

AHMET AKTAŞ

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL-2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOK VE
KARBAPENEM DİRENÇLİ GRAM NEGATİF ÇOMAK
KOLONİZASYONLU NEONATAL REKTAL SÜRÜNTÜ
ÖRNEKLERİNİN METAGENOMİK ARAŞTIRILMASI

AHMET AKTAŞ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. YAŞAR NAKİPOĞLU

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Ahmet AKTAŞ

İTHAF

Aileme...



TEŞEKKÜR

Öncelikle, bu süreçte bana destek olan, bilgilerini bana açan, tecrübeleri ile bana yol gösteren, günlük konuşmalarımızdan bile faydalandığım, ünvanından çok daha fazlası olan değerli hocam Doç. Dr. Yaşar NAKİPOĞLU'na teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca bu tezin oluşturulması sürecinde verdikleri destekler için tez izleme komitesi üyeleri, Sayın Prof. Dr. Zayre ERTURAN ve Sayın Prof. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR'a teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim süresince birlikte olduğumuz başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali AĞAÇFİDAN ve Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. Betigül ÖNGEN, Prof. Dr. Meltem UZUN, Prof. Dr. Dilek ŞATANA, Doç. Dr. Hayriye KIRKOYUN UYSAL, Doç. Dr. Gonca ERKÖSE GENÇ, Dr. Öğr. Üyesi Mustafa ÖNEL ve Dr. Öğr. Üyesi Deniz Bahar AKGÜN KARAPINAR'a teşekkür ederim.

Bu süreçte manevi destekleri ile yanımda olan dönem arkadaşım Dr. Öğr. Üyesi Şafak Ceren UÇAK'a teşekkür ederim.

Son olarak, tüm hayatım boyunca yanımda olan, her hatamda yanımda olup beni destekleyen Annem Fatma AKTAŞ, Babam Ali AKTAŞ ve kıymetli ablalarım Melike ÇAVUŞOĞLU ve Firdes AKTAŞ'a minnetlerimi sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2022-38378

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	2
İTHAF.....	3
TEŞEKKÜR.....	4
İÇİNDEKİLER	5
TABLolar LİSTESİ.....	8
ŞEKİLLER LİSTESİ	9
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	11
ÖZET	12
ABSTRACT.....	13
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	14
2. GENEL BİLGİLER	16
2.1. Vankomsine Dirençli Enterokok (VRE) ve Karbapeneme Dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KRKP).....	16
2.2. İnsan Bağırsak Mikrobiyotası	16
2.2.1. Pre-term Bağırsak Mikrobiyotasının Gelişimi	18
2.2.2. Bağırsak Mikrobiyotasının Bileşenleri	20
2.2.3. Mikrobiyota Oluşumunu Etkileyen Faktörler	20
2.2.3.1. Hamilelik Süreci.....	20
2.2.3.2. Doğum Şekli.....	21
2.2.3.3. Beslenme Tipi	22
2.2.3.4. Hastanede Kalış Süresi.....	22
2.2.3.5. Antibiyotik Kullanımı	22
2.2.3.6. Prebiyotik, Probiyotik ve Simbiyotik Kullanımı	23
2.2.3.7. Bebeklere Uygulanan Antibiyotiklerin Mekonyum Mikrobiyotasına Muhtemel Etkisi	24
2.2.4. Bağırsak Mikrobiyotasının Sağlıktaki Rolü.....	25
2.2.5. Bağırsak Mikrobiyotasının Hastalıklardaki Rolü	26
2.2.5.1. Nekrotizan Enterokolit	28
2.2.5.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (IBH) ve Crohn Hastalığı.....	29
2.2.6. Mekonyum Mikrobiyotası.....	29

2.3. Bağırsak Mikrobiyotası Çalışma Yöntemleri	30
2.3.1. Terminoloji.....	30
2.3.2. Filogenetik Taksonomi	32
2.3.3. Bakteriyal Kültür Yöntemi.....	33
2.3.4. Yeni Nesil Dizileme (NGS) Temelli Yöntemler.....	33
2.3.4.1. 16S rRNA İşaretleyici Gen Analizi.....	35
2.3.4.2. Shotgun Metagenomik	38
2.3.4.3. Metatranskriptomiks (Omiks)	38
2.4. Biyoçeşitlilik Analizi	39
2.4.1. Alfa Çeşitlilik.....	39
2.4.2. Beta Çeşitlilik.....	40
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
3.1. Gereçler.....	41
3.1.1. Besiyerleri	41
3.1.1.1. Antibiyotik Diskleri	41
3.1.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler	41
3.1.1.3. Kullanılan Yazılım ve Cihazlar.....	41
3.1.1.4. Sarf Mazlemeler	42
3.2. Yöntem.....	42
3.2.1. Çalışma Protokolünün Hazırlanması	43
3.2.2. Bebeklere Uygulanan Profilaksi	43
3.2.3. Örneklerin Kültürü ve Bakterilerin Tanımlanması	44
3.2.4. Örneklerin Kültürü ve Bakterilerin Tanımlanması	44
3.2.5. Disk Difüzyon Yöntemi	45
3.2.6. Mekonyum ve Rektal Sürüntüden gDNA İzolasyonu	45
3.2.7. PCR ve gDNA'ların 16S rRNA Bölgelerinin Dizilenmesi.....	47
3.2.8. Ham Verilerin Biyoinformatik Analizi	49
3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme	49
3.2.10. Çeşitlilik Analizi	50
3.2.10.1. Alfa Çeşitliliği.....	50
3.2.10.2. Beta Çeşitliliği.....	50
4. BULGULAR.....	51
4.1. Yenidoğanlara Uygulanan Profilaktik Tedaviler	51

4.2. Örneklerin Kültür Sonuçları	51
4.3. Profilaksi ve Tedavide Kullanılan Antibiyotiklerin Bağırsakta Bulunan Mikrobiyota Bakterilerine Karşı Olası Etkisi	52
4.4. 16S rRNA Sekans Kalite Skorları.....	55
4.5. OTU'ların Biyoinformatik Analizleri	55
4.5.1. Filum (Phylum) Seviyesinde OTU Analizi.....	56
4.5.1.1. Bebeklere Uygulanan Antibiyotiklere Göre Filumların Gruplandırılması ..	59
4.5.1.2. İkizlerde Filumların A ve B Örneklerinde Ortalama Yüzdeleri.....	62
4.5.1.3. İkiz Bebeklerde Biyoçeşitlilik Analizi	63
4.5.1.4. İkiz Olmayan Bebeklerde Filumların A ve B Örneklerinde Ortalama Yüzdeleri	64
4.5.1.5. İkiz Olmayan Bebeklerde Biyoçeşitlilik Analizi	64
4.5.1.6. İkiz ve İkiz Olmayan Bebeklerin Rektal Sürüntü Örneklerinde Filumların ve Bakteri Cinslerin Yüzdesel Görünmelerinin Karşılaştırılması	65
4.5.2. Sınıf (Class) Seviyesinde OTU Analizi	66
4.5.3. Aile (Familya) Seviyesinde OTU Analizi	70
4.5.4. Tür (Species) Bazında OTU Analizi	74
4.5.4.1. İkiz Bebeklerde Biyoçeşitlilik Analizi	77
4.5.4.2. İkiz Olmayan Bebeklerde Biyoçeşitlilik Analizi	78
5. TARTIŞMA	79
KAYNAKLAR	91
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	108

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Yatan bebeklerde kullanılan antibiyotiklerin bakterilere karşı etkisi.	24
Tablo 2-2: Bağırsakta yer alan kısa zincirli yağ asidi üreten gruplar ve substratları.....	26
Tablo 2-3: Bağırsak mikrobiyotasındaki değişimlerin hastalıklarda ilişkileri.....	28
Tablo 2-4: Bu tezde kullanılan taksonomik skala.....	33
Tablo 2-5: NGS temelli genomik analiz metotlarının karşılaştırılması.....	34
Tablo 3-1: Deneylerde kullanılan besiyerleri.	41
Tablo 3-2: Çalışmaya alınan bebeklerin ve alınan örneklerin kabul veya ret kriterleri..	43
Tablo 3-3: Çalışmaya dahil edilen bebeklerin doğum bilgileri ve profilakside kullanılan antibiyotikler.....	44
Tablo 4-1: Bebeklere uygulanan profilaksi ve tedavide kullanılan antibiyotiklerin uygulanma süresi ve VRE/KRKP görülme süreleri.	52
Tablo 4-2: Yatan bebeklere uygulanan profilaksi ve tedavide kullanılan antibiyotiklerin bakterilere karşı etkisi.....	53
Tablo 4-3: Mekonyum (A) ve rektal örneklerde (B) saptanan filumların dağılımı.	56
Tablo 4-4: Mekonyum örnekleri (A örnekler) ve antibiyotik sonrası alınan rektal sürüntü (B örnekler) örneklerinde saptanan filumların yüzdesel görülme dağılımları...	62
Tablo 4-5: İkiz bebeklerin A ve B örneklerinde saptanan filumların yüzdesel ortalama görülme değerleri.....	63
Tablo 4-6: İkiz olmayanlarda A ve B örneklerinde saptanan filumların yüzdesel ortalama görülme değerleri.....	65
Tablo 4-7: Mekonyum örnekleri (A) ve antibiyotik sonrası alınan rektal sürüntü (B) örneklerinde saptanan sınıfların yüzdesel görülme dağılımları.....	67
Tablo 4-8: Mekonyum örnekleri (A) ve antibiyotik sonrası alınan rektal sürüntü (B) örneklerinde saptanan ailelerin yüzdesel görülme dağılımları.	72

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1:Gastrointestinal sistemde bulunan bakteri türleri ve bakterilerinin yerleşimi.	17
Şekil 2-2: Mikrobiyotanın gelişim süreci	19
Şekil 2-3: OTU oluşturma basamakları.	31
Şekil 2-4: Biyoçeşitliliklerin karşılaştırılması.	32
Şekil 2-5: 16S rRNA ve Shotgun metagenomik NGS yaklaşımlarının karşılaştırılması	35
Şekil 2-6: Ribozom ve <i>E. coli</i> 'ye ait 16S rRNA gen şeması	36
Şekil 2-7: Simpson indeksi hesaplama formülü.	39
Şekil 2-8: Shannon indeksi hesaplama formülü.	40
Şekil 2-9: Chao indeksi hesaplama formülü.	40
Şekil 4-1: 16S rRNA dizilerinin ortalama zincir uzunlukları.	55
Şekil 4-2: Ham dizilerin primerlerin kesilmesinden sonra dizi benzerliklerinin tanımlanması.	55
Şekil 4-3: Filumlara ait göreceli bollukların ifade edildiği çubuk grafiği ve ısı haritaları.	57
Şekil 4-4: Filumların ortalama (Sol) ve örnek gruplarında (Sağ) bulunma yüzdeleri. ...	58
Şekil 4-5: Anlamlı fark gösteren filumların göreceli bolluk yüzde grafikleri.	58
Şekil 4-6: Filum bazında örneklerin alfa biyoçeşitliliklerinin karşılaştırmalı grafikleri.	60
Şekil 4-7: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal örneklerin filum bazında Bray-Curtis farklılığı ısı haritası. (Alt) Bray-Curtis Farklılığı (sol) ve Jaccard Uzaklığı (sağ) Temel Koordinat Analizi.	61
Şekil 4-8: (Sol) İkiz bebeklerin alfa biyoçeşitlilik grafikleri, (Orta) Bray-Curtis Farklılığı ve (Sağ) Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.	63
Şekil 4-9: (Sol) İkiz olmayan bebeklerin alfa biyoçeşitlilik grafikleri, (Orta) Bray-Curtis Farklılığı ve (Sağ) Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.	64
Şekil 4-10: Sınıf düzeyinde örneklerde gözlemlenen göreceli bollukların çubuk grafiği ve en yüksek orana sahip 30 taksonu ifade eden ısı haritası.	66
Şekil 4-11: Sınıfların Ortalama (Sol) ve Örnek Gruplarında (Sağ) Bulunma Yüzdeleri	67
Şekil 4-12: Anlamlı fark gösteren sınıfların göreceli bolluk yüzde grafikleri.	68
Şekil 4-13: Örnek gruplarının sınıf bazında alfa çeşitliliklerinin karşılaştırılması.	68

Şekil 4-14: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal örneklerin sınıf bazında Bray-Curtis farklılığı ısı haritası. (Alt) Bray-Curtis Farklılığı ve Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.	69
Şekil 4-15: (Sol) Ailelerin tüm örneklerde ortalama bulunma yüzdesi, (Sağ) Mekonyum ve dirençli koloni tespit edilen örnek grupları ayrıştırılarak ailelerin bulunma yüzdeleri.	70
Şekil 4-16: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen örneklerin ailelerin dağılımları, (Alt) Örneklerin içerdiği baskın aileleri gösterir ısı haritası ve filogenetik metriği.....	71
Şekil 4-17: Örnek gruplarında aile seviyesinde alfa çeşitlilik karşılaştırılması.....	73
Şekil 4-18: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal örneklerin aile bazında Bray-Curtis farklılığı ısı haritası. (Alt) Bray-Curtis Farklılığı (sol) ve Jaccard Uzaklığı (sağ) Temel Koordinat Analizi.	74
Şekil 4-19: (Sol) Örneklerde en bol bulunan türlerin ortalama bulunma yüzdesi. (Sağ) Mekonyum ve rektal sürüntü örneklerinde türlerin bulunma yüzdeleri	75
Şekil 4-20: Örnek bazında en yüksek göreceli bolluğa sahip 30 türe ait ısı haritası ve filogenetik uzaklık haritası.....	75
Şekil 4-21: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal örneklerin tür bazında Bray-Curtis farklılığı ısı haritası. (Alt) Bray-Curtis Farklılığı ve Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.	76
Şekil 4-22: Örnek gruplarında tür seviyesinde alfa çeşitlilik karşılaştırılması.....	77
Şekil 4-23: (Sol) İkiz bebeklerin tür seviyesinde alfa biyoçeşitlilik grafikleri, (Orta) Bray-Curtis Farklılığı ve (Sağ) Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.	77
Şekil 4-24: (Sol) Tekiz bebeklerin tür seviyesinde alfa biyoçeşitlilik grafikleri, (Orta) Bray-Curtis Farklılığı ve (Sağ) Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.	78

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

NGS:	Yeni Nesil Dizileme
VRE:	Vankomisin Dirençli <i>Enterococcus</i>
KRKP:	Karbapenem Dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i>
gDNA:	Genomik DNA
GI:	Gastrointestinal Sistem
T _H :	Yardımcı T Hücresi
NEC:	Nekrotizan Enterokolit
KNS:	Koagülaz negatif <i>Staphylococcus</i>
IBH:	İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı
V:	Hiper değişken 16S rRNA Bölgesi
C:	Korunmuş 16S rRNA Bölgesi
OTU:	Operasyonel Taksonomik Birim
WGS:	Whole Genome Sequencing “Tüm Genom Dizileme”
MC:	MacConkey Agar
MC-M:	Meropenem İlaveli MacConkey Agar
BEA:	Azidli Bile Esculin Agar
BEA-V:	Vankomisin İlaveli Azidli Bile Esculin Agar
TSA:	Triptik Soy Agar
MHA:	Meuller-Hinton Agar
MHB:	Meuller-Hinton Broth
VSE:	Vankomisin duyarlı <i>Enterococcus</i>
KSKP:	Karbapenem duyarlı <i>Klebsiella pneumoniae</i>
ADT:	Antibiyotik Duyarlılık Testi
CLSI:	Clinical and Laboratory Standards Institute
SXT:	Trimetoprim-Sülfometaksazol
Pip-Tazo:	Piperasilin-Tazobaktam
ESBL:	Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz
MRSA:	Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
gDNA:	Genomik DNA

ÖZET

AKTAŞ A. (2024). Vankomisin Dirençli Enterokok ve Karbapenem Dirençli Gram Negatif Çomak Kolonizasyonlu Neonatal Rektal Sürüntü Örneklerinin Metagenomik Araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

İnsan bağırsak mikrobiyotası, sağlıklı ve hastalıklı dönemlerde sayısal anlamda farklılık gösterebilen ve tür çeşitliği yönünden diğer vücut bölgelerine kıyasla en büyük mikrobiyota topluluğudur. Fizyolojik, metabolik ve immünolojik gibi hayati fonksiyonlarda rol oynayan bağırsak mikrobiyotası insan sağlığının merkezi olarak kabul edilmektedir. Doğumun ardından yerleşmeye başlayan mikrobiyotanın kompozisyonu, bebeğin doğum şekli, bebeğin yaşı, beslenme tipi, aldığı antibiyotikler ve çevresel koşullar dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir. Çalışmamızda yenidoğan yoğun bakım servisinde yatan <32 hafta doğum yaşı ve 1500 gr'dan düşük doğum ağırlığına sahip bebeklere yatış süresince uygulanan antibiyotiklerin mikrobiyota kompozisyonuna etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızda, 20 bebekten toplanan mekonyum örnekleri (n=20) ve aynı bebeklerin ilk kez vankomisine dirençli *Enterococcus* (VRE) ve karbapeneme dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KRKP) saptanan rektal sürüntü örnekleri (n=20) olmak üzere toplamda 40 örnekte, yeni nesil dizileme yöntemi ile 16S rRNA kodlayan gDNA bölgesi sekanslanarak metagenomik analizi yapılmıştır. Çalışmamız bu konuda Türkiye'de yapılan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Bebeklerden alınan 20 mekonyum örneğinde toplam 25 filum saptanmıştır. Mekonyumlarda en baskın dört filum sırasıyla; Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota ve Actinomycetota olduğu, rektal sürüntü örneklerinden ise Pseudomonadota göreceli bolluğunda bir artış olduğu diğer üç filumda ise anlamlı bir azalma görüldüğü saptanmıştır. Filum düzeyinde alfa biyoçeşitlikte anlamlı şekilde azalma ($p \leq 0,05$) saptanırken, beta çeşitlilikte rektal sürüntüde varyans azalması görülmüştür. Bebeklere ait örneklerde toplamda 310 aile saptanmıştır. *Enterobacteriaceae* (%35,56) ve *Enterococcaceae* (%18,35) en yüksek oranda görülen aileler olarak saptanmıştır. Cins/tür bazında ise örneklerde toplamda 2594 cins/tür tespit edilmiştir. İlk beş cins; *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., ve *Clostridium* spp., tür ise; *E. faecalis*, *E. faecium* ve *K. pneumoniae* olarak tespit edilmiştir. Bebeklerin bağırsak mikrobiyota kompozisyonunda meydana gelen bu değişimin nedenleri, bebeklerde kullanılan antibiyotiklerin yanı sıra bağırsak mikrobiyotasının doğal gelişim sürecine de bağlı olabilir. Bu konuda daha çok örnek üzerine çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: Mikrobiyota, yenidoğan, antibiyotik, 16S rRNA, VRE, KRKP, mekonyum, rektal sürüntü

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2022-38378

ABSTRACT

AKTAŞ A. (2024). Metagenomic Investigation of Neonatal Rectal Swab Samples Colonised with Vancomycin-Resistant Enterococci and Carbapenem-Resistant Gram Negative Rods. Istanbul University, Institute of Health Science, Medical Microbiology. PhD Thesis. Istanbul.

The human intestinal microbiota is the largest microbiota community compared to other body regions in terms of species diversity, which can differ numerically in healthy and diseased periods. The intestinal microbiota, which plays a role in vital functions such as physiological, metabolic, and immunological, is considered the center of human health. The composition of the microbiota that begins to settle after birth is affected by many factors, including the type of birth of the baby, the baby's age, nutrition type, antibiotics taken, and environmental conditions. Our study aimed to investigate the effect of antibiotics administered to babies with a birth age <32 weeks and a birth weight less than 1500 g on the microbiota composition during hospitalization in the neonatal intensive care unit. In our study, the next-generation sequencing method was used in a total of 40 samples, including meconium samples collected from 20 babies (n = 20) and rectal swab samples (n = 20) from the same babies, in which vancomycin-resistant *Enterococcus* (VRE) and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (KRKP) were detected for the first time. The gDNA region encoding 16S rRNA was sequenced, and metagenomic analysis was performed. Our study is the first study conducted in Turkey on this subject. A total of 25 phyla were detected in 20 meconium samples taken from babies. The four most dominant phyla in meconiums are: Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota, and Actinomycetota. From the rectal swab samples, there was an increase in the relative abundance of Pseudomonadota and a significant decrease in the other three phyla. While a significant decrease ($p \leq 0.05$) was detected in alpha biodiversity at the phylum level, a decrease in variance in rectal swab was observed in beta diversity. A total of 310 families were identified in the sample of babies. *Enterobacteriaceae* (35.56%) and *Enterococcaceae* (18.35%) were found to be the families with the highest frequency. On the basis of genus or species, a total of 2594 genera or species were identified in the samples. The first five genera are *Enterococcus* spp., *Klebsiella* spp., *Staphylococcus* spp., *Enterobacter* spp., and *Clostridium* spp. species; they were identified as *E. faecalis*, *E. faecium*, and *K. pneumoniae*. The reasons for this change in the intestinal microbiota composition of babies may depend on the natural development process of the intestinal microbiota as well as the antibiotics used in babies. It would be useful to conduct studies on more examples of this subject.

Key words: Microbiota, newborn, antibiotic, 16S rRNA, VRE, CRPC, meconium, rectal swab

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. TDK-2022-38378

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Mikrobiyota, bedenin belirli bölgelerinde yerleşik, sağlıklı ve hastalıklı dönemlerde sayısal açıdan farklılık gösterebilen mikroorganizma topluluğunu, mikrobiyom bu mikroorganizmaların genetik materyallerinin toplamı olarak nitelenir (1). Deri, burun, vajina, bağırsak ve ağızda yer alan kommensal, simbiyotik ve patojenik mikroorganizmalar, bedenimizi oluşturan hücrelerden 10^{14} daha fazla oranda bulunabilmektedir (2). İnsanda yaşayan bu mikroorganizmaların büyük çoğunluğu bağırsak florasında yer alarak, enerji üretimi, besinlerin sindirimi, bağışıklık sisteminin gelişmesi ve düzenlenmesinde de kritik görevler üstlenmektedir (3-5). Sağlıklı bir insanın bağırsak sisteminde tahmini 1000'den fazla tür bulunurken, bunlardan sadece 160'u tüm bireylerde ortak olup (çekirdek mikrobiyota), yoğunlukları bireyler arasında farklılık göstermektedir (6,7).

Bağırsak florası sadece bakteriler ve arkealardan ibaret olmayıp virüsler ve çeşitli ökaryotik canlılar da yer alabilir (1,4). Yeni nesil dizileme sistemlerinin (NGS) pratikte kullanımının yaygınlaşması ile birlikte 16S rRNA dizilemesi ve biyoinformatik stratejilerin kullanıldığı metagenomik analizler sonucunda kültürü yapılamayan çok fazla sayıda yeni türlerin varlığı gösterilmiştir. Filogenetik analizlerde, Bacteroidetes, Bacillota (Eski adı: Firmicutes), Pseudomonadota (Eski adı: Proteobacteria) ve Actinomycetota (Eski adı: Actinobacteria) olmak üzere dört ana filumun (phylum) bağırsak mikrobiyotasında ortak baskın bileşenler olduğu, Verrucomicrobiota, Synergistetes, Planctomycetes, Mycoplasmatota (Eski adı: Tenericutes) ve Deinococcus-Thermus'a ait üyelerin değişen oranlarda bulunduğu görülmüştür (8). Cins düzeyinde ise, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Lactobacillus* ve *Proteus* bağırsak mikrobiyotasında baskın olarak yer alırlar (9).

İnsan mikrobiyotasının oluşumunda, gestasyon süresinin ve doğum yaşının etkisi göz ardı edilemeyecek kadar büyüktür. Doğumun ardından yenidoğan mikrobiyotası çevresel koşullar da dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir. Özellikle hastanede kalış sürecinde servis ortamı ve servis çalışanlarının mikrobiyotasına maruz kalmaktadırlar. Bu nedenle, bu tezde, <32 hafta doğum yaşı ve 1500 gr'dan düşük

doğum ağırlığına sahip bebeklerin yenidoğan yoğun bakım servislerinde tedavileri boyunca, vankomisin dirençli *Enterococcus* (VRE) ve karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KRKP) ile kolonizasyonlarına neden olan bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen değişimler, mekonyum örnekleri ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal sürüntü örneklerinden izole edilen genomik DNA'ların (gDNA) 16S rRNA dizilerini karşılaştırılarak biyoçeşitlilikler değerlendirilmiştir. Bu yolla, hastane ortamından kaynaklanan dirençli bakteri kolonizasyonunun yenidoğan mikrobiyotası formasyonundaki değişimlerinin gösterilmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Vankomsine Dirençli Enterokok (VRE) ve Karbapeneme Dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KRKP)

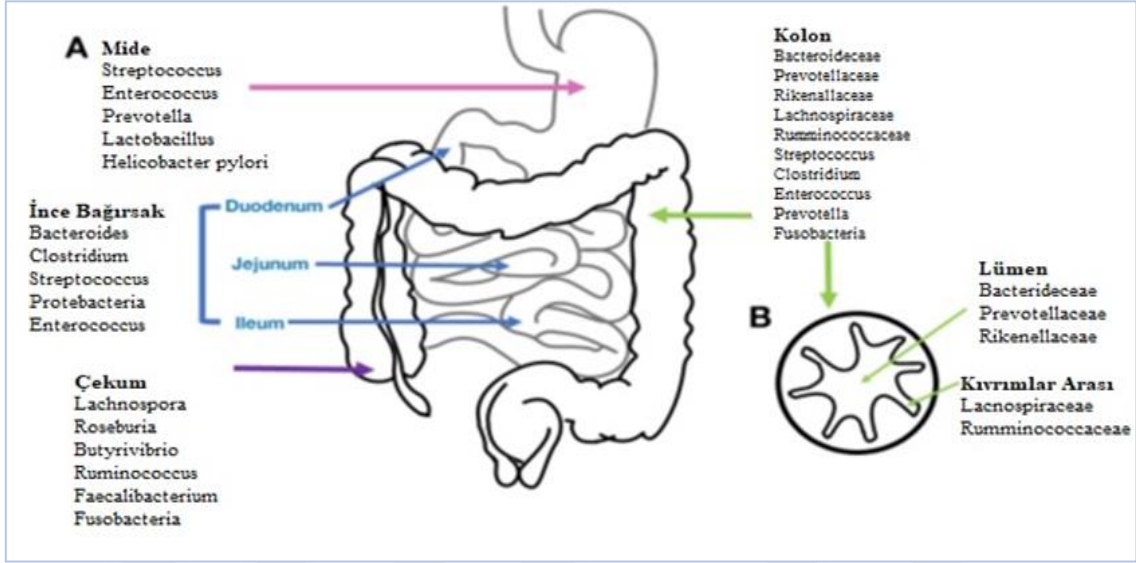
Bakteriyel hastane enfeksiyonu, hastaneye yatan hastaların yatışından 48 saat sonra ortaya çıkan enfeksiyon olarak tanımlanmaktadır (10). Çoğul ilaç direnci (ÇİD) olan Vankomisin Dirençli Enterokok (VRE) ve Karbapenem Dirençli *Klebsiella pneumoniae* (KRKP) gibi bakteriler, el antisepsisi kurallarına uymayan sağlık personelinin elleriyle taşınarak hastanede yatan hastaların bağırsağında kolonize olup, hastalar arası kolaylıkla yayılarak ciddi enfeksiyona neden olan önemli hastane enfeksiyonu etkenleridir. Plazmid/transpozon üzerinde taşınan bu antibiyotik direnç genleri; VRE’de *vanA*, *vanB*, *vanC*, *vanD*, *vanE*, *vanG*, *vanL*, *vanM* ve *vanN* ve KRKP’de ise *IMP*, *VIM*, *NDM*, *KPC* ve *OXA-48* bağırsakta bulunan diğer duyarlı bakterilere geçerek direnç kazanmalarına ve salgınlara neden olmaktadır (11,12). Bundan dolayı bu iki etkenin yatan hastalarda taranmasına her zaman önem verilmektedir. Bağırsak mikrobiyotası normal koşullarda patojen bakterilerin kolonize olmasına izin vermez ancak herhangi bir nedenle örneğin yenidoğan bebeklerde mikrobiyotanın tam oluşmaması, hematolojik hastalar, immünolojik defektler veya altta yatan başka hastalıkları olan hastalarda VRE ve KRKP kolonize olabilmektedir. Kolonizasyon süresi mikrobiyotanın kompozisyonuna göre bazen birkaç gün bazen de bir yıl gibi uzun sürebilmektedir.

2.2. İnsan Bağırsak Mikrobiyotası

İnsan gastrointestinal sistem (GIS) lümeni, konak olan insan ile dış ortam arasındaki en büyük bariyer ve en aktif yüzeydir (13). Önceki inanın aksine, bağırsak epitel bariyeri statik bir fiziksel bariyer olmayıp, bağırsak mikrobiyotası ve bağışıklık sisteminin hücreleri ile güçlü bir şekilde etkileşim halindedir. Epitel hücreleri, bağışıklık hücreleri ve mikrobiyota arasındaki bu yoğun iletişim sayesinde, antijenlere karşı spesifik bağışıklık tepkilerini şekillenmekte, bağışıklık fonksiyonlarının toleransı ve efektör etkileri dengelenmektedir (14).

Bağırsak mikrobiyotası, konak ile simbiyotik ilişkili çok sayıda mikroorganizmadan oluşan bir ekosistemdir (15). Büyük bölümü anaerobik ve fakültatif anaerobik bakteriler olmak üzere bağırsakta yaşamak için adapte olan yaklaşık 10-100

trilyon simbiyotik mikrobiyal hücreden oluşur (Şekil 2-1) (16,17). Bu bakteriler çeşitli besinlerin son sindirimleri ve bazı vitaminlerin modifikasyonu gibi insan fizyolojisi için kritik öneme sahip görevleri üstlenir (18). Ancak bağırsakta yaşayan birçok bakteri, stres ve çeşitli faktörlerin etkisi ile bağırsak bariyerini aşarak dolaşım sistemine geçerek sistemik enfeksiyonlara neden olabilir. Son dönemlerdeki çalışma verileri, etiyojisi bilinmeyen hastalıklar ile bağırsak mikrobiyotasını ilişkilendirmektedir (19).



Şekil 2-1: Gastrointestinal sistemde bulunan bakteri türleri ve bakterilerinin yerleşimi.

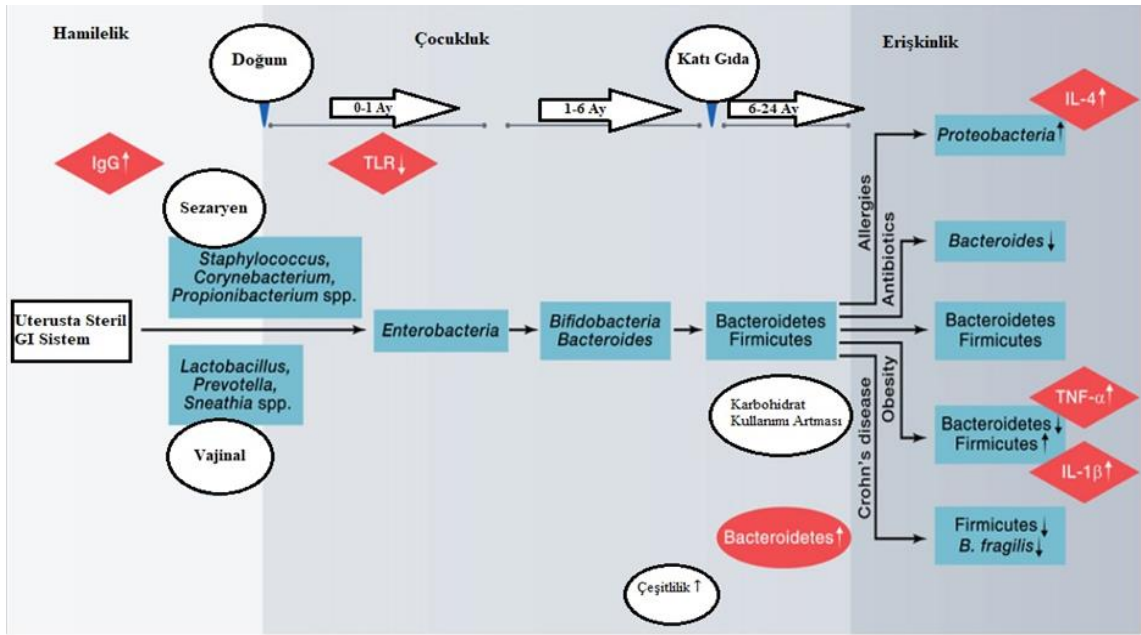
Bağırsak mikrobiyotasında yer alan tüm bakterilerin olumsuz etkileri olmamakla birlikte probiyotikler olarak tanımlanan mikroorganizma grubu sağlıklı anlamda konağa fayda sağlar. Bir organizmanın probiyotik olarak tanımlanabilmesi için; insan orijinli, non-patojenik, mide pH'ı ve safra tuzlarına dirençli, bağırsakta kolonize olabilme yeteneğine sahip ve ürettiği metabolitler ile gerek immün sistem gerekse de fizyolojik olarak olumlu katkı sağlaması gereklidir (20). Bu kriterlere göre değerlendirme yapıldığında; *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. probiyotik bakteriler olarak kabul görmektedir. In vitro yürütülen çalışmalar bu bakterilerin yararlarının sadece canlı haldeyken olmadığını, hücre kalıntılarının ve genetik materyallerinin de bağışıklık sisteminin modülasyonuna katkı sağladığı göstermiştir (21). Bu nedenle, bağırsak mikrobiyotası gelişimi, insanın sadece bebeklik dönemini değil, hayatının ilerleyen dönemlerini de direkt olarak etkilemektedir.

2.2.1. Pre-term Bağırsak Mikrobiyotasının Gelişimi

16S rRNA dizileme teknolojilerinden önce genel inanış, fetüsün rahim içinde steril ortamda bulunduğu ve ilk mikrobiyota oluşumunun fetal zarın yırtılması ile başladığı yönündeydi. Ancak 2014 yılında 16S rRNA'nın dizilenmesi ile yapılan çalışma ile amniyotik sıvının steril olmadığı ve fetüsün deri flora kolonizasyonunun daha rahimdeyken oluşmaya başladığını gösterilmiştir (22). Bu durum, erken doğuma sebep olan korioamniyotitin, sadece eksojen mikroorganizmalardan değil amniyon sıvısı mikrobiyotasından da kaynaklanması ile ilişkilendirilebilir. Erken doğum yapan kadınların amniyon sıvıları ve dış plaklarından alınan örneklerin 16S rRNA incelemelerinde sırasıyla *Fusobacterium nucleatum* ve *Porphyromonas gingivalis* tespit edilmesi mikrobiyota elemanlarının doğum süreci ve fetüs gelişimine etkiledikleri fikrini destekleyici niteliktedir (23). Normal sürede doğan bebeklerin plasentalarından alınan amniyotik sıvı ile mekonyum mikrobiyotası benzerlik gösterirken, *Ureaplasma* spp. kolonizasyonu gözlenen plasentaya sahip bebeklerin erken doğum ve intraventriküler kanama ile dünyaya geldikleri gösterilmiştir (24). Pre-term bebeklerde mekonyumda *Staphylococcus epidermidis* bulunma oranı sezaryen ile doğanlarda %75, vajinal yoldan doğanlarda ise %30 civarındadır (25). Bundan dolayı, amniyon sıvısı mikrobiyotası hamilelik süresini ve bebeğin sonraki hayatında sahip olacağı bağırsak mikrobiyotasını direkt olarak etkilemektedir (Şekil 2-2).

GIS mikrobiyotası doğumda steril olmakla birlikte mikrobiyotanın oluşma süreci; maternal kolonizasyon, doğum şekli, gebelik süresi, ilk enteral beslenmenin içeriği, anne sütünü emme yolu ile alma ve antibiyotik maruziyeti gibi birçok çevresel faktörlerden etkilenir (26,27). Anne sütünün nispeten pH dengeleyici etkisi ile birlikte asidik mide ortamını aşan bakteriler bağırsaklara yerleşerek ilk kolonizasyonu gerçekleştirir. Yapılan bir çalışmada, sağlıklı erişkinlerde GIS mikrobiyotasını oluşturan bakterilerin 10^{14} sayısına erişebileceğini gösterilmiştir (2).

Pre-term bebeklerin mekonyum mikrobiyotalarında bakteriyel çeşitlilik full-term bebeklere göre düşüktür. Bu çeşitlilik, yaşamın ilerleyen dönemlerinde beslenme ve çevresel faktörlerin etkisiyle artış gösterir. *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp. erken dönemdeki baskınlığı, *Enterobacteriaceae* baskınlığına dönüşür. *Clostridium* spp., *Veillonella* spp. full-term bebeklere kıyasla pre-term bebeklerde geç ortaya çıkar. Ancak *Veillonella* spp.'nin 27 haftadan küçük doğan aşırı pre-term bebeklerin mekonyumlarında görüldüğü de literatürde belirtilmiştir (25,28-30).



Şekil 2-2: Mikrobiyotanın gelişim süreci (1'den değiştirilerek). Yenidoğanın gastrointestinal sistemi doğuma kadar sterildir, ancak doğum şekline bağlı olarak kolonizasyon başlar. İlk kolonizasyonun daha kararlı ilerlemesi, hayatın ilk dönemlerinde tool-like reseptör (TLR) sayısının azalmasıyla mümkündür. Beslenme formülasyonunun değişmesiyle mikrobiyal çeşitlilik artar ve bağışıklık sistemi kommensal-patojenik mikroorganizmaları ayırt etme konusunda eğitilir. 3 yaştan sonra ise çoğunlukla Pseudomonadota ve Bacteroidetes bulunur, ancak çeşitli hastalıklar ve çevresel koşulların etkisiyle değişen mikrobiyota çeşitliliği vardır.

