

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**IRAK'TA BAZI GENETİK VE BAĞIŞIKLIK SİNYALLERİ KULLANILARAK
SARS-COV-2 HASTALARININ BAKTERİYOLOJİK VE İMMÜNOLOJİK
ÇALIŞMASI**

Sahar Abdulwahab Abdulwahid ALSAMARAI

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2024**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Sahar Abdulwahab Abdulwahid ALSAMARAI tarafından hazırlanan “**Irak'ta Bazı Genetik ve Bağışıklık Sinyalleri Kullanılarak SARS-COV-2 Hastalarının Bakteriyolojik ve İmmünolojik Çalışması**” adlı tez çalışması 31/10/2024 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Waqas Saadi MAHMOOD

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Fiziki Coğrafya Anabilim Dalı
Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mine TÜRKTAS
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Serkan GÜLSOY
Toprak İlmi ve Ekolojisi Anabilim Dalı
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ebru GÜL
Orman Mühendisliği Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Ersoy YILMAZ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **“Irak'ta Bazı Genetik ve Bağışıklık Sinyalleri Kullanılarak SARS-COV-2 Hastalarının Bakteriyolojik ve İmmünolojik Çalışması”** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan “Bilimsel İntihal Tespit Programı”yla tarandığını, “intihal içermediğini” beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (31/10/2024).

Sahar Abdulwahab Abdulwahid ALSAMARAI

ÖZET

Doktora Tezi

IRAK'TA BAZI GENETİK VE BAĞIŞIKLIK SİNYALLERİ KULLANILARAK SARS-COV-2 HASTALARININ BAKTERİYOLOJİK VE İMMÜNOLOJİK ÇALIŞMASI

Sahar Abdulwahab Abdulwahid ALSAMARAI

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Waqas Saadi MAHMOOD

Bu çalışmanın amacı, COVID-19 hastalarında akciğer enfeksiyonuna neden olan ikincil bakterileri değerlendirmek ve SARS hastalarında ikincil bakteriyel enfeksiyonla ilişkili bağışıklık faktörlerinin yanı sıra, gen ekspresyonunu ve incelenen bağışıklık göstergeleriyle ilişkisi ile reaksiyonların duyarlılığını ve özgüllüğünü tespit ederek moleküler immünolojik testler için en uygun yöntemi belirlemektir. Bu amaçla, bu araştırmaya COVID-19 ile enfekte 236 Iraklı hasta katılmıştır. Tüm hastaların SARS-COV-2 ile enfekte olduğu, nazofarengeal sürüntüden elde edilen polimeraz zincir reaksiyonu kullanılarak doğrulanmıştır. Daha ileri analizler için katılımcılardan kan örnekleri ve nazofarengeal sürüntü örnekleri tıp uzmanının rehberliğinde toplanmıştır. Çalışma grupları hafif enfeksiyonu olan SARS hastaları, ağır ve orta derecede viral enfeksiyona bağlı primer akciğer hasarı olan bir grup hasta ve sağlıklı birey olarak ayrılmıştır. Daha önce aşılanmış farklı yaşlardaki enfekte hastalardan, demografik veriler, semptomlar, komorbidite öyküsü, beslenme alışkanlıkları, ilaç öyküsü, biyokimyasal raporlar ve SARS-CoV-2'nin klinik öyküsü, hasta yaşı, cinsiyeti, enfeksiyon süresi ve varsa kronik hastalık türü gibi bilgiler elde edilmiştir. Ayrıca, incelenen değişkenleri bu türlere göre karşılaştırmak amacıyla, daha önce enfekte olmuş ve aşılanmamış hastaların aldıkları aşı türlerini de ayrı bir grup olarak ele alınmıştır. Araştırmaya hamile ve emziren kadınların yanı sıra katılmaya istekli olmadığını ifade eden hastalar dahil edilmemiştir. Çalışmaya katılanların yaşları 17 ile 89 arasında değişmektedir. Örnekler, enfeksiyon varlığını doğrulayan ikincil bakteriyel pnömoni açısından incelenmiştir. Ayrıca bu enfeksiyonla ilişkili risk faktörleri belirlenmiş ve bazı immünolojik ve genetik belirteçleri değerlendirilmiştir. Farklı bakteri türlerini izole etmek ve tanımlamak için balgam örnekleri, nazofarengeal sürüntüler ve oral sürüntüler kullanılmıştır. Erkeklerde sekonder bakteriyel pnömoni prevalansının (%67) kadınlara (%35,6) kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür. Antimikrobiyal ilaç duyarlılığını değerlendirmek için Kirby-Bauer yöntemi kullanılmış ve Mueller-Hinton agara 11 antibiyotik enjekte edilmiştir. TLR-2, ACE-2, FASL, RBD, IgG ve IgM seviyelerinin yanı sıra bazı genetik ve immünolojik belirteçleri kontrol etmek için enzime bağlı immünosorbent testi (ELISA) tekniği kullanılmıştır. Bu belirteçler birbirleriyle ve sekonder enfeksiyonla ilişkili bakterilerle anlamlı ilişkiler

göstererek aralarında pozitif bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Çalışmamız enfeksiyonla ilişkili bakteri türleri, patojen bakteriler ve mikrobiyom arasında çeşitlilik göstermiştir. Bakterilerin direnç ve virülans oranları da kantitatif ve kalitatif yöntemler kullanılarak biyofilm testi yoluyla değiştirilmiştir. Moleküler düzeyde, SARS-CoV-2 genlerinin viral yük ve döngü eşik değerleri değişmiştir. Birkaç gen üzerinde çalışılmıştır. Enfekte çalışma örneklerindeki ana banka geninin ekspresyon seviyelerinin yanı sıra, başka önemli bir ilişki olmaması koşuluyla, bu moleküler belirteçler ile çalışma gruplarındaki immünolojik ölçümler arasındaki ilişki incelenmiştir.



2024, 169 sayfa

ANAHTAR KELİMELELER: Biyofilm, Ko-enfeksiyon bakterileri, RBD, SARS-COV-2

ABSTRACT

PhD Thesis

BACTERIOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL STUDY OF SARS-COV-2 PATIENTS IN IRAQ USING SOME GENETIC AND IMMUNE SIGNALS

Sahar Abdulwahab Abdulwahid ALSAMARAI

Çankırı Karatekin University
Institute of Graduate Studies
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Melda DÖLARSLAN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Waqas Saadi MAHMOOD

The aim of this study was to evaluate the secondary bacteria causing lung infection in COVID-19 patients and to determine the most appropriate method for molecular immunoassays by detecting the sensitivity and specificity of the reactions by detecting gene expression and its relationship with the immune indicators studied, as well as immune factors associated with secondary bacterial infection in SARS patients. To this end, 236 Iraqi patients infected with COVID-19 participated in this study. All patients were confirmed to be infected with SARS-COV-2 using polymerase chain reaction from nasopharyngeal swab. Blood samples and nasopharyngeal swab samples were collected from participants for further analysis under the guidance of a medical professional. The study groups were divided into SARS patients with mild infection, a group of patients with primary lung damage due to severe and moderate viral infection, and healthy individuals. From previously vaccinated infected patients of different ages, demographic data, symptoms, history of comorbidities, dietary habits, medication history, biochemical reports and clinical history of SARS-CoV-2, patient age, gender, duration of infection and type of chronic disease, if any, were obtained. In addition, the types of vaccines received by previously infected and unvaccinated patients were also considered as a separate group in order to compare the variables examined according to these types. Pregnant and breastfeeding women, as well as patients who expressed unwillingness to participate, were excluded. The ages of the study participants ranged from 17 to 89 years. Samples were examined for secondary bacterial pneumonia confirming the presence of infection. Risk factors associated with this infection were also identified and some immunologic and genetic markers were evaluated. Sputum samples, nasopharyngeal swabs and oral swabs were used to isolate and identify different bacterial species. A higher prevalence of secondary bacterial pneumonia was observed in males (67%) compared to females (35.6%). The Kirby-Bauer method was used to assess antimicrobial drug susceptibility and 11 antibiotics were injected into Mueller-Hinton agar. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) technique was used to check TLR-2, ACE-2, FASL, RBD, IgG and IgM levels as well as some genetic and immunological markers. These markers showed significant associations with each other and with bacteria associated with secondary infection, suggesting a positive relationship between them. Our

study showed diversity among infection-associated bacterial species, pathogenic bacteria and the microbiome. Bacterial resistance and virulence rates were also modified through biofilm testing using quantitative and qualitative methods. At the molecular level, viral load and cycle thresholds of SARS-CoV-2 genes were altered. Several genes were studied. The expression levels of the main bank gene in the infected study samples, as well as the relationship between these molecular markers and immunological measurements in the study groups were examined, provided there were no other significant associations.



2024, 169 pages

Keywords: Biofilm, Co-infecting bacteria, RBD, SARS-COV-2

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Melda DÖLARASLAN'a araştırma boyunca gösterdiği büyük çaba ve destek için ve ikinci danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Waqas Saadi MAHMOOD'a yıllar boyunca unutulmaz teşviki ve yorulmak bilmeyen öğretim çabaları için derin şükranlarımı sunarım. Çalışmamın her anında yanımda oldukları için başta sevgili annem ve babam olmak üzere tüm aileme içtenlikle teşekkür ederim. Kardeşlerim, hepinize çok minnettarım. Tanrı'nın yardımı olmadan başaramam, O'na güveniyorum ve her zaman O'na yöneliyorum.

Sahar Abdulwahab Abdulwahid ALSAMARAI

Çankırı, Ekim 2024

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER DİZİNİ	x
KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	4
2.1 Tarihsel Perspektif.....	4
2.2 Yapı	5
2.3 Sınıflandırma	6
2.4 Klinik Tablo.....	6
2.5 Epidemiyoloji.....	7
2.5.1 Coğrafi dağılım	7
2.5.2 Bulaşma	8
2.6 SARS-CoV-2 Patojenite.....	9
2.7 Patogenez	10
2.7.1 Virüsün konak hücreye bağlanması ve girişi	10
2.7.2 Bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi	14
2.8 Patofizyoloji	15
2.9 Viral Risk Faktörleri.....	15
2.9.1 Bulaşabilirlik.....	15
2.9.2 Viral yük.....	16
2.10 Tanı.....	16
2.11 Moleküler Yöntemler	17
2.12 COVID-19 Aşıları	18
2.12.1 Aşı potansiyeli mRNA.....	18
2.12.2 Çoğalmayan viral vektörleri kullanan aşılar.....	19

2.12.3 İnaktif virüslere yönelik aşılar	19
2.12.4 Alt birimlerden oluşan aşı bileşenleri.....	19
2.12.5 Alternatif tipler.....	19
2.12.6 Tedavi	20
2.13 COVID-19 ve Bağışıklık	21
2.13.1 IgM	21
2.13.2 IgG	21
2.13.3 Sitokinler	22
2.14 İkincil Bakteriyel Akciğer iltihaplanması ile Birleşmiş SARS COV-2	23
2.14.1 Bakteriyel pnömoniye neden olan izole bakterilerin tanımı	24
2.15 Biyofilmler	28
2.15.1 Biyofilmlerin önemi.....	30
2.15.2 Biyofilm oluşumunun aşamaları.....	31
2.16 Viral ve Bakteriyel İlişkiler ve Solunum Sistemini İstila Etmedeki Rollerini	32
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1 Materyal	33
3.2 Yöntemler.....	36
3.2.1 Sterilizasyon	36
3.2.2 Hazırlık ile ilgili çözümler ve reaktifler	36
3.2.3 Kültür ortamının hazırlanması	37
3.3 Çalışma Tasarımı	37
3.3.1 Örnek toplama	38
3.3.2 Klinik veriler	39
3.4 Bakteriyel Çalışma	40
3.4.1 Bakteriyel tanılama	40
3.4.2 Stok kültürünün korunması	40
3.4.3 VITEK2 kompakt sistemi ile manuel tanımlamanın onaylanması	40
3.5 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (Disk Difüzyon Yöntemi).....	41
3.6 API testi.....	42
3.6.1 API 20E testi.....	42
3.6.2 API <i>Staphylococcus</i> testi.....	43
3.7 Biyofilm Oluşumunun Tespiti.....	44

3.8 Virülans Faktörünün Tespiti	45
3.8.1 Hemolizin üretimi	45
3.8.2 Kapsül üretimi	45
3.8.3 Lipaz ve lesitinaz enzim üretimi	45
3.8.4 Proteaz üretimi	45
3.8.5 DNaz üretimi	46
3.8.6 Üreaz üretimi	46
3.9 Serolojik Parametreler	46
3.9.1 Antikor testleri	46
3.9.2 İnsan (TLR-2, ACE-2, RBD, FASL) tespiti	47
3.9.3 CRP'nin tahmini	49
3.9.4 İnsan SARS-COV-2 IgM ve insan SARS-COV-2 IgG tespiti	50
3.10 Moleküler Çalışma	51
3.10.1 Toplam RNA ekstraksiyonu	51
3.10.2 RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi	52
3.11 Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Testi (RT-qPCR)	53
3.11.1 Gen ifadesinin gerçek zamanlı RT-qPCR analizi	54
3.12 İstatistiksel Analiz	54
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	56
4.1 Çalışma Grubu Tasarımı	56
4.2 Örneklerin Dağılımı	56
4.3 Epidemiyoloji	58
4.3.1 SARS-Cov-2 şiddetinin yaşa göre dağılımı	58
4.3.2 SARS-Cov-2 şiddetinin cinsiyete göre dağılımı	59
4.4 Klinik Özellik	61
4.4.1 SARS-CoV-2'nin şiddeti	61
4.5 Bakteriyolojik Çalışma	62
4.5.1 Bakteriyel izolasyonun prevalansı	62
4.5.2 Gram pozitif bakterilerin yaygınlığı	64
4.5.3 Gram negatif bakterilerin yaygınlığı	65
4.6 İzolasyon Bakterilerinin Tanımlanması	66
4.6.1 VITEK2 kompakt sistemi ile manuel tanımlamanın onaylanması	66

4.6.2 Biyokimyasal test sonuçları ile ilgili izole edilmiş bakteriler	68
4.6.3 İzole edilen bakteriler arasında virülans faktörlerinin üretimi	69
4.7 Antibiyotik Duyarlılığı.....	72
4.7.1 Antibakteriyel duyarlılık belirleme.....	72
4.8 Biyofilm Oluşumunun Tespiti.....	81
4.8.1 Kongo kırmızı agar “CRA” yöntemi	81
4.8.2 Mikrotitre plaka (MTP) yöntemi	85
4.9 Gram-Pozitif ve Gram-Negatif Bakterilerin İmmünolojik Parametrelerle İlişkileri	88
4.10 İkincil Bakteriyel Pnömonisi Olan COVID-19 Hastalarında İmmünolojik Belirteç	91
4.10.1 İkincil bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında ve kontrol grubunda TLR-2 düzeyi	91
4.10.2 Sekonder pnömonisi olan COVID-19 hastalarında FASL düzeyi.....	91
4.10.3 Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında ACE düzeyi.....	92
4.10.4 Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında RBD düzeyi.....	93
4.10.5 Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında IgG düzeyi	93
4.10.6 Sekonder bakteriyel enfeksiyonlu hastalarda IgM düzeyi	94
4.11 Moleküler Çalışma	123
4.11.1 Demografik sonuçlar	123
4.11.2 SARS-CoV-2 RT-PCR sonuçları	124
4.11.3 SARS-CoV-2 antikor sonuçları ile RT-PCR sonuçlarının karşılaştırılması	124
4.12 Genlerin Varlığının Konvansiyona Göre Tespiti	125
4.12.1 Gen ifadesinin ters transkripsiyon kantitatif PCR ile ölçülmesi	127
4.12.2 Gen ifade analizi.....	127
4.13 ROC Eğrisi.....	132
4.14 Çalışma Sonuçlarının Analizi	139
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	140
KAYNAKLAR	143
EKLER.....	166
ÖZGEÇMİŞ.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER DİZİNİ

dL	Desilitre
µg	Mikrogram
mg	Miligram
mL	Mililitre
pg	Pikogram
%	Yüzde



KISALTMALAR DİZİNİ

BT	Bilgisayarlı tomografi
ACE	Anjiyotensin dönüştürücü enzim
DNA	Deoksiribonükleik asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
FASL	Fas ligandı
IgG	İmmünoglobulin G
IgM	İmmünoglobulin M
CRA	Kongo kırmızı agar
CoV	Koronavirüs
COVID-19	Koronavirüs hastalığı 2019
MTP	Mikrotitre plakası
MER	Orta doğu solunum sendromu
RBD	Reseptör bağlayıcı alan
SARS-CoV-2	Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs 2
cDNA	Tamamlayıcı DNA
TLR-2	Toll benzeri reseptör 2
TNF	Tümör nekroz faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1	Koronavirüslerin hayvanlarda bulunan orjinleri (Yashavantha Rao and Jayabaskaran 2020).....	4
Şekil 2.2	SARS-CoV-2'nin ana yapısal proteinleri (Yuki <i>et al.</i> 2020)	6
Şekil 2.3	SARS-CoV-2'nin şematik yapısı ve yapısal proteinleri (Beig Parikhani <i>et al.</i> 2021).....	11
Şekil 2.4	SARS-CoV-2'nin ACE2 reseptörünü hedeflemesi ve enfekte hücreye girişi (Letko <i>et al.</i> 2020)	12
Şekil 2.5	SARS-CoV için çeşitli analitik yöntemler (Rai <i>et al.</i> 2021)	17
Şekil 2.6	Bakteriyel biyofilmler (Vasudevan 2014)	29
Şekil 3.1	Serolojik parametrelerin standart seyreltilmesi	49
Şekil 4.1	Örnek türüne göre SARS-Cov-2 şiddetinin dağılımı	57
Şekil 4.2	Yaşa göre SARS-Cov-2 şiddetinin dağılımı.....	58
Şekil 4.3	Cinsiyete göre SARS-Cov-2 şiddeti dağılımı.....	60
Şekil 4.4	Bakteri tiplerinin dağılımı	64
Şekil 4.5	Gram pozitif bakteri izolatlarının yüzdesi	65
Şekil 4.6	Gram negatif bakteri izolatlarının yüzdesi	66
Şekil 4.7	İzole edilen bakterilere uygulanan bazı biyokimyasal testler.....	69
Şekil 4.8	İzole edilen bakterilerin virölans faktörleri	72
Şekil 4.9	Açık Kongo kırmızısı agar üzerinde bakteri örnekleri	82
Şekil 4.10	Mikrotitre plaka yönteminde (A) Gram pozitif (B) Gram-negatif bakteriler	86
Şekil 4.11	ACE-2'nin G-pozitif ve G-negatif bakterilerle ilişkisi.....	88
Şekil 4.12	CRP'nin G-pozitif ve G-negatif bakterilerle ilişkisi	88
Şekil 4.13	G-Pozitif ve G-Negatif bakterilerin FASL ile ilişkileri	89
Şekil 4.14	G-Pozitif ve G-Negatif bakterilerin TLR-2 ile ilişkileri	90
Şekil 4.15	G-Pozitif ve G-Negatif bakterilerin TLR-2 ile ilişkileri	90
Şekil 4.16	Bakteriyel pnömonili COVID-19 hastalarında TLR-2 seviyesi	91
Şekil 4.17	Bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında FASL seviyesi	92
Şekil 4.18	Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında ve kontrol grubunda ACE düzeyi	92
Şekil 4.19	Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında ve kontrol grubunda RBD düzeyi	93
Şekil 4.20	Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında IgG düzeyi ...	94
Şekil 4.21	Pnömonili COVID-19 hastalarında ve kontrol grubunda IgM düzeyi.....	95
Şekil 4.22	Enfekte TLR-2 grubu ile ACE arasındaki korelasyon.....	97
Şekil 4.23	Enfekte RBD grubu ve ACE arasındaki korelasyon.....	97
Şekil 4.24	FASL ve ACE'nin enfekte grubu arasındaki korelasyon	98
Şekil 4.25	Enfekte IgG grubu ile ACE arasındaki korelasyon.....	98
Şekil 4.26	Enfekte IgM grubu ile ACE arasındaki korelasyon.....	99
Şekil 4.27	Enfekte RBD grubu ile TLR-2 arasındaki korelasyon.....	99

Şekil 4.28 FASL ve TLR-2'nin enfekte grubu arasındaki korelasyon	100
Şekil 4.29 Enfekte IgG grubu ile TLR-2 arasındaki korelasyon.....	100
Şekil 4.30 Enfekte IgM grubu ile TLR-2 arasındaki korelasyon	101
Şekil 4.31 FASL ve RBD'nin enfekte grubu arasındaki korelasyon.....	101
Şekil 4.32 Enfekte IgG grubu ile RBD arasındaki korelasyon	102
Şekil 4.33 Enfekte IgM grubu ile RBD arasındaki korelasyon.....	102
Şekil 4.34 Enfekte IgG grubu ile FASL arasındaki korelasyon.....	103
Şekil 4.35 Enfekte IgM ve FASL grubu arasındaki korelasyon	103
Şekil 4.36 Enfekte grup IgM ve IgG arasındaki korelasyon	104
Şekil 4.37 TLR-2 ve ACE'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.....	105
Şekil 4.38 RBD ve ACE'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.....	105
Şekil 4.39 FASL ve ACE'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.....	106
Şekil 4.40 IgG ve ACE'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu	106
Şekil 4.41 IgM ve ACE'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu	107
Şekil 4.42 RBD ve TLR-2'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.....	107
Şekil 4.43 FASL ve TLR-2'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.....	108
Şekil 4.44 Aşılınmış ve aşılınmamış IgG ve TLR-2 arasındaki korelasyon.....	108
Şekil 4.45 IgM ve TLR-2'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.....	109
Şekil 4.46 FASL ve RBD'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.....	109
Şekil 4.47 IgG ve RBD'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu	110
Şekil 4.48 Aşılınmış ve aşılınmamış IgM ve RBD arasındaki korelasyon.....	110
Şekil 4.49 IgG ve FASL'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.....	111
Şekil 4.50 IgM ve FASL'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.....	111
Şekil 4.51 IgM ve IgG'nin aşılınmış ve aşılınmamış olanlar arasındaki korelasyonu.	112
Şekil 4.52 TLR-2 ve ACE'nin aşılınmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu ...	113
Şekil 4.53 RBD ve ACE'nin aşılınmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu	113
Şekil 4.54 ACE ve FASL'nin aşılınmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu	114
Şekil 4.55 IgG ve ACE'nin aşılınmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu	114
Şekil 4.56 IgM ve ACE'nin aşılınmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu	115
Şekil 4.57 RBD ve TLR-2'nin aşılınmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu ...	115
Şekil 4.58 FASL ve TLR-2'nin aşılınmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu .	116
Şekil 4.59 IgG ve TLR-2'nin aşılınmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu	116
Şekil 4.60 IgM ve TLR-2'nin aşılınmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu	117

Şekil 4.61 RBD ve FASL'nin aşılınmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon.....	117
Şekil 4.62 RBD ve IgG'nin aşılınmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon	118
Şekil 4.63 RBD ve IgM'nin aşılınmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon	118
Şekil 4.64 FASL ve IgG'nin aşılınmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon.....	119
Şekil 4.65 FASL ve IgM'nin aşılınmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon.....	119
Şekil 4.66 SARS-CoV-2 IgM, IgG ve RT-PCR Ct değeri arasındaki ilişki	125
Şekil 4.67 Test edilen bazı genlerin amplifikasyon grafiği	127
Şekil 4.68 Test edilen genlerden bazılarının erime eğrisi (I)	128
Şekil 4.69 Test edilen genlerden bazılarının erime eğrisi (II).....	128
Şekil 4.70 Bazı housekeeping genlerin amplifikasyon grafiği (I).....	129
Şekil 4.71 Test edilen housekeeping genlerinden bazılarının erime eğrisi.....	129
Şekil 4.72 Bazı housekeeping genlerin amplifikasyon grafiği (II)	130
Şekil 4.73 Spike gen ifadesinin kat değişimi ortalaması.....	130
Şekil 4.74 N gen ifadesinin kat değişimi ortalaması.....	131
Şekil 4.75 E gen ifadesinin kat değişimi ortalaması	131
Şekil 4.76 BT düzeylerine göre aşılınmış ve enfekte gruplar arasındaki ayrım için ROC analiz kriterleri	133
Şekil 4.77 IgM düzeylerine göre aşılınmış ve enfekte gruplar arasındaki ayrım için ROC analiz kriterleri	134
Şekil 4.78 IgG düzeylerine göre aşılınmış ve enfekte gruplar arasındaki ayrım için ROC analiz kriterleri	135

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	Çalışmada kullanılan cihazlar	33
Çizelge 3.2	Çalışmada kullanılan aletler.....	33
Çizelge 3.3	Çalışmada kullanılan kimyasallar, reaktifler ve boyalar	34
Çizelge 3.4	Çalışmada kullanılan tanı kitleri	34
Çizelge 3.5	Moleküler çalışmada kullanılan kitler	34
Çizelge 3.6	Geleneksel PCR ve qPCR reaksiyonları için kullanılan primerler	35
Çizelge 3.7	Reaktiflerin ve çözeltilerin hazırlanması	36
Çizelge 3.8	Kültür ortamının hazırlanması	37
Çizelge 3.9	ELISA kiti bileşenleri	47
Çizelge 3.10	CRP'nin kit bileşenleri.....	50
Çizelge 3.11	cDNA sentezi için PCR programı.....	53
Çizelge 3.12	qPCR ana karışımı ve premiks reaksiyonlarının bileşimi.....	53
Çizelge 3.13	qPCR programı	53
Çizelge 4.1	Örnek sayısı ve izolasyon yüzdesi	57
Çizelge 4.2	Yaş gruplarına göre SARS-Cov-2 gruplarının demografik dağılımı.....	59
Çizelge 4.3	SARS-Cov-2 grupları arasında kadın ve erkek sıklığı.....	60
Çizelge 4.4	SARS-Cov-2 grubunda SARS-Cov-2'nin sıklık şiddeti	61
Çizelge 4.5	Gram Pozitif bakteri.....	62
Çizelge 4.6	Gram Negatif bakteriler	62
Çizelge 4.7	Morfolojik ve mikroskopik tanılama ile ilgili izole edilmiş bakteriler.....	67
Çizelge 4.8	Biyokimyasal test sonuçları I.....	68
Çizelge 4.9	Biyokimyasal test sonuçları II	68
Çizelge 4.10	İzole edilen bakterilerin virölans faktörleri	72
Çizelge 4.11	İzole edilmiş bakterilerin antibiyotik direnci.....	73
Çizelge 4.12	Aşılan grupta izole edilen bakterilerin antibiyotik direnci.....	74
Çizelge 4.13	Sağlıklı grupta izole edilen bakterilerin antibiyotik direnci	74
Çizelge 4.14	Gram Pozitif bakterilerin CRA ile biyofilm oluşumuna ilişkin sonuçlar ..	84
Çizelge 4.15	Gram Negatif bakterilerin CRA ile biyofilm oluşumuna ilişkin sonuçlar ..	85
Çizelge 4.16	MTP yönteminde Gram Pozitif bakterilerin biyofilm oluşumu sonuçları ..	87
Çizelge 4.17	MTP yönteminde Gram Negatif bakterilerin biyofilm oluşumu sonuçları ..	87
Çizelge 4.18	Bağışıklık düzeyi korelasyon sonuçları	96
Çizelge 4.19	Aşılanmış ve aşılanmamış grupta immünolojik düzey	104
Çizelge 4.20	Aşılanmış ve enfekte grupta immünolojik düzey	112
Çizelge 4.21	Çalışmaya katılan hastaların cinsiyet ve yaş dağılımı	123
Çizelge 4.22	SARS-CoV-2 antikorları ve BT değerleri	124
Çizelge 4.23	SARS-CoV-2 antikorları ile BT değerleri arasındaki karşılaştırma	125
Çizelge 4.24	$\Delta\Delta Ct$ yöntemine bağlı olarak Spike geninin gen ifadesinin kat sayısı	130
Çizelge 4.25	$\Delta\Delta Ct$ yöntemine bağlı olarak N geninin gen ifadesinin kat sayısı	131
Çizelge 4.26	$\Delta\Delta Ct$ yöntemine bağlı olarak E geninin gen ifadesinin kat sayısı.....	131

