



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOKTORA
TEZİ**

**HAVA YOLU İLE BULAŞAN BAZI BAKTERİYEL
ETKENLERE KARŞI İGY TEKNOLOJİSİNE
DAYALI KLİMA FİLTRE SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

ALİ HUSSEİN M. AFANDI

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

HAZİRAN 2019



**HAVA YOLU İLE BULAŞAN BAZI BAKTERİYEL ETKENLERE KARŞI
İgY TEKNOLOJİSİNE DAYALI KLİMA FİLTRE SİSTEMİNİN
GELİŞTİRİLMESİ**

Ali Hussein M. AFANDI

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2019

Ali Hussein M. AFANDI tarafından hazırlanan "HAVA YOLU İLE BULAŞAN BAZI BAKTERİYEL ETKENLERE KARŞI IgY TEKNOLOJİSİNE DAYALI KLİMA FİLTRE SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından **OY BİRLİĞİ** ile Gazi Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof.Dr.Funda DOĞRUMAN AL

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Başkan : Prof. Dr. Serdar DİKER

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

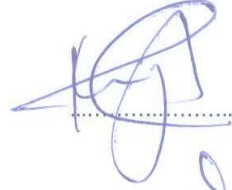
Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof.Dr. Kayhan ÇAĞLAR

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof.Dr.A. Esin AKTAŞ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yıldırım Bayezit Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Üye : Prof. Dr. Işıl FİDAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Doktora Tezi olduğunu onaylıyorum



Tez Savunma Tarihi :10/06/2019

Jüri üyeleri tarafından Doktora tezi olarak uygun görülmüş olan bu tez Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mustafa ASLAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Ali Hussein M. AFANDI

10/06/2019

HAVA YOLU İLE BULAŞAN BAZI BAKTERİYEL ETKENLERE KARŞI IgY TEKNOLOJİSİNE DAYALI KLİMA FİLTRE SİSTEMİNİN GELİŞTİRİLMESİ (Doktora Tezi)

Ali Hussein M. AFANDI

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Haziran 2019

ÖZET

Çalışmamızda, nozokomiyal pnömoni etkeni olarak sık tanımlanan, *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae* bakterileri kullanılarak hazırlanan antijenleri tavukların kas içine enjekte edilerek immünizasyonları gerçekleştirilmiştir ve antikorların etkinliği ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. İmmünizasyon sonrası bakterilere karşı oluşan IgY antikorlarının saflaştırılması ve elde edilmesi için PEG 6000 kullanılmıştır. Elde edilen IgY antikorlarının etkinliği ELISA yöntemiyle tanımlandıktan sonra spesifik IgY antikorlar cam elyaf yapısına sahip olan filtreye capture ELISA yöntemi kullanılarak sabitlenmiştir. Her bakteri için geliştirilen IgY bazlı filtrelerin bakteri yakalama kapasitesini test etmek için anti-bakteri IgY içeren ve antikor içermeyen filtreler üzerine dört defa 1-20 dakika aralıkla bakteriler püskürtülmüştür ve filtrelerin arkasına konulan besiyerlerinde (kanlı agar ve EMB) koloni sayımı yapılmıştır. *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* ile immunize edilmiş ve edilmemiş tavukların IgY antikorları arasındaki OD değerleri farklı dilüsyonlarda (1/100 ve 1/1000) karşılaştırıldığında; immunize olan tavukların yumurtalarından izole edilen IgY antikorların OD değerlerinin ODC değerinden daha yüksek olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae*'a karşı geliştirilen spesifik IgY antikorlarının bakteri yakalama kapasitesini test etmek için IgY antikorları farklı konsantrasyonlarda hazırlanarak (100, 200, 300, 400, 500 ve 750 µg/ml) filtreler kaplanmıştır. Bakteri konsantrasyonları 5×10^4 , 3×10^7 , 6×10^7 , 7.5×10^7 , 1.5×10^8 , 3.0×10^8 , 4.5×10^8 ve 6.0×10^8 cfu/ml olarak hazırlanmıştır. Püskürtme işlemi 1- 20 dakika aralıklarla test edilmiştir. Anti-*S.aureus* IgY içeren filtrelerde üreyen ortalama koloni sayısı 10 iken antikor içermeyen filtre arkasında 540 koloni sayılmıştır, anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtrede a 5-10 koloni saptanırken antikor içermeyen filtrede üreyen koloni sayısı 837 olarak sayılmıştır. Püskürtülen en uygun *S.aureus* bakteri konsantrasyonu 2×10^5 cfu/ml yoğunluğundayken *P.aeruginosa* bakteri konsantrasyonu 5×10^4 cfu/ml yoğunluğunda saptanmıştır. En etkili antikor konsantrasyonu anti-*S.aureus* IgY ve anti-*P.aeruginosa* IgY antikor içeren filtrelerde 500 µg/ml saptanmıştır ve en uygun zamanın ise 10 dakika olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p<0.05$). Optimizasyon çalışmaları süresince anti-*K.pneumoniae* IgY konsantrasyonları ve püskürtme süreleriyle elde edilen sonuçlar arasında tutarsız bulgular saptanmıştır. Bu nedenle anti-*K.pneumoniae* IgY ile hazırlanan filtreler ile sonuç alınmamasının; I: immünizasyon sonrası etkili IgY oluşumunun olmaması, II: antijen hazırlanmasından kaynaklanan nedenlere bağlı olabileceği, III: antijen eldesi için kullanılan suşa bağlı olabileceğini kaynaklandığı düşünülmektedir. Çalışmamızda elde edilen veriler nozokomiyal pnömoni etkeni olarak sık izole edilen bakterilere karşı tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının etkinliğinin yüksek olduğunu göstermiştir. IgY antikorlarının gelecekte tanı, tedavi ve endüstriyel kullanımda özellikle anti-mikrobiyal maske ve biyofiltre geliştirilmesinde etkin olarak kullanılabileceği düşüncesine varılmıştır.

Bilim Kodu : 1.037
Anahtar Kelimeler : IgY Antikor, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, Biyofiltre, Etkinlik, ELISA
Sayfa Adedi : 95
Danışman : Prof.Dr. Funda DOĞRUMAN AL

DEVELOPMENT AIR CONDITIONING FILTER BASED ON IgY TECHNOLOGY
AGAINST THE SOME BACTERIAL INFECTION THAT TRANSMITTED BY AIRWAY
(Ph. D Thesis)

Ali Hussein M. AFANDI

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
July 2019

ABSTRACT

In this study, our aim is to produce IgY antibodies against bacteria of *S. aureus*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa* which commonly identified as the cause of nosocomial pneumonia, and to investigate the efficiency of the produced antibodies using ELISA method. Immunization of chicken was performed using *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* bacteria were immunized through intramuscular injection. PEG 6000 procedure was used for the isolation and purification of IgY antibodies synthesized by immunized hens against bacteria. In that, it is used to fix the specific IgY antibodies to the glass fiber filter using capture ELISA method. An IgY based filter was developed for each bacteria and tested according to bacterial capture capacity; anti-bacteria IgY and antibody-free filters sprayed with bacteria four times between 1-20 minutes. IgY antibodies isolated from hens were compared in order to determine OD values with ELISA method. In both dilutions (1/100 and 1/1000) IgY OD values of hens were immunized with *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* observed to be higher than the calculated cutoff value (ODC) ($p < 0.05$). Developed filters were coated with specific IgY antibodies at different concentrations of (100, 200, 300, 400, 500 and 750 $\mu\text{g/ml}$) against *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae*. Bacterial concentrations were prepared at 5×10^4 , 3×10^7 , 6×10^7 , 7.5×10^7 , 1.5×10^8 , 3.0×10^8 , 4.5×10^8 ve 6.0×10^8 cfu/ml. The spraying process was tested during the periods of 1-20 minutes. Filters efficiency was determined by placing blood agar and EMB behind the filters and then counting the colonies grown on the media. The number of *S. aureus* colonies in antibody-containing filter found to be 10 while the antibody-free filter were 540 colonies. According to the results of several testing scenarios in this study, the optimal bacteria concentration was found to be 2×10^5 cfu/ml, antibody concentration was 500 $\mu\text{g/ml}$, and ideal spraying time is 10 minutes. These results have been found to show a statistical difference of $p < 0.05$. Regarding anti-*P. aeruginosa*, the antibody-containing filter number of colonies was between 5-10 while the antibody-free filter were 837 colonies. The ideal bacteria concentration was 5×10^4 cfu/ml while antibody concentration was 500 $\mu\text{g/ml}$, with optimal spraying time of 10 minutes. These results showed statistical difference of $p < 0.05$. However, anti-*K. pneumoniae* with and without IgY antibodies filter showed an inconsistent results. We think it could be one of the following reasons; (I) no effective IgY formation after immunization, (II) due to the antigen preparation to reasons attributable, and (III) could be the strain used for obtained antigen. In contrast, the data obtained from different study shows that high efficacy of IgY antibodies isolated from chickens against bacteria which are commonly identified as the cause of nosocomial pneumonia. Therefore, it is concluded based on the results of this study that IgY antibodies can/and will be largely and actively used for the purposes of diagnosis and treatments, especially in the development of antimicrobial masks and biofilters.

Science Code : 1.037
Keywords : IgY Antibody, Biofilter, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, Efficiency, ELISA
Page Number : 95
Supervisor : Prof.Dr. Funda DOĞRUMAN AL

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca akademik bilgisini ve deneyimleri ile her zaman yanımda olan, beni araştırmaya yönlendiren, teşvik eden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli hocama. Prof. Dr. Funda DOĞRUMAN AL' a, sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Bilgileri ile bana yardımcı olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nın değerli öğretim üyeleri hocalarıma manevi desteklerini eksik etmeyen hocalarıma teşekkür ederim. Çalışmalarım sırasında bana gösterdiği hoşgörü, ilgi ve desteklerinden dolayı akademik hayatın devam etmesi ve olgunlaşmasında maddi, manevi her türlü desteği veren Yurtdışı Türkler ve Akraba Topluluklar Başkanlığı'na, Türkmeneli Kültür Merkezi'ne ve Türkmeneli Vakfı'na ayrıca öğrenim hayatım boyunca her türlü zorluğa rağmen hiçbir desteği benden esirgemedi bugünlere gelmeme vesile olan sevgili annem Faeza AFANDİ'ye sevgili babam Hussein AFANDİ'ye, sevgili erkek ve kız kardeşlerime içtenliğimle teşekkür ederim. Doktora süresinde çalışmam için harcadığım zamanlar nedeniyle onlara katamadığım anılar ve gösteremediğim ilgi için hiç şikayetçi olmayan hayat arkadaşım, sevgili eşim Zemfira AFANDİ'ye ve biricik oğlum BARIŞ'a sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

Ali Hussein M. AFANDI

Haziran, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Enfeksiyon.....	5
2.2. Hastane Enfeksiyonları	5
2.3. Pnömoni	6
2.3.1. Epidemiyoloji.....	7
2.3.2. Bulaşma yolları ve patogenez	8
2.4. Hastanede Gelişen Pnömoni Etkenleri.....	9
2.4.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
2.4.2. <i>Staphylococcus aureus</i>	12
2.4.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
2.4.4. Pnömoni etkenlerine yönelik enfeksiyon kontrolü	18
2.4.5. Hava filtreleri	18
2.4.6. Filtrasyon	18
2.4.7. Filtre malzemeleri	19
2.4.8. IgY antikoru	20

	Sayfa
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Çalışma Amaç	29
3.2. Bakterilerin Kültürlerinin Yapılması ve Antijen Elde Edilmesi	29
3.2.1. Uygulama	29
3.3. Tavuklar ve İmmünizasyon	34
3.3.1. Uygulama	36
3.4. IgY Antikorlarının Elde Edilmesi ve Saflaştırılması	37
3.4.1. Uygulama	38
3.5. ELISA Yöntemi ile IgY Antikorlarının Etkinliğinin Belirlenmesi.....	43
3.5.1. ELISA çalışmasında kullanan solüsyonlar.....	43
3.5.2. Antijen hazırlaması	43
3.5.3. Testin çalışılması.....	44
3.5.4. Cutoff değerinin hesaplanması.....	44
3.6. Filtrelere IgY antikorunun İmmobilize Edilmesi	44
3.6.1. Uygulaması	44
3.7. Püskürtme İçin Bakteri Hazırlanışı	46
3.7.1. Uygulama	46
3.8. Kabin Tasarımı.....	47
3.9. Filtre Etkinliğinin Belirlenmesi.....	49
3.9.1. Uygulama	50
3.10. İstatistiksel Analiz	51
4. BULGULAR	53
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
KAYNAKLAR	87

	Sayfa
EKLER.....	93
EK-1.Etik Kurul Raporu	94
ÖZGEÇMİŞ.....	95



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Nozokomiyal pnömonide rol oynayan mikroorganizmalar	7
Çizelge 2.2. İgY ve İgG arasındaki yapısal fark	22
Çizelge 3.1. İmmunize edilen tavuk gruplarının dağılımı	35
Çizelge 3.2. McFarland yöntemiyle sayım	46
Çizelge 4.1. Çalışmamızda kullanılan bakterilere karşı elde edilen IgY antikor düzeyleri	53
Çizelge 4.2. Çalışmamızda kullanılan bakterilere karşı elde edilen IgY antikorunun farklı dilüsyolardaki optik dansite (OD), cutoff (ODC) ve p değerleri.....	53
Çizelge 4.3. Anti- <i>S.aureus</i> IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı ...	57
Çizelge 4.4. Anti- <i>P.aeruginosa</i> IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı.....	61
Çizelge 4.5. Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı.....	64

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Hastanede gelişen pnömoninin bulaş yolları	9
Şekil 2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 'nın sınıflandırması.....	10
Şekil 2.3. IgY molekülünün genel yapısı.....	22
Şekil 2.4. IgY ve IgG antikorlarının molekü karşılaştırılması.....	23
Şekil 2.5. Piyasada var olan ticari olarak kullanıma sunulmuş anti- <i>H.pylori</i> IgY içeren yoğurt.....	26
Şekil 3.1. <i>Staphylococcus aureus</i> otomatize sistem antibiyogram test sonucu	31
Şekil 3. 2. <i>P. aeruginosa</i> otomatize sistem antibiyogram test sonucu.....	32
Şekil 3.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> otomatize sistem antibiyogram m test sonucu	32
Şekil 4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ile immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikor (1/100 ve1/1000 dilüsyonlardaki) OD değerlerinin karşılaştırılması	54
Şekil 4.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ile immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikor (1/100 ve1/1000 dilüsyonlardaki) OD değerlerinin karşılaştırılması	55
Şekil 4.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ile immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikor (1/100 ve1/1000 dilüsyonlardaki) OD değerlerinin karşılaştırılması	56
Şekil 4.4. Anti- <i>S.aureus</i> IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı	58
Şekil 4.5. Anti- <i>P.aeruginosa</i> IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı.....	61
Şekil 4.6. Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı.....	64

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterilerinin mikroskopik görünümü.....	11
Resim 2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> kolonilerinin kanlı agarda görünümü	11
Resim 2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> biyokimya testi sonuçları.....	12
Resim 2.4. <i>Staphylococcus aureus</i> bakterilerinin mikroskopik görünümü	13
Resim 2.5. <i>Staphylococcus aureus</i> bakterisinin kanlı agarda kültür görünümü.....	14
Resim 2.6. <i>Staphylococcus aureus</i> biyokimya testi sonuçları	14
Resim 2.7. <i>Klebsiella pneumoniae</i> bakterilerinin mikroskopik görünümü	16
Resim 2.8. <i>Klebsiella pneumoniae</i> kolonilerinin kanlı agarda görünümü.....	16
Resim 2.9. <i>Klebsiella pneumoniae</i> biyokimya testi sonuçları	17
Resim 2.10. Sentetik filtre örnekleri	19
Resim 2.11. Cam elyaf filtre örneği.....	20
Resim 2.12. IgY'nin <i>Helicobacter pylori</i> hücreler bağlanmasının engellemesi	25
Resim 2.13. IgY'nin <i>Pseudomonas aeruginosa</i> hücreler bağlanmasının engellemesi...	25
Resim 2.14. IgY'nin <i>E. coli</i> hücreler bağlanmasının engellemesi.....	26
Resim 2.15. Piyasada var olan ticari olarak kullanıma sunulmuş anti-influnza IgY bazlı filtre içeren klima	27
Resim 2.16. Ticari olarak kullanıma sunulmuş anti-influenza IgY bazlı filtre içeren maske (anti /H1N1 ve H5N1) Güney Kore.....	27
Resim 3.1. Bakterilerin saklanması için kullanılan mikrobank tüpleri.....	30
Resim 3.2. Çalışmada bakteri üretilmesi için kullanılan kanlı agar besiyerleri.....	30
Resim 3.3. Çalışmada bakteri üretilmesi için kullanılan EMB besiyerleri.....	31
Resim 3.4. <i>Staphylococcus aureus</i> kolonilerinin kanlı agarda görünümü.....	33
Resim 3.5. <i>P. aeruginosa</i> kolonilerinin kanlı agarda görünümü	33
Resim 3.6. <i>Klebsiella pneumoniae</i> kolonilerinin EMB besiyerinde görünümü	33
Resim 3.7. Nanodrop spektrofotometr cihazı	34

Resim	Sayfa
Resim 3.8.Çalışmamızda kullanılan Lohmann Brown cinsi tavuk	35
Resim 3.9. Çalışmamızda kullanılan tavukların barındığı kafesler	35
Resim 3.10. Tavuk immunizasyonlarının yapılması.....	36
Resim 3.11. Tavuklardan toplanan yumurtaların +4 °C’de saklanma koşulu.....	37
Resim 3.12. %70 alkol ile yumurtanın dezenfeksiyon	38
Resim 3.13. Yumurta sarısının filtre kağıdında beyaz kısımdan ayrılması	38
Resim 3.14. Yumurta ve PEG 6000 karışımının vortekslenmesi	39
Resim 3.15. Ultrasantrifüj cihazında tüplerin santrifüj işlemi	39
Resim 3.16. Santrifüj işleminden sonra süpernatantın filtrasyonu	40
Resim 3.17. Filtrasyonu sonrası oluşan süpernatant ve %8,5 PEG 6000 karışımının vortekslenmesi	40
Resim 3.18. Örneklerin dönen silindir mikserde (Thermo, ABD) karıştırılması	41
Resim 3.19. IgY içeren son pellet oluşumu	41
Resim 3.20. Elde edilen antikorların mikrodializ kapsülüne eklenmesi.....	42
Resim 3.21. Antikorların ayrıştırılması için %0,1 NaCl çözeltisinde manyetik karıştırıcıyla gece boyu diyaliz işleminin yapılması.....	42
Resim 3.22. Kullanılan cam elyaf filtresi	45
Resim 3.23. Filtrelerin antikorlarla kaplama işlemi.....	45
Resim 3.24. MacFarland okuyucusu ile bakteri konsantrasyonların ayarlanması.....	46
Resim 3.25. Püskürtme kabı	47
Resim 3.26. İç kabin tasarlama aşaması	48
Resim 3.27. Dış kabin tasarlama aşaması.....	48
Resim 3.28. Test kabının son hali	49
Resim 3.29. İç ve dış kabinin tasarım aşamasında belirlenen ölçümlerinin detayları	49
Resim 3.30. Bakteri püskürtülmesi için kullanılan nebulizatör cihazı	50
Resim 3.31. Kabinde nebulizatör ile bakterilerin püskürtme işlemi.....	51

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Anti- <i>S.aureus</i> IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (B). Kaplanan anti- <i>S.aureus</i> antikor konsantrasyonu 200 µg/ml ve püskürtülen <i>S.aureus</i> yoğunluğu 6×10^7 cfu/ml olarak kullanılmıştır.....	58
Resim 4.2. Anti- <i>S.aureus</i> IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (B). Kaplanan anti- <i>S.aureus</i> antikor yoğunluğu 500 µg/ml ve püskürtülen <i>S.aureus</i> konsantrasyonu 3×10^7 cfu/ml olarak ayarlanmıştır	59
Resim 4.3. Anti- <i>S.aureus</i> IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (B). Kaplanan anti- <i>S.aureus</i> yoğunluğun 500 µg/ml ve püskürtülen <i>S.aureus</i> konsantrasyonu 2×10^5 cfu/ml'dır	59
Resim 4.4. Anti- <i>S.aureus</i> IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agarlar (A) anti- <i>S.aureu</i> içeren filtre antikor konsantrasyonu 200 µg/ml, <i>S.aureus</i> bakteri konsantrasyonu 6×10^7 cfu/ml ve (B) anti- <i>S.aureus</i> içeren filtre antikor konsantrasyon 500 µg ve <i>S.aureus</i> bakteri yoğunluğu 3×10^7 cfu/ml ile püskürtülmüştür	60
Resim 4.5. Anti- <i>P.aeruginosa</i> IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki tam üreme (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki tam üreme (B). Kaplanan anti- <i>P.aeruginosa</i> IgY antikor konsantrasyonu 200 µg/ml ve <i>P.aeruginosa</i> yoğunluğu 1.5×10^8 cfu/ml olarak püskürtülmüştür	62
Resim 4.6. Anti- <i>P.aeruginosa</i> IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki 7 koloni sayılmıştır (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki tam üreme (B). Kaplanan anti- <i>P.aeruginosa</i> antikor konsantrasyonu 500 µg/ml ve <i>P.aeruginosa</i> konsantrasyonu 3×10^7 cfu/ml olarak püskürtülmüştür	62
Resim 4.7. Anti- <i>P.aeruginosa</i> IgY içermeyen filtre arkasına konulan EMB plağındaki tam üreme (A) ve antikor içeren filtrenin arkasına konulan EMB plağındaki üreme (B). Kaplanan anti- <i>P.aeruginosa</i> IgY antikor konsantrasyonu 500 µg/ml ve <i>P.aeruginosa</i> yoğunluğu 5×10^4 cfu/ml olarak kullanılmıştır.....	63
Resim 4.8. Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme saptanmamıştır Kaplanan anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY antikor konsantrasyonu 500 µg/ml ve <i>K.pneumoniae</i> 1.5×10^8 cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür	65

Resim	Sayfa
Resim 4.9. Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağında üreme saptanmamıştır. Kaplanan anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY antikor konsantrasyonu 500 µg/ml ve <i>K.pneumoniae</i> 3.0x10 ⁸ cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür.....	66
Resim 4.10. <i>K.pneumoniae</i> püskürtülürken iç (A) ve dış (B) kabine konulan kanlı agarda koloni üremesi görülmemiştir. Bakteri konsantrasyonu 3.0x10 ⁸ cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür	67
Resim 4.11. Kaplanan anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY antikor konsantrasyonu 750 µg/ml ve <i>K.pneumoniae</i> 3.0x10 ⁸ cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür. Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağında tam üreme saptanmıştır.....	68
Resim 4.12. Kaplanan anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY konsantrasyonu 750 µg/ml ve püskürtülen <i>K.pneumoniae</i> 4.5x10 ⁸ cfu/ml yoğunluğunda yapılmıştır Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağında tam üreme saptanmıştır.....	69
Resim 4.13. Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki tam üreme izlenmiştir Kaplanan anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY antikor konsantrasyonu 500 µg/ml ve <i>K.pneumoniae</i> 6.0x10 ⁸ cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür	70
Resim 4.14. Kaplanan anti- <i>K.pneumoniae</i> antikor konsantrasyonu 750 µg/ml ve püskürtülen <i>K.pneumoniae</i> 4.5x10 ⁸ cfu/ml yoğunluğunda yapılmıştır. Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agarda 400-700 koloni (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına tam üreme (B) görülmüştür	71
Resim 4.15. Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plaklarında üreme saptanmamıştır Kaplanan anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY antikor konsantrasyon 500 µg/ml ve <i>K.pneumoniae</i> 3.0x10 ⁸ cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür.....	72
Resim 4.16. Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plaklarında tam üreme görünmüştür Kaplanan anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY antikor konsantrasyon 500 µg/ml ve <i>K.pneumoniae</i> 3.0x10 ⁸ cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür	73

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklamalar
μ l	Mikrolitre
$^{\circ}$ C	Sıcaklık
C	Sabit Bölge
cfu	Colony forming unit
cm	Santimetre
cm ²	Santimetrekare
gr	Gram
H	Ağır zinciri
kDa	Kilodalton
kg	Kilogram
L	HAfif zinciri
m ²	Metrekare
m ³	Metreküp
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
pH	Power of hydrogen
rpm	Revolutions per Minute
U	Üpsilon
V	Değişken Bölge
Mm	Mikrometre
μ m	Mikrometre

Kısaltmalar	Açıklamalar
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (The American Type Culture Collection)
BSA	Bovine Serum Albumin

Kısaltmalar	Açıklamalar
CDC	Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention)
ECVAM	European Centre for the Validation of Alternative Methods
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
EMB	Eosin Methylene Blue
Fc	Hücreye bağlanma bölgesi
HE	Hastane enfeksiyonları
HEPA	High efficiency particulate air
HGP	Hastanede gelişen pnömoni
HIV	İnsan immün yetmezlik virüsü
K1,K2,...	Kapsül antijen tipleri
KNS	Koagülaz negatif stafilokoklar
MRSA	Metisiline dirençli <i>S. aureus</i>
MSSA	Metisiline duyarlı <i>Staphylococcus aureus</i>
NaCl	Sodyum Klorür
NNIS	National Nosocomial Infection Surveillance
OD	Optik dansite
ODC	Cut off
PBS	Phosphate Buffer Solüsyonu
PEG	Polyethylene glycol
pNPP	Paranitrofenil fosfat
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate
YBÜ	Yoğun bakım ünitesi
PBS-T	PBS/Tween20

1. GİRİŞ

Enfeksiyonlar, vücuda çeşitli yollardan bulaşan mikroorganizmalarla ortaya çıkmaktadır. Enfeksiyon etkenler ise; bakteri, virüs, mantar ve parazitler gibi mikroorganizmalardır [1]. Ancak bu etkenlerin arasında enfeksiyon hastalıklarına en sık neden ve tedavi açısından zor olan enfeksiyonlar bakteri kaynaklı olanlardır [1]. Hastalıklara neden olan mikroorganizmalar vücuda çeşitli yollarla girmektedirler ve en sık görülen üç temel yayılma yolu ile bulaşmaktadır. Birincisi damlacık yolu ile ($>5 \mu\text{m}$ çaplı enfekte partiküller) bulaş daha çok yaklaşık bir metreden daha yakın mesafelerde oluşabilmektedir [1]. Enfekte hastanın öksürmesi, hapşırması, konuşması veya aspirasyon, bronkoskopi gibi işlemler sırasında oluşmaktadır. İkincisi ise temas yolu ile yayılım en sık görülen bulaş yoludur. Direkt veya indirekt olabilir. Direkt temas hastadan hastaya temasla olabilmektedir. Cilt cilde temasla veya delici alet yaralanmaları ile bulaşmaktadır. Hava veya solunum yolu ile yayılım $<5 \mu\text{m}$ çaplı enfekte partikül içeren ve uzun süre havada asılı kalabilen enfekte damlacıkların diğer hastalar tarafından solunması ile bulaşmaktadır [1]. Solunum yolu enfeksiyonlarında bulaşma etkenin dış ortamda canlı kalabilme özelliğine göre doğrudan ya da dolaylı yol ile olabilmektedir. Doğrudan bulaşma etkenin, kişiden kişiye yakın temas sonucu damlacık yolu ile geçmektedir, dolaylı bulaşma ise havada asılı kalan damlacık çekirdeğinin solunması ile bulaşmaktadır [2]. Hava yoluyla bulaşan hastalıkların evin aynı katta farklı odalar ve aynı binada farklı daireler arasında yayılabildiği görülmektedir [2]. Aynı ortamda bulunan enfekte kişiden, nefes alma, konuşmak, öksürmek ve hapşırma gibi insan solunum aktiviteleri ile hastalık bulaşmaktadır. Havada bulunan damlacıklar uzun süre kalabilmekte ve hava akımıyla uzak mesafelere taşınabilmektedir [2]. Yapılan araştırmalarda, havada tespit edilen mikroorganizmaların % 80 bakteri iken ikinci sırada mantar ve diğer canlılar üçüncü sırada yer almaktadırlar. Göğüs yoğun bakım, cerrahi yoğun bakım ve acil serviste yapılan hava taramasında %80-90 arasında bakteri, %10-15 arasında mantar ve %5 civarında virüs saptanmıştır [3]. Bu çalışmada kültür yöntemleri ve moleküler yöntemlerle bakteri konsantrasyonu $10 - 10^7$ bakteri / m^3 olarak tespit edilmiştir [3]. Hava ve solunum yoluyla bulaşan hastalıklar; grip, nezle, tonsillit, bronşit, faranjit, otit ve pnömoni olarak ortaya çıkmaktadır [4]. Hastane enfeksiyonları (HE) genel olarak farklı hastalık nedenleriyle hastaneye yatan bir hastada, hastaneye başvurduğunda bulunmayan, kuluçka döneminde olmayan ve hastaneye yattıktan 48-72 saat sonra gelişen veya taburcu olduktan sonra 10 gün içinde ortaya çıkan enfeksiyonlardır [1]. Hastane enfeksiyonları yataklı tedavi kurumlarının hizmet kalitesinin göstergesidir [1]. Hastane enfeksiyonları, hastanede kalış süresinin

uzaması, mortalite ve morbiditenin artması, tedavi süresinin uzaması gibi sorunları da beraberinde getirmektedir [5]. Hastane hava kirliliği, havada bulunan katı ve sıvı uçuşan maddelerdir ve bunların kaynağı, doğanın yapısında bulunan ve rüzgar gibi olayları ile dağılan toz ve polenler iken diğerleri yine doğada bulunan bakteri, virüs ve mantarlar olarak bilinmektedir. Bunun yanı sıra gelişen sanayi ve teknolojiye bağlı kirlenmenin getirmiş olduğu yük çok daha fazladır. Dış hava, ortalama 10^7 - 10^9 arası $0.5 \mu\text{m}$ partükül içermektedir [6]. Steril ortamlardaki kirlilik ise ortamdaki cihaz ve insanlardan kaynaklanır, ancak bir steril alan içinde en önemli faktör olan yine insan olduğu bildirilmektedir. İnsan vücudundan dakika içinde, 10^3 'in üzerinde bakteri ve mantar saçılırken çapı $0.3 \mu\text{m}$ olan 10^5 adet toz parçacığı yaymaktadır [6]. Ameliyathane havasında bulunan mikroorganizma sayısı ile ameliyattan sonra gelişen enfeksiyon oranları arasında doğru bir bağlantı olduğu saptanmıştır, özellikle *Staphylococcus aureus* sayısının 1 m^3 'lük hacimde 750-1500 arasında olabildiği bildirilmektedir, fakat özel hava akımları kullanarak bu oranın azaldığı saptanmıştır [6].

Pnömoni: sıklıkla akciğer dokusunun bakteri, virüs, mantar ve diğer mikroorganizmalara karşı yanıt olarak akciğer parankiminde (alveol ve interstisyum) gelişen akut bir inflamasyondur. Pnömoni; toplum kökenli, hastane kökenli ve bağışıklığı baskılanmış olanlarda görülen pnömoni şeklinde olabilmektedir [4]. Hastanede gelişen pnömonilere %80-90 bakteriler ve %10-20 virüsler neden olmaktadır. Mantarlar olguların %1'ine yakın kısmında neden iken, *Candida* türleri ve *Aspergillus* türleri en sık izole edilen mantarlardır [7].

Hastanede gelişen pnömoni (HGP), genellikle hastaneye yatıştan 48 saat sonra gelişen ve hastanın yatışında inkübasyon döneminde olmadığı bilinen pnömoni olguları ile, hastaneden taburcu olduktan sonraki 48-72 saat içerisinde ortaya çıkan pnömoni olarak tanımlanmaktadır [4, 8]. Hastanede gelişen pnömoniler, hastane enfeksiyonlarında birinci veya ikinci sırada yer almaktadır. HGP, hastane enfeksiyonları ile ilişkili ölümlerin %60'na neden olmaktadır, en çok etkilenen grupta ise; 2-12 ay arasındaki çocuklardır. Hastanede yatan hastaların %0.5-1'inde, yoğun bakım birimlerine yatan hastaların %15-20'sinde HGP geliştiği bildirilmektedir [4]. Toplum kökenli pnömonilerde ölüm oranında son 50 yılda %97'lik bir azalma sağlanabilmiş olmasına karşın, HGP'de mortalite hala %30-33 arasındadır [4].

Pnömoninin öksürük, balgam, nefes darlığı ve göğüs ağrısı gibi semptomları görülmektedir [9]. Türkiye’de HGP saptanan olgularda ortalama mortalite oranı %30-87 arasında değişmektedir [10, 11]. Hastalarda pnömoni gelişmesinin yoğun bakım birimi hastalarında mortaliteyi üç kat artırdığı gösterilmiştir [12]. HGP olgularının gelişmesinin hastanede kalış süresinin uzattığı ve hastane maliyetlerinin 4-5 kat artmasına neden olduğu bildirilmektedir. HGP gelişiminde mikroorganizmalar alt solunum yollarına başlıca üç yoldan bulaşmaktadır. Birincisi orofarinkste kolonize mikroorganizmaların spirasyonu, ikincisi ise inhalasyon yolu (5 µm’den küçük ve mikroorganizma içeren partiküllerin inhalasyon yolu ile alt solunum yollarına ulaşması sonucu da HGP gelişebilmektedir) ve üçüncüsü hematogen yoldur [13, 14].

Hastane kökenli pnömoni başlangıç zamanlarına göre erken ve geç başlangıçlı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Pnömonilerin erken başlangıçlı olanlarında; *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumonia*, metisiline duyarlı *Staphylococcus aureus* (MSSA), *Mycoplasma pneumoniae* gibi mikroorganizmalar etken olarak tanımlanmaktadır. Geç başlangıçlı pnömonilerde ise dirençli *Pseudomonas* türleri, *Klebsiella* türleri, Gram-negatif enterik basiller ve metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve anaerob bakteriler etken olarak tespit edilmektedir. Nozokomiyal salgınlarda ayrıca *Acinetobacter* türleri, *Stenotrophomonas maltophilia* gibi nadir etkenler de patojen olarak tespit edilebilmektedir [7, 15, 16].

Normal şartlarda özellikle steril alan klimatizasyonu sağlayan sistemlerde koruyucu ön filtreler ve HEPA filtreler mevcut olsa bile bunların uygun olmayan kullanım ve bakımları ile sistemin kendisi enfeksiyon kaynağı olabilmektedir [6]. Bu konuda en başı çeken *Legionella pneumophila* (*L.pneumophila*) dışında benzeri ortamlarda üreyebilecek ve literatür bilgileri ile tespit edilen diğer patojenler; *P.aeruginosa*, *Acinetobacter* türleri (*Acinetobacter baumannii*) gibi etkenlerdir [6]. Ticari olarak hali hazırda kullanıma sunulmuş inorganik antibakteriyel maddeler, gümüş, bakır ya da çinko içeren filtreler güvenlik nedeniyle sınırlı bir şekilde kullanılmaktadır, özellikle gümüş içeren antibakteriyel filtrelerde geniş spektrumlu antibakteriyel özelliğe sahip olmasına rağmen insan ve hayvanlara düşük toksisitesi olduğu bildirilmiştir. Ayrıca gümüş filtrelerde düşük konsantrasyonlarda kullanılığında antibakteriyel etki göstermektedir. Gümüş iyonlarının, ışığa karşı duyarlılığı ve halojen iyonları ile yüksek reaktivite derecesine sahip olmasının yanı sıra antibakteriyel etkisinin azaldığı tespit edilmiştir. Antibakteriyel filtre üretiminde çeşitli organik materyallerin yanı sıra antikorlara dayalı (antijen–antikor bağlanma yeteneği)

filtre **çeşitli** avantajlara sahip olduğu ortaya konulmuştur. Kimyasal yöntemlere göre daha güvenli olmaları, fiziksel yöntemlere göre daha spesifik olmaları ve daha hızlı reaksiyon göstermeleri avantajları arasında yer almaktadır [6, 16-19].