Staphylococcus spp. ve *Enterococcus* spp. gibi fakültatif anaeroplara ilk hafta içinde bağırsakta kolonize olmaya başlar. Bu tür bakteriler tarafından oksijen tüketimi, bağırsaktaki redoks potansiyelinde bir düşüşe neden olur, bu durum *Bifidobacteria* spp., *Bacteroides* spp. ve *Clostridium* spp. gibi anaeroplara kolonize olmasına destek sağlar (31). Kolonizasyon için tek etken bağırsak içi mikrobiyota üyeleri olmayıp, eksternal çeşitli faktörler de süreci etkilemektedir. Anne sütü ile beslenen bebeklerde formüle mama ile beslenen bebeklere kıyasla daha yüksek *Bifidobacterium* spp. kolonizasyonu görülür (32). Pre-term bebekler, full-term bebeklere kıyasla daha az tür çeşitliliği ve nispeten daha düşük *Bifidobacterium* spp. insidansı, daha az genel bakteri sayısı ve daha yavaş kolonizasyon oranlarına sahiptir. Batılı ülkelerde doğan bebekler, gelişmekte olan ülkelerde doğanlara göre daha geç bakteri kolonizasyonuna ve daha az *Bifidobacterium* spp.'ye sahiptir. Bu durum, hijyen gibi çevresel faktörlerin full-term bebekler için de önemli olduğunu düşündürür (28). Yenidoğan bakımının (küvözlerde bakım, katı hijyen ve antibiyotik kullanımı vb.) bağırsak mikrobiyotası oluşumu üzerindeki tek başına etkilerini göstermek ise zordur.

2.2.2. Bağırsak Mikrobiyotasının Bileşenleri

GI mikrobiyota kompozisyonu hakkında bilinenler, moleküler sistemlerin keşfi öncesi dönemlerden oldukça farklıdır. Bağırsak mikrobiyotasında yer alan ancak kültür ile tespit edilemeyen türlerin tespitleri için 16S rRNA geninin NGS yöntemleri kullanılarak araştırılması ile 3 milyondan fazla bakteriyel genden oluşan katalog oluşturulmuştur (4). Bu katalogda yer alan deoksiribonükleik asit (DNA) verileri kullanılarak yapılan filogenetik analizlerde, bağırsak mikrobiyotasında yer alan bakterilerin %90'dan fazlasının Bacillota (*Clostridium* spp., *Faecalibacterium* spp., *Roseburia* spp., *Ruminococcus* spp., *Eubacterium* spp.), Pseudomonadota (*Escherichia* spp.) ve Bacteroidota'ya (*Bacteroides* spp., *Prevotella* spp.) dahil bakterilerden oluştuğu görülmüştür. Nispeten daha az oranda Actinomycetota'dan (*Bifidobacterium* spp.) önemli türler ile birlikte; *Lentisphaerae* spp., *Synergistetes* spp., *Planctomycetes* spp., *Tenericutes* spp., *Deinococcus* spp., *Thermus* spp. gibi izole edilmesi zor ya da özel gereksinimlere ihtiyaç duyan cinslerin de yer aldığı görülmüştür. Ökaryotik mikroorganizmalardan *Candida* spp. baskın şekilde bulunmaktadır (33-35).

Hayatın ilk dönemlerinde anne sütü alımı ve diğer faktörlerin etkisi ile Bifidobacteriales ve Coriobacteriales üyeleri yaygınken, Actinomycetotales üyeleri bu iki takıma göre daha az oranda bulunur (8). Actinomycetotales üyelerinin G-C oranının yüksek olması ve hücre zarının parçalanarak genetik materyalin yeterli ve sağlıklı şekilde elde edilmesinin güç olması, bu oranın az olması ile ilişkilendirilebilir.

2.2.3. Mikrobiyota Oluşumunu Etkileyen Faktörler

2.2.3.1. Hamilelik Süreci

Hamile kalma gününün tam olarak tespiti mümkün olmadığından, hamilelik süreci genellikle tahmin edilmektedir. Bebekler, normal şartlarda 37 ve sonraki haftalarda doğar ve full-term bebekler olarak isimlendirilir. Bu süreden önce doğan bebekler pre-term olarak isimlendirilirler. Pre-termlik olgusu erken pre-term (32 hafta ve öncesinde doğanlar) ve geç pre-term (32-37 hafta arası doğanlar) olarak ikiye ayrılır (36,37).

Doğum ağırlıklarında fizyolojik nedenlerden dolayı normal olarak kabul edilebilen tam bir değer bulunmamaktadır. Bir bebeğin doğum ağırlığı, doğumdan sonra kaydedilen ilk ağırlıktır ve ideal olarak doğumdan sonraki ilk saatlerde, doğum sonrası önemli bir kilo kaybı meydana gelmeden önce ölçülür. Düşük doğum ağırlığı terimi,

gebelik yaşına bakılmaksızın <2500 gr ağırlığı ifade eder. Ağırlıkları 1500 gr'dan düşükse çok düşük doğum ağırlıklı, 1000 gr'dan azsa aşırı düşük doğum ağırlıklı olarak adlandırılırlar. Düşük doğum ağırlığı; erken doğum, intrauterin büyüme veya her ikisinin bir sonucu olarak meydana gelebilir (38,39).

Doğum yaşı, yenidoğan mikrobiyotasını etkileyen ana faktörlerden biridir. Amniyon sıvısının sahip olduğu DNA konsantrasyonu ile hamilelik süresi arasındaki ilişkinin gösterilmesi ve mekonyum mikrobiyotasının amniyotik sıvı mikrobiyotası ile benzer karakterde olması, intrauterin ortamın fetal bağırsak mikrobiyotasını direkt olarak etkilediğini göstermektedir (40). Full-term bebeklerin bağırsak mikrobiyotasının yaklaşık 3 yıl sonucunda daha kararlı hale geldiği düşünüldüğünde pre-term bebeklerin bağırsak mikrobiyotası gelişimlerinin full-term bebeklere göre daha fazla etkilenir.

Pre-term bebeklerde bağırsak mikrobiyotasının full-term bebeklere göre daha az gelişmiş olması, immün sistemin full-term bebeklere göre daha az gelişmesine neden olur (41). Yaşamının ilk günlerini küvezde geçiren ve yaşam desteği alan yenidoğanlarda Gram negatif bakterilerin kolonizasyon potansiyeli yüksektir. Sepsis gelişme ihtimalini ortadan kaldırmak için, yüksek oranda antibiyotik kullanılması gerektirmekte, sonuç olarak erişkin benzeri mikrobiyotaya geçiş sürecini uzamaktadır (42). Pre-term 52 bebek üzerinde, doğum ağırlığı, doğum şekli, antibiyotikler ve beslenmeden bağımsız olarak yapılan araştırmada, 18 bebekte *Bifidobacterium* spp. kolonizasyonunun full-term bebeklere göre daha uzun sürede (33. haftadan sonra) oluşmaya başladığı gösterilmiştir. Bu çalışmayla, gebelik yaşının, *Bifidobacterium* spp. kolonizasyonunun zamanlamasını etkileyen ana faktör olduğunu gösterilmiştir (43).

2.2.3.2. Doğum Şekli

Yenidoğan mikrobiyota gelişimi için ilk viraj, doğum şeklidir. Vajinal yoldan doğan bebeklerde ilk mikrobiyota profili ile vajinal mikrobiyota benzerlik göstermektedir. Sezaryen doğumdan sonraki fetal mikrobiyota ise annenin kutanöz mikrobiyotası, doğum ekibinin mikrobiyotası, tedavi süresince kalınan hastane ortamı ve eğer varsa diğer bebeklerin mikrobiyotaları ile benzer profil sergilemektedir (44). Normal yolla doğan bebekler, vajinal orijinli *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Escherichia/Shigella* ve *Parabacteroides* ile kolonize olur. Bu bakteriler, fetüsün ilk bağırsak mikrobiyota kolonilerini oluşturur. Sezaryen ile doğan bebeklerin mikrobiyota bileşenleri temelde annenin deri mikrobiyotası ile doğumu gerçekleştiren ve ilk

kontrolleri yapan ekibin mikrobiyotasında yer alabilen *Enterobacter hormaechei*, *Haemophilus parainfluenzae*, *E. faecalis* ve *Streptococcus australis* açısından daha baskındır (1). Bu veri, normal yolla doğan bebeklerde *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Lactobacillus* spp. ve *Prevotella* spp. baskın iken sezaryen ile doğan bebeklerde *Staphylococcus* spp., *Corynebacterium* spp. ve *Propionibacterium* spp. bakımından daha baskın olduğunun gösterilmesi ile desteklenmiştir. Ayrıca vajinal yoldan doğan bebeklerde *Clostridioides difficile* (*C. difficile*) kolonizasyonu daha az oranda olduğu görülmektedir (44,45).

2.2.3.3. Beslenme Tipi

Anne sütü içeriği bireyden bireye farklılık gösterse de genel itibarıyla oligosakkaritler, vitaminler ve mineraller bakımından oldukça zengindir. Anne sütü ile beslenen yenidoğanların dışkı örneklerinin 16S rRNA temelli analizlerinde *Bifidobacterium* spp. baskınken, formüle mama ile beslenen yenidoğanlarda *C. difficile*, *Bacteroides* spp. ve *C. perfringens*'in baskın olduğu görülmüştür (46). *C. difficile*'nin baskın olduğu yenidoğanlarda egzama gelişme riskini artırdığı, T_{reg} hücre yanıtını etkilediği, bağırsak geçirgenliğini artırdığı ve toksin üretimini artırarak normalde zararsız antijenlere karşı duyarlılığında artışa neden olduğu bildirilmiştir (47,48). Tüm bu verilerin aksine, anne sütünden kesilmenin bağırsak DNA çeşitliliğini artırdığına dair verilerin olması, beslenme tiplerinin bağırsak mikrobiyotasının oluşumu ve gelişimi üzerine etkisini göstermektedir (49).

2.2.3.4. Hastanede Kalış Süresi

Hastane ortamının rolü sezaryen ile doğan ve annenin vajinal mikrobiyotasına maruz kalmayan bebekler için daha önemlidir. Doğumdan sonra yoğun bakım servisine yatırılan bebekler, çapraz bulaş nedeniyle serviste yatan diğer bebekler ile benzer bağırsak mikrobiyotasına sahiptirler (50). *C. difficile* taşıyıcı yoğun bakım servis çalışanı kaynaklı çapraz bulaş, birinci haftada %27, dördüncü haftada %78 ve yedinci haftadan itibaren tüm servis genelinde yatan yenidoğanlarda görülebilir (51).

2.2.3.5. Antibiyotik Kullanımı

Doğum öncesinde, annenin 18 saati aşmayan antibiyotik kullanımı, B grubu streptokokların ve *Lactobacillus* spp.'nin vertikal geçişlerini anlamlı şekilde azaltırken, yaşamın ilk 3 ayında ise *Bacteroides* spp. ve *Parabacterioides* spp. miktarlarında

azalma, Pseudomonadota'da göreceli bolluk artışına neden olmaktadır (52, 53). Full-term bebeklerde antibiyotik kullanımı Actinomycetota ve Bacteroidota oranında düşüşe ve *Enterobacteriaceae* artışına; düşük doğum ağırlığına sahip pre-term bebeklerin mekonyum örneklerinde *Bacteroidaceae* oranının azalmasına, yaşamın ileri günlerinde ise *Enterobacteriaceae* oranında anormal şekilde artışına neden olur (54).

Antibiyotik kullanımı sadece mikrobiyotayı oluşturan bakteri sayısında azalma yapmazken, antibiyotiklere maruz kalan pre-term bebeklerde kısa zincirli yağ asitleri, asetat, propiyonat ve bütirat gibi mikrobiyal metabolitlerin düzeylerinde azalmaya neden olur (55). Yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, antibiyotiklerin yeni oluşmaya başlayan mikrobiyota üzerinde kısa ve uzun vadede etkili olarak disbiyosise neden olup bağışıklık tepkilerinin düzenlenmesi de dahil olmak üzere birçok sistemin fizyolojik gelişimini etkilediğini göstermiştir (56).

2.2.3.6. Prebiyotik, Probiyotik ve Simbiyotik Kullanımı

Bifidobacterium spp. ve *Lactobacillus* spp. probiyotik bakteriler olarak bilinir ve patojen bakterin bağırsak lümenine kolonize olmasının engellenmesinde rol alırlar (50). Ayrıca probiyotik mikroorganizmalara ait metabolitlerin nekrotizan enterokolit gibi bağırsak hastalıklarını önleme potansiyelleri de vardır (57). Anne sütü, içerdiği yüksek oranda *Bifidobacterium* spp., fosfor, laktoferrin ve oligosakkaritler nedeniyle bilinen etkili probiyotik ve prebiyotik olarak bilinmektedir (58). Anne sütünde yer alan oligosakkaritler mikrobiyotada yer alan bakteriler için substrat olarak görev alırken, patojenlerin hücre yüzeyi glikan reseptörlerine bağlanmalarını önleyerek de enfeksiyonları engeller (59). Simbiyotikler ise probiyotikler ve prebiyotiklerin sinerjik etkileşimleri sonucunda ortaya çıkar (50). Anne sütü ile beslenen yenidoğanların ağız ve dışkı örneklerinin 16S rRNA temelli analizlerinde, meme derisinde bulunmayan ancak anne sütünde ve meme aerolasında bulunan Lactobacillales üyelerinin yenidoğanlarının ağız ve dışkısında bulunduğunu gösterilmiştir (60). Bu veriler, sadece anne sütünün bile yenidoğan bağırsağı mikrobiyota oluşumuna katkı sağladığını göstermektedir.

2.2.3.7. Bebeklere Uygulanan Antibiyotiklerin Mekonyum Mikrobiyotasına Muhtemel Etkisi

Profilaksi veya tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklerin insan bağırsak mikrobiyotasında bulunan bakterilere karşı muhtemel etkisi Tablo 2-1’de gösterilmiştir (62).

Tablo 2-1: Bebeklerde kullanılan antibiyotiklerin bakterilere karşı etkisi.

Kullanılan Antibiyotik	Antibakteriyel etkisi
Penisilinler: P (G, V)	Bacillota: <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Clostridium</i> (P-V), <i>Peptoniphilus</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Peptostreptococcus</i> Pseudomonadota: <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Pasteurella</i> , Spirochaetes: <i>Treponema pallidum</i> , <i>Borrelia</i> Actinomycetota: <i>Actinomyces</i> , <i>Cutibacterium acnes</i> (P-G) Fusobacteriota: <i>Fusobacterium</i> Bacteroidota: <i>Prevotella</i> spp.
AMP (aminopenisilin)	Bacillota: <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Clostridium</i> (P-V), <i>Peptoniphilus</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Peptostreptococcus</i> Pseudomonadota: <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Pasteurella</i> , Beta-laktamaz negatif <i>H. influenzae</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> Spirochaetes: <i>Treponema pallidum</i> , <i>Borrelia</i> Actinomycetota: <i>Actinomyces</i> , <i>Cutibacterium acnes</i> (P-G) Fusobacteriota: <i>Fusobacterium</i> Bacteroidota: <i>Prevotella</i> spp.
Piperasilin (ureidopenisilin)	Bacillota: <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Clostridium</i> (P-V), <i>Peptoniphilus</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Peptostreptococcus</i> Pseudomonadota: <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Pasteurella</i> , Çoğu <i>Enterobacteriaceae</i> ve <i>P. aeruginosa</i> Spirochaetes: <i>Treponema pallidum</i> , <i>Borrelia</i> Actinomycetota: <i>Actinomyces</i> , <i>Cutibacterium acnes</i> (P-G) Fusobacteriota: <i>Fusobacterium</i> Bacteroidota: <i>Prevotella</i> spp.
Beta-laktam/Beta laktamaz inhibitörü SAM	Bacillota: <i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Clostridium</i> (P-V), <i>Peptoniphilus</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Peptoniphilus</i> , beta laktamaz üreten suşlarda da etkilidir Pseudomonadota: <i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Pasteurella</i> , beta laktamaz üreten suşlarda da etkilidir Çok dirençli antibiyotiklere dirençli olan <i>Acinetobacter</i> spp. etkilidir. Spirochaetes: <i>Treponema pallidum</i> , <i>Borrelia</i> spp. Actinomycetota: <i>Actinomyces</i> , <i>Cutibacterium acnes</i> (P-G) Fusobacteriota: <i>Fusobacterium</i> spp. Bacteroidota: <i>Prevotella</i> spp.,

Piperasilin Tazobaktam	SAM gibi,+ Pseudomonadota: <i>P. aeruginosa</i> Bacteroidota: <i>B. fragilis</i> 'e, etkilidir
Sefemler: CTX	Bacillota: <i>Streptococcus spp.</i> 'ye çok, <i>S.aureus</i> 'a orta etkili ve enterokoklara etkisiz Pseudomonadota: Gram negatif bakterilere karşı ikinci kuşak sefalosporinlere göre daha etkilidir. <i>Pseudomonas</i> 'a etkisizdir.
Penemler: IMP, MEM	Bacillota: Aerop ve anaerop bakteriler dahil çoğuna etkilidir ancak ertapenem <i>Enterococcus</i> 'a etkisizdir. MEM, <i>Bacteroides spp.</i> , <i>Prevotella spp.</i> , <i>Clostridium perfringens</i> etkilidir. Pseudomonadota: Çoğuna etkilidir. Ancak ertapenem <i>Acinetobacter</i> ve <i>P. aeruginosa</i> 'ya etkisizdir.
Aminoglikozit: GEN, AK	Bacillota: GEN/streptomisin beta-laktam/V ile kombine edilerek enterokok ve stafilokoklarda kullanılır Pseudomonadota: Çoğuna etkilidir. <i>P. aeruginosa</i> 'da <i>Brucella spp.</i> <i>F. tularensis</i> ve <i>Y. pestis</i> 'e etkilidir ancak tek başına kullanılmaz kombine edilerek kullanılır. Actinomycetota: <i>Nocardia</i> (AK), bazı <i>Mycobacteria</i> etkilidir. Anaerop bakterilere etkisizdir.
Folat inhibitörleri Sulfanamid, trimetoprim, SXT	Bacillota: Stafilokoklara MRSA dahil orta etkili ve <i>Listeria</i> , etkili, A grubu streptokok ve enterokoklara etkisizdir Pseudomonadota: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>H.influenzae</i> , <i>Moraxella catarhalis</i> , ve <i>Stenotrophomonas</i> etkili ancak <i>P.aeruginosa</i> 'ya etkisizdir. Actinomycetota: <i>Nocardia</i> etkilidir. Ascomycota (mantar): <i>Pneumocystis jiroveci</i> etkilidir.
Glikopeptidler: V, TEC	Bacillota: Stafilokok MRSA dahil, enterokok, <i>S. pneumoniae</i> , <i>C. difficile</i> , <i>Clostridium perfringens</i> etkilidir, ancak <i>Lactobacillus</i> , <i>Actinomyces</i> , Gram negatiflere, VRE etkisizdir. Actinomycetota: <i>Cutibacterium acnes</i> etkilidir.
Kinolonlar: LEV	Bacillota: Stafilokok, <i>S. pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> Pseudomonadota: <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>Moraxella catarhalis</i> , <i>Legionella</i> Chlamydiae: <i>Chlamydia pneumoniae</i>

2.2.4. Bağırsak Mikrobiyotasının Sağlıktaki Rolü

Konak bağırsak mikrobiyotası ile bağışıklık sistemi kesintisiz bir süreç ile ilişki içindedir. Bağırsak mikrobiyotası ile insan arasındaki bu simbiyotik ilişkide, insan mikroorganizmalar için besleyici, dengeli sıcaklıkta, anaerobik ortam sağlarken; mikroorganizmalar metabolik süreçlerin iyileştirilmesine, besinlerden enerji üretimi ve esansiyel bileşiklerin sentezine yardımcı olur. Ayrıca hücre çoğalması/farklılaşması ve apoptoz süreçlerinde de rol alırlar (62). Bağırsak histolojisi göz önünde bulundurulduğunda mukozada kolonize olan mikrobiyota üyesi bakteriler enterik patojenlerin lümen hücrelerine bağlanmasını engelleyerek (63), lümen florası ile ortak metabolitler için rekabet ederek (64), intraluminal pH'ı düşürerek ve bu patojenik

mikroorganizmalara karşı spesifik bakteriosinler üreterek enteropatojenlerin büyümesini inhibe ederek etki ederler (65). Ayrıca primitif bakteriler, intraluminal ortamda çeşitli metabolik yollarında rol alarak, hayat boyunca enfeksiyonlara karşı verilen immünolojik yanıtı etki ederler (Tablo 2-2) (66,67).

Tablo 2-2: Bağırsakta yer alan kısa zincirli yağ asidi üreten gruplar ve substratları

Asetat	Propionat	Butirat	Laktat
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Clostridia</i>	<i>Bifidobacterium</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Propionobacter</i>	<i>Eubacteria</i>	<i>Bacteroides</i>
<i>Eubacteria</i>	<i>Velionella</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Peptostreptococcus</i>
<i>Lactobacilli</i>		<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
<i>Clostridia</i>		<i>Buytrivibrio</i>	<i>Eubacteria</i>
<i>Ruminococcus</i>			<i>Ruminococcus</i>
<i>Peptostreptococcus</i>			<i>Actinomyces</i>
<i>Velionella</i>			<i>Fusobacterium</i>
<i>Fusobacterium</i>			<i>Enterococcus</i>
<i>Buytrivibrio</i>			<i>Clostridia</i>

Sindirim sistemi, mideden anüse doğru uzandığında ortam şartları asidikten baziğe doğru döner. Midenin asidik ortamı bakterilerin kolonizasyonuna engel olur, bu şekilde birçok intestinal enfeksiyon için ilk bariyer oluşturulmuş olur (68). Besinlerin etkisi ile asidik mide ortamından geçen bakteriler, yenidoğan ince bağırsağında kolonize olarak gram başına 10^{12} bakteri düşecek sayıda çoğalabilirler (9). Kolonda ise yerleşik bakteri sayısı mukus tabakası nedeniyle ince bağırsaktaki çeşitlilik ve sayıya oranla daha düşük ve stabil haldedir. İnce bağırsaktan farklı olarak kolonda anaerobik bakteriler, fakültatif anaeroblara oranla 100 kata kadar fazla yer alarak kolonda fakültatif bakterilerin çoğalmasını engeller ve birçok patojen mikroorganizma kolonizasyona ve hastalığa karşı doğal bağışıklık sağlarlar (69).

2.2.5. Bağırsak Mikrobiyotasının Hastalıklardaki Rolü

Tıbbi imkân ve metotların gelişmesi ile birlikte dünya genelinde hastalıkların neden olduğu ölüm oranlarında azalmalar görülse de özellikle astım ve alerji gibi immünolojik patolojilerde artışlar görülmektedir. İlk dönemlerde, alerjik hastalıklar hijyen önlemlerinin artırılması amacıyla kullanılan maddeler ile ilişkilendirilse de son dönemde özellikle çocuklarda görülen inflamatuvar bağırsak hastalıklarında ciddi şekilde artışlar izlenmektedir (70). Bağırsak mikrobiyotasında yer alan bakterilerin immün sistem hücrelerinin farklılaşması üzerindeki etkileri düşünüldüğünde bu tip alerjik ve immün sistem kaynaklı hastalıkların gelişmesinde etkin rolü olduğunu düşündürür. Hijyen hipotezi olarak adlandırılan bu kuram, özellikle, T_{helper} (T_h) hücre

farklılaşmasının T_{h2} yönünde baskın olması alerjik hastalıkların insidansındaki artış ile bağdaştırırken, T_{h2} 'deki artışın da T_{h1} kaynaklı hastalıkların azalmasına neden olabileceğini öne sürmektedir (70). Ancak sadece hastalık nedenlerinin hijyen temeli üzerine kurulması da çok nitelikli değildir. Yapılan veri analizlerinde pre-term bebeklerde Crohn ve nekrotizan enterokolit insidansındaki artış, durumun sadece hijyen ile bağdaştırılamayacak kadar karmaşık olduğunu göstermiştir (70). Bağırsak mikrobiyotasında yer alan bakteriler, safra asitlerini sekonder safra asitlerine metabolize ederek kardiyovasküler hastalık riskini artırabilirler (5). *Lactobacillus plantarum* naklinin kalp krizini %29 oranda azalmasına, aterosklerotik plaklarda bakteri gDNA'sına rastlanılması ve bu plaklarda gözlenen bakteriyel taksonların aynı bireylerin bağırsaklarında da tespit edilmesi, direkt olarak hastalık ile bağırsak mikrobiyotasının ilişkilendirilmesine olanak sağlamaktadır (Tablo 2-3) (1, 71).

Bağırsak mikrobiyotası beyin ile de sıkı ilişki içerisindedir. Mikrobiyota gelişimi süresince meydana gelen anormalilerin, depresyon, anksiyete ve otizm gibi birçok mental hastalık ile ilişkisi bulunmaktadır (72). Fareler üzerinde yapılan çalışmada, steril farelerin daha aktif motor aktivitesi ve daha az kaygısal davranış sergiledikleri gösterilmiştir. İlginç şekilde, patojen bakterilerden arındırılan dışkının steril fareye nakli sonrasında davranışlarının donör ile benzer şekle büründüğü görülmüştür (73). Bu durum, hijyen hipotezinin aksine, hastalıkların, genetik olarak duyarlı bireyler ile çevresel faktörler arasındaki etkileşimlerin ürünü olduğu, bunun da immün düzensizliğe ve klinik hastalığa neden olduğunu göstermektedir (1).

Tablo 2-3: Bağırsak mikrobiyotasındaki değişimlerin hastalıklarla ilişkileri.

Hastalık	Mikroorganizma/Değişimi	Etki
Alerji	<i>Lactobacillus spp.</i> ↓	Erken dönemdeki kolonizasyonun alerjik hastalık riskinde azalma
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ↓	
	<i>Clostridioides difficile</i> ↓	
	<i>Helicobacter pylori</i> ↓	<i>H. pylori</i> toleransı T_{reg} hücreleri ile astımı baskılama
Çölyak Hastalığı	<i>Bacteroides vulgaris</i> ↑	Kontrollere kıyasla Çölyak hastalarında daha yüksek çeşitlilik
	<i>Escherichia coli</i> ↓	
	<i>Clostridium coccoides</i> ↓	
Astım	Bacteroidota ↑	Astımlı çocukların dışkı örneklerinde bakteriyel çeşitlilik kontrol grubuna göre daha yüksek
	Pseudomonadota ↑	
	Actinomycetota ↓	
	Bacillota ↓	
Anoreksia	<i>Methanobrevibacter smithii</i> ↑	Hasta grubunda anlamlı şekilde yüksek
Obezite	Bacteroidota ↓	Obez bireylerde bağırsak mikrobiyota formasyonunda daha sık değişimi
	<i>Lactobacillus</i> ↑	
	Bacillota/Bacteroidota oranı ↓	
	<i>Methanobrevibacter smithii</i> ↓	
Crohn Hastalığı	<i>Bacteroides ovatis</i> ↑	Sağlıklı bireylere göre çeşitlilik daha az
	<i>Bacteroides vulgaris</i> ↑	
	<i>Bacteroides uniformis</i> ↓	
Tip 2 Diyabet	Bacillota ↓	Plazma glikoz konsantrasyonundaki artışla ilişkili bağırsak mikrobiyotasındaki değişimler
	Clostridia ↓	
	Betaproteobacteria ↑	
	Bacteroidota/Bacillotas oranı ↑	
	<i>Bacteroides-Prevotella</i> ↑	
	<i>Clostridia coccoides-Eubacterium rectale</i> ↓	

2.2.5.1. Nekrotizan Enterokolit

Nekrotizan enterokolit (NEC), yenidoğanlarda gözlenen en yaygın patolojik durumdur. Mikrobiyota gelişimi, doğum şekli, beslenme ve hamilelik yaşı gibi çeşitli faktörlere bağlı olduğu için yenidoğandan yenidoğana kolonizasyon süresi ve yoğunluğu değişiklik göstermektedir. Uterus, steril olduğu ve fetus tüm ihtiyaçlarını kordon vasıtasıyla anneden karşıladığı için doğumdan önce NEC gelişmez (74). NEC gözlemlenen vakaların %90'ı <33 haftalık gebelik süresi ve 1500 gr'dan düşük doğum ağırlığı olan pre-term bebeklerdir. Bu tip çok düşük doğum ağırlığına sahip bebeklerde görülme insidansı %3-7'lere kadar çıkarken, 1000 gr'dan daha düşük doğum ağırlığına sahip bebeklerde bu oran %10 civarındadır (75).

NEC gelişimi farklı birkaç organizma ile ilişkili olabilir. Neonatal dışkı örneklerinin metagenomik incelemelerinde NEC gelişmeden önce *Clostridia*, *Enterobacter* spp. ve koagulaz negatif stafilokok (KNS), *Salmonella* ve *E. coli*'nin anormal şekilde kolonize olabileceği gösterilmiştir (76). Birçok pre-term bebek hayatının ilk evrelerinde intra-venöz antibiyotik almasına rağmen NEC gelişimi gözlenebilir. Gebelik haftası 24 ile 33 haftalar arasında kalan ve 7 gün içerisinde doğum riski olan gebelere antenatal kortikosteroid uygulamasının da NEC insidansını belirgin şekilde azalttığı gösterilmiştir (77).

2.2.5.2. İnflamatuvar Bağırsak Hastalığı (IBH) ve Crohn Hastalığı

Bağırsaklarda bulunan farklı bakteri suşları, farklı bireylerde aynı koruyucu, immünolojik ve metabolik aktiviteleri gerçekleştirir, bu da IBH'de inflamatuvar yanıtı önleyebilir veya uyarabilir. Aktif şekilde IBH olan bireylerde hastalık nüksetmeden önce *C. difficile*, *Bacteriodes vulgates* ve *E. coli* gibi patojenik türlerin sayısının artmakta, *Clostridium leptum* (*C. leptum*) ve *Bifidobacterium* spp. gibi kommensallerin sayısı azalmaktadır (78,79). Bu durum, mevcut mikrobiyota yapısının değişmesini, bu değişikliğe bağlı olarak ortaya çıkan metabolitler de hastalık gelişmesini tetikler. Crohn hastası bireylerin dışkı örneklerinin metagenomik analizlerinde bütirat üreten türlerin mikrobiyotadan elendikleri görülmüştür (80). Bu veriler, sadece bakteri popülasyonundaki değişikliklerin değil aynı zamanda metabolitlerde meydana gelen değişikliklerin de hastalık sürecinde rol oynadığı göstermektedir.

2.2.6. Mekonyum Mikrobiyotası

Mekonyum mikrobiyotası, insanın parmak izi gibi kişiye özgü ve benzersizdir. Yaşamın ilerleyen herhangi bir dönemine ait dışkı örneklerinden de farklılık gösterir. 16S rRNA temelli analiz sonuçlarına göre mekonyumun steril olmayıp amniyon sıvısı ile benzer mikrobiyal yapıda olduğu ve mekonyum mikrobiyotasının gebelik yaşı, doğum öncesi antibiyotik kullanımı ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır (54). NGS yöntemleri ile full-term bebeklerin mekonyumlarının analizinde *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., ve *Shigella* spp. cinslerine ait DNA kalıntılarına rastlanmıştır. Ancak mekonyum bileşimleri bireysel olarak geliştiğinden, standart bir mekonyumun mikrobiyal içerikleri tam olarak bilinmemektedir (81,82).

Mekonyum içeriği doğum şekli başta olmak üzere çeşitli faktörlerden etkilense de aksi fikir olarak doğum şeklinin etkisinin olmadığını gösteren veriler de bulunmaktadır (83,84). Gebelik yaşı da mekonyum şekillenmesi ile direkt ilgilidir. Pre-term mekonyumda daha düşük toplam bakteri sayısı, azalmış *Bacteroidaceae* ve yüksek *Lactobacillaceae* oranı gösterilmiştir. Laktobasillerin oranındaki bu yükselme kısa hamilelik nedeni ile mikrobiyotanın tam olarak gelişmemesi ile ilişkilendirilmektedir (54). İlginç şekilde, taramalı elektron mikroskobu ve 16S rRNA temelli yöntemler kullanarak mekonyum ve subepitelial bölgenin incelenmesinde koklar ile morfolojik ve orantılı olarak tutarlı olan, sıkı bir şekilde paketlenmiş hücresel yapı kümeleri ile ayrı ayrı izole edilmiş mekonyum cepleri olduğunu gösterilmiştir (85). Birbiriyle karşıt olan bu veriler mekonyumun ne kadar karmaşık yapı içinde olduğunu göstermektedir.

2.3. Bağırsak Mikrobiyotası Çalışma Yöntemleri

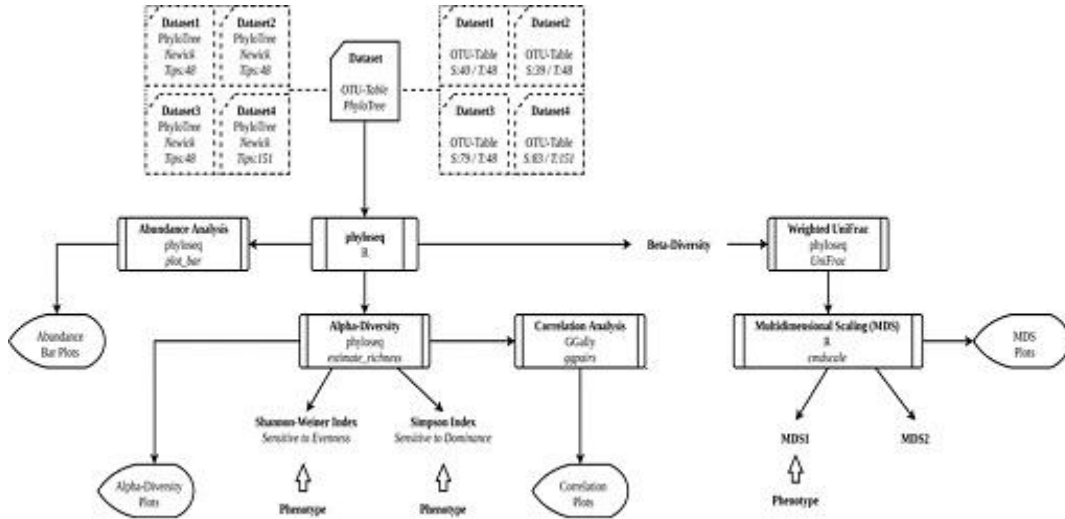
2.3.1. Terminoloji

Bu tezde, mikrobiyota, bakteriler, arkealar, virüsler ve mantarlar dahil olmak üzere bağırsakta yer alan mikroorganizmaları tanımlarken; mikrobiyom, bu mikroorganizmaların genetik materyallerinin toplamını tanımlamaktadır (86). Disbiyoz, bağırsak mikrobiyotasını oluşturan mikroorganizma çeşitliliğinin hastalık, ilaç kullanımı ve beslenme gibi çeşitli faktörlerin etkisi ile dengesizleşmesidir. Disbiyotik mikrobiyotada, tipik olarak mikrobiyal çeşitlilikte, bütirat üreten *Bacteroides* spp. ve *Lactobacillus* spp. gibi simbiyotik bakterilerin sayısında azalma olurken, tersine patojenite potansiyeline sahip bakterilerin sayısında artış görülür (87). Probiyotikler, uygun miktarlarda verildiğinde yararlı etkileri olan mikroorganizmalar olarak tanımlanırken; prebiyotikler, yararlı bakteri türlerinin büyümesini destekleyen gıda substratlarıdır (88).

16S rRNA, tüm prokaryotik canlılarda yer alan, mutasyonlardan korunaklı 9 korunmuş bölge (C) ile yüksek değişkenlik gösteren (V) 9 bölgeden oluşan 30S ribozomal alt birimine ait gendir (89). Filogenetik işaretleyici genler olarak da bilinen bu DNA bölgesi, ilgili organizmalar için güvenilir bir filogeni oluşturmak için gereken yeterli bilgilendirici gücü içeren genom bölgelerine karşılık gelir.

Filogenetik işaretleyici genler, tüm organizmalar için evrensel değildir bu nedenle hangi genin kullanılacağına seçimi mikrobiyom çalışmasında verilen ilk kritik karardır. Her işaretleyici genin, en az birinin sıralama hedefi olarak kullanıldığı ve nadiren tüm

bölgenin tamamen dizilendiği birden fazla alt bölgesi vardır. Bu bölgelerden elde edilen ham verilerin informatik olarak işlenmesi ile birlikte Operasyonel Taksonomik Birim (OTU) denen belirli bir seviyede/oranda birbirine benzeyen bir kümeyi ya da dizi grubunu niteleyen birimler elde edilir (Şekil 2-3).