Çizelge 4.27 Aşılanmış ve enfekte gruplar arasında CT düzeylerine göre ROC analiz kriterleri	132
Çizelge 4.28 IgM seviyelerine dayalı olarak aşılanmış ve enfekte gruplar arasında ayırım için ROC analizi kriterleri	133
Çizelge 4.29 IgG düzeylerine göre aşılanmış ve enfekte gruplar arasında ayırım yapmak için ROC analiz kriterleri	134



1. GİRİŞ

Koronavirüs 2019 (COVID-19) hastalığına neden olan şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) ilk olarak Aralık 2019'da Çin'in Wuhan kentinde tespit edilmiştir. Tespit edildiği günden bu zamana kadar ciddi bir şekilde dünya çapında yayılmaktadır (Wang *et al.* 2020a). İkincil bakteriyel enfeksiyonlar, viral solunum yolu enfeksiyonlarının yaygın bir sonucudur ve genellikle klinik kötüleşmeye neden olur. İyi incelenmiş geçmiş influenza pandemilerinin yanı sıra mevsimsel influenza ve diğer solunum yolu hastalıkları vakalarında, ikincil bakteriyel enfeksiyonlar önemli bir morbidite ve ölüm kaynağı olmuştur (Morens *et al.* 2008, Morris *et al.* 2017). COVID-19 hastalarının yaygın olarak ikincil bakteriyel enfeksiyonlara sahip olduğu ve bunun daha kötü sonuçlarla bağlantılı olabileceği de ortaya çıkmıştır (Feng *et al.* 2020). İkincil bakteriyel enfeksiyonların ne olduğu veya nereden geldiği hala net değildir, ancak çoklu ilaca dirençli bakterilerin bu enfeksiyonları yaydığına dair bazı kanıtlar vardır (Bengoechea and Bamford 2020, Rawson *et al.* 2020). *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli*, COVID-19 ile bağlantılı ikincil bakteriyel pnömoniye neden olan başlıca bakteri türleridir. Bu tür pnömoni antibiyotiklerle bile ölümcüldür (Du *et al.* 2020). COVID-19 hastalarında, hastalık şiddeti, yakın zamanda geçirilen hastalık ve tedavi dahil olmak üzere bir dizi risk değişkeni, sonraki bakteriyel enfeksiyonların olasılığını artırmaktadır (De Bruyn *et al.* 2022). Ayrıca yaş, diyabet, hipertansiyon, immünosüpresif ilaçlar, nörolojik durumlar, mekanik solunum, yoğun bakım ünitesine yatış ve hipertansiyon bakteriyel enfeksiyonla bağlantılı bağımsız değişkenlerdir (Moreno-Torres *et al.* 2022). Bağışıklık sisteminin aşırı reaksiyonu olan sitokin fırtınası bunun sonucudur (Feng *et al.* 2020). Sitokin fırtınası, vücut çok fazla inflamatuvar sitokin ve ACE2, FASL, RBD ve TLR-2 gibi kemotaktik araçlar ürettiğinde ortaya çıkan tehlikeli bir bağışıklık durumudur. Ayrıca bağışıklık hücrelerinin çok aktif hale gelmesine neden olur (Teijaro *et al.* 2014, Merad and Martin 2020). Araştırmacılar, COVID-19'un teşhisinde viral DNA'yı tespit eden moleküler bir yöntem olan RT-PCR testini yaygın olarak kullanmışlardır. Hızlı teşhisi amaçlayan bu yöntem, enfeksiyonun ilk teşhisinde virüse karşı özel konsantrasyonlarda immünoglobulin kullanan serolojik yöntemlerin

kullanılmasını gerektirmektedir. Hastalığın erken ve ileri evrelerinde serum, viral enfeksiyonlarda virüsün antijenik yapılarına karşı gelişen antikorları tespit edebilmektedir. Araştırmacılar kısa bir süre içinde SARS-CoV-2 virüsünün çeşitli antijenik yapılarına karşı antikorları tespit etmek için çeşitli serolojik testler geliştirmiş ve uygulamaya koymuştur. SARS-CoV-2 antikor testlerini akut veya önceden var olan enfeksiyonları belirlemek, hastaların ve bağışık plazma donörlerinin bağışıklık durumunu değerlendirmek, sürveyans çalışmaları yapmak ve RT-PCR testinin etkisiz olduğu durumlarda tanıya yardımcı ve destek olarak kullanılmaktadır. COVID-19'a yönelik klinik şüpheye rağmen, pasif bir test yöntemi olmaya devam etmektedir. Bununla birlikte, hastalık sırasında antikor yanıtında ve dolayısıyla kan antikor seviyelerinde heterojenlik vardır (Aslan *et al.* 2021, Tang *et al.* 2020). Çeşitli çalışmalar virüs antijenleri ve antikorlar arasında bir ilişki olduğunu göstermektedir. Buna göre, anti-S antikorları daha spesifiktir ve anti-N antikorları daha hassastır (Dinç *et al.* 2022). Antikor yanıtı, viral enfeksiyonun şiddeti ve virüse maruz kaldıktan sonraki gün sayısı ile doğrudan artar, ancak tespit edilen antikorların hayatta kalma süresi ve korumada etkili olan nötralize edici antikorlarla ilişkisi hakkında spesifik bir bilgi yoktur. Virüsün yeniden enfeksiyonuna karşı, Ct değerinin izlenmesinin hem asemptomatik hem de semptomatik vakalarda COVID-19 enfeksiyonunun izlenmesine yardımcı olabileceğine inanılmaktadır (Dinç *et al.* 2022). Şiddetli COVID-19 hastalığı olan kişilerde, klinik belirti ve semptomlarıyla uyumlu düşük Ct değerleri gözlemlenmiştir. Öte yandan, SARS hastalarında antikor seviyelerindeki bilinen varyasyona rağmen, hastalığın ciddiyetinin ve viral yükün antikor yanıtını etkileyebileceği ve Ct değeri düştükçe (artan viral yük ile) bağışıklık sistemi yanıtında bir artışa yol açabileceği yönünde bir düşünce yaratmaktadır (Gülbudak *et al.* 2021).

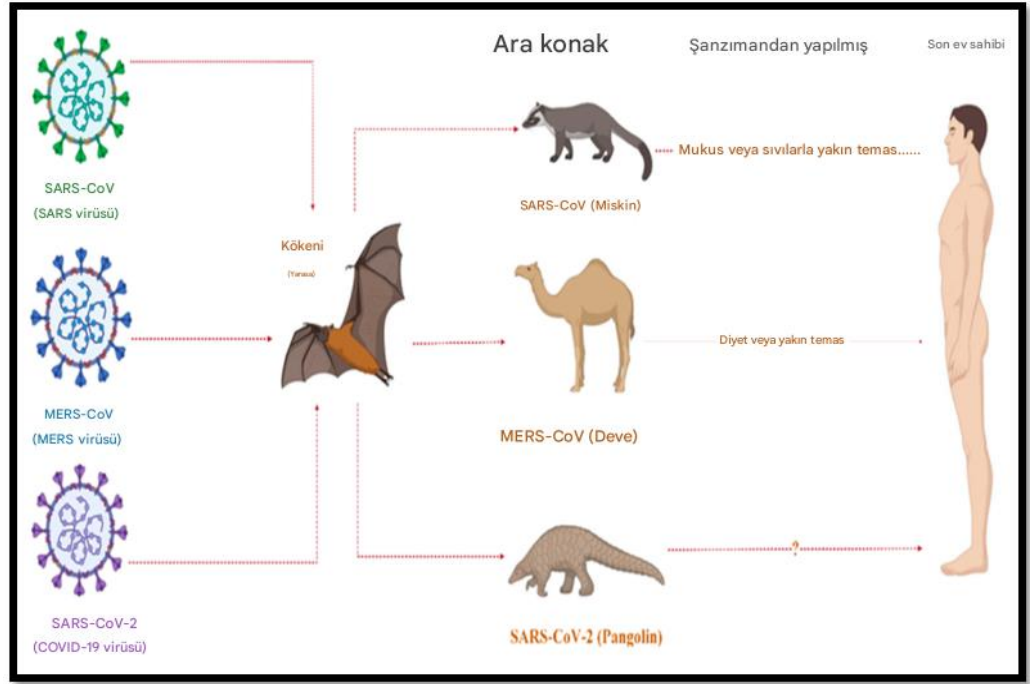
Çalışmamızda, viral enfeksiyon ve enfeksiyonla ilişkili ikincil bakteriyel enfeksiyon arasındaki ilişkinin ve solunum mikrobiyomuna etkisinin incelenmesi amaçlamıştır. Bu amaçla, COVID-19 hastalarında sekonder pnömoniye neden olan bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması, İzole edilen bakterilerin antibiyotik duyarlılığı analiz edilerek hangi antimikrobiyal ilaçların en etkili olduğunun belirlenmesi, Solunum bakterilerinin ve mikrobiyomun biyofilm oluşturma yeteneğinin tespit edilmesi, Viral enfeksiyon sırasında bu ikincil bakteriyel enfeksiyonla ilişkili bazı bağışıklık faktörlerinin rolünün

belirlenmesi, Biyofilm oluşumu yoluyla farklı mikrobiyal topluluklar arasındaki farklılıkları karakterize etmek ve çalışma grupları arasında viral enfeksiyon sırasında bu ikincil enfeksiyonları ve bakteriyel mikrobiyomu tespit etmek ve teşhis etmek için çoklu yöntemlerin karşılaştırılması, İmmünolojik ve moleküler tanı testleri için altın standart yöntemi ve bunların enfeksiyonu saptama ve hastalık şiddetini tahmin etme hassasiyetinin belirlenmesi ve son olarak SARS-CoV-2 yapısal proteinlerinin gen ekspresyon seviyelerinin kantitatif qRT-PCR kullanılarak ölçülmesi ve yanlış negatif sonuçlardan kaçınmak için çalışılan bağışıklık indeksleri ile ilişkisinin belirlenmesi aşamaları gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Tarihsel Perspektif

SARS-CoV-2 virüsü veya Koronavirüs hastalığı (COVID-19), Koronavirüs hastalığı şiddetli akut solunum sendromuna, zatürreye ve ciddi akciğer hasarına neden olan bulaşıcı bir hastalıktır. Şiddetli akut solunum sendromu Koronavirüs 2 Akciğerin alveolünü kaplayan epitel hücreleri olan Tip I ve tip II pnömositler (SARS-CoV) tarafından enfekte edilmiştir. Hastalık, akciğere inflamatuvar infiltratların girmesiyle ilerlemiştir (Martines *et al.* 2020). Hastaların yaklaşık %20'sinde akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) görülmüş ve bunların neredeyse yarısı ölümlle sonuçlanmıştır. Enfekte hastalarda doku dağılımı, SARS-CoV'un bilinen diğer CoV'lara kıyasla bir başka ayırt edici özelliğidir. Şiddetli akut solunum sendromu Bağırsağın epitel hücreleri de Coronavirus 2'yi çoğaltır ve böbrek ve karaciğer dokuları viral RNA'yı geri kazanır (Yashavantha Rao and Jayabaskaran 2020). Şekil 2.1, koronavirüslerin hayvanlarda bulunan orjinini göstermektedir.

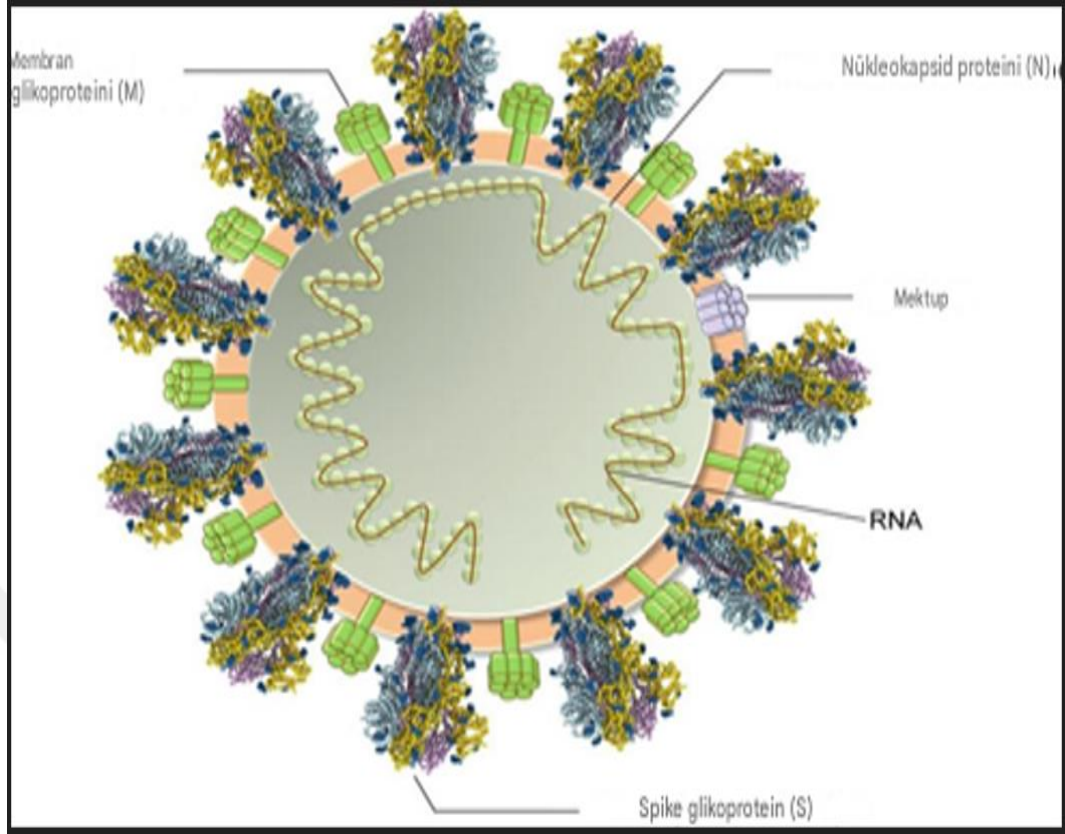


Şekil 2.1 Koronavirüslerin hayvanlarda bulunan orjinleri (Yashavantha Rao and Jayabaskaran 2020)

2.2 Yapı

Pozitif anlamlı tek sarmallı RNA virüsleri, SARS-CoV-2 virüsünün ait olduğu türdür. Çapı 60 ile 140 nm arasında değişen virüs, zarfı içinde yer alır. Virüs, bir elektron mikroskopu altında incelendiğinde taç benzeri bir şekil veren sarmal bir kapside ek olarak dış yüzeyinden çıkıntı yapan mızrak benzeri çıkıntılara sahiptir (Tillett *et al.* 2021). Koronavirüsler, bölünmemiş bir zarf ve pozitif anlamlı tek sarmallı RNA'dan oluşur. Shereen *et al.* (2020)'e göre virüsün genomu yaklaşık 30,000 nükleotide sahiptir. Yuki *et al.* (2020) araştırması aşağıdaki dört yapısal proteini tanımlamıştır (Şekil 2.2):

- Nükleokapsid: Transkripsiyonu ve replikasyonu kolaylaştırmak için kapsid proteini viral RNA'ya bağlanır; bu, virüsün insan hücrelerine sızmasına ve onları viral fabrikalara dönüştürmesine olanak tanır.
- M-proteini: Daha önce virüs oluşumunda kritik bir rol oynadığı Sarmast *et al.* (2021) tarafından belirtilmiştir.
- Protein S tipi: Virüslerin yüzeyindeki bir protein, reseptörlerine (S1 alt birimi) bağlanarak ve zarlarıyla (S2 alt birimi) kaynaşarak virüslerin konakçı hücrelerin içine girmesini sağlar (Kirchdoerfer *et al.* 2016).
- E-protein: Küçük bir zar proteini, viral partikülün tek küçük bileşenidir. Bu, virüsün birleşmesini, zarın geçirgenliğini ve virüs-konak arayüzünü derinden etkiler. Hemagglutinin-esteraz dimeri (HE) virüsün yüzeyinde mevcutsa, viral giriş yardımcı olabilir. Doğal konak hücrelerini enfekte etmede oynadığı işlev, replikasyon için gerekli olmasa bile önemlidir (Wrapp *et al.* 2020).



Şekil 2.2 SARS-CoV-2'nin ana yapısal proteinleri (Yuki *et al.* 2020)

2.3 Sınıflandırma

Coronaviridae ailesi içinde, *Nidovirales* takımını oluşturan koronavirüsler iki alt familyaya aittir: *Coronavirinae* ve *Torovirinae*. *Coronavirinae* alt ailesi, Uluslararası Virüs Taksonomisi Komitesi'ne göre dört ana cinse ayrılır (Pillaiyar *et al.* 2020): alfa-koronavirüs, beta-koronavirüs, gama-koronavirüs ve delta-koronavirüs. Şu anda kullanılan dizileme veritabanlarına göre tüm insan koronavirüsleri (CoV'ler) hayvan kökenlidir. SARS-CoV, MERS-CoV, HCoV-NL63 ve HCoV229E yarasalardan gelirken, HCoV-OC43 ve HKU1N kemirgenlerden gelmektedir.

2.4 Klinik Tablo

Yao *et al.* (2020)'ya göre, hastalığın şiddeti hafif bir enfeksiyondan veya hiç belirti olmamasından SARS-CoV-1 ve MERS gibi ciddi bir solunum yolu enfeksiyonuna kadar

değişebilir. Ortalama beş gün süren kuluçka dönemi bir ile on dört gün arasında sürebilir. Erkekler en çok ateş, öksürük, bitkinlik veya miyaljiden etkilenir (Giannis *et al.* 2020). Gençlerde boğaz ağrısı, baş ağrısı, anosmi, bulantı, kusma ve deri döküntüleri (Kawasaki semptomlarına benzer) daha az görülen semptomlar arasındadır (Jones *et al.* 2020). Wu and McGoogan (2020)'a göre, hastalık ilk ortaya çıktıktan sekiz gün sonra pnömoni ve dispne ortaya çıkmıştır. Hastanın oksijen satürasyonu %94'ten fazla yükseldiğinde ve radyografide pnömoni belirtisi görülmediğinde, orta derecede COVID-19 enfeksiyonu teşhisi konur. Hastada hipoksi (oksijen satürasyonu %94) bulunması ve radyografide pnömoni belirtileri, hafif COVID-19 enfeksiyonu teşhisine sebebiyet verir. Hastanın suni solunuma ihtiyacı olduğunda, şiddetli COVID-19 enfeksiyonu keşfedilmiştir (Ilonzo *et al.* 2021). Guan *et al.* (2020)'a göre, obezite, diabetes mellitus veya hipertansiyon gibi komorbid durumları olan hastaların yaşlandıkça ölme veya daha ciddi hastalıklara yakalanma olasılığı daha yüksek olabilir. Ek olarak pıhtılaşma bozukluğuyla bağlantılı olan bu hastalık, damarlarda ve arterlerde tromboemboli gelişme olasılığını artırmakta ve bu da ölüm oranını yükseltmektedir. Arnold and Fuqua (2020) ve Nag and Kaur (2021)'a göre, ağır hastalığı olan ve uzun süre yoğun bakım ünitelerinde kalan hastalarda ikincil edinilmiş enfeksiyon riski artmaktadır.

2.5 Epidemiyoloji

2.5.1 Coğrafi dağılım

Çin'de, Hubei eyaletine bağlı bir şehir olan Wuhan'dan 2019'un sonlarına doğru bildirilen ilk vakalardan bu yana, laboratuvar onaylı tüm vakalar ve Hubei eyaletindeki klinik olarak teşhis edilen vakalar dahil olmak üzere 80,000'den fazla COVID-19 vakası kaydedilmiştir. Buna göre, Dünya Sağlık Örgütü ve Çin arasındaki ortak bir bilgi toplama gezisi, Çin'deki salgının Ocak sonu veya Şubat 2020 başında zirveye ulaştığını öngörmüştür (WHO 2020). Çin genelindeki birçok eyalet ve belediyede birçok vaka kaydedilmiş olsa da raporların büyük kısmı Hubei ve komşu eyaletlerden gelmiştir. Antarktika hariç tüm kıtalarda kaydedilen vaka sayısında artış görülmüş ve Çin dışındaki yeni vaka oranı Çin içindeki oranı geçmiştir. Başlangıçta, bu olayların başlıca nedeni Çinli turistler ve onlarla temas kuran kişiler olarak bilinmekteydi ancak Çin dışındaki

Güney Kore, İtalya, İran ve Japonya gibi birkaç yerde devam eden yerel bulaş nedeniyle daha küçük salgınlar meydana geldi ve bu ülkelerden gelen hastalıklar diğer yerleri ziyaret eden turistlerde tespit edildi. Amerika Birleşik Devletleri'nde yerel bulaşın olduğu çok sayıda COVID-19 kümesi bulunmuştur (WHO 2020).

2.5.2 Bulaşma

Bulaşma tehlikesi iyi anlaşılmamıştır. Salgının başlangıcında Wuhan'da yapılan bir epidemiyolojik değerlendirmeye göre hastaların çoğu canlı hayvan satan bir deniz ürünleri pazarında çalışmış veya orayı ziyaret etmişti (WHO 2020). Öte yandan, pandemi geliştikçe kişiden kişiye bulaşma ön plana çıktı. SARS-CoV-2'nin grip gibi çoğunlukla kişiler arasındaki solunum damlacıkları yoluyla bulaştığına inanılmaktadır. Enfekte bir kişi öksürdüğünde, hapşırdığında veya konuştuğunda, solunum salgılarına saldıkları virüs, mukoza zarlarıyla doğrudan temas ederek diğer insanlara yayılabilir. Enfeksiyon, birisi enfekte bir yüzeye dokunduktan sonra ağzına, burnuna veya gözlerine dokunduğunda da meydana gelebilir. Buna damlacık bulaşması denir. Damlacıklar normalde havada altı fitten fazla kalmaz. Bununla birlikte, bazı ülkelerde, bulaşma mekanizmalarını çevreleyen mevcut belirsizlik nedeniyle düzenli havadan önlemler önerilirken, diğer ülkelerde belirli "yüksek riskli" protokoller oluşturulmalıdır (Zou *et al.* 2020). Konuma ve enfeksiyon kontrol önlemlerine göre, semptomatik hastalığı olan bir kişiden farklı bulaşma oranları gözlemlenmiştir. Ortak bir DSÖ-Çin araştırması, Çin'deki doğrulanmış hastaların on binlerce yakın temasında, ikincil COVID-19 riskinin %1 ile %5 arasında değiştiğini belirtmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'ndeki 10 doğrulanmış vakanın 445 yakın temasında, semptomatik sonraki atak riski %0,45'tir (Burke *et al.* 2020). Ayrıca SARS-CoV-2'nin asemptomatik kişilerden veya hala kuluçka aşamasında olanlardan yayılabileceği gösterilmiştir (Rothe *et al.* 2020). Bunun ne ölçüde gerçekleştiği henüz belirsizdir. SARS-CoV-2 için çok sayıda serolojik tanı, epidemiyolojik analizi daha da bilgilendirmek ve geniş ölçekli serolojik tarama yoluyla asemptomatik enfeksiyon yelpazesinin daha net anlaşılmasını sağlamak amacıyla geliştirilmektedir.

2.6 SARS-CoV-2 Patojenite

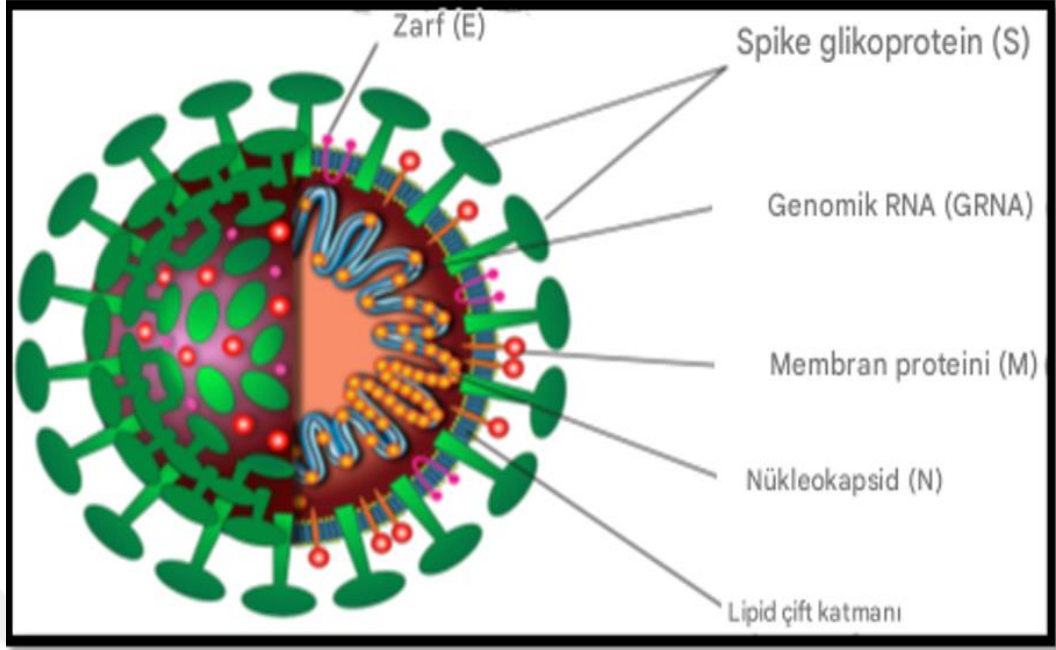
Virüsler zorunlu parazitler oldukları için, genellikle aynı türden yeni viral partiküller üretmek için hücrelere bağımlıdırlar. Enfekte olmuş savunmasız hücrenin içindeki tüm kaynaklar yeni virüslerin üretilmesine yönlendirilir. Krupovic *et al.* (2019)'e göre, virüsler hücrenin zarındaki belirli bir reseptöre bağlanarak hücreye girer. SARS CoV-2, solunum sistemi yoluyla akciğerlere ulaşmadan önce gırtlak ve burun mukozasını enfekte eden zoonotik bir hastalıktır. S proteini, SARS-COV-2'nin yaşam döngüsündeki ilk adımdır. Hava yollarından gelen tripsin benzeri proteaz (TMPRSS11D) ve hücresel serin proteaz (TMPRSS2) tarafından aktive edilir. S proteini daha sonra Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2 (ACE) olarak bilinen belirli bir hücre reseptörüne bağlanır (Bosch *et al.* 2003, Wruck and Adjaye 2020). Belirli hücre yüzeylerinde, çinko metalloenzim ACE 2 (bir karboksipeptidaz) bir ektoenzim olarak ortaya çıkar (Turner 2015). Üst solunum yolu epiteli, karaciğer, ince bağırsak, duodenum, böbrek tübüler hücresi, seminal veziküller, epididim, testis Leydig hücreleri, Sertoli hücreleri ve safra kesesi glandüler hücrelerinin silli hücreleri, homeostatik ACE 2 enziminin ana bölgeleridir. Hem arteriyel basıncın hem de hücre dışı sıvıların izometrik basınç dengesinin korunmasından sorumludur. McMurray *et al.* (2021)'e göre, kardiyomiyositlerde, pankreas ve plasenta dokusunda ve plasenta dokusunda da bulunur. ACE2 reseptörlerinin yaygın dağılımı, COVID-19 ile ilişkili çok çeşitli klinik semptomları açıklamaya yardımcı olabilir (Fei *et al.* 2020). Ancak, gastrointestinal ve pulmoner sistemler girişin birincil uygulayıcılarıdır çünkü bu konumlarda yüksek ACE2 konsantrasyonları vardır (Abassi *et al.* 2020). Virüsün büyük ölçüde artan patojenitesi muhtemelen çoğunlukla SARS-CoV-2 S proteininden kaynaklanmaktadır; bu proteinin ACE2 reseptörlerine SARS-CoV S proteininden 10-20 kat daha güçlü bağlandığı gösterilmiştir (Hamming *et al.* 2004). Viral S proteini ile konak hücrenin ACE 2 enzimi arasında endosom benzeri bir konformasyonel değişimin ardından virüs ve konak hücre kaynaşır. Viral genom daha sonra endositoz yoluyla konak hücrenin sitoplazmasına enjekte edilir, bu da viral replikasyonu artıracak ve hücreden hücreye iletimi teşvik eder (Sharma *et al.* 2021). Bu mekanizma sonucunda anjiyotensin II (Ang II) seviyeleri yükselir, ancak dokudaki ACE 2 ve anjiyotensin I (Ang I) seviyeleri azalır. Sonuç olarak AngII, reseptör tipi (AngII-ATR-1) ile etkileşime girerek kan basıncında, fibrozda, oksidatif strese ve pulmoner

inflamatuvar yanıtta artışa neden olur (South *et al.* 2020). Kısa süre sonra, immünolojik eksiklik ve sitokin fırtınası dahil olmak üzere çeşitli olumsuz etkiler ortaya çıkar (Nasir *et al.* 2021). Viral enfeksiyonu önleyen en önemli bağışıklık hücreleri, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun şiddetiyle orantılı olarak aktive olan T sitotoksik hücreleridir. T yardımcı ve T sitotoksik hücrelerinin aşırı fonksiyonu immün yetmezliğe yol açar (Schmidt and Varga 2018). Viral hücre teması sonrasında, makrofajlar gibi antijen sunan hücreler (APC'ler), SARS CoV-2 antijenlerini T hücrelerine iletir. T hücresi alt kümeleri, bu sürecin bir sonucu olarak sitokin üretir ve bu da T hücrelerini aktive eder. Sitokinler ve bağışıklık hücreleri arasındaki pozitif geri bildirim döngüsü daha sonra büyük miktarda sitokin üretimine neden olur (Li *et al.* 2020).