Bu tez çalışmasında, HGP'lerin önlenmesinde yardımcı olacak IgY teknolojisine dayalı klima filtresi geliştirilmesi hedeflenmekte ve bu biyofiltrenin hava yolu ile bulaşan patojenleri kontrol etmede büyük yarar sağlayacağı düşünülmektedir. IgY antikorları: tavukların serum ve yumurta sarısında bulunan antikorlardır. Tavuklarda bulunan bu antikorlar enfeksiyon sırasında mikroorganizmalara karşı üretilen spesifik antikorlardır ve aynı zamanda bu antikorların yumurta sarısına transfer olduğu bilinmektedir. IgY teknolojisi, tavuk yumurtasında antikoru üretmeye ve izole etmeye dayanan bir yöntemdir [19]. HGP'lere sık neden olan *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae* gibi bakterilere karşı IgY antikorunu geliştirmek için Lohmann Brown cinsi tavukları göğüs kas içi yoluyla immunize edildi. Elde edilen IgY antikorlarının etkinliği ELISA yöntemiyle tanımlandı ve spesifik IgY antikorlar cam elyaf yapısına sahip olan filtreye capture ELISA yöntemi kullanılarak sabitlendi ve hazırlanan biyofiltreler elde edilen IgY antikorlarıyla kaplandı. Geliştirilen IgY bazlı filtrelerin bakteri yakalama kapasitesini test etmek için bakteri süspansiyonları filtre üzerine püskürtüldü.

Bu tez çalışması ile geliştirilecek olan biyofiltrelerin HGP'inin önlenmesinde önemli rolü olacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enfeksiyon

Enfeksiyonlar, vücuda çeşitli yollardan bulaşan mikroorganizmalarla (bakteri, virüs, mantar ve parazit) gelişmektedir. Ancak bunlar içinde bakteriden kaynaklı enfeksiyonlar en önemli enfeksiyon türü olarak ortaya çıkmaktadır [1]. Solunum yolu enfeksiyonları, kişiden kişiye direk temas ve damlacık yolu ile bulaşmaktadır [20, 21]. Havanın içerisinde bulunan katı ve sıvı uçuşan maddelerin iki temel kaynağı mevcuttur: birincisi alana dışarıdan giren havanın içinde bulunurlar, bir kısmı doğanın yapısında bulunan ve rüzgar gibi doğa olayları ile yayılan toz ve polen iken, bir kısmı ise yine doğada bulunan bakteri, virüs ve mantarlar olabilmektedir. Dış hava, ortalama 10 milyon ile 10 milyar arası 0.5 µm parçacık içermektedir. İkincisi steril alanın içinde bulunan cihaz ve insanlardan kaynaklanır. Steril alan içinde en önemli faktör insandır. İnsan vücudu yaklaşık olarak 1000/dk'nın üzerinde bakteri ve mantar parçacığı yaymaktadır [6].

2.2. Hastane Enfeksiyonları

Latince nosos (hastalık), komeion (tedavi), nosocomeion sözcüklerinden türetilen “nozokomiyal enfeksiyon” genel olarak enfeksiyon dışında bir nedenle hastaneye başvuran bir hastada hastanede gelişen enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır [7, 9]. Farklı hastalık nedenlerle hastaneye yatan bir hastada, hastaneye başvurduğunda bulunmayan, kuluçka döneminde olmayan ve hastaneye yattıktan 48-72 saat geçtikten sonra gelişen veya taburcu olduktan sonra 10 gün içinde ortaya çıkan enfeksiyonlardır [1]. Bakteri kaynaklı pnömoni en önemli bulaşıcı hastalıklardan biri olup, yaşam kalitesi, mortalite ve toplum üzerinde büyük etkiye sahiptir [7, 9]. Pnömoni; toplum kökenli pnömoni, hastane kökenli pnömoni ve bağışıklığı baskılanmış olanlarda pnömoni olarak görülmektedir [4]. Dünyada ülkelerin çözemediği önemli bir sağlık sorunudur, her yıl milyonlarca kişi hastane enfeksiyonundan etkilenmekte ve hastane enfeksiyonu tüm dünyada sağlık hizmeti sunumunda en çok rastlanan yan etki olarak bilinmektedir [1]. Hastane enfeksiyonları, hastanede kalış süresinin uzaması, uzun süreli iş gücü kaybı yaratmakta, mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara dirençlerinin artmasına neden olmakta, sağlık sistemine ciddi bir ilave maliyet getirmekte, hasta ve ailesi için ciddi bir maliyete sebep olmakta, tedavi süresinin uzaması gibi sorunları mortalite ve morbiditenin artmasını da beraberinde getirmektedir [1].

Hastane enfeksiyonları, hastaneden hastaneye ve hatta hastane içinde değişik servisler arasında bile büyük farklılık göstermektedir. Yapılan bir çalışmada YBÜ’nde 12 aylık dönemde yapılan bir çalışmada, YBÜ’de gelişen enfeksiyonlar; etken mikroorganizmaları, YBÜ’de yatış süresi, mortalite yönünden değerlendirilmiştir. HE tanıları CDC’nin kriterleri esas alınarak konulmuştur. Toplam 119 hasta 1733 hasta günü takip edilmiştir. 51 hastada toplam 75 enfeksiyon atağı gelişmiştir. Kümülatif YBÜ enfeksiyon insidansı %63.0, insidans dansitesi ise 43.2/1000 hasta yatış günü olarak bulunmuştur. En sık idrar yolu enfeksiyonu görülmüştür. Olguların %89.1’ine idrar sondası uygulanmış ve enfeksiyon oranı 1000 sonda gününde 16.9 olarak tespit edilmiştir. İkinci sıklıkta pnömoni (1000 ventilatör gününde 26.1) ve kateter enfeksiyonu (1000 kateter gününde 48) izlenmiştir. Bu süre içinde beyin cerrahi YBÜ’de genel mortalite oranı %28.5 bulunmuştur. YBÜ’de enfeksiyon gelişen hastalarda mortalite anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0.0.001$). Yoğun bakımda yatış süresi, enfeksiyon gelişenlerde daha yüksek bulunmuştur. Birden fazla enfeksiyon atağı gelişen 18 hastanın 10’u kaybedilmiştir. En sık *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri izole edilmiştir [1, 35].

Hastane kaynaklı enfeksiyonlar hastalarda fonksiyonel bozukluklara, duygusal strese, yaşam kalitesinin düşmesine veya ölüme neden olabilmektedir. Ayrıca hastanede yatış süresinin uzaması, iş kaybının ortaya çıkması, ilaç kullanımının artması, izolasyon ihtiyacı olması, ek laboratuvar ya da diğer tanı yöntemlerinin kullanımı gibi nedenlerle ekonomik yükü de artırmaktadır [1].

2.3. Pnömoni

Pnömoni enfeksiyonu, mikroorganizmalara karşı yanıt olarak akciğer parankiminde gelişen akut bir inflamasyondur. Pnömoninin semptomları; öksürük, balgam, nefes darlığı ve göğüs ağrısı olarak ortaya çıkmaktadır. Ayrıca ateş, halsizlik ve iştahsızlık da görülebilmektedir [7, 9].

Pnömoni; toplum kökenli pnömoni, hastanede gelişen pnömoni ve bağışıklığı baskılanmış olanlarda pnömoni şeklinde üç başlık altında sınıflandırılmaktadır [4, 9]. Hastanede gelişen pnömoniye (HGP), ya çok dirençli ya da fırsatçı patojenler neden olmakla birlikte, %80-90’ı bakteriler ve %10-20’si virüslerden kaynaklanmakta ve mantarlar olguların %1’inden

sorumlu olup *Candida* ve *Aspergillus* türleri en sık rastlanan mantarlar olarak tanımlanmaktadır (Çizelge 2.1) [3, 7, 9, 21].

Çizelge 2.1. Nozokomiyal pnömonide rol oynayan mikroorganizmalar

Erken dönem	Geç dönem
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Enterobacter spp.</i>
<i>Moraxella catarrhalis</i>	<i>Acinetobacter spp</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Gram-negatif basiller	<i>Serratia marcescens</i> ve <i>Escherichia coli</i>

Hastanede gelişen pnömoniler, nozokomiyal enfeksiyonlar arasında sıklık açısından ilk sıralarda yer alır ve hastane enfeksiyonlarına bağlı ölümlerin %60'ından sorumludur. En çok etkilenen grupta ise; 2-12 ay arasındaki çocuklardır. Pnömoni görülme sıklığı 65-69 yaş grubunda %18,2 iken, 85 yaş ve üstü grupta neredeyse bunun üç katı oranlara (%52,3) çıkmaktadır. İleri yaş grubunda; KOAH, diyabet, kronik böbrek yetmezliği, konjestif kalp yetmezliği, kronik karaciğer hastalığı gibi altta yatan başka bir hastalığı olanlarda pnömoni daha sık görülmekte ve ağır seyredebilmektedir. Hastanede yatan hastaların %0.5-1'inde, yoğun bakım birimlerine yatan hastaların %15-20'sinde HGP geliştiği bildirilmektedir [4, 21].

2.3.1. Epidemiyoloji

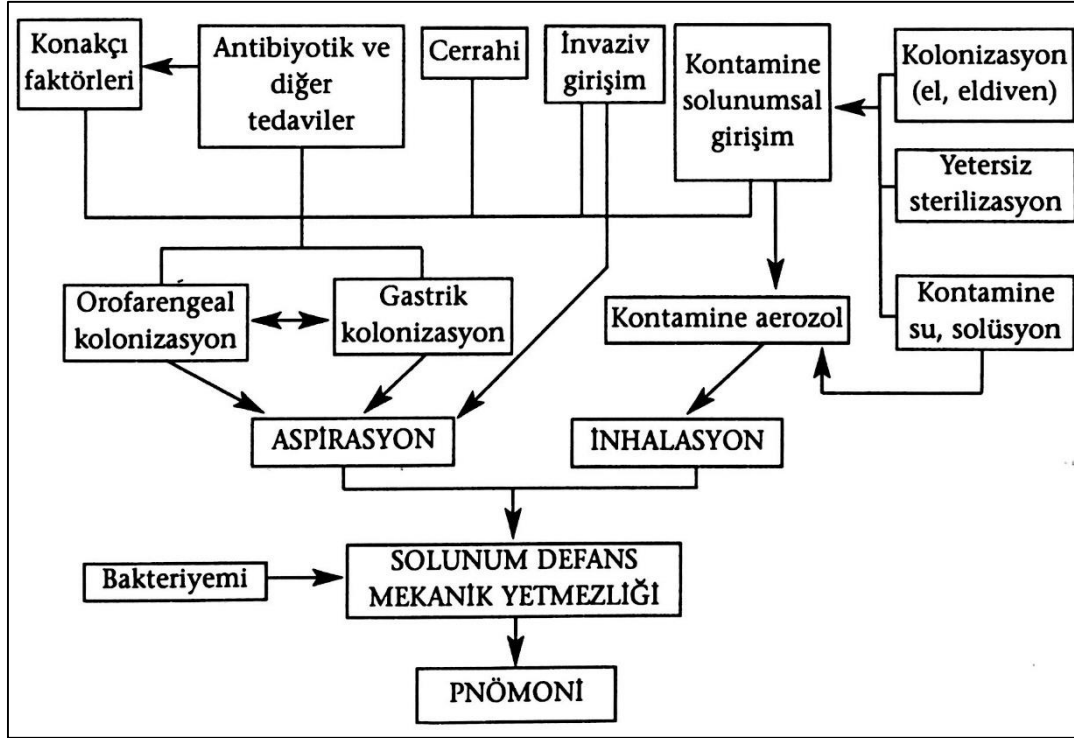
Pnömonilerin Amerika Birleşik Devletleri (ABD)'nde tüm ölüm nedenleri arasında altıncı sırada, enfeksiyon hastalıklarına bağlı ölümler içinde ise ilk sırada yer aldığı bilinmektedir [20, 21, 25]. Hastane enfeksiyonları, bir hastanede ya da hastanenin birkaç servisinde, bir dönemde, olağan kabul edilen oranın üstünde HE'nun görülmesini ifade eder. Yalnız bir epideminin tanımlanması için, o hastanede ya da serviste olağan kabul edilen oranın saptanması gerekmektedir. Hiç enfeksiyon görülmeyen bir serviste ya da enfeksiyon etkeni olarak rastlanmayan bir bakteri ile sadece birkaç hastada ortaya çıkan bir enfeksiyon da "epidemi" olarak kabul edilmektedir [1, 25].

Hastanede genel olarak en sık üriner sistem enfeksiyonu gelişirken, yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) nozokomiyal pnömoni ilk sırada yer almaktadır. Hastane enfeksiyonlarında nozokomiyal pnömoni %0.5-1 sıklıkta görünürken, YBÜ'lerde ise %10-40 sıklıkta gelişmektedir. Mekanik ventilasyon uygulanan kişilerde ise 6-20 kat fazla olduğu bildirilmiştir. National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS) verilerine göre ventilatör

takılan her 1000 hastadan 6.7- 24.1'nin nozokomiyal pnömoni olduğu saptanmıştır. Ancak bu veriler YBÜ'nün tipi ve hastaneye bağlı faktörlere göre değişiklik göstermektedir. Nozokomiyal pnömonide mortalite %20-70 olarak belirtilmektedir [1, 22, 23]. Pensillinin kullanılmaya başlanmasıyla 1940 yılından sonra daha önceki yıllarda nozokomiyal pnömoni etkeni olarak en çok ölüme neden olan bakteri '*Streptococcus pyogenes*' iken, penisilin kullanılmasıyla bu etken azalmıştır. Ancak *Staphylococcus aureus* 1965'li yıllara kadar nozokomiyal enfeksiyonların en çok rastlanan etkeni olmuştur. 1960-1980'li yıllar arasında penisilinaza dirençli penisilinler ve diğer antistafilokokal antibiyotiklerin kullanımı sonucu gram negatif basiller birinci sırada yer almıştır. Günümüzde gram negatif bakterilerin yanı sıra MRSA ve koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), enterokoklar ile *Candida* gibi fırsatçı mayalar nozokomiyal enfeksiyonlarda ilk sıralarda izole edilmektedir [1, 22, 23].

2.3.2. Bulaşma yolları ve patogeneze

HGP oluşumunda mikroorganizmalar alt solunum yollarına başlıca üç yoldan bulaşmaktadır. Orofarinkste kolonize mikroorganizmaların aspirasyonu, inhalasyon ve hematogen yoldur. Ayrıca gastrointestinal sistemden bakteriyel translokasyon (son zamanlarda malignite, yanık ve bağışıklığı kırılmış hastalarda öne sürülen yol) ile alt solunum yollarına geçmektedirler [1, 25, 26]. Enfeksiyonda temel basamak potansiyel patojen mikroorganizmaların yanak mukozasına tutunma yeteneğine sahip olmasıdır. Yapılan araştırmalarda ise fibronektinin bu adezyonu önlediği belirtilmiştir, bazı kritik durumlarda tükürükte fibronektin parçalayan proteazların arttığı durumda adezin kolayca gelişmesine zemin hazırladığı saptanmıştır ve ayrıca *P. aeruginosa* ve *S.aureus* gibi bazı bakterilerin de fibronektini parçalayabildikleri gösterilmiştir. Bakteriyel adezinler ve önceden antibiyotik kullanımı da adezyonu kolaylaştırmaktadır [25, 26]. Kolonize olan etkenin mikroaspirasyon yoluyla akciğer parankimine ulaşmasıyla enfeksiyon meydana gelmekte ve primer endojen, sekonder endojen ve ekzojen kaynaklı olarak ortaya çıkmaktadır [26]. Primer endojen enfeksiyon; yatış sırasında mevcut olan enfeksiyonu, sekonder endojen enfeksiyon; yatış sırasında mevcut olmayan ancak yattığı üniteye kolonize olan mikroorganizmaların akciğer parankimine ulaşmasını ifade etmektedir. Kritik hastalarda kolonizasyon hızı ise % 73'e ulaşmaktadır (Şekil 2.1) [26].



Şekil 2.1. Hastanede gelişen pnömoninin bulaş yolları [26]

2.4. Hastanede Gelişen Pnömoni Etkenleri

2.4.1. *Pseudomonas aeruginosa*

Tarihçe ve sınıflandırma

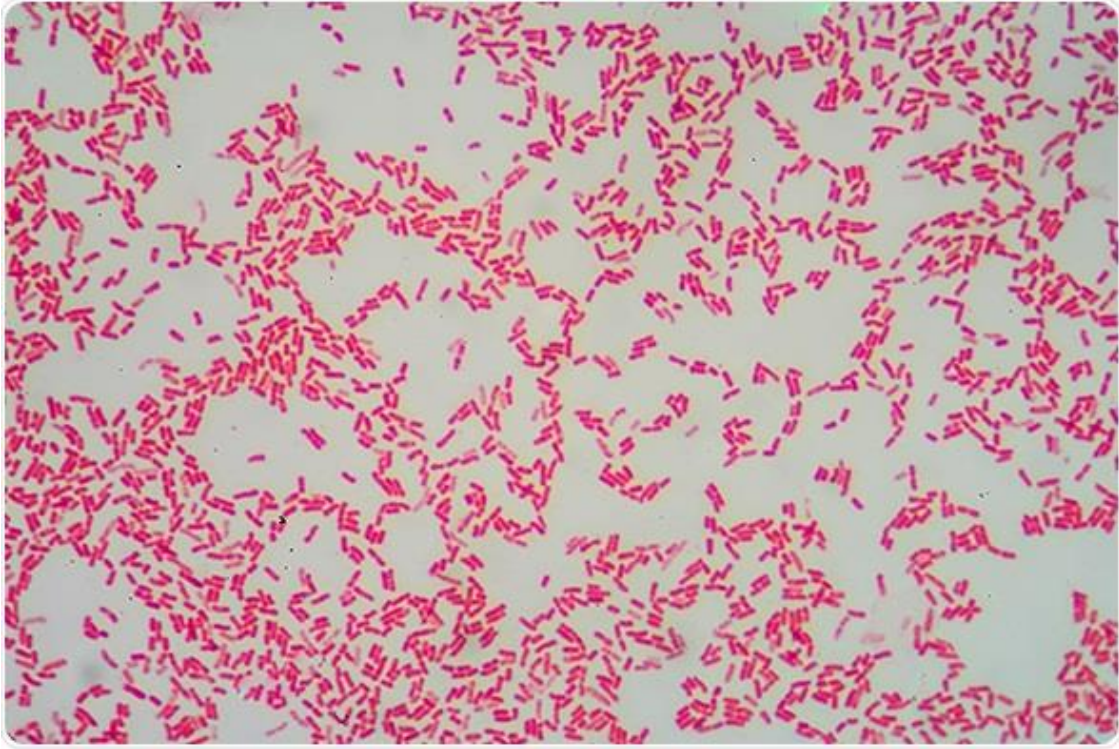
İlk kez Gessard tarafından 1882 yılında mavi yeşil cerahat etkeni olarak tanımlanmıştır. 1886 yılında yeni doğan kanında, 1899 yılında ise yetişkin kanında enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. 19. yüzyılın sonunda insanın hemen hemen tüm anatomik bölgelerinden enfeksiyon etkeni olarak izole edilmiştir. 1980'lerden sonra hastane enfeksiyon etkeni olarak dikkat çekmeye başlamıştır [27]. Pseudomonadaceae familyası Azotobacter group, Mesophilobacter, Oblitimonas, Permianibacter ve Pseudomonas olmak üzere 5 cinsten oluşur. Pseudomonas cinsi de 13 farklı alt türü içerir. Bunlar; *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. anguilliseptica*, *P. caeni*, *P. citronellolis*, *P. fluorescens*, *P. jinjuensis*, *P. mendocina*, *P. nitroreducens*/multiresinivorans grup, *P. oleovorans*/pseudoalcaligenes grup, pseudoalcaligenes, *P. resinovorans* ve *P. straminea* olarak bildirilmiştir [28].

Classification	
Kingdom:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Gamma Proteobacteria
Order:	Pseudomonadales
Family:	Pseudomonadaceae
Genus:	<i>Pseudomonas</i>
Species:	<i>P. aeruginosa</i>

Şekil 2.2. *Pseudomonas aeruginosa* 'nın sınıflandırması

Pseudomonas aeruginosa özellikleri

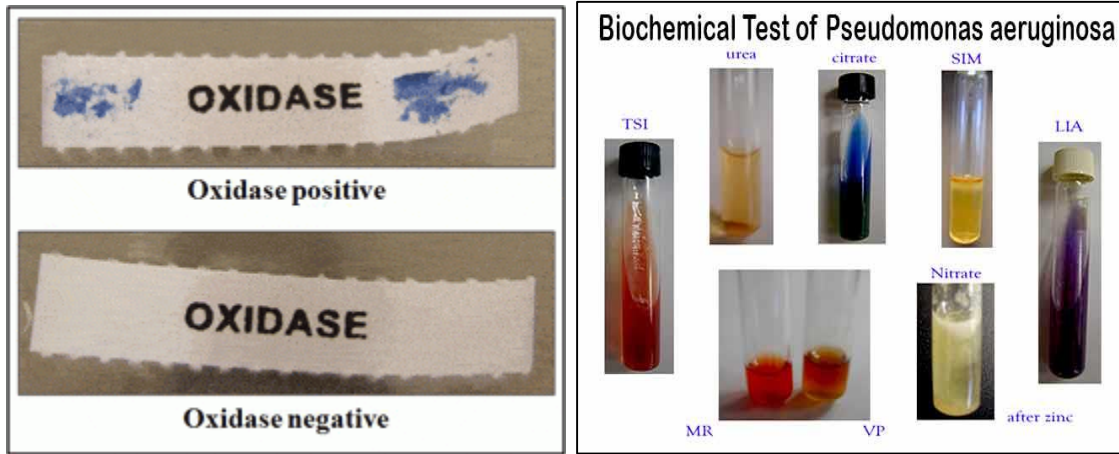
Pseudomonas aeruginosa, aerob, gram negatif özellikte basildir, düz veya hafif kıvrık, spor yapmayan, 0,5-0,8 µm eninde, 1,5-3,0 µm uzunluğunda, uçlarında tek, nadiren 2-3 adet kirpiği ile hareketli bir bakteridir (Resim 2.1) [29, 30]. Bu bakteriler 37⁰ C sıcaklıkta ürerler, 4⁰ C de ürememektedirler. Nitratlı ortamlarda ve arjinin bulunduğunda anaerop koşullarda da üreyebilirler. Piyosiyanin pigmentinin oluşması üreme ortamına bağlı olup ortamdaki yüksek fosfat konsantrasyonlarında artarken, stoklanan kültürlerde pigment oluşturma özelliklerini kaybedebilirler. *Pseudomonas aeruginosa*'nın suda eriyen piyoverdin pigmenti ile suda ve kloroformda eriyen pyosiyanin pigmentinin birleşmesi sonucu karakteristik parlak yeşil renkli koloniler ortaya çıkmaktadır (Resim 2.2). *P.aeruginosa*'nın bazı kökenleri piyorubin ve kahverengi-siyah bir pigment olan piyomelanin de üretebilirler [24]. *Pseudomonas aeruginosa* karbonhidratları fermente etmemektedir. Glikoz ve ksilozu, oksidasyon ile parçalar ancak maltozu fermente etmez. Katalaz ve oksidaz testleri pozitifdir, metil kırmızısı ve Voges Proskauer testleri negatif olarak bilinmektedir (Resim 2.3) [24, 30].



Resim 2.1. *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerinin mikroskopik görünümü [24]



Resim 2.2. *Pseudomonas aeruginosa* kolonilerinin kanlı agarda görünümü [24]



Resim 2.3. *Pseudomonas aeruginosa* biyokimya testi sonuçları [24]

Klinik

Pseudomonas aeruginosa toprak, bitki, su, hayvan ve insan vücut yüzeyleri gibi ortamlarda bulunmaktadır. Bununla birlikte, *P.aeruginosa* insanda, lokal ve sistemik enfeksiyonlara neden olmakta hatta bu enfeksiyonlar yaşamı tehdit edebilecek düzeyde olabilmektedir [30]. *Pseudomonas*ların en sık neden olduğu enfeksiyonlar: nötropenik hastalarda, mekanik ventilasyon desteğindeki hastalarda ve kistik fibrozlu hastaların akut alevlenmelerinde görülen pnömoniler, nötropenik hastalar ve HIV enfeksiyonunu da içeren immun yetmezlikli hastalardaki bakteriyemiler, yanık sonrası gelişen yanık yarası enfeksiyonları, diyabetik hastalarda ve yüzücülerin kulağında gelişen malign otitis media, komplike menenjit ve beyin apseleri, penetran yaralanma ve intraoküler cerrahi sonrası, kontakt lensler ile endoftalmi ve keratit, hematogen yayılım ya da penetran travma veya cerrahi ile ilişkili septik artrit, osteomyelit, primer veya metastatik odaklardan kaynaklanan deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, intravenöz ilaç kullananlarda doğal kapak endokarditi ve prostetik kapak endokarditi olarak bilinmektedir [27]. Son yıllarda gram negatif bakteriler arasında nozokomiyal enfeksiyonların ve buna bağlı morbidite ve mortaliteye en çok neden olan bakteri olarak saptanmaktadır [30].

2.4.2. *Staphylococcus aureus*

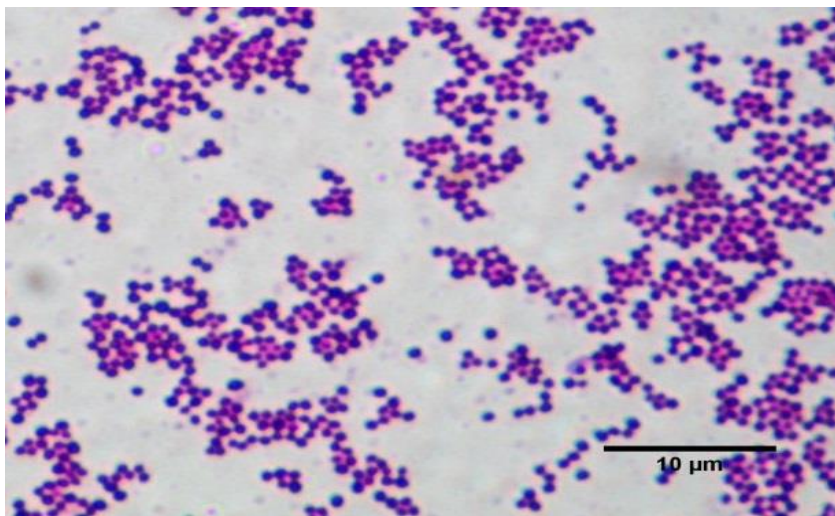
Tarihçe ve sınıflandırma

Stafilokokları ilk kez 1878’de Robert Koch tanımlamış, 1880’de Pasteur abseden izole ettiği stafilokokları sıvı besiyerinde üretmiştir. 1881’de İngiliz cerrah Sir Alexander Ogdson fare

ve kobaylar için patojen olduğunu vurgulamış ve stafilocokların tanımlanmasında mikroskoptaki görünümünden ötürü yunanca üzüm salkımı anlamına gelen “staphyle” terimini ilk kez kullanmıştır. Stafilocoklar Micrococcaceae familyası içinde mikrokoklar, stomatokoklar ve planokoklarla beraber ayrı bir cins olarak yer almaktadırlar. Sınıflandırma olarak Bacilli sınıfının, Bacillales alt grubunun, Staphylococcaceae ailesine ait bir tür olan stafilocoklar günümüzde 33 tür ve 13 alt türe ayrılmaktadırlar. Spor oluşturmadıkları halde çevreden sıklıkla izole edilmektedirler. Stafilocoklar birçok dış etkene dayanıklıdır. Bunun yanında ısıya kısmen dirençlidirler ve yüksek tuz içeren ortamlarda da üreyebilmektedirler. Stafilocoklar içinde insanda en sık enfeksiyona neden olan türler *Staphylococcus aureus* başta olmak üzere, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus saprophyticus*'tur [32].

Mikroskobik özellikleri

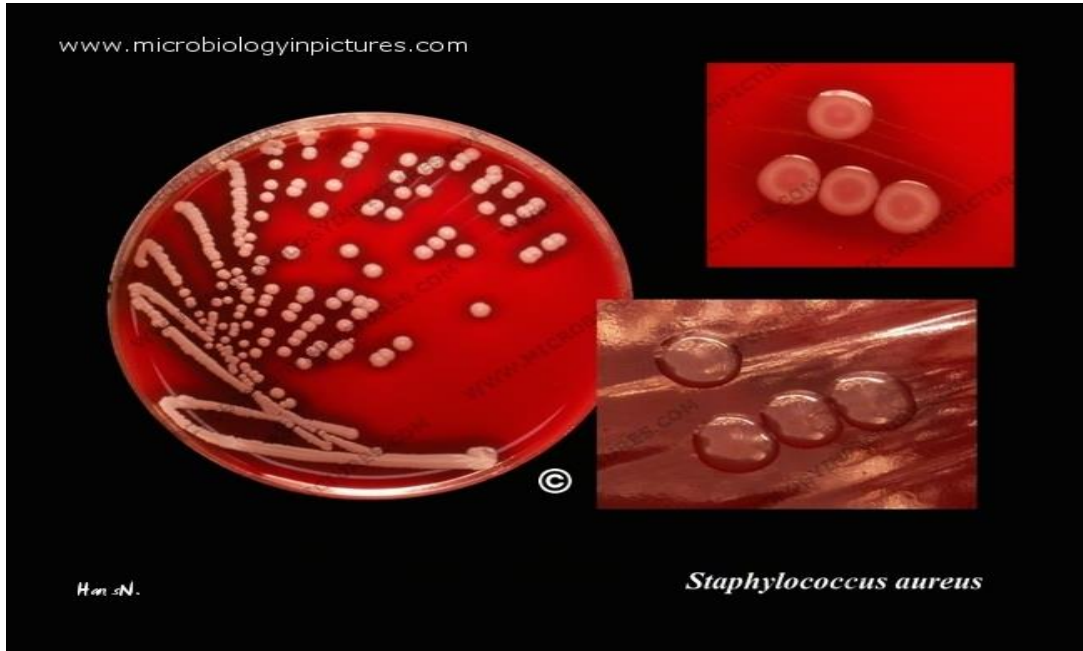
Staphylococcus aureus, mikroskobik olarak gram pozitif, koklar ve kümeler halinde (üzüm salkımı) (Resim 2.4) görünen bir bakteri olup, 18-40 °C'ler arasında ve % 10 NaCl'lü ortamda üreme yeteneğine sahiptir. Aerop veya fakültatif anaerop özellikte, 0.5-3.0 µm çapında, düzgün veya düzensiz kümeler oluşturan, çoğunlukla hareketsiz nadiren hareketli olarak, koagülaz ve hemoliz pozitif, mannitol, sükroz, maltozdan asit yapabilen mikroorganizmalardır [32, 33].



Resim 2.4. *Staphylococcus aureus* bakterilerinin mikroskobik görünümü [32]

Makroskobik özellikleri

S.aureus ekim için kanlı agar, nutrient agar, triptik soy agar veya beyin kalıp agar gibi besiyerleri kullanılır. Bu mikroorganizmalar genellikle 30-37 °C 'de 18-24 saat içinde 1-3 mm çapında koloni oluşturmaktadırlar. *S.aureus* kolonileri 18-24 saatte pigmente (krem rengi, sarı-portakal rengi), S tipi, yuvarlak, hafif kabarık ve çoğunluğu kanlı agarda beta hemoliz oluşturan koloniler geliştirmektedirler (Resim 2.5). *S.aureus*'un kanlı besiyerinde küçük, pigmentsiz ve hemoliz oluşturmeyen koloniler şeklinde üreyen küçük kolonileri de tanımlanmıştır (Resim 2.6) [34, 35].



Resim 2.5. *Staphylococcus aureus* bakterisinin kanlı agarda kültür görünümü [33, 34]



Resim 2.6. *Staphylococcus aureus* biyokimya testi sonuçları [33, 34]

Klinik

Stafilokoklar ciltte ve mukozada normal florada bulunmaktadırlar. İnsanlar stafilokokların ana rezervuarlarıdır. *Staphylococcus aureus*: deri ve mukoza da; apseler, akne, blefarit, hidroadenit, tonsillit, farenjitler, peritonsiller apse ve ayrıca sepsis, endokardit ve pnömoniye neden olabilmektedir. İmmun sistemden; antifagositik kapsül kullanarak, protein A ile antikorlara Fc kısmından bağlanarak ve antijen maskeleye gibi mekanizmaları kullanarak kaçabilmektedir [35].

Nozokomiyal enfeksiyonların en sık etkenlerinden biri olan MRSA suşlarının esas kaynağı enfekte veya kolonize hastalar ile birlikte sağlık personelleridir. MRSA suşları özellikle sağlık personellerinin elleri ile diğer hastalara yayılmaktadır. Hastaların başka nedenlerle antibiyotik almaları kolonizasyon riskini çok fazla artırmaktadır. Hava yoluyla bulaş, yoğun bakım servislerinde pnömoni olgularında ve yanık ünitesi birimlerinde önem kazanmaktadır [34].

2.4.3. *Klebsiella pneumoniae*

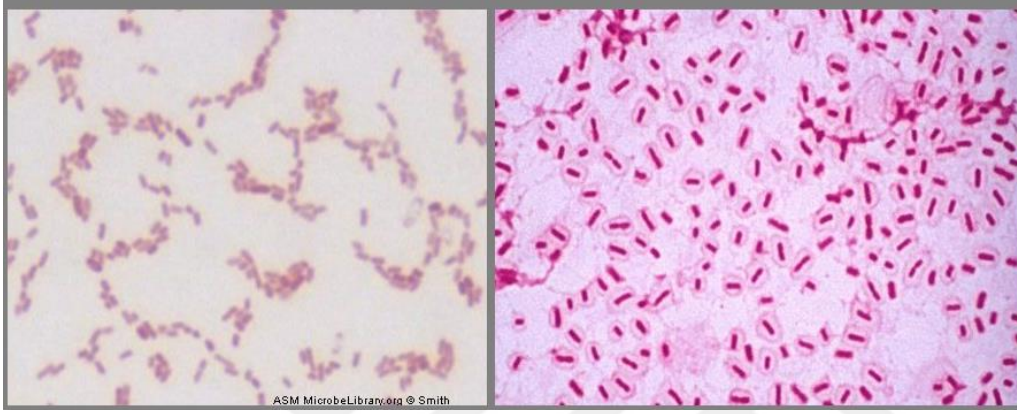
Tarihçe ve sınıflandırma

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*)'ye 1882 de tarif eden Carl Friedlander'in adına göre Friedlander basili de denilirken, *Klebsiella* cinsi adı Edwin Klebs (1834-1913) tarafından verilmiştir. Enterobacteriaceae ailesinin Klebsiellae kabilesinde sınıflandırılan Enterobacter, Hafnia ve Serratia ile birlikte yer alır. *Klebsiella* cinsinin tıbbi öneme sahip üç alt tür bulunmaktadır: *Klebsiella pneumoniae* , *Klebsiella ozaenae* ve *Klebsiella rhinoscleromatis*'tir. Numerikal taksonomi gibi yeni metotların gelişmesiyle, bu cinsteki türlerin sınıflandırılması devamlı olarak düzeltilmektedir. Günümüzde, Cowan, Bascomb ve Orskov'a ait üç ana sınıflandırma bulunmaktadır. [33].