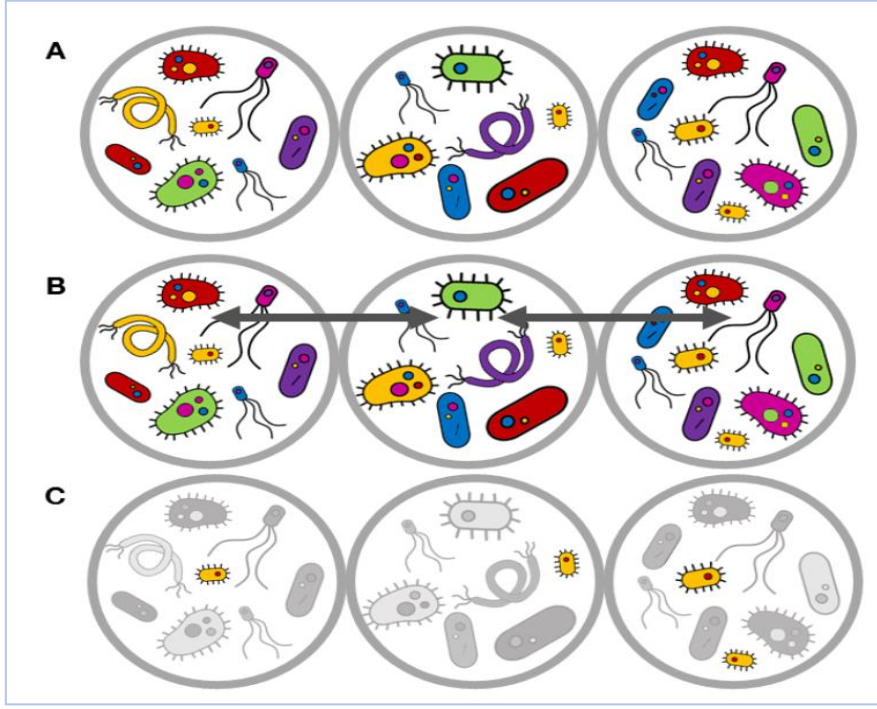


Şekil 2-3: OTU oluşturma basamakları.

OTU kümelemesi, kapalı referans, de novo ve açık referans yöntemi olarak üç farklı yolla gerçekleştirilebilir. Kapalı referans yaklaşımında girdi dizileri bir referans dizi veritabanına göre kümelenir. De novo kümelemede girdi dizileri, veri setindeki tüm diziler arasındaki ikili benzerliğe göre gruplandırılır. Açık referans yaklaşımı, kapalı referans adımının çalıştırılmasıyla başlar ve bunu kapalı referans atamasında başarısız olan dizileri kümeleyen yeni bir adım takip eder (90).

Biyoçeşitlilik, Whittaker (91) tarafından canlı mikroorganizmaların ya da onlara ait işaretleyici genlerin topluluk içindeki ya da topluluklar arasındaki değişkenliğini niteleyen ölçüm birimi olarak alfa, beta ve gama olarak üç farklı türde tanımlanmıştır. Alfa çeşitlilik tanımı tartışmalı olsa da niteliksel olarak, mevcut türlerin sayısı ve bunların düzgünlüğü ile artan belirli bir alan ya da bir örnek içindeki bir topluluğun bileşimsel karmaşıklığının bir ölçüsü olarak tanımlanabilir. Bu nedenle, belirli sayıda farklı tür için, tüm türler eşit derecede bol olduğunda alfa çeşitlilik maksimumdur. Beta çeşitlilik, örnek çiftleri arasındaki taksonomik farklılıkları vurgulamak için kullanılan çeşitliliktir. Türlerin göreceli bollukları genellikle dikkate alınmaz ve bunun yerine örneklerde hangi türlerin paylaşıldığı hangilerinin paylaşılmadığını belirlemek için varlık-

yokluk verileri kullanılır. Gama çeşitlilik, ekosistemdeki genel çeşitliliği tanımlar. Alfa ve beta çeşitlilik, mikrobiyom analizlerinde gama çeşitliliğe göre daha sık kullanılmaktadır. Biyoçeşitliliği hesaplamak için kullanılabilecek birçok matematiksel mesafe fonksiyonu/metrik vardır ancak her biri farklı uygulamalara sahiptir (Şekil 2-4) (91-93).



Şekil 2-4: Biyoçeşitliliklerin karşılaştırılması. (a) Alfa çeşitliliği (bireysel çeşitlilik) (b) Beta çeşitliliği (bireyler arası farklılık) (c) Farklılık bolluğu (taksonların karşılaştırılması) (93'ten değiştirilerek).

2.3.2. Filogenetik Taksonomi

Organizmalar, Bakteriler (Bacteria), Arkealar (Archaea), Protozoonlar (Protozoa), Cromistler (Chromista), Bitkiler (Plantae), Mantarlar (Fungi) ve Hayvanlar (Animalia) olarak 7 farklı kingdom'da sınıflandırılmaktaydı. Moleküler yöntemlerin erişilebilir ve çeşitli alanlarda uygulanması ile birlikte Carl Woese (94) tarafından moleküler seviyede organizmaların karşılaştırılması esasına dayanan genel 3 ana takson Bakteriler (Bacteria), Arkealar (Archeaea) ve Ökaryalar (Eucarya) kabul görmüştür. Bu tezde, taksonların ve mikroorganizmaların gösterilmesi için genel kabul gören Carl Woese tarafından ortaya atılan taksonomik skala kullanılmıştır. Aşağıdaki tabloda kullanılan skala ve kullanılan son ekler listelenmiştir (Tablo 2-4).

Tablo 2-4: Bu tezde kullanılan taksonomik skala.

Taksonomik Birim		Takson örneği
Phylum	-ota	Campylobacterota
Classis	-ia	Campylobacteria
Ordo	-ales	Campylobacterales
Familia	-aceae	<i>Campylobacteraceae</i>
Genus	-	<i>Campylobacter</i>
Species	-	<i>Campylobacter jejuni</i>
Subspecies		<i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>

2.3.3. Bakteriyal Kültür Yöntemi

Geleneksel kültür yöntemi ile mikrobiyota analizinde, mikroorganizmaların sadece morfolojik ve biyokimyasal özelliklerinden faydalanılmaktadır. Ancak bağırsakta yer alan mikroorganizmaların büyük kısmının anaerobik karakterde olması, özel supplement içeren besiyerleri ve ortamlara ihtiyaç duyması, kalıntı DNA parçalarının kültürlenme yöntemi ile tespit edilememesi nedeniyle bağırsak mikrobiyotası biyoçeşitliliği sınırlı olarak belirlenebilir (8). Kültüre dayalı yöntemler, bağırsak mikrobiyotasının bileşimini analiz etmek için zamansal ve mali anlamda uygun yöntemler değildir. Bununla birlikte, bakteri kültürü, bağırsak mikrobiyomunda bulunan spesifik bakterilerin canlılığı ve fonksiyonel özellikleri hakkında bilgi sağladığı için mikrobiyom çalışmalarında alternatif olarak kullanılabilir (95). Yine de insan kolonunda yaşayan bakteri türlerinin %80'inin klasik kültür metodu ile tespit edilemeyeceği tahmin edildiğinden mikrobiyota çalışmaları için çok uygun bir yöntem olarak kabul görmemektedir (96).

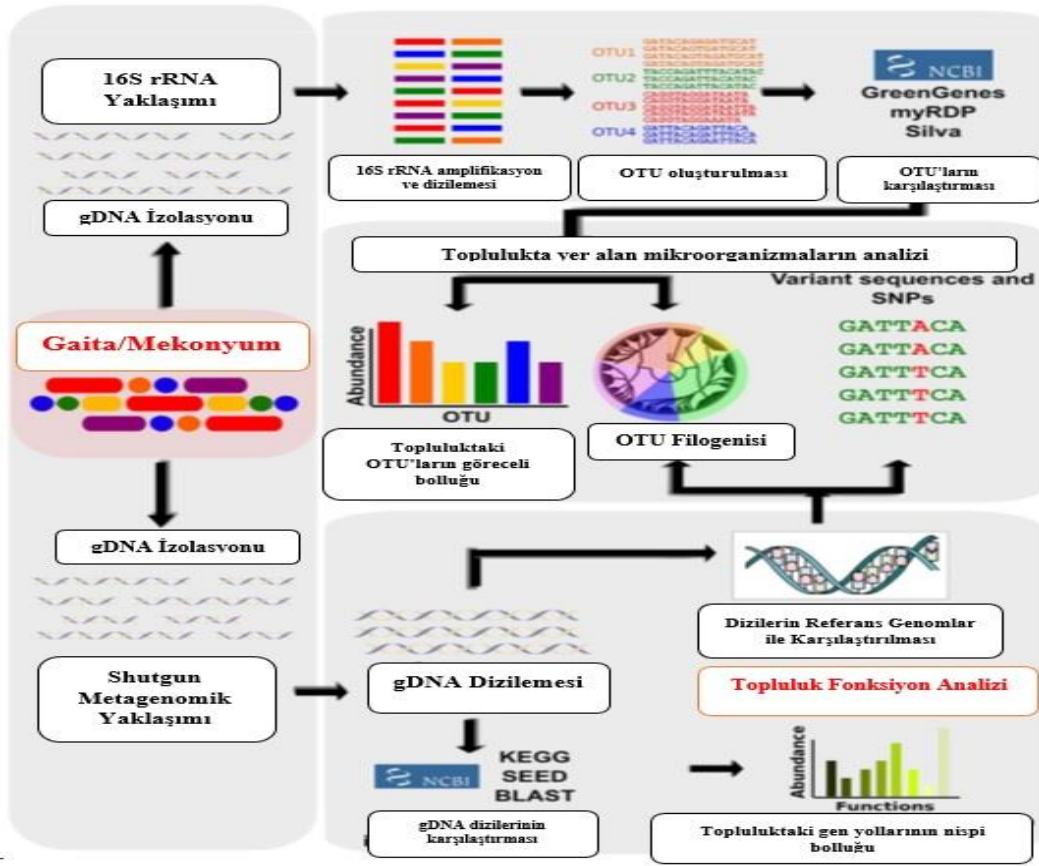
2.3.4. Yeni Nesil Dizileme (NGS) Temelli Yöntemler

NGS yöntemlerinin kullanılması ile birlikte klasik kültür yöntemleri ile göreceli olarak basit olarak algılanan bağırsak mikrobiyotasının aslında görünenden daha zengin olduğu görüldü (Tablo 2-5) (97).

16S rRNA temelli yaklaşımda, gDNA izolasyonunun ardından daha dar kapsamlı primerler kullanılarak sadece belirli bölgeler dizilenerek, referans kütüphaneler ile karşılaştırılır. Shotgun metagenomik yaklaşımında ise total DNA dizilemesi ve 16S rRNA'ya göre daha karmaşık ve maliyetli informatik analiz basamaklarını kapsar (Şekil 2-5) (98).

Tablo 2-5: NGS temelli genomik analiz metotlarının karşılaştırılması.

Metot	Avantajlar	Dezavantajlar
16S rRNA Dizilemesi	- Hızlı, basit ve ucuz numune hazırlama ve analiz - Düşük miktar ve yüksek düzeyde kontamine olmuş örnekler için uygun - Karşılaştırma için çok sayıda veri mevcut	- Canlı-ölü ayrımı yapılamaz. - Değişken bölgeler nedeniyle primer seçimleri daha detaylı olmalıdır. - Kontrol amaçlı negatif numuneler de çalışılmalıdır.
Shotgun Metagenomiks	- Mikrobiyal fonksiyonel genlerin göreceli bolluğunu doğrudan anlamaya imkân sağlar. - Bilinen organizmalar için türler ve suşlar düzeyinde mikrobiyal taksonomik ve filogenetik kimlik elde edilebilir. - Sıralanmış genomlara sahip hedef organizmalar için yerinde büyüme oranlarını tahmin edebilir. Nüfus ortalamalı mikrobiyal genomların bir araya getirilmesine izin verebilir.	- Nispeten pahalı, zahmetli ve karmaşıktır. - Konak kaynaklı DNA ve organellerden kaynaklanan kontaminasyon riski vardır. - Diğer yöntemlere göre genellikle daha fazla derinlikte dizileme gerekir. - Canlı-ölü ayrımı yapılamaz.
Omiks	- Marker gen analizi ile eşleştirildiğinde, bir topluluktaki hangi mikroorganizmaların aktif olarak transkripsiyon yaptığını tahmine imkân sağlar. - Doğası gereği aktif canlı mikroorganizmalar ile uyuyan veya ölü mikroorganizmalar ve hücre dışı DNA arasında ayırım yapar. - Dinamik bireysel varyasyonu yakalar. - Müdahale ve olay maruziyetine verilen yanıtlar dahil olmak üzere mikrobiyal aktiviteyi doğrudan değerlendirir.	- En pahalı, zahmetli ve karmaşık sistemdir. - Konak mRNA kontaminasyonu giderilmeli ve rRNA kaldırılmalıdır. - Dikkatli numune toplama ve saklama gerektirir. - Veriler, yüksek transkripsiyon oranlarına sahip organizmalara yöneliktir. - Transkripsiyon oranlarını bakteriyel bolluk değişikliklerinden ayırmak için eşleştirilmiş gDNA dizilimi gerektirir.



Şekil 2-5: 16S rRNA ve Shotgun metagenomik NGS yaklaşımlarının karşılaştırılması. (97’den değiştirilerek).

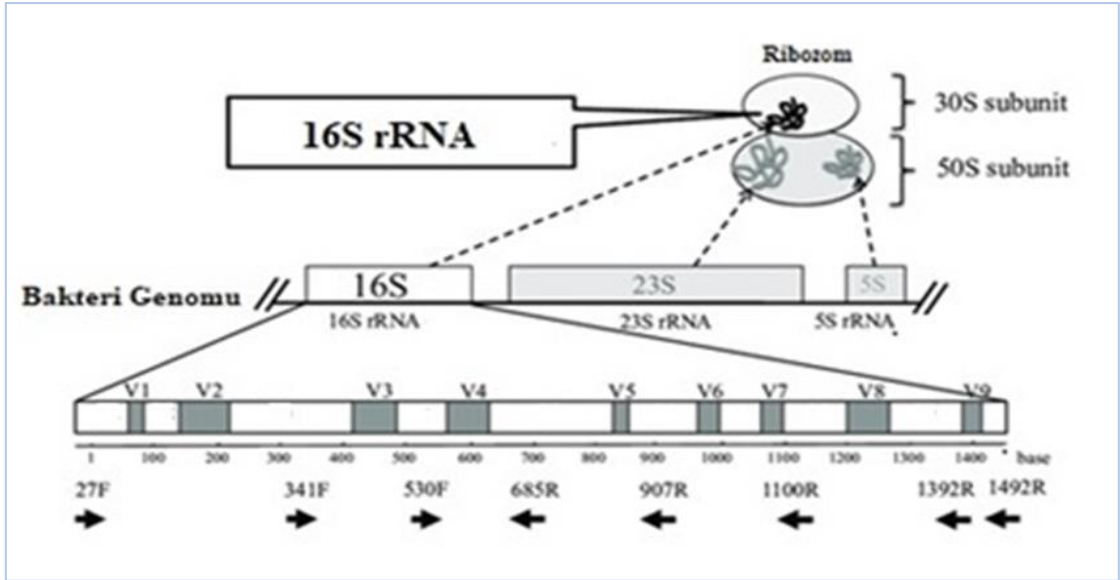
2.3.4.1. 16S rRNA İşaretleyici Gen Analizi

Mikroorganizmaların akrabalık düzeyleri, ribozomal bölgeleri kodlayan genlerin benzerliğine göre belirlenir. Böylece topluluk içindeki her bir genomu, taşındığı hücrelerin mutlak sayısını veya popülasyon içindeki göreceli bolluklarını tanımlayan bir frekans atanır. Bir örnekteki her genomu tam olarak sıralamak pratik olmadığından, farklı genomları az ya da çok benzersiz bir şekilde etiketleyen bir dizi (16S rRNA) moleküler belirteç tanımlanmıştır (97). Bir cihazın markası, modeli ve üretim yılı ile cihazı detaylı incelemeye gerek kalmadan bileşenlerini tanımlanabildiği gibi, 16S rRNA geni de tüm genomu dizilemeye gerek kalmadan onu içeren genomun tanımlanmasını sağlar (98).

16S rRNA, ökaryotik 18S rRNA ile homologdur ve küçük ribozom alt birimini kodlayan gDNA bölgesi tarafından kodlanır (99). 16S rRNA’nın içerdiği değişken ve korunmuş bölgeleri dizilemek için evrensel olarak geçerli primerler ve barkodlar belirlenmiş, bu barkodlar ve primerlerin kullanılması ile değişken bölgelerde yer alan mutasyonların analizi yapılarak ilk filogenetik ağaçlar oluşturulmuştur (100,101).

Prokaryotlarda yapılan çalışmalardan sonuç elde edilmesi ile ökaryotlar gibi daha kompleks organizmalarda da 18S rRNA geni kullanılarak filogenetik çalışmalar yapılmıştır (102).

Farklı popülasyonları analiz etmek için farklı belirteçler seçilebilse de bir genin marker gen olarak kullanılabilmesi için; popülasyonun her üyesinde bulunması, farklı genomlara sahip bireyler arasında farklılık göstermesi ve farklı genomlar arasındaki evrimsel uzaklıkla orantılı olarak farklılık göstermesi gereklidir (98). Bu kriterlere uygun olarak ribozomal protein alt birimleri, uzama faktörleri ve RNA polimeraz alt birimleri dahil olmak üzere bu tür birkaç belirteç tanımlanmış olsa da en yaygın kullanılan 16S rRNA genidir (103,104).



Şekil 2-6: Ribozom ve *E. coli*'ye ait 16S rRNA gen şeması. (103'ten değiştirilerek) Açık renkli kutular korunmuş alanları, koyu renkli kutular hiper değişken alanları nitelemektedir. Koyu renkli oklar, 16S rRNA gen dizisi üzerindeki evrensel primerlerin yaklaşık konumlarını gösterir. Yüksek oranda korunmuş primer bağlanma bölgelerine ek olarak, 16S rRNA gen dizileri, bakterilerin tanımlanması için faydalı türe özgü imza dizileri sağlayabilen hiper değişken bölgeler içerir.

Bu gDNA bölgesi yaklaşık 1500 bp'lik 9 hiper değişken bölgeden (V1-V9) ve bunların aralarında bulunan korunmuş bölgelerden oluşur. Genellikle 16S rRNA veya bazen rDNA olarak anılır; yüksek düzeyde korunmuş her mikroorganizmada bulunan dizileri içermesi ve evrimsel zaman içinde daha büyük ya da daha az değişen bölgeleri içermesi nedeniyle bağırsak mikrobiyota analizinde en yaygın kullanılan gDNA bölgesidir (Şekil 2-6) (105).

Filogenetik analizlerde en sık olarak V3-V4 bölgelerinin dizilenmesi prensibine dayanan yöntem kullanılır. Ancak daha yeni alternatif yaklaşımlar, bağırsak mikrobiyota analizleri için kullanılan tam uzunluktaki bakteriyel 16S rRNA geninin

dizilenmesine olanak sağlamıştır (106). Çalışmamızda, literatürde en sık kullanılan yöntemden farklı olarak V1-V9 bölgelerinin tamamının dizilenmesi prensibi ile mikrobiyota analizi yapılmıştır. Mikrobiyom analizi için sadece 16S rRNA geni dizilenmesi, mikrobiyotada yer alan türlerin her birinin tespit edilmesine imkân verir (107). Bu sayede hem maddi hem de uygulama açısından mikrobiyota analizlerini daha erişilebilir hale gelir.

Elde edilen ham DNA zincirlerinin informatik analizlerinde, çeşitli karşılaştırma programları kullanılarak, NCBI (Proje numaraları: PRJNA33317 ve PRJNA33175) GreenGenes, Ribozomal Veri Tabanı Projesi ve Silva gibi çeşitli veri tabanlarında yer alan dizilerle eşleştirilmektedir (108,109).

Dışkıdan gDNA ekstraksiyonu ve otomatize cihazlar ile DNA miktarının belirlenmesinin ardından, 16S rRNA geni için evrensel primerler kullanılarak PCR ile çoğaltma işlemi yapılır (110). Amplikonlar, Illumina, Nanopore ve ION Torrent gibi NGS sistemleri kullanılarak dizilenir (111). Cihazdan alınan ham veriler, ticari ve linux dilinde yazılan programlar kullanılarak primerlerden kurtarılır, 16S rRNA geni konsensus dizileri oluşturulur ve online veri tabanlarında yer alan kütüphaneler ile karşılaştırılarak informatik analizleri yapılır (107).

Dizi analizinde karşılaşılan ilk zorluk "benzersiz" dizinin kesin olarak tanımlanmasıdır. 16S rRNA geninin çoğu yüksek oranda korunmuş olsa da sıralanan bölgelerin aşırı değişken olduğundan çok kısa bir evrimsel süre içinde baz çifti/çiftleri değişebilir. Bununla birlikte, henüz tanımlanmamış 16S rRNA dizileri, dizilerin biyolojik anlamını ve teknik olarak anlamlılığını zorlaştırır (112). 16S rRNA dizileri online veri tabanlarında yer alan veriler ile karşılaştırılarak OTU'lar oluşturulur. OTU oluşturmada önce diziler kalite filtresinden geçirilir ve tekrar dizileri elenir, böylece sadece anlam ifade edecek dizilerin analizi sağlanır. OTU oluşturma işlemi sırasında, kümeleme algoritması grubu, küme dizileri, tanım eşiği (diğer adıyla dizi kimliği "ID") olarak adlandırılan belirli bir benzerlik skalasına göre sıralanır. %95, %97 veya %99 benzerlik skalaları pratikte sıklıkla kullanılan dizi benzerliği sınır değerleridir (113).

Literatürde, mikrobiyota çalışmalarında karşılaştırma için kullanılabilecek data setleri olsa da evrensel olarak kabul edilebilecek net veri kümeleri bulunmamaktadır (98). Bundan dolayı farklı benzerlik oranlarına sahip veri kümelerinin bileşimlerinden faydalanılabilir. Örneğin, %97 ve daha yüksek ID'deki OTU'ların tür düzeyine kadar

taksonomik çözünürlüğü temsil ettiği kabul gören genel kanıdır (113). Benzer şekilde, %99 ID, mikroorganizmaları suş seviyesine kadar tanımlayabilir (92).

Türlerin yoğunluğunun belirlenmesine ek olarak bağırsak mikrobiyotasının metabolik işlevi, PICRUSt2 gibi biyoinformatik araçlar kullanılarak 16S rRNA dizilimine dayalı olarak tahmin edilebilir (114). Her OTU ayrı bir kategori olarak ele alınırsa, her 16S rRNA dizisi, adlandırılmış bir filuma veya başka bir taksonomik kategoriye bindirilirse, mikrobiyom dizi havuzu, histogram olarak temsil edilebilir (115).

16S rRNA dizilerinin informatik analizinde, taksonomik olarak gruplanmış mikrobiyom koleksiyonunun, göreceli bolluk histogramlarının set olarak mı yoksa bir ikili varlık/yokluk vektörleri seti olarak mı analiz edeceği seçilerek hangi OTU'ların popülasyon varyansının en önemli kaynaklarını temsil ettiği belirlenmelidir. Bunun için Temel Bileşenler Analizi veya Kanonik Korelasyon Analizi gibi ayrıştırma yöntemleri kullanılabilir (116). 16S rRNA üzerine yoğunlaşan çalışmalardan elde edilen verilerin kütüphanelere eklenmesi ile birlikte OTU oluşturulması için kullanılabilecek veri setleri çeşitlenecek, mikrobiyotayı oluşturan yeni türlerin tanımlanması için yarara sağlayacaktır.

2.3.4.2. Shotgun Metagenomik

Shotgun Metagenomik, örnek içinde bulunan bakterilerin gDNA'larının hedef bölge olmaksızın tüm genomun dizilenmesi (WGS) ve analiz edilmesi olarak tanımlanmaktadır (92). 16S rRNA gen analizi, güçlü olmasına rağmen, sadece bir gene dayalı olarak bir mikrobiyotanın bileşimini tespit etmekle sınırlıdır; oysa metagenomik, bir mikrobiyomdaki tüm genler hakkında bilgi sağlayarak mikrobiyomun metabolik potansiyelini de ortaya çıkarmaktadır (105). WGS'nin 16S rRNA dizilemeye göre bir diğer avantajı, bakteri türlerini gelişmiş ve daha doğru algılar. Yine de 16S rRNA dizilemesi daha uygun maliyetlidir ve daha fazla referans veriye sahiptir (117).

2.3.4.3. Metatranskriptomiks (Omiks)

Metatranskriptomiks, mikrobiyomdaki transkripsiyonel olarak aktif genlerin incelenmesidir ve ifade edilen genler hakkında bilgi sağlar. Prokaryotik mRNA kararsız ve toplam RNA'ya kıyasla miktarı az olduğundan, bu örneklerin işlenmesi zordur (118). Metaproteomik, bağırsak mikrobiyotasının işlevsel potansiyeline dair fikir edinmek için mikrobiyomdaki tüm protein içeriği hakkında bilgi sağlar (119). Metabolomik, nükleer

manyetik rezonans ve kütle spektrometresi teknolojilerini kullanarak kolin, safra asitleri, fenoller ve kısa zincirli yağ asitleri gibi mikrobiyotanın metabolik yollarından çeşitli metabolitleri saptar (120). Mikrobiyota bileşimi hakkındaki bilgilerin metatranskriptomik, metaproteomik ve metabolomik yaklaşımlarla bütünleştirilmesi, mikrobiyota aktivitesi ve metabolik kapasitesi hakkında önemli bilgiler sağlar (121).

2.4. Biyoçeşitlilik Analizi

2.4.1. Alfa Çeşitlilik

Alfa çeşitlilik, basit anlamda bir numune içindeki mikroorganizma çeşitliliğini tanımlamaktadır. Bu çeşitliliği tanımlarken örnek içindeki tür zenginliği, tür dağılımı ya da her ikisi de kullanılabilir. Tür zenginliği, numune içindeki farklı türlerin niceliksel olarak ifadesidir (Örn. Numune içindeki taksonların toplam sayısı) (97). Bu metriğin ifade değeri 0-1 arasında değişir. Değer ne kadar yüksekse, türlerin çeşitliliği de o kadar yüksek olur. Bu tip hesaplamalarda numune içindeki türlerin göreceli bollukları dikkate alınır. Alfa çeşitliliğin en güzel örnekleri Simpson ve Shannon-Weiner (diğer adıyla Shannon indeksi) indeksleridir. Simpson endeksi, topluluk içindeki türlerin baskınlığına dayanan düzgünlük ölçüsüdür (Şekil 2-7).

$$D = \frac{\sum_{i=1}^s n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

D: Simpson indeksi s: Gözlemlenen takson sayısı

n_i: Belirli bir takson için mikroorganizma sayısı N: Tüm taksonlar için mikroorganizma sayısı

Şekil 2-7: Simpson indeksi hesaplama formülü.

Çeşitlilik düşük, tür baskınlığı yüksek olduğunda Simpson değeri daha yüksektir. Literatürde, Simpson çeşitliliği en yaygın şekilde, topluluk eşit olduğunda daha yüksek değer üreten 1-D şeklinde ifade edilir (InvSimpson İndeksi).

Shannon indeksi (H), dağılımın rastgeleliğine dayanan çeşitliliğin doğrudan ölçüsüdür ve topluluk daha dengeli olduğunda değeri daha yüksektir (91). Bu metriğin kullanımında dizileme aşamalarında yapılan hataların çeşitlilik dağılımlarını direkt olarak etkileyebileceği akıldan çıkarılmamalıdır (Şekil 2-8) (97).

$$H = - \sum_{i=1}^s \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

H: Shannon İndeksi s: Gözlemlenen takson sayısı

n_i : Belirli bir takson için mikroorganizma sayısı N : Tüm taksonlar için mikroorganizma sayısı

Şekil 2-8: Shannon indeksi hesaplama formülü.

Chao indeksinin iki türü vardır: Chao 1 ve Chao 2. Chao 1, bolluğa dayalı bir tahmin edicidir; dolayısıyla belirli bir sınıfa ait bireysel örneklerin bolluğunu ifade eden verilere ihtiyaç duyar. Chao 2 ise, olaya dayalı bir tahmin edicidir; dolayısıyla bir numunede bir türün yokluğunu veya varlığını belirten verilere ihtiyaç duyar. Genel olarak se.chao1 olarak tanımlanır (Şekil 2-9) (122).

$$S_{(max)Chao} = S_{obs} + (a^2 + b^2)$$

Şekil 2-9: Chao indeksi hesaplama formülü.

2.4.2. Beta Çeşitlilik

Beta çeşitlilik, iki farklı numune arasındaki mikrobiyal toplulukların karşılaştırmasıdır. Genel olarak, örnek çiftleri arasındaki farklılıkları değerlendirir. Bu çeşitlilik hesaplamasının, gDNA izolasyonu ve PCR gibi ön basamaklardan kaynaklı hatalardan etkilenmesi alfa çeşitliliğe göre daha azdır. Beta çeşitlilik niceliksel ve niteliksel olarak hesaplanabilir. En yaygın kullanımda olan niteliksel ölçütler UPGMA ve UniFrac (Filogenetiksel), Bray-Curtis ve Jaccard (Filogenetiksel olmayan) indekslerdir. Jaccard uzaklık ölçütü, sadece özelliklerin varlığı ile ilgilenir (91, 123). Gözlemlenen türlerin tahmini yöntemine benzer şekilde Bray-Curtis gibi kantitatif beta çeşitlilik ölçümleri sadece taksonların sayısına dayanarak ölçümleri değerlendirir. Buna karşılık, UPGMA ve UniFrac, taksonlar arasındaki filogenetik mesafeleri de hesaba katarak hesaplama yürütür (124,125).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereçler

3.1.1. Besiyerleri

Tablo 3-1'e göre hazırlanan besiyerlerinin otoklavda 121 °C'de 15 dk sterilizasyonu sağlanmıştır. Daha sonra otoklavdan çıkartılıp 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petri kutularına dökülmüştür. Ayrıca katılaşmadan BEA besiyerine 6 mg/L vankomisin ilave edilerek vankomisinli BEA (BEA-V) besiyeri ve MC besiyerine 1 mg/L meropenem (meropenem –trihidrat, potens: 980, Glentham Life Science, Birleşik Krallık) ilave edilerek meropenemli MC (MC-M) besiyerleri hazırlanmıştır.

Tablo 3-1: Deneylerde kullanılan besiyerleri.

Besiyerleri	Marka	Toz madde (gr/L)	pH Değeri
Azidli Bile Esculin Agar (BEA)	Biolab, Macaristan	45	7,2± 0,1
Mac Conkey agar (MC)	Oxoid, ABD	51,5	7,1 ± 0,2
Triptik Soy Agar (TSA)	Becton Dickinson, ABD	40	7,3 ± 0,2
Mueller Hinton Buyyon (MHB)	Biolab, Macaristan	22	7,3 ± 0,1
Mueller Hinton Agar (MHA)	Becton Dickinson, ABD	38	7,3 ± 0,1

3.1.1.1. Antibiyotik Diskleri

Vankomisin (30 µg), teikoplanin (30 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg) ve ertapenem (10 µg) diskleri (Oxoid, ABD) firmasından sağlanmıştır.

3.1.1.2. Kimyasal Maddeler ve Kitler

- ◆ %96'lık etil alkol (Sigma, Almanya)
- ◆ Zymo BIOMICS DNA Miniprep (Cat. No. D4300) gDNA izolasyon kiti (Zymo Research, ABD)
- ◆ ONT 16S Barkodlama Kiti (ONT SQK-16S024--gDNA'ya ait V1-V9 bölgeleri için) (Oxford Nanopore, Birleşik Krallık)
- ◆ PYR testi (Pyrolidonly-beta naphilamide, ChemBio, Türkiye)

3.1.1.3. Kullanılan Yazılım ve Cihazlar

Çalışmamızda, İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı envanterinde yer alan cihazlar ve Acıbadem Üniversitesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı envanterine kayıtlı cihazlar kullanılmıştır:

- ◆ Otoklav (Nüve, Türkiye)
- ◆ İnkübatör (Mettler, Almanya)
- ◆ Derin dondurucu (Siemens, Almanya)
- ◆ Tekli mikropipet (10'luk, 100'lük ve 1000'lik)
- ◆ NanoDrop One (Thermo Fisher, ABD)
- ◆ Qubit 2.0 (Thermo Fisher, ABD)
- ◆ ONT FLO-MIN106D akış hücresi v.9.4.1 (Oxford Nanopore, Birleşik Krallık)
- ◆ MinION Mk1B dizileme cihazı (Oxford Nanopore, Birleşik Krallık)
- ◆ ONT MinKNOW (v. 21.02.1) (Oxford Nanopore, Birleşik Krallık)
- ◆ ONT guppy (v. 6.1.5)
- ◆ bbtools (v. 38.91)
- ◆ magicblast (v. 1.6)
- ◆ NCBI 16S bakteriyel veri bankası (21.12.2023 tarihli)
- ◆ samtools (v. 1.13)
- ◆ FastQC (v.0.12.1)
- ◆ R v. 4.3.2

3.1.1.4. Sarf Mazlemeler

- ◆ Steril Petri kutusu (90 mm çaplı)
- ◆ Pirojensiz mikrosantrifüj tüpü
- ◆ Pipet uçları (10 µL, 100 µL ve 1000 µL)
- ◆ Rektal örnekleme için steril swap
- ◆ Steril dışkı kabı
- ◆ Enjektör tipi filtre (0,22µ)

3.2. Yöntem

Bu tez çalışmasında, pre-term bebeklerin mekonyumları ile VRE ve KRKP kolonizasyon sürecinde bağırsak mikrobiyotasında meydana gelen değişikliklerde, muhtemel faktörlerin etkilerinin total 16S rRNA bazında yeni nesil dizilme yöntemi ile kapsamlı olarak araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmamızın etik kurul onayı İstanbul Tıp Fakültesi Bilimsel Çalışmalar Etik Kurulundan 08.10.2021 tarih ve 18 sayılı kararı ile alınmıştır.

3.2.1. Çalışma Protokolünün Hazırlanması

Tez çalışma protokolü, İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Genel Mikrobiyoloji Bilim Dalı ile Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı Çocuk Yenidoğan Yoğun Bakım ünitesi ile ortak planlanmıştır. Oluşturulan yazılı protokole, yatan bebeklerin doğum şekli (vajinal/sezaryen), doğum ağırlığı ve alınan mekonyum/rektal sürüntü örneklerinin kabul veya ret kriterleri belirlenmiştir. Bu kriterler Tablo 3-2’de gösterilmiştir.

Proje destek bütçesi esasına göre, 20 bebeğe ait toplamda 40 mekonyum/rektal sürüntü örnekleri çalışmaya alınmıştır. İlk 20 örnek bebeklerin mekonyum örneği (A grubu), diğer 20 örnek ise aynı bebeklere ait VRE/KRKP içeren ilk rektal sürüntü örnekleridir (B grubu).

Tablo 3-2: Çalışmaya alınan bebeklerin ve alınan örneklerin kabul veya ret kriterleri.

Örneklerin kabul kriterleri	Örneklerin ret kriterleri
a. Gestasyon yaşı <32 hafta	a. Gestasyon yaşı >32 hafta
b. Bebek doğum ağırlığı 1500 gr’dan düşük olması	b. Bebek doğum ağırlığı 1500 gr’dan yüksek olması
c. Mekonyum alımından önce antibiyotik kullanılmaması	c. Mekonyum alımından önce antibiyotik kullanılması
d. İlk örnek kültüründe vankomisin duyarlı enterokok (VSE) ve/veya karbapenem duyarlı <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KSKP) üremesi	d. İlk örnek kültüründe VSE/KSKP ürememesi veya vankomisin dirençli enterokok (VRE) ve/veya karbapenem dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i> (KRKP) üremesi
e. Alınan örneklerde yeterli oranda gDNA izole edilmesi	e. Alınan örneklerden yeterli oranda gDNA’nın izole edilememesi
f. Çalışmada istenilen örnekler alınana kadar bebeğin yaşaması	f. Çalışmanın herhangi bir aşamasında istenilen örneklerin alınmasından önce bebeğin vefat etmesi

3.2.2. Bebeklere Uygulanan Profilaksi

Çalışmaya dahil edilen tüm bebeklere, profilaktik olarak üç gün gentamisin+ampisilin uygulanmıştır. Sadece 6 no’lu bebeğe serviste ampisilin olmadığı için penisilin G, 7 no’lu bebeğe ampisilin-sulbaktam+gentamisin uygulanmıştır. Ayrıca 8 no’lu bebeğin annesi gebelik sürecinde meropenem kullandığını ifade etmiştir. Tüm bebeklere doğduktan sonra 1 mg K vitamini verilmiş ve antibiyotik tedavi süresince haftada bir kere olacak şekilde tekrarlanmıştır. Ayrıca 7, 8, 9 ve 13 no’lu dört bebeğe haftada iki defa antifungal olan flukonazol ve 7, 8, 9, 10, 11, 17 ve 18 no’lu yedi bebeğe

üç gün ise pentoksifilin uygulanmıştır. Çalışmaya dahil edilen bebeklerin tamamının doğumu sezaryen ile gerçekleşmiştir (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: Çalışmaya dahil edilen bebeklerin doğum bilgileri ve profilakside kullanılan antibiyotikler.