2.7 Patogenez

2.7.1 Virüsün konak hücreye bağlanması ve girişi

Çalışmalara göre, SARS-CoV-2 beta-korona virüs cinsine aittir. Nükleokapsid (N), spike (S), membran (M) ve zarf (E) olarak bilinen dört yapısal protein SARS-CoV-2 virüsünü oluşturur. Protein M'nin virüsün konakçıya girişinde ve zarfların oluşturulmasında oynadığı önemli rol Şekil (2.2)'de gösterilmiştir (Kim *et al.* 2020). Schoeman and Fielding (2019)'e göre Protein E, virüsün çimlenmesinden, zarf üretiminden ve yayılmasından sorumludur. Çok işlevli N proteininin rolü transkripsiyonu ve viral birleşimi artırmaktır (Kang 2020). Farmasötik ve aşı araştırmalarındaki özel statüsü, Spike (S) proteininin aynı zamanda virüsün konakçı hücrelere bağlanmasından da sorumlu olmasından kaynaklanmaktadır. Walls *et al.* (2020), nötralize edici veya immünolojik antikorlara tepki vermedikleri için N, M ve E proteinlerinin terapötik hedefler olarak düşünülmediğini belirtmiştir. Yakın zamanda tanımlanan SARS-CoV-2'nin S glikoproteini, S1 ve S2 olmak üzere iki alt birimden oluşur ve tipik olarak bir kılıca benzeyen bir sivri uç olarak gösterilir. Ancak kristalografi, bu proteinin gerçek yapısının gözlemlenmesine olanak tanır. Bu glikoprotein için PDB modeli, alt birimleri oluşturan birçok alanın enfeksiyon süreci için ne kadar önemli olduğunu gösterir. S1 ve S2'yi birbirine bağlayan polibazik amino asit köprüsü, viral hedeflemeyi araştırmak için önemli olabilir (Andersen *et al.* 2020).

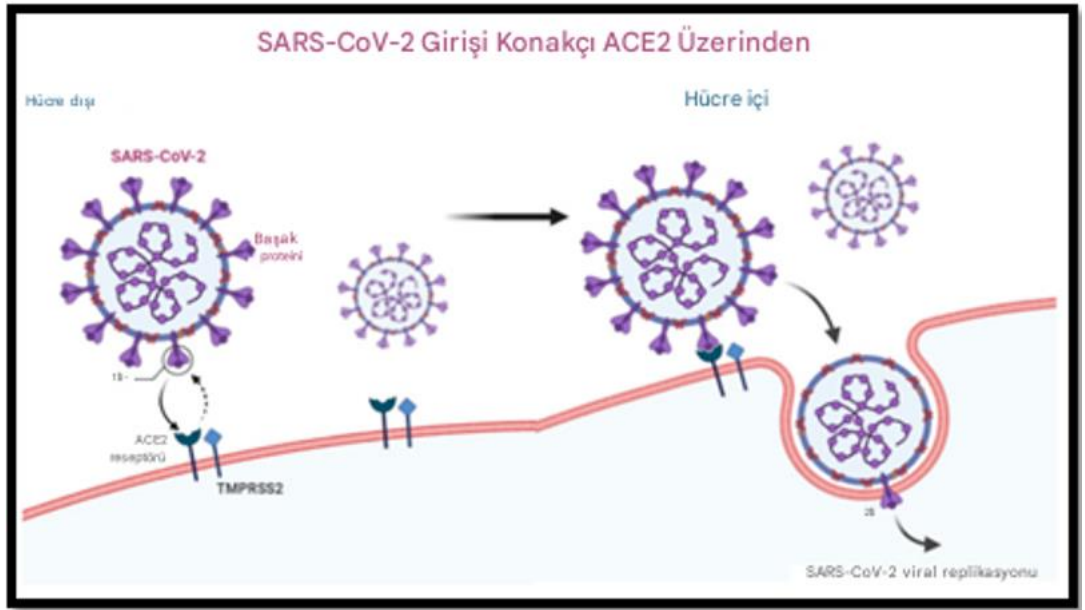


Şekil 2.3 SARS-CoV-2'nin şematik yapısı ve yapısal proteinleri (Beig Parikhani *et al.* 2021)

Bir S-proteini virüsün konak hücreye bağlanmasına yardımcı olur ve hücreye girmesini sağlar. Virüs penetrasyon sürecinden sonra çoğalır ve konak hücre tamamen enfekte olana ve öldürülene kadar devam eder (McIntosh *et al.* 2020). S-spike proteini, daha sonra endojen viral RNA genetik materyalini konak hücrelere salan anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörleri aracılığıyla memeli akciğer hücrelerine girer. Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) düzenlemesi, anjiyotensin dönüştürücü enzimlerin (ACE2) temel rollerinden biridir. Akciğerler, böbrekler ve kalp, hücre yüzeyi reseptörü olarak işlev gören ve SARS-CoV-2'nin konak hücrelere ve plazmaya girişini kolaylaştıran anjiyotensin dönüştürücü enzim 2'yi (ACE2) sergiler.

Ayrıca, SARS-CoV-2'nin ACE/ACE2 dengesinin bozulması ve RAS'ı aktive etmesi, özellikle önceden var olan kardiyovasküler hastalık sorunları, hipertansiyon ve diyabeti olan bireylerde, COVID-19'un gelişimine katkıda bulunan faktörler arasındadır (Beyerstedt *et al.* 2021). Vücudun diğer bölgelerine kıyasla, insan akciğerinde alveoler epitel hücreleri tip 1 ve 2'de çok daha fazla ACE2 ekspresyonu vardır (Zhang *et al.* 2020a). Çalışmalara göre, erkek alveoler hücreler ACE2'yi dişi alveoler hücrelerden çok daha yüksek seviyede eksprese eder. Ayrıca, Asyalı alveoler hücrelerdeki ACE2

ekspresyon seviyeleri Beyaz Amerikalılara göre çok daha fazladır (Foresta *et al.* 2020, Vinciguerra and Greco 2020). Raporlara göre, SARS-CoV-2 virüsünün spike protein yoluyla bağlanması, alveolar hücrelere zarar verebilecek, sistemik tepkilere ve hatta ölüme neden olabilecek ACE2 ekspresyonunu artırabilir (Wrapp *et al.* 2020). Bununla birlikte, reseptör bağlanması, bir koronavirüsün konak hücrelerini hedeflemesi için gerekli bir koşuldur. Viral spike proteini, reseptöre bağlandıktan sonra Katepsin, TMPRSS2 veya Furin Proteaz tarafından asit bağımlı proteoliz yoluyla kesilir. Bunu, Şekil 2.4'te görüldüğü gibi viral kaplamanın hücre zarlarıyla kaynaşması izler. Spike proteini fiziksel olarak iki parçaya ayrılır: insan hücresinin ACE 2 reseptörüne (RBD) bağlanma bölgesine sahip olan nS1, terminal birim; ve hücreler arası kuyruk (IT), füzyon proteini ve transmembran çapa (TA) içeren nS2, terminal bölüm. Letko *et al.* (2020)'ya, spike proteininin uyarlanabilir amino asit dizisi, konakçısıyla uyumluluğunu artırır.



Şekil 2.4 SARS-CoV-2'nin ACE2 reseptörünü hedeflemesi ve enfekte hücreye girişi (Letko *et al.* 2020)

Patojen, ona bağlanarak konak hücreye erişim kazanır. Kanıtlar, SARS-CoV-2'nin bir beta-koronavirüs olduğunu göstermektedir. SARS-CoV-2'nin unsurları virüs bir zarf, sivri uç, zar ve nükleokapsid içerir. Protein M, virüsün konakçıya girmesine ve kendisini paketlemesine yardımcı olur (Kim *et al.* 2020).

Schoeman and Fielding (2019'e) göre, çoğalma, çimlenme, zarf üretimi ve yayılma, protein E tarafından desteklenir. Kang *et al.* (2020)'a göre, çok işlevli N proteini transkripsiyonu ve virüs montajını artırır. Sivri (S) proteini ayrıca viral-konak hücre tutunmasını kolaylaştırır. Bu nedenle aşılama ve tıp araştırmalarında öne çıkar. N, M ve E proteinleri, immünoloji ve nötralize edici antikorlar bunlarla reaksiyona girmediğinden farmasötik hedefler değildir (Walls *et al.* 2020). S1 ve S2, yeni bulunan SARS-CoV-2 S glikoproteininin iki yarısıdır. Kılıç şeklindeki sivri uçlar yaygındır. Öte yandan kristalografi, bize bu proteinin şeklini gösterebilir. Enfeksiyon için kritik olan glikoprotein alanları, PDB modelinde görülebilir. Andersen *et al.* (2020)'e göre, polibazik bir amino asit köprüsü S1 ve S2'yi birbirine bağlar. Bu, virüslerin hücrelere nasıl girdiğini anlamak için gerekli olabilir. İllüstrasyon SARS-CoV-2'nin yapısı ve proteinleri (Beig Parikhani *et al.* 2021). Bir S-proteini virüsün ilgi duyulan hücreye girmesine izin verir. Virüs hücreye girdiğinde çoğalır ve sonunda hücreyi yok eder (McIntosh *et al.* 2020). ACE2 reseptörlerinin etkisiyle S-spike proteini memelilerin akciğer hücreleri tarafından alınır ve viral RNA genetik materyalinin konak hücrelere girmesine izin verir. ACE2'nin oynadığı en önemli rollerden biri RAS'tır. SARS-CoV-2, ACE2 hücre yüzey reseptörünü kullanarak konak hücrelere ve plazmaya erişebilir. Böbrekler, akciğerler ve kalbin hepsi RAS'ı içerir. Diyabet, yüksek tansiyon veya kalp hastalığı gibi önceden var olan rahatsızlıkları olan kişilerde SARS-CoV-2, ACE ve ACE2 dengesini bozabilir ve RAS'ı aktive edebilir (Beyerstedt *et al.* 2021). En yüksek ACE2 konsantrasyonları insan tip 1 ve tip 2 akciğer epitel hücrelerinde bulunmuştur (Zhang *et al.* 2020a). ACE2'nin alveoler hücrelerdeki ekspresyonu erkeklerde kadınlara kıyasla çok daha fazladır. Dahası, beyaz hücrelerle karşılaştırıldığında, Asyalı alveoler hücreler daha yüksek miktarda ACE2 ekspresyonu gösterir (Foresta *et al.* 2020, Vinciguerra and Greco 2020). Wrapp *et al.* (2020)'a göre, spike proteinler SARS-CoV-2 etkileşimlerine yanıt olarak ACE2 ekspresyonunu artırır. Bundan dolayı alveoler hücrelerde hasar ve ardından sistemik veya hatta ölümcül reaksiyonlar meydana gelebilir. Koronavirüsün konak hücreleri enfekte etmesi için reseptör teması gerekir. Reseptör etkileşiminin ardından, viral spike proteini furin proteaz, TMPRSS2 veya katepsin kullanılarak asit bağımlı proteolizle kesilir. Bu nedenle viral kaplama hücre zarlarıyla birleşebilir. Tipik bir spike proteininde, nS1 terminal ünitesi insan ACE 2 reseptörü (RBD) ile etkileşime girerken, nS2 terminal alanı füzyon proteinini, transmembran ankrajı (TA) ve hücreler arası kuyruğu (IT) barındırır.

Letko *et al.* (2020), spike proteinlerinin amino asit yapılarını değiştirerek konak uyumluluğunu iyileştirebileceğini bulmuştur. ACE2 reseptörü, SARS-CoV-2'nin hastalıklı hücelere giriş noktasıdır.

2.7.2 Bağışıklık sistemi üzerindeki etkisi

SARS-CoV-2 epitel hücrelerini enfekte ettiğinde enfeksiyon başlar. Hücre ölümünü başlattıktan sonra virüs konakçıyı terk eder. Virüs çoğaldıktan sonra proteinleri CD8+T ve NK hücreleri tarafından ifade edilir. Epitel yıkımının ardından SARS-CoV-2 antijenleri, MHC sınıf II molekülleri kullanılarak subepitelyal dendritik hücreler (DC) ve doku makrofajları tarafından CD4+ T hücrelerine sunulabilir. Sonuç, T hücresi farklılaşmasında hafıza Th1, Th17 ve TFH'ye doğru bir kaymadır. B lenfositlerinin plazma hücrelerine farklılaşması ve IgM ile başlayarak antikor üretmeye başlaması için TFH hücreleri gereklidir (Azkur *et al.* 2020). SARS-CoV-2 virüsü B hücreleri tarafından doğrudan tespit edilebilir ve Th lenfositleri MHC sınıf II molekülleri aracılığıyla viral antijenlere maruz bırakılabilir. Makrofajlar bu maddeler tarafından aktive edilir. Long *et al.* (2020)'a göre Uzun vadeli bağışıklık olasılığı, ilk IgM reaksiyonundan sonra izotipik IgG'ye dönüşme ile oluşabilir. SARSCoV-2, germinal merkez (GC) yanıtını azaltarak uzun süreli antikor reaksiyonlarını engelliyor gibi görüldüğünden, bu tekniği uygulamak zordur (Cañete and Vinuesa 2020). Şiddetli SARS-CoV-2 enfeksiyonları vakalarında, Melenotte *et al.* (2020), B hücresi sayılarında bir azalma keşfetmiştir. Cañete and Vinuesa (2020)'a göre, bellek T hücresi yanıtlarının tam olarak nasıl hayatta kaldığı hala bilinmemektedir. COVID-19 hastalarında kaspaz 3, TRAIL ve FAS seviyelerinin yükselmesi ve CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin etkinliğinin azalması görülür. Bu bulgulara dayanarak, T hücresi kaybı veya şiddetli lenfopeni daha iyi anlaşılabilir (Chen and John Wherry 2020). Virüs RNA tanımlama süreci, NF-kB ve IRF3 sinyal yollarının aktivasyonunu tetikler. Çekirdekteki bu transkripsiyon faktörleri interferon-alfa ve inflamatuvar sitokinler üretir. Viral enfeksiyon durumunda, bu bağışıklık sisteminin ilk tepkisidir (Prompetchara *et al.* 2020). Bağışıklık tepkisinden kaçınmak için SARS-CoV-2 sitozolik sensörü/RNA'yı baskılar. Etkili bir ilk tepkinin yokluğunda, virüs çoğalır ve yayılır ve INF-I'e yol açar. Bu, nötrofillerin ve makrofajların akciğerlere akınıyla ortaya çıkan sitokin fırtınası sendromunu tetikler (Prompetchara *et al.* 2020). Shi *et al.* (2020)'e

göre, erken koronavirüs hastalığının birincil belirtileri arasında lenfopeni ve sitokin salınım sendromu bulunur. Periferik hücre alt kümelerindeki değişiklikler klinik değişkenlerle ve COVID-19 tedavisinin etkinliğiyle bağlantılıdır. Hastaların akciğerlerinde MIP-1A, MCP-1, G-CSF, IL-10, IL-7, IL-2 ve TNF- α gibi sitokinlerde artış gözlemlenmektedir. Prompetchara *et al.* (2020)'a göre bu sitokinler COVID-19'un etkilerini artırmaktadır.

2.8 Patofizyoloji

Virüsün yaşam döngüsü 5 adımdan oluşur; bağlanma, penetrasyon, biyosentez, olgunlaşma ve salınma. Virüs konak reseptörlerine bağlandıktan sonra (bağlanma), endositoz veya membran füzyonu (penetrasyon) yoluyla konak hücrelerine girer. Viral içerikler konak hücrelerinin içine salınır ve viral RNA replikasyon için çekirdeğe girer. Viral mRNA, viral proteinler yapmak için kullanılır (biyosentez) (Hoffmann *et al.* 2020). Daha sonra, yeni viral parçacıklar yapılır (olgunlaşma) ve salınır. Yapısal ve işlevsel analiz, SARS-CoV-2 için sivri ucun ayrıca akciğerlerde, kalpte, ileumda, böbrekte ve mesanede yüksek oranda ifade edilen Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim 2'ye (ACE2) bağlı olduğunu göstermiştir. SARS-CoV2'nin konak proteine bağlanmasının ardından, sivri uç proteini proteaz bölünmesine uğrar. SARS-CoV ve MERS-CoV'nin spike proteinini aktive etmek için iki adımlı ardışık proteaz kesimi. S1/S2 bölgesi, transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) ve katepsin L gibi diğer proteazlar tarafından kesime tabi tutulur, furinin yaygın ekspresyonu muhtemelen bu virüsü çok patojenik hale getirir (Millet and Whittaker 2014).

2.9 Viral Risk Faktörleri

2.9.1 Bulaşabilirlik

Virüsün birincil rezervuarı, toplam etkilenen sayısı ve bulaşma şekli, yayılmasında önemli faktörlerdir. Hastalık, arkadaşlar, aile ve dostça etkileşimler yoluyla bir grup hasta ve asemptomatik enfekte bireyler arasında hızla yayılabilir. Dahası, virüs kuluçka

aşaması boyunca çoğalır. Dahası, teflon, çelik, cam ve cerrahi eldivenlerde uzun süre kalır (Vuotto *et al.* 2014). Değişiklikler virüsün patojenitesini, tedaviye direncini, immünolojik tepkilerini, replikasyonunu ve yeni konakçılara uyum sağlama kapasitesini etkiler. Dahası, mutasyonlar nedeniyle yeni suşların ortaya çıkması, yeni suşun istila etme olasılığını artıracaktır (Pachetti *et al.* 2020, Rashedi *et al.* 2020).

2.9.2 Viral yük

Alt solunum yolu hücreleri ve ağız ve dilin epitel hücreleri SARS-CoV-2 ve reseptörü ACE2'yi içerir ve büyütür. Virüsün viral yayılımı 37 güne kadar sürebilir. Asemptomatik bireyler semptomatik kişilerle karşılaştırılabilir bir viral yüke sahiptir. Yine de Thompson *et al.* (2011)'a göre, asemptomatik kişilerin oranı sitokin üretebilen dendritik hücreler, doğuştan gelen makrofajlar, adaptif T ve B lenfositleri ve doğal öldürücü hücrelerden yaklaşık dört kat daha fazladır. TNF- α , INF, IL-1 ve IL-6 dahil olmak üzere bir dizi sitokin sitokin fırtınasının bir parçasıdır (Braciale and Hahn 2013). Sitokinlerdeki artışlar, T hücrelerini, nötrofilleri ve makrofajları enfekte bölgeye çeker, burada endotel hücre-hücre etkileşimlerinin bozulması, kılcal damarlara zarar, yaygın alveoler yıkım, vasküler bariyer yıkımı ve nihayetinde çoklu organ yetmezliği kaynaklı ölüm yoluyla dokuyu toplar ve hasara uğratar. Şekil 2.2'de görüldüğü gibi, akciğer hasarı, akut akciğer hasarına veya şiddetli aşamasına (ARDS) yol açabilen bir sitokin fırtınasının sonuçlarından biridir (Braciale and Hahn 2013). Colafrancesco *et al.* (2020), akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), SARS CoV-1, SARS CoV-2 ve MERS dahil olmak üzere çok ölümcül olan koronavirüslerin neden olduğu şiddetli viral pnömoninin sık görülen bir yan etkisidir. Akut akciğer hasarı ve diğer solunum bozuklukları, akciğerlere yeterli oksijen gitmesini engelleyen akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ile birleştiğinde önemli ölüm nedenleridir (Mason *et al.* 2016).

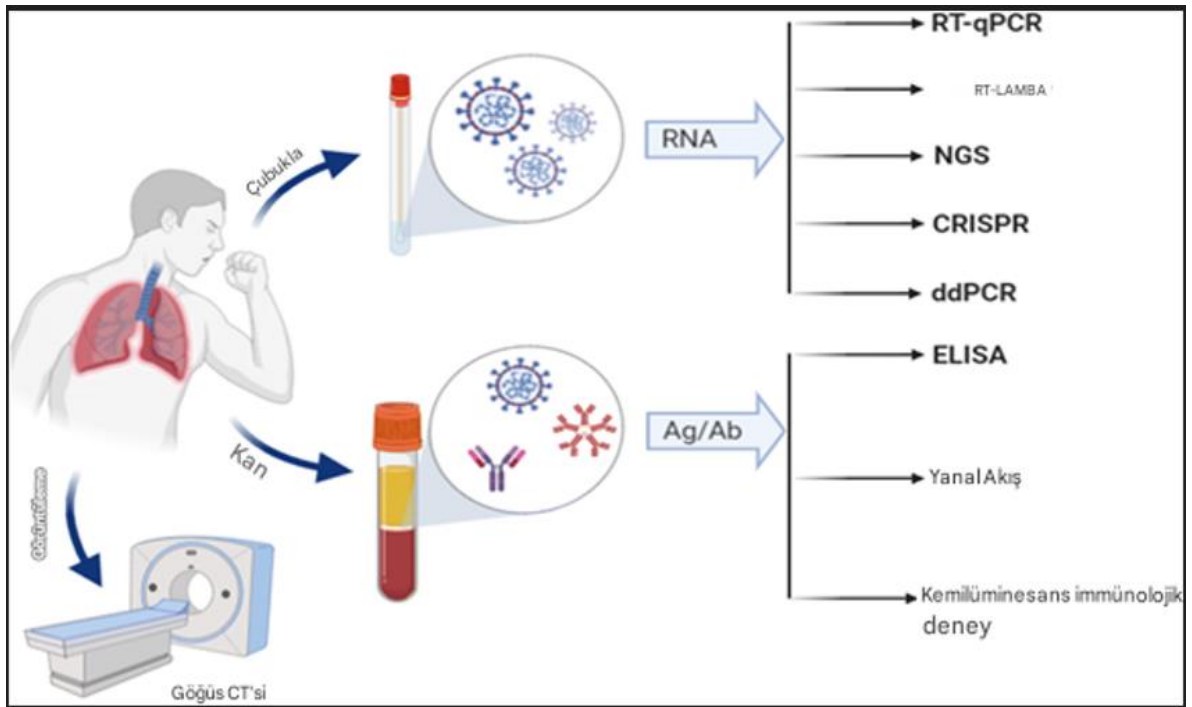
2.10 Tanı

Klinik ve epidemiyolojik değerlendirmenin ötesinde, şüpheli patojeni hızlı bir şekilde tanımlamak için laboratuvar muayenesi çok önemlidir. Bunun ayrıca izolasyonun etkinliğini artırdığı da bilinmektedir. COVID-19'un klinik tablosunu gösteren çok az kişi

vardır, diğerleri asemptomatiktir ve geri kalanında akut solunum sıkıntısı sendromu ve çoklu organ yetmezliği gelişmektedir. Bu zorluk nedeniyle, COVID-19 enfeksiyonunun kesin tanısını koymak kolay olmayabilir. Bir kişide COVID-19 hastalığının tanısı büyük ölçüde ilgili kişinin maruz kalma geçmişine ve semptomlarına bağlıdır ve Şekil 2.3'te görüldüğü gibi BT taraması, NAAT ve Seroloji gibi laboratuvar prosedürleri ile doğrulanır (Corman *et al.* 2020, Wan *et al.* 2020). Bu tür immünoyagnostik testin arkasındaki temel kavram, ELISA kullanılarak virüse ve/veya antijenlerine karşı antiviral antikorlar, IgG ve IgM'nin ölçülmesidir (Rai *et al.* 2021). En yaygın kullanılan serolojik testler Enzim bağlantılı immünosorbent testi (Bundschuh *et al.* 2020), Hasta başı testi (Guo *et al.* 2020) ve MINI VIDAS'tır (Meunier *et al.* 2022).

2.11 Moleküler Yöntemler

Bu yöntemler şunları içerir: Nükleik asit amplifikasyon testi, Ters transkriptaz gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu, Ters transkripsiyon döngüsü aracılı izotermal amplifikasyon ve CRISPR tabanlı tanı (Rai *et al.* 2021).



Şekil 2.5 SARS-CoV için çeşitli analitik yöntemler (Rai *et al.* 2021)

Antikor tabanlı immünoyagnostiğin temel prensibi, viral enfeksiyona (IgG ve IgM) ve/veya viral antijene yanıt olarak geliştirilen antikorların enzim bağılı immünosorbent testi (ELISA) (Rai *et al.* 2021) yoluyla saptanmasıdır. En popüler serolojik testler arasında Enzim bağılı immünosorbent testi (Bundschuh *et al.* 2020), Hasta başı testi (Guo *et al.* 2020) ve MINI VIDAS (Meunier *et al.* 2022) yer alır

2.12 COVID-19 Aşıları

Alıcının tepkisini izlemek aşıların güvenliğini ve özgüllüğünü belirlemek için kullanılıyordu; ancak teknolojiye gelişmeler bu yaklaşımı geçersiz kılarak hem daha güvenli hem de daha doğru aşılamaların uygulanmasını mümkün kıldı. Protein alt birimleri, nükleik asitler veya viral vektörler içeren varyantları içeren çeşitli aşılar ticari olarak erişilebilir durumdadır (Mellet and Pepper 2021).

2.12.1 Aşı potansiyeli mRNA

RNA aşıları, COVID-19'a karşı birincil önleyici tedbir olarak Avrupa Birliği, Birleşik Krallık ve Amerika Birleşik Devletleri'nden resmi onay almıştır. Pfizer-BioNTech ve Moderna, bağışıklık tepkisi uyandırmak için RNA kullanan çok sayıda aşı geliştirmiştir. Aşı insan dokusuna girdiğinde, kendi kendini kopyalayan RNA veya haberci RNA, hücrelerin SARS-CoV-2 sivri proteinini yapmasını sağlar. Bu, virüsün vücut tarafından tanımlanmasını ve yok edilmesini kolaylaştırır. RNA aşıları tipik olarak nükleozid modifiye mRNA kullanır, ancak evrensel olarak kullanılmaz. Dozajlar arasındaki önerilen aralık 21 gün olsa da bu sürenin Amerika Birleşik Devletleri'nde 42 güne ve Kanada'da 4 aya uzatılması izin verilebilir. Aşı, ikinci dozdan sonraki yedi gün içinde semptomatik enfeksiyon önlemede %91 etkilidir. Hafif ile şiddetli enjeksiyon yeri ağrısı, yorgunluk ve migren en sık karşılaşılan yan etkilerdir, genellikle sınırlı bir süre devam eder ve hafif ile orta şiddette olarak sınıflandırılır (Sharma *et al.* 2021, Marcelino *et al.* 2021, Hsieh *et al.* 2024).