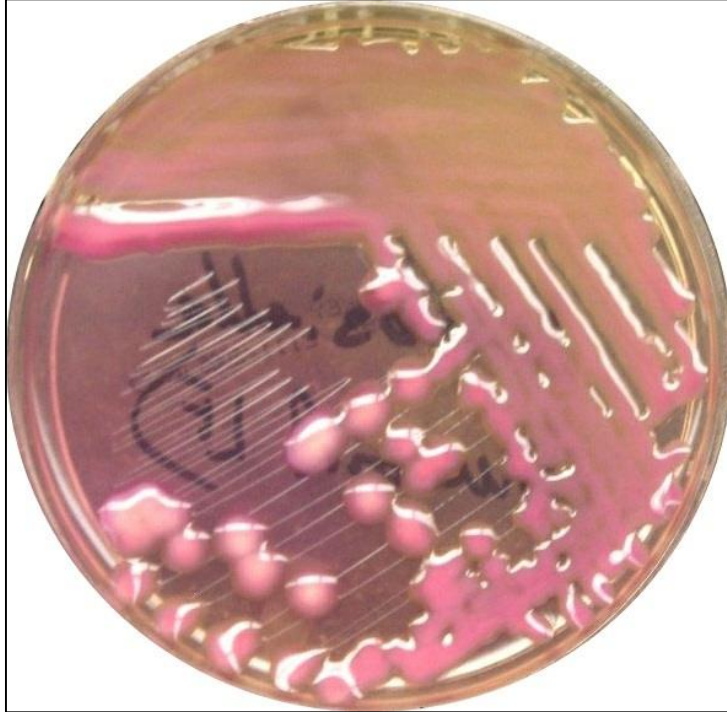
Klebsiella pneumoniae özellikleri

Gram negatif bakteriyolojik boyalarla iyi boyanırlar, kısa uçları yuvarlak, spor yapamayan ve hareketsiz bir bakteridir. 1-2 µm boyunda ve 0.5-0.8 µm enindedir. Geniş bir kapsülü (polisakkarit) bulunmaktadır (Resim 2.7). Fakültatif anaeropturlar. Kanlı agar, EMB, MacConkey, sıvı besiyeri ve XLD gibi besiyerlerinde 37°C'de üremektedirler. Katı

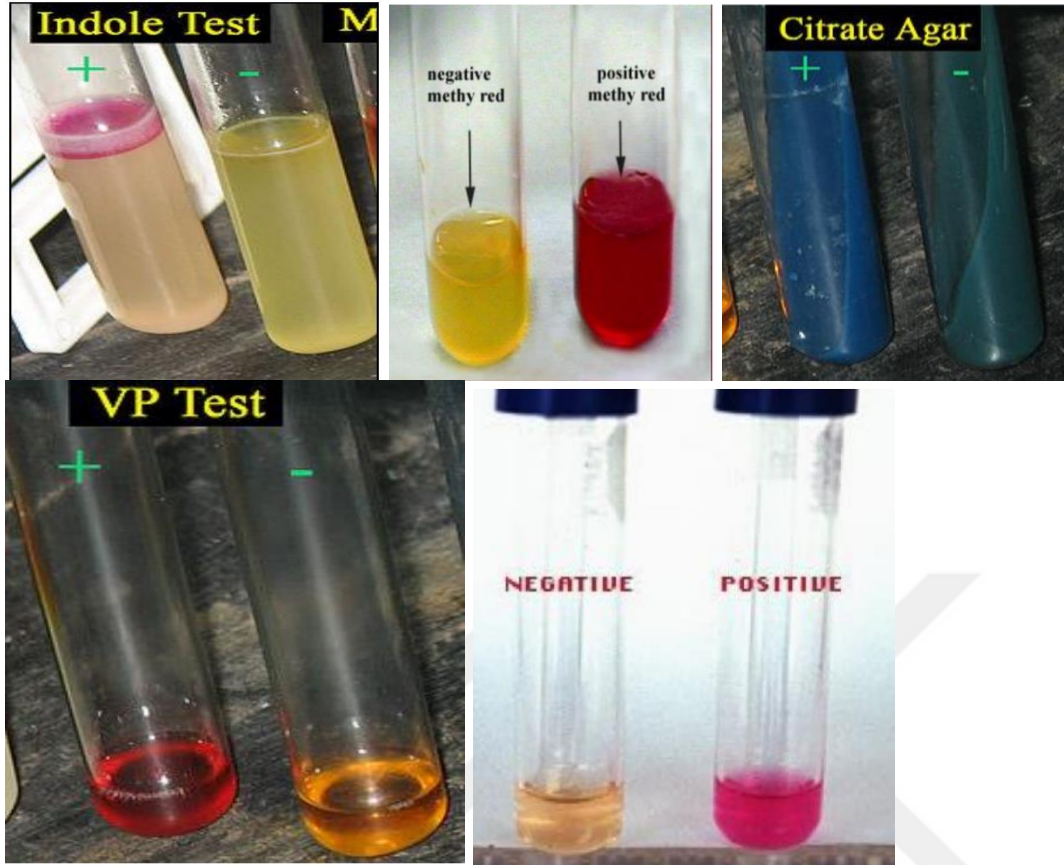
besiyerlerinde M kolonileri yaparak (3-4 mm) ürerler (Resim 2.8). Kapsülsüz suşlar düzensiz ve R tipi koloniler oluştururken, bazı suşlar S tipi koloniler yapabilirler. İndol oluşturmazlar. Metil kırmızısı deneyi negatif, Voges Proskauer ise pozitifdir. Tek karbon kaynağı olarak sitratı kullanılmaktadırlar. *K.pneumoniae* suşlarının birçoğu hemen bütün şekerleri gaz ve asit oluşturarak parçalarlar. Nişastayı en geç 4 gün içerisinde gaz oluşturarak parçalamaları ile diğer enterik bakterilerden ayırt edilmektedirler (Resim 2.9) [33].



Resim 2.7. *Klebsiella pneumoniae* bakterilerinin mikroskopik görünümü [33]



Resim 2.8. *Klebsiella pneumoniae* kolonilerinin kanlı agarda görünümü



Resim 2.9. *Klebsiella pneumoniae* biyokimya testi sonuçları [33]

Klinik

K pneumoniae ile lobar pnömoni; alkoliklerde, diabetiklerde, kronik obstrüktif akciğer hastalığı olanlarda genellikle üst solunum yollarında kolonize olmuş bakterilerin aspirasyonu sonucu oluşmaktadır. *Klebsiella*, pnömonisi gram negatif bakteri pnömonileri içinde daha seyrek görülenidir fakat ölüm oranı diğer gram negatif pnömonilerden iki kat fazladır. Bazen bronkopnömoni ve bronşit olarak seyreden akciğer enfeksiyonlarına da rastlanmaktadır. Genellikle akciğer enfeksiyonlarında K1, K3, K4 ve K5 antijenine sahip kapsül antijen tipleri izole edilmektedir [33]. *Klebsiella* ile idrar yolu ve cerrahi yara enfeksiyonları, bakteriyemi diğer gram negatif bakterilerle oluşan enfeksiyonlardaki klinik belirtilere benzer seyreder. Nozokomiyal idrar yolu enfeksiyonlarından *Klebsiella*'lar %9 dolayında izole edilmiştir ve çok defa ürolojik bir inceleme veya uygulama sonrası enfeksiyonlar gelişmektedir [33]. Bakteriyemiye çok defa damar içi kateter uygulaması, bağırsaktan translokasyon veya akciğer enfeksiyonu nedeniyle sebep olurlar. *Klebsiella pneumoniae* ile menenjit, safra kesesi enfeksiyonu, çeşitli organlarda apse oluşumu gibi enfeksiyonlar da meydana gelir ve organa özel klinik belirtiler vermekteler. Pnömoni;

diyabet, alkolikler ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı olanlarda genellikle üst solunum yollarında kolonize olmuş bakterilerin aspirasyonu sonucu oluşur [33].

2.5. Pnömoni etkenlerine yönelik enfeksiyon kontrolü

Hastalıklardan korunmada aşılama, tedavide ise antibiyotik kullanımı gibi yöntemler mevcuttur, fakat bu sürecin oldukça zor ve uzun olması hastalarda morbidite ve mortalite riski ile hastane maliyeti artırması gibi sorunları beraberinde getirmektedir. Bu problemlere karşı özellikle hastalık riskinin yüksek olduğu hastane, alışveriş merkezleri, okullar gibi kalabalık bölgelerde hava yolu ile bulaşan patojenlerin vücuda girişlerini engellemeye yardımcı olacak bir biyofiltre tasarımının hava yolu ile bulaşan patojenlerin neden olduğu salgınları kontrol etmede büyük yarar sağlamıştır [16, 38, 39]. Normal şartlarda özellikle steril alan klimatizasyonu sağlayan sistemlerde koruyucu ön filtreler mevcuttur [6].

2.5.1. Hava filtreleri

Havada bulunan istenmeyen gaz, buhar ya da başka tanecikleri ayrıştırmaya yarayan cihaz ya da malzemelere filtre denir. Klima santrallerinde ve havalandırma sistemlerinde dış havadaki tanecikleri, toz, toprak ve benzeri istenmeyen cisimleri tutmak, havalandırma cihazları girişlerinde gerekli ayrımları yapmak, besleme havalarındaki virüs ve bakterileri azaltmak amacıyla uygun filtreler kullanılmaktadır. Hava filtrelerinin yakalama mekanizması; elek etkisi, atalet etkisi, yakalanma etkisi, difüzyon etkisi ve elektrostatik etkisinin yanı sıra antibakteriyel etkiye sahip filtrelerin geliştirilmesi ile gerçekleştirilmektedir [6, 16]. Filtrasyon yetersiz kalır ise filtre kendisi enfeksiyon kaynağı olabilecektir. Bu durumda en sık *L. pneumophila* izole edilmekte olup diğer patojenler ise, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* türleri (*Acinetobacter baumannii*), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* kompleks (*B.cepacia*), *Aspergillus* türleri, *Pneumocystis jiroveci* ve diğer fungal etkenlerdir [6].

2.5.2. Filtrasyon

Filtrasyon, havanın içerisinde mevcut olan katı ve sıvı uçuşan yabancı maddelerin uzaklaştırılmasıdır. Filtreler II. Dünya Savaşının başlarında gaz maskelerinde kullanılmıştır. Özellikle askeri alanda kullanılan bu sistemler, savaş sonrasında ise gerek tıp, gerek ise

hassas alet montajında gerek duyulan steril ortam gereksinimi için klasik klima sistemleri ile kombine olarak kullanılmıştır. Günümüzdeki anlamda filtre ve klima-havalandırma sistemleri ise 1960'lı yılların ortalarında, mühendislik pratiğine yerleşmiştir [6].

2.5.3. Filtre malzemeleri

Sentetik/polyester elyafı

Bu filtre malzemesi sentetik esnek yığın lifli, yüksek katmanlı yapı oluşturan bir alev geciktirici madde ile birbirine bağlanmış %100 dokuma olmayan polyester elyaflarından oluşur. Yapışkan madde kaplı tip ve kuru tip olmak üzere iki kısma ayrılır.

- Yapışkan madde kaplı, filtre elyafları yağ ve benzeri bir akıcı madde ile kaplanır ve bu madde tozların lif yüzeyine yapışmasını sağlar.
- Kuru tip filtreler de yukarıda bahsedilen yapışkan maddeli filtrelerle benzer, yalnız filtre elyafları tozun yapışmasına yardım eden bir madde ile kaplanmamıştır (Resim 2.10) [39].



Resim 2.10. Sentetik filtre örnekleri [39]

Cam elyafı (Fiberglass)

Cam elyaf filtre malzemesi aralıksız cam elyaf katmanlarıyla yoğunlaştırılmış olup oldukça yüksek yükleme yeteneği sağlamaktadır. Filtrenin hava tarafındaki kısmı cilt şeklinde malzemeyi destekler ve son filtreleme kademesi oluşturur (Resim 2.11) [39].



Resim 2.11. Cam elyaf filtre örneği [39]

2.5.4. Antimikrobiyal filtreler

Antibakteriyel filtre üretiminde çeşitli organik materyallerin yanı sıra antikorlara dayalı sistemlerle (antijen–antikor bağlanma yeteneği) yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli avantajlara sahip olduğu ortaya konulmuştur. Diğer kimyasal yöntemlere göre daha güvenli, diğer fiziksel yöntemlere göre daha spesifik ve hızlı reaksiyon gösteren yöntem olduğu saptanmıştır. İnorganik antibakteriyel maddeler, (gümüş, bakır ya da çinko) güvenlik açısından tartışmalı olup sınırlı bir şekilde kullanılmıştır. Gümüş, geniş spektrumlu antibakteriyel özelliğe sahip olmasına rağmen düşük toksisitesi mevcuttur. Bu özelliğinin insan ve hayvanlara etkisi olduğu bildirilmiştir, ayrıca düşük konsantrasyonlarda antibakteriyel etki göstermemektedir. Öte yandan gümüş iyonlarının, ışığa karşı duyarlılığı ve halojen iyonları ile yüksek reaktivite derecesine sahip olması nedeniyle antibakteriyel etkisinin azaldığı görülmektedir [16, 17, 37-40].

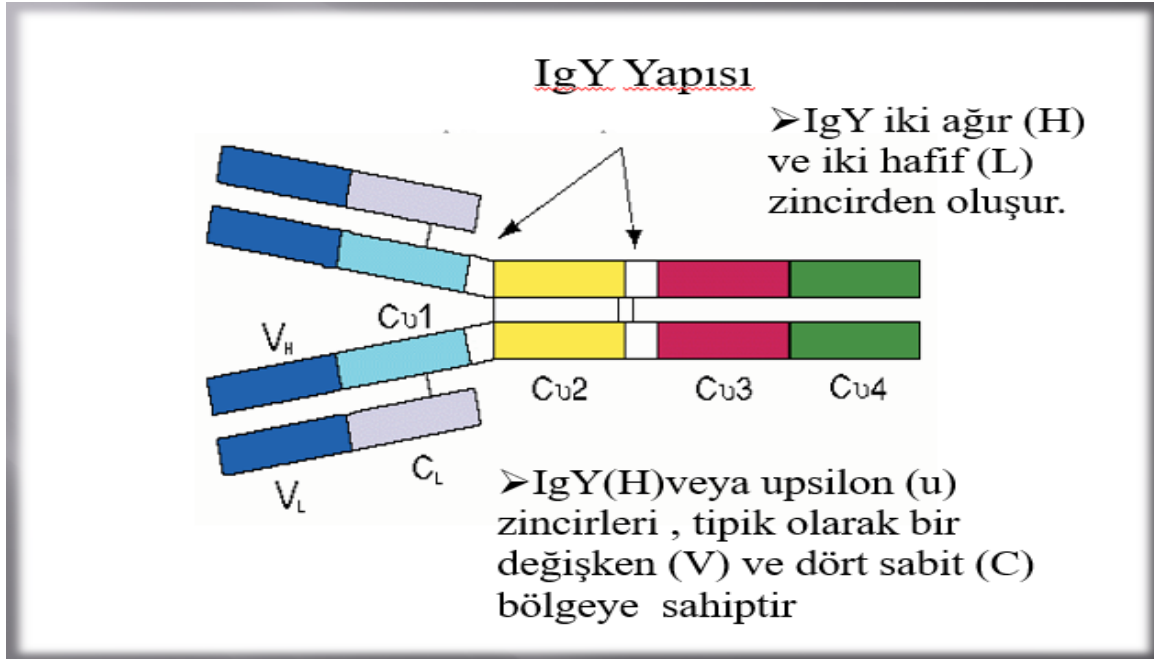
2.6. IgY antikoru

IgY antikoru, ilk defa Klemperer tarafından 1893 yılında mikroorganizmalarla immunize edilen tavukların yumurtalarının sarısından elde edilmiş ve oluşan bu antikorların mikroorganizmalara spesifik olduğu bildirilmiştir [31]. IgY antikorları 1980'lerden bu yana

daha geniş uygulama alanlarında yer almıştır. Antikorların elde edilmesinin non-invaziv olması nedeniyle 1996 yılında IgY teknolojisi European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM) araştırma ekibi tarafından alternatif bir antikor elde etme yöntemi olarak tavsiye edilmiştir [31]. IgY-teknolojisi 1999 yılında, İsviçre Hükümeti Veteriner Dairesi tarafından hayvan sağlığını desteklemek amacıyla kullanabilecek alternatif bir yöntem olarak kabul görmüştür [31, 40-42].

2.6.1. IgY antikor yapısı

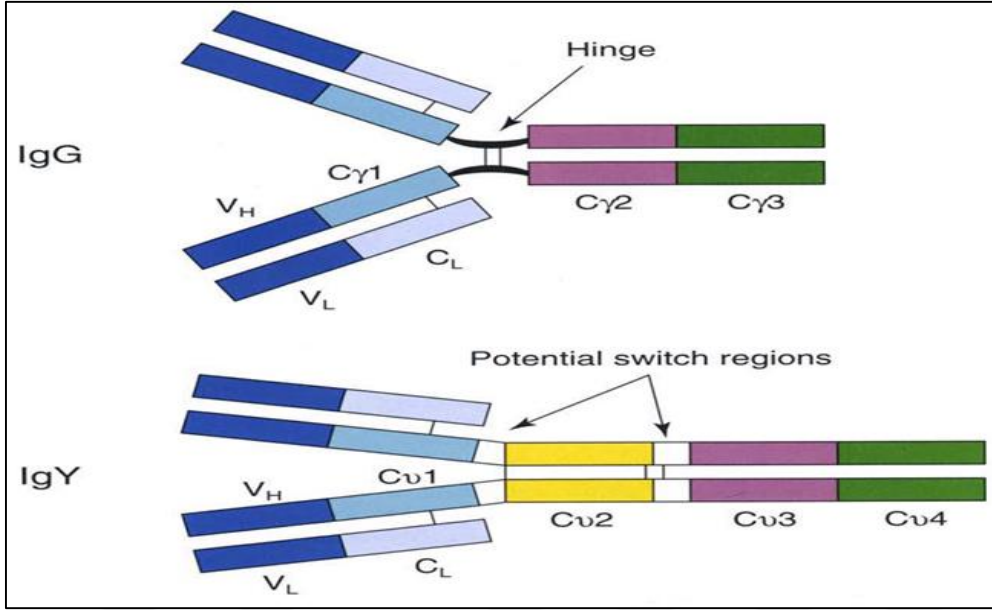
IgY molekülünün genel yapısı memelilerde bulunan IgG'ye benzer olup, iki ağır (H) ve iki hafif (L) zincirden oluşmaktadır. IgY (H) veya üpsilon (U) zincirleri, tipik olarak bir değişken (V) ve dört sabit (C) bölgeye sahiptir [20, 43]. IgY ağır zinciri 67-70 kDa tek tip olarak bilinmektedir. IgY' nin CU1-CU2 ve CU2-CU3 bağlantılarının yan kısmında prolin, glisin rezidüleri içeren ve kısıtlı esneklik sağlayan bölgeleri bulunmaktadır. Sadece memeli IgG antikoruna özgü olan ve esneklik sağlayan menteşe bölgesine IgY antikor yapısındaki CU1 ve CU2 arasındaki bölge işlevsel olarak benzer özellik göstermektedir (Şekil 2.3). IgY antikorumun bu yapısal özelliğinden dolayı IgG 'ye göre esnekliği daha azdır ve bu nedenle antijenle bağlanma yeteneği daha spesifiktir. Ayrıca IgY 5.7-7.6 izoelektrik noktasına sahiptir ve bu sebeple IgG 'den daha hidrofobiktir. Bu özelliği zengin yağ içeriğine sahip olan yumurta sarısına uyum sağlamasına neden olmaktadır (Çizelge 2.2) (Şekil 2.4) [41-47]. IgY antikorlarının IgG antikorlarına göre antijenlere afinitesinin 3-5 kat daha fazla olduğu bildirilmektedir. IgY antikorlarının güvenli ve dayanıklı yapıya sahip olması, tedavi ve koruma amacıyla kullanılmasını sağlamaktadır. IgY antikorlarının başlıca etki mekanizmaları ise; mikrobiyal ajanların hücre yüzeyine adezyonunu ve kolonizasyonunu etkilemesi, virüslerin hücreden hücreye geçişi sırasında spesifik bağlanmalar ile kolonizasyonun engellenmesi, sindirim sistemindeki patojenlerin aglütinasyonu ile toplu bir şekilde sindirim sisteminden atılmalarının sağlanması, patojenlerin enzim aktivitelerinin düşürülmesi ve toksinlerin nötralizasyonu şeklinde olmaktadır. Literatürde bu etkilerin hayvan modellerinde ve aynı zamanda klinik çalışmalarda da kullanıma uygun olduğu bildirilmektedir [16]. IgY antikorlarının fiziksel ortamlardaki dayanıklılığını göstermek için yapılan çalışmalarda, ısıya karşı geniş bir aralıkta (0-70°C) aktivitesini kaybetmediği, pH 3,5-11 değerlerinde aktivitesini koruduğu, 4000 kg/cm²'lik basınca dayandığı gösterilmiştir [16, 44, 46].



Şekil 2.3. IgY molekülünün genel yapısı [43-44]

Çizelge 2.2. IgY ve IgG arasındaki yapısal fark [43-45]

IgY	IgG
Zincir üpsilon (u)	Zincir gamma
Ağır zincir 67-70 kDa	Ağır zincir 50 kDa
Rheumatoid faktör ile çapraz reaksiyon vermez	Rheumatoid faktör ile çapraz reaksiyon verir
Memelerdeki kompleman aktive etmez	Memelerdeki komplemanı aktive eder
Tek tip (sadece IgY)	Memelerde 10 tip ve birçok alt-tip
<i>S aureus</i> hücre duvarında bulunan A ve G proteine bağlanmaz	<i>S aureus</i> hücre duvarında bulunan A ve G proteine bağlanır



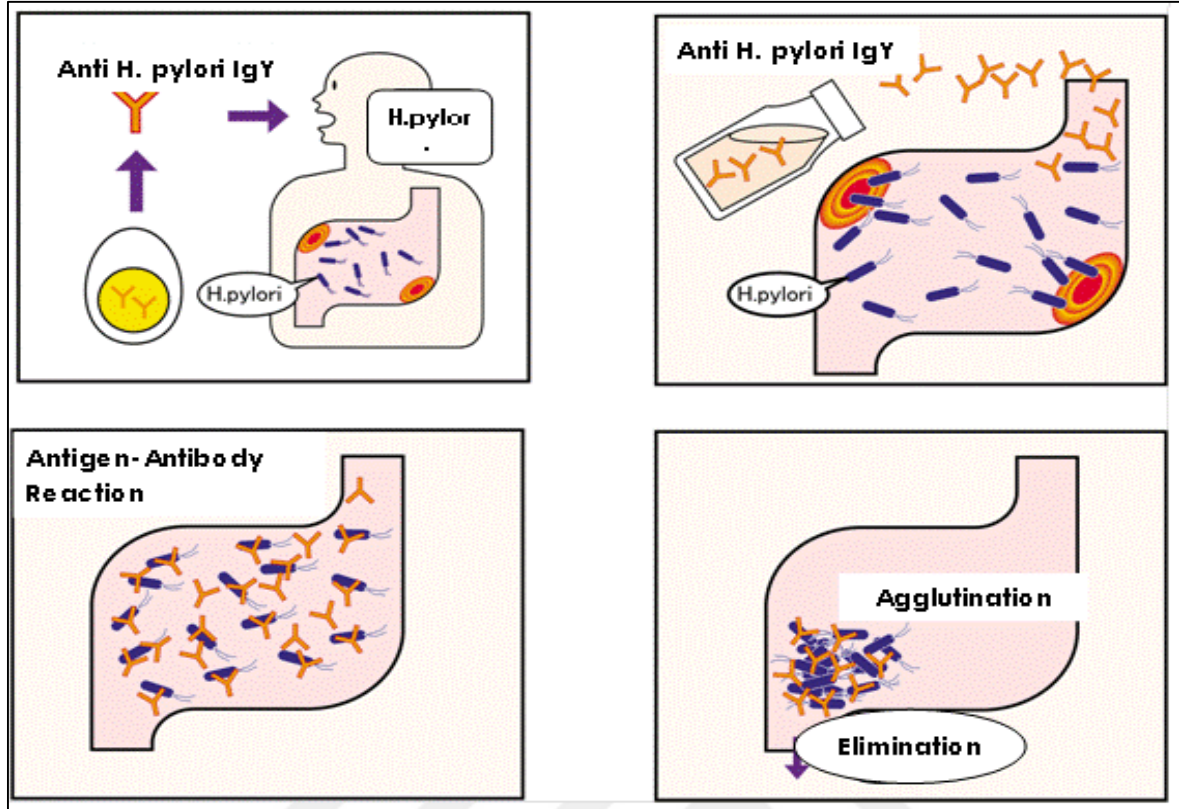
Şekil 2.4. IgY ve IgG antikorlarının molekül yapılarının karşılaştırılması [43-45]

2.6.2. IgY teknolojisi

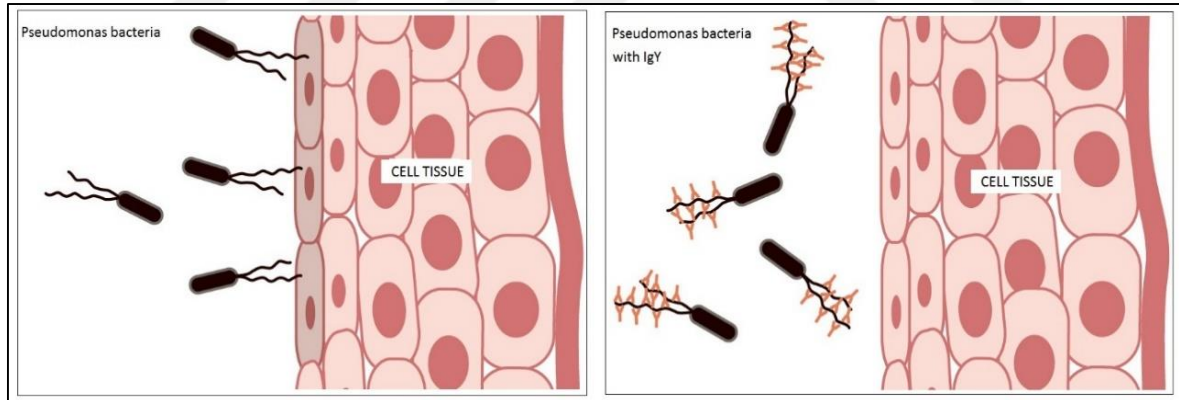
IgY antikorı: tavukların serum ve yumurta sarısında bulunan antikorlardır [16]. Tavuklarda bulunan bu antikorlar enfeksiyon sırasında mikroorganizmalara karşı yüksek miktarda gelişen spesifik antikorlardır ve aynı zamanda bu antikorların yumurta sarısına transfer olduğu bilinmektedir [16, 47]. IgY teknolojisi, tavuk yumurtasında antikorı üretmeye ve izole etmeye dayanan bir yöntemdir. IgY antikorunun yumurta sarısından izolasyonu koyun, keçi ve tavşan gibi hayvanların kanından izole edilmesine göre daha kolay, non-invazif, uzun ömürlü ve yüksek miktarda sentezlenmesi gibi avantajlara sahiptir [43]. IgY antikorı yumurta sarısında zaman içinde bozulmaksızın kalabilmekte ve 5–10 yıl 4°C’de saklansa bile antikor aktivitesinde önemli bir kayıp olmamaktadır. Bu antikorlar, oda sıcaklığında 6 aya kadar ve 37°C bir aya kadar aktivitelerini koruyabilmektedir. İmmunize edilen her tavuktan günde 75-100 mg IgY ayda ise 1,500 mg IgY elde edilmekte bu da yaklaşık bir koyundan elde edilen antikora karşılık gelmektedir. Tavuk antikorlarının, tanı yöntemlerinde kullanılması, memeli antikorlarına göre daha düşük maliyete neden olabilecektir. IgY antikorlarının hazırlama aşamasında toksik madde kullanılmaması diğer önemli bir avantajı oluşturmaktadır [16, 47].

2.6.3. IgY 'nin tıp, veterinerlik ve biyomedikal alanında kullanımı

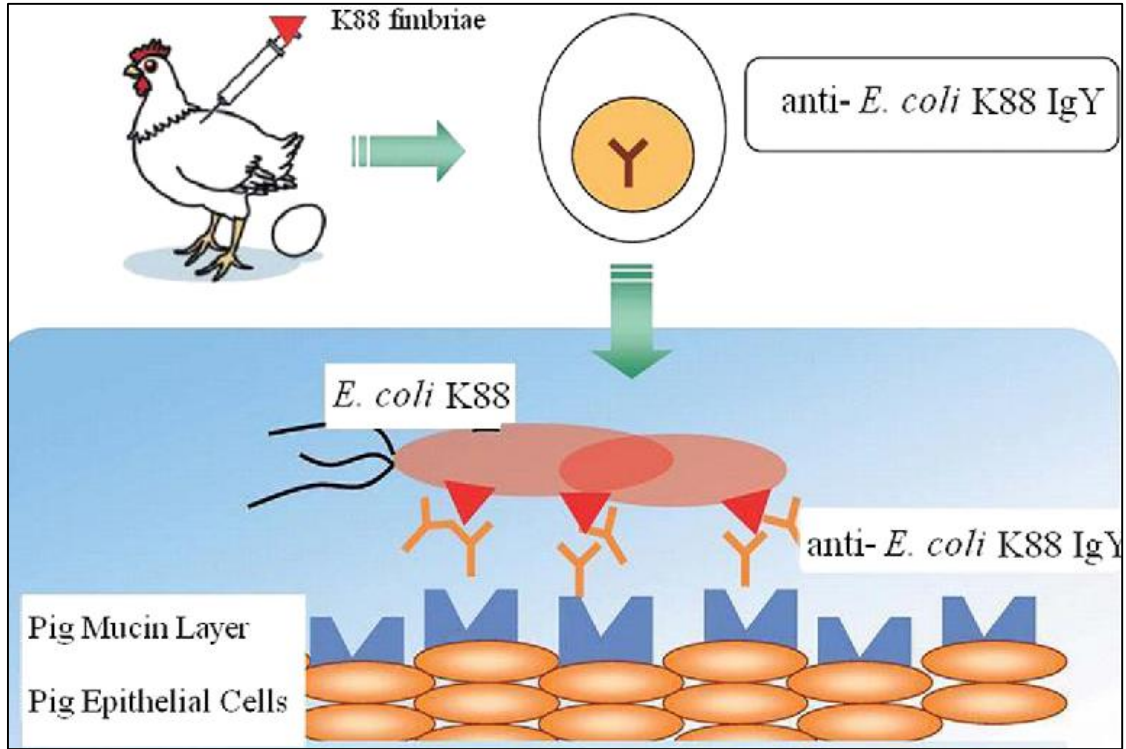
IgY 'nin tıpta tedavi ve koruma amacıyla kullanıldığı çalışmalar mevcuttur. Çocuk bağırsak enfeksiyonlarının önlenmesinde ve *Helicobacter pylori* enfeksiyonlarının tedavisinde başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Resim 2.12) [48]. Diş çürüklerinin önlenmesinde anti-*Streptococcus mutans* IgY içeren ağız çalkantı sularının kullanılması etkili bulunmuştur [49]. Kistik fibrozis hastalarında anti-*P aeruginosa* IgY içeren ağız çalkantı suyu ile ağız çalkaması uygulandığında, hastalarda kronik *P.aeruginosa* enfeksiyonlarının sıklığında azalma olduğu tespit edilmiş ve antibiyotik kullanımının sınırlandırmasında yararlı olduğu belirtilmiştir (Resim 2.13.) [31]. Deneysel çalışmalarda da *S.aureus* ve *Escherichia coli* 'ye karşı IgY 'nin bakteri üremesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Resim 2.14) [36]. Ayrıca veterinerlik alanında köpeklerde parvovirüs, rotavirüsler ve coronavirus enfeksiyonlarının tedavisinde IgY antikorunun kullanımında olumlu sonuçlar elde edilmiştir [31]. IgY uygulamaları biyomedikal araştırmalarda da kullanılmaktadır. IgY bazlı immünoanalizlerin üretilmesi, proteinlerin veya peptidlerin konsantrasyonlarının ELISA ile ölçülmesi sağlanmış ve klinik kimya çalışmalarında da kullanılmıştır [31, 42]. IgY antikorları, viral, bakteriyel ve bitki antijenlerinin tespiti, evcil hayvanlarda bağırsak parazitlerini ve gıdalarda toksinleri saptamak amacıyla yapılan araştırmalarda da kullanılmıştır [42, 53].



Resim 2.12. IgY'nin *Helicobacter pylori* hücreler bağlanmasının engellemesi [52]



Resim 2.13. IgY'nin *Pseudomonas aeruginosa* hücreler bağlanmasının engellemesi [50, 51]



Resim 2.14. IgY'nin *E. coli* hücreler bağlanmasının engellemesi [36]

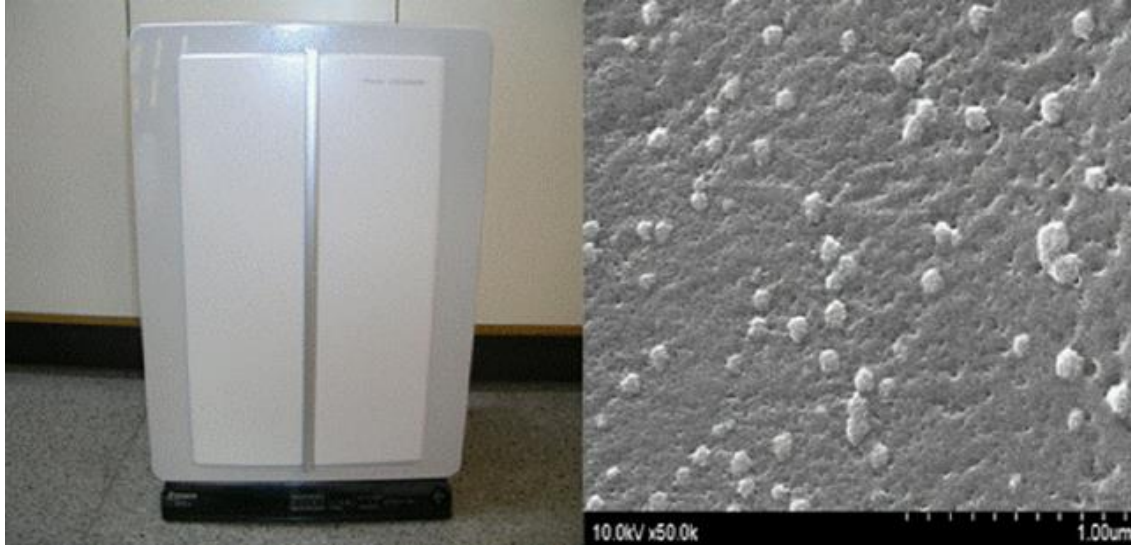
2.6.4. Piyasada bulunan IgY bazlı ürünler

Günümüzde ticari olarak *H.pylori* enfeksiyonlarında kullanılmak üzere anti-*H.pylori* IgY içeren yoğurt üretilmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. Piyasada var olan ticari olarak kullanıma sunulmuş anti-*H.pylori* IgY içeren yoğurt [52].

Ayrıca piyasada ticari olarak kullanıma sunulmuş anti-influenza IgY bazlı filtre içeren klimalarda üretilmiştir (Resim 2.15).



Resim 2.15. Piyasada var olan ticari olarak kullanıma sunulmuş anti-influenza IgY bazlı filtre içeren klima (Japonya) [52]

Diğer bir ticari ürün ise anti-influenza IgY bazlı maske olup Güney Kore’de üretilmiştir (Resim 2.16).