Örnek No	Doğum Yaşı (Hafta)	Doğum Ağırlığı (Gram)	Profilakside Kullanılan Antibiyotikler* (gün)
1	31+1/7	1470	GEN +AMP (3)
2	31+1/7	1410	GEN +AMP (3)
3	29+2/7	855	GEN +AMP (3)
4	25+2/7	450	GEN +AMP (3)
5	31+4/7	1385	GEN +AMP (3)
6	29+3/7	1200	GEN+P (3)
7	28+6/7	1440	GEN+SAM (3)
8	27+5/7	920	AMP+CTX (4)
9	27+4/7	640	GEN +AMP (3)
10	29+4/7	1045	GEN +AMP (3)
11	29+4/7	1355	GEN +AMP (3)
12	31+1/7	1270	GEN +AMP (3)
13	31	1425	GEN +AMP (4)
14	29+5/7	1070	GEN+ AMP (3)
15	29+5/7	1005	GEN+ AMP (3)
16	26+5/7	840	GEN +AMP (3)
17	26+1/7	920	GEN +AMP (3)
18	26+1/7	930	GEN +AMP (3)
19	29+3/7	1350	GEN +AMP (3)
20	29+3/7	880	GEN +AMP (3)

*İkiz bebekler aynı hanede iki numara şeklinde yazılmıştır. Kısaltmalar: AMP=Ampisilin; CTX=Sefotaksim; GEN=Gentamisin; P=Penisilin G; SAM=Sulbaktam-Ampisilin.

3.2.3. Örneklerin Kültürü ve Bakterilerin Tanımlanması

Ocak 2022-Ağustos 2023 tarihleri arasında Yenidoğan Yoğun Bakım ünitesine yatırılan bebeklerden ilk 24 saat içinde iki mekonyum örneği alınarak Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hastane Enfeksiyonları Laboratuvarına gönderilmiştir. Örneklerden biri herhangi bir işleme tabi tutulmadan derin dondurucuya kaldırılmıştır. Diğer örneklerden ise konvansiyonel yöntemler ile kültürler yapılmıştır.

3.2.4. Örneklerin Kültürü ve Bakterilerin Tanımlanması

Gönderilen örneklerin kültürü iki şekilde yapılmıştır:

- a. Mekonyum/rektal sürüntü örneklerinde VSE ve KSKP bakterilerin varlığını saptamak için sırasıyla BEA ve MA besiyerlerine kültürleri yapılmıştır.
- b. Rektal sürüntü örneklerinde VRE ve KRKP bakterilerin varlığını saptamak için sırasıyla BEA-V ve MC-M besiyerlerinde kültürler yapılmıştır. Bakterilerin tanımlanması konvasyonel yöntemlerle yapılmıştır. Enterokoklar, Gram-pozitif, katalaz negatif, eskulin hidrolizi özelliğine sahip ve PYR (Pyrolidonyl-beta naphilamide) pozitif koklardır. *K. pneumoniae*, üreaz negatif, Voges-Proskauer pozitif, hareketsiz, indol negatif ve üç şekerli demirli besiyerinin kırmızıdan sarıya dönüştüren Gram-negatif çomaklarıdır (61).

3.2.5. Disk Difüzyon Yöntemi

VSE/VRE ve KSKP/KRKP bakterilerin taze kültüründen steril eküvyonla MHB'ye alınmış ve 0,5 McFarland bulanıklığında olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır. Hazırlanan bu süspansiyondan steril eküvyonla alınan örnek, MHA'a yayılmıştır. Enterokoklar için vankomisin ve teikoplanin ve *K. pneumoniae* için imipenem, meropenem, ertapenem diskleri yerleştirilmiştir. Ekim yapılan besiyeri 35°C $\pm$ 2°C'de 16-18 saat inkübe edilmiştir. CLSI kriterine göre, Enterokoklarda vankomisin için üreme inhibisyon zon çapı duyarlı ≥ 17 mm, orta duyarlı 15-16 mm ve dirençli ≤ 14 mm, teikoplanin için ≥ 14 mm duyarlı, orta duyarlı 11-13 mm ve dirençli ≤ 10 mm kabul edilmiştir. Her iki antibiyotiğe dirençli olan suşlar VRE olarak kabul edildi. Enterobacterales'lerde imipenem ve meropenem için ≥ 23 mm duyarlı, 20-22 mm orta duyarlı ve ≤ 19 mm dirençli; ertapenem için ≥ 22 mm duyarlı, 19-21 mm orta duyarlı ve ≤ 18 mm dirençli kabul edilmiştir (126). Karbapenemlerden hepsine duyarlı olanlar KSKP ve tek bir karbapeneme dirençli olanı KRKP olarak değerlendirilmiştir. VRE ve KRKP olarak izole edilen tüm rektal sürüntü örnekleri ve bu hastaların mekonyumları toplamda 20 bebeğe ait 40 örnek kodlanmış ve gDNA izolasyon aşamasına kadar -80 °C'de saklanmıştır.

3.2.6. Mekonyum ve Rektal Sürüntüden gDNA İzolasyonu

Çalışmamızda mekonyumlar ve rektal sürüntü örneklerinden gDNA izolasyonu için aynı protokoller uygulanmıştır. Çalışmanın bu kısmı, Anabilim Dalımızda yeterli cihaz donanımı olmadığı için Acıbadem Üniversitesi Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi Anabilim Dalı laboratuvarı ile ortak olarak yürütülmüştür.

gDNA izolasyonu için ZymoBIOMICS DNA Miniprep Kitinde (Katolog no: D4300) belirtilen aşağıdaki protokol uygulanmıştır:

- a. 0,22µ enjektör tipi filtre ile steril edilmiş 1 mL %96'lık etil alkol içinde saklanan 200 mg mekonyum numunesi/rektal sürüntü vorteks ile hafif şekilde homojenize edildikten sonra içinden 250 µL alınarak ZR Bashing Bead Lizis tüpüne aktarılarak üzerine 750 µL ZymoBIOMICS lizis solüsyonu eklenerek tüp kapatılmıştır.
- b. Tüpler çevrilmek üzere sabitleyicilere tutturularak 5 dk boyunca en yüksek hızda çevrilmiş, sonrasında 5 dk boyunca dinlendirilmiştir. Bu şekilde 4 defa daha işlem yapılarak toplamda 20 dk süre ile boncukların etkisi ile hücrelerin parçalanması sağlanmıştır.
- c. ZR Bashing Bead lizis tüpü mikrosantrifüj ile 10000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- d. 400 µL süpernatant, toplama tüpündeki Zymo-Spin III-F filtresine aktarılarak 1 dakika boyunca 8000 g'de santrifüjlenmiş, ardından Zymo-Spin III-F filtresi atılmıştır.
- e. 1200 µL ZymoBIOMICS DNA Binding Buffer, tüp içinde kalan filtrat üzerine eklenerek iyice çalkalanmıştır.
- f. Bu karışımdan 800 µL alınarak Zymo-Spin IICR kolonuna aktarılarak 10000 g'de 1 dk santrifüj edilmiştir.
- g. Toplama tüpünden gelen akıntı atılarak bir önceki aşama tekrarlanmıştır.
- h. 400 µL 1 numaralı DNA yıkama solüsyonu yeni toplama tüpünde yer alan Zymo-Spin IICR kolonuna aktarılarak 10000 g'de 1 dk santrifüj edilerek akan kısım atılmıştır.
- i. 700 µL 2 numaralı DNA yıkama solüsyonu eklenerek üst basamakta yapılan işlem tekrarlanmıştır.
- j. Tekrar 2 numaralı DNA yıkama solüsyonundan 200 µL eklenerek 10000 g'de 1 dk santrifüj edilmiş ve akan kısım atılmıştır.
- k. Zymo-Spin IICR kolnu yeni temiz 1.5 mL hacimli mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. Üzerine 100 µL DNase/RNase free su eklendi ve 1 dk oda ısısında

bekletilmiştir. Ardından 1 dk boyunca 10000 g’de santrifüj edildi. Bu işlem ile olası peltelerin elemine edilmesi sağlanmıştır.

- l.** Zymo-Spin III-HRC Filtresi yeni bir toplama tüpüne yerleştirilerek üzerine 600 µL HRC Prep solüsyonundan eklenerek 8000 g’de 3 dk santrifüj edilmiştir.
- m.** “k” basamağında elde edilen DNA 1,5 mL mikrosantrifüj tüpü içinde hazırlanmış III-HRC filtresine aktararak 16000 g’de 3 dk santrifüj edilmiştir.

3.2.7. PCR ve gDNA’ların 16S rRNA Bölgelerinin Dizilenmesi

PCR için 27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'; 1492R 5'-GGTACCTTGTACGACTT-3' evrensel barkodlu primerler kullanılmıştır (127).

Mekonyum ve rektal sürüntü örneklerinden elde edilen saf gDNA'lara ait 16S rRNA bölgelerinin dizilenmesi için aynı protokoller uygulanmıştır:

- a.** -20 °C’de tutulan 16S barkodlarının yer aldığı plaklar çıkarılarak çözündürülerek plakların içinde bulunan sıvıların tüplerin dibinde olduğundan emin olarak soğutucu raklar üzerine yerleştirilmiştir.
- b.** LongAmp Hot Start Taq 2X Master karışımı çözündürüldükten sonra pipetlenerek karıştırılmış ve soğutucu rak üzerine yerleştirilmiştir.
- c.** 10 ng (10 µL) gDNA, DNA LoBind tüpüne alınarak üzerine 10 µL nukleaz-free su eklenip mikrosantrifüj ile hafif şekilde karıştırılmıştır.
- d.** Her numune için 5 µL nukleaz-free su, 10 µL hedef gDNA ve 25 µL LongAmp Hot Start Taq 2X Master karışımı 0,2 mL hacmindeki PCR tüpünde aktarılmıştır.
- e.** Pipet ile hafifçe karıştırılarak temiz pipet ucu ile barkodları içeren folyo hafifçe delinmiştir. Bu işlem her numuneye ait gDNA için farklı pipet kullanılarak yapılmıştır. Bu sayede pipet ucu kaynaklı olası kontaminasyonun önüne geçilmiştir.
- f.** 16S gDNA barkodları içeren kuyular pipet ile 10 kez karıştırılarak içine 10 µL numune aktarılmış ve yine 10 defa pipetle karıştırılmıştır.
- g.** Aşağıdaki basamaklar kullanılarak amplifiye edilmiş ve 4 °C’de saklanmıştır.
 - Ön denatürasyon (95 °C, 1 dk) (Tek döngü)
 - Denatürasyon (95 °C, 20 sn) (25 döngü)
 - Çözünme (Annealing) (55°C, 30 sn) (25 döngü)
 - Uzama (Extension) (65 °C, 2 dk) (25 döngü)
 - Final Uzama (65 °C, 5 dk) (Tek çevrim)

- h.** Her örnek içinde AMPure XP boncukları içeren 1.5 mL hacimli tüplere aktarılarak vortekslenmiştir.
- i.** Tüp içine 30 μ L resüspanse AMPure boncukları eklenerek 5 dk hareketli karıştırıcıda oda sıcaklığında inkübe edilmiştir.
- j.** Nukleaz-free su kullanılarak 500 μ L %70'lik etanol hazırlanmıştır.
- k.** İnkübasyondan sonra numune biraz daha çevrilerek mıknatıslı tutucu üzerine yerleştirilerek süpernatant pipetlenmiştir.
- l.** Mıknatıslı tutucu üzerindeyken 200 μ L %70'lik etanol ile peletler yapısı bozulmadan yıkanmış ve ardından etanol pipetlenerek atılmıştır.
- m.** “k” basamağındaki işlem tekrarlandı. Tekrar döndürülerek olası kalıntı etanol pipetlenerek temizlenmiştir.
- n.** 30 saniye boyunca pelet kurumaya bırakıldı. Süre uzaması peletin çatlamasına neden olabilir bu da sonraki basamaklarda peletin hatalı şekilde atılmasına sebebiyet verebileceği için süre takibi yapılmıştır.
- o.** Ardından pelet 10 μ L, 10 mM Tris-HCl pH: 8 ve 50 mM NaCl içeren tüpe aktarıldı ve oda ısısında 2 dk inkübe edilmiştir.
- p.** Sıvı berraklaşana kadar mıknatıs üzerinde peletlenmiştir.
- q.** 10 μ L elüat 1.5 mL'lik eppendorf DNA LoBind tüpüne aktarılarak saklandı. Peletlenen boncuklar ise bu işlemlerden sonra atılmıştır.
- r.** Qubit 2.0 kullanılarak 1 μ L eluat içindeki gDNA miktarı ölçüldü. Sınır değer olarak kitin önerdiği 280/260: ~1,80 değerleri kullanıldı. Saflık değeri yeterli olmayan örneklerin, manyetik tanecik yöntemiyle saflaştırmaları yapılmıştır. Sonra, tekrardan, örneklerin kalite kontrolleri yapıp esas konsantrasyonları ölçülmüştür.
- s.** Barkod içeren kütüphaneler 10 μ L 10 mM Tris-HCl ve 50 mM NaCl içinde toplamda 50-100 fmol olacak şekilde ayarlanmıştır.
- t.** Barkodlanmış gDNA üzerine 1 μ L RAP eklenerek hafifçe karıştırıldı ve 5 dk boyunca oda ısısında inkübe edilmiştir.
- u.** Yukardaki tüm işlemler sonucunda kütüphane, dizileme için cihaza yüklenmek için hazırlandı ve cihaza yüklenene kadar da buz üzerinde tutulmuştur.

Barkodlanan gDNA, MiniOn Mk1B cihazına yüklenmesi için aşağıda tanımlanan işlemler uygulanmıştır:

- a. Dizileme tamponu, yükleme boncukları ve Flush Tether solüsyonunu Flush tether tüpü içinde oda sıcaklığında karıştırılarak vortekslenmiştir.
- b. Akış hücresi karışımı için 30 µL çözündürülmüş flush tether tüpe eklenmiş üzerine yıkama solüsyonu aktarılıp karıştırılarak cihaza yüklenmiştir.
- c. Hava kabarcığı olmadığına dikkat edilerek akış hücresine yüklenmiştir.
- d. Aşağıdaki basamaklar izlenerek kütüphane yeni tüp içinde hazırlanmıştır:
 - 34 µL sekanslama buffer solüsyonu
 - 25,5 µL yükleme boncukları
 - 4,5 µL nukleaz-free su
 - 11 µL DNA kütüphanesi
- e. SpotON numune yükleme girişinden 200 µL hazırlama karışımı ve 75 µL hazırlanan kütüphaneden yükleme yapılarak ONT FLO-MIN106D akış hücresine (v. R9.4.1) yükleme hazırlığı tamamlanmıştır.

Dizileme çevrimi tamamlandıktan sonra “fast5” uzantılı ham veri dosyaları cihazdan toplanarak biyoinformatik analizleri için saklanmıştır.

3.2.8. Ham Verilerin Biyoinformatik Analizi

“fast5” uzantılı ham veri dosyaları, ONT guppy (v.6.1.5) komut satırı programı ile adaptör ve barkodlardan kurtarılmıştır. Dizilerin FastQC (v.0.12.1) programı ile yapılan kalite kontrolü sonrasında, bbTools (v.38.91), magicblast (v.1.6) ve samtools (v.1.13) programları ile konsensus dizileri oluşturulmuştur. Diziler, 21.12.2023 tarihli NCBI 16S bakteriyel veri bankasına eşleştirilip anotasyonu yapılarak her bir örnek filumdan türe kadar olan taksonlarda OTU tabloları elde edilmiştir.

3.2.9. İstatistiksel Değerlendirme

OTU dosyaları, SPSS (v.26), R (v.4.2.0) ve Rstudio IDE (v.2022.02.2) ile tek bir tabloda birleştirilerek tüm bakteriler için göreceli miktarlar elde edilmiştir. Analizler öncesi R decontam (v. 1.18.1) paketi kullanılarak kontaminasyonlar elimine edilmiştir. Normallik testi için Shapiro-Wilk’s testi, önemli farklılık ($p < 0,05$) gösteren özellikleri belirlemek amacıyla paired Welch’s t-test (normal dağılım görülen gruplarda) ve paired Wilcoxon Signed Rank Testi (normal dağılım göstermeyen gruplarda) ve anlamlılık düzeylerini doğrulama yöntemi olarak da Bonferroni yöntemi uygulanmıştır.

3.2.10. Çeşitlilik Analizi

3.2.10.1. Alfa Çeşitliliği

Alfa çeşitlilik analizi, aynı türdeki bireysel tür çeşitliliğidir. R programında “phyloseq” paketi ile yapılmıştır. Alfa çeşitlilik analizi, üç farklı metrikte, gözlemlenen (observed), Shannon ve Inverse Simpson (InvSimpson) metrikleriyle incelenmiştir.

Gruplar arasındaki istatistiksel olarak farklılığın değerlendirilmesi, parametrik ve normal dağılım görülen örneklerde paired Welch’s t-testi, parametrik olmayan ve normal dağılım göstermeyen örneklerle ise Wilcoxon Sing Rank testi ile belirlenmiştir. Tahmini kutu grafikleri “ggplot2” paketi kullanılarak çizilmiştir.

3.2.10.2. Beta Çeşitliliği

Bireyler arası türler çeşitliliğidir. Toplanan örneklerin beta biyoçeşitliliklerinin karşılaştırılması için Bray-Curtis ısı haritası ile Bray-Curtis farklılığı ve Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizleri kullanıldı. Bray-Curtis farklılığında sonuç 0 ise iki bölge aynı türü paylaşıyor; 1 ise hiçbir türü paylaşmıyor olarak değerlendirildi. Bray-Curtis farklılığı ve Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizlerinde aksislerin değerlerinin toplamının %80’den büyük olması varyans değerlerinin açıklayıcı olduğunu ifade etmektedir. Filogenetik benzerlik analizi için UPGMA mesafe metriğinin sadece ağırlıklı kullanılmıştır. UPGMA ölçütü “phyloseq” paketinden UPGMA işlevi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Yenidoğanlara Uygulanan Profilaktik Tedaviler

Profilaksiste kullanılan antibiyotiklere ek olarak 1-5, 9-13 ve 16-20 numaralı bebeklere Gram-pozitif bakterilere karşı TEC ile birlikte, Gram-negatif çomaklara karşı üçüncü kuşak sefalosporinlerden CTX kullanılmıştır. 4 nolu bebeğin serviste kalış süresi diğer bebeklere göre daha uzun sürdüğü için TEC+CTX kombinasyonu değiştirilerek TEC yerine V, CTX yerine MEM, AK ve LEV folik asit antagonisti SXT ile kombine edilerek uygulanmıştır (128). 6 nolu bebekte TEC ile GEN; 7 ve 8 nolu bebeklerde ise CTX yerine TZP kullanılmıştır. TZP bir beta laktam olan piperasilin ile beta-laktamaz inhibitörü olan tazobaktam kombinasyonundan oluşmaktadır (129). MEM, 4, 10, 11 ve 17 nolu bebeklerde CTX yerine; 19-20 nolu bebeklerde de TEC+CTX ile kombine edilerek kullanılmıştır.

4.2. Örneklerin Kültür Sonuçları

Bebeklerin ilk yatışında alınan mekonyum/rektal sürüntü örneklerinde üreyen VSE/KSKP (A örnekleri) daha sonra bebeklere uygulanan çeşitli antibiyotikler sırasında/sonrasında haftada bir kez alınan rektal sürüntü örneklerinde üreyen ilk VRE/KRKP (B örnekleri) için kolonizasyon süresi hesaplanmış ve Tablo 4-1’de gösterilmiştir.

Çalışmamıza dahil edilen 20 bebekten beşi çift yumurta ikizidir (1-2, 10-11, 14-15, 17-18 ve 19-20 numaralı bebekler). Örneklerin tamamında VRE ve KRKP üremesi saptanmıştır. İlk VRE kolonizasyonu 10 bebekte (%50) (Bebek no: 3, 7, 8, 10, 12, 14, 15-18) görüldü. Aynı bebeklerden serviste yatış süreleri boyunca haftalık olarak gelen örneklerde KRKP üremesi de görülmüştür. İlk KRKP kolonizasyonu 9 bebekte (%45) (Bebek no: 1, 2, 4, 5, 6, 9, 11, 13 ve 20) görüldü. Aynı bebeklerden serviste yatış süreleri boyunca haftalık olarak gelen örneklerde VRE üremesi de görülmüştür. Sadece 19 no’lu tek örnekte (%5) VRE ve KRKP birlikte olduğu görülmüştür. VRE ve KRKP’nin yatan bebeklerin bağırsağında kolonize olmaları için gereken süre VRE için 12-60 gün (ort. 33,1 gün), KRKP için 6-62 gün (ort. 22,9) gün, VRE+KRKP için 15-96 gün (ort. 43,8 gün) olarak saptanmıştır.

Tablo 4-1: Bebeklere uygulanan profilaksi ve tedavide kullanılan antibiyotiklerin uygulanma süresi ve VRE/KRKP görülme süreleri.

Bebek no	Tedavide Kullanılan Antibiyotikler* (gün)	Yatış Tarihi	İlk Görülen VRE/KRKP için gerekli süre (gün)	VRE+KRKP kolonizasyonu için gerekli süre (gün)
1	TEC+CTX (4)	18.11.2021	KRKP (18)	25
2	TEC+CTX (4)		KRKP (12)	25
3	TEC+CTX (4)	20.12.2021	VRE (48)	69
4	TEC+CTX (2), V+MEM (7), V+MEM+AK (9), LEV+SXT (7)	01.12.2021	KRKP (62)	96
5	TEC+CTX (4)	24.02.2022	KRKP (28)	26
6	TEC+GEN (6)	23.03.2022	KRKP (6)	15
7	TEC+TZP (4)	13.04.2022	VRE (13)	22
8	V+TZP (5)	2.09.2022	VRE (24)	40
9	TEC+CTX (4)	2.12.2022	KRKP (18)	32
10	TEC+CTX (4) V+MEM (5)	16.12.2022	VRE (23)	35
11	TEC+CTX (4), TEC+MEM (5)		KRKP (31)	45
12	TEC+CTX (3)	9.01.2023	VRE (34)	55
13	TEC+CTX (3), V+TZP (3)	7.01.2023	KRKP (17)	36
14	TEC+TZP (2)	01.06.2022	VRE (60)	74
15	TEC+TZP (2)		VRE (27)	60
16	TEC+CTX (3)	21.06.2023	VRE (12)	33
17	TEC+CTX (2), V+MEM (4)	02.03.2023	VRE (52)	60
18	TEC+CTX (2), V+MEM (4)		VRE (38)	68
19	TEC+CTX+MEM (7)	17.04.2023	VRE+KRKP (29)	
20	TEC+CTX+MEM (7)		KRKP (14)	30

*Kısaltmalar: AK, amikasin; AMP, ampicilin; CTX, sefotaksim; GEN, gentamisin; LEV, levofloksasin; MEM, meropenem; P., penisilin G; SAM, sulbactam-ampicilin; SXT, trimetoprim-sulfametoksazol; TEC, teikoplanin; TZP, tazobaktam-piperasilim; V, vankomisin.

4.3. Profilaksi ve Tedavide Kullanılan Antibiyotiklerin Bağırsakta Bulunan Mikrobiyota Bakterilerine Karşı Olası Etkisi

VRE kolonizasyonu en erken 12. günde GEN+AMP (3 gün profolaksi) ve TEC+CTX (3 gün tedavi) kullanılan 16 no'lu bebekte ve en geç 60. günde GEN+AMP (3 gün profolaksi) ve TEC+TZP (2 gün tedavi) uygulanan 14 no'lu bebekte gerçekleşmiştir. KRKP kolonizasyonu en erken 6. günde GEN+P (3 gün profolaksi) ve TEC +GEN (6 gün tedavi) kullanılan 6 no'lu bebekte ve en geç 60. günde GEN+AMP (3 gün profolaksi) ve TEC+TZP (2 gün tedavi) uygulanan 14 no'lu bebekte gerçekleşmiştir. Profilakside kullanılan antibiyotikler aerop ve bir kısım anaerop bakterilere etkilidir. Aminoglikozit grubu GEN, AMP/P ile kombine edilerek kullanılmıştır. AMP/P Gram pozitif etkilidir ancak Gram negatif çomakların

(*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*) çoğu AMP/P'ye dirençlidir. Ancak 7 no'lu bebekte AMP yerine daha güçlü antibiyotik olan beta-laktamaz inhibitörü olan SAM ve 8 no'lu bebekte üçüncü sefalosporin olan CTX kullanılmıştır. CTX enterokok dışında stafilokok ve streptokok gibi diğer Gram pozitif bakterilere ve *E.coli*, *Klebsiella* spp. gibi *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilere etkili olup *Pseudomonas* spp.'ye etkisizdir.

Tedavide kullanılan TEC ve V gibi glikopeptidler ile sadece Gram pozitif bakterilere, *C. difficile* etkili olan antibiyotikler CTX ile kombine edilerek (1-5, 9, 10,11,12,13, 16-20 no'lu bebeklerde) uygulanmıştır. Bazı bebeklerde CTX yerine GEN (6 no'lu bebekte) veya TZP (7, 8, 13, 14, 15 no'lu bebeklerde) kullanılmıştır. Piperasilin, ureidopenisilin olup Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere etkili bir beta-laktamdır aynı zamanda anti-*Pseudomonas* olarak da adlandırılır. EUCAST'e (130) göre anaerop bakterilere karşı kullanılan antibiyotikler, *Bacteroides* spp.'de TZP, MEM, klindamisin, metronidazol; *Prevotella* spp. ve *F. necrophorum*'da benzil penisilin, TZP, MEM, klindamisin, metronidazol; *C. perfringens*'te V, benzil penisilin, TZP, MEM, klindamisin, metronidazol; *Cutibacterium acnes*'te V, benzil penisilin, TZP, MEM ve klindamisin olarak bildirilmiştir. Anaerop bakterilere etkili olan V/MEM/TZP 4,7, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 17-20 no'lu bebeklerde kullanılmıştır (Tablo 4-1 ve Tablo 4-2).

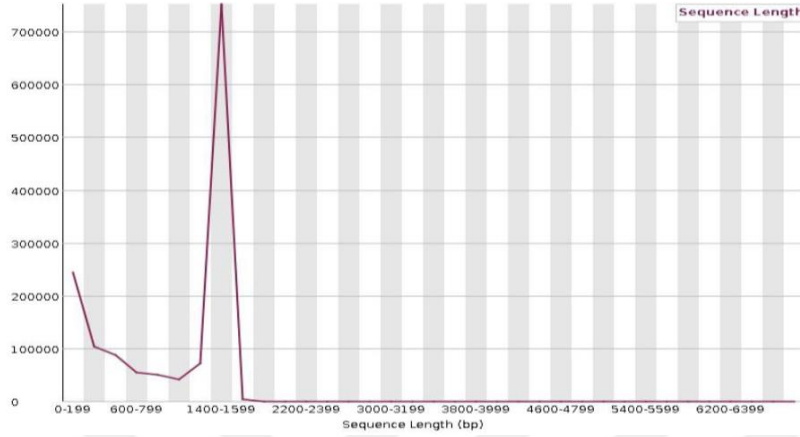
Tablo 4-2: Yatan bebeklere uygulanan profilaksi ve tedavide kullanılan antibiyotiklerin bakterilere karşı etkisi (60).

Kullanılan Antibiyotik	Antibakteriyel etkisi			
	Gram Pozitif	Gram Negatif		Anaerop
Penisilinler: P (G, V)	<i>Streptococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i>	<i>Neisseria</i> <i>Treponema</i> <i>Actinomyces</i>	<i>gonorrhoeae</i> , <i>pallidum</i> ,	<i>Clostridium</i> (P-V), <i>Peptoniphilus</i> , <i>Fingoldia</i> , <i>Peptostreptococcus</i> , <i>Fusobacterium</i> , <i>Prevotella</i> spp. (P-G), <i>Cutibacterium acnes</i> (P-G)
AMP (aminopenisilin)	P gibi	P gibi ve negatif <i>H.influenzae</i> , <i>mirabilis</i> , <i>E. coli</i> ,	Beta-laktamaz P.	P gibi
Piperasilin (ureidopenisilin)	P gibi	Çoğu <i>Enterobacteriaceae</i> ve <i>P. aerugiona</i> 'ya etkili		P gibi

Beta-laktam/Beta laktamaz inhibitörü SAM TZP	P gibi ancak beta laktamaz üreten suşlarda da etkilidir	P gibi ancak beta laktamaz üreten suşlarda da etkilidir Çok antibiyotiğe dirençli olan <i>Acinetobacter</i> spp. etkilidir. SAM gibi ve <i>P. aeruginosa</i> 'da etkilidir.	<i>B.fraglise</i> , <i>Prevotella</i> spp., <i>C. perfringens</i> etkilidir.
Sefemler: CTX	<i>Streptococcus</i> 'a çok etkili, <i>Enterococcus</i> 'a etkisiz, <i>S. aureus</i> 'a orta düzeyde etkilidir	Gram negatif bakterilere karşı ikinci kuşak sefalosporinlere göre daha etkilidir. <i>Pseudomonas</i> 'a etkisizdir.	
Penemler: IMP, MEM	Etkilidir	Etkilidir	MEM, <i>Bacteroides</i> spp, <i>Prevotella</i> spp., <i>C. perfringens</i>
Aminoglikozit: GEN, AK	Etkisi değişkendir ancak V ile sinergist yaparak enterokoklara etkili olur	Gram negatif çomaklara, <i>Nocardia</i> (AK) etkilidir, GEN veya beta-laktam ile sinergist etkisi <i>P. aeruginosa</i> 'da kullanılır	Etkisizdir
Folat inhibitörleri Sulfanamid, Trimetoprim, SXT	A grubu streptokok ve enterokoklara etkisizdir, Stafilokoklara, MRSA orta etkili, <i>Listeria</i> spp. etkilidir	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>H.influenzae</i> , <i>M. cattarhalis</i> , ve <i>Stenotrophomonas</i> spp. etkili ancak <i>P. aeruginosa</i> 'ya etkisizdir.	
Glikopeptidler: V, TEC	Stafilokok MRSA dahil, enterokok etkili, <i>Lactobacillus</i> spp. ve <i>Actinomyces</i> spp.'ye etkisizdir	Etkisizdir	Gram pozitif anaerop: V, <i>C. difficile</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Cutibacterium acnes</i>
Kinolonlar: LEV	<i>Staphylococcus</i> ve <i>Streptococcus pneumoniae</i> etkilidir	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>M cattarhalis</i> , Patojenler: <i>Chlayidophyla pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Legionella</i> , <i>Bacillus anthrachis</i>	

4.4. 16S rRNA Sekans Kalite Skorları

Toplamda, 1418944 okuma ve 1,4 Gbp baz elde edilmiştir. N50 değeri 1442 kb, örnek başına ortalama okuma sayısı 34608 olarak belirlenmiştir. Zincirlerin uzunlukları 1-6945 bp arasında (ortalama: 1004 bp) olarak tespit edilmiştir (Şekil 4-1).

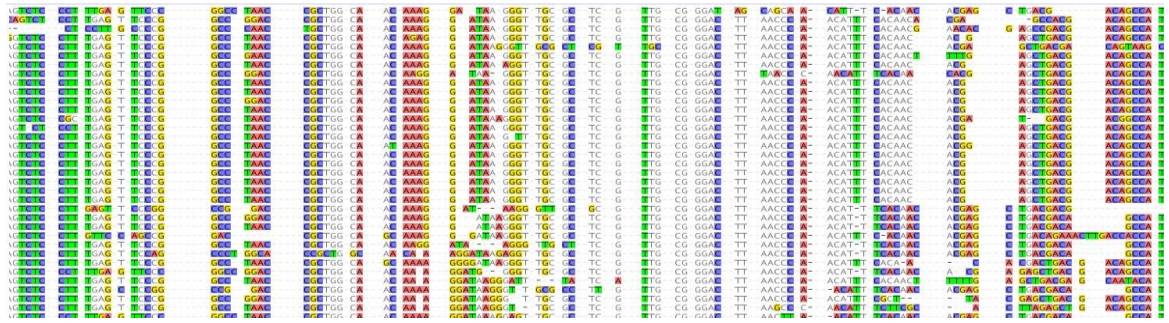


Şekil 4-1: 16S rRNA dizilerinin ortalama zincir uzunlukları.

Dikey bar: Total okuma sayısı; Yatay bar: Ortalama DNA zincir uzunluğu

4.5. OTU'ların Biyoinformatik Analizleri

OTU'ların analizinde De Novo kümeleme yöntemi kullanılmıştır (Şekil 4-2). Her OTU için yapılan biyoinformatik analiz sonuçları başlıklara ayrılarak belirtilmiştir. İstatistiksel değerlendirmede; $p < 0,05$ olduğunda anlamlı olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analiz, mekonyum ve rektal sürüntü, ikiz ve ikiz olmayan bebekler olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 4-2: Ham dizilerin primerlerin kesilmesinden sonra dizi benzerliklerinin tanımlanması. Şekilde her renk bir bazı temsil etmektedir. Barkod ve primerlerinden kurtarılan diziler önce tekrar dizilerinden arındırılmıştır. Ardından diziler hizalandı ve hizalama skorları referans alınarak zincirler arasındaki uzaklık belirlenmiştir. Bu matristen yararlanılarak rehber oluşturularak taksonlar arasındaki ilişki belirlenmiştir.

4.5.1. Filum (Phylum) Seviyesinde OTU Analizi

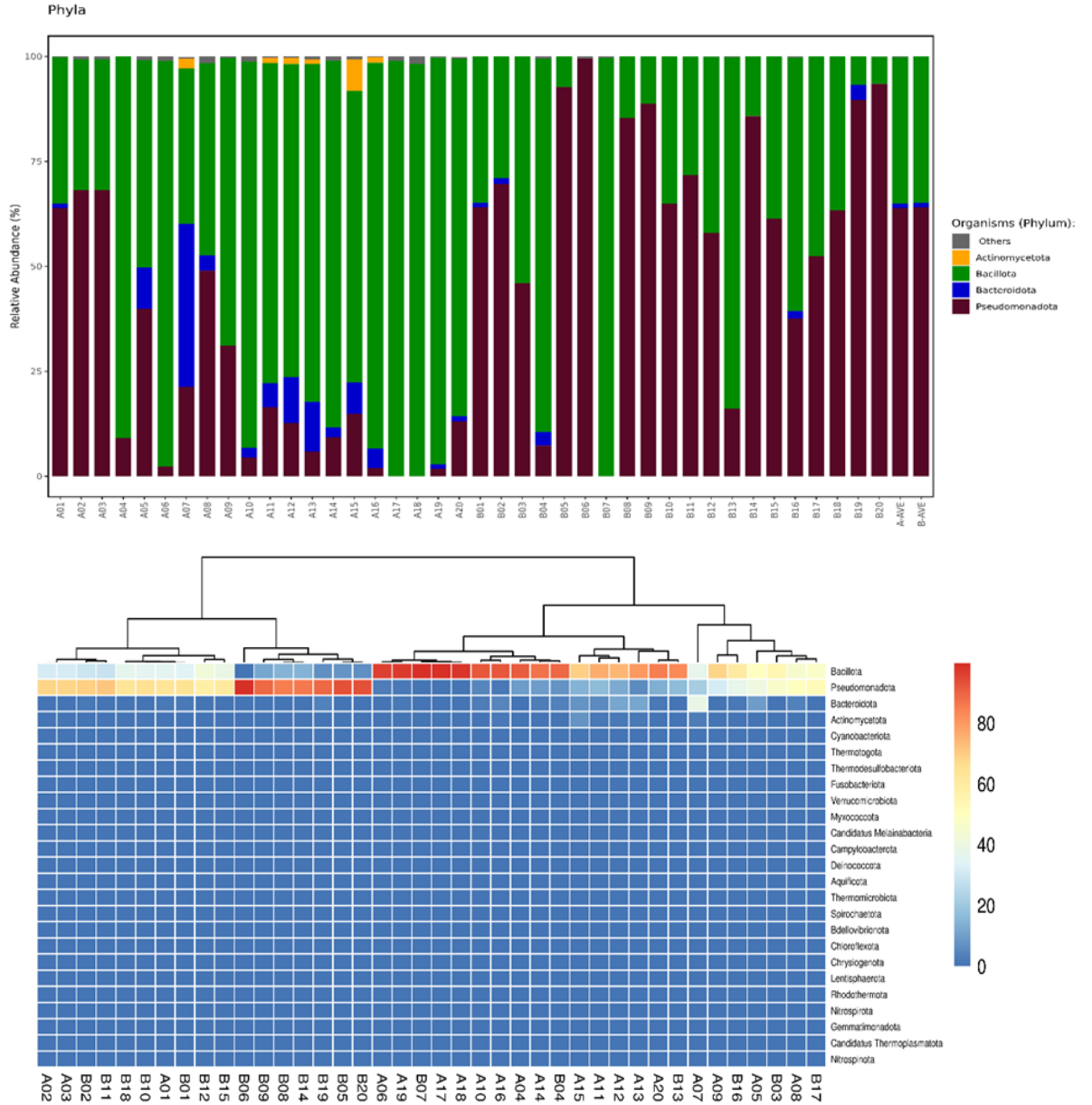
İncelenen 20 bebeğe ait mekonyum örneklerinde (A) toplam 25 filum saptanmıştır (Tablo 4-3). Ancak çeşitli antibiyotik kullanımı, VRE+KRKP kolonizasyon sonrası bu filumlardan sadece 13'si alınan rektal sürüntü örneklerinde (B) görülmüştür. Diğer 12 filum ise görülmemiştir (Tablo 4-3).

Tablo 4-3: Mekonyum (A) ve rektal örneklerde (B) saptanan filumların dağılımı.