2.12.2 oğalmayan viral vektörleri kullanan aşılar

Bu aşılar, Çoğalmayan viral vektöre bir örnek olan viral bir proteini kodlayan DNA'ya sahip bir adenovirüs kapsidi kullanır. Viral vektörlere dayalı aşılar, oğalmadıkları için yalnızca vücutta bir bağıışıklık tepkisi uyandıran antijeni üretirler. Sputnik V, Janssen, Oxford-AstraZeneca ve Convidecia aşılarının hepsi bu türden yetkili formülasyonlar içerir. Bu aşıların etkinliğı, ilk dozdan 22 gün sonra %76 ve ikinci dozdan iki gün sonra %81'dir. Aşılanmanın yan etkileri arasında enjeksiyon yerinde ağı, mide bulantısı ve baş dönmesi bulunur; aşı buzdolabında saklandığında stabil kalır (Vanaparthi *et al.* 2021, Chanukya and Srikantam 2021).

2.12.3 İnaktif virüslere yönelik aşılar

Bu aşılar, formaldehit veya ısı gibi etkisiz hale getirme işlemlerinden geçmiş virüs parçacıkları içermelerine rağmen bağıışıklık tepkisini uyarmaya devam eder. Bu kategorinin açıklayıcı örnekleri arasında Rus aşıları CovidVac ve Sinopharm BIBP ve WIBP (Patel *et al.* 2021) yer alır.

2.12.4 Alt birimlerden oluşan aşı bileşenleri

Alt birim aşılamarı, tam patojen yerine hedeflenen antijenleri uygulayarak hastalık koruması sunar. Protein alt birimleri sıklıkla antijen olarak kullanılsa da patojenin bir bölümünü simgeleyen herhangi bir molekül yeterli olabilir. Bu aşılar arasında Corbevax, MVC COV1901, EpiV Corona ve ZF2001 (Arunachalam *et al.* 2021, Mellet and Pepper 2021) bulunur.

2.12.5 Alternatif tipler

Şu anda insanlarda başka aşı türleri test edilmektedir. Bunlar arasında lentivirüs vektörleri, konjugat aşılar, viral benzeri parçacıklar, farklı DNA plazmidleri, SARS-CoV-2 sivri proteinini yapan veziküler stomatit virüsü ve HIV benzeri parçacıklar yer

almaktadır. Bilim insanları, ilgisiz hastalıklar için mevcut aşuların bağışıklık sistemini uyarabileceği ve COVID-19 enfeksiyonunun şiddetini azaltabileceği olasılığını araştırmıştır. Deneyisel veriler, tüberkuloz için BCG aşısının viral olmayan bağışıklık sistemi yan etkilerine sahip olabileceğini dūřündürmektedir; ancak, bu aşının COVID-19 bulaşmasını önleyebileceğini gösteren hişbir kanıt bulunmamaktadır (Mellet and Pepper 2021).

2.12.6 Tedavi

şu anda hastalar antiviral tedavi, antibiyotik ve steroidler ile tedavi görmektedir. HIV enfeksiyonunu tedavi etmek için kullanılan şeşitli proteaz inhibitörleri (örneğin darunavir, atazanavir) replikasyonu için gerekli olan HIV proteazını da bloke edebilir (Stasi *et al.* 2020). Antiviral Lopinavir/ritonavir ilaşları, Covid-19 nedeniyle hafif hastalığı olan hastalarda, hastaların hastaneye yatırılması yerine hastalığın erken evrelerinde ana tedavilerden biridir. Bu ilaçlar daha önce SARS-CoV-2 ve MERS-CoV tedavisi için de önerilmiştir.

İmmünomodülatör ilaçlar; Virüsün yol aştığı zararın önemli bir yönü, inflamatuvar süreçlerin düzensizleştirilmesi ve bazı durumlarda, örneğin hastalarda, IL-6, IFN- γ ve TNF- α gibi inflamatuvar sitokinlerin aşırı salgılanmasıdır. Bu nedenle, bağışıklık tepkisini dizginlemek için otoimmün hastalıklarda uygulanan anti-inflamatuvar ilaçlar önerilmektedir (Stasi *et al.* 2020).

Tocilizumab; Tocilizumabın, anakinra, kortikosteroidler, baricitinib, klorokin ve hidroksiklorokin içeren ağır pnömoni hastalarında ölme veya invaziv mekanik ventilasyona alınma olasılığını azaltabileceği gösterilmiştir (Flisiak *et al.* 2021).

2.13 COVID-19 ve Başışıklık

2.13.1 IgM

En büyük antikor olan immünoglobulin, antijen maruziyetine yanıt olarak oluşan ilk antikordur. Bu antikor izotipi dahildir. Johansen *et al.* (2000)'e göre, B hücreleri önce yüzeye bağı bir molekül olarak IgM üretir ve salınmasından önce gelişimlerinin erken dönemlerinde ifade eder. İmmünoglobulin M (IgM), plazma hücreleri tarafından immünolojik yanıtın ilerleyen aşamalarında üretilir. IgM iki formda bulunur: 12 bölgeye sahip ancak J zinciri olmayan heksamerler veya 10 antijen bağlanma bölgesine ve birleşme (J) zincirine sahip çözünür pentamerler. M pentamerler ve heksamerler sırasıyla yaklaşık 900 veya 1050 kDa ağırlığındadır. Keyt *et al.* (2020) tarafından yapılan araştırmaya göre, polivalan IgM'ler bivalan IgG'lerden daha fazla antijen afinitesine sahip olabilir. IgM antikorları enfeksiyonları nötralize eder ve lizis hücreleri ve enfeksiyona neden olan organizmalarla birlikte çalışır. Capolunghi *et al.* (2013)'ye göre, IgM çeşitli fizyolojik moleküllerle etkileşime girer. IgM, tamamlayıcı bileşen C1'e bağlanır ve hücreleri öldüren ve antijenleri opsonize eden klasik yolu başlatır. Poli immünoglobulin reseptörü (pIgR), IgM'yi mide lümeni ve anne sütü gibi mukozal yüzeylere taşır. Bu bağlanma J zincirini gerektirir (Keyt *et al.* 2020). Çoğu COVID-19 hastası, semptomların başlamasından birkaç hafta sonra IgG ve IgM antikorları üretir. IgM testi, semptomların başlamasından sonraki üç hafta içinde IgG testinden daha yüksek test duyarlılığına sahiptir. Yapılan çalışmalarda, IgM düzeylerinin semptomlar başladıktan sonra dört ile beş hafta arasında istikrarlı bir şekilde düştüğünü, ancak çoğu hastanın ilk iki ayda pozitif kaldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, IgG pozitifliği semptomlar başladıktan sonra üç ile altı ay boyunca %92 oranında devam eder (Maine *et al.* 2020). Virüse özgü IgM ve IgG antikorları için serolojik testler geliştirilmiştir ve sonuçlar ayındır (Hou *et al.* 2020).

2.13.2 IgG

Vidarsson *et al.* (2014), kandaki ve hücre dışı sıvıdaki ana antikorun çok sayıda dokudaki enfeksiyonu düzenlediğini belirtmektedir. İnsan serum antikorlarının %75'i kan dolaşımındaki en yaygın tiptir. Plazma B hücreleri IgG üretir ve serbest bırakır. Her IgG

antikorunun iki paratopu vardır. Dört peptit zincirli protein yaklaşık 150 kDa ağırlığındadır. Davies *et al.* (2014) göre yapı, yaklaşık 50 kDa ağırlığında iki özdeş γ ağır zincir ve yaklaşık 25 kDa ağırlığında iki özdeş hafif zincire sahip tetramerik bir kuaterner yapıdır (Collins and Jackson 2013). Patojenler aglütinasyon yoluyla bağlanır. Patojen bağlayıcı IgG bu mekanizmaya aracılık eder. Patojen yüzeylerindeki IgG kaplaması, fagositik bağışıklık hücrelerinin patojeni tespit edip yemesini ve ortadan kaldırmasını sağlar. IgG, tüm klasik tamamlayıcı sistem yollarını aktive ederek patojeni öldürür. IgG ayrıca ADCC'ye ve hücre içi antikor aracılı proteolize katkıda bulunur. Her ikisi de TRIM21'e bağlanmak ve işaretli virionları sitozolik proteazoma taşımak için IgG kullanır (Davies *et al.* 2014). IgG, tip II ve tip III aşırı duyarlılık reaksiyonlarıyla ilişkilidir. Önceden aşılanmış COVID-19 hastalarının, naif bireylere göre daha yüksek IgM ve IgG seviyeleri vardır. İkinci dozdan iki hafta sonra, önceden aşılanmış grup çok daha yüksek IgM ve IgG bağışıklık tepkileri sergiler. Ancak IgG titresi. Çalışmanın başında IgG için pozitif olan hastalarda, ikinci doz IgG titresini artırmıştır (Cucchiari *et al.* 2021).

2.13.3 Sitokinler

Sitokin adı verilen düşük molekül ağırlıklı proteinler, hücresel tepkileri ve iletişimi pleyotropik ve hücreye özgü bir şekilde düzenler. Homeostatik koşullar sitokin genlerinin ifadesini kontrol eder ve iltihap gibi farklı bağışıklık tepkilerindeki çeşitli uyarılar, bunların transkripsiyonu ve translasyonu üzerinde etkilidir. Takeuchi (2016)'e göre sitokinler, bağışıklık tepkilerinde rol oynayan farklılaşma, çoğalma ve iletişim dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri kontrol eder. Dört ana sitokin kategorisi, kaynaklarına ve/veya özelliklerine göre lenfokinler (lenfositler tarafından yapılır), monokinler (monositler tarafından üretilir), interlökinler (lökositler tarafından üretilir) ve kemokinlerdir (kemo-çekici sitokinler). Sitokinler üç farklı etkiye sahip olarak sınıflandırılır: salgılayan hücre üzerinde etki eden otokrin, komşu hücreler üzerinde etki eden parakrin ve uzak hücreler üzerinde etki eden endokrin; NK hücreleri, B ve T lenfositleri ve fagositik hücreler de dahil olmak üzere bağışıklık hücrelerinin çoğunluğu sitokin üretme yeteneğine sahiptir (Takeuchi 2016). Sitokinlerin ciddi patolojik durumlara neden olabildiği sistemik enfeksiyonlarda (endotoksini, sepsis ve en son pandemi solunum yolu enfeksiyonu koronavirus hastalığı 19), yakın zamanda "sitokin

fırtınası" terimi ortaya atılmıştır (Chauhan *et al.* 2021). IL-1 β , IL-6, IL-8 ve TNF- α dahil olmak üzere birkaç sitokin, daha önceki bölümlerde tartışıldığı gibi CS'nin immünopatogenezinde rol oynar.

2.14 İkincil Bakteriyel Akciğer iltihaplanması ile Birleşmiş SARS COV-2

Solunum yolu enfeksiyonu virüsleri uzun yıllardır, bazen mevsimsel dalgalanmalarla birlikte, küresel olarak yüksek morbidite ve ölüm oranlarıyla ilişkilendirilmektedir (Bradley and Bryan 2019). Birincil enfeksiyon sırasında veya sonrasında gelişen hastalarda ikincil bakteriyel enfeksiyonların araştırılması çok önemlidir, ancak bir viral hastalık acil durumu sırasında ana vurgu altta yatan enfeksiyonun klinik bakımı üzerinedir. Dahası, ko-enfeksiyonlar ortaya çıkabilir ve aynı etkiye sahip olabilir, bu da hastanın iki farklı patojenin neden olduğu sorunları yaşadığı anlamına gelir (Morris *et al.* 2017, Wang *et al.* 2018).

Viral olarak enfekte olmuş organların bakteriyel kolonizasyonu, viral enfeksiyonların, özellikle de pulmoner virüslerin kayda değer bir sonucudur. Bu durum, zayıflamış bağışıklık sistemleri ve/veya bakteriler için fırsatçı ve savunmasız giriş noktaları nedeniyle artan morbidite ve mortalite oranlarıyla bağlantılıdır (Mallia *et al.* 2012). Çoğunlukla orijinal viral enfeksiyonun getirdiği immünolojik duyarlılığın sonucu olan süperenfeksiyonlar veya ikincil bakteriyel enfeksiyonların aksine, ko-enfeksiyonlar aynı anda çok sayıda enfeksiyonun (viral, bakteriyel veya maya) ortaya çıkmasıdır. Ko-enfeksiyonlar, süper-enfeksiyonlar veya ikincil enfeksiyonlar viral pandemiler sırasında yaygındır. 1918'deki İspanyol Gribi pandemisinde, bakterilerle birlikte görülen enfeksiyonlar yaklaşık 50 milyon ölümle ilişkilendirilmiştir ve 2009 H1N1 Grip pandemisinde, bakterilerle birlikte görülen enfeksiyonlar ölümlerin %34'ünden sorumludur (Chertow and Memoli 2013). Tıbbi raporlar genellikle bu etkileri göz ardı etmektedir (Manohar *et al.* 2020). İkincil enfeksiyonlara karşı savunmasızlığın arkasındaki kesin mekanizma bilinmese bile, konağın doğuştan gelen bağışıklık sisteminin virüs aracılı immüno supresyonunun fırsatçı bakterileri konakta kolonileşmeye teşvik etmesi muhtemeldir (Kim *et al.* 2011). Memeli konakların aynı anda birçok fırsatçı enfeksiyona karşı savunmasız olmasına rağmen, konak-patojen etkileşimleri üzerine

yapılan çalışmaların büyük bir kısmı tek patojen, tek konak paradigmasına odaklanmaktadır (Dempsey *et al.* 2010). Viral olarak indüklenen ikincil bakteriyel enfeksiyonların sıklığı, bir mikropa verilen bağışıklık tepkisinin diğer enfeksiyon etkenlerine karşı bağışıklığı etkilemesi nedeniyle artabilir (Hendaus *et al.* 2015). Aktif viral enfeksiyonlar sırasında farklı bakteri suşları, enfeksiyon yolları, enfeksiyonun yakınlığı ve bakterilerin virülans özelliklerindeki farklılıklar nedeniyle farklı sonuçlar doğurmaktadır. Viral enfeksiyonların yanı sıra müteakip bakteriyel enfeksiyonların da etkili tedavisi esastır. İkincil bakteriyel enfeksiyonlar başlangıçtaki antiviral tedaviyle tedavi edilemez (McCullers 2011). Hastane kaynaklı veya nozokomiyal enfeksiyonlar, hastanın potansiyel olarak çevresinden edinebileceği ikincil enfeksiyonlara örnektir. Artan antibiyotik kullanımı ve onlarca yıllık suistimal ve yanlış kullanım nedeniyle, nozokomiyal hastalıklar genellikle çok çeşitli ilaçlara dirençlidir ve bu da çoklu ilaca dirençli bakterilerin seçilmesine neden olur (Manohar *et al.* 2020). Profilaktik antibiyotik tedavisi almalarına rağmen, COVID-19 kohort çalışmasındaki hastaların neredeyse %50'sinin akciğerlerinde *K. pneumoniae*, *Staphylococcus*, *A. baumannii* ve *E. coli* dahil olmak üzere çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu ikincil bakteriyel enfeksiyonlar gelişmiş ve bu da sonuçta ölümlerine yol açmıştır (Du *et al.* 2020).

2.14.1 Bakteriyel pnömoniye neden olan izole bakterilerin tanımı

Solunum yolu enfeksiyonunun etiyolojisi Solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan en önemli faktörlerden biri bakteri ve virüslerdir. SARS-COV-2 hastalarında sekonder bakteriyel enfeksiyon genellikle viral bir hastalıkla enfeksiyondan sonra gelişir ve SARS-COV-2 hastalarında tanımlanan yaygın bakteriyel organizmalardan biridir. *Klebsiella pneumoniae* ve *Streptococcus aureus* bakterileri en önemli nedenlerden birini temsil eder (Sharifipour *et al.* 2020).

2.14.1.1 Klebsiella türleri

İmmotil, gram-negatif çubuklar kalın bir kapsüle sahiptir (Berkowitz and Jerris 2016). Laktozu fermente eden bu bakteri tarafından MacConky agarda büyük mukoid koloniler üretilir (Nahavandinejad and Asadpour 2017). Deri, ağız ve bağırsakların doğal florasında

daha yaygın olmasına rağmen, solunduğunda insan ve hayvan akciğerlerine, özellikle de alveollere ciddi zarar verebilir ve kırmızı balgama yol açabilir. Klinik örneklerden izole edilen *K. oxytoca* ve *K. rhinoscleromatis*'ten sonra, *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olan *K. pneumoniae*'nin klinik olarak en alakalı olduğuna inanılmaktadır. *Klebsiella* türleri son yıllarda önemli nozokomiyal enfeksiyonlar olarak tanınmaya başlamıştır (Riddell and Sanyal 2019). Li *et al.* (2014)'ye göre, lipopolisakkarit, kapsül polisakkarit, dış membran proteini ve fimbria dahil olmak üzere çeşitli virülans faktörlerine sahiptir. Bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde *K. pneumoniae* genellikle idrar yolu enfeksiyonları (İYE), pnömoni, karaciğer apseleri, yara enfeksiyonları ve bakteriyemi gibi hastalıklarla bağlantılıdır. McPherson (2017)'a göre, yenidoğan kreşlerindeki *Klebsiella* salgınları, çeşitli antibiyotik tedavilerine dirençli hastane kaynaklı enfeksiyonlar olarak tanımlanmıştır. Plazmid transferi yoluyla, antimikrobiyal direnç bu salgınlarla ilişkilendirilmiştir. *Enterobacteriaceae* ailesinin antibiyotik direncinde artış göstermesine rağmen, *K. pneumoniae* karbapenemaz (KPC) mevcut olduğu için *K. pneumoniae*'nin en dirençli olduğu düşünülmektedir.

2.14.1.2 *Staphylococcus aureus*

Bu özel *Staphylococcus* türü, klinik açıdan en önemli olanıdır ve küçükten ölümcül olana kadar çok çeşitli hastalıklara neden olur. *S. aureus* genellikle tipik bir deri ve mukoza zarı florası olarak düşünülse de, hasar görmüş herhangi bir dokuya sızabilen fırsatçı bir flora olarak da kabul edilmektedir (McPherson 2017). *S. aureus*'un toksinleri, hücre dışı değişkenleri ve invazif özellikleri patojenitesinin kaynaklarıdır (Berkowitz and Jerris 2016). Lipsky *et al.* (2010)'ye göre, *S. aureus* deri lezyonları, pnömoni, yara enfeksiyonları, apseler ve hatta septisemi dahil olmak üzere çeşitli hastalıklara neden olabilir. *S. aureus* virülans faktörleri, hücre duvarının bir bileşeni olan ve bakterinin konakçı hücreye bağlanmasına yardımcı olan bir yapışma proteini olduğu düşünülen protein A gibi çeşitli toksinlerin ve hücre dışı enzimlerin üretimini içerir. Fagositozu önlemek için, çözünebilir fibrinojeni fibrine dönüştüren koagülaz enzimini de üretmektedir. *S. aureus* tarafından salgılanan bir kümelenme faktörü, bakterilerin fibrinojen ve fibrine yapışmasından sorumludur ve mikropların kümelenmesine neden olur. *S. aureus* suşlarının çoğunun lipaz, kolajenaz, hiyaluronidaz, proteinaz ve nükleaz

dahil olmak üzere çeşitli ekzoproteinler ürettiği bilinmektedir. McPherson (2017)'a göre, bu proteinlerin ana işlevi konak dokuyu bakteriyel gelişim için gerekli olan besin maddelerine ayırmak olabilir. Ayrıca, lökositin, Panton-Valentine lökositin, α -hemolizin, β -hemolizin ve β -hemolizin gibi çeşitli sitolitik ekzotoksinler salgılar (Truant 2016). PVL lökositler için güçlü bir afiniteye sahipken, γ -hemolizin ve lökositin eritrositler ve lökositler için sitotoksiktir, α -hemolizin ise öncelikle insan monositleri ve trombositleri üzerinde sitolitik bir etkiye sahiptir (Jamil *et al.* 2016). Stafilokokal enterotoksinler ve toksik şok sendromu toksini-1 gibi ekfoliyatif toksinler, *S. aureus*'un ürettiği diğer ekzotoksin sınıfları arasındadır. Süperantijenler, TSST-1 ve enterotoksinleri içeren bir toksin sınıfıdır. Süperantijenler, T hücre proliferasyonunu keyfi olarak indüklemeye kapasitesine sahiptir (Riddell and Sanyal 2019). Thompson *et al.* (2011)'a göre, doğuştan gelen makrofajlar, doğal öldürücü hücreler, adaptif T ve B lenfositleri ve dendritik hücrelerin tümü sitokin oluşturabilir. Sitokin fırtınası, TNF- α , INF, IL-1 ve IL-6 dahil olmak üzere birçok sitokini içerir (Braciale and Hahn 2013). Sitokinlerin yükselmesi sonucunda T hücreleri, nötrofiller ve makrofajlar enfekte bölgeye çekilir, bu da kılcal damarlara zarar verir, endotel hücre etkileşimini bozar, alveolleri yaygın bir şekilde tahrip eder, vasküler bariyerleri yıkar ve nihayetinde çoklu organ yetmezliği ve ölümle sonuçlanır. Braciale and Hahn (2013)'a göre akciğer hasarı, sitokin fırtınasının akut akciğer hasarına veya bunun ciddi aşamasına (ARDS) yol açabilecek sonuçlarından biridir.

2.14.1.3 *Streptococcus pneumonia*

Gram-pozitif *Streptococcus pneumoniae* şeklinde veya kısa zincirler halinde bakterilerdir (Düzgüneş 2015). Bu bakteriler pnömoni vakalarının %95'ine neden olmaktadır. Ana virülans faktörü polisakkarit kapsüldür ve kolin bağlayıcı proteinleri pnömokok CBP hücre duvarında bulunabilir (Yamaguchi *et al.* 2019). Bu bakteriler farinkste kolonize olur. Nazal mikrobiyom: Yetişkinlerin %25'inde patojenik mekanizmalar, bağışıklık sisteminin teikoik asit yolu üzerinden güçlü enfeksiyonlara verdiği yanıtıdır (Düzgüneş 2015).

2.14.1.4 *Streptococcus pyogenes*

Solunum yolu hastalıklarının en önemli nedenlerinden biri, zincirler halinde düzenlenmiş oval bileşenlerden oluşan gram pozitif bir bakteri olan *Streptococcus pyogenes*'tir. Bu zincirler, ardışık hücre bölünmeleri sonucunda ve sıvı ortamda oluşurlar. Bu bakteriler, büyüyen kolonilerin etrafındaki beta kanını analiz etme yetenekleriyle karakterize edilirler. Bakteriler, streptolizin O, ekzotoksin A, streptolizin S ve ekzotoksin B (Levinson 2018) dahil olmak üzere çok sayıda enzim ve toksin üretebilir. Bu bakteriler, adaptif bağışıklık zayıfladığında bronşiyal tüplerin enfeksiyonlarına ve boğaz ağrısına neden olur.

2.14.1.5 *Moraxella catarrhalis*

Gram-negatif bakterilerde solunum yolu hastalıklarının nedenlerinden biri, normalde üst solunum yollarında bir arada bulunan oval ile yassı koklardan oluşur. Bazen oksidaz testi için gerekli olan zorunlu aerobik ortamda büyüyen kısa zincirlerde bulunurlar. Bu bakteriler, konak yüzeyindeki stabilite sürecine ve bağışıklık sistemi tarafından enfeksiyona yanıt olarak antikor oluşumuna yardımcı olan membran vezikülleri ile temsil edilen virülans faktörlerine (Tamang *et al.* 2005) ve ayrıca iç ve dış toksinlere ek olarak polisakkarit kapsülün varlığına sahiptir. Tüm bu faktörler konağın bağışıklık sistemini uyarır. Bu bakteriler, özellikle yetişkinlerde, alt solunum yollarındaki viral enfeksiyon nedeniyle fırsatçı bakterilere dönüşen bir mikrobiyomu veya komensal bakteriyi temsil eder.

2.14.1.6 *Pseudomonas* türleri

Gram-negatif bir basil olarak insanları, hayvanları ve bitkileri enfekte etme yeteneğine sahiptir (Engelkirk *et al.* 2020). Çoklu ilaca dirençli bir bakteri olan *P. aeruginosa*, doğuştan iyi gelişmiş antibiyotik direnç mekanizmaları ve sepsis ve ventilatörle ilişkili pnömoni gibi ciddi hastane kaynaklı enfeksiyonlarla bağlantısı nedeniyle iyi bilinmektedir (Tille 2015).

Bu bakteri fırsatçı olarak kabul edilir ve özellikle kistik fibroz ve ciddi yanık vakalarında birçok enfeksiyona yol açabilir. Isınan havuz folikülitinde olduğu gibi, çoğunlukla bağışıklık sistemi zayıflamış kişileri etkiler, ancak bağışıklık sistemi yeterli kişileri de enfekte edebilir (Kaye and Pogue 2015). Bu tür enfeksiyonlar sepsis ve yaygın inflamasyona neden olur. Bu kolonizasyon böbrekler, akciğerler ve idrar sistemi gibi önemli organlarda ölümcül etkilere sahip olabilir (Murray *et al.* 2020).

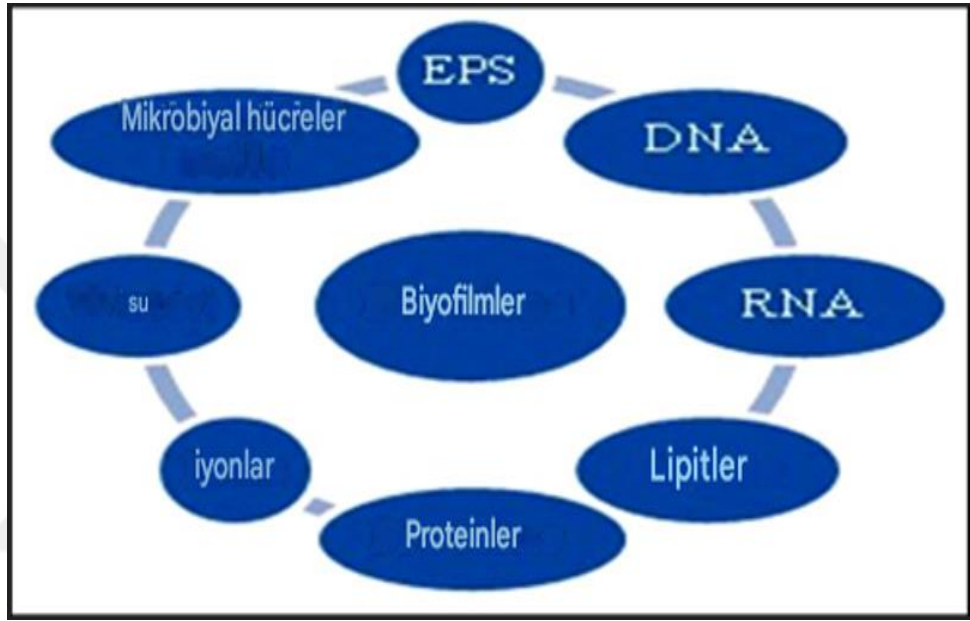
2.14.1.7 *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii gram-negatif, laktoz fermente etmeyen, toprak ve suda yaygın olarak bulunan aerobik bir kokobasildir. *Acinetobacter* çoğunlukla kommensal olmasına rağmen, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olabilir. Kan, idrar, balgam, plevral sıvı ve deride *A. baumannii*'ye rastlanmıştır ve bu bakteri genellikle cihazlarla bağlantılı enfeksiyonlarda tespit edilmiştir. *Acinetobacter* bakteriyemisi olan hastalar bakteriyel hastalığı intravenöz kateterler yoluyla edinmiş gibi görünmektedir. Sepsis, yanıklı hastalarda veya bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde *Acinetobacter* gibi fırsatçı mikroorganizmalar tarafından meydana getirilebilir. Genellikle ilaçlara dirençli olan *Acinetobacter* suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisi zor olabilir (Engelkirk *et al.* 2020). SARS CoV-1, SARS CoV-2 ve MERS gibi son derece ölümcül koronavirüsler, şiddetli viral pnömoninin sık görülen bir sonucu olan akut solunum sıkıntısı sendromuna (ARDS) neden olabilir (Colafrancesco *et al.* 2020). Akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS), akut akciğer hasarı ve diğer solunum bozuklukları vakalarında önde gelen bir ölüm nedenidir. Akciğerlere yeterli oksijen gitmesini engeller (Mason *et al.* 2016).