世界にたった1つの技術
02

**「3Dプリーツ形状記憶構造」で
これまでにない着け心地を実現！**

構造による機能特性
3Dプリーツ形状記憶構造

世界にたったひとつの技術
「3Dプリーツ形状記憶構造に関する意匠等」
登録意匠第1413423号・1413424号・1422882号
登録実用第3163625号

スーパーソニックウェーブ加工

+

**画期的な新素材
リップキーパー**
透気性はしっかり確保しながら、
マスクを閉じたときの空間形
状の保持性能を飛躍的に向上。

**着け心地の違いを
実感頂いてます！**

メイクしてても
口紅がマスクに
つきにくい！

着けている
時間が長い程、
着け心地の
違いを実感！

息苦しさを
感じないので、
快適でいられる！

Resim 2.16. Ticari olarak kullanıma sunulmuş anti-influenza IgY bazlı filtre içeren maske (anti /H1N1 ve H5N1) Güney Kore



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışma Amaç

Çalışmamızda, nozokomiyal pnömoni etkeni olarak sık tanımlanan *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*), *Klebsiella pneumoniae* (*K.pneumoniae*) ve *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*) bakterilerine karşı IgY geliştirilmek için Lohmann Brown cinsi tavuklar immunize edilmiş, yumurtadan izole edilen IgY antikorların etkinliğinin ELISA yöntemiyle tanımlandıktan sonra anti-bakteri IgY antikorlu filtre geliştirmek amacıyla yapılmıştır.

3.2. Bakterilerin Kültürlerinin Yapılması ve İmmunizasyon İçin Antijen Elde Edilmesi

Çalışmamızda *S.aureus* ATTC 6538, *P. aeruginosa* ATCC 27853 ve *K. pneumoniae* ATCC 13883 bakterileri kullanıldı. Boncuklu saklama tüplerinde -20°C'de saklanan bakteriler oda sıcaklığında çözüldü ve biyogüvenlik kabininin içinde steril ortamda kanlı besiyerine (%5 koyun kanlı agar) ekim yapıldı. Ekim yapılan plaklar 37 °C'de gece boyunca etüvde inkübe edildi. Üreyen koloniler 1 ml PBS (Phosphate Buffer Solüsyonu) içeren tüplere aktarıldı. Bakteri süspansiyonu içeren tüpler 3000 rpm 'de 20 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısmı atıldı ve yıkama işlemi PBS ile üç defa tekrarlandı. Bakteri inaktivasyonu kuru ısıtıcıda 65°C'de 35 dakika bekletilerek gerçekleştirildi. İşlem sonrası oluşan artıkları uzaklaştırmak amacıyla 9000 rpm 'de 20 dakika santrifüj yapıldı ve süpernatant kısmı atıldı. Tüplerin dibinde kalan pelletin üzerine 500 µl PBS eklenerek protein miktarı 0,5 mg/ml olacak şekilde nanodrop spektrofotometrede ayarlandı ve immunizasyon için kullanıldı [54, 58].

3.2.1. Uygulama

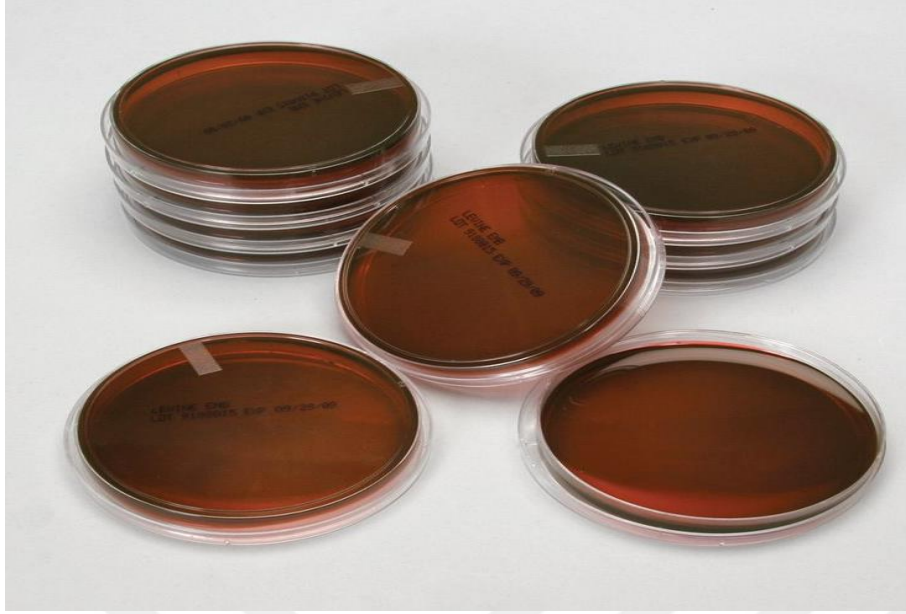
1. Mikrobankta (Microbank, ABD) -20°C'de saklanan bakteriler oda sıcaklığında çözüldü (Resim 3.1). Biyogüvenlik kabininde bek kullanılarak *S aureus*, ATTC 6538 kanlı agara (%5 koyun kanlı) ekim yapıldı, *P.aeruginosa*, ATCC 27853 ve *K.pneumoniae* ATCC13883 kanlı agara ve EMB besiyerine ekildi ve plaklar 37° C'de gece boyunca etüvde inkübe edildi (Resim 3.2, 3.3).



Resim 3.1. Bakterilerin saklanması için kullanılan mikrobank tüpleri

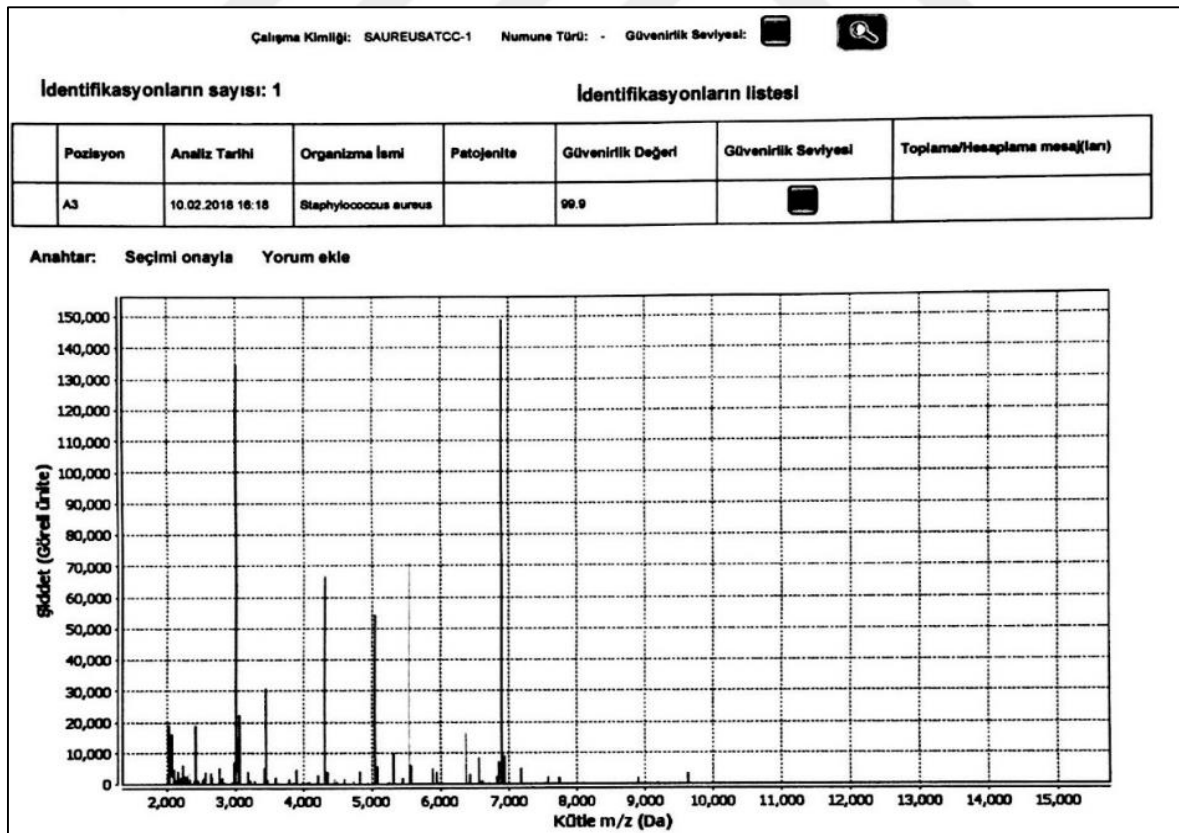


Resim 3.2. Çalışmada bakteri üretilmesi için kullanılan kanlı agar besiyerleri

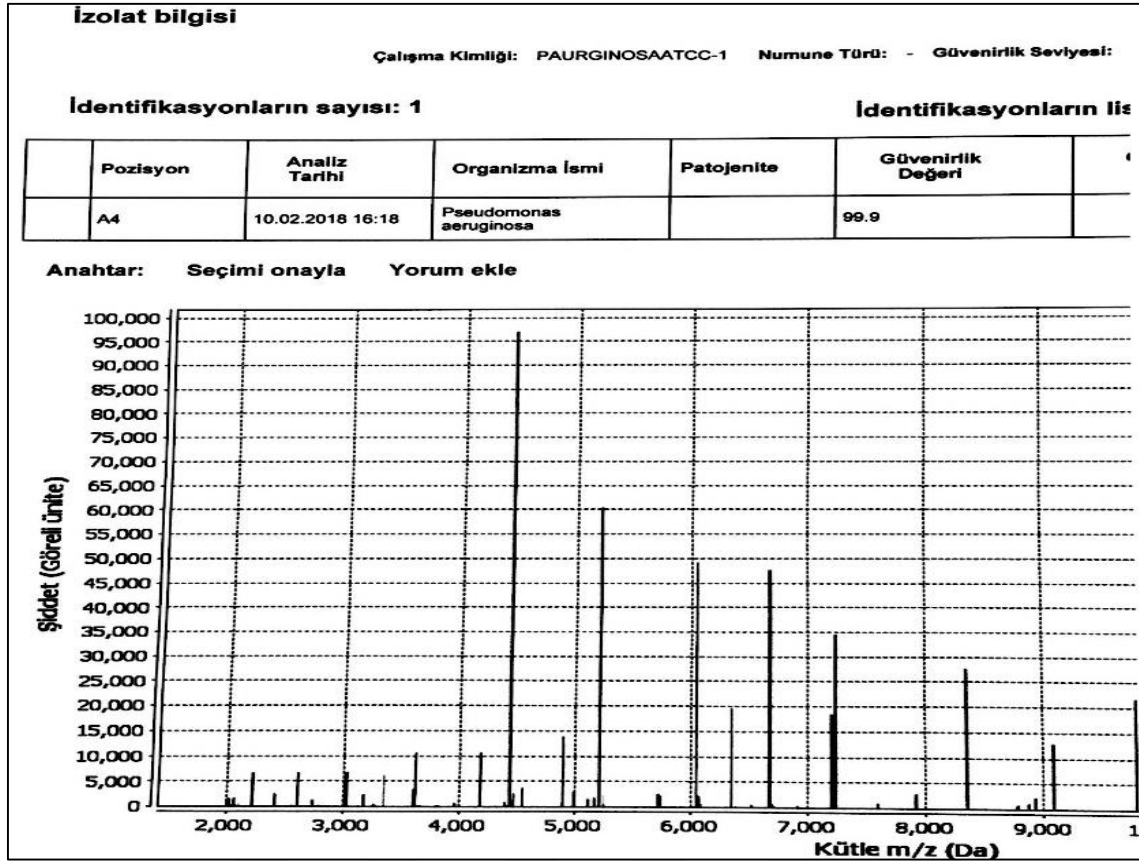
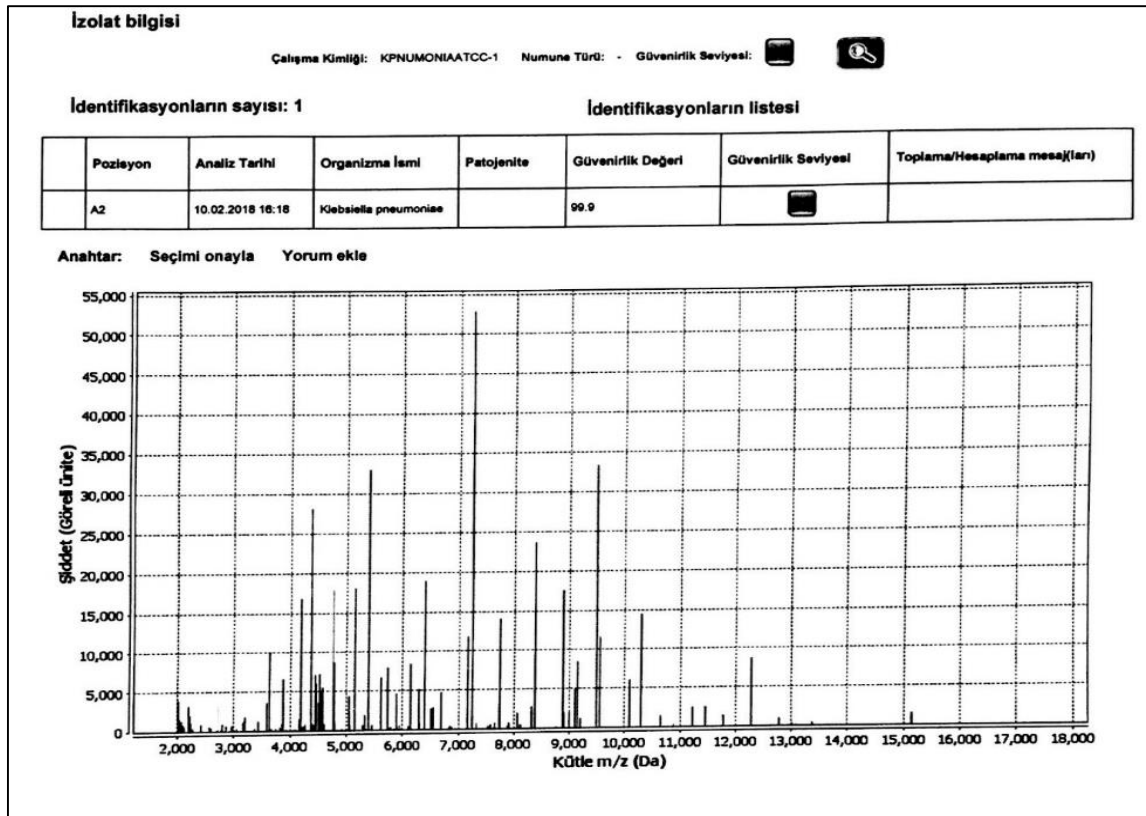


Resim 3.3. Çalışmada bakteri üretilmesi için kullanılan EMB besiyerleri

2. Bakteriler işleme alınmadan önce bakteri identifikasyon ve antibiyogram duyarlılık (BD, İngiltere) cihazını kullanarak tekrar tanımlandı (Şekil 3.1-3.3).



Şekil 3.1. *Staphylococcus aureus* otomatize sistem antibiyogram test sonucu

Şekil 3.2. *P. aeruginosa* otomatize sistem antibiyogram test sonucuŞekil 3.3. *Klebsiella pneumoniae* otomatize sistem antibiyogram m test sonucu

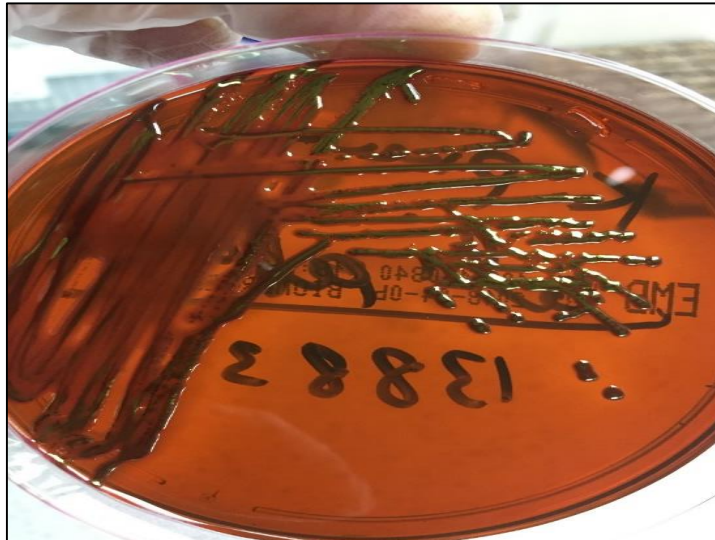
3. Kanlı agar ve EMB besiyerinde üreyen bakteriler steril eküvyon ile 5 ml PBS içeren 15 ml'lik tüpe aktarıldı. (Resim 3.4-3.6).



Resim 3.4. *Staphylococcus aureus* kolonilerinin kanlı agarda görünümü



Resim 3.5. *P. aeruginosa* kolonilerinin kanlı agarda görünümü



Resim 3.6. *Klebsiella pneumoniae* kolonilerinin EMB besiyerinde görünümü

4. Tüpler iyice karıştırıldıktan sonra 3000 rpm 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant atıldı, tüpün üzerine tekrar 5 ml PBS ilave edildi ve 3 defa 3000 rpm 10 dakika santrifüj ile yıkama yapıldı.
5. Yıkama yapılan tüpler 65 °C' de 35 dakika bekleterek bakteriler inaktive edildi ve bu işlem sonrasında artıklarını uzaklaştırmak amacıyla 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi.
6. Tüplerin dibinde kalan pelletin üzerine 500 µl PBS eklenerek protein miktarı 0,5 mg/ml olacak şekilde nanodrop cihazı (Thermo, ABD) ile hazırlandı (Resim 3.7).



Resim 3.7. Nanodrop spektrofotometr cihazı

3.3. Tavuklar ve İmmünizasyon

Bu çalışma için gerekli hayvan etik kurul izini alındı (tarihi 27/06/2018 ve karar no:2018/23). Çalışmamızda, 22 haftalık Lohmann Brown cinsinden 11 adet tavuk kullanıldı (Çizelge 3.1) (Resim 3.8). Yaklaşık 1 yıl sürecek deneyler için tavukların verimli bir şekilde bakımı için özel kafesler tasarlandı. Kafesler galvaniz kare 40 mm kalınlıktaki malzeme ile yapıldı (Resim 3.9). Her bakteri için üçer ve iki adette negatif kontrol olacak şekilde tavuklar kullanıldı. *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae*'den hazırlanan 0,5 mg/ml antijen ve aynı hacimde Freund's tamamlanmış (complete) adjuvanı ile toplam 500 µl olacak şekilde hazırlanan antijen solüsyonu insülin enjektörü kullanılarak tavukların sağ ve sol göğüs kaslarına iki farklı yere immunizasyon için enjekte edildi. Hatırlatma immunizasyonları iki

hafta aralıklarla dört kere 0,5 mg/ml antijen ile Freund's tamamlanmamış (incomplete) adjuvantı kullanarak yapıldı. İmmunize edilen ve edilmeyen tavuklardan 35. günden itibaren yumurtalar iki ay boyunca toplandı (1yumurta/gün). Yumurtalar günlük olarak etiketlenip +4°C'de saflaştırma işlemine kadar muhafaza edildi [37, 49, 55, 57, 59].

Çizelge 3.1. İmmunize edilen tavuk gruplarının dağılımı

Deneyi grupları	Tavuk sayısı
<i>S.aureus</i>	3 tane
<i>P.aeruginosa</i>	3 tane
<i>K.pneumonia</i>	3 tane
Negatif kontrol (immunize olmayan)	2 tane



Resim 3.8.Çalışmamızda kullanılan Lohmann Brown cinsi tavuk



Resim 3.9. Çalışmamızda kullanılan tavukların barındığı kafesler

3.3.1. Uygulama

- 1- *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K. pneumoniae* bakterilerinden elde edilen 0,5 mg/ml protein miktarı ile hazırlanan antijen solüsyonu ve Freund's tamamlanmış adjuvanı toplam 0.5 ml olacak şekilde insülin enjektörü ile 22 haftalık Lohmann Brown cinsi yumurta tavuklarının sağ ve sol göğüs kaslarına iki farklı yere enjekte edilerek immunizasyon sağlandı.
- 2- Hatırlatma immunizasyonları ise iki hafta aralıklarla dört kere yapıldı. Hatırlatma immunizasyonlarında 0.5 mg/ml protein ile Freund's tamamlanmamış adjuvanı 0.5 ml toplam hacim olacak şekilde antijen solüsyonu hazırlanarak immunizasyon yapıldı (Resim 3.10).



Resim 3.10. Tavuk immunizasyonlarının yapılması

- 3- İmmunize edilen tavuklardan yumurtalar 35. günden sonra toplanmaya başlandı ve iki ay boyunca toplanan yumurtalar (yumurta/gün) günlük olarak etiketlenip +4°C'de IgY izolasyon işlemine kadar muhafaza edildi (Resim 3.11).



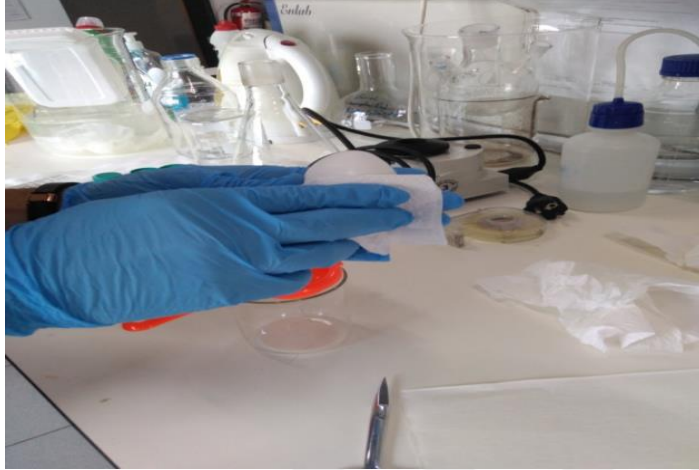
Resim 3.11. Tavuklardan toplanan yumurtaların +4 °C’de saklanma koşulu

3.4. IgY Antikorlarının Elde Edilmesi ve Saflaştırılması

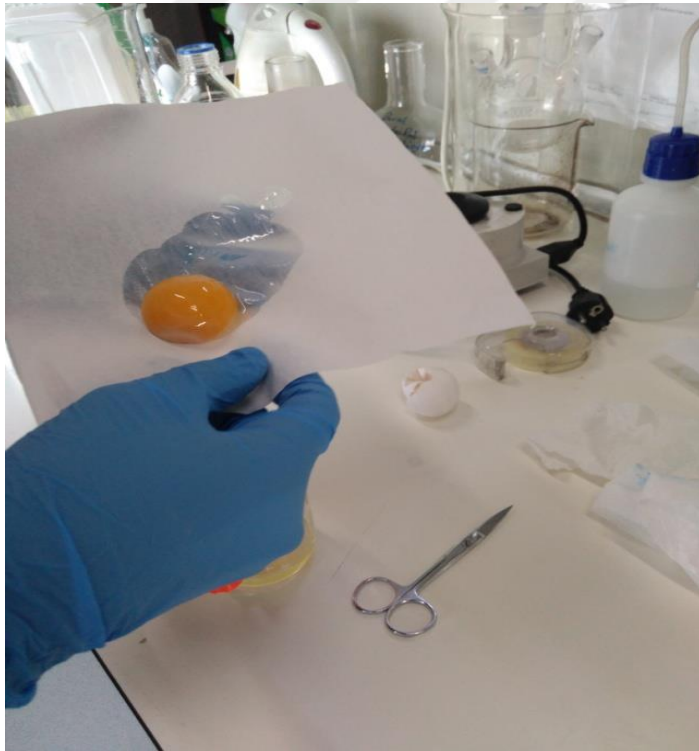
İmmunize edilen ve edilmeyen tavuklardan toplanan yumurtalar %70’ lik alkol ile dezenfekte edildikten sonra kırılarak sarısı ile beyaz kısmı ayrıldı. Yumurtanın sarı kısmı 50 ml’lik tüplere aktarıldı ve tüpteki son hacmin üzerine iki kat PBS eklendi. Bu işlem her yumurta için ayrı ayrı yapıldı. Tüplerdeki son hacmin üzerine toz halinde Polyethylene glycol (Merck, Almanya) (PEG) 6000’dan gram olacak şekilde %3,5 oranında eklenerek dönen silindir mikserde (roller mixer) (Stuart, İngiltere) karıştırıldı. Son karıştırma işleminden sonra tüpler ultrasantrifüj (Thermo, ABD) ile 13000g, +4°C’de 20 dakika boyunca santrifüj edildi ve işlem sonrası üst kısımda oluşan süpernatant kağıt filtreyle filtrasyon yapılarak başka bir tüpe aktarıldı. Son hacmin üzerine %8,5 ağırlığında PEG 6000 ilave edildi ve tekrar 13000g, +4°C’de 20 dakika santrifüj işlemi uygulandı. Bu işlem sonrası tüplerdeki süpernatant atıldı, dipte kalan pellet 1 ml PBS içerisinde çözündürüldü. Pelletin üzerine PBS ilave edilerek son hacim 10 ml olacak şekilde tamamlandı ve üzerine %12 ağırlığında PEG 6000 eklenip yukarıda belirtilen aynı hız ve koşullarda santrifüj edildi. Tekrar süpernatant atıldı, son pellet 800 µl PBS içerisinde çözündürüldü, mikrodializ kapsülüne (QuixSep, ABD) eklendi ve kapsül distile su içinde hazırlanan %0,1 NaCl çözeltisinde manyetik karıştırıcıda (Heidolph MR 3000, Almanya) gece boyu diyalize tabi tutuldu. İzole edilen IgY antikorlarının protein konsantrasyonu nanodrop spektrofotometre (Thermo, ABD) ile 280 nm’de ölçüldü [60-64].

3.4.1. Uygulama

- 1- İmmunize edilen tavuklardan toplanan yumurtalar öncelikle %70 alkol ile dezenfekte edilerek yumurta sarısı ile beyaz kısmı ayrılarak sarı kısım 50 ml'lik tüplere aktarıldı (Resim 3.12, 3.13).



Resim 3.12. %70 alkol ile yumurtanın dezenfeksiyon



Resim 3.13. Yumurta sarısının filtre kağıdında beyaz kısımdan ayrılması

2- Her yumurtadan yaklaşık 15 ml yumurta sarısı elde edilmiştir, bu hacmin üzerine iki kat PBS (30 ml) eklendi ve toplam hacmin (45 ml) üzerine 1,575 gram (%3.5) PEG 6000 ekleyerek hazırlandı (Resim 3.14).



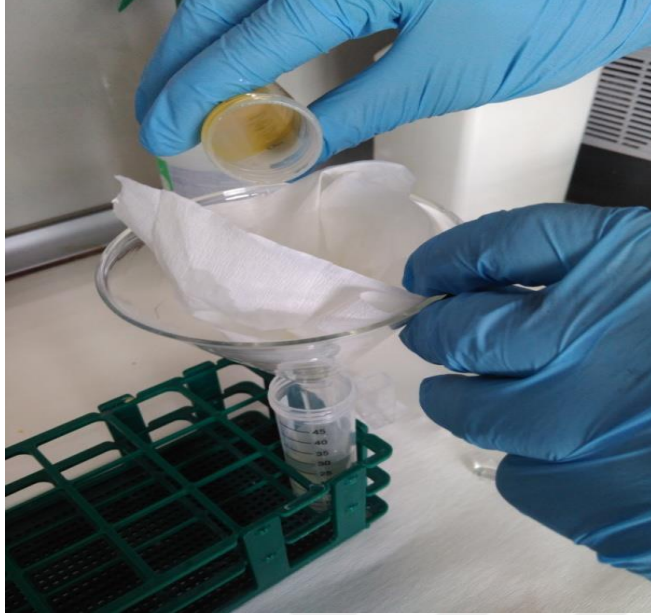
Resim 3.14. Yumurta ve PEG 6000 karışımının vortekslenmesi

3- Yumurta sarısı ve PEG 6000 içeren tüpler 13000 g +4 °C'de 20 dakika ultrasantrifüj (Thermo, ABD) cihazında santrifüj edildi (Resim 3.15).



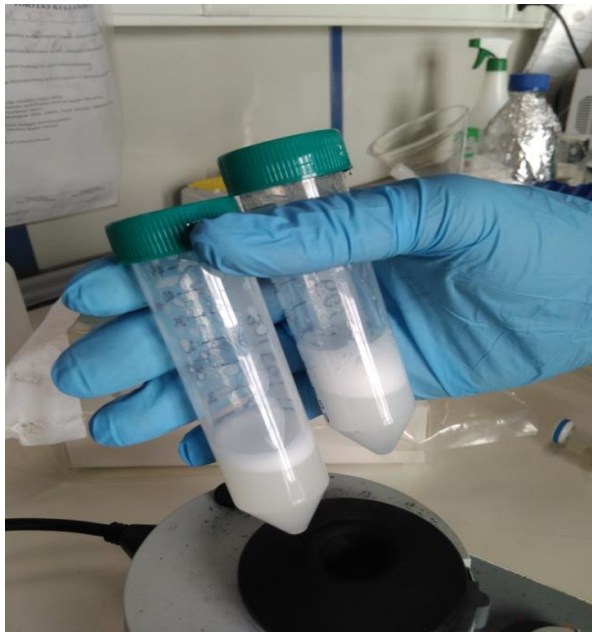
Resim 3.15. Ultrasantrifüj cihazında tüplerin santrifüj işlemi

- 4- Santrifüj sonrası oluşan süpernatant kısım filtrelenerek başka bir tüpe aktarıldı (Resim 3.16).



Resim 3.16. Santrifüj işleminden sonra süpernatantın filtrasyonu

- 5- Filtre edilen süpernatanttan oluşan yeni hacmin üzerine %8,5 ağırlığında PEG 6000 ilave edilip, vorteks ve karıştırıldıktan sonra tekrar 13000 g 20 dakika santrifüjlendi (Resim 3.17, 3.18).

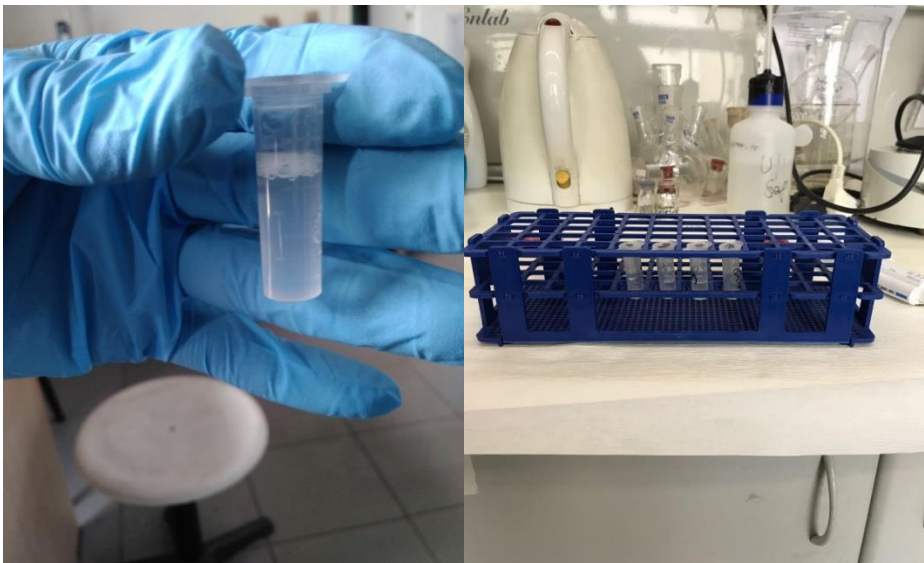


Resim 3.17. Filtrasyonu sonrası oluşan süpernatant ve %8,5 PEG 6000 karışımının vortekslenmesi

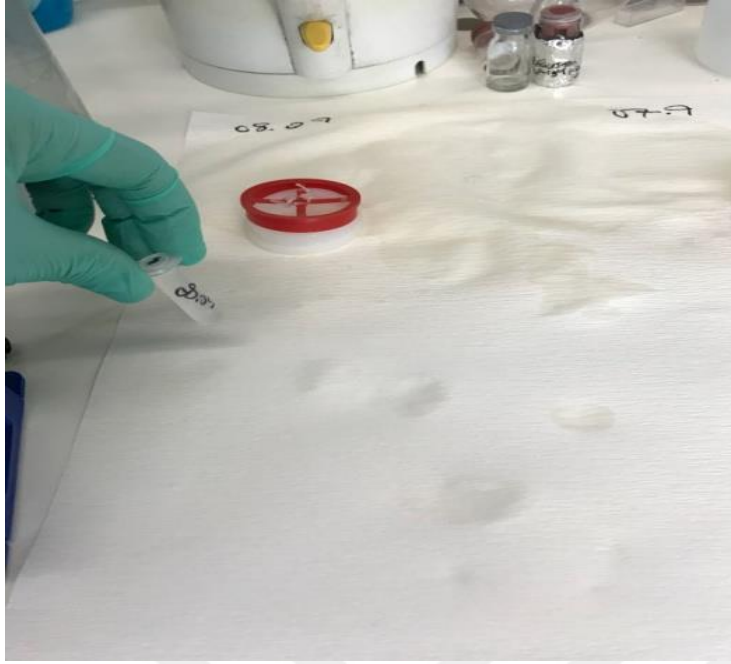


Resim 3.18. Örneklerin dönen silindir mikserde (Thermo, ABD) karıştırılması

6. Santrifüj yapılan tüplerin süpernatant kısmı atılarak dipte kalan pellet 1 ml PBS ile çözdürüldü.
7. Çözülmüş pelletin üzerine son hacim 10 ml olacak şekilde PBS eklendi.
8. 10 ml pelletin toplam hacmine %12 ağırlıkta PEG 6000 eklenip, tekrar $+4^{\circ}\text{C}$ 'de, 13000g 20 dakika santrifüj edildi.
9. Tekrar süpernatant atıldı, son pellet 800 μl PBS içerisinde çözdürüldü, mikrodializ kapsülüne eklendi ve kapsül (QuixSep, ABD) distile su içinde hazırlanan %0,1 NaCl çözeltisinde manyetik karıştırıcıda (Heidolph MR 3000, Almanya) gece boyu diyalize tabi tutuldu (Resim 3.19-3.21).



Resim 3.19. IgY içeren son pellet oluşumu (izole edilen antikor)



Resim 3.20. Elde edilen antikorların mikrodializ kapsülüne eklenmesi



Resim 3.21. Antikorların ayrıştırılması için %0,1 NaCl çözeltisinde manyetik karıştırıcıyla gece boyu diyaliz işleminin yapılması

10. İzole edilen IgY antikorlarının protein konsantrasyonu bazı alınarak nanodrop (Thermo, ABD) spektrofotometre ile 280 nm’de ölçüldü.

3.5. ELISA Yöntemi ile IgY Antikorlarının Etkinliğinin Belirlenmesi

3.5.1. ELISA çalışmasında kullanan solüsyonlar

Kaplama solüsyonu; 200 ml distile suya 0,318 g sodyum karbonat (Na_2CO_3), 0,586 g sodyum bikarbonat (NaHCO_3) ve 0,04 g sodyum azide (Na_2N_3) eklenerek pH: 9,6 olacak şekilde hazırlandı.

Phosphate Buffer Solüsyonu (PBS); piyasada ticari olarak bulunan PBS tabletlerinden (Sigma Aldrich, ABD) (1 tablet/100 ml distile su) pH:7,4 olacak şekilde hazırlandı.

PBS/Tween20,(PBS-T) hazır PBS çözeltisine %0,05 (v/v) olacak şekilde Tween20 ilave edilerek hazırlandı.

Bovine Serum Albumin (Sigma Aldrich, ABD) (BSA) çözeltisi; toz şeklinde bulunan BSA'den 4,83 mg tartılarak 1 ml PBS solüsyonu içerisinde hazırlandı.

Bloklama Tamponu; 12 ml PBS/Tween20 solüsyonuna BSA çözeltisinden 12 µl eklenerek hazırlandı.

Substrat Çözeltisi; paranitrofenil fosfat (Sigma Aldrich, ABD) (pNPP) içeren tabletlerden 10 ml distile su içine bir tane tablet konularak 10 dakika mikserde karıştırılarak hazırlandı.