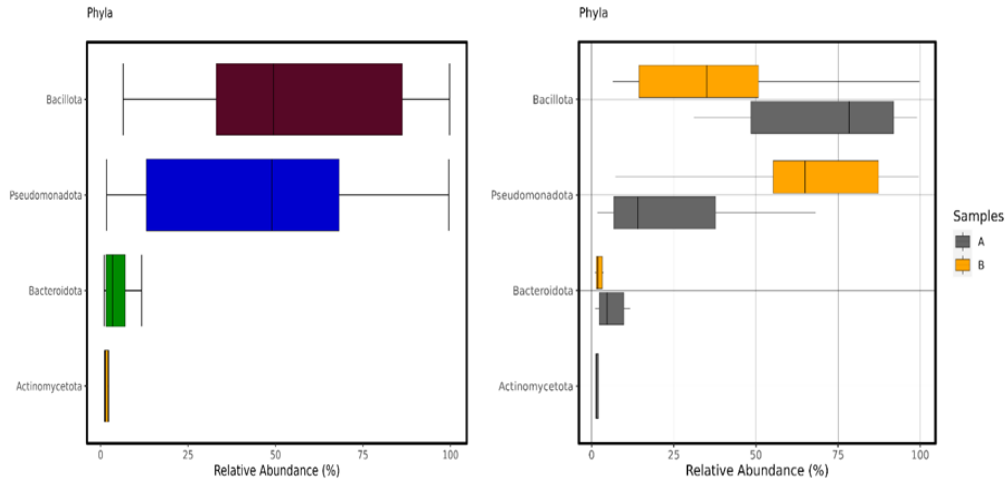
No	Filum	A grubu (n=20)		B grubu (n=20)		Toplam (n=40)	
		n	%	n	%	n	%
1	Actinomycetota	19	95	19	95	38	95
2	Aquificota	3	15	0	0	3	7,5
3	Bacillota	20	100	20	100	40	100
4	Bacteroidota	19	95	17	85	36	90
5	Bdellovibrionota	2	10	0	0	2	5
6	Campylobacterota	5	25	4	20	9	22,5
7	C. Melainabacteria	7	35	0	0	7	17,5
8	C. Thermoplasmatota	1	5	0	0	1	2,5
9	Chloroflexota	2	10	2	10	4	10
10	Chrysiogenota	2	10	0	0	2	5
11	Cyanobacteriota	13	65	3	15	16	40
12	Deinococcota	4	20	0	0	4	10
13	Fusobacteriota	4	20	1	5	5	12,5
14	Gemmatimonadota	1	5	0	0	1	2,5
15	Lentisphaerota	1	5	2	10	3	7,5
16	Myxococcota	2	10	0	0	2	5
17	Nitrospinota	1	5	0	0	1	2,5
18	Nitrospirota	1	5	0	0	1	2,5
19	Pseudomonadota	100	100	100	100	40	100
20	Rhodothermota	2	10	1	5	3	7,5
21	Spirochaetota	5	25	1	5	6	15
22	Thermodesulfobacteriota	9	45	3	15	12	30
23	Thermomicrobiota	1	5	0	0	1	2,5
24	Thermotogota	5	25	0	0	5	12,5
25	Verrucomicrobiota	7	35	3	15	10	25

Tüm örneklerde, yüzdesel olarak en yüksek görülen 4 filum sırasıyla; Bacillota, Pseudomonadota, Actinomycetota ve Bacteroidota olarak sıralanmıştır. Mekonyumlarda görülen filum çeşitliliği VRE+KRKP görülen rektal örneklere göre daha yüksek olduğu

görülmüştür (Şekil 4-3, 4-4). Bu filumlardan sadece biri (Pseudomonadota) rektal sürüntü örneklerinde mekonyum örneklerine göre anlamlı bir artış gösterirken diğer üç filumda anlamlı bir azalma kayıt edilmiştir. Aynı şekilde ikinci grupta Cyanobacteriota ve Verrucomicrobiota ve üçüncü grupta Thermodesulfobacteriota ve Candidatus Melainabacteria’da anlamlı azalma görülmüştür ($p<0,05$) (Tablo 4-4).

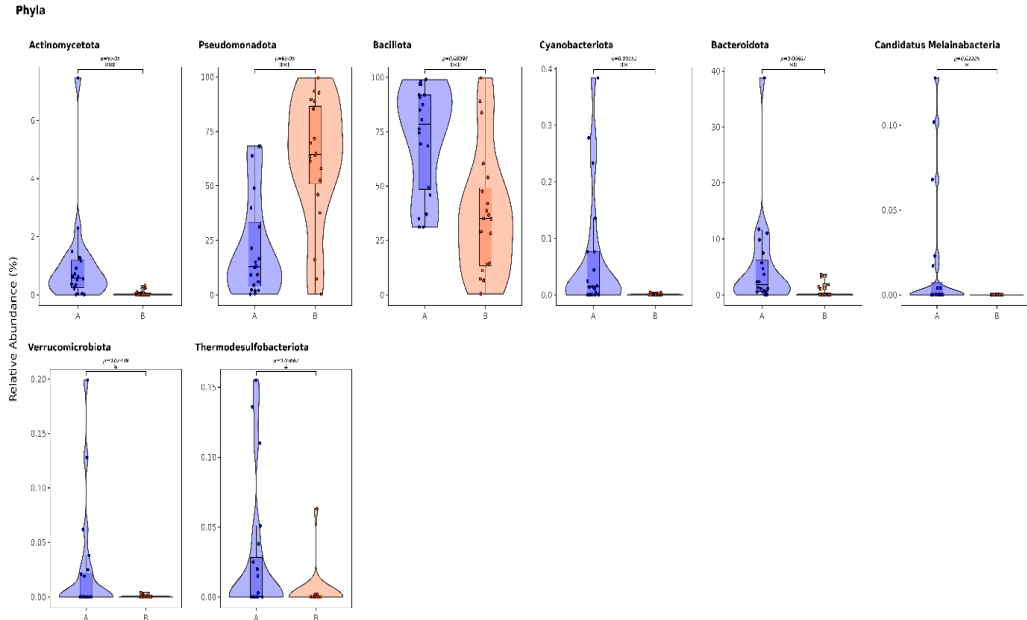


Şekil 4-3: Filumlara ait göreceli bollukların ifade edildiği çubuk grafiği ve ısı haritaları. (Üst) Grafikte, %1’den az olan filumlar (%0,66) ise gri renkte “others” olarak ifade edilmiştir. İfade edilen filumlardan Bacillota (%54,42), Pseudomonadota (%42,05), Bacteroidota (% 2,86) en bol olarak bulunmaktadır. (Alt) Örneklerde en yüksek oranda bulunan filumlar kırmızı renkte ifade edilmiştir. Renk skalası maviye doğru ilerledikçe filumların ifade yüzdesi azalmaktadır.



Şekil 4-4: Filumların ortalama (Sol) ve örnek gruplarında (Sağ) bulunma yüzdeleri. A: Mekonyum, B: VRE+KRKP görülen rektal örnek

8 filumda, gruplar arasında yüzdesel olarak anlamlı şekilde fark görülmüştür (Tablo 4-3). *Candidatus Melainabacteria* sadece mekonyum örneklerinde görülmüştür. Pseudomonadota, VRE/KRKP görülen örneklerde göreceli bolluğunda artış görülen tek filumdur (Şekil 4-5). Bakteri tür düzeyinde elde ettiğimiz başka önemli bir bulgu da Pseudomonadota’da *Enterococcus* spp. ve *Klebsiella* spp. gibi cinslerin özellikle VRE+KRKP kolonize rektal sürüntü örneklerinde anlamlı (%21,7138→%62,3941, $p=0,000057$) bir şekilde artışı olmuştur.



Şekil 4-5: Anlamlı fark gösteren filumların göreceli bolluk yüzde grafikleri.

4.5.1.1. Bebeklere Uygulanan Antibiyotiklere Göre Filumların Gruplandırılması

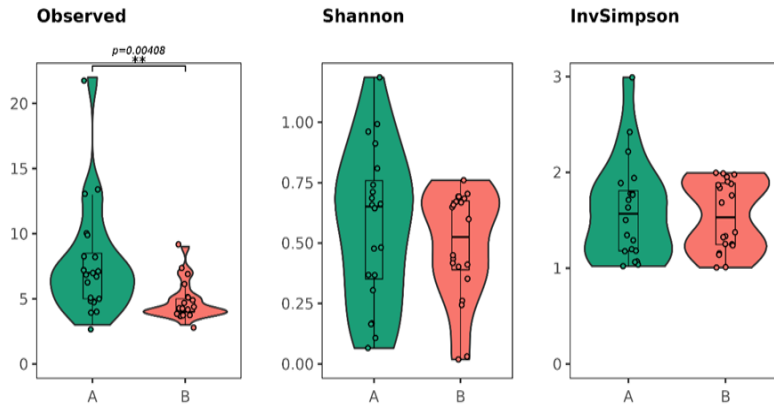
Mekonyumlarda saptanan 25 filum, profilaktik ve tedavi amacıyla kullanılan antibiyotiklere göre 3 grupta incelenmiştir:

- **1. Grup: Bebeklere kullanılan antibiyotiklerin etki spektrumunda olan ve insanlarda hastalık yapabilen filumlar.** Bu grup insan hastalıkları ile ilişkilendirilmiş bakterileri içeren 7 filumdur. Bu filumlar; Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota, Actinomycetota, Fusobacteriota, Spirochaetota ve Campylobacterota.
- **2. Grup: Bebeklere kullanılan antibiyotiklerin etki spektrumunda olan ve insanlarda hastalık yaptığı kanıtlanmayan filumlar.** Bu grup insan hastalıkları ile şimdilik ilişkisi kanıtlanmayan bakterileri içeren 6 filumdur. Bu filumlar; Chloroflexota, Cyanobacteriota, Deinococcota, Gemmatimonadota, Myxococcota ve Verrucomicrobiota.
- **3. Grup: Bebeklerde kullanılan antibiyotiklerinin etkisinin değerlendirilmediği filumlar.** Mekonyum örneklerinde çok düşük yüzdesel görülme gösteren (%0,0001-%0,0173) bir kısmı arke bakteriler gibi (Thermotogota, Candidatus Thermoplasmatota), arke bakteriler gibi görünüp gram negatif bakterileri baskılayan küçük virgül şeklinde bakteriler (Bdellovibrionota) veya siyanobakterilere benzeyen bakteriler (Candidatus Melainabacteria) olup genetik yapısı bilindiği halde hakkında yeterli bilgiye bulunmamaktadır. Bu grupta 12 filum bulunmaktadır. Bu filumlar; Thermodesulfobacteriota, Candidatus Melainabacteria, Thermotogota, Aquificota, Bdellovibrionota, Chrysiogenota, Rhodothermota, Candidatus Thermoplasmatota, Lentisphaerota, Nitrospinota, Nitrospirota ve Thermomicrobiota olarak belirlenmiştir (Tablo 4-4).

20 mekonyum örneğinde görülme sayısına göre filum yüzdeleri kıyaslandığında Bacillota ve Pseudomonadota %100, Bacteroidota ve Actinomycetota %95, Fusobacteriota %20, Spirochaetota ve Campylobacterota %25, kısaca birinci grupta bulunan filumlar örneklerin %20-%100'ünde görülmüştür. İkinci grupta bulunan filumlardan Cyanobacteriota %65, Verrucomicrobiota %35, Deinococcota %20,

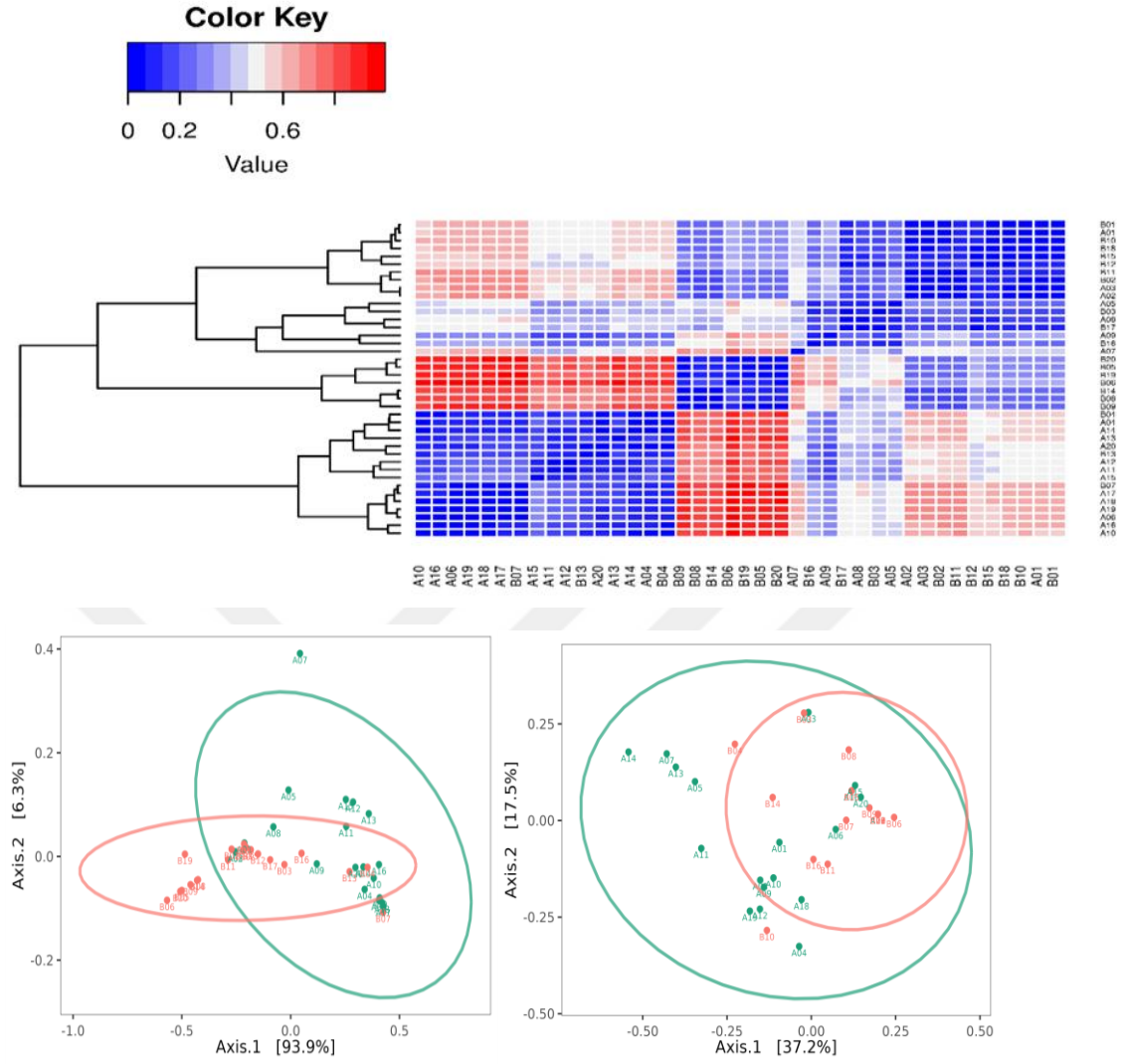
Myxococcota %10, Chloroflexota %10 ve Gemmatimonadota %5 olarak toplamda örneklerin %5-%65'inde saptanmış ve birinci gruba göre daha az örneklerde görülmüştür. Üçüncü grupta bulunan filumlar ise örneklerin %5-%45'inde bulunmuş ve filumların görüldüğü en düşük örnek sayısı bu grupta saptanmıştır.

Mekonyum örneklerinin alfa çeşitliliğinin analizinde Observed biyoçeşitlilik anlamlı şekilde azalmıştır ($p=0,004$). Shannon ve InvSimpson metrikleri arasında da anlamlı bir fark görülme de azalma tespit edilmiştir (Sırası ile $p=0,39$ ve $p=0,89$) (Şekil 4-6).



Şekil 4-6: Filum bazında örneklerin alfa biyoçeşitliliklerinin karşılaştırmalı grafikleri.
Dikey barlarda çeşitlilik sayısal olarak ifade edilmiştir.

Toplanan örneklerin beta biyoçeşitliliklerinin karşılaştırılması için Bray-Curtis ısı haritası kullanılmıştır. Bray-Curtis farklılığında sonuç 0 ise iki bölge aynı türü paylaşıyor; 1 ise hiçbir türü paylaşmıyor olarak değerlendirilmiştir. Filogenetik benzerlik analizi için UPGMA metriğinden faydalanılmıştır. Alfa ve Beta biyoçeşitlilikteki anlamlı şekilde farklılıkları da düşündüğümüzde doğumda var olan bazı filumların mikrobiyotadan elendikleri, Bacillota ve Pseudomonadota gibi filumların oransal olarak artarak yerleşik hale geldiği görülmüştür (Şekil 4-7).



Şekil 4-7: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal örneklerin filum bazında Bray-Curtis farklılığı ısı haritası. (Alt) Bray-Curtis Farklılığı (sol) ve Jaccard Uzaklığı (sağ) Temel Koordinat Analizi. Bray-Curtis farklılığı ısı haritasının sol kısmına UPGMA yöntemi ile örnekleri ortalama uzaklıklara göre gruplayan filogenetik ağaç çizilmiştir. Isı haritası verileri mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal örnekler arasında benzer filum elemanlarının sayısının azaldığı ancak yine de tam olarak farklılık göstermektedir. PCoA elips çiziminde için % 95 güven aralığı tercih edilmiştir. (Yeşil renk: Mekonyum, Turuncu renk: VRE/KRKP görülen örnekler)

Tablo 4-4: Mekonyum örnekleri (A örnekler) ve antibiyotik sonrası alınan rektal sürüntü (B örnekler) örneklerinde saptanan filumların yüzdesel görülme dağılımları.

Filumlar	Ortalama görülme yüzdesi		p değeri	Yorum
	A	B		
1.Grup (7 filum)				
Bacillota	71,851	36,9886	0,0009319	Anlamlı azalma
Pseudomonadota	21,7138	62,3941	0,000062	Anlamlı artış
Bacteroidota	5,157	0,565	0,006066	Anlamlı azalma
Actinomycetota	1,0071	0,0423	0,000047	Anlamlı azalma
Fusobacteriota	0,0285	0,00001	0,1056454	Anlamsız
Campylobacterota	0,0067	0,0041	0,3525421	Anlamsız
Spirochaetota	0,0033	0,0001	0,0590582	Anlamsız
2.Grup (6 filum)				
Cyanobacteriota	0,0655	0,0005	0,001511	Anlamlı azalma
Verrucomicrobiota	0,0246	0,0006	0,0243902	Anlamlı azalma
Myxococcota	0,019	0	0,3710934	Anlamsız
Deinococcota	0,0053	0	0,1003482	Anlamsız
Chloroflexota	0,0009	0,0004	0,4226781	Anlamsız
Gemmatimonadota	0,0002	0	1	Anlamsız
3. Grup (12 filum)				
Thermotogota	0,0402	0	0,0590582	Anlamsız
Thermodesulfobacteriota	0,0277	0,0034	0,0366713	Anlamlı azalma
Candidatus Melainabacteria	0,0173	0	0,0222541	Anlamlı azalma
Aquificota	0,0042	0	0,1814492	Anlamsız
Thermomicrobiota	0,0041	0	1	Anlamsız
Bdellovibrionota	0,0021	0	0,3710934	Anlamsız
Chrysiogenota	0,0008	0	0,3710934	Anlamsız
Rhodothermota	0,0004	0,0002	1	Anlamsız
Nitrospirota	0,0003	0	1	Anlamsız
Candidatus Thermoplasmatota	0,0002	0	1	Anlamsız
Nitrospinota	0,0002	0	1	Anlamsız
Lentisphaerota	0,0001	0,0005	0,5862137	Anlamsız

4.5.1.2. İkizlerde Filumların A ve B Örneklerinde Ortalama Yüzdeleri

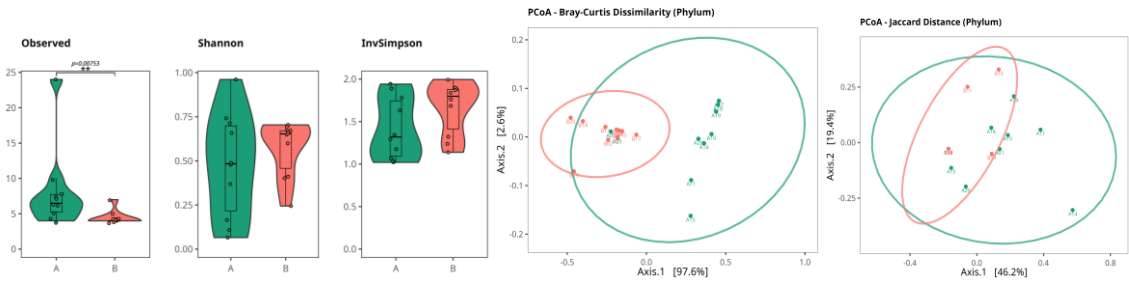
İkiz bebeklerin A ve B örneklerinin filumların yüzdesel görülmeleri karşılaştırıldığında Bacillota'da anlamlı bir düşüş ($p=0,001953$), Pseudomonadota'da ise anlamlı bir artış ($p=0,001953$) olduğunu ve diğer filumlarda ise bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: İkiz bebeklerin A ve B örneklerinde saptanan filumların yüzdesel ortalama görülme değerleri

Filum	A ort.	B ort.	p değeri	Yorum
Actinomycetota	1,1716	0,0133	0,414520	Anlamsız
Aquificota	0,0007	0	0,100348	Anlamsız
Bacillota	77,0646	27,7494	0,001953	Anlamli azalma
Bacteroidota	2,2748	0,6156	0,307749	Anlamsız
Bdellovibrionota	0,0004	0	0,100348	Anlamsız
Campylobacterota	0,0015	0,0004	0,100348	Anlamsız
Candidatus Melainabacteria	0,0255	0	0,100348	Anlamsız
Chlorobiota	0,0002	0	0,100348	Anlamsız
Chloroflexota	0,0011	0,0004	0,100348	Anlamsız
Chrysiogenota	0,0002	0	0,100348	Anlamsız
Cyanobacteriota	0,0447	0,0006	0,100348	Anlamsız
Deinococcota	0,0067	0	0,100348	Anlamsız
Fusobacteriota	0,0004	0	0,100348	Anlamsız
Gemmatimonadota	0,0004	0	0,100348	Anlamsız
Lentisphaerota	0,0002	0	0,100348	Anlamsız
Myxococcota	0,0002	0	0,100348	Anlamsız
Nitrospinota	0,0003	0	0,100348	Anlamsız
Nitrospirota	0,0006	0	0,100348	Anlamsız
Pseudomonadota	19,2747	71,6199	0,001953	Anlamli artış
Rhodothermota	0,0006	0	0,100348	Anlamsız
Spirochaetota	0,0015	0	0,100348	Anlamsız
Synergistota	0,01	0	0,100348	Anlamsız
Thermodesulfobacteriota	0,0079	0,0004	0,100348	Anlamsız
Thermotogota	0,0748	0	0,100348	Anlamsız
Verrucomicrobiota	0,0234	0	0,100348	Anlamsız

4.5.1.3. İkiz Bebeklerde Biyoçeşitlilik Analizi

İkiz bebeklerde observed alfa çeşitliliğinde anlamlı şekilde azalma tespit edilmiştir ($p=0,00753$). Shannon ve InvSimpson metriklerinde ise istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir ($p \geq 0,05$). Beta çeşitlilikte belirgin şekilde olmasa da mekonyumlar ve rektal sürüntü örneklerinde varyans azalması görülmüştür (Şekil 4-8).



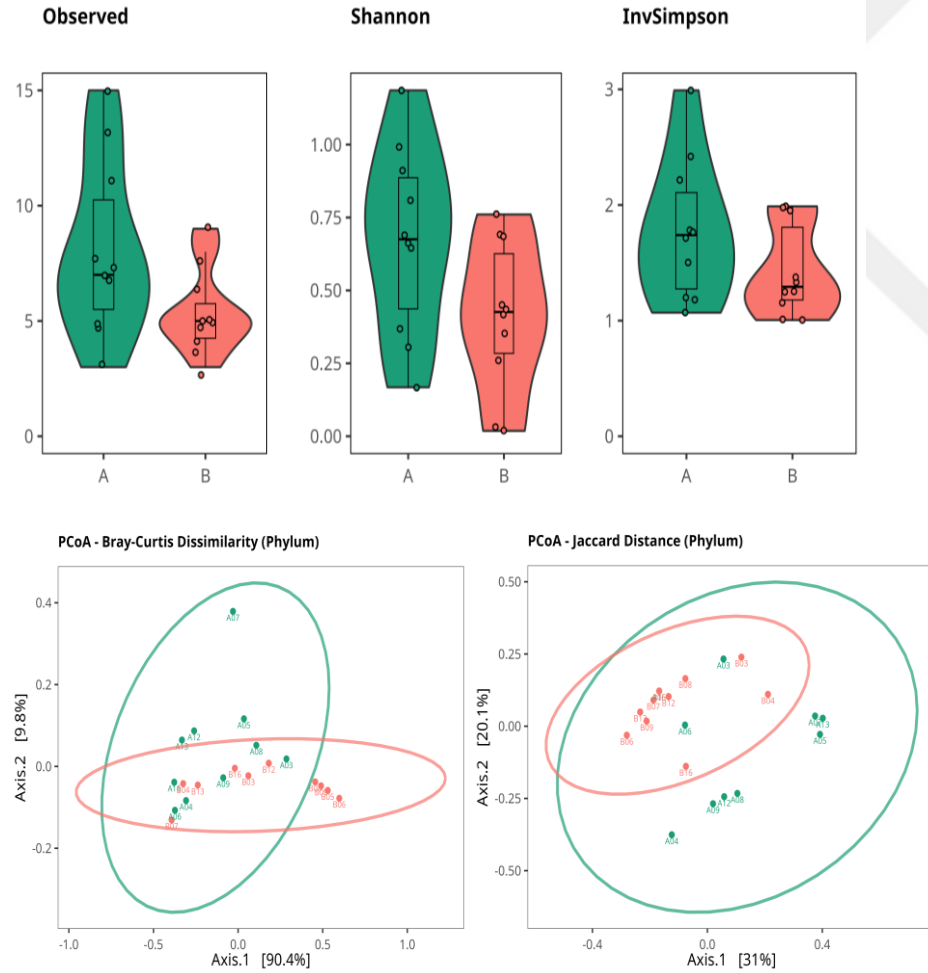
Şekil 4-8: (Sol) İkiz bebeklerin alfa biyoçeşitlilik grafikleri, (Orta) Bray-Curtis Farklılığı ve (Sağ) Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.

4.5.1.4. İkiz Olmayan Bebeklerde Filumların A ve B Örneklerinde Ortalama Yüzdeleri

İkiz olmayan bebeklerin A ve B örneklerinin filumların yüzdesel görülmeleri karşılaştırıldığında Bacillota'da anlamlı düşüş ($p=0,003274982$) ve Pseudomonadota'da ise anlamlı artış ($p=0,001953125$) olduğunu ve diğer filumlarda ise bir değişiklik olmadığı belirlenmiştir (Tablo 4-6).

4.5.1.5. İkiz Olmayan Bebeklerde Biyoçeşitlilik Analizi

İkiz olmayan bebeklerin alfa çeşitliliğinde anlamlı farklılık görülmedi ($p \geq 0,05$). Beta çeşitlilikte de ikiz bebeklerdeki kadar olmasa da varyanslarda azalma tespit edilmiştir (Şekil 4-9).



Şekil 4-9: (Sol) İkiz olmayan bebeklerin alfa biyoçeşitlilik grafikleri, (Orta) Bray-Curtis Farklılığı ve (Sağ) Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.

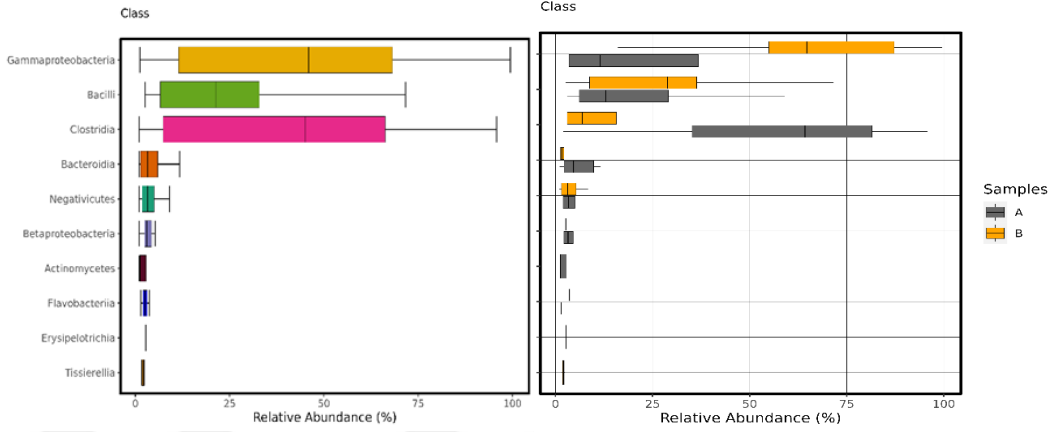
Tablo 4-6: İkiz olmayanlarda A ve B örneklerinde saptanan filumların yüzdesel ortalama görülme değerleri.

Filum	A ort	B ort	p değeri	Yorum
Actinomycetota	0,8427	0,0712	0,05802402	Anlamsız
Aquificota	0,0076	0	0,181449208	Anlamsız
Bacillota	66,6373	46,2279	0,003274982	Anlamli azalma
Bacteroidota	8,0393	0,5145	0,232421875	Anlamsız
Bdellovibrionota	0,0038	0	0,181449208	Anlamsız
Campylobacterota	0,0119	0,0078	0,674986714	Anlamsız
Candidatus Melainabacteria	0,0091	0	0,181449208	Anlamsız
Candidatus Thermoplasmatota	0,0003	0	0,181449208	Anlamsız
Chlorobiota	0,0007	0	0,181449208	Anlamsız
Chloroflexota	0,0007	0,0003	0,201242621	Anlamsız
Chrysiogenota	0,0014	0	0,181449208	Anlamsız
Cyanobacteriota	0,0863	0,0004	0,181449208	Anlamsız
Deinococcota	0,0038	0	0,181449208	Anlamsız
Fusobacteriota	0,0566	0,0001	0,201242621	Anlamsız
Gemmatimonadota	0	0,0011	0,201242621	Anlamsız
Lentisphaerota	0,0031	0,0004	0,278517024	Anlamsız
Myxococcota	0,0378	0	0,181449208	Anlamsız
Pseudomonadota	24,1529	53,1683	0,001953125	Anlamli artış
Rhodothermota	0,0002	0,0004	0,201242621	Anlamsız
Spirochaetota	0,0051	0,0002	0,201242621	Anlamsız
Thermodesulfobacteriota	0,0474	0,0063	0,583882421	Anlamsız
Thermomicrobiota	0,0082	0	0,181449208	Anlamsız
Thermotogota	0,0055	0	0,181449208	Anlamsız
Verrucomicrobiota	0,0258	0,0011	0,280712665	Anlamsız

4.5.1.6. İkiz ve İkiz Olmayan Bebeklerin Rektal Sürüntü Örneklerinde Filumların ve Bakteri Cinslerin Yüzdesel Görünmelerinin Karşılaştırılması

İkiz bebeklerin mekonyum örneklerinde bulunan tıbbi olarak patojenitesi kanıtlanmış bakteri cinsleri rektal sürüntü örneklerine göre daha yüksek göreceli bollukta tespit edilmiştir. Örneğin Bacillota'dan *Streptococcus* spp. rektal örneklerde saptanan yüzdesel görülme oranları (%0,2825) mekonyum örneklerine göre (%3,7553) anlamlı bir düşüş gösterirken ($p=0,04579$), aynı filumda bulunan *Enterococcus* spp.'de bunun tam tersi görülmüştür. Enterokokların rektal örneklerinde saptanan yüzdesel görülme oranları (%23,0507) mekonyum örneklerine (%9,047) anlamlı bir yükseliş göstermiştir ($p=0,04579$). İkiz olmayan bebeklerde mekonyumlar ile rektal sürüntü örneklerinde

Mekonyumlarda, Clostridia (%49,30) ve Bacilli'nin (%19,35), rektal sürüntü örneklerinde Gammaproteobacteria'nın (%62,13) baskın olduğu saptanmıştır (Şekil 4-11).

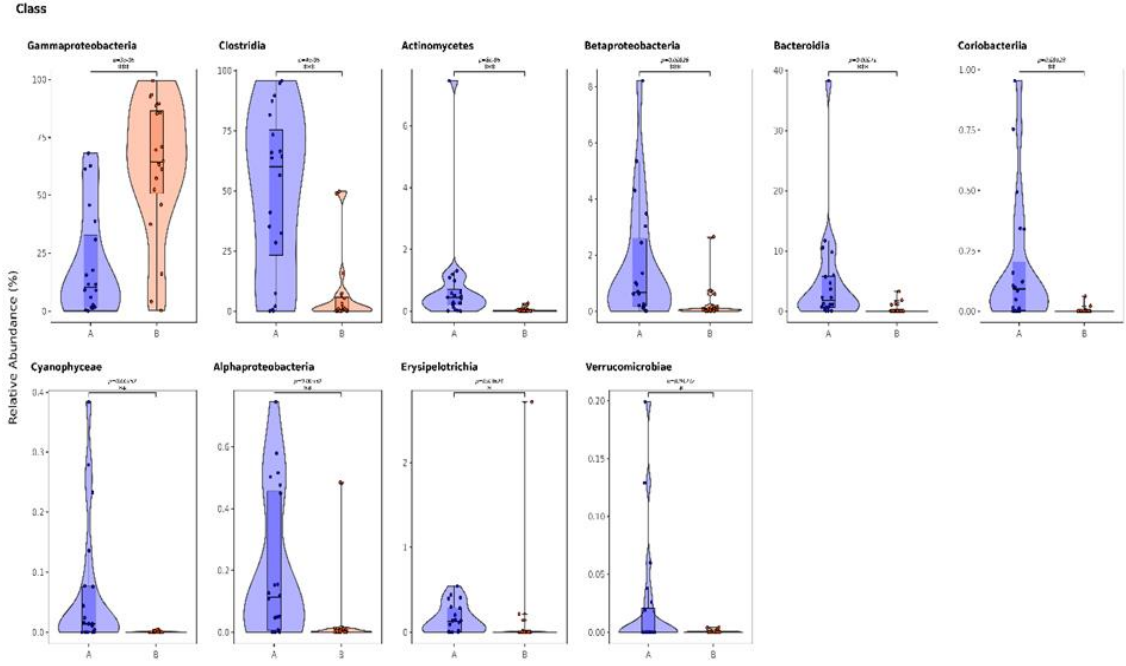


Şekil 4-11: Sınıfların Ortalama (Sol) ve Örnek Gruplarında (Sağ) Bulunma Yüzdeleri

10 sınıfta da istatistiksel olarak anlamlı farklar saptanmıştır (Şekil 4-12). Gammaproteobacteria hariç tüm sınıflarda azalma görülmüştür (Tablo 4-7).

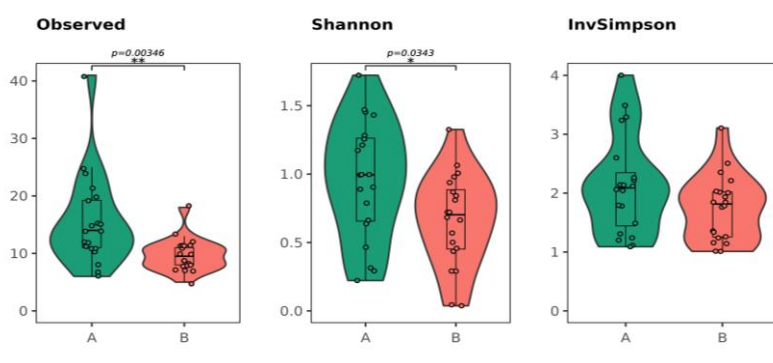
Tablo 4-7: Mekonyum örnekleri (A) ve antibiyotik sonrası alınan rektal sürüntü (B) örneklerinde saptanan sınıfların yüzdesel görülme dağılımları.

Filumlar	Sınıf	A	B	p değeri	Yorum
Pseudomonadota	Gammaproteobacteria	19,86	62,12	0,00003	Anlamlı Artış
	Betaproteobacteria	1,65	0,24	0,00026	Anlamlı Azalma
	Alphaproteobacteria	0,21	0,028	0,00352	Anlamlı Azalma
Actinomycetes	Actinomycetes	0,82	0,038	0,00008	Anlamlı Azalma
Actinomycetota	Coriobacteriia	0,18	0,005	0,00123	Anlamlı Azalma
Bacteroidota	Bacteroidia	5,02	0,38	0,00071	Anlamlı Azalma
Cyanobacteriota	Cyanophyceae	0,07	0,0005	0,00152	Anlamlı Azalma
Bacillota	Clostridia	49,31	7,14	0,00004	Anlamlı Azalma
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	0,02	0,0005	0,04232	Anlamlı Azalma



Şekil 4-12: Anlamli fark gösteren sınıfların göreceli bolluk yüzde grafikleri. İstatistiksel olarak anlamli farka sahip OTU'lar arasında sadece Gammaproteobacteria sınıfı dirençli koloni izlenen rektal örnekte yüzdesel olarak artış görülürken diğer OTU'larda azalma görüldü. *Clostridium* spp. gibi bağırsaklarda yüksek oranda bulunan anaeroblari barındıran Clostridia sınıfındaki azalma da dikkate değerdir.

Mekonyum örneklerinde alfa biyoçeşitlilik Observed ($p=0,00346$) ve Shannon indeksinde anlamli şekilde azaldığı ($p=0,0343$) görülmüştür. InvSimpson metrikleri arasında anlamli bir fark görülmemiştir ($p=0,245$) (Şekil 4-13).