2.15 Biyofilmler

Armbruster and Parsek (2018)'e göre biyofilmler, mikroorganizmaların kendilerinin oluşturduğu hücre dışı bir matris içinde yer alan bakteri veya çok hücreli topluluk koleksiyonlarıdır. Hücre dışı DNA (eDNA), hücre dışı polimerik madde (EPS), lipidler ve çoğu amiloid lifleri oluşturan proteinler, kimyasal olarak çeşitlilik gösteren bu matrisi oluşturur. Her bir bileşenin türü ve oranı bakteri türleri ve çevresel faktörler tarafından kontrol edilir (Hobley *et al.* 2015). Bu nedenle, farklı mikroorganizmalar için bakteriler,

arkealar ve tek hücreliler, kamçılılar, amipler, diatomlar ve tek hücreli algler gibi ökaryotlarda biyofilm üretimi ile çevresel zorluklardan korunur (Van Wolferen *et al.* 2018, Aguilera *et al.* 2007). Ayrıca, biyofilm büyümesi kaynak edinimini ve topluluk üyeleri arasındaki etkileşimleri kolaylaştırır (Flemming *et al.* 2016). Dünya genelinde yapılan son tahminler, prokaryotların %40-80'inin biyofilmlerde yaşadığını göstermektedir (Flemming and Wuertz 2019) (Şekil 2.6).



Şekil 2.6 Bakteriyel biyofilmler (Vasudevan 2014)

Mikrobiyal topluluğu oluşturan türler filogenetik olarak bağlantılı olabilir veya olmayabilir. Biyofilmler bir veya daha fazla katmandan oluşabilir. Biyofilm matrisleri içinde oluşan birçok eğim, bakterilerin metabolizmalarını belirli ortamı kolonize etmek için değiştirdiği mikronişler yaratır. Örneğin anaerobik bakteriler biyofilmin daha derin katmanlarında başlayacaktır. Ek olarak, pH, tehlikeli maddeler veya fiziksel hasar gibi çevresel zorluklara duyarlı mikrobiyal hücreler biyofilmin daha derin seviyelerinde yaşar. Biyofilm, mikroorganizmalar içinde "çoğunluk algılama" hücre-hücre sinyallemesini kolaylaştırır ve bu da onların gelişimini destekler (Schulze *et al.* 2021).

2.15.1 Biyofilmlerin önemi

Biyofilmleri ilk tanımlayan Zobell (1943) olmuştur; o zamandan bu yana, özellikle biyomedikal, gıda ve çevre alanlarında biyofilmlerle ilgili çeşitli endişeler ortaya çıkmıştır (Marques *et al.* 2007, Laird *et al.* 2012). *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* dahil olmak üzere tıbbi açıdan önemli birçok patojen bakterinin patogeneğinde biyofilm oluşumu patojenitelerinin önemli bir bileşenidir (Beloin *et al.* 2008, Gellatly and Hancock 2013, Gordon and Lowy 2008). Çok sayıda hastalık biyofilm enfeksiyonlarından kaynaklanır veya bu enfeksiyonlarla bağlantılıdır; Diş çürükleri (periodontitis), inatçı rino-sinüzit, inatçı tonsillit, inatçı osteomiyelit, inatçı peritonit, inatçı prostatit, inatçı yaralar, kistik fibroz, enfektif endokardit, tekrarlayan İYE'ler ve kan dolaşımı enfeksiyonları (KSE'ler) iyi bilinen bazı örneklerdir, Kalıcı tıbbi cihazlarla (periton kateterleri, rahim içi cihazlar, damar içi kateterler, idrar yolu kateterleri, kontakt lensler, kalp kapakçıkları, eklem protezleri ve diğer ortopedik implantlar gibi) bağlantılı enfeksiyonlar ve ventilasyonla ilişkili pnömoni (Vestby *et al.* 2020). Çoğu üropatojen biyofilm oluşturduğundan, bu özellik ile enfeksiyonun kalıcılığı ve tekrarlama arasında bir ilişki olabilir. Bu kapasite, güçlü bir bağışıklık sistemine ve az beslenmeye sahip bakterilerin bu tür zorlu koşullarda hayatta kalmasını sağlayabilir. Üropatojenler antimikrobiyallere karşı yüksek derecede direnç göstermektedir. Bu direnç, Jamal *et al.* (2018) tarafından bildirildiği üzere, içsel direnç veya biyofilm gelişimi gibi birçok mekanizmaya atfedilebilir. Tahminlere göre, biyofilmler insanlardaki tüm mikrobiyal hastalıkların %80'ine doğrudan neden olmaktadır (Davies 2003). Biyofilmlerin içindeki bakterilerin antibiyotiklere, dezenfektanlara, mekanik uzaklaştırmaya ve diğer stres faktörlerine karşı direnci yaklaşık bin kat daha fazladır ve bu direnç antimikrobiyal tedavilerin etkinliğini önemli ölçüde azaltır. Bu nedenle, tarım, gıda üretimi ve tıp gibi çeşitli endüstrilerde yaygın olan tekrarlayan biyofilm enfeksiyonları ve kontaminasyonlarından kaynaklanan birçok sorun ortaya çıkmaktadır (Høiby *et al.* 2011, Galié *et al.* 2018).

2.15.2 Biyofilm oluşumunun aşamaları

Jamal *et al.* (2018)'e göre, biyofilm üretiminde dört ana aşama yer almaktadır: hücre bağlanması, mikrokoloni oluşumu, biyofilm gelişimi ve son olarak biyofilmin dağılması.

Hücre bağlanması; Crozet *et al.* (2014)'e göre, biyofilm oluşturma'nın ilk adımı bakterilerin yüzeye tutunmasını içerir. Bir yüzeye yapışabilmek için organizmanın, yüzey tarafından oluşturulan itici kuvvetlere ve bakterinin sahip olduğu pasif membrana karşı koyabilmesi gerekir. Plastik gibi hidrofobik bir yüzey ile cam veya metal gibi hidrofilik bir yüzeyi karşılaştırdığımızda, hidrofobik yüzeyin daha düşük bir itme kuvvetine sahip olduğunu görürüz. İtici kuvvetlerdeki azalmaya bağlı olarak bağlanma gücünde bir artış söz konusudur. Palmer *et al.* (2007)'e göre, filamentler ve flagella bakteriyel membrana yapışma sürecinden sorumludur. Bağlanmanın ilk aşaması “tersinir bağlanma” olarak adlandırılır ve yapısal destek içerir. Bu aşamada, bakteriler yüzeye zayıf bir şekilde bağlanır ve onu terk edip planktonik yaşam tarzlarına geri dönme kabiliyetine sahiptir (Petrova and Sauer 2012). Yüzeyde kalan bakteriler için geri dönüşü olmayan bir bağlanma gerçekleşir. Bu, planktonik yaşam tarzından biyofilm yaşam tarzına geçiş için gerekli bir aşamadır. Pili ve flagellum sentezini kodlayan genlerin ekspresyonunda azalma olur. Bakteriyel membranın yüzey proteinleri, bakterilerin yüzeye yapışmasını desteklemekten sorumludur ve sonuçta geri dönüşü olmayan bir bağın oluşmasına yol açar. Rabin *et al.* (2015)'e göre, biyofilmler hem fiziksel kayma streslerine hem de ardından gelen güçlü kimyasallara dayanabilmektedir.

Mikrokoloni oluşumu; Hücre bölünmesinin ve hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) üretiminin başlaması, bakteri hücrelerinin yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanmasını takip eder (Armbruster and Parsek 2018). Flemming *et al.* (2007)'e göre, EPS'nin oluşturulması, bağlı hücreler için bir barınak görevi gören bir biyofilm matrisinin oluşmasına yol açar. EPS, yüzeylere hücre yapışması sürecinde yer alır ve sonuçta kalıcı bağlanmaya yol açar. Biyofilm matrisini oluşturan proteinlerin, hücrelerin birbirine yapışmasını kolaylaştıran yapışkan benzeri niteliklere sahip olduğu yakın zamanda doğrulanmıştır. EPS ayrıca bakteri hücrelerinde gözlemlenen hücresel kohezyon sürecinde de bir aracı görevi görmektedir. Bowen *et al.* (2018) biyofilm üretiminin ikinci

adımının birlikte organize olan küçük kolonilerin oluşumunu içerdiğini bulmuştur. Çoğu zaman, bir biyofilm birçok farklı türde küçük topluluktan oluşur ve bu topluluklarda kendi aralarında koordine olurlar. Jamal *et al.* (2018)'a göre koordinasyon, substratların değişimi, temel metabolitlerin dağılımı ve toksik bileşenlerin ortadan kaldırılması sürecinde hayati bir unsurdur (Şekil 2.6) (Vestby *et al.* 2020). Çoğu üropatojen biyofilm oluşturduğundan, bu özellik ile enfeksiyonun kalıcılığı ve nüksü arasında bir ilişki olabilir. Bu kapasite, güçlü bir bağışıklık sistemine ve az beslenmeye sahip bakterilerin bu tür zorlu koşullarda hayatta kalmasına izin verebilir. Patojenlerin antimikrobiyallere karşı yüksek direnç prevalansı vardır. Bu direnç, Jamal *et al.* (2018) tarafından bildirildiği üzere, içsel direnç veya biyofilm gelişimi gibi birçok mekanizmaya atfedilebilir. Tahminlere göre, biyofilmler insanlardaki tüm mikrobiyal hastalıkların %80'ine doğrudan neden olmaktadır (Davies 2003). Biyofilmlerin içindeki bakterilerin antibiyotiklere, dezenfektanlara, mekanik uzaklaştırmaya ve diğer stres faktörlerine karşı direnci yaklaşık bin kat daha fazladır ve bu direnç antimikrobiyal tedavilerin etkinliğini önemli ölçüde azaltır. Bu nedenle, tarım, gıda üretimi ve tıp gibi çeşitli endüstrilerde yaygın olan tekrarlayan biyofilm enfeksiyonları ve kontaminasyonlarından kaynaklanan birçok sorun ortaya çıkmaktadır (Høiby *et al.* 2011, Galié *et al.* 2018, Lamas *et al.* 2018).

2.16 Viral ve Bakteriye İlişkiler ve Solunum Sistemini İstila Etmedeki Roller

Mikroplar arasında iki tür ilişki vardır. Bunlar ya rekabetçi ya da negatiftir ki bu da aynı ortamda ya da yerde yaşayan iki organizma arasındaki ilişkiyi temsil eder. Daha sonra bağışıklık sistemi bu organizmalardan birini etkiler ya da biri diğerini avlar ya da simbiyotik ve ortakyaşar bir ilişkidir ya da pozitiftir ve iki farklı organizmanın varlığını temsil eder. Bir yerde, birbirlerinin bağışıklık sisteminden kaçmasına yardımcı olurlar, böylece bir arada var olabilirler (Grice and Segre 2014). Bu viral-bakteriyel ilişki, hücrelerin bakteriyel istilası aşamasının yanı sıra adezyon proteinlerindeki değişiklikler ve bağışıklık sisteminin bozulması, ayrıca kommensal bakterilerin savunma mekanizmalarını kaybetmesi gibi çeşitli aşamalardan geçer (Peters *et al.* 2019).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

Çalışmada kullanılan cihazlar Çizelge 3.1’de, aletler Çizelge 3.2’de, kimyasallar, reaktifler ve boyalar Çizelge 3.3’de, tanı kitleri Çizelge 3.4’te, moleküler çalışmada kullanılan kitler Çizelge 3.5’te, geleneksel PCR ve qPCR reaksiyonları için kullanılan primerler Çizelge 3.6’da gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz	Şirket	Ülke
Otoklav	YXQ.SO4 280A	Çin
Bunsen brülörü	Sharma scientific	Hindistan
Işık mikroskobu	Olympus (CX31)	Filipinler
Derin dondurucu	GFL	Almanya
Damıtıcı	GFL	Almanya
Elektrik fırın	Memmert	Almanya
ELISA okuyucu	BioTek	Kore
Kapüşon	Lab tech	Kore
Sıcak plaka manyetik karıştırıcı	VWR	Filipinler
İnkübatör	JRAD	Çin
Mikro santrifüj	Iso-Fuge 1424/QLS	İngiltere
Mikrodalga	LG	Kore
pH metre	Adwa	Macaristan
Buzdolabı	LG	Kore
Gerçek zamanlı PCR	Applied biosystems	Amerika
Hassas terazi	Sartorius	Almanya
Spektrofotometre	EMC LAB	Almanya
Termal döngüleyici	Applied biosystems	Amerika
VİTEK 2 kompakt sistem	bioMerieux	Fransa
Vorteks	Fanem	Brezilya

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan aletler

Alet	Şirket	Ülke
96 kuyucuklu Microtitterplak	Citotest	Çin
Pamuk Çubuklar	Biozek	Hollanda
Eppendorf tüpleri 1,5 mL	Merk	Almanya
Cam test tüpleri	BD BioScience	Amerika
Döngü	Himedia	Hindistan
Mikropipetler	Dragon lab	Çin
Eppendorf	Himedia	Almanya
Mikroskop kapak camı	Biozek	Hollanda

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kimyasallar, reaktifler ve boyalar

Öge	Şirket	Ülke
Agaroz	Biorad	İtalya
BaCl ₂	BDH	İngiltere
Borik asit	BDH	İngiltere
Kloroform	BDH	İngiltere
Kongo kırmızısı boyası	Fluka	İsviçre
Kristal menekşe boyası	Arcomex	Ürdün
(EDTA)	BDH	İngiltere
Etanol %100, %70	BDH	İngiltere
Formaldehit	BDH	İngiltere
Buzul asetik asit	BDH	İngiltere
Glyserol	BDH	İngiltere
Gram boyama kiti	Atomscientific	İngiltere
H ₂ SO ₄	BDH	İngiltere
Hidrojen peroksit	BDH	İngiltere
Kovac reaktifi	Himedia	Hindistan
Metil kırmızısı	BDH	İngiltere
Oksidaz reaktifi	BDH	İngiltere
Nükleaz içermeyen su	Transgen	Çin
Üre tozu	BDH	İngiltere

Çizelge 3.4 Çalışmada kullanılan tanı kitleri

Tanı kiti	Şirket	Ülke
API 20 E	BioMérieux	Fransa
API stafilokok	BioMérieux	Fransa
RBD-Kit	MyBioSource	Amerika
CRP kiti	Clona test	İspanya
ACE-2 Kiti	MyBioSource	Amerika
FASL kiti	MyBioSource	Amerika
İnsan interlökin 17 ELISA kiti	Cusabio	Amerika
TLR-2 ELISA Kiti	MyBioSource	Amerika
SARS-COV-2 IgG	Biomérieux	Fransa
SARS-COV-2 IgM	Biomérieux	Fransa
VITEK-2 GN kartı	Biomérieux	Fransa
VITEK-2 GP kartı	Biomérieux	Fransa

Çizelge 3.5 Moleküler çalışmada kullanılan kitler

Kit isim	Şirket	Ülke
2X Easy taq PCR süper karışımı	Transgen	Çin
AccuPower Green Star qPCR ön karışımı	Bioneer	Kore
AccuPower PCR Ön Karışımı	Bioneer	Kore
Easy Script Tek Adımlı gDNA çıkarma ve cDNA	Transgen	Çin
GoTaq® qPCR ana karışımı	Promega	Amerika
cDNA kiti	Sigma-Aldrich	Almanya

Çizelge 3.6 Geleneksel PCR ve qPCR reaksiyonları için kullanılan primerler

Geleneksel PCR için kullanılan primerler					
Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2; Betacoronavirüs; zarf proteini (E) geni					
Primer	Sekans (5'→3')	Şablon ipliği	Uzunluk	Tm	%GC
İleri primer	EYLEMCATTCGTTTCGGAAGAGACA	Artı	23	59,99	43,48
Ters primer	ÇAGATTTTAAACACGAGAGTAAACG	Eksi	25	57,03	36,00
Ürün uzunluğu	191				
Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2; Betacoronavirüs; nükleokapsid fosfoprotein (N) geni					
Primer	Sekans (5'→3')	Şablon ipliği	Uzunluk	Tm	GC %
İleri primer	AACACAAGCTTTCGGCAGAC	Artı	20	59,34	50,00
Ters primer	GCACCTGTGTAGGTCAACCA	Eksi	20	59,89	55,00
Ürün uzunluğu	198				
Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs 2; Betakoronavirüs; yüzey glikoprotein (S) geni					
Primer	Sekans (5'→3')	Şablon ipliği	Uzunluk	Tm	%GC
İleri primer	GTGACACTTGCAGATGCTGG	Artı	20	59,48	55,00
Ters primer	GCACCAAAGGTCCAACCAGA	Eksi	20	60,47	55,00
Ürün uzunluğu	194				
Şiddetli akut solunum yolu sendromu koronavirüs 2; Betakoronavirüs; House Keeping genleri					
Primer	Sekans (5'→3')	Şablon ipliği	Uzunluk	Tm	GC %
İleri primer	F:GTTTTGTAGTTTTTGAGTTAGTGTGTGT	Artı	20	59,48	55,00
Ters primer	R;CTCAACCTACAATCAAAAACAACACAAACA	Eksi	20	60,47	55,00
* Tüm primerler Macrogen/ Kore ve Bioneer/ Kore'den temin edilmiştir.					

3.2 Yöntemler

3.2.1 Sterilizasyon

A) Nemli sterilizasyon: On beş dakika boyunca tüm kültür ortamı 121°C'de ve 1,5 barda otoklavlanmıştır. Bu teknik kullanılarak cam tüpler, Eppendorf tüpleri ve mikropipet uçları sterilize edilmiştir.

B) Kuru sterilizasyon: İki saat boyunca her cam eşya 180°C'ye ayarlanmış bir fırında sterilize edilmiştir.

C) Filtrasyon: Çok sayıda çözeltiyi sterilize etmek için bir filtre ünitesi sistemi kullanılmıştır.

3.2.2 Hazırlık ile ilgili çözümler ve reaktifler

Çizelge 3.7'de bakteriyel inceleme için Leber (2016)'e göre oluşturulan çözeltiler ve reaktifler ile moleküler çalışma için Ahmadi *et al.* (2016)'ye göre oluşturulan çözeltiler ve tamponlar gösterilmektedir (EK 1).

Çizelge 3.7 Reaktiflerin ve çözeltilerin hazırlanması

Reaktif veya çözüm	Hazırlık yöntemi
Katalaz reaktifi	EK 2
Oksidaz-reaktifi	
Macfarland standart çözeltisi 0,5	
DNaz test reaktifi	
Fosfat tamponlu çözelti (PBS)	
Gram boyama kiti	
Hidrojen peroksit %3	
Hint mürekkebi	
Kovacs reaktifi	
Metil-kırmızı reaktif	
Voges-proskauer reaktifi	
Üre çözeltisi	

3.2.3 Kültür ortamının hazırlanması

Kültür ortamının hazırlanması için kullanılan besiyerler Çizelge 3.8’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.8 Kültür ortamının hazırlanması

Kültür ortamı	Referans
Kanlı agar besiyeri	(Alfred 2005)
MacConkey agar besiyeri	
Manitol tuzlu agar besiyeri	
Nutrient Agar Besiyeri	
Besin Suyu Ortamı	
Muller - Hinton Agar Besiyeri	
Eozin Metilen Mavisı Medium	(Atlas and Synder 2013)
Peptonlu Su Ortamı	
Metil kırmızı-voges proskaur ortamı (MR-VP)	
Kligler demir agar	
Kongo kırmızısı agar besiyeri	(Freeman <i>et al.</i> 1989)
DNaz agar ortamı	(Atlas 2006)
Simmons sitrat agar besiyeri	(Atlas 2006)
Üre Agar Besiyeri	(Atlas 2006)

3.3 Çalışma Tasarımı

Çalışma denekleri genel hastanelerden, izolasyon merkezlerinden ve enfekte hastalar için tanı merkezlerinden alınmıştır. Bu çalışmada, çalışma grupları hafif enfeksiyonu olan SARS hastaları, ağır ve orta derecede enfeksiyona bağlı primer akciğer hasarı olan hastalar ve sağlıklı olan kontrol grubu olmak üzere üç grupta toplanmıştır. Çalışmaya katılan kişilerden; demografik veriler, semptomlar, komorbidite öyküsü, beslenme alışkanlıkları, ilaç öyküsü, biyokimyasal raporlar ve SARS-CoV-2 klinik öyküsü, yaşı, cinsiyeti, enfeksiyon süresi, varsa kronik hastalık türü ve enfekte ve daha önce aşılanmış olup olmadığına ait bilgiler toplanmıştır. Çalışılan varyantların karşılaştırılması için düşünülen aşı tipleri, daha önce enfekte olmuş ve aşılanmamış hastalarla birlikte başka bir grup olarak bu tiplere göre değerlendirilmiştir. Daha ileri analizler için katılımcılardan kan örnekleri, nazofarengeal sürüntü örnekleri, ağız boşluğu sürüntü örnekleri ve balgam toplanmıştır. Hamile ve emziren kadınlar ile katılmak istemeyen hastalar araştırma çalışmasının dışında tutulmuştur.

3.3.1 Örnek toplama

Örnekler üç adımda toplanmıştır:

İlk aşama; Kan örneği işleme: Hastaların bulunduğu hastane laboratuvarının aspirasyon ünitesinde, tek kullanımlık enjektörler kullanılarak hastalardan sırayla 5 mL'lik taze aspire edilmiş venöz kan örnekleri alınmıştır. Her hastanın kanı alındıktan sonra ikiye bölünmüştür. Kanın ilk kısmı jel tüplerde 3000 rpm'de on dakika santrifüj edilerek serum ayrıştırılmış ve barkod ile etiketlenmiştir. Daha sonra, her numuneden 1/2 ile 1 mL serum (immünolojik belirteçler RBD, ACE-2, Fasl, TLR-2 CRP, IgG ve IgM için) çıkarılmış, düz bir tüpe konulduktan sonra etiketlenmiş ve derin dondurucuda saklanmıştır.

İkinci aşama; Klinik örnekler, özel Viral sürüntü kullanılarak viral vektör içeren steril kaplarda, 5 mL taşıyıcı ortam içeren VTM tüplerinde toplanmıştır. Viral yüklerinin değerini belirlemek için virüsün yapısal proteinlerinin genlerini hedef alan RNA'yı çıkaran ve cDNA'ya dönüştüren PCR testi yapıldıktan sonra analiz edilmek üzere -70°C'de 5 günden fazla saklanmıştır (örneklerin uzun süreli saklanması).

Üçüncü aşama; Bakteriyel sürüntülerin işlenmesi: Bakteriyel sürüntüler, üst ve alt solunum yollarının birden fazla bölgesinden toplanmış, kültürlenmiş, teşhis edilmiş ve çeşitli yöntemler kullanılarak antibiyotik duyarlılığı, virülans ve biyofilm testleri için test edilmiş ve özel sürüntüler kullanılarak mikrobiyolojik inceleme için bir taşıyıcı ortam içeren steril kaplarda toplanan diğer klinik örneklerle karşılaştırılmıştır. Örneklerin tamamı steril cam kaplarda bir ortamda (nutrient broth) üretilmiş, 24 saat inkübe edilmiş ve daha sonra bir ortama (kanlı agar) taşınarak planlı bir şekilde üretilmiştir. Mikrobiyal kültürler 24 saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmiştir. Saflaştırma işleminden sonra, izolatlar bir nutrient agar eğimine aktarılmış ve bir süre inkübe edilmiştir. Tanısal testlerde kullanılabilecek kadar buzdolabında 4 santigrat derece sıcaklıkta tutulmuştur. Hastaların balgam örnekleri sabahın erken saatlerinde alınmış ve steril vidalı geniş ağızlı kaplara konulmuştur. Örnekler daha sonra kanlı, çikolatalı ve MacConkey agarda büyütülmüş ve bir gün boyunca 35-37°C'de tutulmuştur. Viral örnekleri yakalamak için VTM tüplerinde beş mililitre taşıyıcı ortam kullanılmıştır. Viral yükü ve toplanmayı

değerlendirmek için, RNA'nın çıkarılmasını ve cDNA'ya dönüştürülmesini içeren ve virüsün yapısal proteinlerinin genlerine odaklanan PCR testi gerçekleştirilmiştir. Hastanın balgam örnekleri steril vidalı kapaklı geniş ağızlı kaplarda alınmıştır. Mikrobiyal patojen daha sonra 37°C'de tam bir gün boyunca kanlı agar, çikolatalı agar ve MacConkey agar üzerinde kültür yoluyla tanımlanmıştır.

3.3.2 Klinik veriler

Anketler aracılığıyla yaş, cinsiyet, hastalık şiddeti (hafif ve ağır vakalar) ve diğer faktörlere ilişkin veriler doğrudan hastalardan veya yakınlarından toplanmıştır.

Dahil edilme kriterleri: COVID-19'u yüksek oranda gösteren klinik bulguları olan tüm hastalar dahil edilmiştir. Pozitif bir PCR testinden sonra, hastanın doktoru COVID-19 tanısını koymuş ve bu tanı daha ileri kan testleriyle doğrulanmıştır.

Hariç tutulma kriterleri:

- RT-PCR testi negatif olan tüm hastalar.
- Hamile hastalar
- Bilinen bağışıklık bozukluğu olan hastalar (otoimmün hastalık, immün yetmezlik).
- Steroid veya immünomodülatör tedavi verilen hastalar.

Etik konular: Etik açıdan bakıldığında, araştırma gruplarını seçmeden ve veri toplamadan önce Genel Hastane Tıbbi Laboratuvarlar Bölümü'nden izin alınmıştır. Salahaddin Sağlık Müdürlüğü tesislerinde çalışma izni ve iş akışını izlemek için hastaneye uygulama deneyimi olan bir süpervizör atanmıştır. Ayrıca, her hastanenin laboratuvar bölümünden, laboratuvara karşılık gelen immünoloji biriminde çalışmak için izin ve onay alınmıştır. Hastalardan alınan kan örneklerini, ya takip rejiminin bir parçası olarak (yatan hasta) ya da COVID-19 tanısını taramak veya doğrulamak amacıyla kimyasal veya serolojik testler yapmak için kullanılmıştır.

3.4 Bakteriyel Çalışma

3.4.1 Bakteriyel tanılama

A) Morfolojik ve mikroskopik tanılama: Koloninin şekli, boyutu, rengi, kenarları ve yüksekliği kaydedildikten sonra, ayrılan bakteriler Gram boyandı ve 100X ışık mikroskobu altında görüntülenmiştir (Wanger *et al.* 2017, Levinson 2018).

B) Biyokimyasal reaksiyonlar: Tüm biyokimyasal analizler, Leber (2016) ve Alfred (2005) tarafından belirtildiği gibi, 18 ile 24 saatlik bir süre boyunca yeni kurulan koloniler üzerinde gerçekleştirilmiştir.