3.5.2. ELISA için antijen hazırlaması

Kanlı agarda üreyen bakteri kültürlerinden steril eküvyonla 3-5 koloni alınarak 1 ml PBS içeren tüplere aktarıldı ve 3000 rpm 'de 20 dakika santrifüj edilerek yıkama işlemi yapıldı. Süpernatant atılıp yıkama işlemi tekrarlandı. Pelletin üzerine 1 ml PBS eklendi ve bakterileri parçalamak için beş kez sıvı nitrojende dondurulup 37°C'lik su banyosunda çözüldü. Hücre artıklarını uzaklaştırmak amacıyla antijen içeren tüpler 9000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi ve üstteki berrak kısım (antijen) toplandı. Toplanan antijenin, kaplama solüsyonu içindeki son konsantrasyon 1-2 µg/100 µl protein (antijen) olacak şekilde hazırlandı ve ELISA plağının her kuyusuna kuyu başına 100µl eklenip +4°C'de gece boyu inkübe edildi. Plaklar PBS /Tween20 ile üç defa yıkandı, her kuyuya 100µl bloklama solüsyonu eklenerek

37°C’de 1 saat inkübe edildi. Tekrar üç defa PBS/Tween 20 ile yıkanan plaklar oda ısısında kuruduktan sonra tekrar kullanılabilecek kadar -20°C’de saklandı [55, 59, 65, 66].

3.5.3. Testin çalışılması

Tüm yumurtalardan izole edilen IgY antikorlarının PBS/Tween20 içinde 1/100, 1/1000 ve 1/10000 seri dilüsyonları hazırlandı. Her dilüsyon için dört kuyucuk kullanıldı. Bakteri antijenleri ile kaplı ELISA plaklarındaki kuyulara antikor dilüsyonlarından 100µl ilave edildi. Plaklar etüvde 1 saat inkübe edildikten sonra PBS/Tween20 ile üç defa yıkandı. Yıkama ardından 1:1000 olarak sulandırılan HRP (horseradishperoxidase) ile konjuge edilmiş keçi anti-tavuk IgY (Sigma Aldrich, ABD) sekonder antikorlarından her kuyuya 100µl eklendi. Plaklar etüvde 1 saat inkübe edildikten sonrası PBS/Tween20 ile beş kez yıkama yapıldı. Yıkama işleminden sonra her kuyuya substrat tamponundan 100 µl eklendi ve 30-45 dakika oda ısısında karanlık ortamda inkübe edildi. ELISA plaklarında oluşan renk değişimi 405 nm dalga boyunda spektrofotometrede (Thermo, ABD) ölçüldü [55, 59, 65, 66].

3.5.4. Cut off değerinin hesaplanması

İmmunize edilmeyen tavuk yumurtalarından izole edilen IgY antikorlar ile elde edilen OD’nin ortalaması +2X SD (ODC) şeklinde hesaplandı [67, 68]

3.6. Filtrelere IgY antikorunun İmmobilize Edilmesi

İzole edilen IgY antikorlarının bakteri yakalama kapasitesini test etmek için antikorlar cam elyaf yapısına sahip olan filtreye capture ELISA yöntemi kullanılarak sabitlendi [16, 17,37, 69].

3.6.1. Uygulaması

1- Cam elyaf yapısına sahip olan filtre maddesi 4 cm en, 4 cm boy ve 1.5 mm kalınlık ölçülerinde kullanıldı (Resim 3.22).



Resim 3.22. Kullanılan cam elyaf filtresi

- 2- Filtre kaplamalarında IgY antikorları 100, 200, 300, 400, 500 ve 750 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında denendi.
- 3- *S. aureus* ve *P.aeruginosa* bakterisi için filtreler 100, 200 ve 500 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarında antikorla kaplandı.
- 4- *K. pneumoniae* denemelerinde antikor miktarı 100, 200, 300, 400, 500 ve 750 $\mu\text{g/ml}$ yoğunlukta kullanılmıştır.
- 5- Antikorlar 10 ml kaplama tamponu içinde hazırlandı.
- 6- Steril petri kabında kaplama tamponu filtreler üzerine eklendi ve gece boyunca + 4 °C'de bekletildi (Resim 3.23).
- 7- Buzdolabında bekletilen filtreler daha sonra PBS-T ile üç defa steril ortamda yıkandı.



Resim 3.23. Filtrelerin antikorlarla kaplama işlemi

- 8- Filtreler yıkama işleminden sonra 10 ml bloklama solüsyonu ile 1 saat boyunca 37 °C' de inkübe edildi ve tekrar beş defa PBS-T ile yıkandı.
- 9- Hazırlanan filtreler kullanılabildiği kadar + 4 °C' de saklandı.

3.7. Püskürtme İçin Bakteri Hazırlanışı

Katı besiyerinde (kanlı ve EMB) üreyen (*S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae*) kolonilerinin PBS içinde süspansiyonları hazırlanarak püskürtülme işleminde kullanıldı.

3.7.1. Uygulama

- 1- Katı besiyerinde üreyen bakterilerden eküvyon çubuğu ile 3-5 koloni alındı ve PBS içeren tüpe konularak. süspansiyon hazırlandı.
- 2- Her bakteri için çeşitli konsantrasyonlar MacFarland okuyucu (Biomérieux, France) ile ayarlandı ve kullanıldı (Çizelge 3.2) (Resim 3.24)



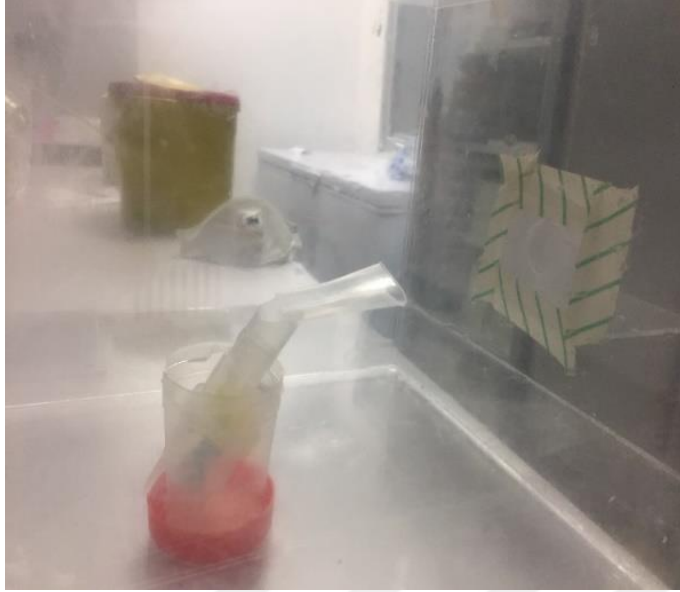
Resim 3.24. MacFarland okuyucusu ile bakteri konsantrasyonlarının ayarlanması

- 3- *S. aureus* etkeni için 7.5×10^7 , 6×10^7 , 3×10^7 , ve 2×10^5 cfu/ml konsantrasyonları kullanıldı.
- 4- *P.aeruginosa* bakterisi için 1.5×10^8 , 3×10^7 ve 5×10^4 cfu/ml konsantrasyonları denendi.
- 5- *K. pneumoniae* püskürtmesinde 3×10^7 , 6×10^7 , 7.5×10^7 , 1.5×10^8 , 3.0×10^8 , 4.5×10^8 ve 6.0×10^8 cfu/ml konsantrasyonlar kullanıldı.

Çizelge 3.2. McFarland yöntemiyle sayım

MacFarland	Bakteri sayısı
0.1	3×10^7
0.2	6×10^7
0.25	7.5×10^7
0.5	1.5×10^8
1.0	3.0×10^8
1.5	4.5×10^8
2.0	6.0×10^8

- 6- PBS'te hazırlanan bakteriler filtreler püskürtülmeden önce kontrol amaçlı kanlı agara ekim yapıldı ve 37 C'de 18-24 saat inkübe edildi.
- 7- Sıvı ortamda olan bakteriler nebulizatör cihazında (Renz, Almanya) bulunan püskürtme kabına aktarıldı (Resim 3.25).



Resim 3.25. Püskürtme kabı

- 8- Hazırlanan IgY antikor içeren filtrelerin yakalama kapasitesini test etmek için antikor içermeyen filtreler de özel tasarlanan kabinin iç kısmına yerleştirildi [39].

3.8. Kabin Tasarımı

IgY antikoru içeren ve içermeyen filtrelerin etkinliğini test etmek için tasarlanan kabin şeffaf fiberglass yapısı olan maddeden yapıldı. Kutu, iç ve dış kabin olarak iki parça halinde tasarlandı [16].

- 1- İç kabinin ebatları en 30 cm, uzunluk 30 cm ve yükseklik 25 cm olarak tasarlandı. Hava girişi ve çıkışı için iki tane delik açıldı. Hava giriş için içi kabinin zemininden 15 cm yükseklikte 1 cm çapında bir delik açıldı. Ayrıca test edilecek filtrelerden geçecek havanın dış kabine ulaşması için 3 cm çapında delik açıldı ve çıkan havanın kanlı ve EMB besiyeleri ile temas etmesi için besiyerlerin konulması için bir yer yapıldı. Ayrıca işlem sırasında filtrelerin ve püskürtme yapılacak plakların kolayca yerleştirilmesi için kabinin üst kısmında 10 x 10 cm boyutunda kapak yapıldı (Resim 3.26).

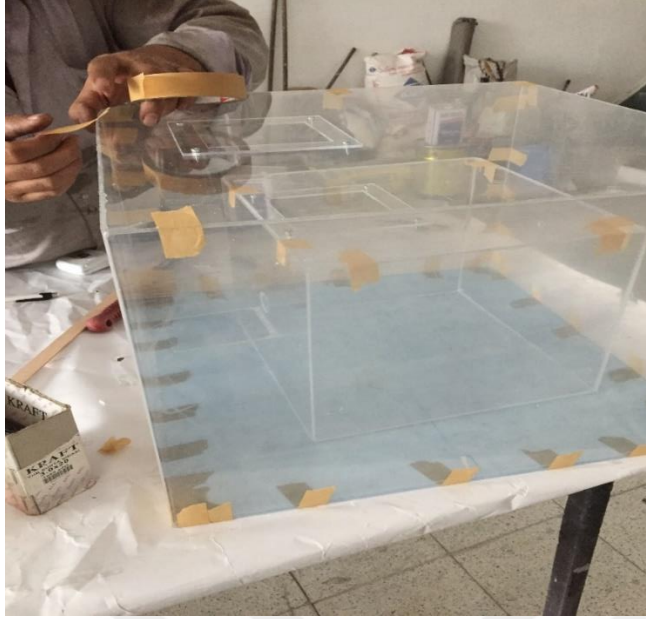


Resim 3.26. İç kabin tasarlama aşaması

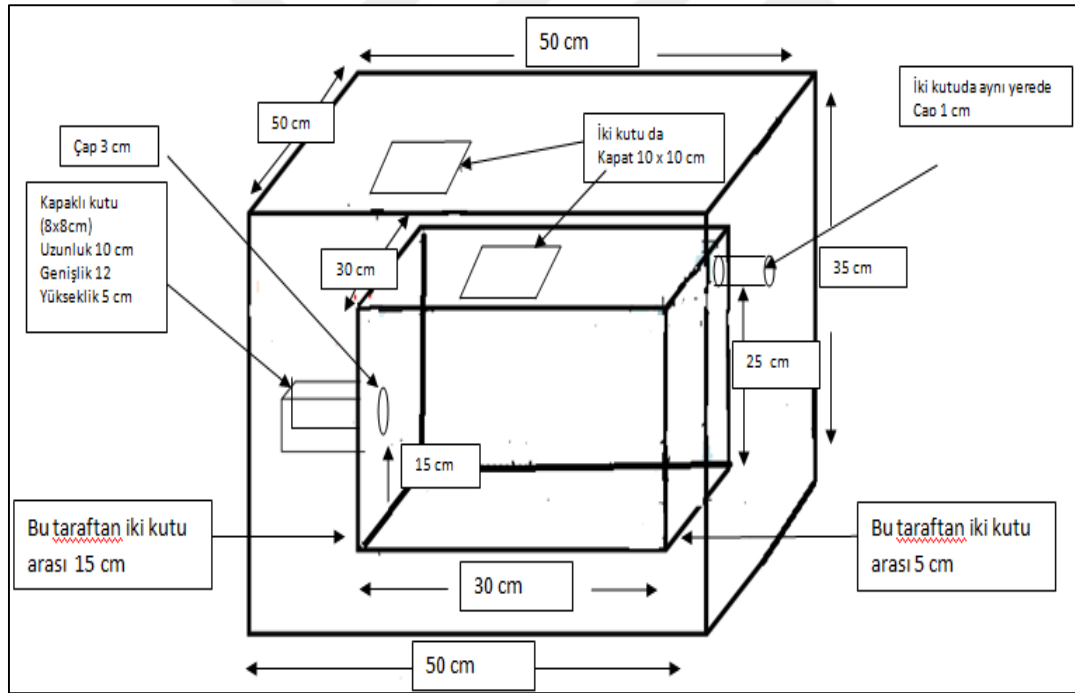
- 2- Dış kabin, iç kabine benzer şekilde tasarlandı, ancak 50x50x35 cm ölçülerinde yapıldı. Test edilecek filtrelerden geçen havanın dış kabinin dışına çıkması için 0.5 cm çapında bir delik açıldı ve çıkan havanın temiz bir şekilde dışarı salınması için 0.20 m μ filtre yerleştirildi (Resim 3.27-3.29).



Resim 3.27. Dış kabin tasarlama aşaması



Resim 3.28. Test kabininin son hali



Resim 3.29. İç ve dış kabinin tasarım aşamasında belirlenen ölçülerinin detayları

3.9. Filtre Etkinliğinin Belirlenmesi

Bakteri yakalama kapasitesini test etmek için geliştirilen IgY antikorları filtrelelere çeşitli konsantrasyonlarda kaplandı. Geçirgenliğini denemek için püskürtülecek bakteriler farklı konsantrasyonlarla PBS içinde hazırlandı (Bkz 3.8.1) [16,17].

3.9.1. Uygulama

- 1- Bakteri süspansiyonları 10 ml PBS içinde hazırlandı.
- 2- Hazırlanan bütün bakteri konsantrasyonları nebulizatör (Renz, Almanya) ile IgY içeren ve içermeyen filtreler üzerine püskürtüldü (Resim 3.30).
- 3- Püskürtme yapılırken, püskürtme işlemini test etmek amacıyla iç ve dış kabine işlem sırasında kanlı agar yerleştirildi.



Resim 3.30. Bakteri püskürtülmesi için kullanılan nebulizatör cihazı

- 4- Nebulizatörden gelen hava akımı ile sıvı halinde bulunan etkenler buhar fazına dönüşerek test edilecek filtreler üzerine püskürtüldü.
- 5- Her püskürtmede *S.aureus*, *K.pneumoniae* için üç tane kanlı agar ve *P.aeruginosa* için ise kanlı agar ve EMB kullanıldı (Resim 3.31).
- 6- Püskürtme işlemi 1, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 ve 20 dakika aralıklarla denendi.
- 7- Bütün bakteriler için yapılan her püskürtme işleminde denemeler aynı koşullarda dört defa yapıldı.
- 8- IgY antikorlu filtrelerde (100-750 µg/ml) antikor konsantrasyonları denendi.
- 9- İşlem sonrası toplanan kanlı agar ve EMB besiyerlerinin 37 °C'de 18-24 saat etüvde inkübasyonu sonrası koloni sayımı yapıldı.



Resim 3.31. Kabinde nebulizatör ile bakterilerin püskürtme işlemi

3.10. İstatistiksel Analiz

İmmunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının OD değerlerinin karşılaştırılması ve filtre etkinliğinin değerlendirilmesi için gerekli istatistiksel analizler Statistical Packages of Social Sciences (SPSS, version 20.0 for Windows) bilgisayar programında Mann-Whitney U testi kullanarak yapıldı ve $p < 0,05$ değeri istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.



4. BULGULAR

Çalışmamızda, nozokomiyal pnömoni etkeni olarak sık tanımlanan *S.aureus*, *K.pneumoniae* ve *P.aeruginosa* bakterilerine karşı IgY antikorı geliştirmek için 22 haftalık 11 adet Lohmann Brown cinsi tavukların 9'una göğüs kas içi bakteri antijenleri ile enjeksiyon yapılarak immunize edilmiştir. İmmunize edilen ve edilmeyen tavuklardan 35. günden itibaren yumurtalar iki ay boyunca toplanmıştır (1yumurta/gün). Bakterilere karşı oluşan IgY antikorlarının saflaştırılması ve elde edilmesi için PEG 6000 kullanılmıştır. İzole edilen IgY antikorlarının protein konsantrasyonu bazı alınarak nanodrop spektrofotometre ile 280 nm'de ölçülmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Çalışmamızda kullanılan bakterilere karşı elde edilen IgY antikor düzeyleri

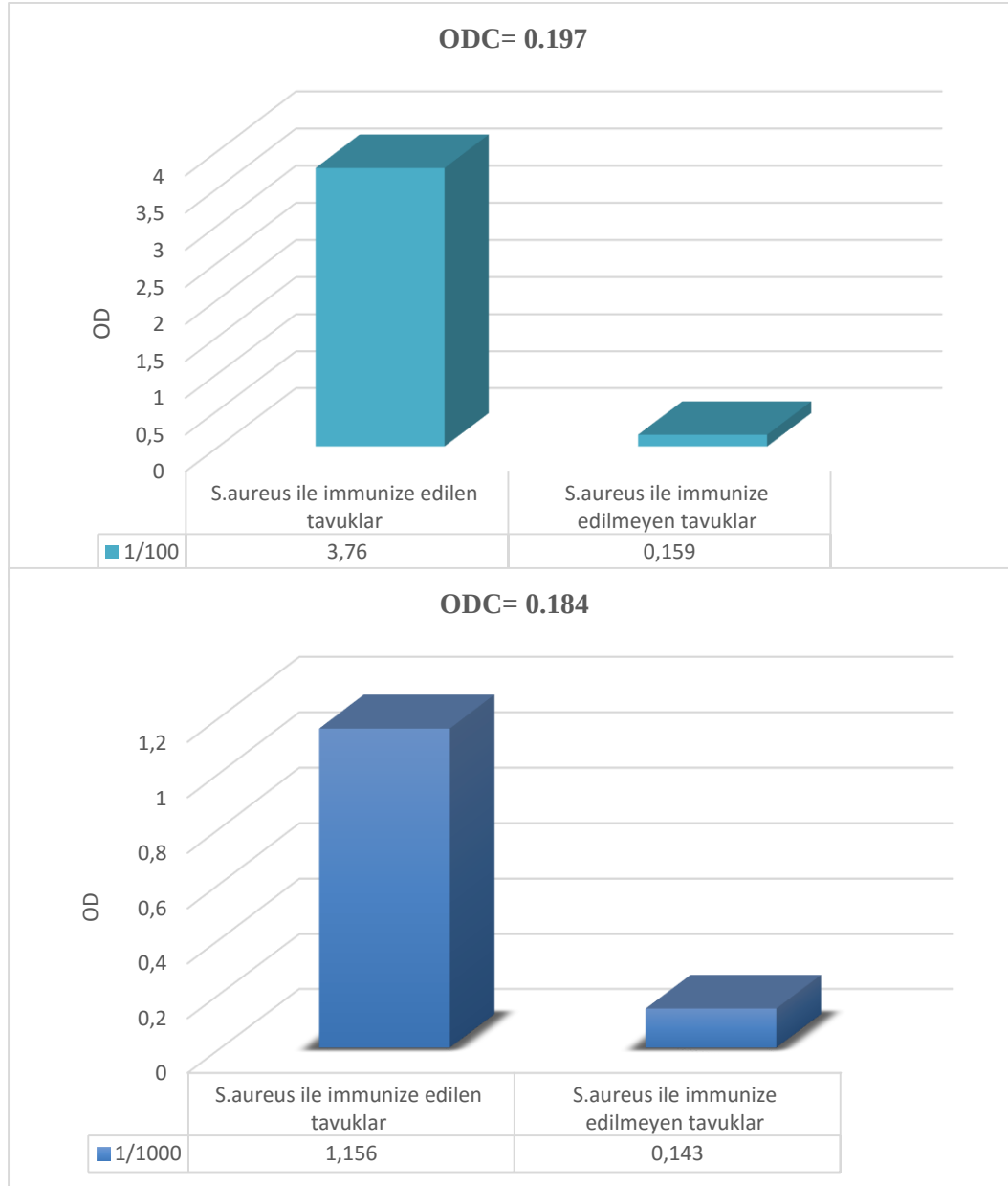
Bakteriler	mg/ml
<i>S.aureus</i> ATTC 6538	14.63
<i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853	3.70
<i>K.pneumoniae</i> ATCC 13883	1.33
Negatif kontrol (immunize edilmeyen)	0.93

Antikorların etkinliği ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. İmmunize edilen ve edilmeyen tavukların yumurtalarından izole edilen IgY antikorlarının OD değeri karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Çalışmamızda kullanılan bakterilere karşı elde edilen IgY antikorunun farklı dilüsyonlardaki optik dansite (OD), cut off (ODC) ve p değerleri

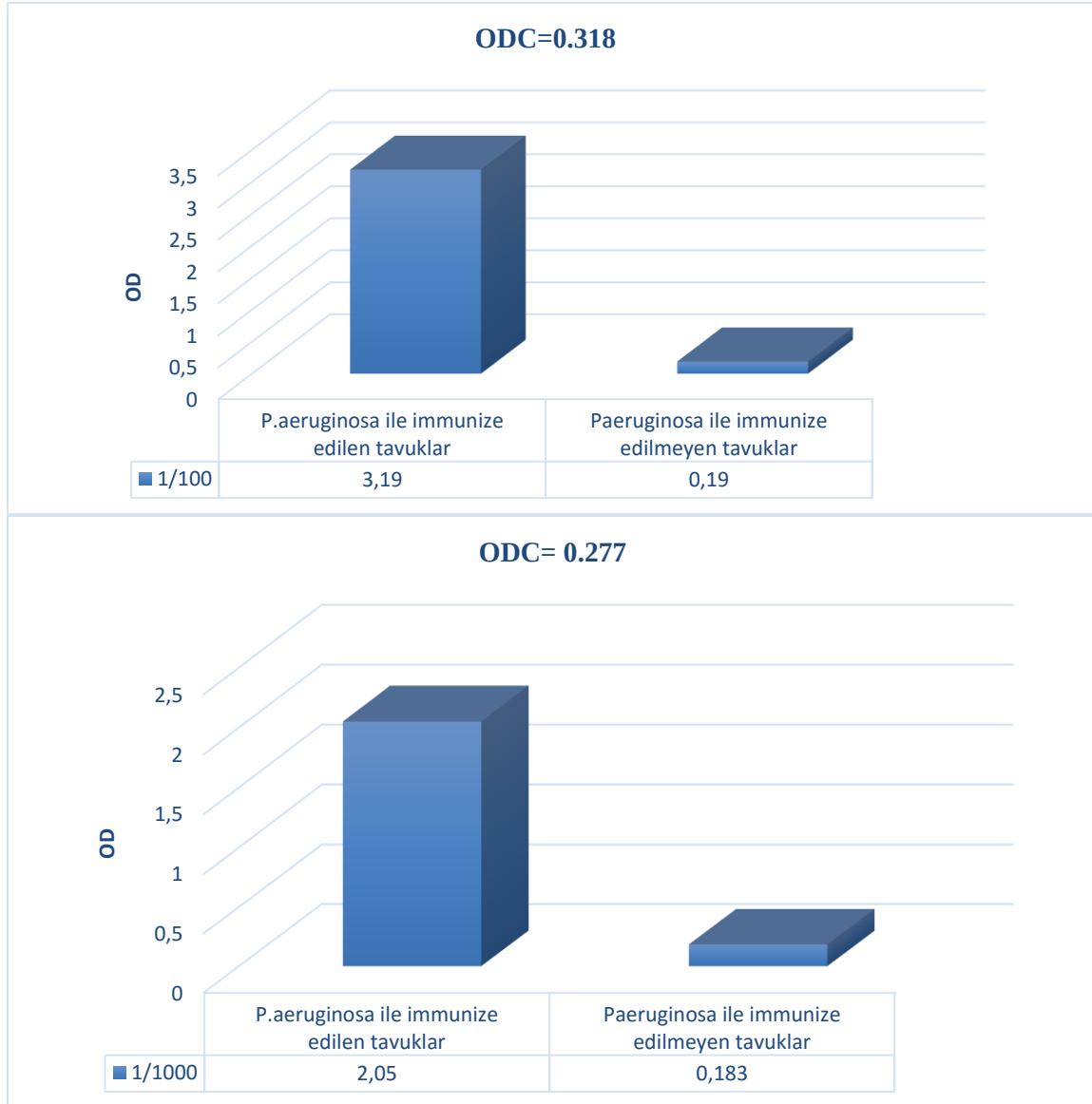
Antikorlar		OD	Cut off (ODC)	P değeri
Anti- <i>S.aureus</i> IgY	1/100 dilüsyon	3.76	0.197	p<0,05
	1/1000 dilüsyon	1.156	0.184	p<0,05
Anti- <i>P.aeruginosa</i> IgY	1/100 dilüsyon	3.19	0.318	p<0,05
	1/1000 dilüsyon	2.05	0.277	p<0,05
Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY	1/100 dilüsyon	2.24	0.113	p<0,05
	1/1000 dilüsyon	1.022	0.111	p<0,05

Anti-*S.aureus* IgY ve immunize edilmemiş yumurtalardaki antikor arasındaki OD değeri farklı dilüsyonlar (1/100 ve 1/1000) ile karşılaştırıldığında: immunize olan yumurtalardaki antikorların OD değerlerinin ODC'den daha fazla olduğu saptanmıştır (p<0.05). Bu sonuçlar Şekil 4.1 de sunulmuştur.



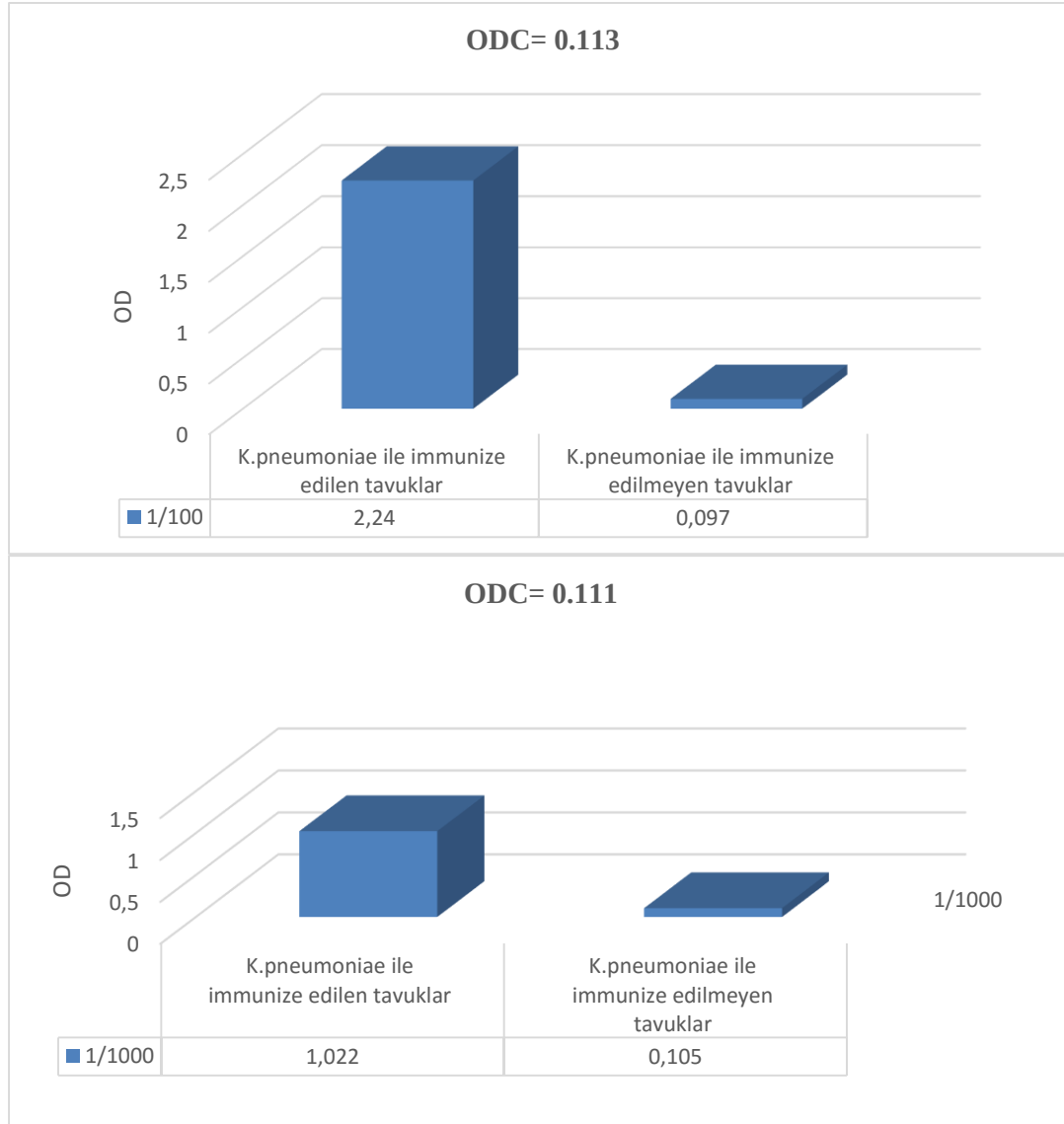
Şekil 4.1. *Staphylococcus aureus* ile immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikor (1/100 ve 1/1000 dilüsyonlardaki) OD değerlerinin karşılaştırılması

Anti-*P.aeruginosa* IgY OD değerleri ise anti-*S.aureus* IgY değerleri ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. Anti-*P.aeruginosa* IgY ile ilgili sonuçlar Şekil 4.2 verilmiştir.



Şekil 4.2. *Pseudomonas aeruginosa* ile immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikor (1/100 ve 1/1000 dilüsyonlardaki) OD değerlerinin karşılaştırılması

Anti-*K.pneumoniae* IgY ve immunize edilmemiş yumurtalardaki antikor arasındaki OD değeri farklı dilüsyonlar (1/100 ve 1/1000) ile karşılaştırıldığında: immunize olan yumurtadaki antikorların OD değerlerinin ODC daha fazla olduğu saptanmıştır ($p<0.05$). Bu sonuçlar Şekil 4.3 te sunulmuştur.



Şekil 4.3. *Klebsiella pneumoniae* ile immunize edilen ve edilmeyen tavuklardan elde edilen IgY antikor (1/100 ve 1/1000 dilüsyonlardaki) OD değerlerinin karşılaştırılması

4.1. Spesifik IgY Antikorlarının Bakteri Yakalama Kapasitesi

S.aureus, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae* bakteri antijenleri ile immunize edilen ve immunize edilmeyen tavuk yumurtalarından izole edilen IgY antikorlarının hem 1/100 dilüsyonda hem de 1/1000 dilüsyondaki OD değerlerinin immunize edilmeyen tavuk yumurtalarından izole edilen OD'lerle karşılaştırılması sonucunda her iki dilüsyonda da OD değerlerin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p<0,05$).

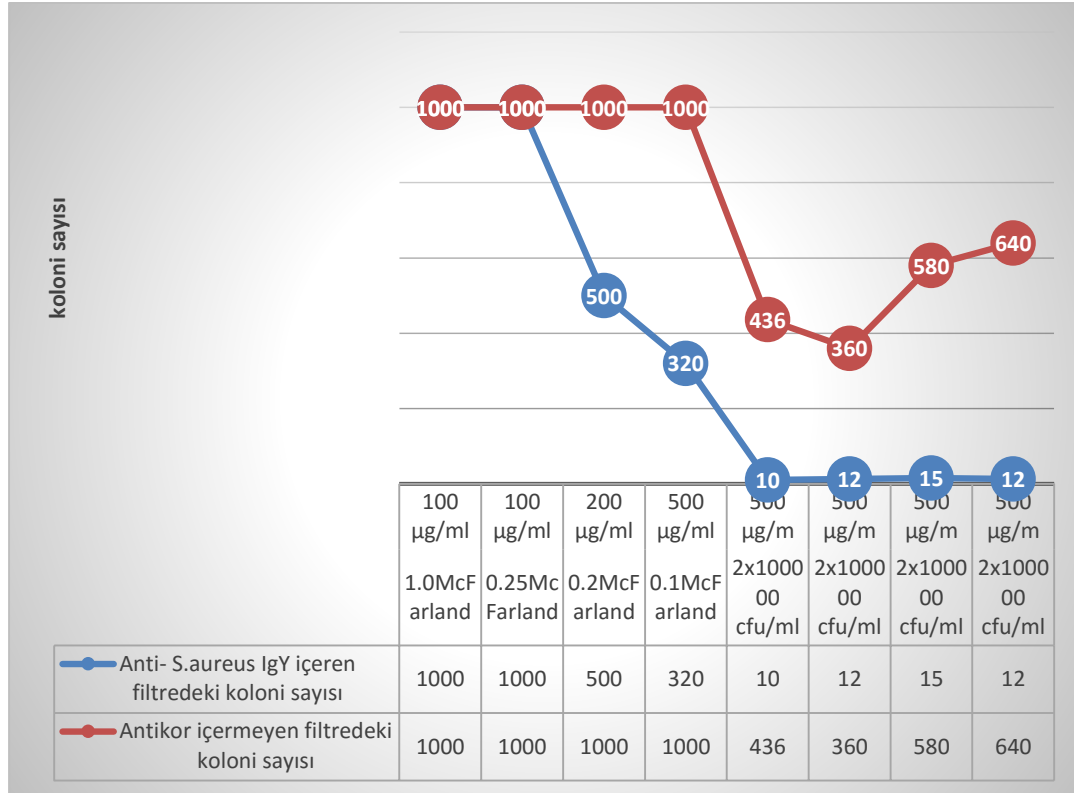
Nozokomiyal pnömoni etkenlerine karşı geliştirilen spesifik IgY antikorların bakteri yakalama kapasitesini test etmek için bakteriler farklı konsantrasyonlarla IgY antikorlu içeren ve içermeyen filtre üzerine püskürtülmüştür.

Anti-*S.aureus* IgY içeren filtrelerin geçirgenliğini denemek için *S.aureus* bakterisinden 2×10^5 , 3×10^7 , 6×10^7 ve 7.5×10^7 cfu/ml konsantrasyonlarla hazırlanmış ve en uygun sonuçlar 2×10^5 cfu/ml yoğunluğunda elde edilmiştir. Ayrıca anti-*S.aureus* IgY antikorları 100, 200 ve 500 µg/ml yoğunlukta denenmiştir ve en etkili antikor düzeyi 500 µg/ml antikor içeren filtrelerde görülmüştür. Püskürtme işlemi 1, 2, 5, 7.5, 10 ve 15 dakika aralıklarla test edilmiştir ve en uygun püskürtme zamanı ise 10 dakika olarak saptanmıştır. Anti-*S.aureus* IgY içeren filtrenin arkasındaki kanlı agarda saptanan koloni sayısının antikor içermeyen filtreye göre çok az olduğu belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3, Şekil 4.4 ve Resim 4.1-4.4'te verilmiştir.