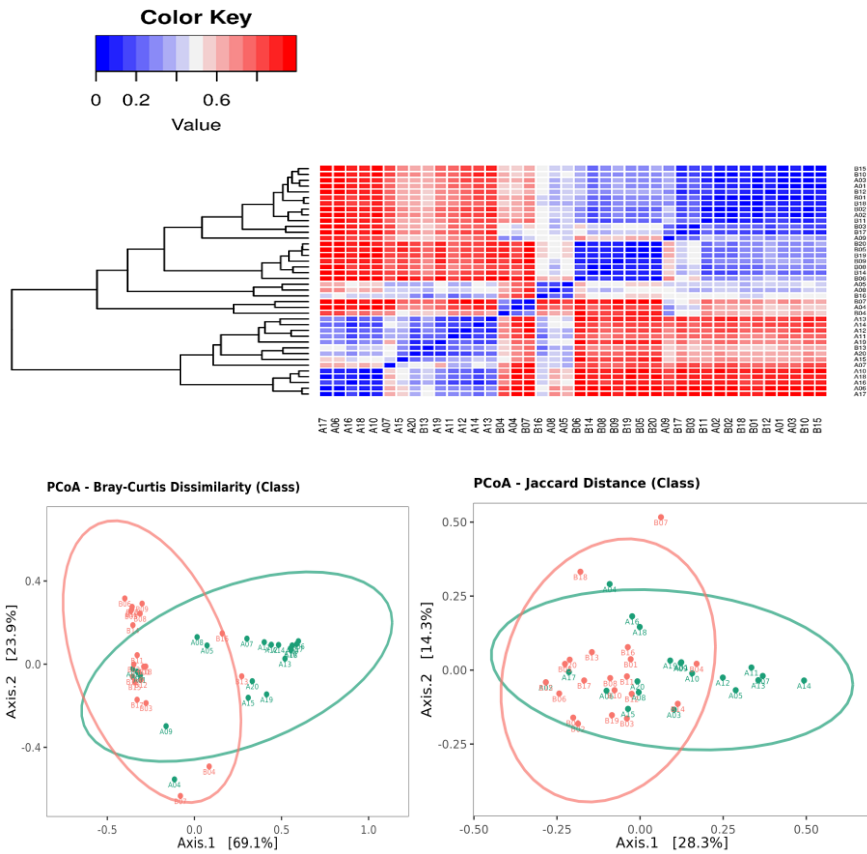


Şekil 4-13: Örnek gruplarının sınıf bazında alfa çeşitliliklerinin karşılaştırılması.

Sınıf seviyesi için elde edilen ısı haritalarında mekonyumlarda tespit edilen sınıfların rektal sürüntü örneklerine göre farklılık saptanmıştır. *Culicoidibacteria*, *Deferrisomatia*, *Desulfobulbia* ve *Ktedonobacteria* gibi hiçbir mekonyum örneğinde görülmeyp sadece rektal sürüntülerde kolonize olan sınıfların etkisi ile örneklerin biyoçeşitliliklerinde ve filogenetik uzaklıklarında değişim tespit edilmiştir (Şekil 4-14).

KRKP kolonizasyonunun ilk görüldüğü 5 numaralı bebekte (Gen+Amp) Negativicutes, Bacteroidia ve Clostridia mikrobiyotadan elenmiştir. 6 numaralı bebekte (Gen+P) Clostridia (%94,79→%0,14) Gammaproteobacteria kaynaklı (%1,52→%99,49) baskılanmıştır. Bu bebeklerin serviste kaldıkları sürece maruz kaldıkları şartlar tam olarak birbiri ile eşitlik göstermemiş olsa da profilakside kullanılan antibiyotik tipinin mikrobiyota yapısında değişime neden olduğu tespit edilmiştir.

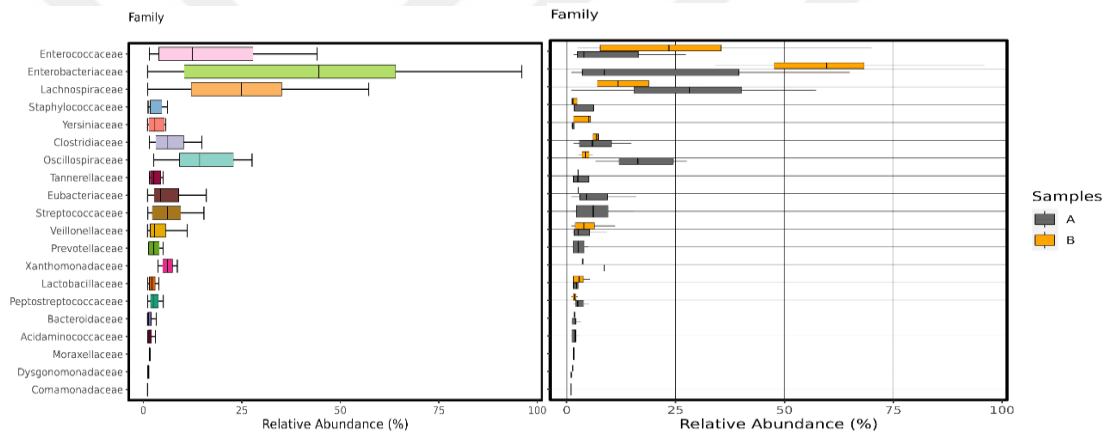
İkiz bebeklerden 10 numaralı bebeğin (TEC+CTX, V+MEM) mekonyumunda Betaproteobacteria, Bacteroidia, Negativicutes ve Clostridia; 11 numaralı bebekte (TEC+CTX, TEC+MEM) Clostridia, Negativicutes ve Bacteroidia %1'den az orana baskılandığı tespit edilmiştir. 10 numaralı bebekte Betaproteobacteria'nın yüksek oranda baskılanması, ikiz kardeşinden farklı olarak vankomisin tedavisinden kaynaklanmış olabilir.



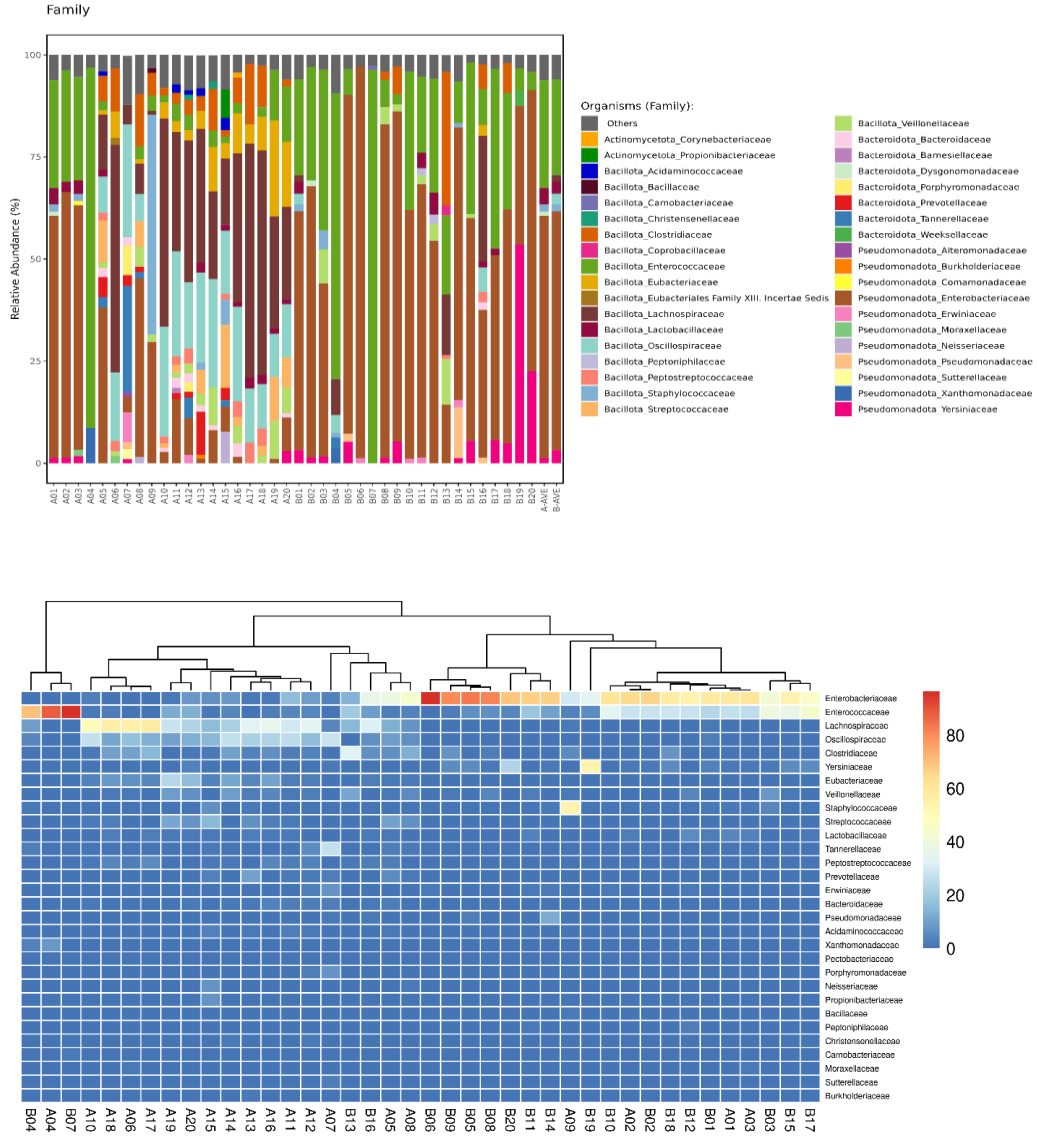
Şekil 4-14: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal örneklerin sınıf bazında Bray-Curtis farklılığı ısı haritası. (Alt) Bray-Curtis Farklılığı ve Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.

4.5.3. Aile (Family) Seviyesinde OTU Analizi

Bebeklere ait örneklerde toplamda 310 aile saptanmıştır. Bu ailelerden 126 tanesi (%40,6) sadece mekonyumlarda, 37 tanesi (%11,9) sadece rektal sürüntülerde saptanmıştır. *Enterobacteriaceae* (%35,56) ve *Enterococcaceae* (%18,35) her iki grup ortalaması olarak en yüksek oranda görülen sınıf olarak saptanmıştır. Mekonyumlarda en yüksek oranda *Lachnospiraceae* (%23,38), rektal sürüntü *Enterobacteriaceae* (%53,45) en bol görüldüğü saptanmıştır. Anaerobik takson *Lachnospiraceae* (%23,38→%2,90) mekonyumlarda, rektal sürüntülerde ise *Enterobacteriaceae* (%53,45) ve *Enterococcaceae*'nin (%25,56) en bol oldukları saptanmıştır. Örneklerin sahip oldukları mikrobiyota kompozisyonlarının dağılımı Şekil 4-15 ve 4-16'da ifade edilmiştir. 56 ailenin yüzdesi anlamlı farklılık saptanmıştır (Tablo 4-8).



Şekil 4-15: (Sol) Ailelerin tüm örneklerde ortalama bulunma yüzdesi, (Sağ) Mekonyum ve dirençli koloni tespit edilen örnek grupları ayrıştırılarak ailelerin bulunma yüzdeleri.



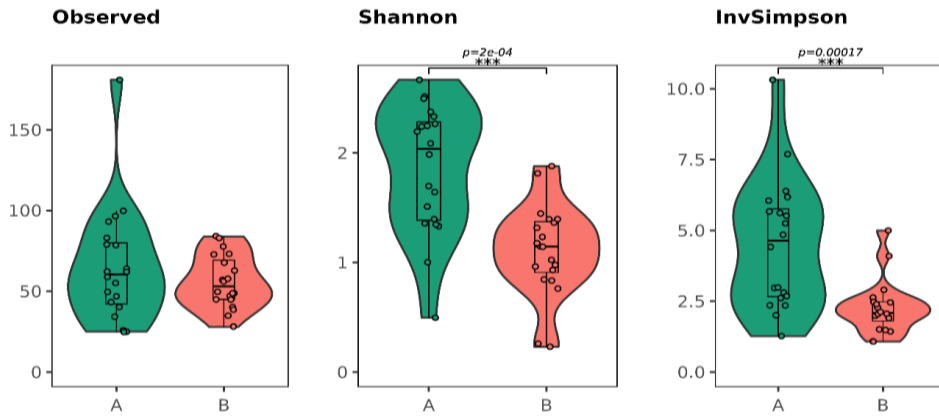
Şekil 4-16: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen örneklerin ailelerin dağılımları, (Alt) Örneklerin içerdiği baskın aileleri gösterir ısı haritası ve filogenetik metriği. %1'den daha az yoğunluğa sahip OTU'lar "others" başlığında birleştirilmiştir. Her iki grubun ortalamasına bakıldığında *Enterobacteriaceae* ve *Enterococcaceae* ailelerinin baskın oldukları görülmektedir. Örneğin 6 numaralı bebeğe ait mekonyum örneğinde *Bacillaceae* ailesi baskın halde iken, dirençli bakteri kolonizasyonu görülen örnekte bu ailenin tabloda ifade edilme yüzdesi olan %1'den daha az olacak şekilde baskılandığı, baskın ailenin *Enterobacteriaceae* olduğu görülmektedir.

Tablo 4-8: Mekonyum örnekleri (A) ve antibiyotik sonrası alınan rektal sürüntü (B) örneklerinde saptanan ailelerin yüzdesel görülme dağılımları.

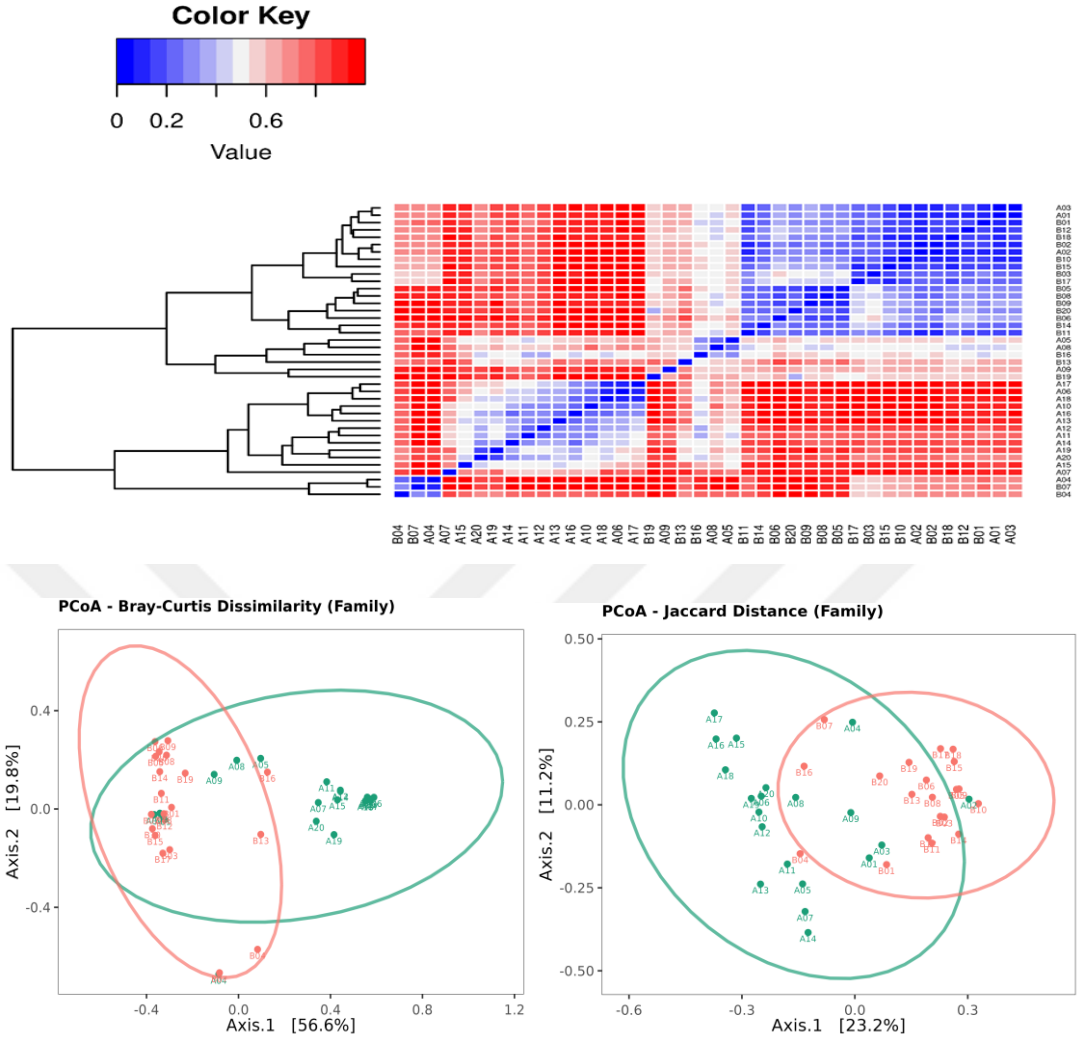
Aile	A	B	<i>p</i> değeri	Yorum
<i>Acidaminococcaceae</i>	0,6138	0,0191	0,002200013	Anlamli azalma
<i>Aeromonadaceae</i>	0,012	0,0274	0,00159806	Anlamli artiş
<i>Pseudoalteromonadaceae</i>	0,0014	0,0175	0,00109394	Anlamli artiş
<i>Psychromonadaceae</i>	0,0008	0,0027	0,023184249	Anlamli artiş
<i>Shewanellaceae</i>	0,0068	0,013	0,007991698	Anlamli artiş
<i>Colwelliaceae</i>	0,0022	0,0051	0,010960575	Anlamli artiş
<i>Listeriaceae</i>	0,0237	0,0538	0,036580351	Anlamli artiş
<i>Thermoactinomycetaceae</i>	0,0162	0,0012	0,013020217	Anlamli azalma
<i>Oxalobacteraceae</i>	0,0474	0	0,009151689	Anlamli azalma
<i>Sutterellaceae</i>	0,2885	0,0118	0,001515739	Anlamli azalma
<i>Comamonadaceae</i>	0,2094	0,041	0,014353894	Anlamli azalma
<i>Atopobiaceae</i>	0,0204	0,0001	0,034610558	Anlamli azalma
<i>Coriobacteriaceae</i>	0,0586	0,0032	0,034101509	Anlamli azalma
<i>Bacteroidaceae</i>	0,9641	0,1314	0,0004685	Anlamli azalma
<i>Odoribacteraceae</i>	0,066	0,0005	0,005099322	Anlamli azalma
<i>Porphyromonadaceae</i>	0,5411	0,0004	0,021738681	Anlamli azalma
<i>Prevotellaceae</i>	1,4104	0,0241	0,000850677	Anlamli azalma
<i>Rikenellaceae</i>	0,0755	0,0024	0,006946698	Anlamli azalma
<i>Tannerellaceae</i>	1,8918	0,1341	0,010479751	Anlamli azalma
<i>Bruguierivoracaceae</i>	0,0276	0,1737	0,001039036	Anlamli artiş
<i>Budviaceae</i>	0,0104	0,0686	0,000029088	Anlamli artiş
<i>Enterobacteriaceae</i>	17,6792	53,4482	0,000019727	Anlamli artiş
<i>Hafniaceae</i>	0,0096	0,0575	0,002296914	Anlamli artiş
<i>Morganellaceae</i>	0,0516	0,1802	0,000394821	Anlamli artiş
<i>Pectobacteriaceae</i>	0,1248	0,4659	0,000014881	Anlamli artiş
<i>Thorselliaceae</i>	0,0013	0,0034	0,002465499	Anlamli artiş
<i>Yersiniaceae</i>	0,5525	5,7443	0,001197413	Anlamli artiş
<i>Erwiniaceae</i>	0,6113	0,7123	0,008308411	Anlamli artiş
<i>Christensenellaceae</i>	0,3522	0,0046	0,000653585	Anlamli azalma
<i>Eubacteriaceae</i>	5,008	0,191	0,000047684	Anlamli azalma
<i>Eubacteriales Family XIII</i>	0,1752	0,0026	0,002655082	Anlamli azalma
<i>Lachnospiraceae</i>	23,3803	2,9023	0,000315247	Anlamli azalma
<i>Oscillospiraceae</i>	13,2117	0,7106	0,000027517	Anlamli azalma
<i>Peptococcaceae</i>	0,0346	0,0004	0,045020881	Anlamli azalma
<i>Peptostreptococcaceae</i>	1,4754	0,2397	0,002325058	Anlamli azalma
<i>Vallitaleaceae</i>	0,0039	0,0006	0,040920864	Anlamli azalma
<i>Clostridiaceae</i>	4,6792	2,9209	0,011898635	Anlamli azalma
<i>Chromatiaceae</i>	0,0132	0,0163	0,012807115	Anlamli artiş

<i>Ectothiorhodospiraceae</i>	0,001	0,0044	0,024463932	Anlamli artış
<i>Corynebacteriaceae</i>	0,2519	0,017	0,000429613	Anlamli azalma
<i>Mycobacteriaceae</i>	0,0174	0	0,036031686	Anlamli azalma
<i>Eggerthellaceae</i>	0,1174	0,0015	0,001329052	Anlamli azalma
<i>Enterococcaceae</i>	11,1454	25,5625	0,012079239	Anlamli artış
<i>Lactobacillaceae</i>	1,4299	0,8997	0,048440933	Anlamli azalma
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0,0972	0,02	0,004932472	Anlamli azalma
<i>Flavobacteriaceae</i>	0,0737	0,0003	0,009090698	Anlamli azalma
<i>Methylococcaceae</i>	0,0104	0,0404	0,007724234	Anlamli artış
<i>Microbacteriaceae</i>	0,0839	0,0008	0,016315528	Anlamli azalma
<i>Micrococcaceae</i>	0,0711	0,0004	0,005822758	Anlamli azalma
<i>Neisseriaceae</i>	0,4757	0,0022	0,014266187	Anlamli azalma
<i>Oceanospirillaceae</i>	0,0053	0,0172	0,04633273	Anlamli artış
<i>Orbaceae</i>	0,0006	0,0053	0,001078475	Anlamli artış
<i>Pasteurellaceae</i>	0,0864	0,0166	0,017181396	Anlamli azalma
<i>Streptococcaceae</i>	3,2944	0,2217	0,003152847	Anlamli azalma
<i>Akkermansiaceae</i>	0,0251	0,0006	0,042315275	Anlamli azalma
<i>Vibrionaceae</i>	0,0383	0,0971	0,003512662	Anlamli artış

Rektal sürüntülerde observed alfa çeşitlilikte anlamlı fark tespit edilmemiştir ($p=0,52$). Aksine, Shannon ($p=0,00004$) ve InvSimpson ($p=0,00017$) metriğinde istatistiksel olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir (Şekil 4-17). Mekonyumlar ile rektal sürüntü örnekleri arasında taksonlarda farklılık ve filogenetik olarak uzaklaşma tespit edilmiştir (Şekil 4-18).



Şekil 4-17: Örnek gruplarında aile seviyesinde alfa çeşitlilik karşılaştırılması.

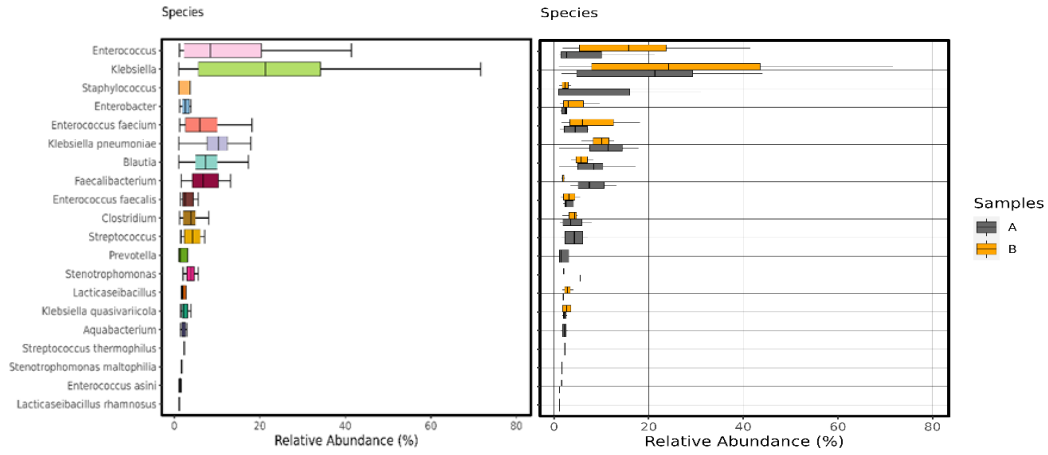


Şekil 4-18: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal örneklerin aile bazında Bray-Curtis farklılığı ısı haritası. (Alt) Bray-Curtis Farklılığı (sol) ve Jaccard Uzaklığı (sağ) Temel Koordinat Analizi.

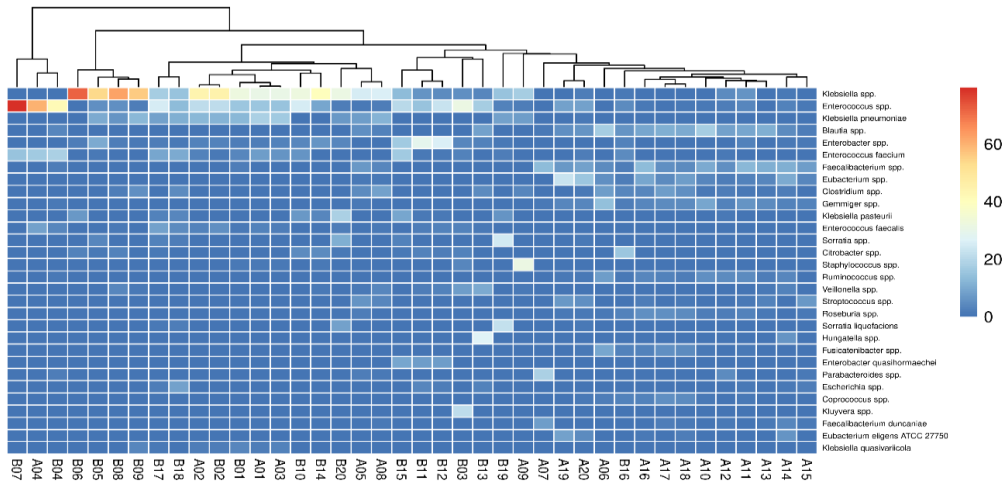
4.5.4. Tür (Species) Bazında OTU Analizi

20 bebeğe ait örneklerde toplamda 2594 tür tespit edilmiştir. Bunlardan 924 tanesi (%35,6) sadece mekonyumlarda, 574 tanesi (%22,1) sadece rektal sürüntülerde tespit edilmiştir. En bol görülen ilk on tür *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, *E. faecium*, *K. pneumoniae*, *Blautia spp.*, *Faecalibacterium spp.*, *E. faecalis*, ve *Clostridium spp.* olarak tespit edilmiştir. *Klebsiella* ve *Enterococcus* rektal sürüntülerde en fazla görülen ilk iki tür olurken; mekonyum örneklerinde *Klebsiella spp.* ve *Staphylococcus spp.* en yüksek iki tür olarak tespit edilmiştir. Örnek grupları arasındaki değişim oranları karşılaştırıldığında en

yüksek oradan değişim *Staphylococcus* spp.'de tespit edilmiştir (azalma yönünde) (Şekil 4-19, 4-20).



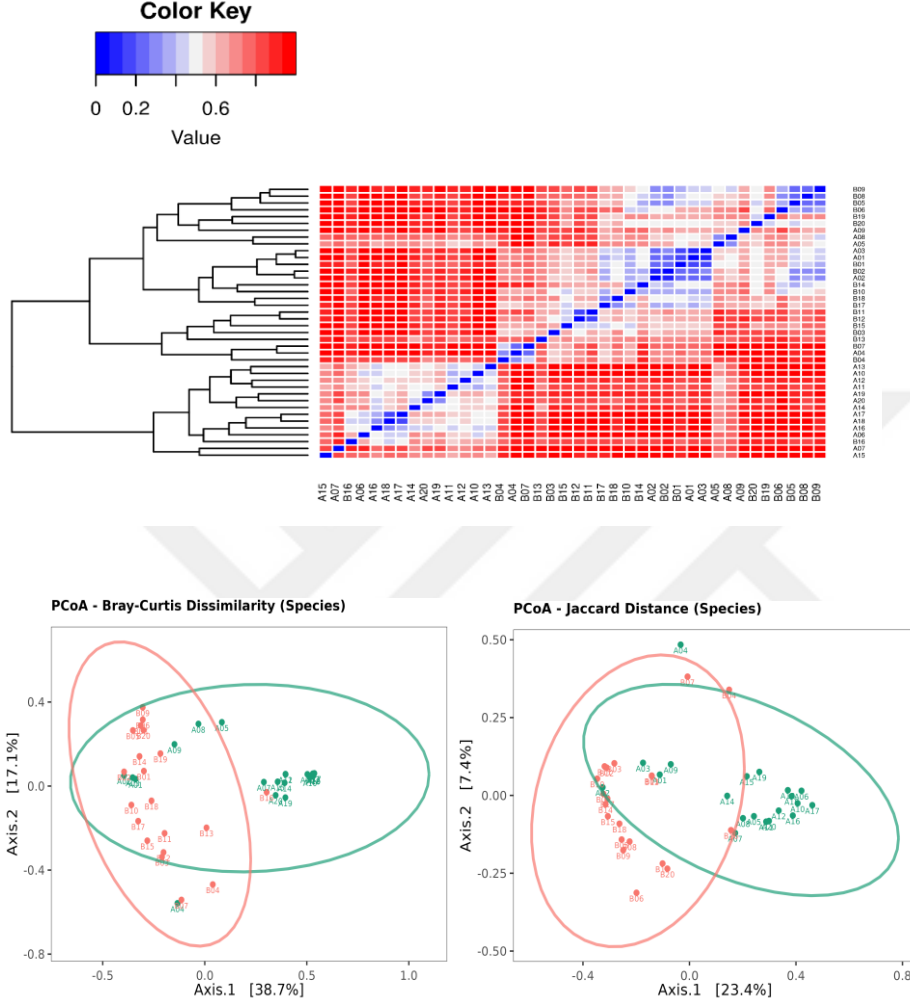
Şekil 4-19: (Sol) Örneklerde en bol bulunan türlerin ortalama bulunma yüzdesi. (Sağ) Mekonyum ve rektal sürüntü örneklerinde türlerin bulunma yüzdeleri



Şekil 4-20: Örnek bazında en yüksek göreceli bolluğa sahip 30 türe ait ısı haritası ve filogenetik uzaklık haritası.

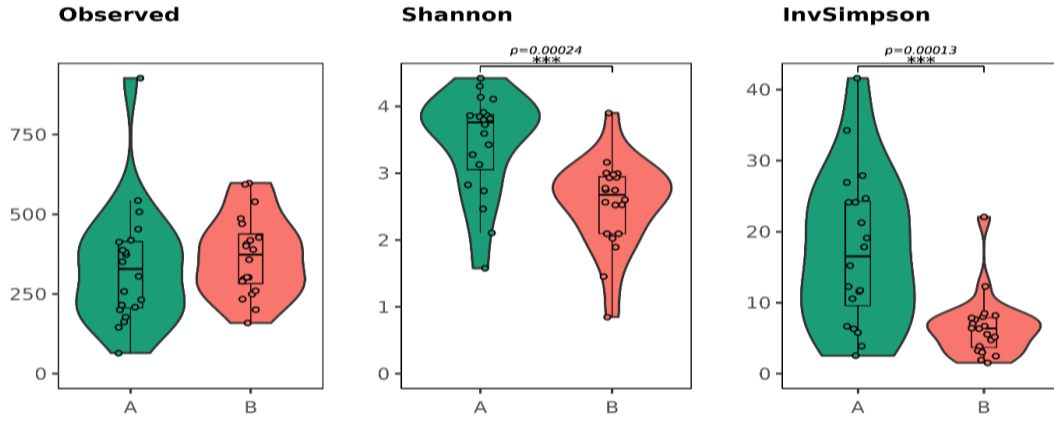
Bifidobacterium spp.'nin mekonyumlarda görülen oranına (%0,005) göre rektal sürüntülerde (%0,0128) görülme yüzdesi artmış olsa da bu artışın istatistiksel olarak anlam ifade etmediği tespit edilmiştir ($p \geq 0,05$). *Akkermansia* spp.'de rektal sürüntülerde istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,042315275$) azalma tespit edilmiştir (%0,0236→%0,0006). *Blautia* spp.'de de rektal sürüntülerde istatistiksel olarak anlamlı ($p=0,00051427$) azalma tespit edilmiştir (%6,8737→%1,0573).

Mekonyumlarda görülen 924 tür rektal sürüntülerde tespit edilmemiştir. 574 türde sadece dirençli koloni izlenen örneklerin mikrobiyotalarında görülmüştür. Ayrıca, filogenetik uzaklıklarda artış da görülmüştür (Şekil 4-21).



Şekil 4-21: (Üst) Mekonyum ve dirençli bakteri kolonizasyonu görülen rektal örneklerin tür bazında Bray-Curtis farklılığı ısı haritası. (Alt) Bray-Curtis Farklılığı ve Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.

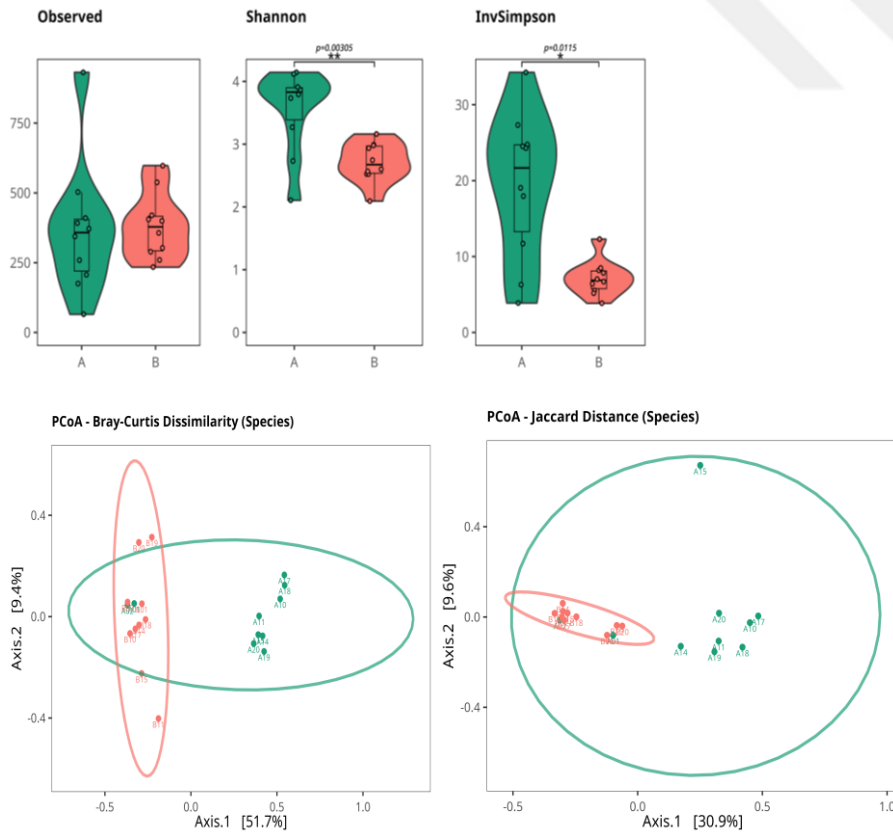
Tür seviyesinde ifade edilen OTU miktarları arasında diğer tüm üst taksonlarda olduğu gibi azalma görülse de istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p=0,295$). Shannon ($p=0,00024$) ve InvSimpson ($p=0,00013$) metriğinde istatistiksel olarak anlamlı azalma olduğu görüldü. Görülen farkın bakteri miktarlarından olması beklenebilir. Bu veriler, iki örnek grubundaki aynı bakterilerdeki miktar değişikliğini göstermektedir (Şekil 4-22).



Şekil 4-22: Örnek gruplarında tür seviyesinde alfa çeşitlilik karşılaştırılması.