C) Novobiosin disk difüzyon yöntemi: Koagülaz-negatif stafilokoklar, antibiyotik duyarlılık testi ile aynı protokol kullanılarak 30 µg novobiosin diskinde duyarlılık açısından test edilmiştir (aşağıda açıklanmıştır). Antibiyotik duyarlılığı 16 mm'den büyük bir inhibisyon zonu ile gösterilir (Alfred 2005). Koagülaz-negatif stafilokoklar, antibiyotik duyarlılık testiyle (aşağıda açıklanmıştır) aynı protokol kullanılarak 30 µg novobiosin diske karşı duyarlılık açısından test edilmiştir. Antibiyotik duyarlılığı, 16 mm'den büyük bir inhibisyon bölgesi ile gösterilir (Alfred 2005).

3.4.2 Stok kültürünün korunması

Forbes *et al.* (2007)'e göre, izolatlar düzenli olarak nutrient agar plaklarına ekilmiş, günlük kullanım için 4°C'de tutulmuş ve ayda bir alt kültüre alınmıştır. Alfred (2005)'e göre, bakteri izolatları dondurulmuş stok kültürler olarak %20 gliserol içinde -20°C'de laboratuvarda muhafaza edilmiştir.

3.4.3 VITEK2 kompakt sistemi ile manuel tanımlamanın onaylanması

Renk değişiklikleri, floresan ve antimikrobiyal duyarlılık testleri yoluyla, son derece otomatik VITEK 2 kompakt sistemi (bioMerieux, Fransa), numuneleri hızlı bir şekilde

tanımlamak için 64 kuyucuklu bir konfigürasyonda mikrolitre miktarlarda antibiyotik ve biyokimyasal test ortamı içeren plastik reaktif kartları kullanır. Tekrarlanan türbidimetrik izleme kullanılarak, yöntem kısaltılmış inkübasyon süresi içinde bakteriyel büyümeyi bulur (Reller *et al.* 2009).

Süspansiyonun hazırlanması: Steril bir fırça veya aplikatör kullanılarak, yeterli sayıda saf kültür kolonisi aktarılmış ve 12x75 mm'lik şeffaf bir plastik test tüpünde 3,0 mL steril salin (sulu %0,9 NaCl, pH 4,5-7,0) içinde süspanse edilmiştir. Bulanıklık ölçülmüş ve DensiChek bulanıklık ölçer kullanılarak 0,5-0,63'e ayarlanmıştır. Daha sonra, spesifik bir reaktif kartı kullanılarak (biri Gram-negatif bakteriler ve diğeri Gram-pozitif bakteriler için olmak üzere iki çeşit kullanılmıştır), süspansiyon tüpü cihazın içine yerleştirilmiştir.

3.5 Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (Disk Difüzyon Yöntemi)

Bu testi yürütmek için Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü ve Bahador *et al.* (2019) tarafından sağlanan kılavuzlara uygun olarak Kirby-Bauer tekniği kullanılmıştır. Wilson *et al.* (2015) disk difüzyon tekniğini modifiye Kirby-Bauer yöntemine uygun olarak yürütmüştür. Saf bakteri izolatları seçilip %0,9'luk tuzlu su çözeltisine aşılandıktan sonra, bakterilerin büyüme aktivitesi et suyunda bulanıklık aranarak izlenmiştir. Çoğu bakteri için 3 ila 5 saatlik bir inkübasyon süresi gereklidir. Daha sonra, süspansiyonu kültüre etmeden önce, bakteri süspansiyonunun bulanıklığı $1,5 \times 10^8$ CFU/mL ile karşılaştırılabilir olan 0,5 McFarland standardı ile karşılaştırılmıştır (Tille 2015). Duyarlılık testi bir Mueller-Hinton plakası kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sterilize edilmiş pamuklu çubuklar bakteri süspansiyonuna daldırılmış ve ardından inokulumun tüm yüzeye eşit olarak dağılmasını sağlamak için plakanın yüzeyine üç kez sürülmüştür. Son olarak, antibiyotik diskleri plakanın yüzeyine (merkezler arasında en az 24 mm olacak şekilde) yerleştirilmiş ve verilerin okunmasını çarpıtabilecek nem birikimini önlemek için baş aşağı inkübe edilmiştir. Steril bir forseps veya iğne ucu kullanılarak yedi antibiyotik diski plakaya en uygun şekilde yerleştirilmiş ve disklerin ortamın yüzeyiyle tam temas ettiğinden emin olmak için hafifçe itilmiştir. (35-37)°C'de bir gecelik inkübasyon süresinin ardından, inhibisyon bölgesi genişliği milimetre cinsinden bir cetvelle ölçülmüş ve CLSI tarafından belirlenen standart inhibisyon bölgesi ile

karşılaştırılmak üzere Çizelge 3.5'te gösterildiği gibi kaydedilmiştir (Goldman and Green 2015).

3.6 API testi

3.6.1 API 20E testi

Enterobacteriaceae ve diğer oksidaz-pozitif ve oksidaz-negatif bağırsak bakterileri analitik profil indeks test şeritleri kullanılarak tanımlanabilir. Tek şeritteki her bir kuyu toz haline getirilmiş dehidre besiyerinden yapılır ve plastik şeride tutturulur (Ball 1997). Organizma, API 20E testinin verdiği yedi basamaklı biyotip numarası kullanılarak tanımlanabilir. Daha önce de belirtildiği gibi, API 20E testi bu çalışmada daha önce biyokimyasal testler kullanılarak tanımlanmış olan bakteri izolatlarının kimliğini ve türünü doğrulamak için kullanılmıştır. Süreç, üretici firmanın yönergelerine uygun olarak aşağıdaki şekilde tamamlanmıştır:

API 20E şeridindeki biyokimyasal test ikinci bir oksidaz testi ile tamamlanmıştır.

- Tek bir saf koloniden steril distile su ile bir süspansiyon oluşturulmuş ve 0,5 McFarland standart çözeltisi ile karşılaştırılmıştır.
- Pastör pipeti kullanılarak, API 20E şeridinin 20 kuyucuğu, tamamen bakteri süspansiyonu ile doldurulan GEL, VP ve CIT hariç, duvarın kenarına kadar bakteri süspansiyonu ile doldurulmuştur.
- Anaerobik koşulların oluşturulması için LDC, ADH, H₂S, ODC ve URE kuyucuklarına 2 damla mineral yağ eklenmiştir.
- Tepsiyeye birkaç damla su eklenmiş ve API 20E şeridi yerleştirilmiştir.
- Daha sonra (35-37)°C'de 24 saat inkübe edilmiştir.
- İnkübasyondan sonra şerit okunmuştur, bazı kuyucuklarda renk değişmiş ve hemen okunmuştur. Ancak
- TDA kuyucuğuna bir damla triptofan deaminaz (TDA reaktifi) eklenmiştir, kahverengi bir renk oluşması pozitif sonucu temsil eder.

- IND kuyucuğuna bir damla Kovac reaktifi eklenmiştir, kırmızı bir halkanın gelişmesi pozitif sonuç olarak kabul edilir.
- Bir damla %40 KOH (VP1 reaktifi) ve bir damla α -naftol (VP2 reaktifi) sırasıyla VP kuyucuğuna eklenmiş ve on dakika bekletilmiştir.
- Şerit tanımlama, belirli bir API 20E kağıdı üzerinde renk tablosu (okuma skalaları) okunarak ve pozitif ve negatif sonuçlar işaretlenerek gerçekleştirilmiştir. Puanlar verilmiş ve Kuyular siyah üçgenlerle üçlü olarak işaretlenmiştir. Her üçlü için sadece pozitif kuyu skorları eklenmiştir. Üç test reaksiyonu birleştirilerek yedi basamaklı bir sayı üretilir ve bu sayı kod kitabında kontrol edilebilir (Mahon and Lehman 2022).

3.6.2 API *Staphylococcus* testi

Bu teknik, *Staphylococcus* türlerini tanımlamak ve ayırt etmek için üretilen işletme talimatlarına uygun olarak kullanılmıştır. Biyokimyasal test için bu sistem, kurutulmuş besiyeri içeren bir dizi kuyudan oluşmaktadır. Bu kuyucuklara 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu ekilmiş ve ardından 35-37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından, kuyucukların renkleri ya kendiliğinden ya da belirli kimyasallar eklendiğinde değişmiştir. Pozitif ve negatif testlerin sonuçları birleştirilerek profil numarası oluşturuldu ve bakteri türünü doğru bir şekilde tanımlamak için kod kitabındaki profil numarasıyla karşılaştırıldı. API staph için adımlar API 20E için olanlarla aynıdır, ancak aşağıdaki ek reaktifler farklıdır:

Nit 1 ve Nit 2 reaktiflerinin her birinden bir damla kuyuya uygulanmış ve sonuçlar bundan sonra on dakika boyunca okunmamıştır.

- ZYM kuyucuğuna sırasıyla bir damla ZYM A reaktifi ve bir damla ZYM B reaktifi eklenmiş, ardından sonuçların okunması için 10 dakika beklenmiştir.
- VP kuyucuğuna bir damla VP1 reaktifi ve bir damla VP2 reaktifi eklenmiş, sonuç 10 dakika sonra okunmuştur.

3.7 Biyofilm Oluşumunun Tespiti

A) Kongo kırmızı agar (CRA) yöntemi

Kültürler bakteri suşu ile takviye edilmiş CRA plakalarına yerleştirilmiş ve 24 saat boyunca 37°C'de inkübe edilmiştir. 24 ve 48 saatlik büyümeden sonra CRA plakası embriyo rengini izlemek için incelenmiştir. Siyah koloniler içeren flanşlar genel olarak kabul edilebilir bulgularken, biyofilm oluşumu olmayan flanş kırmızısı koloniler ve siyahtan kırmızıya renk değişimi biyofilm oluşumunun çok az olduğunu veya hiç olmadığını göstermiştir. Kongo kırmızısı boyası ile etkileşime giren polisakkaritlerin çoğu hemen reaksiyona girerek renkli kompleksler veya ikincil ürünler oluşturduğundan, koyu renkli kolonilerin kolor atılımı büyük ölçüde desteklenmektedir (Jain and Agarwal 2009).

B) Mikrotitre plakası (MTP) yöntemi

MTP deneyi olarak bilinen en yaygın kullanılan deney, biyofilm gelişimini tanımlamak için standart bir test olarak kabul edilmektedir. Deney Christensen *et al.* (1985) tarafından sağlanan yönergelere uygun olarak gerçekleştirilmiştir, ancak O'Toole and Kolter (1998) inkübasyon süresinin 24 saate uzatıldığını bildirmiştir. Bakteri izolatları 1:200 oranında seyreltilmiş ve %1 glikoz içeren besleyici et suyunda 37°C'de 24 saat kültürlendikten sonra mikro-titer plakalara (96 düztabanlı kuyucuklu mikro-titer plaka) enjekte edilmiştir. Kuyucuklar PBS tamponu kullanılarak iki kez temizlenmiş ve bir gün sonra kurumaya bırakılmıştır. Ardından, %0,4 kristal viyole solüsyonu uygulanmış ve leke olarak işlev görmesi için 10 dakika bekletilmiştir. Bunu takiben, plakalar sterilize edilmiş distile su ile temizlenmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Bağlı bakterileri ölçmek için daha sonra %70 etanol eklenmiştir. Absorbans 490 nm'de belirlendikten ve her bir numunenin absorbansı boş numuneden çıkarıldıktan sonra, 490 nm>0,12 OD biyofilm oluşturan numune olarak kabul edilmiştir (Namvar *et al.* 2013). Bulgular optik yoğunluğa (OD 490 nm) göre şu şekilde sınıflandırılmıştır: negatif (biyofilm oluşturmayan), zayıf, orta ve güçlü biyofilm oluşturanlar (Gad *et al.* 2009): Hiç yok veya hafif, orta (0,12-0,24), güçlü ($\geq 0,240$).

3.8 Virölans Faktörünün Tespiti

3.8.1 Hemolizin üretimi

Kültür plakası 35-37°C'de 24 saat inkübe edildikten sonra, hemolizin sentezi kanlı agarda bakteri kolonilerinin etrafında net bir bölge olarak görülmüştür (Richards *et al.* 2015).

3.8.2 Kapsül üretimi

Hint mürekkebi kullanılarak kapsül üretimi gösterilmiştir. Bu testi gerçekleştirmek için bir damla Hint mürekkebi cam bir lamın yüzeyine uygulandı. Daha sonra, bakteri kolonisinin bir kısmı lama eklenmiş, mürekkeple karıştırılmış ve ışık mikroskobu altında görülmeden önce bir kapak lamı ile kapatılmıştır. Kapsülün varlığı, bakterinin etrafında şeffaf bir halenin ortaya çıkmasıyla anlaşılmaktadır (McPherson 2017).

3.8.3 Lipaz ve lesitinaz enzim üretimi

Bakteri kolonilerinin yumurta sarısı (%15) ile desteklenmiş besin agarına aşılması ve ardından 35-37 santigrat derecede 24-48 saat inkübe edilmesiyle bu enzimler tespit edilmiştir. Kolonileri çevreleyen ve besiyeri boyunca uzanan beyaz, opak dağınık bir bölgenin gelişmesi lesitinaz sentezinin varlığını göstermiştir. Lipazı tespit etmek için aynı plakaya 20 dakika boyunca %20 CuSO₄.7H₂O eklenmiştir. Fazla çözelti daha sonra atılmış ve plaka 30 dakika boyunca bir kez daha inkübe edilmiştir. Olumlu bir sonuç, büyüyen alanın mavimsi-yeşil renk geliştirmesidir (Koneman *et al.* 2006).

3.8.4 Proteaz üretimi

Bu enzimin mevcut olup olmadığını tespit etmek için bakteri kolonileri yağsız süt agarı üzerinde büyütülmüş ve 35 ile 37 santigrat derecede 24 ile 48 saat inkübe edilmiştir. Bakterinin proteolitik aktivitesini gösteren umut verici bir sonuç, bakteri kolonilerinin etrafında temiz bir bölge oluşmasıdır (McPherson 2017).

3.8.5 DNaz üretimi

Bunu göstermek için, bakteri kolonileri %0,005 metil yeşili içeren DNase agar üzerine aşılınmış ve ardından (35-37)°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Kolonilerin etrafında nükleazın etkisini gösteren net bir bölgenin oluşması olumlu bir sonuca işaret etmiştir (Goldman and Green 2015).

3.8.6 Üreaz üretimi

Bakteri izolatları bir üre agar tüpüne saplandıktan sonra, tüp 35-37 santigrat derecede 24-72 saat inkübe edilmiştir. Cesaret verici bir sonuç pembe rengin büyümesiydi (Goldman and Green 2015).

3.9 Serolojik Parametreler

3.9.1 Antikor testleri

Antikor testleri hastalardan alınan kan örneklerinde Architect i2000 SR cihazında (Abbott, Illinois, ABD), SARS-CoV-2 IgM ve SARS-CoV-2 IgG için kemilüminesans mikropartikül immünoassay (CMIA) yöntemi (Abbott, İrlanda) kullanılarak yapılmıştır. Çalışma aşağıdaki şekilde yapılmıştır:

- Hastalardan alınan kan örnekleri en geç 2 saat içinde laboratuvara gönderilmiştir.
- Örnekler 4000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek serum elde edilmiştir.
- Örnekler ve pozitif/negatif kontroller Architect i2000 SR cihazına yüklenmiştir.
- Sonuçlar, daha önce cihaz belleğinde saklanan üç kalibratör replikasıdan [Örnek (S)/Kesme (C)] elde edilen kalibratör ortalama sinyaline bölünmüştür.
- Hasta sonuçları varsayılan sonuç birimi endeksi (S/C) cinsinden sunulmuştur.
- SARS-CoV-2 IgM için kesme değeri ≥ 1 indeks, SARS-CoV-2 IgG için kesme değeri İndeksi (S/C) $\geq 1,4$ olanlar “pozitif” olarak kabul edilmiştir.

- SARS-CoV-2 IgM için kesme değeri <1 indeks, SARS-CoV-2 IgG için kesme değeri İndeksi (S/C) <1,4 olanlar “negatif” olarak kabul edilmiştir.

3.9.2 İnsan (TLR-2, ACE-2, RBD, FASL) tespiti

ELISA yöntemi kullanılarak, araştırma katılımcılarının serumunda insan TLR-2, ACE-2, RBD ve FASL seviyeleri bulunmuştur.

A) Test içeriği: Bu test kantitatif sandviç yöntemini kullanır Mikroplaka, ELISA, TLR-2, ACE-2, RBD ve FASL-spesifik antikor ile önceden kaplanmıştır. Örnekler ve standartlar daha sonra mevcut TLR-2, ACE-2, RBD ve FASL'yi bağlayan sınırlı antikoru içeren mikroplaka kuyularına pipetlenmiştir. Daha sonra, bağlanmamış element kuyucuklardan çıkarılmış ve TLR-2, ACE-2, RBD ve FASL'ye özgü biyotin-konjuge antikor eklenmiştir. Avidin-konjuge horseradish peroksidaz ilavesinin ardından, kuyucuklar artık, bağlanmamış avidin-enzim reaktifinden kurtulmak için bir kez daha temizlenmiştir. Substrat çözeltisi mikroplaka kuyularına eklendikten sonra nihayet bir renk ortaya çıktı. Rengin yoğunluğu, ilk aşamada bağlanan TLR-2, ACE-2, RBD ve FASL miktarına dayanmaktadır. Rengin gelişimi durdurulmuş ve yoğunluğu ölçülmüştür.

B) Kit bileşenleri: Bu çalışmada immünolojik seviyeyi tahmin etmek için kullanılan ELISA kiti bileşenleri Çizelge 3.9'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.9 ELISA kiti bileşenleri

Öge	Miktar
Deneme plaka (12x8 kaplanmış Mikrokuyular)	1 (96 kuyu)
Biyotin-antikor	1 adet 120 µL
HRP-avidin	1 adet 120 µL
Biyotin-antikor Seyreltici	1 X 15 mL
HRP-avidin Seyreltici	1 X 15 mL
Örnek Seyreltici	1 X 50 mL
Yıkama Tamponu	1 X 20 mL
TMB Alt Tabakası	1 X 10 mL
Durdurma solüsyonu	1 X 10 mL
Şerit	4

C) Kullanıma hazır çözümler:

- Biotin-antikor seyreltici
- HRP-avidin seyreltici
- Numune seyreltici
- TMB substratı ve durdurma çözeltisi

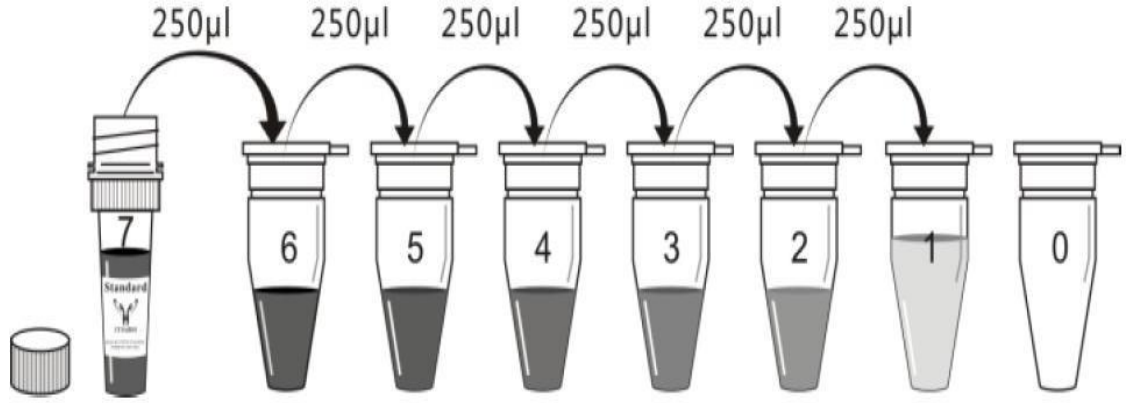
D) Solüsyon hazırlığı:

Biotin-antikor: Flakon açılmadan önce santrifüjlenmiş ve antikoru seyreltmek için 990 μ L Biotin antikor seyrelticiğine 10 μ L Biotin-antikor eklenmiştir.

HRP-avidin: flakon da santrifüjlenmiş ve her 10 μ L HRP-avidin için 990 μ L HRP-antikor seyrelticiği kullanılarak seyreltilmiştir.

Yıkama tamponu: Konsantre içinde oluşabilecek kristalleri çözmek için oda sıcaklığına kadar ısıtıldıktan sonra hafifçe karıştırıldı. 500 mililitre distile su, yıkama tamponunu seyreltmek için 20 mililitre yıkama tamponu konsantrasyonu ile karıştırıldı.

Standart: Flakon 6,000-10,000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra 400 pg/mL stok çözelti oluşturmak için üzerine 1 mililitre numune seyreltici eklenmiştir. Standardı hafifçe karıştırdıktan ve en az 15 dakika dinlendirdikten sonra, standardın tamamen sulandığını doğrulamak için her bir kuyucuğa (S0 ile S6) 250 μ L örnek seyreltici pipetlenmiştir. Daha sonra stok çözelti kullanılarak 2 kat seyreltme serisi oluşturulmuştur. Şekil 3.1'de görüldüğü gibi, numune seyrelticiği sıfır standart (0 pg/mL) ve seyreltilmemiş standart (400 pg/mL) yüksek standart olarak işlev görmektedir.



Şekil 3.1 Serolojik parametrelerin standart seyreltilmesi

E) Prosedür: Belirtildiği gibi, çalışma standartları, reaktifler ve numuneler hazırlanmıştır. Her bir kuyucuğa 100 µL standart ve 100 µL numune eklenmiş, sağlanan yapışkan şeritle kaplanmış ve 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra her bir kuyucuğa 100 µL biyotin antikoru uygulanmıştır. Kuyucukları yeni bir yapışkan şeritle kapatın ve 37°C'de 1 saat inkübe edin. Bir fişkırtma şişesindeki yıkama tamponu her bir kuyucuğu doldurmak için kullanıldı, 2 dakika bekletildi ve ardından tamponu çıkarmak için plakayı ters çevirip kuru bir kağıt havluya kuruladı. Kuyucuklara 100 µL HRP-avidin ekleyin, yapışkan şeritle örtün ve 37°C'de 1 saat inkübe edin. Kuyuları beş kez aspire edin ve yıkayın. Kuyucuklara 90 µL TMB substratı ekleyin ve ışık olmadan 37°C'de 15-30 dakika inkübe edin. Reaksiyonu durdurmak için kuyucuklara 50 µL durdurma çözeltisi ekleyin. Kuyucukların optik yoğunluğu 450 nm mikroparka okuyucu kullanılarak 5 dakika içinde ölçülmüştür.

3.9.3 CRP'nin tahmini

Prensibi: Kaplanmış lateks partiküllerinin anti-insan CRP'ye karşı sayımda aglütinasyonu; serum CRP. CRP konsantrasyonu lateks partiküllerinin aglütinasyonu ile doğru orantılıdır ve 570 nm'de fotometrik olarak bulanıklık ile okunur.

Kit bileşenleri: Bu çalışmada CRP seviyelerini tahmin etmek için kullanılan kit bileşenleri Çizelge 3.10'da gösterilmiştir.

Çizelge 3.10 CRP'nin kit bileşenleri

Reaktif	Kompozisyon
Reaktif 1	Glisin tamponu ($\leq 0,12$ mol/L), Sodyum azid ($\leq 0,99$ g/L), pH 8,6
Reaktif 2	Antikor ile kaplanmış lateks partiküllerinin süspansiyonu

Prosedür: Test protokolü manuel olarak girilmiş ve cihaz yazılım sisteminde saklanmıştır. Reaktifler (R1 ve R2) reaktif tepsinine yerleştirildikten sonra, bu reaktiflere ilişkin bilgiler cihaz yazılım sistemine otomatik olarak girilmiştir. Hastalar, verileri ve numune konumlarıyla birlikte cihaz yazılım sistemine manuel olarak girilmiştir.

3.9.4 İnsan SARS-COV-2 IgM ve insan SARS-COV-2 IgG tespiti

Test Prensipleri: Test, iki aşamalı bir sandviç enzim immunoassay yaklaşımı ve sonuçta floresan saptama kullanır. Tek kullanımlık katı faz haznesi (SPR) katı fazın yanı sıra pipetleme aletini de tutar. Önceden dağıtılmış ve kullanıma hazır tek kullanımlık, mühürlü reaktif şeritleri reaktifleri içerir. Her test adımı cihaz tarafından otomatik olarak gerçekleştirilir. SPR cihazı, reaksiyon ortamını tekrar tekrar içeri ve dışarı döndürür. IgM, numune seyreltme aşamasından sonra SPR cihazı duvarının içine kaplanan rekombinant viral antijen tarafından yakalanır. IgM, bir sonraki adımda alkalın fosfataz ile etiketlenmiş anti-insan IgM kullanılarak seçici olarak tanımlanır. Son tespit aşamasında, tek bir substrat SPR cihazının içine ve dışına çevrilir. Konjugat enzimi bu substratı hidrolize ederek 450 nm dalga boyunda floresan bir ürün oluşturur. Floresanın yoğunluğu numunede bulunan antikor miktarı ile doğrudan ilişkilidir. Deneyin tamamlanmasının ardından cihaz, bellekte saklanan S1 standardını kullanarak sonuçları otomatik olarak hesaplar ve bir test değeri üretir.

Test yöntemi:

- Kullanmadan önce tüm kit bileşenleri ve SPR poşeti oda sıcaklığına getirilmiştir.
- Test edilen her numune kontrolü veya standardı için bir strip ve bir SPR cihazı kullanılmıştır.

- Test, cihaz üzerindeki 9COM kodu ile tanımlanır.
- Standart ve kontrol vorteks tipi bir karıştırıcı kullanılarak karıştırılmıştır.
- Pipetlemeden önce numunelerde, standartlarda ve kontrollerde kabarcık olmamalıdır.
- Standart, kontrol ve numune hacimleri 100 µL'dir.
- SPR cihazları ve şeritler cihaza yerleştirilmiştir.
- Test, kılavuzda belirtildiği şekilde başlatılmıştır.

3.10 Moleküler Çalışma

3.10.1 Toplam RNA ekstraksiyonu

3.10.1.1 Lizis adımları

- 200 µL numuneyi 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpüne aktarılır.
- Numuneye 400 µL VB Lizis tamponu ekleyin ve vorteksle karıştırılır.
- Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edilir.
- Taşıma ortamında muhafaza edilen nazofarengeal ve orofarengeal sürüntü örnekleri için VTM, UTM ve PBS gibi ortamlardan 200 µL'yi 1,5 mL'lik bir tüpe aktarılır.
- Numuneye 400 µL VB Lizis tamponu eklenir ve ardından vorteksle karıştırılır.

3.10.1.2 Nükleik asit bağlama

- Örnek lizatına 450 µL AD tamponu (etanol eklendiğinden emin olun) eklenir.
- Karıştırmak için tüpü kuvvetlice çalkalanır.
- Bir VB kolonunu 2 mL'lik bir toplama tüpüne yerleştirilir.
- Lizat karışımının 600 µL'sini VB kolonuna aktarılır.
- 14-16,000 x g'de 1 dakika santrifüjlenir.
- Akış suyunu atın, ardından VB Kolonunu 2 mL'lik tüpe geri yerleştirilir.
- Kalan karışımı VB kolonuna aktarılır.
- 14-16,000 x g'de 1 dakika santrifüjlenir.
- Akış suyunu içeren 2 mL toplama tüpü atılır.

- VB Kolonunu yeni bir 2 mL toplama tüpüne aktarılır.