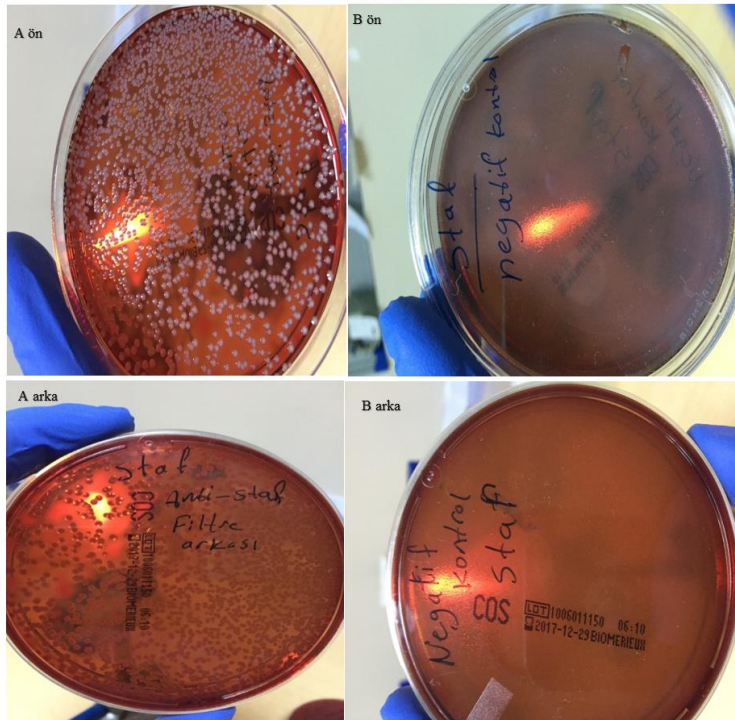
Çizelge 4.3. Anti-*S.aureus* IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı (10 dakika püskürtme)

Denemler	Püskürtülen bakteri konsantrasyonu	Kaplanan IgY antikor konsantrasyonu	Anti- <i>S.aureus</i> IgY içeren filtredeki koloni sayısı	Antikor içermeyen filtredeki koloni sayısı
1	3.0×10^8 cfu/ml	100 µg/ml	Sayılmayacak kadar	Tam üreme
2	7.5×10^7 cfu/ml	100 µg/ml	Sayılmayacak kadar 1000 koloni	Tam üreme
3	6×10^7 cfu/ml	200 µg/ml	100-500 koloni	Tam üreme
4	3×10^7 cfu/ml	500 µg/ml	320 koloni	Tam üreme
5	2×10^5 cfu/ml 1. deneme	500 µg/ml	1-10 koloni	436
6	2×10^5 cfu/ml 2. deneme	500 µg/ml	1-12 koloni	360
7	2×10^5 cfu/ml 3. deneme	500 µg/ml	2-10 koloni	580
8	2×10^5 cfu/ml 4. deneme	500 µg/ml	3-12 koloni	640

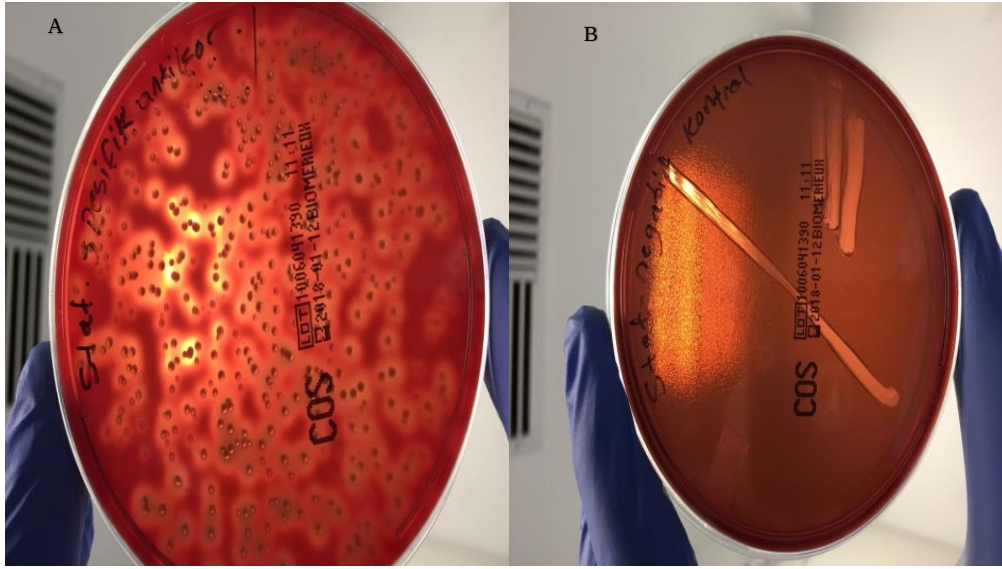
* Tam üreme 100000 koloni olarak değerlendirilmiştir



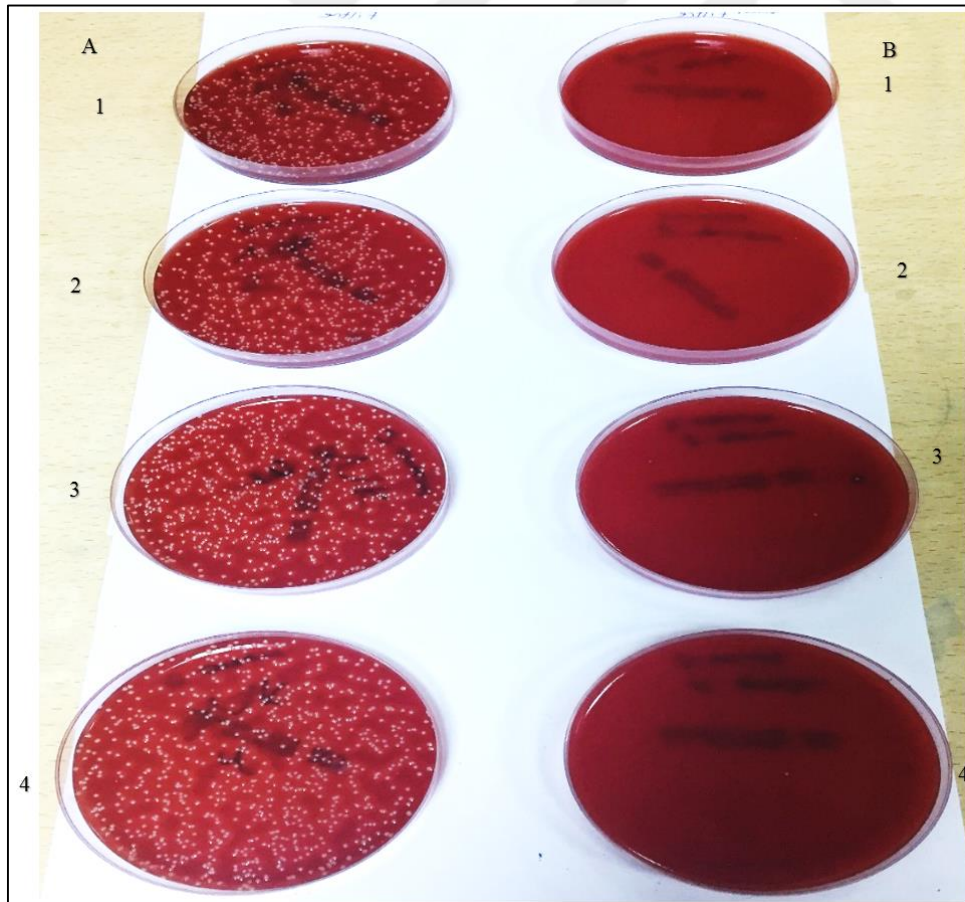
Şekil 4.4. Anti-*S.aureus* IgY içeren ve antikör içermeyen filtrelerde koloni sayısı



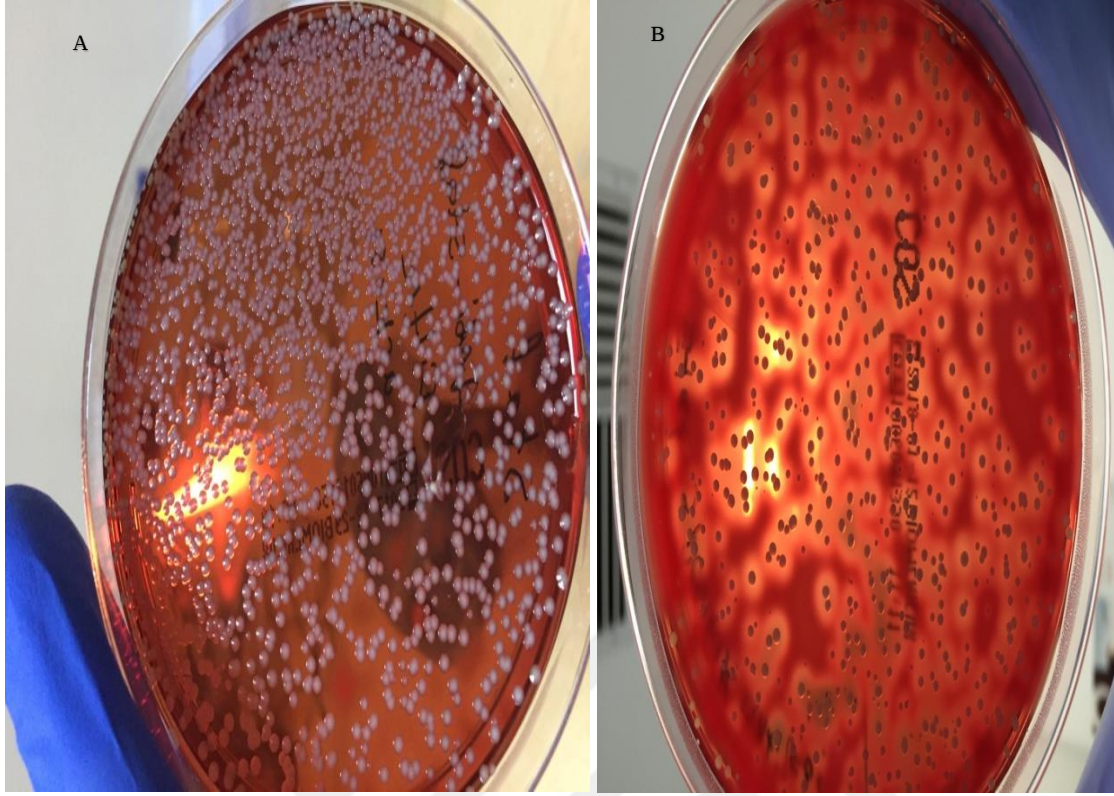
Resim 4.1. Anti-*S.aureus* IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (A) ve antikör içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (B). Kaplanan anti-*S.aureus* antikör konsantrasyonu 200 µg/ml ve püskürtülen *S.aureus* yoğunluğu 6×10^7 cfu/ml olarak kullanılmıştır



Resim 4.2. Anti-*S.aureus* IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (B). Kaplanan anti-*S.aureus* antikor yoğunluğu 500 $\mu\text{g/ml}$ ve püskürtülen *S.aureus* konsantrasyonu 3×10^7 cfu/ml olarak ayarlanmıştır



Resim 4.3. Anti-*S.aureus* IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (B) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme (A). Kaplanan anti-*S.aureus* yoğunluğun 500 $\mu\text{g/ml}$ ve püskürtülen *S.aureus* konsantrasyonu 2×10^5 cfu/ml'dır



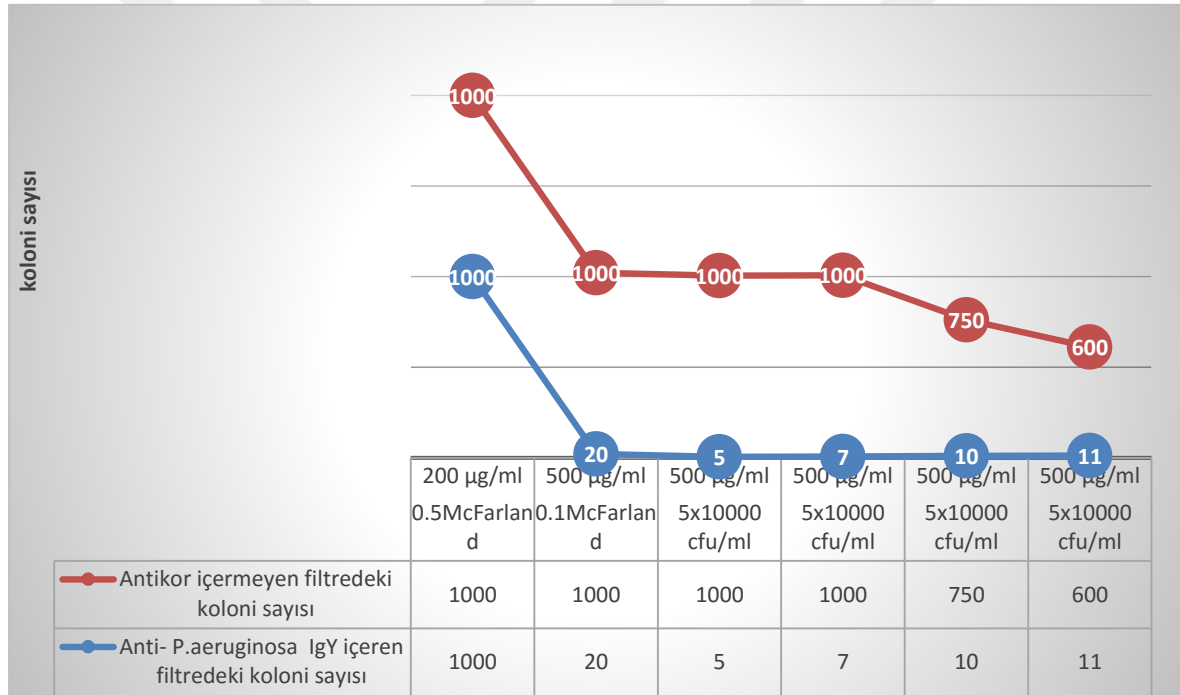
Resim 4.4. Anti-*S.aureus* IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agarlar (B) anti-*S.aureu* içeren filtre antikor konsantrasyonu 200 µg/ml, *S.aureus* bakteri konsantrasyonu 6×10^7 cfu/ml ve (A) anti-*S.aureus* içeren filtre antikor konsantrasyon 500 µg ve *S.aureus* bakteri yoğunluğu 3×10^7 cfu/ml ile püskürtülmüştür

Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtre etkinliği ise; 200 ve 500 µg/ml IgY antikor konsantrasyonlar ile denenmiştir ve en etkili antikor düzeyi 500 µg/ml antikor içeren filtrelerde elde edilmiştir. Püskürtmede 5×10^4 , 1.5×10^8 ve 3.0×10^8 cfu/ml yoğunluğunda *P.aeruginosa* konsantrasyonları kullanılmıştır ve en uygun sonuçlar 5×10^4 cfu/ml yoğunluğunda saptanmıştır. Püskürtme işlemi 1, 2, 2.5, 5, 7.5, 10 ve 15 dakika aralıklarla yapılmıştır en uygun zamanı ise 10 dakika olduğu belirlenmiştir. Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren ve içermeyen filtrelerin arkasındaki EMB besiyerlerinin etüvde bir gece inkübasyonu sonrasında koloni sayımı yapılmıştır. Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtrenin arkasındaki EMB besiyerinde saptanan koloni sayısının antikor içermeyen filtreye göre çok az olduğu saptanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.4. , Şekil 4.5 ve Resim 4.5-4.7’de verilmiştir.

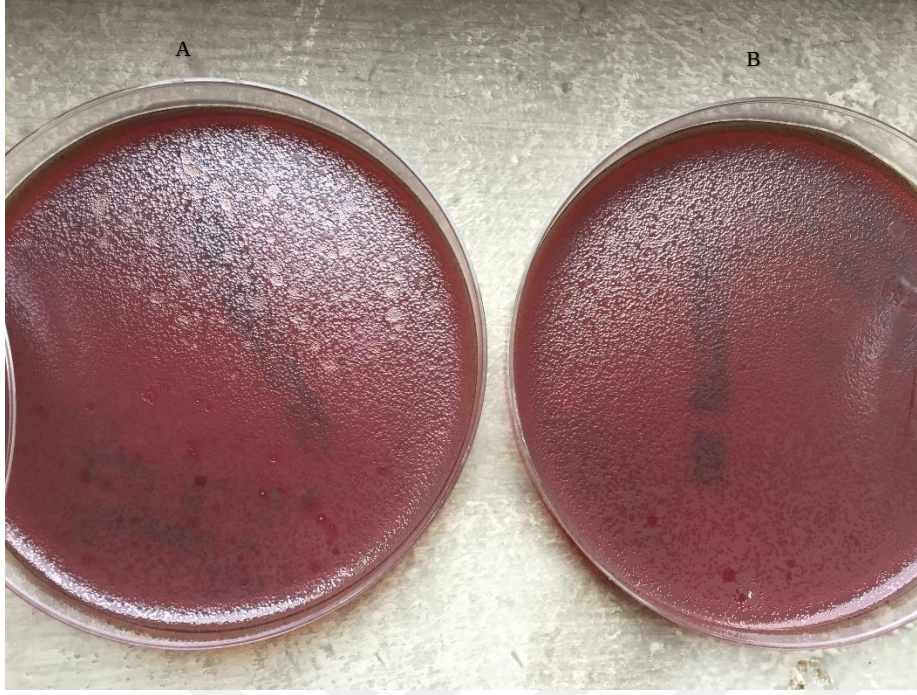
Çizelge 4.4. Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı(10 dakika püskürtme)

Denemler	Püskürtülen bakteri konsantrasyonu	Kaplanan IgY antikor konsantrasyonu	Anti- <i>P.aeruginosa</i> IgY içeren filtredeki koloni sayısı	Antikor içermeyen filtredeki koloni sayısı
1	1.5×10^8 cfu/ml	200 µg/ml	Sayılmayacak kadar	Tam üreme
2	3×10^7 cfu/ml	500 µg/ml	7 koloni	Tam üreme
3	3×10^7 cfu/ml	500 µg/ml	20 koloni	Tam üreme
4	5×10^4 cfu/ml 1. deneme	500 µg/ml	1-5 koloni	680-1000
5	5×10^4 cfu/ml 2. deneme	500 µg/ml	1-7 koloni	630-1000
6	5×10^4 cfu/ml 3. deneme	500 µg/ml	4-10 koloni	456-750
7	5×10^4 cfu/ml 4. denem	500 µg/ml	3-11 koloni	200-600

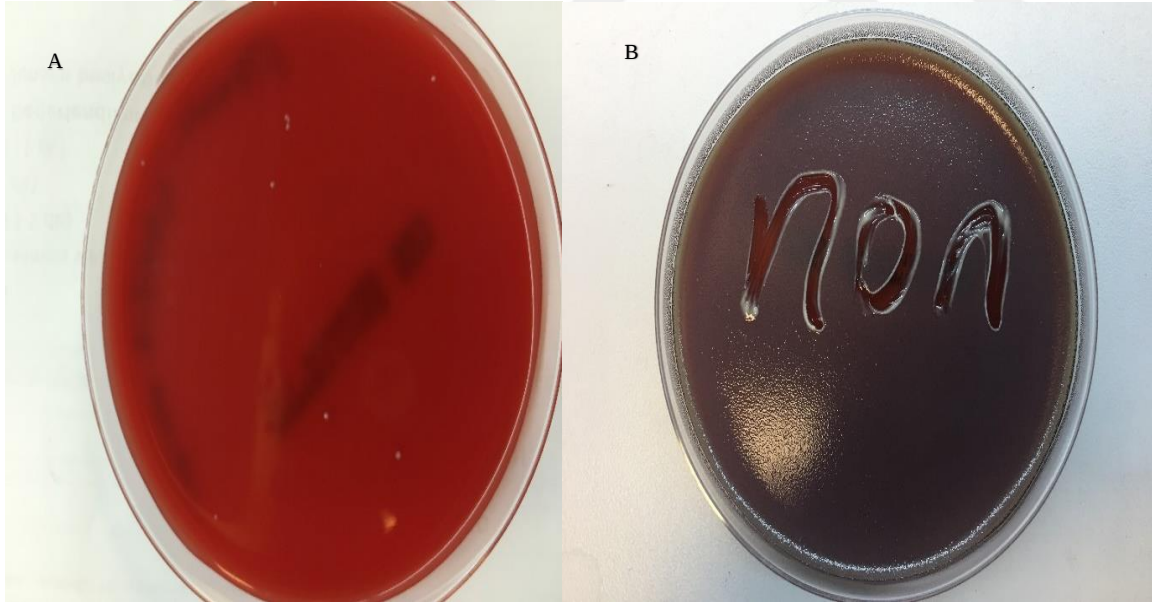
* Tam üreme 100000 koloni olarak değerlendirilmiştir



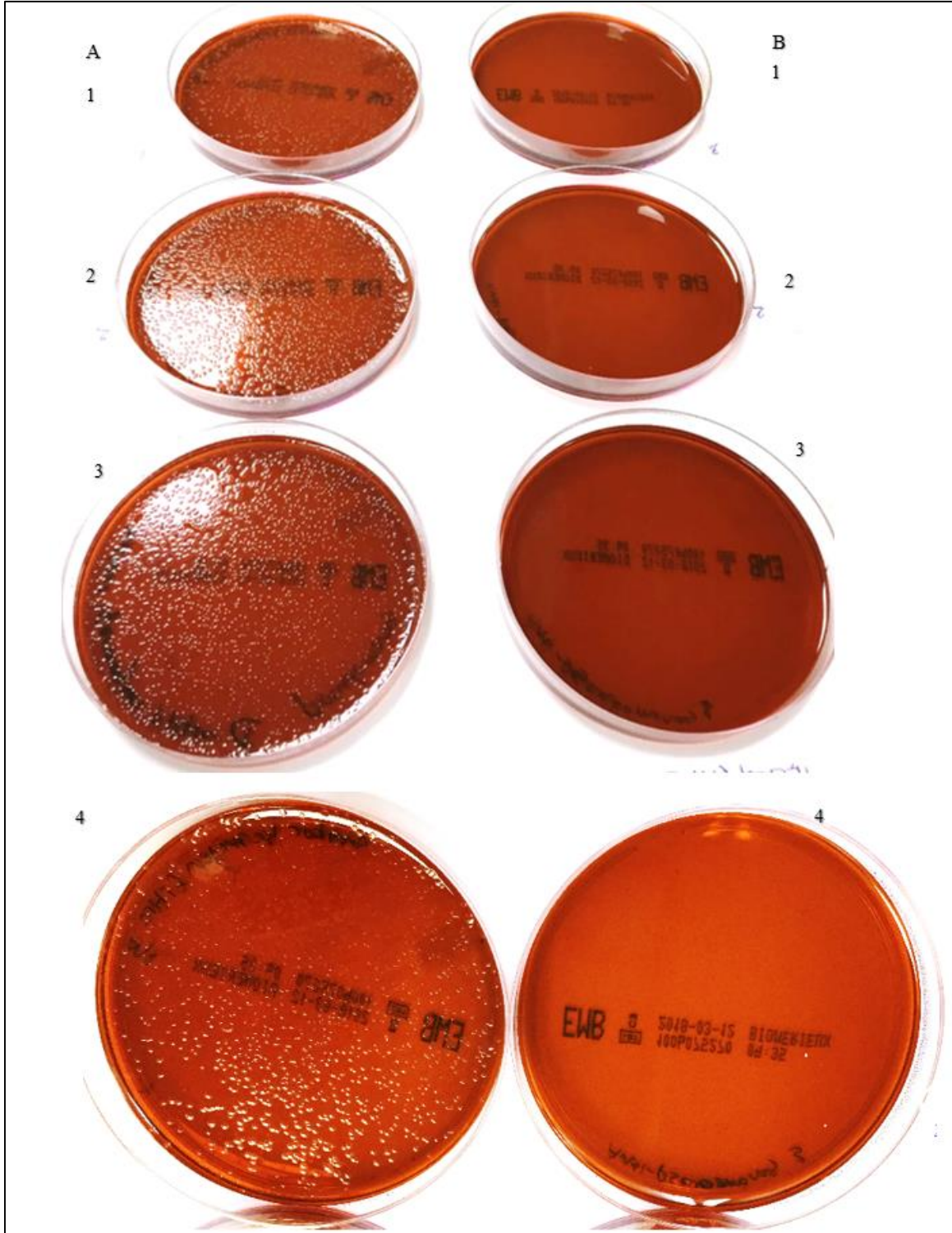
Şekil 4.5. Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı



Resim 4.5. Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki tam üreme (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki tam üreme (B). Kaplanan anti-*P.aeruginosa* IgY antikor konsantrasyonu 200 $\mu\text{g/ml}$ ve *P.aeruginosa* yoğunluğu 1.5×10^8 cfu/ml olarak püskürtülmüştür



Resim 4.6. Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agar plağındaki 7 koloni sayılmıştır (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki tam üreme (B). Kaplanan anti-*P.aeruginosa* antikor konsantrasyonu 500 $\mu\text{g/ml}$ ve *P.aeruginosa* konsantrasyonu 3×10^7 cfu/ml olarak püskürtülmüştür



Resim 4.7. Anti-*P.aeruginosa* IgY içermeyen filtre arkasına konulan EMB plağındaki tam üreme (B) ve antikor içeren filtrenin arkasına konulan EMB plağındaki üreme (A). Kaplanan anti-*P.aeruginosa* IgY antikor konsantrasyonu 500 µg/ml ve *P.aeruginosa* yoğunluğu 5×10^4 cfu/ml olarak kullanılmıştır

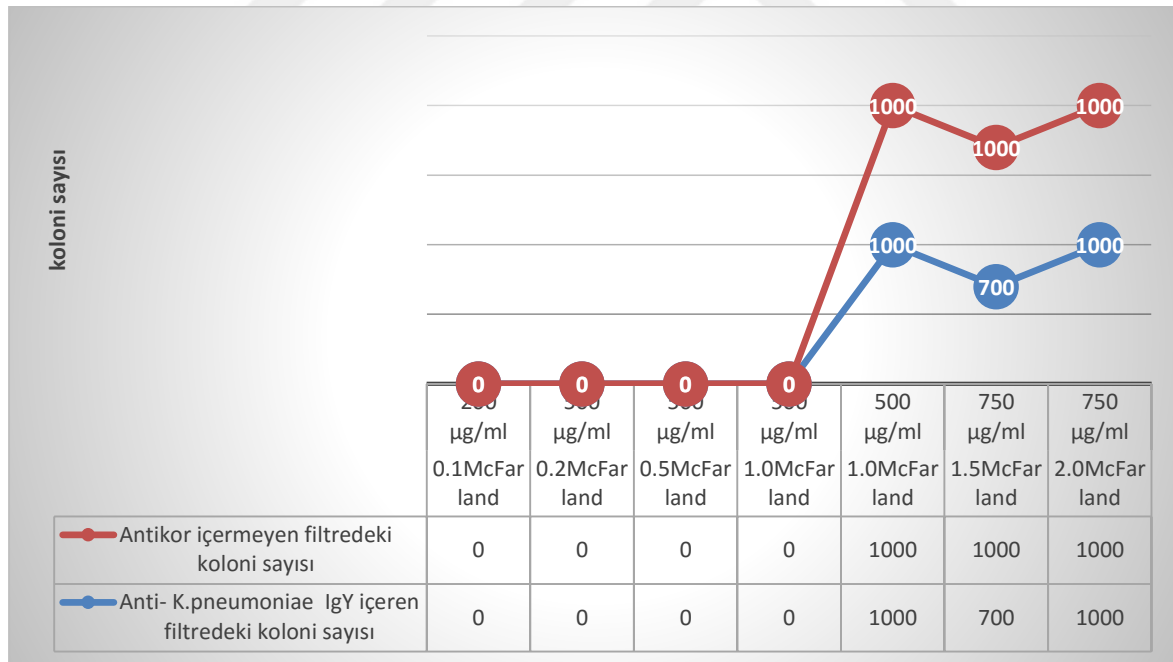
Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren filtre etkinliği: anti-*K.pneumoniae* IgY içeren filtreler 100, 200, 300, 400, 500 ve 750 µg/ml antikor yoğunluğunda kaplanmıştır. Bakteri yakalama kapasitesi denemesinde 3×10^7 , 6×10^7 , 1.5×10^8 , 3.0×10^8 , 4.5×10^8 ve 6.0×10^8 cfu/ml

yoğunluğunda *K.pneumoniae* konsantrasyonu kullanılmıştır. Püskürtme 1, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 ve 20 dakika aralıklarla test edilmiştir. Anti-*K. pneumoniae* IgY içeren ve içermeyen filtre ile yapılan farklı bakteri, anti-*K.pneumoniae* IgY konsantrasyonları ve püskürtme süreleriyle elde edilen sonuçlar arasında tutarsız bulgular elde edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.5, Şekil 4.6 ve Resim 4.8-4.16’de verilmiştir.

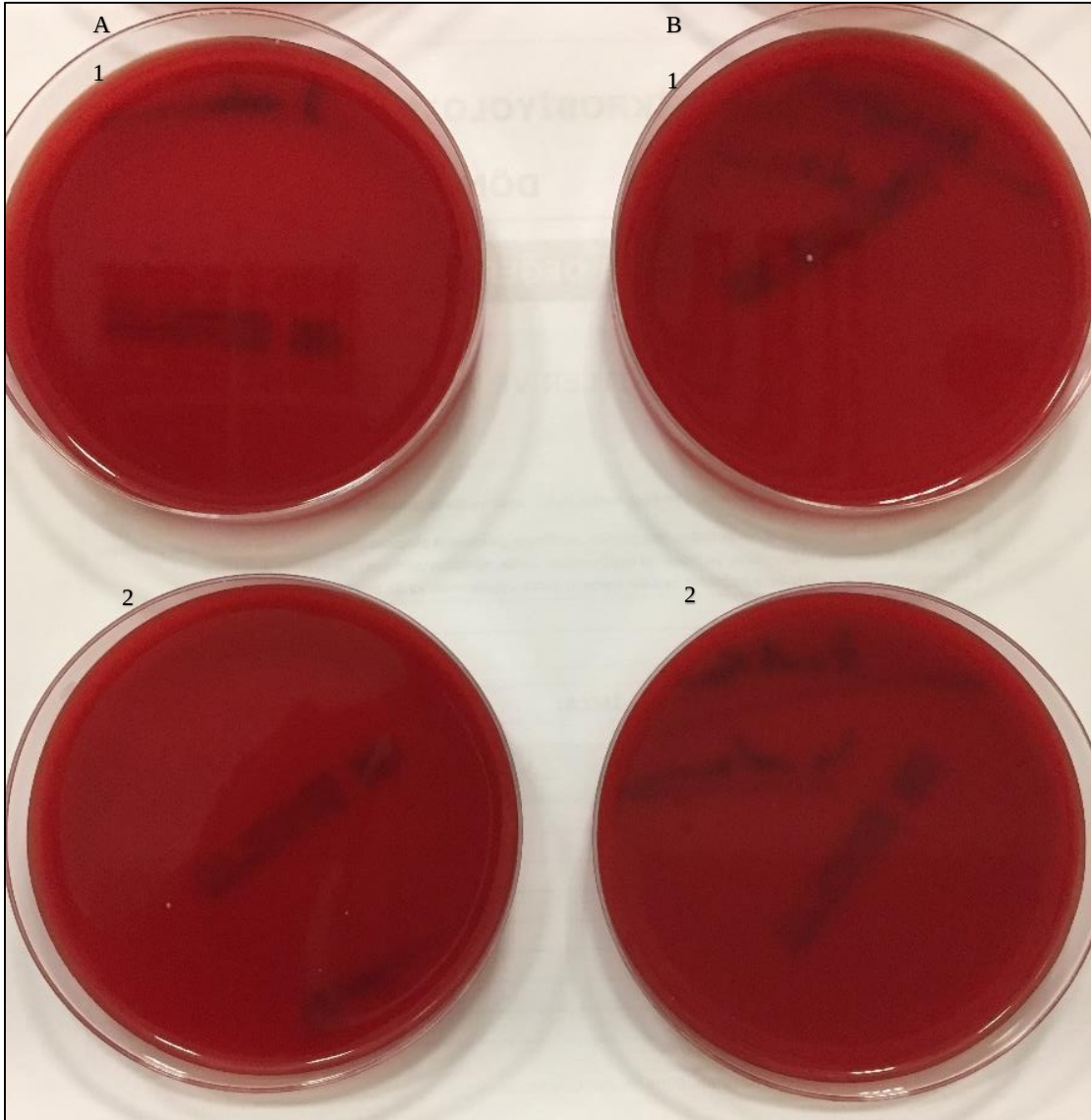
Çizelge 4.5. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı

Denemeler	Püskürtülen bakteri konsantrasyonu	Kaplanan IgY antikor konsantrasyonu	Anti- <i>K.pneumoniae</i> IgY antikor içeren filtredeki koloni sayısı	Antikor içermeyen filtredeki koloni sayısı
1	3×10^7 cfu/ml	200 µg/ml	Üreme yok	Üreme yok
2	6×10^7 cfu/ml	500 µg/ml	Üreme yok	Üreme yok
3	1.5×10^8 cfu/ml	500 µg/ml	Üreme yok	Üreme yok
4	3.0×10^8 cfu/ml	500 µg/ml	Üreme yok	Üreme yok
5	3.0×10^8 cfu/ml	500 µg/ml	Tam üreme	Tam üreme
6	4.5×10^8 cfu/ml	750 µg/ml	400-700 koloni	yoğun üreme
7	6.0×10^8 cfu/ml	750 µg/ml	yoğun üreme	yoğun üreme

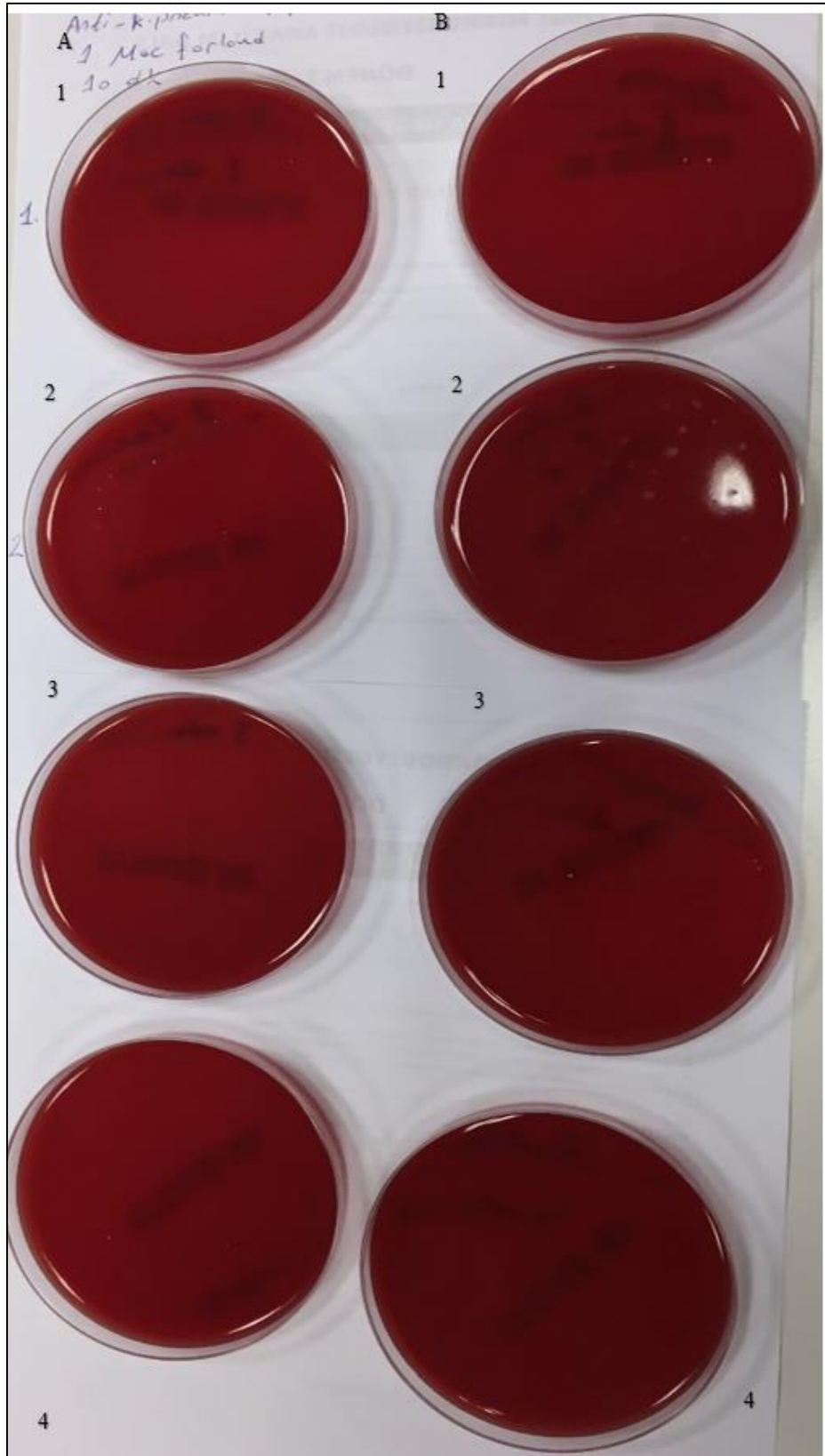
* Tam üreme 100000 koloni olarak değerlendirilmiştir