4.5.4.1. İkiz Bebeklerde Biyoçeşitlilik Analizi

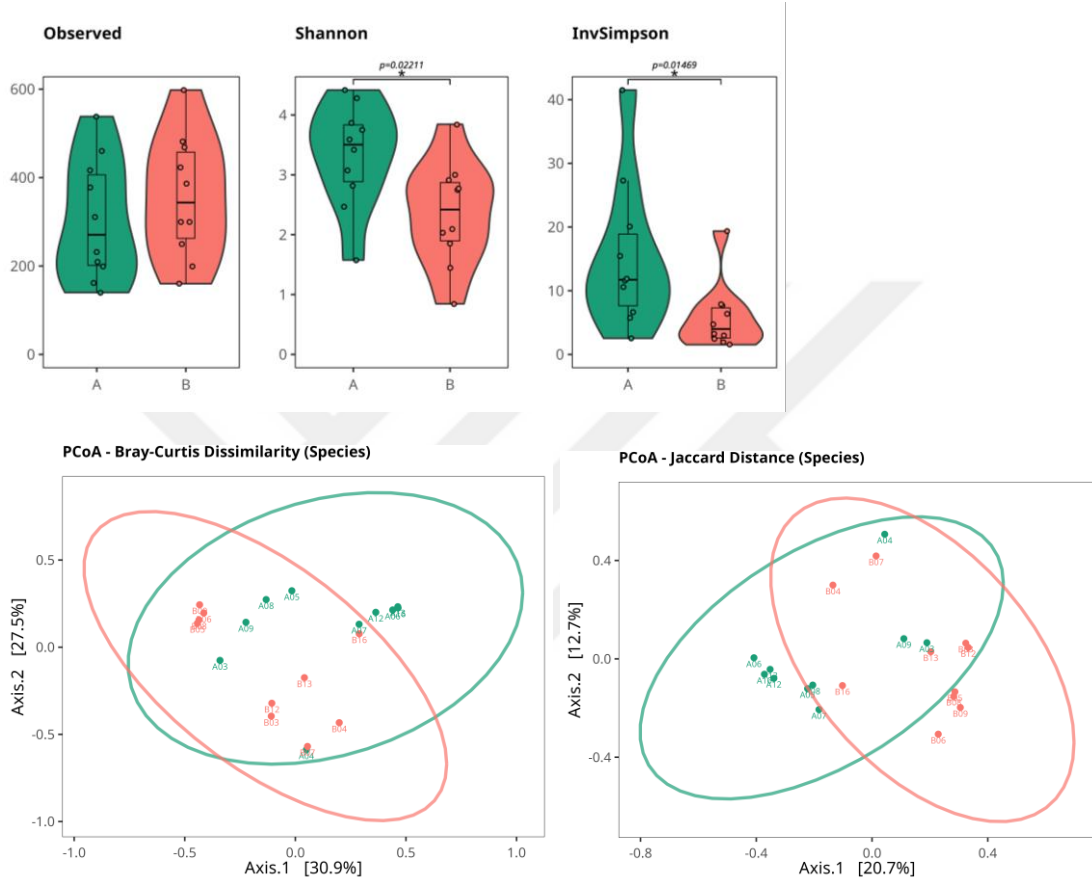
İkiz bebeklerde observed biyoçeşitlilikte anlamlı azalma görülmemiştir ($p \geq 0,5$). Ancak Shannon ve InvSimpson metriklerinde istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlemlenmiştir (sırasıyla, $p=0,00305$ ve $p=0,0115$). Beta biyoçeşitlilikte de varyanslarda büyük değişimler tespit edilmemiştir (Şekil 4-23).



Şekil 4-23: (Sol) İkiz bebeklerin tür seviyesinde alfa biyoçeşitlilik grafikleri, (Orta) Bray-Curtis Farklılığı ve (Sağ) Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.

4.5.4.2. İkiz Olmayan Bebeklerde Biyoçeşitlilik Analizi

Tekiz bebeklerde observed biyoçeşitlilikte anlamlı fark görülmemiştir ($p \geq 0,5$). Ancak Shannon ve InvSimpson metriklerinde istatistikse olarak anlamlı azalma tespit edilmiştir (sırasıyla, $p=0,02211$ ve $p=0,01469$). Beta biyoçeşitlilikte de ikiz bebeklerde olduğu gibi varyanslarda büyük değişimler tespit edilmemiştir (Şekil 4-24).



Şekil 4-24: (Sol) Tekiz bebeklerin tür seviyesinde alfa biyoçeşitlilik grafikleri, (Orta) Bray-Curtis Farklılığı ve (Sağ) Jaccard Uzaklığı Temel Koordinat Analizi.

5. TARTIŞMA

Son yıllarda insan bağırsak mikrobiyotasını insan sağlığı ile ilişkilendiren birçok çalışma sonuçları bildirilmiştir (17, 23, 36). Doğum sonrası bağırsaklar, kısmen aerop ya da mikroaerofil ortamından dolayı fakültatif anaerop bakteriler ile kolonize olur. Bu bakteriler ortamda bulunan oksijeni kullanarak anaerop bakteriler için uygun ortamı yaratır. Daha sonra yiyeceklerle (anne sütü veya bebek maması) bu birleşim değişikliklere uğrar ve *Bifidobacterium* spp., *Bacteroides* spp. ve *Clostridium* spp. gibi fakültatif anaeroplara baskın hale gelir. Pseudomonadota ve *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde ilk düşüş gerçekleşirken Bacteroidota ve Bifidobakterilerde artış meydana gelmektedir. Yenidoğan mikrobiyotası 2-4 yıllık süre içinde erişkin mikrobiyotası formunu kazanarak Bacillota ve Bacteroidota baskın hale gelir. Onları Actinomycetota, Pseudomonadota ve Verrucomicrobiota takip eder. Yenidoğan mikrobiyotası doğum şeklinden etkilenmektedir. Örneğin, normal yolla doğan bebeklerde *Lactobacillus* spp. ve *Prevotella* spp. gibi vajinal cinsler baskınken, sezaryen yolla doğan bebeklerde *Cutibacterium*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*, *C. difficile*, *Streptococcus* spp. gibi cilt ve çevre mikrobiyotasında bulunan cinsler baskın olup, *Bifidobacterium* spp. ve *Bacteroides* spp. sayısında da azalma meydana gelir (131).

Çeşitli nedenlerle mikrobiyotada meydana gelen disbiyoz bağırsak hastalıkları ve yaşamın ilerleyen dönemlerindeki hastalıklara zemin oluşturabilir. Geniş spektrumlu antibiyotikler bağırsak mikrobiyota çeşitliliğini azaltır ve patojenleri öldürmenin yanı sıra yararlı mikropları yok ederek disbiyozu neden olabilir (132). Hastanede yatan bebeklerde profilaksi ve tedavi amacıyla kullanılan antibiyotikler ile gelişim aşamasında olan bağırsak mikrobiyotasının dengesi ve çeşitliliği bozulabilir. Bu koşullar, antisepsi kurallarına uymayan sağlık çalışanların elleriyle başka bebeklerden veya çevre yüzeylerde bulunan VRE ve KRKP gibi ÇİD patojenlerin bebeklerin bağırsağında kolonize olmalarını kolaylaştırır. Bu patojenler yenidoğanlar gibi mikrobiyota yönünden zayıf bireylerin bulunduğu alanlarda hızlı bir şekilde yayılım göstererek ölümlerine neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda yeni doğan ölümlerinin %35'inden bu enfeksiyonların sorumlu olduğu gösterilmiştir (133,134). Amerikan Hastalık Koruma ve Önleme Merkezi (CDC)'in önerisi (135) üzerine İstanbul Tıp Fakültesi, hastane enfeksiyonu kontrol komitesi tarafından bu iki etkenin hastanede yatan hastalara ait rektal sürüntü örneklerinde taraması periyodik olarak haftada bir kez yapılmaktadır.

Hastane enfeksiyonu üzerine yapılan çalışmaların çoğu bu iki patojenin prevalansı ya da tedavisi üzerine yoğunlaşmıştır (136,137).

Bu çalışmada mekonyum (A) ve bu iki etkenin birlikte görüldüğü rektal sürüntü (B) örneklerinde mikrobiyotanın çeşitliliği araştırılmıştır. Çalışmamızda, Yenidoğan Yoğun Bakım Ünitesi'nde yatan 1500 gr'dan düşük doğum ağırlığına sahip, 32 haftalık ve daha erken dünyaya gelen 20 bebeğin A örnekleri ile çeşitli profilaksi ve tedaviden sonraki ilk B örnekleri (KRP ve VRE izole edilen) olmak üzere toplam 40 örneğin 16S rRNA'nın V1-V9 bölgeleri dizilerek metagenomik analizi yapılmıştır. Bebeklere, serviste kalış sürelerinde olası sepsiste mortaliteyi azaltmak için immünomodülatör olarak fosfodiesteraz inhibitörü olan pentoksifil kullanılmıştır (138).

Çalışmamız bu konuda Türkiye'de yapılan ilk çalışma özelliğini taşımaktadır. Tez çalışmamızda, gDNA izolasyonu için Zymo BIOMICS DNA Miniprep izolasyon kiti kullanılmıştır. gDNA miktarı mekonyumlar (200 mg) için ortalama 53,39 µg/mL, VRE ve KRP görülen rektal örneklerde (200 mg) 58,14 µg/mL olarak elde edilmiştir. Çalışmamızda, örnek sayısı açısından daha önce mekonyumların araştırıldığı çalışmalara (139,140) göre düşük sayıda örnek kullanılmış olsa da çalışmaya dahil edilen 20 mekonyum örneğinden de yeterli bakteriyel gDNA izole edilmiştir.

Mekonyum örneklerinde mikrobiyota analiz için farklı metotlar, sistemler ve primerlerin kullanıldığı birçok çalışma mevcuttur. Hansen ve ark. (140) 37-40. Haftalarda dünyaya gelen 15 bebeğe ait mekonyumların mikrobiyota analizi için Floresan In situ Hibridizasyon tekniği ile 16S rRNA hedefli probalar kullandıkları çalışmada, mekonyum örneklerinde 2/3 oranında tespit edilebilir bakteri olduğunu göstermişlerdir. Ancak yine de elde ettikleri hücre sayısı çeşitlilik analizine izin vermeyecek kadar düşük olduğundan metodun uygulanabilir olmadığını göstermişlerdir.

Dos Santos ve ark. (141) qPCR'da cpn 60 sekansını hedef alan primerler kullanarak mekonyum içindeki bakteriyel gDNA varlığını ve miktarını ölçmeyi hedefleyen ve doğrulama yöntemi olarak Pulsed Field Gel Elektforezi kullandıkları çalışmada dışkılarda mekonyumlara göre önemli ölçüde daha yüksek bakteri yükü olduğunu göstermişlerdir. Kültürlerde de en sık *S. epidermidis*, *E. faecalis* ve *E. coli* tespit etmişlerdir.

Mikrobiyota analizinde 16S rRNA bölgesinin dizilenmesi en sık kullanılan yöntemdir (94). Yaklaşık 1500 bp uzunluğa sahip bu gDNA bölgesi kendi içinde 9 hiper değişken bölge ve bunların arasında yerleşik korunmuş bölgelerden oluşmaktadır (143).

Farklı değişken bölgeleri hedefleyen primerlerin kullanılması, farklı seviye ve kesinlikte sonuçların elde edilmesine olanak sağlamaktadır. Farklı değişken bölgeler için bazı filumlarda taksonomik çözünürlük farklı görüldüğünden, biyoinformatik analizlerde kullanılan veri tabanlarında yer alan data kaynaklı karışıklıklar sonuçları etkilemektedir (144). Ayrıca kullanılan dizileme sistemlerine göre de elde edilen dizi skorları farklılık gösterir. Literatür taramızda, MiSeq gibi ikinci nesil, (143), Oxford Nanopore MinION (145) ve PacBIOS Sequel (146) gibi üçüncü nesil dizileme teknolojilerinde V1-V3 (147) ve V3-V4/V5 (148) hiper değişken bölgelerin dizilenmesi en sık kullanılan yöntemler olarak karşımıza çıkmıştır.

Lopez-Aladid ve ark. (148) aynı örneğin 16S rRNA'sında farklı hiper değişken bölge dizilenerek verimlilikleri karşılaştırdıkları çok merkezli çalışmada, alfa çeşitlilikte V7-V9 skorunun V1-V2, V3-V4 ve V5-V7 bölgelerinden elde edilen skorlara göre önemli ölçüde yüksek olduğunu, V3-V4 ve V5-V7 skorları ile diğer bölge skorları arasında da önemli farklılıklar olduğu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, üçüncü nesil cihaz olan MinION cihazı ile total (V1-V9) 16S rRNA zincirini dizilemek için 27F-1429R primerlerini kullanılmıştır. 16S rRNA dizi zincirlerini tek zincir halinde elde edilmiştir. Toplamda, 1418944 okuma ve 1,4 Gbp baz elde edilmiştir. N50 değeri 1442 kb, örnek başına ortalama okuma sayısı 34608 olarak belirlenmiştir. Ortalama DNA zincir uzunluğu 1004 bp olarak tespit edilmiştir. Cihazdan toplanan dizilerin kalitesi, filumdan başlayarak tür seviyesinde kadar OTU'ların ayrıştırılabilmesine imkân vermiştir. Tür bazında 2594 takson tanımlanmıştır. A ve B örnekleri arasında alfa çeşitlilikte anlamlı farklar tespit edilmiştir (A'da daha yüksek alfa çeşitlilik oranı izlenmiştir.). Beta çeşitlilikte de bireyler arasında %95'lik güven aralığında örnek grupları arasında yüksek varyans değişikliği görülmemiştir. Filumdan başlayarak aşağıya doğru inen tüm taksonlarda A ve B örnekleri arasında anlamlı farklılıklar gördük. Anaerobik filumların fakültatif filumların ortaya çıkması ile baskılandıklarını gördük. En alt takson olan tür seviyesinde 385 tür A ile B örnekleri arasında anlamlı farklılıklar gösterdiği tespit edilmiştir.

Çalışmamızda 10'u ikiz (çift yumurta) olmak üzere toplam 20 bebekten alınan A örneğinde toplam 25 filum saptanmış ve bunlardan 12'si antibiyotik sonrası VRE+KRKP içeren B örneklerinde görülmemiştir. Profilaksi ve tedavide kullanılan antibiyotiklerin etki spektumu 3 grupta incelenmiştir. Birinci grupta bulunan 7 filum (Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota, Actinomycetota, Fusobacteriota,

Spirochaetota ve Campylobacterota) bebeklere uygulanan antibiyotiklerin etki spektrumunda olan insan patojeni içeren filumlardır. İkinci grupta bulunan 6 filum (Chloroflexota, Cyanobacteriota, Deinococcota, Gemmatimonadota, Myxococcota ve Verrucomicrobiota) bebeklere uygulanan antibiyotiklerin etki spektrumunda olan ve insanlarda hastalık yapması kanıtlanmayan filumlardır. Üçüncü grupta 12 filum (Thermodesulfobacteriota, Candidatus Melainabacteria, Thermotogota, Aquificota, Bdellovibrionota, Chrysiogenota, Rhodothermota, Candidatus Thermoplasmatota, Lentisphaerota, Nitrospinota, Nitrospirota ve Thermomicrobiota) bebeklerde kullanılan antibiyotiklerin etkisi bu filumlarda araştırılmamıştır. Birinci grupta, B örneklerindeki filumların yüzdesel görülmeleri A örneklerine göre karşılaştırıldığında üç filumda (Bacillota, Bacteroidota, Actinomycetota) anlamlı azalma, Pseudomonadota'da anlamlı artış; ikinci grupta, iki filumda azalma (Cyanobacteriota ve Verrucomicrobiota); üçüncü grupta ise iki filumda (Thermodesulfobacteriota ve Candidatus Melainabacteria) azalma görülürken, üç grupta toplam 17 filumda anlamlı değişiklik saptanmamıştır. İkiz ve ikiz olmayan bebeklerde Bacillota ve Pseudomonadota A ve B örneklerinin tamamında (40 örnek) görülmüştür. Bu iki filumun ikiz ve ikiz olmayan bebeklerin B örneklerindeki yüzdesel görülmesi incelendiğinde A'ya göre aynı şekilde, birinci filum Bacillota'da anlamlı azalma (sırasıyla, $p=0,00195$ ve $p=0,0032$) ve ikinci filum Pseudomonadota'da anlamlı bir artış (sırasıyla, $p=0,00195$ ve $p=0,00195$) saptanmıştır. Bacillota, stafilkoklar, streptokoklar, enterokoklar ve diğer gram pozitif sporlu anaerop (*Clostridia* spp. gibi) veya aerop (*Bacillus* spp. gibi) bakterileri kapsamaktadır. İkiz bebeklerde, streptokok ve enterokok cinslerinin yüzdesel görülmeleri B örneklerinde sırasıyla, %0,2825 ve %23,0507 ve A örneklerinde sırasıyla, %3,7553 ve %9,047, dolayısıyla streptokoklarda anlamlı azalma ($p=0,31773$) ve enterokoklarda da anlamlı artış ($p=0,26292$) görülmüştür. Diğer bakterilerde (*Clostridium*, *Staphylococcus*) anlamlı farkın olmadığı belirlenmiştir. Streptokok cinsinde görülen azalma muhtemelen profilaksi ve tedavide kullanılan P, AMP, V, TEC gibi antibiyotiklere bağlı olabilir. Enterokok cinsi bakteriler safra, yüksek tuz oranı ve sıcaklığa streptokok cinsi bakterilere göre daha dayanıklıdır. Bunun yanı sıra enterokoklar, sefalosporinlere ve aminoglikozitlere tolerans göstermektedirler. Yapılan çalışmalarda beta-laktam'ın minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) enterokoklarda streptokoklara göre daha yüksektir. Dolayısıyla enterokok enfeksiyonun tedavisinde bakterisit etkiyi

gerçekleştirmek için beta-laktam ile aminoglikozit kombinasyonu veya V'nin kullanılması önerilmektedir (149,150).

Bu çalışmaya dahil olan 20 bebekten sadece 5'inde V kullanılmıştır. *Staphylococcus* spp. ve *Streptococcus* spp.'nin V etkisi ile baskılanması muhtemelen *Enterococcus* spp.'nin çoğalması için daha kolay bir ortam oluşturmaya ve sayısının artmasına neden olabilir. Clark ve ark. (151) çocuk yoğun bakım servisinde yatan bebeklere uygulanan profilaktik antibiyotiklerin bağırsak mikrobiyotasının çeşitliğini etkilediğini bildirmiştir. Gasparrini ve ark. (152) antibiyotik alan bebeklerde *Bifidobacterium* spp. ve Bacteroidota yoğunluğu azalırken enterokokları daha baskın olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda *Bifidobacterium* spp.'de B örneklerinde A'ya oranla istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Ayrıca Bacteroidota'da düşüş olurken enterokoklarda bir artış olmuştur. Fouhy ve ark. (153) 4-8 hafta GEN+AMP tedavi uygulanan yenidoğan bebeklerde Pseudomonadota'da artış, *Bifidobacterium* spp. ve *Lactobacillus* spp.'de düşüş meydana geldiğini bildirmiştir. Çalışmamızda, 8 no'lu bebeğin dışında 18 bebekte GEN+AMP ve 6 no'lu bebekte GEN+AMP yerine üç günlük P profilaktik tedavi sonrası benzer şekilde Pseudomonadota'da anlamlı bir artış gerçekleşmiştir. Pseudomonadota, tüm enterik bakteriler, non-fermentatif türlerin çoğu güç üreyen Gram negatif kokobasil ve kokları kapsamaktadır (60). Dolayısıyla, daha kompleks hücre duvarına sahip olan Pseudomonadota'daki bakteriler Gram pozitif bakterileri içeren Bacillota'daki bakterilere göre antibiyotiklere karşı daha dirençlidir. B örneklerinde saptanan Pseudomonadota'nın olası artış nedenleri; 1. Bağırsakta bulunan enterik bakterilerin Bacillota'ya oranla bu filumda toplanması, 2. B örneklerinde KRKP bakterilerin bulunması ve bu bakterilerin plazmidleri üzerine taşınan karbapenem direnç genlerinin bebeklerine uzun yatış (25-96 gün) nedeni ile bağırsakta bulunan diğer enterik bakterilere geçmesi veya uygulanan CTX/MEM antibiyotiklere karşı direnç gelişmesidir (154). Bacteroidota'da *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp., *Flavobacterium* spp., *Sphingobacterium* spp. ve bağlı diğer non-fermentatif gram negatif basiller bulunmaktadır (60).

Pérez-Cobas ve ark. (155) bakteriyostatik veya bakterisit etkili antibiyotiklerin mikrobiyotayı farklı şekillerde etkilediklerini bildirmişlerdir. Örneğin bakteriyostatik antibiyotikler Gram negatif bakterilerin liposakkarit tabakasının sentezinde katkısı olan genlerin ifadesini artırarak Gram negatifleri; bakterisit antibiyotikler ise endosporun

oluşumunda rol oynayan genlerin sayısını artırarak Gram pozitif bakterilerin sayısını arttırmaktadır. Çalışmamızda, Bacteroidota'da bulunan *Prevotella*, *Bacteroides*, *Porphyromonas* ve *Flavobacterium* spp.'de B örneklerindeki yüzdesel görülmesinde A'ye göre ne ikizlerde (sırasıyla, $p=0,5233$, $p=0,343$, $p=1$, $p=1$) ne de ikiz olmayan bebeklerde (sırasıyla, $p=0,5938$, $p=0,2366$, $p=1$, $p=1$) bir değişiklik görülmemiştir. Klinik önemi olan Actinomycetota'da *Actinomyces*, *Nocardia* ve *Corynebacterium* gibi aerop Gram pozitif pozitif çomaklar bulunmaktadır (60). Çalışmamızda, *Actinomyces* ($p=1$) ve *Nocardia*'da ($p=1$) anlamlı fark görülme de *Corynebacterium*'da VRE+KRKP görülen rektal sürüntülerde anlamlı şekilde azalma tespit edilmiştir ($p=0,00042$).

Dardas ve ark. (156) AMP+GEN tedavisinden sonra Bacteroidota'da artış olduğunu ve bu baskınlığın 30 güne kadar devam ettiğini bildirmiştir. Benzer şekilde, Zwittink ve ark. (157) 5 günden fazla amoksisilin-GEN uygulamasının Bacteroidota'da artışına neden olduğunu, bu artışın da *Bifidobacterium* spp. baskılanması kaynaklı olduğunu bildirilmiştir. Lu ve ark. (158) yaptığı çalışmada beta-laktam antibiyotik tedavisi gören erken doğan (37 hafta+6 günden önce) bebeklerde Bacteroidota'da anlamlı azalma, *Enterococcus* spp.'de ise anlamlı artış bildirilmiştir. Korpela ve ark. (139) 1500 gr'dan düşük doğum ağırlığına sahip 45 erken doğan bebeğin mekonyumları üzerinde yaptıkları mikrobiyota analizinde, GEN'nin *Enterococcus* spp. ve *Bifidobacterium* spp.'yi baskıladığı ve alfa çeşitlilikte azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Drell ve ark. (139) 1200 gr'dan düşük doğum ağırlığına sahip 50 bebeğin mekonyumlarında, AMP+GEN kullanımının alfa çeşitlilik skorunun arttığını; *Staphylococcus* spp. ve *Enterobacteriaceae*'de artışına, *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* gibi probiyotik türlerde de azalmaya neden olduğunu göstermişlerdir. Çalışmamız sonucunda, çalışmalarla uyumlu şekilde Bacillota ve Bacteroidota'da anlamlı şekilde azalma görülürken, Pseudomonadota'nın baskın olarak bulunduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda, Actinomycetota'da ikiz ve ikiz olmayanlar bebeklerde anlamlı azalma görülmemiştir (sırasıyla, $p=0,414519$ ve $p=0,058024$). Wandro ve ark. (159) 32 erken doğan bebekten toplanan toplam 77 rektal örnekte AMP+GEN uygulaması ile Actinomycetota üyesi *Bifidobacterium*'un tamamen mikrobiyotadan elendiğini göstermişlerdir. *Bifidobacterium* cinsi, fermentasyon ile asetat ve laktat üretir. Ayrıca anne sütünde bulunan ve bebek tarafından sindirimi mümkün olmayan şekerlerin sindirimini sağlayarak fizyolojik gelişime katkı sağlar. Anne sütü alınması süresince

sayıları artış göstererek baskın taksonlardan biri haline gelirler (160). Çalışmamızda dahil edilen bebeklerin serviste kaldıkları süre boyunca anne sütü ile beslendiler. Her ne kadar K vitamini desteği verilmiş olsa da bebeklerde *Bifidobacterium spp.*'de önemli bolluk artışı görülmedi. Fizyolojik gelişime direkt olarak etki eden bir diğer cins *Eggerthella spp.* şekerleri fermente ederek NK hücreleri stimüle eden s-equol sentezleyerek antikarsinojenik mekanizmaya katkı sağlar (161). Çalışmamızda, *Eggerthella spp.*'nin bolluğunda B grubu örneklerde önemli derecede azalma saptanmıştır ($p=0,00909$).

Fusobacteriota, Gram negatif anaerob sporsuz çomak bakterileri içermektedir. Septisemiye neden olan geniş bir insan enfeksiyonları yelpazesinde rol oynadığı uzun zamandır bilinmektedir ve yakın zamanda intra-amniyotik enfeksiyonlar, erken doğum ve tropikal ülserlerdeki önemi rapor edilmiştir (162). Bu filumun tespit edildiği A grubundan dört örnekte (%0,0285) ve B grubundan bir örnekte (%0), ayrıca ikiz ve ikiz olmayan bebeklerde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (sırasıyla, $p=0,105645$, $p=0,100348$, $p=0,201242$). *Spirochaetota*'nın tespit edildiği A grubundan beş (%0,0033) ve B grubundan bir (%0,0001) örnekte, ayrıca ikiz ve ikiz olmayan bebeklerde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (sırasıyla, $p=0,059058$, $p=0,100348$, $p=0,201242$). Campylobacterota, Gram negatif virgül şeklinde bakterileri içermektedir. *Campylobacter* ve *Helicobacter* cinsleri bu filuma dahildir. Bu filum, 2021 yılına kadar Pseudomonadota içersinde yer almaktaydı (163). Bu filumun görüldüğü A grubundan beş (%0,0067) ve B grubundan bir örnekte (%0,0041), ayrıca ikiz ve ikiz olmayan bebeklerde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (sırasıyla, $p=0,352542$, $p=0,100348$, $p=0,674986$). Dolayısıyla çalışmamızda birinci grupta olan Fusobacteriota, Campylobacterota ve Spirochaetota'da anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır.

Jethwani ve Grover (164) 2019'da sağlıklı kişilerin bağırsak mikrobiyotasında en baskın filumları; Bacteroidota, Bacillota, Pseudomonadota, Fusobacteriota, Mycoplasmatota (eski adı: Tenericutes), Actinomycetota ve Verrucomicrobiota şeklinde sıralamış ve bunların total mikrobiyotanın %90'nını oluşturduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda mekonyumda belirlenen 25 filum ile benzerlik gösterse bile sıralamalarda biraz farklılık saptanmıştır. Çalışmamızda tespit ettiğimiz filumların sıralaması; Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota, Actinomycetota, Cyanobacteriota, Thermotogota, Fusobacteriota, Thermodesulfobacteriota, Verrucomicrobiota ve diğer 16 filum daha düşük yüzde ile görülmüştür. Bunun nedeni ise çalışmamızda yetişkin

rektal örnek yerine düşük ağırlıklı bebek mekonyumun kullanılması çünkü insan bağırsak mikrobiyotasının tamamlanması 3-4 yaşına kadar devam etmesidir (17). Bäckhed ve ark. (49) 1 yaşındaki İsveçli bebeklerin rektal örneklerini metagenomik analiz ile incelemişlerdir. Bacillota ve Bacteroidota'yı en baskın, daha sonra Actinomycetota ve Pseudomonadota baskınlığını görmüşlerdir. Ayrıca alfa çeşitliliğin azaldığını ve beta çeşitlilikte varyans artışı bildirmişlerdir. Bu çalışma verileri bebeklerin yaşı çalışmamıza dahil edilen bebeklerin yaş (≤ 32 hafta) grubuna daha yakın olması nedeniyle çalışmamızla daha uyumlu bulunmuştur.

Doğum sırasında verilen antibiyotiklerde bir haftalık bebek mikrobiyotasının kompozisyonun etkilemektedir. Bu etki üç araştırma grubu tarafından araştırılmıştır. Aloisio ve ark. (165) Actinomycetota ve Bacteroidota oranının düştüğünü, Azad ve ark. (52) 3 aylık bebeklerde Bacteroidota oranının düştüğünü, *Enterococcus* spp. ve *Clostridium* spp. oranının arttığını, Mazzola ve ark. (166) ise *Enterobacteriaceae* oranının yükseldiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ikinci grup olarak sınıflandırılan A ve B örneklerinden saptanan ve şimdilik insan hastalıkları ile ilgisi olmayıp sadece bağırsak mikrobiyotası ve deniz, okyanus gibi su kaynakları ile ilişkili 6 filum bulunmuştur. Bu filumlar; filamentöz şeklinde Gram pozitif ve Gram negatif, aerop ve anaerop bakterileri bulundurur (167). Bu filum, 20 bebekte A ve B'de ikişer örnekte görülüp yüzdesel görülmesi A grubunda %0,0009 ve B grubunda %0,0004 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca ikiz ve ikiz olmayan bebeklerde anlamlı bir değişiklik göstermediği saptanmıştır (sırasıyla, $p=0,422678$, $p=0,100348$, $p=0,201242$).

Cyanobacteriota, Gram negatif uzun filamentöz çomak şeklinde olup mavi-yeşil algler olarak bilinse de alg olarak sınıflandırılmamıştır. Bu filum, insan mikrobiyotası, göl ve temiz su yüzeyinde açmış çiçek gibi koloniler halinde üreyip suya yeşil renk verir. Ayrıca yer yüzünde oksijen üreten ilk mikroorganizma olarak bilinmektedir (168).

Cyanobacteriota, A grubundan 13 örnekte (ort: %0,0655) ve B grubundan 3 örnekte (ort: %0,0005) tespit edilmiştir. Yüzdesel görülmeleri anlamlı bir azalma saptanmıştır ($p=0,001511$). Ancak ikiz ve ikiz olmayan bebeklerde anlamlı bir azalma görülmemiştir. Deinococcota Gram pozitif ve Gram negatifleri içermektedir (169). Bu filum A grubunda 4 örnekte görülmüştür (ort: %0,0053). B grubunda hiçbir örnekte görülmemiştir. Ayrıca ikiz ve ikiz olmayan bebekler de anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (sırasıyla, $p=0,100348$, $p=0,181449$).

Gemmatimonadota, Gram negatif olup aerop ve anerop koşullarda üreyebilen, çamur, organik tarım toprağı ve göl yüzeyi suyundan yapılan kültürlerden izole edilmiştir (170). Bu filum, A grubu örneklerden sadece bir örnekte tespit edilmiş (%0,0002) olup, B grubunda herhangi bir örnekte tespit edilmemiştir. Ayrıca ikiz ve ikiz olmayan bebeklerde de anlamlı değişiklik saptanmamıştır (sırasıyla, $p=1$, $p=0,100348$).

Myxococcota, A grubundan iki örnekte (ort: %0,019) saptanmış olup B grubu örneklerde tespit edilmemiştir. Ayrıca ikiz ve ikiz olmayan bebeklerde de anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (sırasıyla, $p=0,371093$, $p=0,100348$, $p=0,181449$). Verrucomicrobiota, A grubundan yedi örnekte ve B grubundan üç örnekte tespit edilmiştir. B grubu örneklerde (ort: %0,0006) A grubu örneklere göre (ort: %0,0246) anlamlı bir azalma bulunmuştur ($p=0,02439$). Ancak ikiz ve ikiz olmayan bebeklerde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır (sırasıyla, $p=0,100348$, $p=0,280712$). Kısaca ikinci grupta bulunan 7 filumdan sadece Cyanobacteriota ve Verrucomicrobiota'da anlamlı bir azalma oldu. Diğer beş filumda anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir. Bu filumların bazı cinsleri insan sağlığıyla ilgili önemli bakteri içermektedir. Örneğin, Verrucomicrobiota'da bulunan zorunlu anaerop *Akkermansia muciniphila* bağırsak mukozasında bulunan musini parçalayarak karbon ve azot kaynağı olarak kullanılmaktadır. Bu fonksiyonu bağırsak epiteline yakın mesafede bulunan mukus tabakasındaki besinlerden etkilenir. Yapılan çalışmalarda bir yaşındaki bebeğin bağırsağında görülmeye başladığı ve yetişkin olana kadar sayısının artarak devam ettiği gösterilmiştir. Bu bakterinin azalması obezite, tip 1 ve 2 diyabet, karaciğer yağlanması, kolon kanseri gibi bazı kanser türlerin görülmesine neden olmaktadır. Bu nedenle bu hastalıkların tedavisinde faydalı bir mikrobiyota kullanılması mümkündür. Ancak tedavide bu bakterinin pastörize ederek öldürülmesinin canlı bakteriden daha iyi sonuç verdiği bildirilmektedir (171,172). Dolayısıyla bu gibi bebeklerin takibi gerekirse zamanında bu bakteriye probiotik olarak kullanılması onları birçok hastalığa karşı koruyabilir.

Stewart ve ark. (173) doğumdan sonra yenidoğan yoğun bakım servisinde tedavi gören 29 bebeğin mekonyum örneği ile bu bebeklerden taburcu olduktan sonra rektal örnekler alarak mikrobiyota profillerini karşılaştırmıştır. Tedavi süresince *K. oxytoca* ve *E. faecalis*'te azalma, *Akkermansia* spp., *Blautia* spp. ve *Bacteroides* spp.'de artış

görülse de yoğun bakımda kalma süresince kullanılan antibiyotiklerin anlamlı şekilde farklılık oluşturmadığını göstermişlerdir.

Bergsten ve ark. (169) 2022’de Bazaltik İzlanda’daki Surtsey adasından topladıkları sondaj sıvıları, sondaj karotları ve fumarol örneklerinin 16S rRNA geni dizilemesi kullanarak yaptıkları mikrobiyota tespiti çalışmasında, bu örneklerden %40 Bacillota, %31,7 Pseudomonadota, %22 Actinomycetota, %4,1 Bacteroidota ve %2 Deinococcota’yı tespit etmişlerdir. Çalışmamızda, üçüncü grup altında toplanan 12 filumun 10 tanesinde B örneklerinde A örneklerine göre anlamlı bir azalma görülmemiştir. Diğer iki filum Thermodesulfobacteriota, Candidatus Melainabacteria’da anlamlı bir azalma saptanmıştır (sırasıyla, $p=0,0366713$, $p=0,0222541$). Alınan 20 mekonyum yüzdesel görülmesi ise; 9 örnekte Thermodesulfobacteriota %0,0277 ve 7 örnekte Candidatus Melainabacteria %0,0173 olarak belirlenmiştir. Antibiyotiklerin bu filumlar üzerinde olan etkisi yeterince kaynak bulunmamaktadır.

Kasai ve ark. (174) Bacillota/Bacteroidota oranı artmasının obeziteye yol açabileceğini ileri sürmüştür. Thuny ve ark. (175) endokardit tedavisi için hastalara verilen V ve GEN hastaların sürekli kilo almasına neden olduğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızda, B grubu örneklerde (%65,46) Bacillota/Bacteroidota oranının A grubu örneklerine (%13,93) göre artış gösterdiği tespit edilmiştir.

Konvansiyonel yöntemlerin yerini alan moleküler yöntemler, mekonyum örneklerinin steril olduğu fikri ortadan kaldırmıştır (176). He ve ark. (84) 39 anne-bebek çiftine ait amniyotik sıvı, vajinal sıvı ve mekonyum örneklerinde yaptıkları çalışmada amniyotik sıvı ve vajinal sıvı mikrobiyotasında *Lactobacillus* spp. ve *Curvibacter* spp.; mekonyum mikrobiyotasında *Bacillus* spp. ve *Escherichia* spp.’nin baskın oldukları göstermişlerdir. Ayrıca, amniyotik sıvı mikrobiyotası ile fetal mikrobiyotanın benzer OTU formasyonuna sahip olduklarını ve amniyotik sıvı mikrobiyotasının fetal mikrobiyota oluşumuna katkı sağladığını göstermişlerdir. Yang ve ark. (177) 56 ikiz bebeğin (18 tek yumurta, 38 çift yumurta) mekonyumları üzerinde yapılan araştırmada alfa çeşitliliğinin iki grup arasında önemli ölçüde farklı olmadığını gösterirken, tek yumurta ikizleri ile çift yumurta ikizlerinin beta çeşitlilik varyanslarının düşük olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamıza dahil edilen bebeklerin tümü çift yumurta ikizleriydi. Çalışmamıza dahil olan ikizlerde Yang ve ark tarafından yapılan çalışma verileri ile uyumlu olarak A örnekleri ile B örneklerinin alfa çeşitliliğinde anlamlı derecede azalma

tespit edilmiştir ($p=0,00753$). Beta çeşitlilikte de B grubunda varyans azalması görülmüştür.

Antibiyotik kullanımının Bacillota'ya etkisi üzerine çelişkili veriler mevcuttur. Drell (139) ve Zwittink (157), *Staphylococcaceae*'de anlamlı artış bildirirken Arboleya ve ark. (54) bu görüşe karşıt olarak azalma olduğunu bildirmiştir. Benzer durum *Streptococcaceae* için de geçerlidir. Zhu ve ark. (178) anlamlı artış bildirirken, Arboleya ve ark. (55) azalma olduğunu belirtmektedir. Russell ve ark. (179) vankomisin ve piperasiline maruz kalan yeni doğan bebeklerde *Velionella* spp.'nin artış gösterdiğini, bu durumun da gama-aminobutirik asit vasıtası ile bağırsak-beyin iletişimini etkileyeceğini öne sürmüşlerdir. Beta laktamlardan P uygulanan yenidoğanlarda *Lactobacillus* spp.'nin önemli şekilde azalma gösterdiği ancak sefalosporinlerin herhangi bir etkisinin olmadığı da bildirilmiştir (53,141,180). Çalışmamızda da önceki çalışmalara uyumlu şekilde *Staphylococcaceae* bir azalma görülmezken, *Streptococcaceae* ve *Lactobacillus* spp.'de anlamlı bir azalma saptanmıştır.