3.10.1.3 Yıkama

- VB kolonuna 400 µL W1 Tamponu eklenir ve ardından 14-16,000 x g'de 30 dakika santrifüjlenir.
- Akış suyunu atın, ardından VB Kolonunu 2 mL'lik Tüpe geri yerleştirilir.
- VB kolonuna 600 µL Yıkama Tamponu (etanol eklendiğinden emin olun) eklenir.
- 14-16,000 x g'de 30 saniye santrifüjlenir.
- Akış suyunu atın ve VB kolonunu tekrar 2 mL'lik tüpe yerleştirilir.
- Kolon matrisini kurutmak için 14-16,000 x g'de 3 dakika santrifüjlenir.

3.10.1.4 Nükleik asit elüsyonu

- Kurutulmuş VB kolonunu temiz bir 1,5 mL mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilir.
- VB kolon matrisinin merkezine 50 µL RNaz içermeyen su eklenir.
- RNaz içermeyen suyun matris tarafından emildiğinden emin olmak için en az 3 dakika bekletilir.

3.10.2 RNA'nın cDNA'ya dönüştürülmesi

Basit bir senaryo gDNA'nın çıkarılmasıyla cDNA'nın tek adımlı sentezi RNA'yı karşılık gelen DNA formuna dönüştürmek ve kalan genomik DNA'yı çıkarmak için Süper Karışım kullanıldı. Bu adımların ardından kullanıma hazır bir süper karışım oluşturulmuştur:

- 10 µL ankrajlı oligo (dt)ler
- 10 µL rastgele primer
- 100 µL easy script RT/RI enzim karışımı
- 10 µL gDNA sökücü

Üretici tarafından sağlanan yönergelerle göre, prosedür 20 µL'lik bir reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. Bu da her numune için 14 µL süper karışım ve 6 µL numune RNA'sı eklendiği anlamına gelmektedir. Bundan sonra, karışım Çizelge 3.11'de gösterilen protokole uygun olarak geleneksel bir PCR termal döngüleyiciden geçirilmiştir. Elde edilen cDNA daha sonra ihtiyaç duyulana kadar -20°C'de derin dondurucuda saklanmıştır.

Çizelge 3.11 cDNA sentezi için PCR programı

	Adım 1	Adım 2	Adım 3	Adım 4
Sıcaklık	25°C	42°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	15 dakika	5 saniye	Tutma

3.11 Kantitatif Gerçek Zamanlı PCR Testi (RT-qPCR)

Reaksiyon için primerler belirtilen PCR karışımı bileşenleri ve programları Çizelge 3.12 ve Çizelge 3.13'te gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.12 qPCR ana karışımı ve premiks reaksiyonlarının bileşimi

Master karışım bileşenleri (Qigene)	Hacim	Ön karışımın bileşenleri (Bioneer)	Hacim
Ana karışım	10 µL	Ön karışım	10 µL
İleri primer	1 µL	İleri primer	1 µL
Ters primer	1 µL	Ters primer	1 µL
cDNA şablonu	6-8 µL	cDNA şablonu	6-8 µL
Nükleaz içermeyen su	20 µL	Nükleaz içermeyen su	20 µL

Çizelge 3.13 qPCR programı

Adım	Durum	Döngü
Ön-Denatürasyon	94°C/1-5 dakika	1
Denatürasyon	94°C/5-20 saniye	40-45
Tavlama/Uzatma	60°C/40-45 saniye	
Algılama (Tarama)		
Erime eğrisi	-	1

3.11.1 Gen ifadesinin gerçek zamanlı RT-qPCR analizi

Farklı örnekler arasında transkript seviyelerinin karşılaştırılmasında $2^{-\Delta\Delta C_t}$ yöntemi kullanılmıştır (Livak and Schmittgen 2001). Hedef genin C_t 'si housekeeping (dahili kontrol) genine normalize edilmiştir. İlgili gen ile dahili kontrol geni arasındaki döngü eşiği (C_t) değerlerindeki farkı belirlemek için Denklem (3.1) ve Denklem (3.2) kullanılmıştır:

$$\Delta C_t (\text{Test (semaglutid ile muamele edilmiş)}) = \text{İlgili } C_t \text{ geni} - C_t \text{ dahili kontrol} \quad (3.1)$$

$$\Delta C_t (\text{kalibratör (işlenmemiş)}) = \text{İlgili } C_t \text{ geni (hedef)} - C_t \text{ dahili kontrol} \quad (3.2)$$

Test numunelerinin ΔC_t 'si kalibratörün C_t 'sine normalize edilmiştir.

C_t , Denklem (3.3)'e göre hesaplanmıştır:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{test}) - \Delta C_t (\text{kalibratör}) \quad (3.3)$$

Sonunda, ifade oranı $2^{-\Delta\Delta C_t}$ = Normalize edilmiş ifade ortalamaları formülü kullanılarak belirlenmiş ve verilerin yüzdeleri rapor edilmiştir. Bağlı gen ifadesi verileri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ tekniği (Livak yöntemi) kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. SPSS v.23 yazılımı (IBM Corp., ABD) kullanılarak, istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) veya veri gruplamasına dayalı T-testi ile belirlenmiştir. Bir olasılık değeri 0,05'ten küçükse ($p < 0,05$) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.12 İstatistiksel Analiz

Verileri temsil etmek için ortalamalar ve yüzdeler kullanılmıştır. Göreceli gen ifadesi verileri $2^{-\Delta\Delta C_t}$ tekniği (Livak yöntemi) kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir. SPSS v.23 yazılımı (IBM Corp., ABD) kullanılarak, istatistiksel anlamlılık tek yönlü varyans analizi (ANOVA) veya veri gruplamasına dayalı T-testi ile belirlendi.

İstatistiksel anlamlılık 0,05'ten küçük olasılık değerleri olarak tanımlanmıştır ($p<0,05$). SPSS (sürüm 28) ve Microsoft Office Excel 2010 gibi istatistiksel yazılımlar, ortalama ortalamaları karşılaştırmak ve P değerinde (0,05) test analizi (F testi) kullanarak verileri analiz etmek için kullanılmıştır. Al Rawi (2000) de korelasyonların bu programlar kullanılarak yapıldığını bildirmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Aralık 2019'da COVID-19 dünya çapında hızla yayılmaya başlamış, halk sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturmuş ve hem iş dünyası hem de toplum üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olmuştur. Bu araştırmada, ateş ve üst veya alt solunum yolu semptomları ile başvuran ve tümü RT-PCR ile SARS-CoV-2 enfeksiyonu olarak doğrulanan bireyler tanımlanmıştır. Şiddetli vakalar alt solunum yolu hastalığı (pnömoni) bildirirken, daha hafif olanlar üst solunum yolu enfeksiyonlarından şikayetçidir. Viral yük miktarı, yaş ve eşlik eden hastalıkların tümü hastalığın ne kadar şiddetli olduğunu etkilemiştir (Xu *et al.* 2020, Huang *et al.* 2020, Wang *et al.* 2020).

4.1 Çalışma Grubu Tasarımı

Bu çalışmada, çalışma grupları hafif enfeksiyonu olan SARS hastaları, virüsle ağır ve orta derecede enfeksiyona bağlı primer akciğer hasarı olan hastalar ve bir grup sağlıklı denek olarak ayrılmıştır. Farklı yaşlarda olmak üzere şu bilgiler elde edilecektir: hastanın yaşı, cinsiyeti, enfeksiyon süresi, varsa kronik hastalık türü ve enfekte ve daha önce aşılanmış hastalar. Çalışılan varyantların karşılaştırılması için düşünülen aşı tipleri, daha önce enfekte olmuş ve aşılanmamış hastalarla birlikte başka bir grup olarak bu tiplere göre değerlendirilmiştir. Daha ileri analizler için katılımcılardan kan örnekleri, nazofarengeal sürüntü örnekleri, ağız boşluğu sürüntü örnekleri ve balgam toplanmıştır. Hamile ve emziren kadınlar ile katılmak istemeyen hastalar araştırma çalışmasının dışında tutulmuştur. Çalışma popülasyonundan demografik veriler, semptomlar, komorbidite öyküsü, beslenme alışkanlıkları, ilaç öyküsü, biyokimyasal raporlar ve SARS-CoV-2'nin klinik öyküsü toplanmıştır.

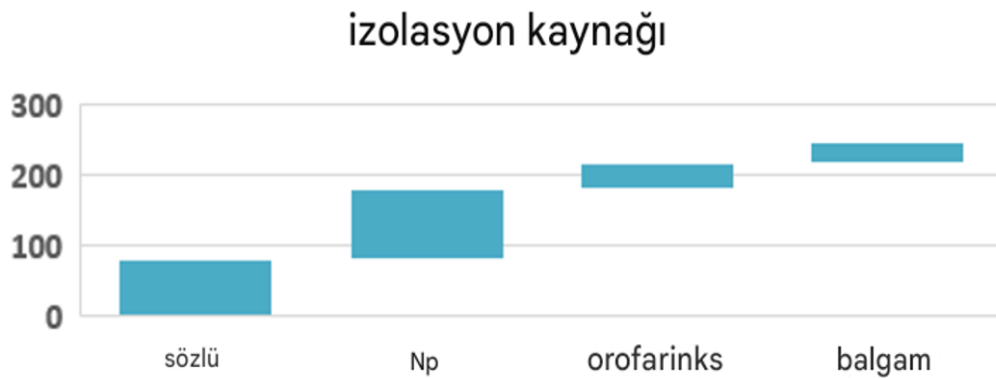
4.2 Örneklerin Dağılımı

Bu dönemde sırasıyla Samarra ve Tikrit'teki Samarra Genel Hastanesi ve Saladin Hastanesi ile Bağdat ve diğer vilayetlerdeki çeşitli polikliniklere başvuran COVID-19 hastalarından toplam 240 nazofarengeal sürüntü, orofarengeal sürüntü ve balgam örneği

toplanmıştır. Kasım 2022'den Aralık ayına kadar. Koronavirüs ile 2023'ün başında, serolojik testler (IgG, IgM) ve moleküler RT-PCR yoluyla, (%68) patojenik bir bakteri olarak COVID-2 ile ikincil bir enfeksiyon ve (%35) fırsatçı bir enfeksiyon olarak doğrulanmıştır. Hastalarda semptomlar hafif ile orta arasında değişmiştir. Diğer 66 hasta ise şiddetli semptomlardan şikayetçi olarak hastaneye başvurmuştur. Bu çalışmanın enfeksiyon prevalansı, Irak'ta daha önce yapılan iki çalışmadan daha düşüktür: Al Amin *et al.* (2021) COVID-19 hastalarının %70'inde ve De Bruijn *et al.* (2022) ikincil bakteriyel pnömoni tespit etmiştir. Vakaların %64,9'u Belçika'da kaydedilmiştir; bununla birlikte, bu çalışmanın insidans oranı Mahmoudi (2020) tarafından İran'da yürütülen araştırmadan daha yüksektir. De Bruijn *et al.* (2022), enfeksiyon bölgelerinden toplanan sürüntü örneklerinin türüne göre, örnekleri ve sayılarını Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi İspanya geneline dağıtmıştır (Şekil 4.1).

Çizelge 4.1 Örnek sayısı ve izolasyon yüzdesi

İzolasyon kaynağı	Büyüme	Büyüme	Toplam
Ağız boşluğu	79	10	89
Nazofarenks	99	22	121
Boğaz +orofarenks	35	13	48
Balgam	33	19	52



Şekil 4.1 Örnek türüne göre SARS-Cov-2 şiddetinin dağılımı

4.3 Epidemiyoloji

4.3.1 SARS-Cov-2 şiddetinin yaşa göre dağılımı

Araştırma bulguları, COVID-19 hastaları arasında ≥ 50 yaş grubunun en yüksek sekonder bakteriyel pnömoni prevalansına (%26,02) sahip olduğunu ve bunu 40-50 yaş (%20,73), 30-40 yaş (%20,13) ve 20-30 yaş (%19,51) gruplarının izlediğini göstermektedir. En düşük sekonder bakteriyel pnömoni prevalansı ≤ 20 yaş grubunda bildirilmiştir (%13,11). COVID-19 hastalarında sekonder bakteriyel pnömoninin yaş gruplarına göre dağılımı Şekil 4.2'de gösterilmektedir.



Şekil 4.2 Yaş a göre SARS-Cov-2 şiddetinin dağılımı

İlk yaş grubu (≥ 20 -50) oral kaviteden izole edilmiştir, yaş yüzdeleri %32,11'dir. İkinci yaş grubunda nazofarenks izole edilmiştir, yaş yüzdesi %40,24'tür. Üçüncü yaş grubunda balgam izole edilmiştir, yaş yüzdesi %11,38'dir. Dördüncü yaş grubu orofarinks izolasyonu olup yaş yüzdesi %16,26'dır. Yaş grupları ayrıca Çizelge 4.2'de gösterilen farklı yaş evrelerine göre ayrıntılı olarak bölünmüştür. Yakın zamanda yayınlanan benzer verilerde olduğu gibi, yaş ile hastalık şiddeti arasında anlamlı bir ilişki vardı ve yaşlı hasta daha duyarlıydı (Jin *et al.* 2020, Hou *et al.* 2020). Hastalığı kesmek için, Wang *et al.* (2020b) tarafından bildirildiği gibi, ileri yaş grubunda ölüm oranı bile daha yüksektir. Bunun açıklaması, yaşlı hastalarda komorbidite nedeniyle bağışıklığın azalması, daha

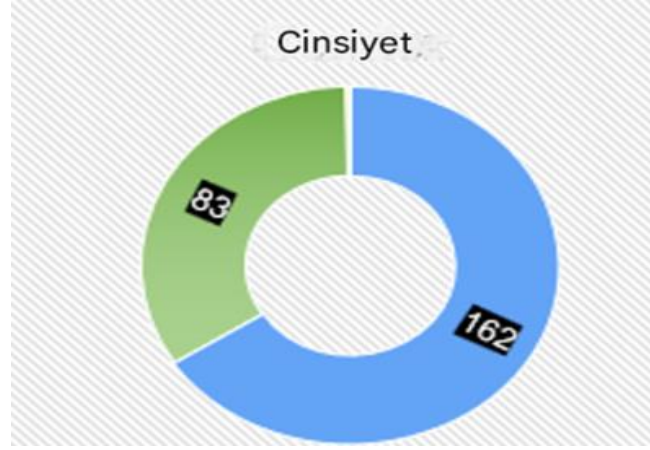
şiddetli hastalığa ve daha geniş komplikasyonlara yol açmasıdır, Ji *et al.* (2020), kadın ve erkek hastalar arasında yaş dağılımında önemli bir fark olmadığını kabul etti.

Çizelge 4.2 Yaş gruplarına göre SARS-Cov-2 gruplarının demografik dağılımı

Yaş (yıl)	Toplam=		Ağız boşluğu		Nazofarenks		Balgam		Orofarenks	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
≤20	32	13,01	10	12,66	7	7,07	1	5,57	35	14
21-30	48	19,51	16	20,25	20	20,20	2	7,14	25	10
31-40	50	20,33	18	40	13	38,24	23	43,4	15	6
40-50	51	20,73	14	17,72	23	23,23	9	32,1	12,05	5
50-70	64	26,02	18	22,78	30	30,30	12	30,0	10	4

4.3.2 SARS-Cov-2 şiddetinin cinsiyete göre dağılımı

Araştırmamızın bulguları, erkeklerin SARS-COV-2 enfeksiyonuna yakalanma olasılığının kadınlardan biraz daha yüksek olduğunu göstermektedir (%65,85'e karşı %31,44). Bu bulgular, erkeklerin kadınlardan daha duyarlı olabileceği teorisini desteklemektedir. SARS-COV-2 hastalarında enfeksiyonun cinsiyete göre dağılımı Şekil 4.3'de gösterilmiştir.



Şekil 4.3 Cinsiyete göre SARS-Cov-2 şiddeti dağılımı

Bu bulgu, erkeklerin kadınlara kıyasla daha ağır vakalar geliştirme olasılığının daha yüksek olduğu gözlemimizle tutarlıdır ve sağlık hizmetlerine başvuru süresindeki cinsiyet farklılıkları, hastaneye yatış gerektiren COVID-19'lu erkeklerin artan oranını açıklayabilir, ancak bu örneklemede Cinsiyet ve hastalık şiddeti arasında bir ilişki olmamasına rağmen, erkek cinsiyeti hastalık şiddeti için bir risk faktörü olmaya devam etmektedir. Yoğun bakım ünitesinde bakılma olasılıkları kadınlara göre üç kat daha fazladır; bunun nedeni testisler tarafından salgılanan testosteronun bağışıklık sistemini baskılayıcı, kadınlarda bulunan östrojenin ise bağışıklık sistemini güçlendirici etkiye sahip olması olabilir. Genel olarak, insidans oranı eşitti ve bu da (Jin *et al.* 2020, Hou *et al.* 2020) tarafından kabul edildi (Çizelge 4.3).

Çizelge 4.3 SARS-Cov-2 grupları arasında kadın ve erkek sıklığı

Kadın		Erkek		Toplam izole		İzolasyon kaynağı
%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	
%34,2	26	%32,9	51	%12,5	29	Ağız boşluğu
%19,3	30	%40	62	%52,3	121	Nazofarenks
%6,4	10	%14,8	23	%15,1	35	Orofarenks
%6,4	10	%12,9	20	%19,9	46	Balgam
	76		155		231	Toplam
ns Pearson Ki-Kare=0,230 P-Değeri=0,973						

4.4 Klinik Özellik

Hastalığın başlangıcında farklı COVID-19 endikasyonları ve semptomları ortaya çıkmaktadır. Mevcut araştırmaya göre, ateş, baş ağrısı ve öksürük COVID-19 hastaları tarafından bildirilen en yaygın klinik şikayetlerdir. Hastalığın başlangıcının birinci ve ikinci haftalarında, hastalığın çeşitli evrelerinde ateş görülmüştür. Orta ve şiddetli COVID-19 hastalığı olanlar, daha hafif semptomları olanlara göre daha sık nefes darlığı yaşadıklarını bildirmiştir. Hafif ve orta derecede hasta olarak sınıflandırılan hastalar arasında şiddetli olanlara kıyasla en yaygın iki semptom yorgunluk ve kas ağrısıdır. Şiddetli hastalardaki ana semptomlardan biri göğüs rahatsızlığıydı. Tüm hastalar arasında boğaz ağrısı ve bulantı, kusma veya ishal gibi gastrointestinal semptomlar daha az sıklıkta görülmüştür. Tat ve koku kaybı, özellikle daha az şiddetli vakalarda sıklıkla bildirilmiştir.

4.4.1 SARS-Cov-2'nin şiddeti

SARS-CoV-2 vakalarının çoğunda ağız boşluğunda 23 (%29,11) ağır hastalık görülmüş, bunu sırasıyla 29 (%36,71) hafif ve 9 (%11,39) zayıf hastalık izlemiştir. Buna karşılık, nazofarenks durumunda sırasıyla 17 (%17,17), 54 (%54,55), 16 (%16,16) şiddetli, hafif ve zayıf hastalık gözlemledik. Buna karşılık, orofarenks durumunda sırasıyla 16 (%45,71), 9 (%25,71), 4 (%11,43) şiddetli, hafif ve zayıf hastalık gözlemledik, balgamda izole edilen oral kavite durumunda 10 (%30,30) şiddetli hastalık gözlemlendi, bunu sırasıyla 13 (%45,45) ve 6 (%18,18) hafif ve zayıf hastalık takip etti. Hastalık şiddeti yaş ve malign komorbiditeler ile anlamlı derecede ilişkiliydi. Şiddetli hastalık her bireyde görülebilmesine rağmen, ileri yaş ve tıbbi komorbiditeleri olan hastalar arasında daha belirgindir (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4 SARS-Cov-2 grubunda SARS-Cov-2'nin sıklık şiddeti

İzolasyon kaynağı	Toplam		Hafif		Akut		Zayıf		Yok	
	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
Ağız boşluğu	29	32,11	29	36,71	20	29,11	9	11,39	17	22,78
Nazofarenks	121	40,24	49	54,55	15	17,17	14	16,16	12	13,13
Orofarenks	35	14,23	9	25,71	16	45,71	4	11,43	6	25,71
Balgam	46	13,41	13	45,45	10	15,20	6	18,18	4	12,12
Toplam	231	%100	100	%100	60	%100	33	%100	39	%100

*
Pearson Ki-Kare=18,952 P-Değeri=0,026

4.5 Bakteriyolojik Çalışma

4.5.1 Bakteriyel izolasyonun prevalansı

Bakteri izolasyonu için balgam, nazofarenks, ağız boşluğu ve orofarenks örnekleri kullanılmıştır. Koloniler besiyeri, mikroskopik, makroskopik, kültürel karakteristik ve biyokimyasal testlerden geçirilmiştir. Vitek-2 testleri kullanılarak tür düzeyinde tanımlama doğrulandı. Mevcut araştırmada çok sayıda bakteri türü tespit edilmiştir ve isolatların büyük kısmı bakteriyeldir. Bakterilerin %63,41'i Gram-pozitif, %41,87'si ise Gram-negatiftir (Çizelge 4.5) (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.5 Gram Pozitif bakteri

İzolasyon kaynağı	Bakteriler	İzolasyon sayısı	%	Toplam	%
Ağız boşluğu	<i>Staphylococcus aureus</i>	14	9,8	19	19,7
Nazofarenks	<i>Fusobacterium</i>	5	3,5		
Orofarenks	<i>H. influenzae</i>	3	2,1	34	35,41
Balgam	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	31	21,7		
Ağız boşluğu	<i>Streptococcus pyogenes</i>	17	11,8	26	27,8
Nazofarenks	<i>H.influenzae</i>	8	5,6		
orofarenks	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	4,2	18	18,75
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	2,1		
	<i>H. influenzae</i>	9	6,3		
(Toplam)		96		96	
**					
Ki-Kare=26,284 P-Değeri=0,0008					

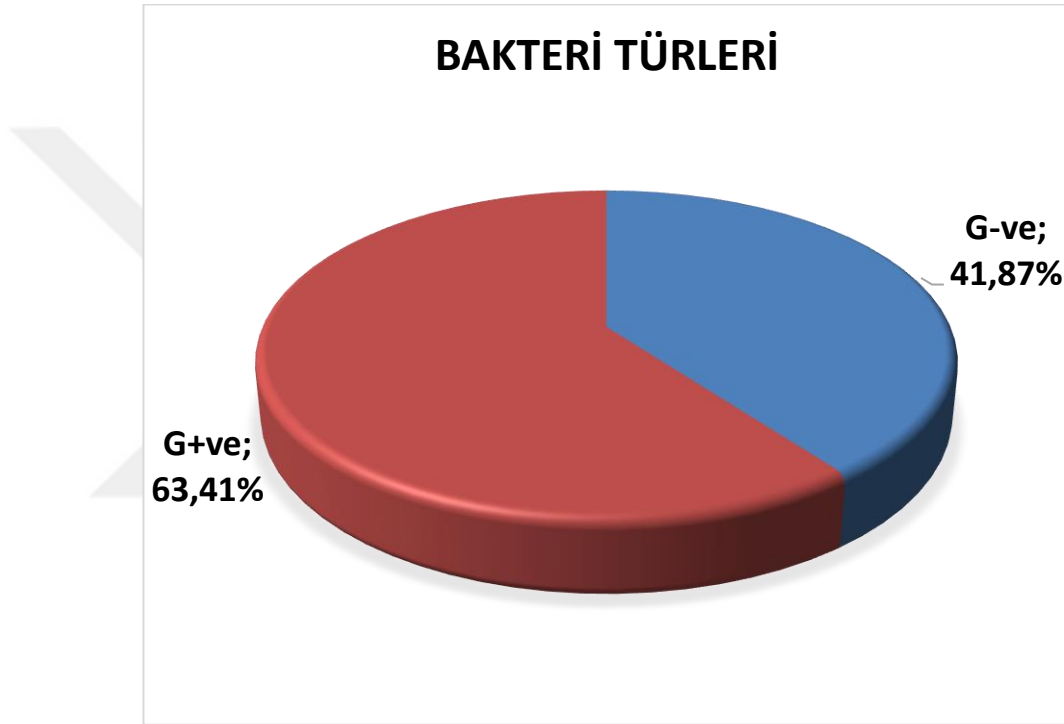
Çizelge 4.6 Gram Negatif bakteriler

İzolasyon kaynağı	Bakteriler	İzolasyon sayısı	%	Toplam	%
Ağız boşluğu	<i>K.pneumoniae</i>	4	3	10	7,40
	<i>K.oxytoca</i>	6	4,4		
Nazofarenks	<i>K.pneumoniae</i>	27	20	87	64,40
	<i>K.oxytoca</i>	9	6,7		
	<i>A. baumannii</i>	8	5,9		
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	20	14,8		
	<i>M.catarrhalis</i>	13	9,6		

	<i>Lactococcus lactis</i>	10	7,4		
Orofarenks	<i>M.catarrhalis</i>	10	7,4	10	7,4
Balgam	<i>M. tuberculosis</i>	11	8,1		20,7
	<i>M.catarrhalis</i>	6	4,4	28	
	<i>E. coli</i>	3	2,2		
	<i>Pseudomonas aeruognosa</i>	8	5,9		
Toplam		135	100	135	100
**					
Ki-Kare=51,267 P-Değeri=0,00002					

Viral solunum yolu enfeksiyonları genellikle diğer mikroorganizmaların varlığını da içerir. Altta yatan çeşitli faktörler tanı zorluğuna, olumsuz prognoza, yüksek morbidite ve mortalite oranlarına ve sağlık bakım kaynaklarının kullanımının artmasına katkıda bulunur. İlişkili bakteriyel enfeksiyonlar ya hasta hastaneye kabul edilmeden önce (toplum kaynaklı) ya da hastalığın ilerlemesini zorlaştıran ikincil bir enfeksiyon olarak (hastane kaynaklı) ortaya çıkabilir. Gözlemsel çalışmamızda, hastalarda laboratuvarca doğrulanmış bakteriyel ko-enfeksiyon insidansının daha yüksek olduğunu tespit ettik. Çalışmamızın ikinci döneminde bakteriyel enfeksiyonların daha yüksek oranda görülmesi, hastaneye kabul kriterlerinin değiştirilmesine bağlanabilir. Özellikle, bu dönemde, hastane yönetimi gerektiren ciddi tıbbi komorbiditeleri olan hastalar giderek daha fazla kabul edilirken, asemptomatik veya hafif semptomları olan ve ikinci virüs enfeksiyonu dalgasının yayılması nedeniyle evde tedavi edilen hastalar için örnekler toplanmıştır. Bu sonuç, SARS-CoV-2'nin şiddetinin sonraki bakteriyel enfeksiyonların oluşumunu doğrudan etkilediğini öne süren Fu *et al.* (2020)'nin bulgularını desteklemektedir. Şiddetli SARS-CoV-2 enfeksiyonunun bir sonucu olarak akciğerlerin gaz halindeki oksijen ve karbondioksit alışverişi yeteneği azalır, bu da desidual ve yüzey hücrelerine zarar verir ve bu da birçok besinin bronşlara geçmesine izin vererek bakterilerin büyümesini büyük ölçüde artırır (Zhang *et al.* 2020b). Viral enfeksiyon üzerine, kirpikli hücreler de dahil olmak üzere üst ve alt solunum yolu boyunca bulunan doku hücreleri hasar görür ve bu nedenle mukustan kurtulmak zordur, bu da bakterilerin müesine yapışmasını kolaylaştırır ve böylece ikincil bakteriyel enfeksiyon olarak adlandırılan şeye neden olur (Grasselli *et al.* 2020). Bağışıklık sistemi ile ilişkisi nedeniyle ikincil bakteriyel enfeksiyon ile enfeksiyon olasılığı artar. Sitokin fırtınasından sonra bağışıklık tepkisi yavaşlar ve bu dengesiz tepki önemli ikincil bakteriyel enfeksiyonla sonuçlanır (Zhang *et al.* 2020b). Fu *et al.* (2020) tarafından, vücudun diğer

bölgelerini etkileyen ciddi enfeksiyonlara neden olan yaygın ve aşırı bağışıklık tepkisinin bir sonucu olarak SARS-CoV-2 hastaları arasında ikincil bakteriyel enfeksiyonların oluşumunda varyasyon olduğu gösterilmiştir ve çalışmamızın bir parçası olarak, bu çalışma için toplanan örneklerin miktarı ve kalitesi aracılığıyla üst ve alt solunum yollarının çeşitli konumlarına göre varyasyon türünü belirlememizi sağlayan farklı teşhis yöntemleri kullanarak ikincil enfeksiyonda varyasyon türünü belirlemeyi düşünüyoruz (Şekil 4.4).