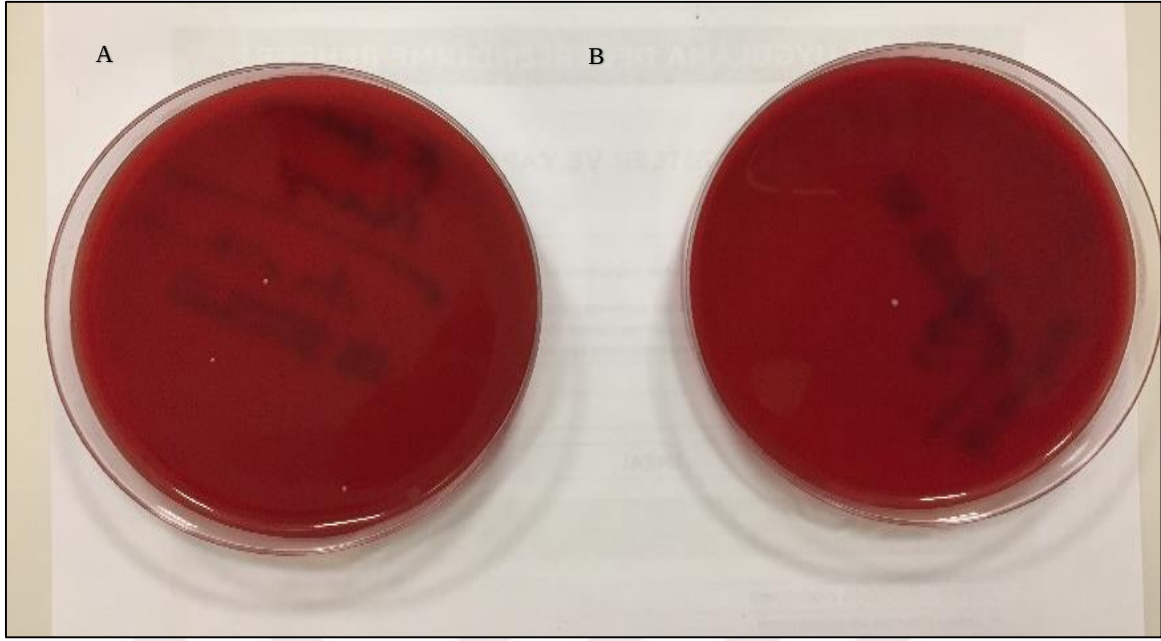
Şekil 4.6. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren ve antikor içermeyen filtrelerde koloni sayısı



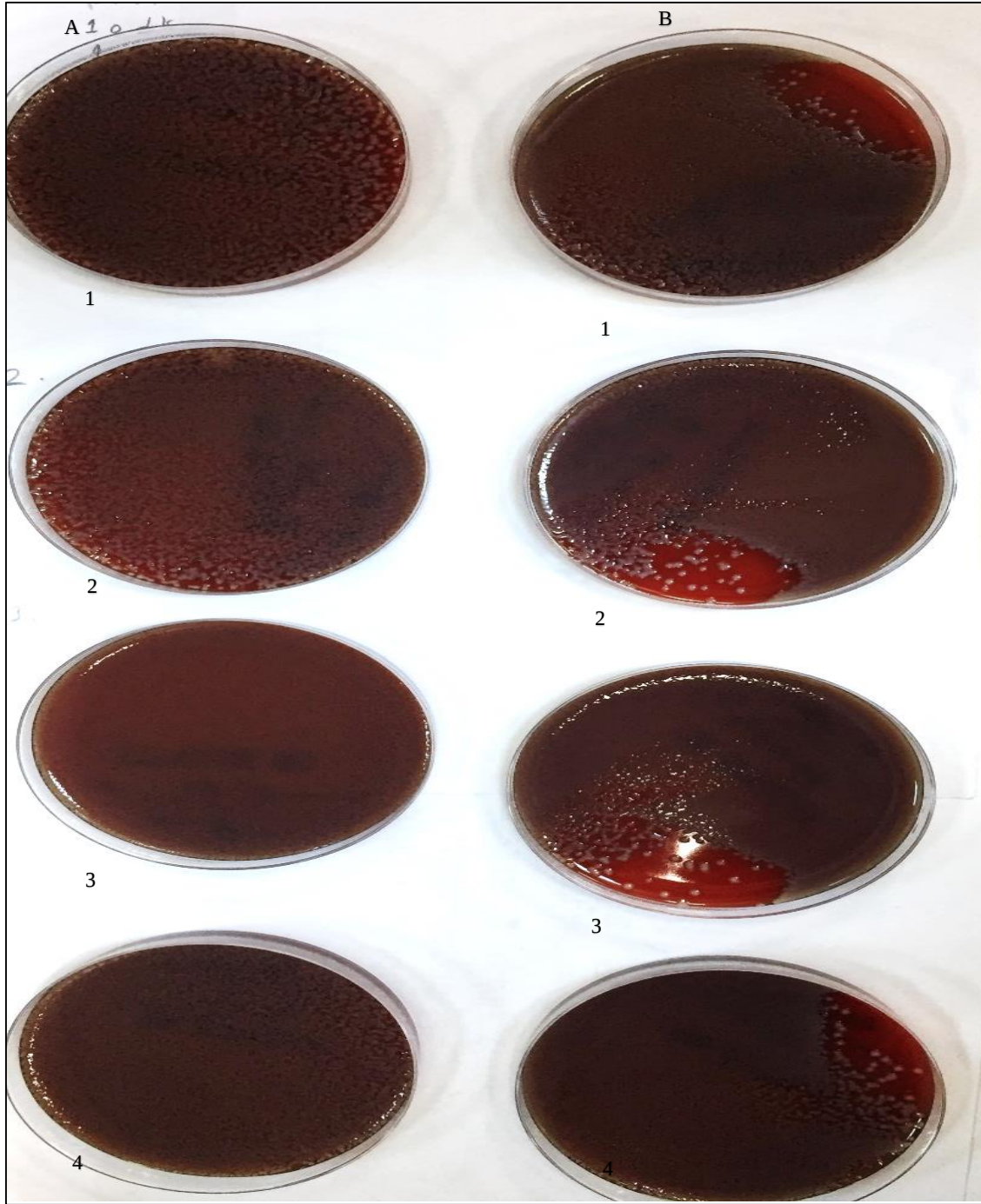
Resim 4.8. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki üreme saptanmamıştır. Kaplanan anti-*K.pneumoniae* IgY antikor konsantrasyonu 500 µg/ml ve *K.pneumoniae* 1.5×10^8 cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür



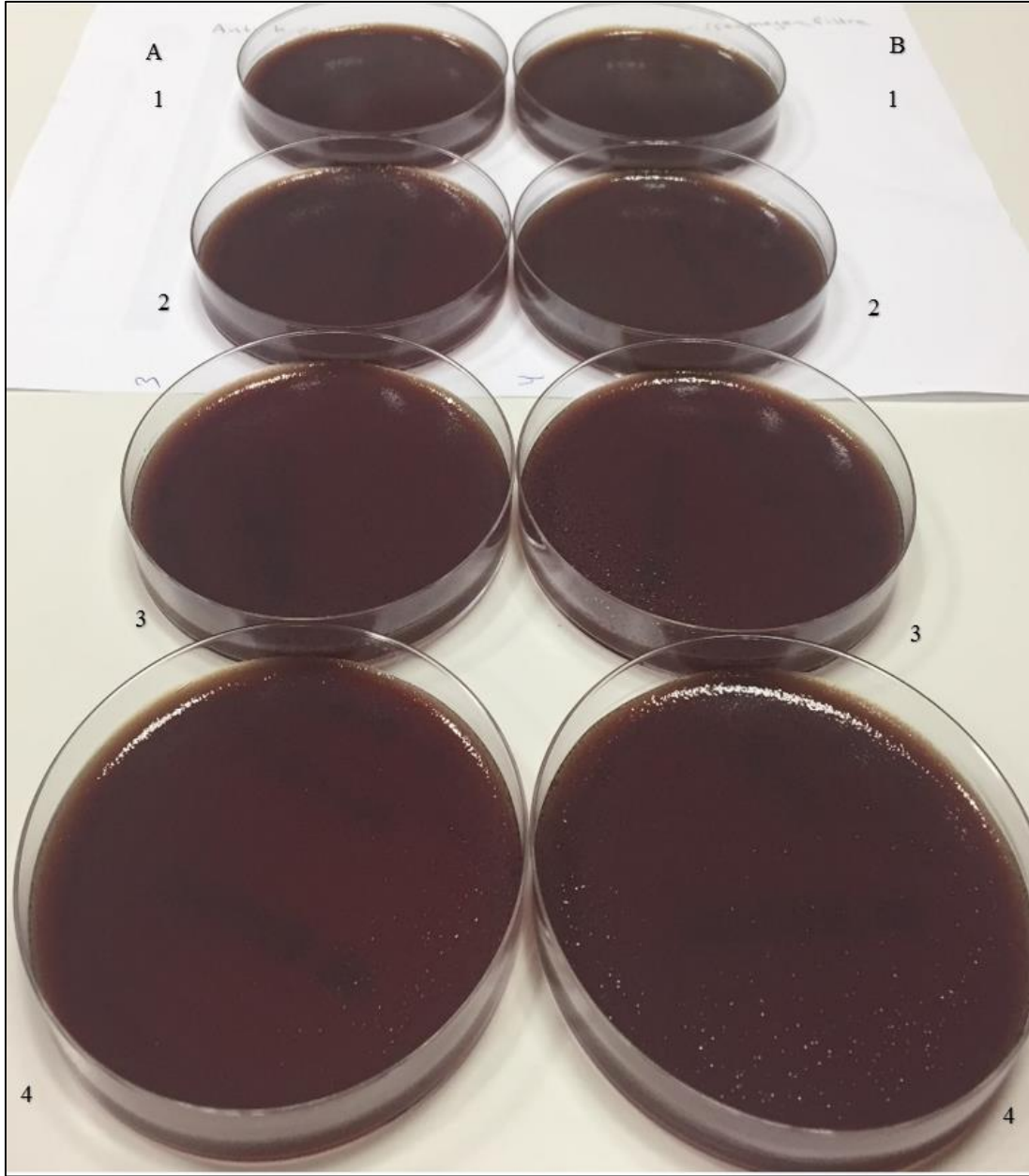
Resim 4.9. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağında üreme saptanmamıştır. Kaplanan anti-*K.pneumoniae* IgY antikor konsantrasyonu 500 µg/ml ve *K.pneumoniae* 3.0×10^8 cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür



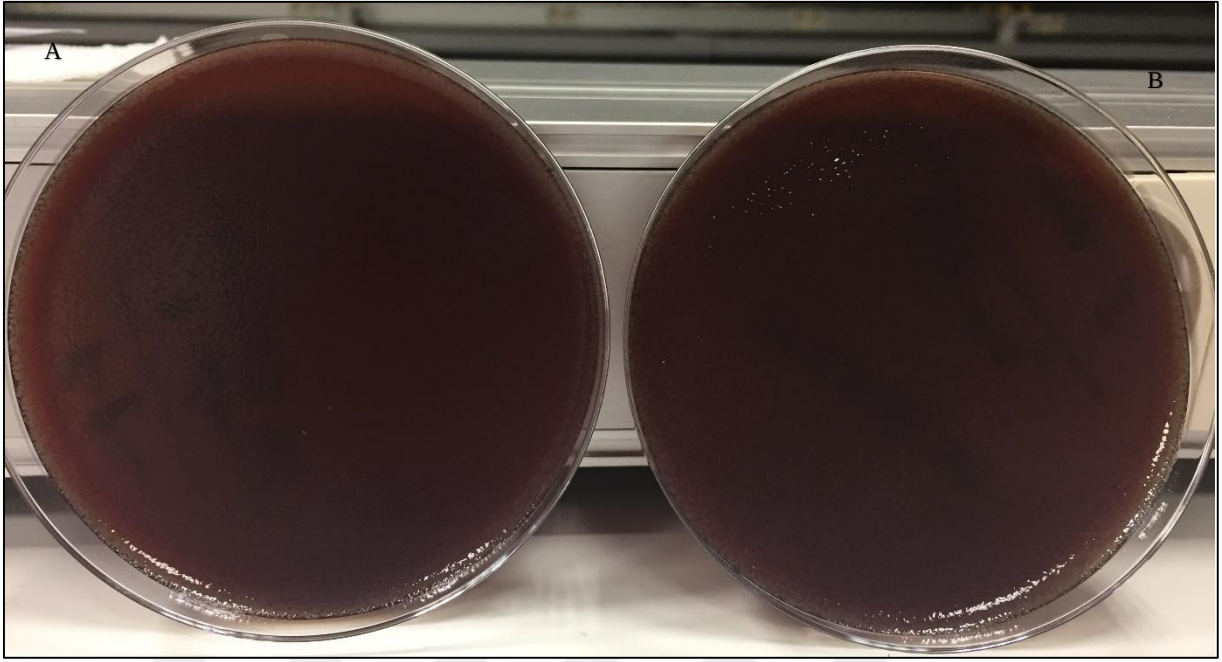
Resim 4.10. *K.pneumoniae* püskürtülürken i  (A) ve d   (B) kabine konulan kanlı agarda koloni üremesi görülmemiştir. Bakteri konsantrasyonu 3.0×10^8 cfu/ml yo unlu unda p sk rt lm  t r



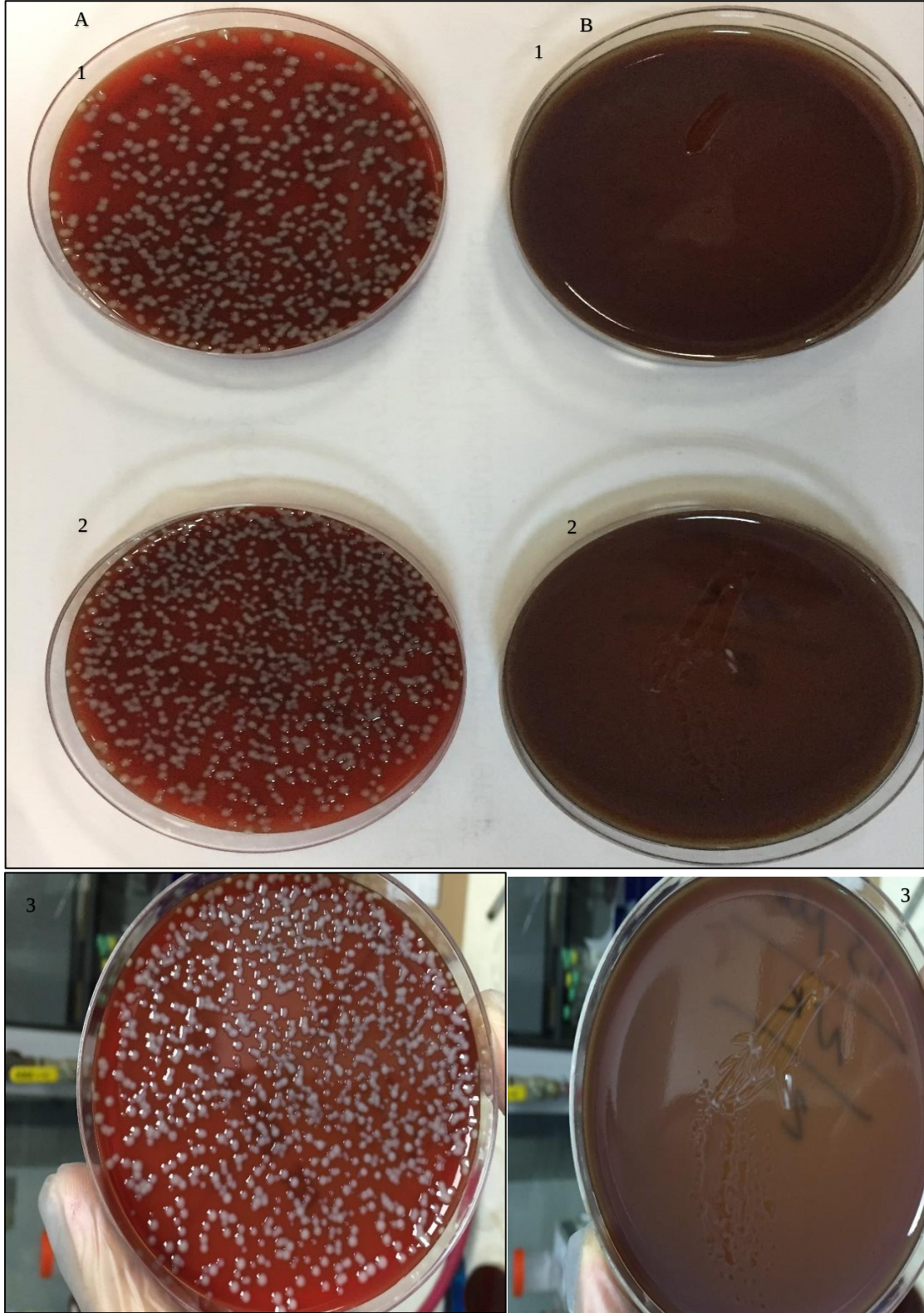
Resim 4.11. Kaplanan anti-*K.pneumoniae* IgY antikor konsantrasyonu 750 µg/ml ve *K.pneumoniae* 3.0×10^8 cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağında tam üreme saptanmıştır



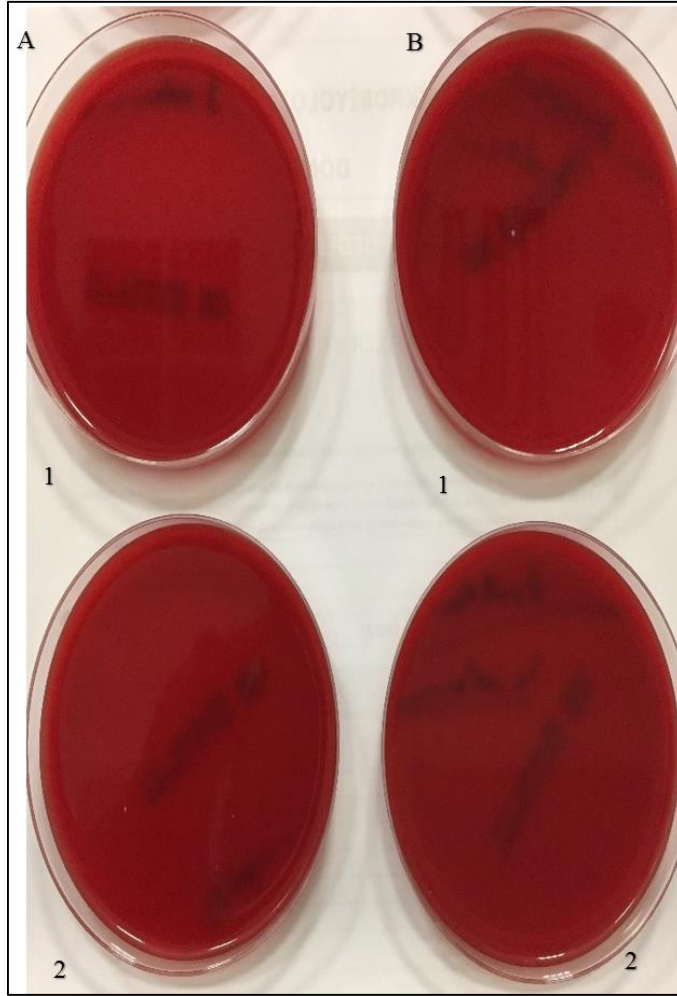
Resim 4.12. Kaplanan anti-*K.pneumoniae* IgY konsantrasyonu 750 $\mu\text{g/ml}$ ve püskürtülen *K.pneumoniae* 4.5×10^8 cfu/ml yoğunluğunda yapılmıştır. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağında tam üreme saptanmıştır



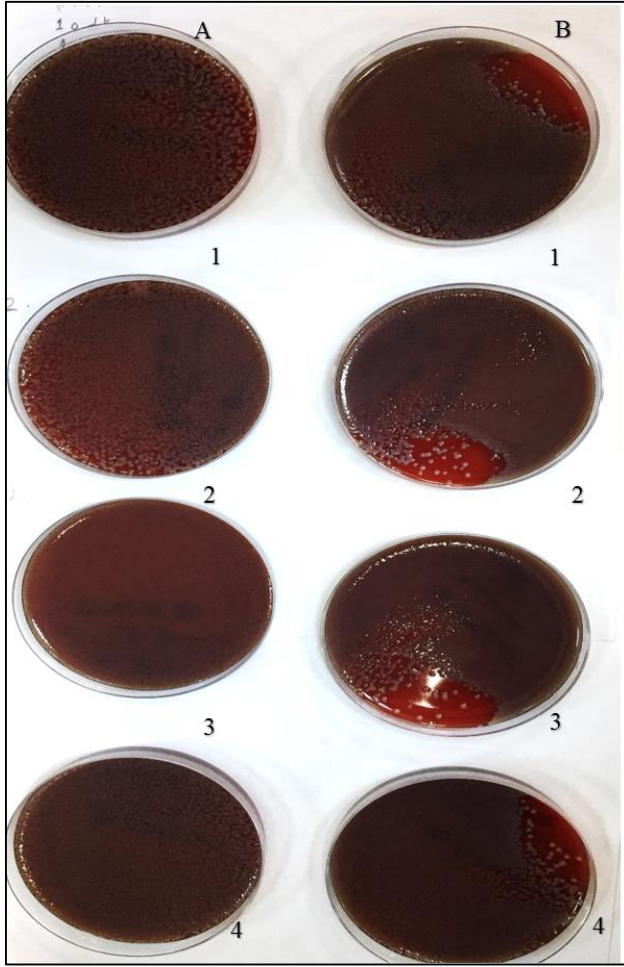
Resim 4.13. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plağındaki tam üreme izlenmiştir. Kaplanan anti-*K.pneumoniae* IgY antikor konsantrasyonu 500 µg/ml ve *K.pneumoniae* 6.0×10^8 cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür



Resim 4.14. Kaplanan anti-*K.pneumoniae* antikor konsantrasyonu 750 µg/ml ve püskürtülen *K.pneumoniae* 4.5x10⁸ cfu/ml yoğunluğunda yapılmıştır. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren filtre arkasına konulan kanlı agarda 400-700 koloni (A) ve antikor içermeyen filtrenin arkasına tam üreme (B) görülmüştür



Resim 4.15. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plaklarında üreme saptanmamıştır. Kaplanan anti-*K.pneumoniae* IgY antikor konsantrasyon 500 µg/ml ve *K.pneumoniae* 3.0×10^8 cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür



Resim 4.16. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren (A) ve antikor içermeyen (B) filtrenin arkasına konulan kanlı agar plaklarında tam üreme görünmüştür. Kaplanan anti-*K.pneumoniae* IgY antikor konsantrasyon 500 µg/ml ve *K.pneumoniae* 3.0×10^8 cfu/ml yoğunluğunda püskürtülmüştür

Sonuç olarak, anti-*S.aureus* IgY içeren filtrelerin denemelerinde en uygun bakteri konsantrasyonu 2×10^5 cfu/ml yoğunluğunda elde edilmiştir, en etkili antikor düzeyi 500 µg/ml antikor içeren filtrelerde görülmüştür ve en uygun püskürtme zamanı ise 10 dakika olarak saptanmıştır. Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtre etkinliğinde ise en etkili antikor konsantrasyonu ise 500 µg/ml antikor içeren filtrelerde elde edilmiştir, en uygun bakteri konsantrasyonu 5×10^4 cfu/ml yoğunluğunda saptanmıştır ve en uygun zaman ise 10 dakika olarak belirlenmiştir. Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren ve içermeyen filtre ile yapılan farklı bakteri konsantrasyonları, farklı anti-*K.pneumoniae* IgY konsantrasyonları ve püskürtme süreleriyle elde edilen sonuçlar arasında tutarsız bulgular elde edilmiştir.



5. TARTIŞMA

Hastalıklardan korunmada aşılama, tedavide ise antibiyotik kullanımı gibi yöntemler bulunmakta ancak tedavinin oldukça zor ve uzun süreli olması hastalarda morbidite ve mortalite riski ile hastane maliyeti artırmaktadır. Özellikle alışveriş merkezleri, okullar gibi hastalık riskinin yüksek olduğu kalabalık bölgelerde hava yolu ile bulaşan patojenlerin vücuda girişlerini engellemeye yardımcı olacak bir biyofiltre tasarımı hava yolu ile bulaşan patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonları kontrol etmede büyük avantaj sağlamaktadır [16, 38, 39]. Hava filtreleri; havada bulunan istenmeyen gaz, buhar ya da tanecikleri ayrıştırmaya yarayan cihaz ya da malzemelere denilmektedir. Klima santrallerinde ve havalandırma sistemlerinde dış havadaki tanecikleri, toz, toprak ve benzeri istenmeyen cisimleri tutmak, havalandırma cihazları girişlerinde gerekli ayrımları yapmak, besleme havalarındaki virüs ve bakterileri azaltmak amacıyla uygun filtreler kullanılmaktadır [6, 16]. Filtrasyon yetersiz olduğu zaman filtre kendisi enfeksiyon kaynağı olabilecektir. Filtrelerin enfeksiyon kaynağı olduğunda en sık *L. pneumophila* izole edilmekte, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* türleri (*Acinetobacter baumannii*), *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia* kompleks (*B.cepacia*), *Aspergillus* türleri, *Pneumocystis carinii* ve diğer fungal etkenlerde izole edilmektedir [6]. Antimikrobiyal filtreler; biyofiltre, inorganik antibakteriyel maddeler, bakır, gümüş ya da çinko kullanarak yapılmaktadır [16].

Bu tez çalışmasında, HGP'lerin önlenmesinde yardımcı olacak IgY teknolojisine dayalı klima filtresi geliştirilmesi için prototip oluşturulması hedeflenmektedir ve bu biyofiltrenin hava yolu ile bulaşan patojenlerin önlenmesinde büyük yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, nozokomiyal pnömoni etkeni olarak sık tanımlanan *S.aureus*, *K.pneumoniae* ve *P.aeruginosa* bakterilerine karşı IgY geliştirmek için Lohmann Brown cinsi tavukların göğüs kası içine bu bakterilerden elde edilen antijenler verilerek tavuklar immunize edilmiştir. Bütün tavuk grupları, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*'den hazırlanan 0,5 mg/ml antijenle immunize edilmiştir. Elde edilen IgY antikorlarının etkinliğinin ELISA yöntemiyle tanımlandıktan sonra spesifik IgY antikorları cam elyaf yapısına sahip olan filtreye capture ELISA yöntemi kullanılarak sabitlenmiştir. Hazırlanan biyofiltreler elde edilen IgY antikorlarıyla kaplanmıştır. Her bakteri için geliştirilen IgY bazlı filtrelerin bakteri yakalama kapasitesini test etmek için anti-bakteri IgY içeren ve antikor içermeyen filtreler üzerine dört defa 1-20 dakika aralıkla bakteriler püskürtülmüştür. Filtre etkinliğini

belirlemek için filtrelerin arkasına konulan besiyerlerinde (kanlı agar/ EMB) üreyen koloniler sayılarak sonuçlar değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda, IgY antikorları ELISA yöntemi ile değerlendirilmeden önce antikor konsantrasyonları, nanodrop spektrofotometre ile 280 nm’de ölçülmüştür. *S.aureus* ile immunize edilen tavuklardan elde edilen protein konsantrasyonu 14.63 mg/ml iken *P.aeruginosa* ile immunize edilen tavuklarda 3.70 mg/ml ve *K. pneumoniae* ile immunize edilen tavuklarda 1.33 mg/ml olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre en yoğun antikor yanıtı *S.aureus* ile immunize edilen tavuklardan izole edilmiştir, *P.aeruginosa* ile immunize edilen tavuklardan elde edilen antikor seviyesinin *S.aureus* ile immunize edilen tavuklara göre dört kat daha düşük olduğu saptanmıştır ve en düşük antikor konsantrasyonu *K.pneumoniae* ile immunize edilen tavuklardan elde edildiği tespit edilmiştir.

İmmunize edilen tavuklardan izole edilen IgY antikorlarının hem 1/100 dilüsyonda hem de 1/1000 dilüsyondaki OD değerlerinin, immunize edilmeyen tavuk yumurtalarından izole edilen OD ’ler ile karşılaştırılması sonucunda her iki dilüsyonda da OD değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p>0.05$). Bu bulgu yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir. Tobias ve arkadaşları [36] yaptıkları çalışmada, *S.aureus* ile immunize edilen ve edilmeyen deve kuşlarının yumurtalarından izole ettikleri spesifik anti-*S.aureus* IgY ve non spesifik IgY antikorlarını beyin kalp infizyon buyyonda *S.aureus* ile 37°C ’de dört saat inkübasyon sonrası katı besiyerine ekim yapmışlardır. Sonuç olarak immunize edilmiş deve kuşlarından izole edilen antikorların bakteri üremesini inhibe ettiği saptanmıştır ve yumurtadan izole edilen antikorların tedavi için kullanımının ümit verici olduğu belirtilmiştir. Thomsen ve arkadaşları [50] yaptıkları çalışmada, kistik fibrozis hastalarında anti-*P. aeruginosa* IgY içeren ağız çalkantı suyu ile ağız çalkalamasının kistik fibrozis hastalarında kronik *P. aeruginosa* enfeksiyonlarının önlenmesinde etkili olduğu tespit edilmiş ve antibiyotik kullanımının sınırlandırılmasında yararlı olacağı belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise IgY antikorlarının *Salmonella* türlerinin üremesi üzerine etkisi araştırılmıştır. *Salmonella* spp ile immunize edilen ve edilmeyen tavukların yumurtasından saflaştırılmış spesifik anti-*Salmonella* spp IgY ve non spesifik IgY antikorları *S.enteritidis* ve *S.typhimurium* ile triptik soya buyyon 37°C’de 4-6 saat inkübasyon sonrası katı besiyerine ekilmiştir. Sonuç olarak immunize edilmiş tavuklardan izole edilen antikorların bakteri üremesini anlamlı düzeyde inhibe ettiği saptanmıştır [71]. Uma ve arkadaşları [72] çalışmalarında mastitli sığırlardan

izole edilen *K.pneumoniae* ile hazırladıkları antijen süspansiyonuyla immunize ettikleri tavuklardan anti-IgY *K.pneumoniae* antikorlarını izole etmişlerdir. Tavukların düzenli aralıklarla immunize edilmesinin spesifik IgY antikor oluşumunu 1/10000 dilüsyona kadar artırdığı indirek ELISA yöntemi ile gözlemişlerdir. Elde edilen antikorların *K.pneumoniae* üzerindeki üreme inhibisyon etkisi araştırılmıştır. Todd Hewitt buyyonunda spesifik anti-*K.pneumoniae* IgY antikorlarının farklı konsantrasyonlarında (1-5 µg/ml), *K.pneumoniae* ile birlikte 37°C’de bir gece inkübasyonu sonrası nutrient agara ekim yapılmış ve tekrar 37°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. Kullanılan anti-*K.pneumoniae* IgY konsantrasyonlarından 3 µg/ml düzeyi bakteri üreme inhibisyonunun tamamen gerçekleştiği en etkili düzey olarak saptanmıştır. Araştırmacılar IgY antikorlarının sığır mastitlerinin tedavisinde kullanılabileceği sonucuna varmışlardır.

Araştırmamızda, üç bakteriyel etkenle (*S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae*) immunize edilen tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının, immunize edilmeyen tavuklardan izole edilen antikorlara göre ELISA yönteminde saptanan OD değerlerinin daha yüksek olduğu istatistiksel olarak belirlenmiştir.

S.aureus, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae*’a karşı geliştirilen spesifik IgY antikorlarının bakteri yakalama kapasitesini test etmek için IgY antikorlarının farklı konsantrasyonlarıyla (100, 200, 300, 400, 500 ve 750 µg/ml) filtreler kaplanmıştır. Antikor konsantrasyonları nanodrop spektrofotometre ile 280 nm’de ölçülmüştür. Bakteri konsantrasyonları 5×10^4 , 3×10^7 , 6×10^7 , 7.5×10^7 , 1.5×10^8 , 3.0×10^8 , 4.5×10^8 ve 6.0×10^8 cfu/ml olarak hazırlanmıştır. Püskürtme işlemi 1, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 ve 20 dakika aralıklarla test edilmiştir.

Anti-*S.aureus* IgY içeren filtrelerin optimizasyonun sonucunda antikor içeren ve antikor içermeyen filtre arkasına konulan besiyerlerinde, antikor içeren filtrelerde üreyen ortalama koloni sayısı 10 iken antikor içermeyen filtre arkasında 540 koloni sayılmıştır. Püskürtülen en uygun bakteri konsantrasyonu 2×10^5 cfu/ml yoğunluğunda, filtreye kaplanan en uygun IgY antikor düzeyi 500 µg/ml ve en uygun püskürtme zamanı ise 10 dakika olduğu saptanmıştır. Antikor içeren filtrelerin antikor içermeyen filtrelerle karşılaştırılığında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtre etkinliğinde ise antikor içeren filtre arkasındaki besiyerlerinde 5-10 koloni saptanırken antikor içermeyen filtrede üreyen koloni sayısı 837

olarak sayılmıştır ve istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p<0.05$). En etkili antikor konsantrasyonu 500 µg/ml antikor içeren filtrelerde elde edilmiştir, en uygun bakteri konsantrasyonu 5×10^4 cfu/ml yoğunluğunda saptanmıştır ve en uygun zamanın ise 10 dakika olduğu belirlenmiştir.

Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren ve içermeyen filtre ile yapılan farklı optimizasyon deneyleri sonucunda uygun bir veri edilememiştir. Anti-*K.pneumoniae* IgY konsantrasyonları ve püskürtme süreleriyle elde edilen sonuçlar arasında tutarsız bulgular saptanmıştır. En düşük IgY antikor konsantrasyonu *K.pneumoniae* ile immunize edilen tavuklardan elde edilmiştir. Bu nedenle anti-*K.pneumoniae* IgY ile hazırlanan filtreler ile sonuç alınmamasının; I: immunizasyon sonrası etkili IgY oluşumunun olmamasına, II: antijen hazırlanmasından kaynaklanan nedenlere, III: antijen eldesi için kullanılan suşa bağlı olabileceğini düşünülmektedir. En yoğun antikor yanıtı *S.aureus* ile immunize edilen tavuklardan izole edilmiştir. *P.aeruginosa* ile immunize edilen tavuklardan elde edilen antikor seviyesinin *S.aureus* ile immunize edilen tavuklara göre dört kat daha düşük olduğu saptanmıştır ve en düşük antikor konsantrasyonunun *K. pneumoniae* ile immunize edilen tavuklardan elde edilmiştir. Ancak ELISA yöntemi ile immunize edilen ve edilmeyen tavukların yumurtalarından izole edilen IgY antikorlarının OD değeri her iki dilüsyonda (1/100 ve 1/1000) karşılaştırıldığında: immunize edilen tavukların yumurtalarındaki IgY OD değerinin hesaplanan cutoff değerinin (ODC) üstünde olduğu görülmüştür ($p<0.05$). *S. aureus* ve *P.aeruginosa* ile immunize edilen tavuklardan elde edilen IgY arasında aynı dilüsyonda benzer sonuçlar verir iken *K. pneumoniae* ile immunize edilenlerdeki OD değerinin düşük olduğu saptanmıştır.