Sonuç olarak, Yenidoğan Yoğun Bakımda yatan bebeklerin VRE ve KRKP etkenlerin bağırsağında kolonize olmaları için gereken süre; VRE için 12-60 gün (ort. 33,1 gün), KRKP için 6-62 gün (ort. 22,9) gün ve VRE+KRKP için 15-96 gün (ort. 43,8 gün) olarak saptanmıştır. Bebeklerden alınan 20 mekonyum örneğinde toplam 25 filum saptanmıştır. Bunlardan 12'si B örneklerinde görülmemiştir. A örneklerinde en baskın dört filum sırasıyla; Bacillota, Pseudomonadota, Bacteroidota ve Actinomycetota olduğu, profilaktik ve tedavi sonrası VRE+KRKP içeren B örneklerinde ise Pseudomonadota yüzdesel görülmesinde bir artış olduğu, diğer üç filumda da anlamlı azalma görüldüğü saptanmıştır. Ayrıca yüzdesel görülmeleri bu dört filuma göre daha düşük olan Cyanobacteriota, Verrucomicrobiota, Thermodesulfobacteriota ve Candidatus Melainabacteria'da da anlamlı bir azalma görülmüştür ($p<0,05$). İkiz olan ve ikiz olmayan bebekler arasında gözlemlenen filumların yüzdesel bolluklarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı görülmüştür. Filum düzeyinde alfa çeşitlilikte bir azalma ($p<0,05$) saptanırken beta çeşitliğinde anlamlı bir varyans değişikliği olmadığı belirlenmiştir ($p\geq 0,05$). Bebeklere ait örneklerde toplamda 310 aile saptanmıştır. Bu ailelerden 126'sı (%40,6) sadece mekonyum, 37'si (%11,9) sadece rektal sürüntü ve 147'si (%47,5) her iki örnek grubunda saptanmıştır. *Enterobacteriaceae* (%35,56) ve *Enterococcaceae* (%18,35) her iki grup ortalaması

olarak en yüksek oranda görülen sınıf olarak saptanmıştır. Cins/tür bazında ise örneklerde toplamda 2594 cins/tür tespit edilmiştir. Bunlardan 924 (%35,6)'ü sadece mekonyum, 574 (%22,1)'ü sadece rektal sürüntü ve 1096 (%42,3)'sı her iki örnek grubunda tespit edilmiştir. İlk beş cins; *Enterococcus spp.*, *Klebsiella spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Enterobacter spp.*, ve *Clostridium spp.*, tür ise; *E. faecalis*, *E. faecium* ve *K. pneumoniae* olarak tespit edilmiştir. Mekonyum örneklerinde *Klebsiella spp.* ve *Staphylococcus spp.* ve rektal sürüntü örneklerinde ise *Klebsiella spp.* ve *Enterococcus spp.* en fazla görülen ilk iki cins olarak tespit edilmiştir. İkiz bebeklerde rektal sürüntü örneklerinde mekonyum örneklerine göre streptokoklarda anlamlı bir azalma ve enterokoklarda anlamlı bir artış olduğu saptanmıştır. İkiz olmayan bebeklerde cins/tür düzeyinde anlamlı bir değişiklik saptanmamıştır. Çalışmamızda, anne sütü alan bebeklerin mekonyum mikrobiyotasında Bacillota, Bacteroidota, Pseudomonadota, Actinomycetota, Verrucomicrobiota, Bifidobacteria ve *Enterobacteriaceae* bulunması, ayrıca sezaryen ile doğan bebeklerde *Cutibacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.* gibi anne cilt bakterilerin olması bu konuda yapılmış çalışmalarla uyumlu olarak saptanmıştır. Ancak rektal sürüntü örneklerinde Bacteroidota, *Cutibacterium spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus spp.*'de saptanan anlamlı düşüş, Pseudomonadota ve *Enterobacteriaceae*'de görülen anlamlı artış ile mikrobiyota kompozisyonunda bir değişiklik olduğu belirlenmiştir. Bu değişikliğin nedenleri bebeklerde kullanılan antibiyotiklerin yanı sıra bağırsak mikrobiyotasının doğal gelişim sürecine bağlıda olabilir. Bu konuda daha çok örnek üzerine çalışmaların yapılması yararlı olacaktır.

KISITLIKLAR

1. Araştırma bütçesine göre sadece 20 bebek çalışmaya dahil edilmiştir.
2. Annelerin hamilelikte aldıkları antibiyotikler araştırmaya dahil edilmemiştir.
3. Bebeklerin tamamı sezaryenle doğduğu için vajinal doğan bebek mikrobiyotası ile karşılaştırma olanağımız olmamıştır.
4. Bebeklerin bağırsak mikrobiotasında kolonize olan VRE+KRKP'lerin negatifleşme sürecinden sonra mikrobiyota kompozisyonu tekrar örnek alınıp takip edilmemiştir.
5. Özellikle ikiz ve ikiz olmayan bebeklerin sonuçların değerlendirilmesinde yararlanabileceğimiz istatistiksel hesaplamalarda zorluklar yaşanmıştır.

KAYNAKLAR

1. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*. 2012 Mar 16;148(6):1258-1270.
2. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut*. 1998 Jan;42(1):2-7.
3. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):837-848.
4. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar 4;464(7285):59-65.
5. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):242-249.
6. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature*. 2009 Jan 22;457(7228):480-4.
7. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol*. 2014 Aug;32(8):834-41.
8. Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev*. 2014 Sep;38(5):996-1047.
9. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2003 Feb 8;361(9356):512-519
10. Revelas A. Healthcare - associated infections: A public health problem. *Niger Med J*. 2012 Apr;53(2):59-64.
11. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014 Oct;12(10):1221-36.
12. Al-Zahrani IA. Routine detection of carbapenem-resistant gram-negative bacilli in clinical laboratories. A review of current challenge. *Saudi Med J*. 2018 Sep;39(9):861-872.

13. Moreau MC. Influence of the intestinal microflora on host immunity: Normal physiological conditions. In: Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourie B, editors. Gut Microflora: Digestive physiology and pathology. 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2006;131-149.
14. Takiishi T, Fenero CIM, Câmara NOS. Intestinal barrier and gut microbiota: Shaping our immune responses throughout life. *Tissue Barriers*. 2017 Oct 2;5(4):e1373208.
15. Collignon A, Butel MJ. Establishment and composition of the gut microflora. In: Rambaud JC, Buts JP, Corthier G, Flourie B, editors. Gut Microflora: Digestive physiology and pathology. 1 ed. Paris: John Libbey Eurotext; 2006;19-36.
16. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Jan;14(1):20-32.
17. Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 7;21(29):8787-803.
18. Ellis JL, Karl JP, Oliverio AM, Fu X, Soares JW, Wolfe BE, et al. Dietary vitamin K is remodeled by gut microbiota and influences community composition. *Gut Microbes*. 2021 Jan-Dec;13(1):1-16.
19. Bodansky HJ, Staines A, Stephenson C, Haigh D, Cartwright R. Evidence for an environmental effect in the aetiology of insulin dependent diabetes in a transmigratory population. *BMJ*. 1992 Apr 18;304(6833):1020-1022.
20. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol*. 1998 Feb 17;39(3):237-8.
21. Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, et al. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2004 Apr;38(4):365-74.
22. Wassenaar TM, Panigrahi P. Is a foetus developing in a sterile environment? *Lett Appl Microbiol*. 2014 Dec;59(6):572-579.
23. Ercan E, Eratalay K, Deren O, Gur D, Ozyuncu O, Altun B, et al. Evaluation of periodontal pathogens in amniotic fluid and the role of periodontal disease in pre-term birth and low birth weight. *Acta Odontol Scand*. 2013 May-Jul;71(3-4):553-9.

24. Olomu IN, Hecht JL, Onderdonk AO, Allred EN, Leviton A; Extremely Low Gestational Age Newborn Study Investigators. Perinatal correlates of *Ureaplasma urealyticum* in placenta parenchyma of singleton pregnancies that end before 28 weeks of gestation. *Pediatrics*. 2009 May;123(5):1329-1336.
25. Moles L, Gómez M, Heilig H, Bustos G, Fuentes S, de Vos W, et al. Bacterial diversity in meconium of preterm neonates and evolution of their fecal microbiota during the first month of life. *PLoS One*. 2013 Jun 28;8(6):e66986.
26. Bennet R, Eriksson M, Nord CE, Zetterström R. Fecal bacterial microflora of newborn infants during intensive care management and treatment with five antibiotic regimens. *Pediatr Infect Dis*. 1986 Sep-Oct;5(5):533-539.
27. Sakata H, Yoshioka H, Fujita K. Development of the intestinal flora in very low birth weight infants compared to normal full-term newborns. *Eur J Pediatr*. 1985 Jul;144(2):186-190.
28. LaTuga MS, Ellis JC, Cotton CM, Goldberg RN, Wynn JL, Jackson RB, et al. Beyond bacteria: a study of the enteric microbial consortium in extremely low birth weight infants. *PLoS One*. 2011;6(12):e27858.
29. Schwartz A, Gruhl B, Löbnitz M, Michel P, Radke M, Blaut M. Development of the intestinal bacterial composition in hospitalized preterm infants in comparison with breast-fed, full-term infants. *Pediatr Res*. 2003 Sep;54(3):393-9.
30. La Rosa PS, Warner BB, Zhou Y, Weinstock GM, Sodergren E, Hall-Moore CM, et al. Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Aug 26;111(34):12522-7.
31. Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999 May;69(5):1035-1045.
32. Parrett AM, Edwards CA. In vitro fermentation of carbohydrate by breast fed and formula fed infants. *Arch Dis Child*. 1997 Mar;76(3):249-253.
33. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005 Mar 25;307(5717):1915-1920.
34. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005 Jun 10;308(5728):1635-8.

35. Zoetendal EG, Plugge CM, Akkermans ADL, de Vos WM. *Victivallis vadensis* gen. nov., sp. nov., a sugar-fermenting anaerobe from human faeces. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003 Jan;53(Pt 1):211-215.
36. Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature*. 2008 Oct 23;455(7216):1109-13.
37. Goldenberg RL, Culhane JF, Iams JD, Romero R. Epidemiology and causes of pre-term birth. *Lancet*. 2008 Jan 5;371(9606):75-84.
38. Cutland CL, Lackritz EM, Mallett-Moore T, Bardaji A, Chandrasekaran R, Lahariya C, et al. Low birth weight: Case definition & guidelines for data collection, analysis, and presentation of maternal immunization safety data. *Vaccine*. 2017 Dec 4;35(48 Pt A):6492-6500.
39. Bearfield C, Davenport ES, Sivapathasundaram V, Allaker RP. Possible association between amniotic fluid micro-organism infection and microflora in the mouth. *BJOG*. 2002 May;109(5):527-533.
40. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One*. 2008 Aug 26;3(8):e3056.
41. Del Prete G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*. 1992 Oct;47(5):450-455.
42. Basu S. Neonatal sepsis: the gut connection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Feb;34(2):215-222.
43. Butel MJ, Suau A, Campeotto F, Magne F, Aires J, Ferraris L, et al. Conditions of bifidobacterial colonization in preterm infants: a prospective analysis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2007 May;44(5):577-82.
44. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 29;107(26):11971-5.
45. Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, et al. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics*. 2006 Aug;118(2):511-21.

46. Le Huërou-Luron I, Blat S, Boudry G. Breast- v. formula-feeding: impacts on the digestive tract and immediate and long-term health effects. *Nutr Res Rev.* 2010 Jun;23(1):23-36.
47. Penders J, Vink C, Driessen C, London N, Thijs C, Stobberingh EE. Quantification of *Bifidobacterium* spp., *Escherichia coli* and *Clostridium difficile* in faecal samples of breast-fed and formula-fed infants by real-time PCR. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Feb 1;243(1):141-7.
48. Penders J, Thijs C, van den Brandt PA, Kummeling I, Snijders B, et al. Gut microbiota composition and development of atopic manifestations in infancy: the KOALA Birth Cohort Study. *Gut.* 2007 May;56(5):661-667.
49. Bäckhed F, Roswall J, Peng Y, Feng Q, Jia H, Kovatcheva-Datchary P, et al. Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe.* 2015 May 13;17(5):690-703.
50. Johnson CL, Versalovic J. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics.* 2012 May;129(5):950-960.
51. Ferraris L, Butel MJ, Campeotto F, Vodovar M, Rozé JC, Aires J. Clostridia in premature neonates' gut: incidence, antibiotic susceptibility, and perinatal determinants influencing colonization. *PLoS One.* 2012;7(1):e30594.
52. Berardi A, Lugli L, Rossi C, Guidotti I, Lanari M, Creti R. Impact of perinatal practices for early-onset group B Streptococcal disease prevention. *Pediatr Infect Dis J.* 2013 Jul;32(7):e265-271.
53. Azad MB, Konya T, Persaud RR, Guttman DS, Chari RS, Field CJ. Impact of maternal intrapartum antibiotics, method of birth and breastfeeding on gut microbiota during the first year of life: a prospective cohort study. *BJOG.* 2016 May;123(6):983-993.
54. Arbolea S, Sánchez B, Milani C, Duranti S, Solís G, Fernandes N, et al. Intestinal microbiota development in pre-term neonates and effect of perinatal antibiotics. *J Pediatr.* 2015 Mar;166(3):538-544.
55. Arbolea S, Sánchez B, Solís G, Fernández N, Suárez M, Hernández-Barranco AM, et al. Impact of Prematurity and Perinatal Antibiotics on the Developing Intestinal Microbiota: A Functional Inference Study. *Int J Mol Sci.* 2016 Apr 29;17(5):649.

56. Berardi A, Fornaciari S, Rossi C, Patianna V, Bacchi Reggiani ML, et al. Safety of physical examination alone for managing well-appearing neonates $\geq$ 35 weeks' gestation at risk for early-onset sepsis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2015 Jul;28(10):1123-1127
57. Lin HC, Hsu CH, Chen HL, Chung MY, Hsu JF, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight pre-term infants: a multicenter, randomized, controlled trial. *Pediatrics.* 2008 Oct;122(4):693-700.
58. Coppa GV, Zampini L, Galeazzi T, Gabrielli O. Prebiotics in human milk: a review. *Dig Liver Dis.* 2006 Dec;38 Suppl 2:291-294.
59. Donovan SM, Comstock SS. Human Milk Oligosaccharides Influence Neonatal Mucosal and Systemic Immunity. *Ann Nutr Metab.* 2016;69 Suppl 2(Suppl 2):42-51.
60. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* 2003 Dec;143(6):754-758.
61. Proscop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Koneman EW, et al, The Enterobacteriaceae. In: Color atlas and textbook of diagnostic microbiology, Antimicrobial Susceptibility Testing. Chapter 17. p. 1074-1171. Wolter Kluwer and Lippincott Williams& Wilkins publishers. 2017).
62. Donohoe DR, Garge N, Zhang X, Sun W, O'Connell TM, et al. The microbiome and butyrate regulate energy metabolism and autophagy in the mammalian colon. *Cell Metab.* 2011 May 4;13(5):517-526.
63. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. *Lactobacillus acidophilus* LA 1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut.* 1994 Apr;35(4):483-489.
64. Wilson KH, Perini F. Role of competition for nutrients in suppression of *Clostridium difficile* by the colonic microflora. *Infect Immun.* 1988 Oct;56(10):2610-2614.
65. Silva M, Jacobus NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987 Aug;31(8):1231-1233.
66. Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1997 Nov-Dec;21(6):357-65.

67. Christian MT, Edwards CA, Preston T, Johnston L, Varley R, et al. Starch fermentation by faecal bacteria of infants, toddlers and adults: importance for energy salvage. *Eur J Clin Nutr*. 2003 Nov;57(11):1486-91.
68. Wroblewski LE, Peek RM Jr. *Helicobacter pylori*, Cancer, and the Gastric Microbiota. *Adv Exp Med Biol*. 2016;908:393-408.
69. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans AD, et al. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Jul;68(7):3401-3407.
70. Moayyedi P. Invited Commentary: Clues to the etiology of Inflammatory bowel disease- A return to John Snow? *Am J Epidemiol* 2006 Oct;164(7):624-626.
71. Lam V, Su J, Koprowski S, Hsu A, Tweddell JS, et al. Intestinal microbiota determine severity of myocardial infarction in rats. *FASEB J*. 2012 Apr;26(4):1727-1735.
72. Grenham S, Clarke G, Cryan JF, Dinan TG. Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol*. 2011 Dec 7;2:94.
73. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Feb 15;108(7):3047-3052.
74. Sántulli TV, Schullinger JN, Heird WC, Gongaware RD, Wigger J, et al. Acute necrotizing enterocolitis in infancy: a review of 64 cases. *Pediatrics*. 1975 Mar;55(3):376-387
75. Guillet R, Stoll BJ, Cotten CM, Gantz M, McDonald S, et al. Association of H2-blocker therapy and higher incidence of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2006 Feb;117(2):e137-142.
76. Lin PW, Stoll BJ. Necrotising enterocolitis. *Lancet*. 2006 Oct 7;368(9543):1271-1283.
77. Holman RC, Stoll BJ, Clarke MJ, Glass RI. The epidemiology of necrotizing enterocolitis infant mortality in the United States. *Am J Public Health* 1997 Dec;87(12):2026-2031.
78. Manichanh C, Rigottier-Gois L, Bonnaud E, Gloux K, Pelletier E, et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006 Feb;55(2):205-211.

79. Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel JF, et al. Fecal beta-D-galactosidase production and *Bifidobacteria* are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci*. 1997 Apr;42(4):817-822.
80. van Nuenen MH, Venema K, van der Woude JC, Kuipers EJ. The metabolic activity of fecal microbiota from healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2004 Mar;49(3):485-491.
81. Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One*. 2014 Mar 10;9(3):e90784.
82. Wampach L, Heintz-Buschart A, Hogan A, Muller EEL, Narayanasamy S, et al. Colonization and Succession within the Human Gut Microbiome by Archaea, Bacteria, and Microeukaryotes during the First Year of Life. *Front Microbiol*. 2017 May 2;8:738.
83. Grier A, Qiu X, Bandyopadhyay S, Holden-Wiltse J, Kessler HA, et al. Impact of prematurity and nutrition on the developing gut microbiome and pre-term infant growth. *Microbiome*. 2017 Dec 11;5(1):158.
84. He Q, Kwok LY, Xi X, Zhong Z, Ma T, et al. The meconium microbiota shares more features with the amniotic fluid microbiota than the maternal fecal and vaginal microbiota. *Gut Microbes*. 2020 Nov 9;12(1):1794266.
85. Rackaityte E, Halkias J, Fukui EM, Mendoza VF, Hayzelden C, et al. Viable bacterial colonization is highly limited in the human intestine in utero. *Nat Med*. 2020 Apr;26(4):599-607.
86. Marchesi JR, Ravel J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. *Microbiome*. 2015 Jul 30;3:31.
87. Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E. Dysbiosis and the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2017 Apr;17(4):219-232.
88. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug;11(8):506-514.
89. Bouchet V, Huot H, Goldstein R. Molecular genetic basis of ribotyping. *Clin Microbiol Rev*. 2008 Apr;21(2):262-273.

90. Navas-Molina JA, Peralta-Sánchez JM, González A, McMurdie PJ, Vázquez-Baeza Y, et al Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods Enzymol.* 2013;531:371-444.
91. Whittaker RH. Evolution and Measurement of Species Diversity. *Taxon.* 1972;21(2/3), 213–251.
92. Goodrich JK, Di Rienzi SC, Poole AC, Koren O, Walters WA, et al. Conducting a microbiome study. *Cell.* 2014 Jul 17;158(2):250-262.
93. Spellerberg IF, Fedor PJ. A tribute to Claude Shannon (1916-2001) and a plea for more rigorous use of species richness, species diversity and the ‘Shannon-Wiener’ Index. *Global Ecology and Biogeography.* 2013;12(3):177-179.
94. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990 Jun;87(12):4576-4579.
95. Sommer MO. Advancing gut microbiome research using cultivation. *Curr Opin Microbiol.* 2015 Oct;27:127-132.
96. Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science.* 2006 Jun 2;312(5778):1355-1359.
97. Knight R, Vrbanc A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, et al. Best practices for analysing microbiomes. *Nat Rev Microbiol.* 2018 Jul;16(7):410-422.
98. Morgan XC, Huttenhower C. Chapter 12: Human microbiome analysis. *PLoS Comput Biol.* 2012;8(12):e1002808.
99. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tse H, Yuen KY. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Oct;14(10):908-934.
100. Rozas M, Brillet F, Callewaert C, Paetzold B. MinION™ Nanopore Sequencing of Skin Microbiome 16S and 16S-23S rRNA Gene Amplicons. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022 Jan 5;11:806476.
101. Chen YL, Lee CC, Lin YL, Yin KM, Ho CL, et al. Obtaining long 16S rDNA sequences using multiple primers and its application on dioxin-containing samples. *BMC Bioinformatics.* 2015;16 Suppl 18(Suppl 18):13.

102. Fox GE, Magrum LJ, Balch WE, Wolfe RS, Woese CR. Classification of methanogenic bacteria by 16S ribosomal RNA characterization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977 Oct;74(10):4537-4541.
103. Fukuda K, Ogawa M, Taniguchi H, Saito M. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH*. 2016 Sep;38(3):223-232.
104. Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Oct;11(5):442-446.
105. Iyer N. Methods in microbiome research. *Lab Anim (NY)*. 2016 Aug 23;45(9):323-326.
106. Johnson JS, Spakowicz DJ, Hong BY, Petersen LM, Demkowicz P, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis. *Nat Commun*. 2019 Nov 6;10(1):5029.
107. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010 May;7(5):335-336.
108. Cole JR, Wang Q, Cardenas E, Fish J, Chai B, et al. The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan;37:141-145.
109. Pruesse E, Quast C, Knittel K, Fuchs BM, Ludwig W, et al. SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(21):7188-7196.
110. Wang Y, Qian PY. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS One*. 2009 Oct 9;4(10):e7401.
111. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016 Jan;107(1):1-8.
112. Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Jun;6(6):431-440.
113. Schloss PD. The effects of alignment quality, distance calculation method, sequence filtering, and region on the analysis of 16S rRNA gene-based studies. *PLoS Comput Biol*. 2010 Jul 8;6(7):e1000844.

114. Hamady M, Knight R. Microbial community profiling for human microbiome projects: Tools, techniques, and challenges. *Genome Res.* 2009 Jul;19(7):1141-1152.
115. Johnson RA, Wichern DW. 2007. *Applied Multivariate Statistical Analysis*:5th Edition, Prentice Hall.
116. Zoetendal EG, Rajilic-Stojanovic M, de Vos WM. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut.* 2008 Nov;57(11):1605-1615.
117. Ranjan R, Rani A, Metwally A, McGee HS, Perkins DL. Analysis of the microbiome: Advantages of whole genome shotgun versus 16S amplicon sequencing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Jan 22;469(4):967-977.
118. Bashiardes S, Zilberman-Schapira G, Elinav E. Use of Metatranscriptomics in Microbiome Research. *Bioinform Biol Insights.* 2016 Apr 20;10:19-25.
119. Kolmeder CA, de Vos WM. Metaproteomics of our microbiome - developing insight in function and activity in man and model systems. *J Proteomics.* 2014 Jan 31;97:3-16.
120. Aw W, Fukuda S. Toward the comprehensive understanding of the gut ecosystem via metabolomics-based integrated omics approach. *Semin Immunopathol.* 2015 Jan;37(1):5-16.
121. Misra BB, Langefeld CD, Olivier M, Cox LA. Integrated Omics: Tools, Advances, and Future Approaches. *J Mol Endocrinol.* 2018 Jul 13;JME-18-0055.
122. Chiu CH, Chao A. Estimating and comparing microbial diversity in the presence of sequencing errors. *PeerJ.* 2016 Feb 1;4:e1634.
123. Bray, J. Roger, and J. T. Curtis. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecological Monographs*, 1957; 27(4):326–349.
124. Lozupone C, Lladser ME, Knights D, Stombaugh J, Knight R. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison. *ISME J.* 2011 Feb;5(2):169-172.
125. Faith DP, Lozupone CA, Nipperess D, Knight R. The cladistic basis for the phylogenetic diversity (PD) measure links evolutionary features to environmental gradients and supports broad applications of microbial ecology's

- "phylogenetic beta diversity" framework. *Int J Mol Sci.* 2009 Nov 3;10(11):4723-4741.
126. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 33rd ed. CLSI document M100-Ed33. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2023.
 127. Dos Santos HRM, Argolo CS, Argôlo-Filho RC, Loguercio LL. A 16S rDNA PCR-based theoretical to actual delta approach on culturable mock communities revealed severe losses of diversity information. *BMC Microbiol.* 2019 Apr 8;19(1):74.
 128. Zander J, Besier S, Ackermann H, Wichelhaus TA. Synergistic antimicrobial activities of folic acid antagonists and nucleoside analogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):1226-31.
 129. Zhou K, Tao Y, Han L, Ni Y, Sun J. Piperacillin-Tazobactam (TZP) Resistance in *Escherichia coli* Due to Hyperproduction of TEM-1 β -Lactamase Mediated by the Promoter Pa/Pb. *Front Microbiol.* 2019 Apr 16;10:833.
 130. EUCAST disk diffusion for selected rapidly growing anaerobic bacteria on Fastidious Anaerobe Agar with 5% horse blood (FAA-HB) https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Disk_diffusion_Anaerobes_Reading_Guide_v_2.0_2023.pdf; Erişim: 18.04.2024
 131. Patangia DV, Anthony Ryan C, Dempsey E, Paul Ross R, Stanton C. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health. *Microbiologyopen.* 2022 Feb;11(1):e1260.
 132. Lawn JE, Kerber K, Enweronu-Laryea C, Cousens S. 3.6 million neonatal deaths--what is progressing and what is not? *Semin Perinatol.* 2010 Dec;34(6):371-86.
 133. Perez-Palacios P, Girlich D, Soraá N, Lamrani A, Maoulainine FMR, et al. Multidrug-resistant Enterobacterales responsible for septicemia in a neonatal intensive care unit in Morocco. *J Glob Antimicrob Resist.* 2023 Jun;33:208-217.
 134. Management of Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings (2006) <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/mdro/index.html>; Erişim: 18.04.2024

135. Sefali S, Nakipoglu Y. Efficacy of oritavancin and nisin alone and their combination against vancomycin resistant enterococci strains in hospitalized patients in Turkiye. *Indian J Med Microbiol*. 2024 Jan-Feb;47:100489.
136. Demir HK, Nakipoglu Y. Investigation of the prevalence of carbapenem resistance genes in faecal carriage of carbapenem resistant *Klebsiella* spp. isolates by multiplex real-time PCR method. *J Infect Dev Ctries*. 2023 Nov 30;17(11):1606-1612.
137. Pammi M, Haque KN. Pentoxifylline for treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev*. 2015 Mar 9;(3):CD004205.
138. Korpela K, Blakstad EW, Moltu SJ, Strømmen K, Nakstad B, et al. Intestinal microbiota development and gestational age in preterm neonates. *Sci Rep*. 2018 Feb 6;8(1):2453.
139. Drell T, Lutsar I, Stšepetova J, Parm U, Metsvaht T, Ilmoja ML, et al. The development of gut microbiota in critically ill extremely low birth weight infants assessed with 16S rRNA gene based sequencing. *Gut Microbes*. 2014 May-Jun;5(3):304-12.
140. Hansen R, Scott KP, Khan S, Martin JC, Berry SH, et al. First-Pass Meconium Samples from Healthy Term Vaginally-Delivered Neonates: An Analysis of the Microbiota. *PLoS One*. 2015 Jul 28;10(7):e0133320.
141. Dos Santos SJ, Pakzad Z, Elwood CN, Albert AYK, Gantt S, et al; Maternal Microbiome Legacy Project Team. Early Neonatal Meconium Does Not Have a Demonstrable Microbiota Determined through Use of Robust Negative Controls with cpn60-Based Microbiome Profiling. *Microbiol Spectr*. 2021 Oct 31;9(2):e0006721.
142. Abellan-Schneyder I, Matchado MS, Reitmeier S, Sommer A, Sewald Z, et al. Primer, Pipelines, Parameters: Issues in 16S rRNA Gene Sequencing. *mSphere*. 2021 Feb 24;6(1):e01202-20.
143. Marizzoni M, Gurry T, Provasi S, Greub G, Lopizzo N, et al. Comparison of Bioinformatics Pipelines and Operating Systems for the Analyses of 16S rRNA Gene Amplicon Sequences in Human Fecal Samples. *Front Microbiol*. 2020 Jun 17;11:1262.

144. Branton D, Deamer DW, Marziali A, Bayley H, Benner SA, et al. The potential and challenges of nanopore sequencing. *Nat Biotechnol.* 2008 Oct;26(10):1146-53.
145. Eid J, Fehr A, Gray J, Luong K, Lyle J, et al. Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. *Science.* 2009 Jan 2;323(5910):133-8.
146. Alcon-Giner C, Caim S, Mitra S, Ketskemety J, Wegmann U, et al. Optimisation of 16S rRNA gut microbiota profiling of extremely low birth weight infants. *BMC Genomics.* 2017 Nov 2;18(1):841.
147. Nossa CW, Oberdorf WE, Yang L, Aas JA, Paster BJ, et al Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J Gastroenterol.* 2010 Sep 7;16(33):4135-44.
148. López-Aladid R, Fernández-Barat L, Alcaraz-Serrano V, Bueno-Freire L, Vázquez N, et al. Determining the most accurate 16S rRNA hypervariable region for taxonomic identification from respiratory samples. *Sci Rep.* 2023 Mar 9;13(1):3974.
149. Miller WR, Murray BE, Rice LB, Arias CA. Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Infect Dis Clin North Am.* 2020 Dec;34(4):751-771.
150. Arias CA, Murray BE. The rise of the Enterococcus: beyond vancomycin resistance. *Nat Rev Microbiol.* 2012 Mar 16;10(4):266-78.
151. Clark RH, Bloom BT, Spitzer AR, Gerstmann DR. Reported medication use in the neonatal intensive care unit: data from a large national data set. *Pediatrics.* 2006 Jun;117(6):1979-87.
152. Gasparri AJ, Wang B, Sun X, Kennedy EA, Hernandez-Leyva A, et al. Persistent metagenomic signatures of early-life hospitalization and antibiotic treatment in the infant gut microbiota and resistome. *Nat Microbiol.* 2019 Dec;4(12):2285-2297.
153. Fouhy F, Guinane CM, Hussey S, Wall R, Ryan CA, et al. High-throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicillin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Nov;56(11):5811-20.
154. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, et al. Comparative review of the carbapenems. *Drugs.* 2007;67(7):1027-52.

155. Pérez-Cobas AE, Gosalbes MJ, Friedrichs A, Knecht H, Artacho A, et al. Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: a multi-omic approach. *Gut*. 2013 Nov;62(11):1591-601.
156. Dardas M, Gill SR, Grier A, Pryhuber GS, Gill AL, et al. The impact of postnatal antibiotics on the preterm intestinal microbiome. *Pediatr Res*. 2014 Aug;76(2):150-8.
157. Zwittink RD, van Zoeren-Grobbe D, Renes IB, van Lingen RA, Norbruis OF, et al. Dynamics of the bacterial gut microbiota in preterm and term infants after intravenous amoxicillin/ceftazidime treatment. *BMC Pediatr*. 2020 May 7;20(1):195.
158. Lu S, Huang Q, Wei B, Chen Y. Effects of β -Lactam Antibiotics on Gut Microbiota Colonization and Metabolites in Late Preterm Infants. *Curr Microbiol*. 2020 Dec;77(12):3888-3896.
159. Wandro S, Osborne S, Enriquez C, Bixby C, Arrieta A, et al. The Microbiome and Metabolome of Preterm Infant Stool Are Personalized and Not Driven by Health Outcomes, Including Necrotizing Enterocolitis and Late-Onset Sepsis. *mSphere*. 2018 Jun 6;3(3):e00104-18.
160. Marcobal A, Barboza M, Sonnenburg ED, Pudlo N, Martens EC, et al. Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe*. 2011 Nov 17;10(5):507-14.
161. Yokoyama S, Suzuki T. Isolation and characterization of a novel equol-producing bacterium from human feces. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2008 Oct;72(10):2660-6.
162. Bennett KW, Eley A. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *J Med Microbiol*. 1993 Oct;39(4):246-54.
163. Berman, J. *Taxonomic Guide to Infectious Diseases* (2 ed.). Elsevier, 2019, pp. 39–119. Retrieved 17 February 2024.
164. Jethwani P, Grover K. Gut microbiota in health and diseases—a review. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 2019, 8(8):2019;1586–1599
165. Aloisio I, Quagliariello A, De Fanti S, Luiselli D, De Filippo C, et al. Evaluation of the effects of intrapartum antibiotic prophylaxis on newborn intestinal microbiota using a sequencing approach targeted to multi

- hypervariable 16S rDNA regions. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2016 Jun;100(12):5537-46.
166. Mazzola G, Murphy K, Ross RP, Di Gioia D, Biavati B, et al. Early Gut Microbiota Perturbations Following Intrapartum Antibiotic Prophylaxis to Prevent Group B Streptococcal Disease. *PLoS One*. 2016 Jun 22;11(6):e0157527.
 167. Petriglieri F, Kondrotaite Z, Singleton C, Nierychlo M, Dueholm MKD, et al. A comprehensive overview of the Chloroflexota community in wastewater treatment plants worldwide. *mSystems*. 2023 Dec 21;8(6):e0066723.
 168. Mehdizadeh Allaf M, Peerhossaini H. Cyanobacteria: Model Microorganisms and Beyond. *Microorganisms*. 2022 Mar 24;10(4):696.
 169. Bergsten P, Vannier P, Frion J, Mougeolle A, Marteinsson VP. Culturable Bacterial Diversity from the Basaltic Subsurface of the Young Volcanic Island of Surtsey, Iceland. *Microorganisms*. 2022 Jun 8;10(6):1177.
 170. Mujakić I, Piwosz K, Kobližek M. Phylum Gemmatimonadota and Its Role in the Environment. *Microorganisms*. 2022 Jan 12;10(1):151.
 171. Cani PD, Depommier C, Derrien M, Everard A, de Vos WM. Akkermansia muciniphila: paradigm for next-generation beneficial microorganisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022 Oct;19(10):625-637.
 172. Zhang T, Li Q, Cheng L, Buch H, Zhang F. Akkermansia muciniphila is a promising probiotic. *Microb Biotechnol*. 2019 Nov;12(6):1109-1125.
 173. Stewart CJ, Skeath T, Nelson A, Fernstad SJ, Marrs EC, et al. Preterm gut microbiota and metabolome following discharge from intensive care. *Sci Rep*. 2015 Nov 24;5:17141.
 174. Kasai C, Sugimoto K, Moritani I, Tanaka J, Oya Y, et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. *BMC Gastroenterol*. 2015 Aug 11;15:100.
 175. Thuny F, Richet H, Casalta JP, Angelakis E, Habib G, et al. Vancomycin treatment of infective endocarditis is linked with recently acquired obesity. *PLoS One*. 2010 Feb 10;5(2):e9074.
 176. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. 2008 Apr;159(3):187-93.

177. Yang J, Yao S, Cheng K, Xu L, Hou L, et al. Comparison of Meconium Microbiome in Dizygotic and Monozygotic Twins Born by Caesarean Section (CS). *Front Microbiol.* 2020 Jun 3;11:1139.
178. Zhu D, Xiao S, Yu J, Ai Q, He Y, et al. Effects of One-Week Empirical Antibiotic Therapy on the Early Development of Gut Microbiota and Metabolites in Preterm Infants. *Sci Rep.* 2017 Aug 14;7(1):8025.
179. Russell JT, Lauren Ruoss J, de la Cruz D, Li N, Bazacliu C, et al. Antibiotics and the developing intestinal microbiome, metabolome and inflammatory environment in a randomized trial of preterm infants. *Sci Rep.* 2021 Jan 21;11(1):1943.
180. Hourigan SK, Subramanian P, Hasan NA, Ta A, Klein E, et al. Comparison of Infant Gut and Skin Microbiota, Resistome and Virulome Between Neonatal Intensive Care Unit (NICU) Environments. *Front Microbiol.* 2018 Jun 25;9:1361.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

VANKOMİSİN DİRENÇLİ
ENTEROKOK VE KARBAPENEM
DİRENÇLİ GRAM NEGATİF
ÇOMAK KOLONİZASYONLU
NEONATAL REKTAL SÜRÜNTÜ
ÖRNEKLERİNİN METAGENOMİK
ARAŞTIRILMASI

by AHMET AKTAŞ

Submission date: 18-Apr-2024 04:25PM (UTC+0300)

Submission ID: 2353827722

File name: REKTAL_SU_RU_NTU_O_RNEKLERI_NI_N_METAGENOMI_K_ARAS_TIRILMASI.pdf (3.66M)

Word count: 26952

Character count: 180657

VANKOMİSİN DİRENÇLİ ENTEROKOK VE KARBAPENEM DİRENÇLİ GRAM NEGATİF ÇOMAK KOLONİZASYONLU NEONATAL REKTAL SÜRÜNTÜ ÖRNEKLERİNİN METAGENOMİK ARAŞTIRILMASI

ORIGINALITY REPORT

5%	5%	3%	1%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	acikbilim.yok.gov.tr Internet Source	2%
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 Internet Source	<1 %
3	www.researchgate.net Internet Source	<1 %
4	acikerisim.medipol.edu.tr Internet Source	<1 %
5	www.esp.org Internet Source	<1 %
6	tr.hmongwiki.com Internet Source	<1 %
7	Feyza Gül, Sukriye Karadayı, Zuhul Yurdabakan, Tülin Özbek, Beytullah Karadayı. "Investigating Changes in Salivary Microbiota Due to Dental Treatment: A Metagenomic	<1 %