Bu bulgular yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Kosugi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada devekuşlarını influenza antijenleri ile immunize edip izole edilen anti-influenza IgY antikorlarını ELISA yöntemiyle tanımladıktan sonra nötralizasyon etkisini denemek için anti-influenza IgY ve virüs karışımının hücre kültürüne (MDCK) aktararak. nötralizasyon etkisini değerlendirmişler ve virüsün %50 oranında nötralize edildiğini tespit etmişlerdir. Ayrıca anti-influenza IgY antikorları kullanılarak geliştirdikleri biyofiltre üzerine influenza virüsü püskürtülmüş ve virüslerin % 99.99'nun 10 dakika içinde filtrede tutulduğu saptanmıştır [16]. Adachi ve arkadaşları yaptıkları araştırmada, H5N1 virüsüne karşı IgY geliştirmek amacıyla devekuşlarını H5 protein ile immunize etmişlerdir. Kuşların yumurtalarından izole edilen antikorların aktivitelerini

serolojik yöntemler ile tanımladıktan sonra nötralizasyon etkisini değerlendirmek amacıyla anti-H5N1 IgY ve H5N1 virüsü 37 °C’de 1 saat inkübasyon işleminden sonra virüs ve antikor karışımı hücre kültürüne (MDCK) aktarılmıştır. Ayrıca pozitif kontrol olarak IgY antikor olmadan H5N1 virüsü ve hücre kültürü kullanılmış, 35 °C’de 2-3 gün inkübasyon sonrası nötralizasyon etkisi değerlendirilmiş ve sonuç olarak virüs nötralizasyon etkisi tespit edilmiştir. Bu bulgularla IgY antikorun endüstriyel kullanımda özellikle anti-influenza maske ve biyofiltre geliştirmesinde yarar sağlayacağı öne sürülmüştür [73].

Bachtıar ve arkadaşları araştırmalarında *Streptococcus mutans* karşı IgY antikorunu elde etmek tavukları *S.mutans* ile immunize etmişler ve yumurtadan izole edilen anti-*S.mutans* IgY’ler ELISA ile tanımlamışlardır. Anti-*S.mutans* IgY etkisini değerlendirmek için IgY antikor içeren jel geliştirilmiştir. Çalışmada Sprague Dawley ratlar kullanılmış ve hayvanlar *S.mutans*’a bırakılmakla beraber diş çürüğünü hızlandıracak diyet uygulanmıştır. Ratlar (n=24) dört gruba ayrılmıştır; A grubundaki ratların dişleri IgY içeren jeli ile kaplandı, B grubundaki ratların dişleri kontrol grubu olarak jel ile kaplanmamış, C grubundaki ratların 29 gün sonra dişleri IgY içeren jeli ile kaplanmış ve D grubundaki ratların dişleri ise IgY içermeyen bir jel ile kaplanmıştır. Bakteri miktarını belirlenmek için ön dişlerden eküvyon ile örnekler toplanmasının yanı sıra tükürükten de örnekler alınmış ve ELISA yöntemiyle değerlendirilmiştir. Sonuç olarak IgY içeren jel ile dişleri kaplanan grupta diğer gruplara göre bakteri miktarında anlamlı bir şekilde azalma olduğu saptanmıştır ve bu sonuçlar doğrultusunda topikal uygulamada *S.mutans* miktarının anlamlı şekilde azaldığı görülmüştür [74].

Shi ve arkadaşları yaptıkları çalışmada çoklu antibiyotik direnci bulunan (MDR) (karbapenemler, ikinci, üçüncü kuşak sefalosporinler, antipseudomonas penicilinler, florokinolonlar ve aminoglikozidler) *Acinetobacter baumannii* (ÇAD-*A.baumannii*) karşı IgY antikor sentezlemek amacıyla tavuklar iki ÇAD- *A.baumannii* suşuyla immunize edilmiş ve elde edilen IgY’lerin antibakteriyel etkisi in vitro ve in vivo olarak araştırılmıştır. ELISA yöntemiyle IgY etkinliği gösterilmiş ve sıvı besiyerinde *A.baumannii*’nin üremesini inhibe ettiği belirlenmiştir. Elektron mikroskopik incelemede, bakterilerde yapısal modifikasyon ve agregasyon saptanmıştır. MDR *Acinetobacter baumannii* bakterileri BALB/c farelerinde akut pnömoni oluşturmak için nazal olarak uygulanmıştır. Birinci gruba spesifik IgY, diğer gruba sefoperazon/sulbaktam ve üçüncü gruba ise deksametazon periton içi enjekte edilmiştir. Anti-MDR- IgY’lerle enjekte edilen grupta farelerin % 8.3, antibiyotik

enjekte edilenlerin grubun % 33.3 ve dexametazon enjekte edilen grup ile her hangi bir tedavi uygulanmayan grubun % 91.7' sinde ölüm gerçekleştiği bildirilmiştir. Aynı zamanda spesifik IgY enjekte edilen enfekte farelerin serumlarındaki proinflatuar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β seviyesinin azaldığı saptanmıştır. Sonuç olarak spesifik IgY'nin *A.baumannii* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde yeni seçenek olacağı ileri sürülmüştür [75].

Barati ve arkadaşları çalışmalarında 20 haftalık tavukları 200 μ g kolera toksininin (CTB) B alt birimi (toksinin hücre bağlanmasını sağlayan kısım) ile immunize etmişler ve anti-CTB IgY antikorunun aktivitesi ve spesifikliğı ELISA ile değerlendirilmiştir. IgY antikorunun koruyucu etkisini belirlemek için yeni doğan fareler öldürücü dozda *Vibrio cholerae* ile aşılanmış ve anti CTB-IgY oral olarak uygulanan farelerde ölüm oranının azaldığı saptanmıştır. Antibiyotiğe dirençli bakteri sayısındaki artış nedeniyle alternatif bir yöntem olarak IgY bazlı ürünlerin (anti CTB-IgY) hem kontrol hem de insanlarda kolera enfeksiyonlarının önlenmesinde yararlı olacağı belirtilmiştir [64].

Grzywa ve arkadaşları çalışmalarında meme kanser tanısında kansere özgü proteinlerden biri olan CA 15-3 proteinini kullanmışlar ve bu antijen ile tavuklar immunize etmişlerdir. Hatırlatma immünizasyonları iki gruba ayrılmış, I ve II hatırlatma immunizasyonları 4. ve 12. haftalarda başta immunize edilen antijen miktarının yarısı ile yapılmıştır. III. ve IV. hatırlatma immünizasyonları ise 2. ve 6. haftalarda yapılmıştır. Toplanan yumurtalardan IgY antikorunu PEG 6000 çöktürme yöntemiyle izole edildikten sonra ELISA ile tanımlanmıştır. Spesifik IgY antikorlarının etkinliğı indirekt ELISA yöntemiyle değerlendirilmiş ve antijen tanımlama sınırı 2.5 ng/ml olarak tespit edilmiştir ve bu sonuçların farelerden elde edilen monoklonal IgG ile benzer olduğu saptanmıştır. Araştırmacılar spesifik poliklonal IgY üretiminin maliyetini 1USD/mg olarak saptamışlardır. Sonuç olarak IgY üretiminin ucuz ve immünolojik tanı yöntemleri için uygun olduğunu tespit etmişlerdir [76].

Sifi ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada akrep sokmalarına karşı anti venom tedavisi için IgY antikorunu alternatif bir tedavi yöntemi olabileceğini düşünerek *Aah* (*Androctonus australis hector*) antijenleri ile tavuklar immunize etmişlerdir. Tavuklardan toplanan yumurtalardan IgY antikorları izole edildikten sonra antikorlar indirekt ELISA yöntemiyle tanımlanmıştır. IgY antikorlarının etkinliğini in vivo olarak 25 tane fare ile denenmiştir. Farelere subkutanöz olarak venom (0.5 mg/kg) uygulandıktan 30 dakika sonra

intraperitoneal olarak anti venom IgY farklı konsantrasyonlarda uygulanmıştır. Fareler beş gruba ayrılmış ve her grupta beş adet fare kullanılmıştır. Antikorlar birinci grupta 150 µl, ikinci grupta 200 µl, üçüncü grupta 250 µl, dördüncü grupta 300 µl ve beşinci grupta 500 µl düzeylerinde verilmiştir. Sonuç olarak fare gruplarında hayatta kalma oranı birinci grupta 2 fare (40%), ikinci grupta 3 fare (60%), üçüncü grupta 4 fare (80%) ve son iki grupta 100% olarak görülmüştür. IgY antikorlarının, akrep zehirinin öldürücü etkisini nötralize edebilmesi zehirin neden olduğu ciddi patolojik etkileri önleyebilir olması ve anti-venom IgG antikorlarla yapılan çalışmalarla uyumlu sonuçlar göstermesi nedeniyle IgY antikorlarının bu tip durumlar için alternatif bir tedavi olacağı ileri sürülmüştür [77].

Fink ve arkadaşları Dengue virüsüne karşı IgY antikorunun nötralizan etkinliğini belirlemek için virüsün DENV2 antijenini (120 µg) kazlara enjekte etmişlerdir. İmmunize edilen hayvanlardan toplanan yumurtalardan antikorlar amonyum sülfat kullanılarak izole edilmiş ve anti-DENV2 IgY'nin antikor aktivitesi, ELISA ile değerlendirilmiştir. IgY antikorunun in vitro olarak nötralizan etkisini belirlemek için anti-DENV2 IgY ve virüs karışımı 45 dakika bekletildikten sonra hücre kültürüne aktarılmış, ayrıca in vivo olarak 6-8 haftalık farelere damar yoluyla 1×10^7 pfu/ml dengue virüsü enjekte edilmiş ve 24 saat sonra farelere periton yoluyla farklı dozlarda anti-DENV2 IgY verilmiştir. IgY antikorunun 50% oranında nötralizan etkisine sahip olduğu saptanmıştır. İn vitro olarak çalışmada IgY antikorun (1-2 mg) enjekte edilen farelerde enfeksiyona tam koruma sağladığı gözlenmiştir ve dengue virüs tedavisi için alternatif bir yöntem olacağı düşüncesine varılmıştır [78].

Teimoor ve arkadaşları çalışmalarında tavuklar 0.5 mg *Opisthorchis viverrini* helmintinin rekombinant O ve F (rOv-CF) antijenleri ile immunize edilerek IgY antikorları PEG 6000 yöntemiyle elde edilmiştir. Tavuklardan izole edilen IgY ve tavşanlardan elde edilen IgG antikorları kullanılarak sandviç ELISA geliştirilmiştir. *Opisthorchis* enfeksiyonun endemik olduğu bölgelerden 90 insan dışkısı toplanmış ve 30 pozitif olgu (dışkıda yumurta +), 30 negatif olgu (dışkıda yumurta -) ve 30 olgu dışkıda yumurta (-), ancak diğer helmint yumurtaları + olacak şekilde gruplandırılmıştır. Çalışmada 30 pozitif tanımlanmış hastadan 28'inde pozitif saptanmıştır (duyarlılık 93.33%) negatif olarak tanımlanan 60 örnekten 14'ünde ise pozitiflik saptanmıştır (spesifiklikte 76.66%). Sonuç olarak IgY bazlı ELISA yönteminin insanlarda gelişen opisthorchiasis enfeksiyonunun tanısında umut vaat ettiği ortaya konulmuştur [79].

Antibakteriyel filtre üretiminde çeşitli organik materyallerin yanı sıra antikora dayalı sistemlerin çeşitli avantajlara sahip olduğu ortaya konulmuştur [16, 38, 39]. Antikor içeren filtreler ile patojenlere karşı yüksek afiniteli biyomolekülün, hem düşük maliyetli olarak toplum kullanımına uygun enfeksiyonlardan korunma sağlaması hem de hava yolu ile bulaşan patojenlerin kontrol altına alınmasına yardımcı olabileceği düşünülmektedir.

IgY antikorunun üretiminin kolay, maliyetinin düşük olması ve patojenlere karşı yüksek afiniteli olması, diğer kimyasal yöntemlere göre daha güvenli olması, fiziksel yöntemlere göre daha spesifik olması ve diğer yöntemlere göre daha hızlı reaksiyon göstermesi avantajları olarak sıralanmaktadır [16, 38, 39]. Bu nedenle bu tez çalışması ile geliştirilmesi planlanan biyofiltrelerin HGP'nin kontrol altına alınmasında büyük yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hastalıklara karşı korunmada aşılama veya tedavide ilaç kullanımı gibi yöntemler bulunmakla birlikte bazı enfeksiyonların tedavisinin oldukça zor olması ve hastalık halinin uzun süre devam etmesi söz konusudur. Bu problemlere karşı özellikle hastalık riskinin yüksek olduğu hastane, alışveriş merkezleri, okullar gibi kalabalık bölgelerde hava yolu ile bulaşan patojenlerin vücuda girişlerini engellemeye yardımcı olacak bir biyofiltre tasarımının hava yolu ile bulaşan patojenlerin neden olduğu salgınları kontrol etmede büyük yarar sağlayacağı düşünülmektedir.

Çalışmamızda, nozokomiyal pnömoni etkeni olarak sık tanımlanan, *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K. pneumoniae* bakterileri kullanılarak hazırlanan antijenlerin tavukların kas içine enjekte edilerek immünizasyonları gerçekleştirilmiştir. İmmünizasyon sonrası bakterilere karşı oluşan IgY antikorlarının saflaştırılması ve elde edilmesi için PEG 6000 kullanılmıştır. Antikorların etkinliği ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir.

İmmunize edilen tavuklardan izole edilen IgY antikorlarının hem 1/100 dilüsyonda hem de 1/1000 dilüsyondaki OD değerlerinin, immunize edilmeyen tavuk yumurtalarından izole edilen OD 'ler ile karşılaştırılması sonucunda her iki dilüsyonda da OD değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği saptanmıştır ($p>0.05$).

Elde edilen IgY antikorlarının etkinliği ELISA yöntemiyle tanımlandıktan sonra *S.aureus*, *P.aeruginosa* ve *K.pneumoniae*'a karşı geliştirilen spesifik IgY antikorlarının bakteri yakalama kapasitesini test etmek için spesifik IgY antikorlar farklı konsantrasyonlarda hazırlanark (100, 200, 300, 400, 500 ve 750 µg/ml) cam elyaf yapısına sahip olan filtreye capture ELISA yöntemi kullanılarak sabitlenmiştir.

Filtrelerin etkinliğini gösterebilmek amacıyla özel bir kabin tasarımı yapılmış ve bu kabin içine yerleştirilen filtrelerin arkasına besiyerleri konularak bakteriler püskürtülmüştür. Püskürtme işlemi için bakteri konsantrasyonları 5×10^4 , 3×10^7 , 6×10^7 , 7.5×10^7 , 1.5×10^8 , 3.0×10^8 , 4.5×10^8 ve 6.0×10^8 cfu/ml olarak hazırlanmıştır. Püskürtme işlemi 1, 2, 2.5, 5, 7.5, 10, 15 ve 20 dakika aralıklarla test edilmiştir.

Anti-*S.aureus* IgY içeren filtre arkasındaki besiyerinde üreyen ortalama koloni sayısı 10 iken antikor içermeyen filtre arkasında 540 koloni sayılmıştır. Anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtre etkinliğinde ise antikor içeren filtre arkasındaki besiyerlerinde 5-10 koloni saptanırken antikor içermeyen filtrede üreyen koloni sayısı 837 olarak sayılmıştır. Anti-*S.aureus* IgY içeren filtreye püskürtülen bakteri konsantrasyonu 2×10^5 cfu/ml yoğunluğunda bulunmuştur ve anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtrede ise en uygun bakteri konsantrasyonu 5×10^4 cfu/ml yoğunluğunda saptanmıştır.

Anti-*S.aureus* IgY ve anti-*P.aeruginosa* IgY içeren filtrelerde en etkili antikor düzeyi 500 µg/ml antikor içeren filtrelerde görülmüştür ve en uygun püskürtme zamanı ise 10 dakika olarak saptanmıştır. Bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösterdiği tespit edilmiştir ($p < 0.05$).

Anti-*K.pneumoniae* IgY içeren ve içermeyen filtre ile yapılan farklı optimizasyon deneyleri sonucunda uygun bir veri elde edilememiştir. Anti-*K.pneumoniae* IgY konsantrasyonları ve püskürtme süreleriyle elde edilen sonuçlar arasında tutarsız bulgular saptanmıştır. En düşük IgY antikor konsantrasyonu *K.pneumoniae* ile immunize edilen tavuklardan elde edilmiştir. Bu sonuçların istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermediği tespit edilmiştir ($p > 0.05$). Bu nedenle anti-*K.pneumoniae* IgY ile hazırlanan filtreler ile sonuç alınmamasının;

I: immunizasyon sonrası etkili IgY oluşumunun olmaması

II: antijen hazırlanmasından kaynaklanan nedenlere bağlı olabileceği

III: antijen eldesi için kullanılan suşa bağlı olabileceği düşünülmektedir

Öneriler

Antibakteriyel filtre üretiminde çeşitli organik materyallerin yanı sıra antikorlara dayalı filtre çalışmalarının çeşitli avantajlara sahip olduğu ortaya konulmuştur:

- 1- Kimyasal yöntemlere göre daha güvenli olmaları
- 2- Fiziksel yöntemlere göre daha spesifik olmaları
- 3- Düşük maliyetle üretilmeleri
- 4- Daha hızlı reaksiyon göstermeleri avantajları arasında yer almaktadır.

IgY teknolojisi ile ortaya çıkan ürünlerin

1. Enfeksiyonların (bakteri, virüs, mantar ve parazit) tedavisinde yeni bir seçenek olabileceği,
2. Enfeksiyonların tanısında ticari kit üretiminde kullanılabileceği,
3. IgY antikorunun endüstriyel kullanımda özellikle anti-mikroorganizma maske ve biyofiltre üretimi için geliştirilebileceği konusunda ümit vaat eden çalışmalar bulunmakta ve yeni projeler için kaynak oluşturmaktadır.





KAYNAKLAR

1. Ağırbaş, İ. (2013). *Hastane Enfeksiyonları Maliyet Analizi*. Bilimsel Araştırma Projesi Sonuç Raporu, A Ü BAP, Ankara, 13-49.
2. Ai, Z. T. and Melikov, A.K. (2018). Airborne spread of expiratory droplet nuclei between the occupants of indoor environments: a review. *Indoor Air*, 28(4),500-524.
3. Zhai, Y. (2018). A review on airborne microorganisms in particulate matters: Composition, characteristics and influence factors, *Environment International*, 113, 74-90.
4. Hacımustafaoğlu, E. (2009). Çocuklarda Hastanede Gelişen Pnömoni Tanı ve Tedavi Uzlaş Raporu, *Türk Toraks Derneği*, Ankara.3-6.
5. Soperario, D. J. (2005). America, Guidelines for the management of adults with hospital-acquired, ventilator-associated, and healthcare-associated pneumonia. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 171,388-416.
6. Teksöz, E. (2005). Havalandırma-Klima ve HEPA Filtrasyon Sistemleri ile Bu Sistemlere Bağlı Gelişebilecek Enfeksiyonlar. 4.Ulusal Sterilizasyon Dezenfeksiyon Kongresi - Samsun, 591-599.
7. Aytaç, N., Naharcı, H. ve Öztunç G. (2008). Adanada eğitim araştırma hastanelerinin yoğun bakım hemşirelerinde hastane enfeksiyonları bilgi düzeyi. *Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 9(3), 9-15.
8. Tablan, O.C. (2003). *Guidelines for preventing health-care-associated pneumonia, Recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee*, Dallas, ABD 1-94.
9. Yamauchi, N.M. (2018). Bacterial Pneumonia in Elderly Japanese Populations. *Japanese Clinical Medicine*, 9, 1–4.
10. Dreyfuss, D. (1991). Prospective study of nosocomial pneumonia and of patient and circuit colonization during mechanical ventilation with circuit changes every 48 hours versus no change. *American Review of Respiratory Disease*, 143(1), 738-743.
11. Ören, B. (2010). Nozokomiyal pnömoni ve hemşirelik bakımı. *Yoğun Bakım Hemşireliği Dergisi*,14(2), 55-58.
12. Chastre, J., Fagon, J.Y. and Trouillet, J.L. (1995). Diagnosis and treatment of nosocomial pneumonia in patients in intensive care units. *Clinical Infectious Diseases*, 21(3), 226-237.
13. Kallet, R.H. and Quinn, T.E. (2005). The gastrointestinal tract and ventilator-associated pneumonia. *Respiratory Care*, 50(7), 910-923.
14. Kollef, M.H. (1995). Mechanical ventilation with or without 7-day circuit changes: A randomized controlled trial. *Annals of internal medicine*, 123(3), 168-174.

15. Miaśkiewicz-Peska, E. and Łebkowska, M. (2011). Effect of antimicrobial air filter treatment on bacterial survival. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 19(84), 1.
16. Kosugi, T., Kusano, T., Takeno, K., Iwanaga, H. and Kamiyama, Y. (2009). Development of “Antibacterial Properties and an Antiviral Multifunctional Bio-filter” and the Air Purification System “Living Space Purifier KPD1000”. *FujiFilm Research and Development*, 57, 18-23.
17. Iwanaga, H. (2009). Verification of a specific reaction between an airborne antigen and an immobilized antibody at a gas-solid interface. *Analytical Sciences*, 25(9), 1101-1106.
18. Liu, G. (2017). A review of air filtration technologies for sustainable and healthy building ventilation. *Sustainable Cities and Society*, 32, 375-396.
19. Rahman, S. (2013). Oral passive IgY-based immunotherapeutics: a novel solution for prevention and treatment of alimentary tract diseases. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 9(5), 1039-1048.
20. Tabaru, A., Kemalettin, Ö. (2006). Koah Atak ve Toplum Kökenli Pnömonide Enfeksiyon Kontrol Komitesi Öncesi ve Sonrası Tedavi Yaklaşımı ve Sonuçları, *The Eurasian Journal of Medicine*, 77-78.
21. Kılınç, O. (2000). *Pnömoniler*. Türk Toraks Derneği, 1-39.
22. Bielen, K. (2017) . Animal models of hospital-acquired pneumonia: current practices and future perspectives. *Annals of Translational Medicine*, 5(6). 1-13.
23. .Özlü, T., Bülbül, Y. ve Özsu, S. (2007). Ulusal verilerle toplum kökenli pnömoniler. *Tüberküloz ve Toraks Dergisi*, 55(2), 191-212.
24. Gür, D. (2003). Hastane enfeksiyonu etkeni çoklu dirençli Gram negatif mikroorganizmalar. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*, 111-117.
25. Akalın, H. (2004). Nozokomiyal Pnömoni-Epidemiyoloji-Patogenez-Etyoloji-Tanı. *Hastane enfeksiyonları Dergisi*, 11-18.
26. Doğanay, M., Ünal, S. ve Şaradan, Y. (2003). *Hastane enfeksiyonları*. Ankara. Bilimsel Tıp Yayınevi, 519-523.
27. Albayrak, G.T. (2008). *Hastane enfeksiyonu etkeni olan Pseudomonas aeruginosa kökenlerinde çift disk sinerji testi ve kombine çift disk sinerji ile metallo-betalaktamaz varlığının araştırılması*. Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, 1-20.
28. Bilgehan, H. (2000). *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. (10. Baskı). İzmir:Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, 50-75
29. Ustaçelebi, Ş . (1999) . *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara:Gündüş Kitabevi, 551-557.

30. Klockgether, J. and Tümmler, B. (2017). Recent advances in understanding *Pseudomonas aeruginosa* as a pathogen. *F1000Research*, 2-5.
31. Schade, R. and Terzolo, H. (2006). *IgY-technology: application and trends*. -12th European Poultry Conference, Verona, Italy, 2-6.
32. Boz, E. (2009). Toplum kaynaklı ve nozokomiyal deri ve yumşak doku enfeksiyonlarından izole edilen *Staphylococcus aureus*'ların MLSb direnci ve antimikrobiyal duyarlılık. Uzmanlık Tezi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Mikrobiyoloji Klinik Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İstanbul, 7-9.
33. Bilgin, Y. (2006). *Escherichiae coli* , *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Staphylococcus aureus* Suşlarında Çeşitli Aminoglikozidlerin Duyarlılıklarının Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı Haseki Eğitim Ve Araştırma Hastanesi İstanbul, 18-19
34. Biçer, A.T. (2009). Hastane İzolatı *Staphylococcus aureus* ve Koagülaz Negatif *Staphylococcus* Suşlarında Metisilin Direncinin Farklı Yöntemlerle Araştırılması. Uzmanlık Tezi, Tıp Fakültesi Çukurova Üniversitesi, 101.
35. İnternet: Taylor, T. U. (). *Staphylococcus aureus* StatPearls URL: <http://www.webcitation.org/query?url=https%3A%2F%2Fwww.ncbi.nlm.nih.gov%2Fpubmed%2F28722898&date=2019-05-22>, Son Erişim Tarihi: 03.04.2019.
36. Tobias, F.L. (2012). Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains by neutralizing IgY antibodies from ostrich egg yolk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43(2), 544-551.
37. Hasegawa, et al. (1981) Antibacterial and antifungal composition. United States Patent, 1-10.
38. Köksal, Y. (2001/3-6 Ekim). *Kapalı Mahallerde Hava Kalitesinin iyileştirilmesi*. V. Ulusal Tesisat Mühendisliği Kongresi, İzmir, 525-537.
39. Aslan, S. ve Kaplan, S. (2010). Filtrasyon tekstilleri: Kullanılan hammaddeler, üretim yöntemleri ve kullanım alanları. *The Journal of Textiles and Engineer*. 17(79).
40. Li, X. (2015). Chicken egg yolk antibodies (IgY) as non-antibiotic production enhancers for use in swine production: a review. *Journal of animal science and biotechnology*, 6(1), 40.
41. Sim, J.S. and Nakai, S. (1994). *Egg uses and processing technologies: New developments*. Cab International. p.25-50.
42. Narat, M. (2003). Production of Antibodies in chickens. *Food Technology and Biotechnology*, 41(3), 259-267.
43. Xu, Y. (2011). Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: A review. *Biotechnology Advances*, 29(6), 860-868.

44. Liang, X. (2018). Comparison of Chicken IgY and Mammalian IgG in Three Immunoassays for Detection of Sulfamethazine in Milk. *Food Analytical Methods*, 11(12), 3452-3463.
45. Müller, S. (2015) IgY antibodies in human nutrition for disease prevention. *Nutrition Journal*, 14(1),109.
46. Korver, M.Y. (2007). Study of egg yolk antibodies alternative antibiotics. *World Poultry*, 23(5).
47. Liang, X. (2018). Comparison of Chicken IgY and Mammalian IgG in Three Immunoassays for Detection of Sulfamethazine in Milk. *Food Analytical Methods*, 1-12.
48. Solhi, R. (2017). In vitro evaluation of cross-strain inhibitory effects of IgY polyclonal antibody against *H. pylori*. *Microbial Pathogenesis*, 110, 682-687.
49. Nguyen, S.V. (2011). Anti-cell-associated glucosyltransferase immunoglobulin Y suppression of salivary mutans streptococci in healthy young adults. *The Journal of the American Dental Association*, 142(8), 943-949.
50. Thomsen, K. (2016) Anti-*Pseudomonas aeruginosa* IgY antibodies augment bacterial clearance in a murine pneumonia model. *Journal of Cystic Fibrosis*, 15(2), 171-178.
51. Nilsson, E. (2008). Good effect of IgY against *Pseudomonas aeruginosa* infections in cystic fibrosis patients. *Pediatric Pulmonology*, 43(9), 892-899.
52. Abdou, A, M. (2013). Functional Proteins and Peptides Of Hen's Egg Origin, *Bioactive Food Peptides in Health and Disease*,115-124.
53. Akbari, M.R. (2018). Anti-*Vibrio cholerae* IgY Antibody Inhibits Mortality in Suckling Mice Model. *Journal of the National Medical Association*, 110(1), 84-87.
54. Kovacs-Nolan, J. and Mine, Y. (2004). Passive immunization through avian egg antibodies. *Food Biotechnology*, 18(1), 39-62.
55. Jagadeeswari, M., Dhanabalan, R. and Saranya, G. (2015). Detection of *Staphylococcus aureus* from Clinical and Sub-clinical Bovine Mastitis milk samples using Chicken egg yolk antibodies (IgY). *International Journal of Applied and Pure Science and Agriculture*, 1(7), 1-6.
56. Reddy, P.K. (2013).Evaluation of IgY capture ELISA for sensitive detection of Alpha hemolysin of *Staphylococcus aureus* without staphylococcal protein A interference. *Journal of Immunological Methods*, 391(1-2), 31-38.
57. Kollberg, H. (2003). Oral administration of specific yolk antibodies (IgY) may prevent *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with cystic fibrosis: a phase I feasibility study. *Pediatric Pulmonology*, 35(6),433-440.
58. Asadian, F. and Nikbakht, Gh.R. (2012). Development and ELISA-based detection of anti-M2e IgY antibodies using an encoding plasmid for M2e-Hsp70 C-terminal gene. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 6(2), 67-71.

59. Hodek, P. (2013). Optimized protocol of chicken antibody (IgY) purification providing electrophoretically homogenous preparations. *Int Journal Electrochem Science*, 8, 113-124.
60. Pauly, D. (2011). IgY technology: extraction of chicken antibodies from egg yolk by polyethylene glycol (PEG) precipitation. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, (51).
61. Hodek, P., Stiborová, M. (2003). Chicken antibodies-Superior alternative for conventional immunoglobulins. *Proceedings-Indian National Science Academy Part B*, 69(4),461-468.
62. Amro, W.A., Al-Qaisi, W. and Al-Razem, F. (2018). Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 16(1), 99-103.
63. Fishman, J.B. and Berg, E.A. (2018). Isolation of IgY from Chicken Eggs. *Cold Spring Harbor Protocols*, (6),99-150.
64. Barati, B., Ebrahimi, F. and Nazarian S. (2018). Production of chicken egg yolk antibody (IgY) against recombinant cholera toxin B subunit and evaluation of its prophylaxis potency in mice. *Iranian Journal of Immunology*, 15(1), 47-58.
65. He, J. (2016). Development of indirect competitive ELISA using egg yolk-derived immunoglobulin (IgY) for the detection of Gentamicin residues. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(1), 8-13.
66. Yamada, K. (2013). Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a specific anti-PBP2a chicken IgY antibody. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 66(2), 103-108.
67. Pompilio, A. and Pompilio, S. (2011). Phenotypic and genotypic characterization of *Stenotrophomonas maltophilia* isolates from patients with cystic fibrosis: Genome diversity, biofilm formation, and virulence. *BMC Microbiology*, 11, 159.
68. Stepanović, S., Vuković, D. and Hola, V. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115, 891–899.
69. Gibbs, J. and Kennebunk, M. (2001). Immobilization Principles–Selecting the Surface. *ELISA Technical Bulletin*, 1, 1-8.
70. Yegani, M. and Korver, D. (2007). Are egg yolk antibodies an alternative to antibiotics. *World Poultry*, 23(5), 22-25.
71. Lee, E. (2002.). In vitro studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. *Poultry Science*, 81(5), 632-641.
72. Uma, M. (2012). Purification and characterization of chicken egg yolk antibodies (IgY) against mastitis-causing *Klebsiella pneumonia*. *European Journal of Biological Sciences*, 4(2), 35-39.

73. Adachi, K. (2008). Development of neutralization antibodies against highly pathogenic H5N1 avian influenza virus using ostrich (*Struthio camelus*) yolk. *Molecular Medicine Reports*, 1(2), 203-209.
74. Bachtiar, E.W. (2016). Effect of topical anti-*Streptococcus mutans* IgY gel on quantity of *S. mutans* on rats' tooth surface. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 63(2), 159-169.
75. Shi, H. (2017). Effects of specific egg yolk immunoglobulin on pan-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 95, 1734-1742.
76. Grzywa, R. (2014). Highly sensitive detection of cancer antigen 15-3 using novel avian IgY antibodies. *ALTEX-Alternatives to Animal Experimentation*, 31(1), 43-52.
77. Sifi, A., Adi-Bessalem, S. and Laraba-Djebbari, F. (2018). Development of a new approach of immunotherapy against scorpion envenoming: Avian IgYs an alternative to equine IgGs. *International Immunopharmacology*, 61, 256-265.
78. Fink, A.L. (2017). Dengue virus specific IgY provides protection following lethal dengue virus challenge and is neutralizing in the absence of inducing antibody dependent enhancement. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(7), e0005721.
79. Teimoori, S. (2017). Chicken IgY-based coproantigen capture ELISA for diagnosis of human opisthorchiasis. *Parasitology International*, 66(4), 443-447.



EK-1.Etik Kurul Raporu



YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

Toplantı Tarihi : 27/06/2018
Toplantı No : 2018/23
Proje Başvuru No : 52

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilimdalından sorumlu araştırmacı Uzman Mikrobiyolog Ali Afandi nin, "Hava Yolu İle Bulaşan Bazı Bakteriyel Etkenlere Karşı IgY Teknolojisine Dayalı Klima Filtre Sisteminin Geliştirilmesi" başlıklı doktora çalışmasının " Yumurta Tavuklarının İmmünizasyonu, IgY Üretilmiş Yumurtaların Toplanması" alt başlıklı araştırma önerisi hayvanlara yapılan işlemlerin raporunun veteriner Hekim tarafından verilmesi koşuluyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Emine KOÇ

(BAŞKAN)

1. Prof. Dr. Tamer YILMAZ

(ÜYE)

2. Prof. Dr. Vedat SAĞMANLIGİL

(ÜYE)

3. Doç. Dr. Dilek ARSOY

(ÜYE)

4. Doç. Dr. Bilgen BAŞGUT

(ÜYE)

5. Doç. Dr. Serdar SUSEVER

(ÜYE)

6. Yrd. Doç. Dr. Savaş Volkan GENÇ

(ÜYE)

7. Vet. Hek. Umut SAYILI

(ÜYE)

8. Avukat Burak NOLAN

(ÜYE)

9. Vet. Hek. Meliha TEMİZEL

(ÜYE)

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : AFANDI, Ali Hussein M.
 Uyruğu : Irak (Türkmen)
 Doğum tarihi ve yeri : 09.06.1986/ Telafer – Irak
 Medeni hali : Evli
 Telefon : +90 535 922 98 16
 e-mail : aliafandy202@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi / Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	2013
Lisans	Musul Üniversitesi, Fen- Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Mikrobiyoloji ABD	2009
Lise	Telafer Lisesi/Musul	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-		

Yabancı Dil

İngilizce, Arapça

Yayınlar

Afandi, A.H.M. ve Doğruman-Al, F. (2019). Staphylococcus aureus, Klebsiella pneumoniae ve Pseudomonas aeruginosa ile immunize edilen tavuklardan elde edilen IgY antikorlarının etkinliğinin ELISA yöntemiyle araştırılması. *Türk Hijyen Ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, <https://dx.doi.org/10.5505/TurkHijyen.2019.67366>.

Projeler

AFANDI, Ali Hussein M., 2015). *TUBİTAK 1003 Projesi. Influenza A Enfeksiyonu Tanısı İçin (M2e) Peptidine Spesifik IgY Antikoru Dayalı İmmünokromatografi Yöntemi İle Hızlı Tanı Kiti Geliştirilmesi*. Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Fak. Biyomühendislik bölümü, Esenler/İstanbul.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...



Gazili olmak ayıcalıktır