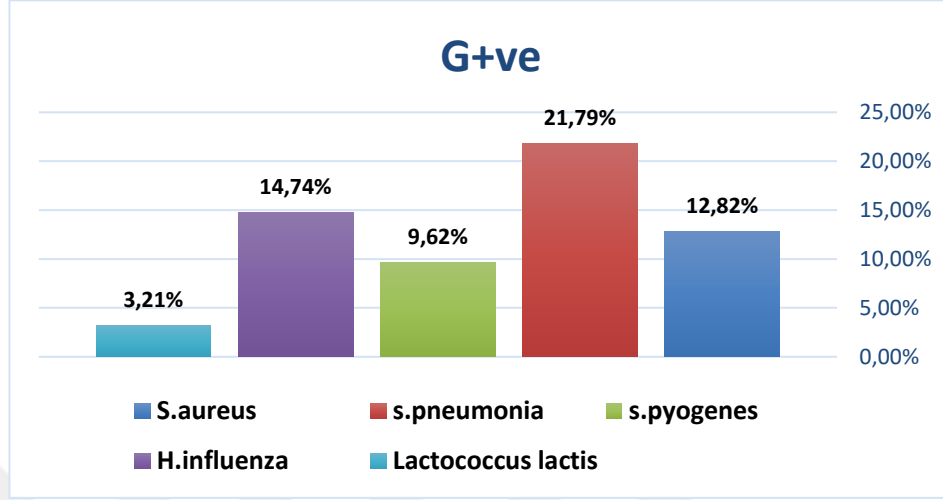


Şekil 4.4 Bakteri tiplerinin dağılımı

4.5.2 Gram pozitif bakterilerin yaygınlığı

Çalışmamızda toplanan örneklerin türü ve sayısı ile önceki araştırmalar, SARS-COV-2 hastalarında sekonder bakteriyel enfeksiyon insidansındaki farklılığı açıklamak için düşünülmüştür. Çalışmamızın sonuçları, sekonder bakteriyel enfeksiyon yüzdesinin Gram pozitif (%63,41) olduğunu ve bu enfeksiyon oranlarının çalışma örneklerinin izolasyon kaynaklarına göre değiştiğini göstermiştir. Çalışmamızda toplanan örneklerin türü ve sayısı ile önceki araştırmalar, SARS-COV-2 hastalarında sekonder bakteriyel

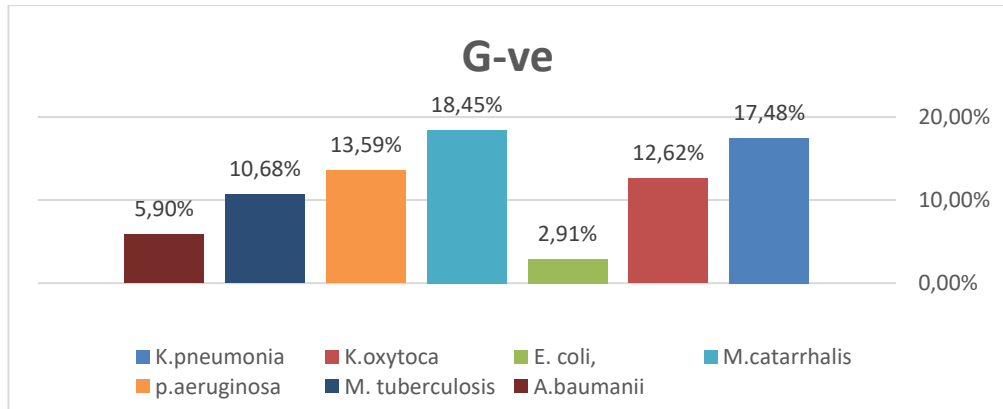
enfeksiyon insidansındaki farklılığı açıklamak için düşünülmüştür. Bu enfeksiyonun yüzdesi, çalışma örneklerinin izolasyon kaynaklarına bağlı olarak değişmiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 Gram pozitif bakteri izolatlarının yüzdesi

4.5.3 Gram negatif bakterilerin yaygınlığı

Çalışmamızın sonuçları sekonder bakteriyel enfeksiyonların Gram-negatif olma oranının %63,41 olduğunu ve bu enfeksiyon oranlarının çalışma örneklerinin izolasyon kaynaklarına göre değiştiğini göstermiştir. Çalışmamızda toplanan örnek türü ve sayısı ile daha önce yapılan araştırmalar SARS-COV-2 hastalarında sekonder bakteriyel enfeksiyon görülme sıklığındaki farklılığı açıklamak için dikkate alınmıştır: *K. pneumonia* (%18,45), *M. catarrhalis* (%17,48), *P. aeruginosa* (%13,59), *K. oxytoca* (%12,62), *M. tuberculosis* (%10,68), *A. baumani* (%5,90), *E. coli* (%2,91) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 Gram negatif bakteri izolatlarının yüzdesi

Her numune üzerinde mikroskopik analiz yapılmıştır. Etkenin belirlenmesi amacıyla, solunum yolu enfeksiyonu geçirdiğinden şüphelenilenlerin kan ve MacConkey agar kültürleri yapılmıştır. Şekil, boyut ve Gram boyası ile etkileşimi ayırt etmek için önce Gram boyama uygulanmıştır. İzolatların 106'sı (%41,87) gram-negatif ve geri kalan 156'sı (%63,41) gram-pozitif. Gram boyama bulgularına dayanarak biyokimyasal analizler yapılmış ve sonuçlar Jorgensen and Pfaller (2015) ile Mahon and Lehman (2022) sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Düşük üreme gösterenler ve kontamine olduğu düşünülenler ileri incelemeden elendiğinden yalnızca 182 örnek analiz edilmiştir. Gram-pozitif (GP) ve Gram-negatif (GN) tanımlama kartları, manuel biyokimyasal testleri desteklemek üzere tanımlamayı kolaylaştırmak için VITEK2 sistemine bağlanmıştır. De Bruyn *et al.* (2022), sekonder bakteriyel pnömoni hastaların kültürlerinde en sık bulunan patojen türünün Gram-negatif bakteriler olduğunu ve örneklerin %82'sini oluşturduğunu göstermiştir. Bu sonuçlar mevcut araştırma ile tutarlıdır. Ayrıca, Dudoignon *et al.* (2021)'a göre, Gram-negatif bakteriler bakteriyel izolatların %85,7'sini oluşturmaktadır. Hayatı tehdit eden en yaygın enfeksiyon olarak kabul edilen hastane kaynaklı pnömoniye çoğunlukla Gram-negatif bakteriler neden olur ve çoğu durumda mekanik ventilasyonla ilişkilidir. Dudoignon *et al.* (2021) araştırmasına göre, ikincil bakteriyel pnömoniye neden olan patojenlerin %47,40'ını Gram-pozitif mikroorganizmalar, %52,59'unu ise Gram-negatif mikroorganizmalar oluşturmaktadır.

4.6 İzolasyon Bakterilerinin Tanımlanması

4.6.1 VITEK2 kompakt sistemi ile manuel tanımlamanın onaylanması

Otomatik VITEK 2 kompakt sistemi (bioMérieux, Fransa), 64 kuyu formatında <1 µL biyokimyasal test ortamı ve antibiyotik içeren plastik reaktif kartları kullanarak numuneleri renk değişiklikleri, floresan ve antimikrobiyal duyarlılık testi ile tanımlar. Yöntem, tekrarlanan türbidimetrik izleme kullanarak kısaltılmış inkübasyon süresinden daha kısa sürede bakteriyel büyümeyi tespit eder (Reller *et al.* 2009).

Süspansiyonun hazırlanması: Şeffaf bir 12x75mm plastik test tüpünde, steril bir fırça kullanılarak aktarılan yeterli sayıda saf kültür kolonisini süspanse etmek için 3,0 mL steril salin (sulu %0,9 NaCl, pH 4,5-7,0) kullanılmıştır. Belirli bir reaktif kartı kullanılarak, bulanıklık DensiChek bulanıklık ölçer kullanılarak 0,5-0,63'e ayarlanmıştır (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7 Morfolojik ve mikroskopik tanılama ile ilgili izole edilmiş bakteriler

İzole edilmiş bakteriler	Kültürel özellikler				Dış görünüş
	MacConky	Kan	Çikolata	Mannitol	Karakteristik
<i>K. oxytoca</i>	Pembe, mukuslu	Grimsi ile Beyaz mukus	Grimsi ile Beyaz mukus	-	Tek veya çift kısa çubuklar
<i>E. coli</i>	Pembe, parlak değil	Grimsi ile Beyaz mukus	Grimsi ile Beyaz mukus	-	Tek veya çift kısa çubuklar
<i>P. aeruginosa</i>	Soluk koloniler	Gri, β-Hemoliz (bazı gerilmek)	Grimsi yeşilimsi kolonilere	-	Tek veya çift kısa çubuklar
<i>A. baumannii</i>	Soluk sarı, mukuslu	Grimsi ile beyaz koloniler	Grimsi beyaz koloniler	-	Tek veya çift kısa çubuklar
<i>S. aureus</i>	-	Beyaz koloniler β-ile Hemoliz	Beyaz koloniler	Altın sarı	Tek, çift veya kümelenmiş, küçük koklar
<i>K. pneumoniae</i>	büyük dairesel koloni şekli, konveks yükselti, mukuslu, gri, fermentasyon, Gama hemoliz	Laktoz fermentasyonu nedeniyle mukuslu, pembemsi ile kırmızı	Grimsi beyaz renkte genellikle mukuslu koloniler	-	Tek veya çift kısa çubuklar
<i>M. catarrhalis</i>	Hemolitik olmayan, yuvarlak, opak, dışbükey ve grimsi beyaz	-	gri-beyaz, kuru, tel halka ile kolayca kaldırılabilir	-	Düzleştirilmiş bitişik kenarlara sahip diplococcus
<i>E. coli</i>	Koloniler yuvarlak, nemli ve pürüzsüzdür ve kenarları düz ve pembe görünür, Laktoz fermentörü	Gri-beyaz nemli koloniler	gri-beyaz nemli koloniler	-	Hareketli çubuk
<i>M. tuberculosis</i>	Koloniler düz ve bastırılmış görünür ve düzensizdir	Yeşil alanda krem rengi, pürüzlü koloniler	Krem renkli pürüzlü koloniler	-	Hafif Kavisli ince çubuk
<i>Lactococcus lactis</i>	Kolonileri yapışkan, nemli ve beyaz görünümlüdür	Küçük, dairesel, pürüzsüz, tam ve zayıf α-hemolitik	pürüzsüz, α-hemolitik	Dairesel, pürüzsüz	laktokoklar küresel veya oval şekilli hücrelere sahiptir
<i>Fusobacterium</i>	-	Dairesel veya düzensiz olabilen kolonileri belirlemek	Düzensiz rizoit kenarlı, donuk, granüler koloniler	-	Bireysel hücreler, sivri uçlu, ince, çubuk şeklinde basillerdir.
<i>S. pneumoniae</i>	-	Alfa-hemolitik, koloniler küçük ve gri görünür ve yeşil bir hemoliz bölgesi oluşturur	Yeşil veya sarı-yeşil bölgeler	Altın sarı	Kısa zincirli bakteri, uzun diplokok
<i>S. pyogenes</i>	-	β-hemolitik, küçük koloni, kuru, mukuslu	β-hemolitik-koloniler	-	Tek, çift veya zincir, küçük koklar
<i>H. influenza</i>	-	Hafif kokulu, dışbükey, pürüzsüz, soluk,	Mukoid koloniler, koku kültürü	-	Kısa çubuk, pleomorfik formlar

		Gri veya şeffaf koloniler			
--	--	---------------------------	--	--	--

4.6.2 Biyokimyasal test sonuçları ile ilgili izole edilmiş bakteriler

Çalışmamızda izole edilen bakteri türlerini tanımlamak için kullanılan biyokimyasal testlerin sonuçları aşağıdaki Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.8 Biyokimyasal test sonuçları I

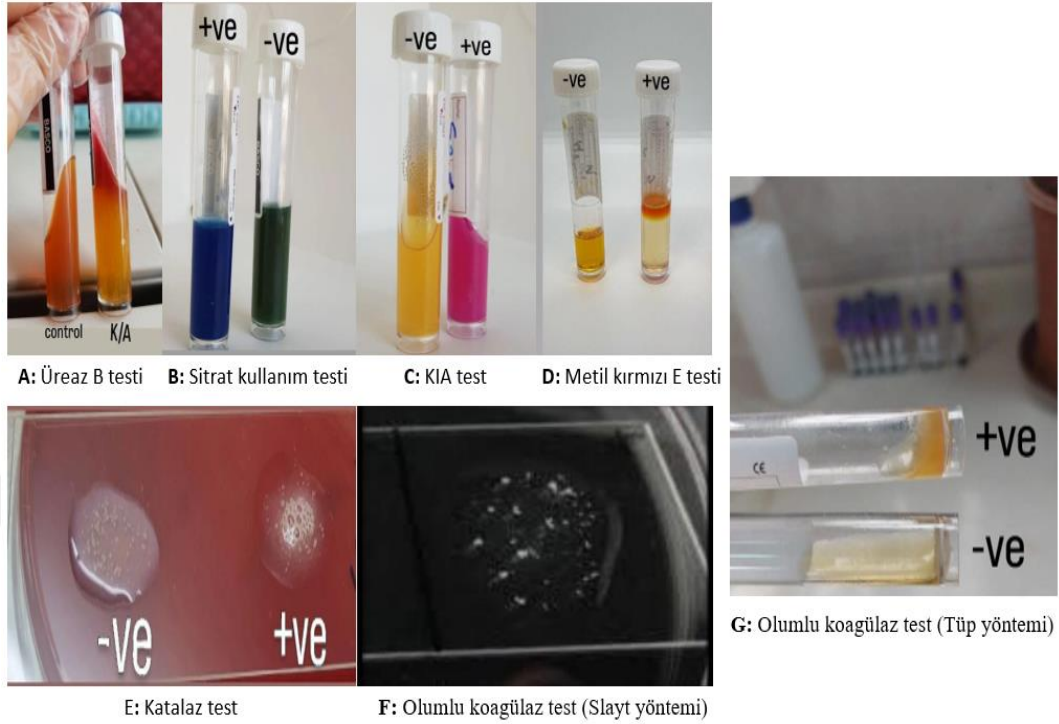
Biyokimyasal testler	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>A. baumannii</i>	<i>M. catarrhalis</i>	<i>S. aureus</i>
İndol	-	+	+	-	-	-	NT
MR	-	-	+	-	-	-	NT
VP	+	+	-	-	-	+	NT
Sitrat kullanımı	+	+	-	+	+	-	NT
Katalaz	+	+	+	+	+	-	+
Oksidaz	-	-	-	+	-	-	-
Urease	+	+	-	-	-	-	+
KIA	A/A	A/A	A/A	K/K	K/A	A/A	NT
Gaz	+	+	+	-	-	+	NT
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	NT
EMB'de Büyüme	Pembe açık metalik parlaklık	Pembe açık metalik parlaklık	Yeşil metalik parlaklık	Renksiz laktozsuz fermenter	Renksiz laktozsuz fermenter	Pembe, metalik değil parlaklık	NT
Koagülaz	NT	NT	NT	NT	NT	NT	+

+ : pozitif, - : negatif NT: test edilmedi A/A: asit/asit A/K: alkalın/asit

Çizelge 4.9 Biyokimyasal test sonuçları II

Biyokimyasal testler	<i>H. Influenza</i>	<i>M. catarrhalis</i>	<i>S. pneumoniae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>L. lactis</i>	<i>Fusobacterium</i>
İndol	+	-	-	-	-	+
MR	+	-	+	-	-	+
VP	-	-	-	-	+	-
Sitrat kullanımı	-	-	-	-	-	-
Katalaz	+	+	-	+	+	-
Oksidaz	+	+	-	-	-	-
Urease	+	-	-	+	-	-
KIA	K/K	K/K	K/K	NT	A/A	K/A
Gaz	-	-	-	-	-	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	+
EMB'de Büyüme	Renksiz laktozsuz fermenter	Renksiz laktozsuz fermenter	Renksiz laktozsuz fermenter	Renksiz laktozsuz fermenter	Renksiz laktozsuz fermenter	Renksiz laktozsuz fermenter
Koagülaz	NT	NT	NT	NT	NT	-
Ornithin	+	-	-	-	-	-

+ : pozitif, - : negatif NT: test edilmedi A/A: asit/asit A/K: alkalın/asit



Şekil 4.7 İzole edilen bakterilere uygulanan bazı biyokimyasal testler

4.6.3 İzole edilen bakteriler arasında virölans faktörlerinin üretimi

Bakteriyel patojenler, konak dokulara erişmek, bağışıklık sistemine direnmek ve konakları içinde uygun nişlerde yer edinmek için çeşitli virölans faktörleri edinmiştir:

Hemolizin: *S. aureus*, *S. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* gibi bakteriler de hemolizin olarak bilinen bir toksin sınıfı üretirler. Bakteriler konak dokuda ortalama 10^5 hücre/mL'yi aştığında, kırmızı kan hücrelerine girerek gözenekler oluşturan ve bakteri kullanımı için demiri serbest bırakan proteinler üretirler. Hemolizinler kesinlikle doku hasarını sürdürmek ve bağışıklık sisteminden kaçınmak gibi ek bir işleve sahiptir, ancak diğer bazı çalışmalar hemolizin işlevinin farklı faktörlere bağlı olarak değişken olabileceğini göstermektedir.

Üreaz: Üreaz, üreyi hidrolize ederek amonyak üretir. Üreaz, *K. pneumoniae* ve *E. coli*'nin asidik ortamları nötralize etmesini sağlayan güçlü bir baz üretir, bu da muhtemelen üreyi üre kalıntıları olarak üre çekirdeğinde tutarken (üreaz) önleme ve tedavideki rolünü aydınlatır.

DNAaz: *S. aureus* ve *P. aeruginosa*, konak DNA'sını parçalayarak potansiyel bağışıklıktan kaçışa ve nötrofil hücre dışı tuzaklarının (NET'lerde oluşan) yok edilmesine yol açan DNAaz üretir. DNAazın bağışıklıktan kaçışı teşvik ettiği kesinlikle gösterilmiştir, ancak yakın zamanda NET'lerde kalmayı önleyecek başka mekanizmalar da önerilmiştir.

Lesitinaz: *S. aureus* ve *A. baumannii* etkenlerinin her ikisi de hücrelerin fosfolipid membranlarındaki lesitini bozan ve dokuların istilasına ve hasara izin veren lesitinaz üretmektedir. Bu rol, 2022 yılındaki lesitinaz üretim çalışmaları kullanılarak doğrulanmıştır. Bununla birlikte, son çalışmalar lesitinaz aktivitesinin *A. baumannii*'nin tüm suşları tarafından sunulan bir şey olmadığını göstermiştir.

Lipaz: *S. aureus* ve *P. aeruginosa* tarafından üretilen bir enzim olan lipaz, konak dokuların lipidleri üzerinde çalışır ve böylece insan vücudunun deri/dokuları üzerindeki lipid açısından zengin ortamlarda yayılmasını sağlar. Son zamanlarda yapılan çalışmaların çoğu, lipazın doğrudan deri enfeksiyonlarına katkıda bulunabileceği deri bütünlüğü enfeksiyonlarında lipazın rolünü desteklemek için kullanılmıştır. Bununla birlikte, çeşitli çalışmalar, sistemik enfeksiyon üzerindeki etkinliğini göstermiştir.

Proteaz: *S. aureus* da dahil olmak üzere çeşitli bakteri türlerinde bulunur ve bağışıklık sisteminin bileşenleri de dahil olmak üzere konakçı proteinlerini parçalar. Virülanstaki rolleri geniş çapta belgelenmiştir, ancak bazı araştırma makaleleri, bazı durumlarda proteaz eksikliği olan suşların hala enfeksiyonlara neden olabileceğini bildirmiştir.

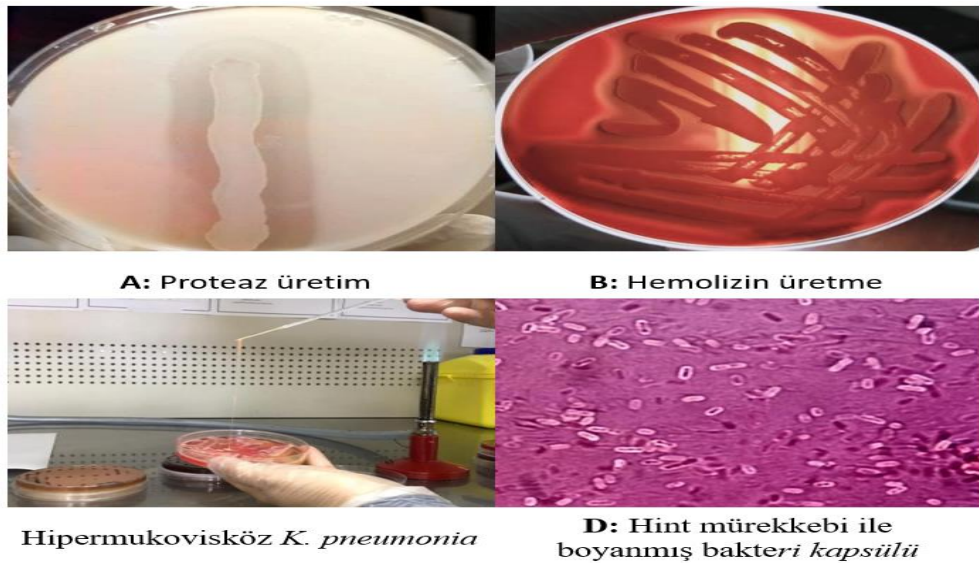
β -laktamaz: β -laktamaz, β -laktam antibiyotikleri parçalamaktadır ve dirençle ilişkilendirilmektedir. *S. aureus* ve *P. aeruginosa* gibi bakteriler, β -laktamaz üretimi

konusunda yaygın olarak incelenmiştir. Dirençli suşların β -laktamaza bağlı rolü birçok çalışmada doğrulanmıştır. Bununla birlikte, bazı araştırmalar yeni β -laktamaz inhibitörlerinin dirençli suşlara karşı işe yarayabileceğini göstermiştir.

Koagülaz: Koagülaz yaygın olarak *S. aureus* tarafından üretilir ve bakterinin bağışıklık hücresi aracılı saldırısını önleyen koruyucu bir fibrin barikatını destekler. Virülanstaki bu rol, *S. aureus* patojenite çalışmalarında yeniden teyit edilmiştir. Bazı yazarlar bazı suşlarda koagülazın rolünü sorgulamıştır. Gerekçeleri, bağışıklıktan kaçınma için olası alternatif mekanizmalar önermiştir.

Katalaz: Katalaz, *S. aureus* ve *P. aeruginosa* gibi mikroplarda üretilir ve reaktif oksijen türlerini nötralize etme işlevi görür ve bakterileri oksidatif stresin etkilerinden koruyabilir. Sınırlı sayıda araştırmacı katalazın anaerobik koşullarda bir faktör olmadığını savunsa da, 2023 yılında yapılan çalışmaların doğrulanması, katalazın zararlı ortamlarda bakteriyel hayatta kalmayı artırmadaki rolünü vurgulamıştır.

Kapsül: *K. pneumoniae* ve *S. pneumoniae* gibi mikroplardaki bakteriyel kapsülün bağışıklık hücreleri tarafından fagositozu engellediği belgelenmiştir. Bu fikir çalışmalarla tutarlı bir şekilde desteklenmiştir, ancak son zamanlarda bazı suşlarda kapsülden bağımsız virülans faktörleri araştırılmıştır (Çizelge 4.10) (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 İzole edilen bakterilerin virülans faktörleri

Çizelge 4.10 İzole edilen bakterilerin virülans faktörleri

Bakteriyel Türler	H.	U.	D.	Le.	Li.	Pro.	β -lac.	Cog.	Cat.	Caps.
<i>S. aureus</i>	1.	0.	1	1.	1	1.	1.	1.	1.	1.
<i>K. pneumoniae</i>	0.	1.	0	0	0	1.	1.	0	1.	1.
<i>K. oxytoca</i>	0.	1.	0	0	0	1.	1.	0	1.	1.
<i>S. pneumoniae</i>	1.	0	0	0	0	1.	1.	0	0.	1.
<i>A. baumannii</i>	0.	0	0	1.	0	1.	1.	0	1.	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	0	1.	1.	1.	1.	1.	0	1.	0
<i>M. catarrhalis</i>	0	0	0	0	0	1.	1.	0	1.	0
<i>H. influenzae</i>	0	0	0	0	0	1.	1.	0	0	1.
<i>L. lactis</i>	0	0	0	0	1.	0	0	0	0	0
<i>M. tuberculosis</i>	0	0	0	0	0	1.	0	0	0	0
<i>S. pyogenes</i>	1.	0	0	0	0	1.	1.	0	0	1.
<i>Fusobacterium</i>	0.	0	0	0	0	1.	0	0	0	1.
<i>E. coli</i>	1.	1.	0	0	0	1.	1	0	1.	0.

0=Negatif, 1=Pozitif

4.7 Antibiyotik Duyarlılığı

Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteriler için CLSI (2023) standartlarına göre, en yaygın kullanılan on antibiyotiğe karşı tüm bakteri izolatlarında disk difüzyon tekniği kullanılarak antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. Bulgular da bu tavsiyelere uygun olarak yorumlanmıştır. Çalışmanın sonuçları açık bir tutarsızlık göstermiştir. Enfeksiyonu doğrulanmış hastalardan izole edilen bakteriler, sağlıklı ve aşılanmış kişilerden izole edilen bakterilere kıyasla antibiyotiklere karşı daha dirençliydi; bunun nedeni belki de bağışıklık sistemlerinin zayıf olması, antibiyotiklerin yanlış kullanımı, etkili antibiyotiği belirlemek için laboratuvar kültürü yapılmaması, doktora danışmadan aşırı antibiyotik alımı ve toplum bilincinin eksikliği olabilir.

4.7.1 Antibakteriyel duyarlılık belirleme

Antibiyotik duyarlılığını test etmek için broth mikrodilüsyon tekniği ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Her bir izolatu içeren Muller-Hinton agar (MHA) besiyerinde her bir antibiyotik diskini çevreleyen inhibisyon zonu ölçülmüş ve sonuçlar, CLSI kılavuzları tarafından önerilen zon çapı kesme noktasına göre izolatlar duyarlı (S), orta (I) veya dirençli (R) olarak sınıflandırılarak yorumlanmıştır. Aşağıda her bir bakteri

grubuna karşı kullanılan antibiyotik diskleri (Rosco, Taastrup, Danimarka) verilmiştir: İzole Gram-pozitif Bakterilerde Antibiyotik Direnci Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.11 İzole edilmiş bakterilerin antibiyotik direnci

	Bakteril er	Sayı. izolat	Antibiyotiklere Dirençli izolat sayısı (%)										
			IMP	CN	CRO	LEV	MEM	TMP	AK	TIP	AMC	AZM	OX
Ağız boşluğu	S. aureus	5	0	0	1(20)	4(80)	0	360	2(40)	3(60)	3(60)	4(80)	5(100)
	K.pneu monia	2	2(100)	0	1(50)	2(100)	0	150	1(50)	2(100)	1(50)	2(100)	2(100)
	K.Oxyto ca	6	5(83,3	0	6(100)	2(33,3)	0	4(66,6)	0	6(100)	0	5(83,3)	6(100)
Nazofarenks	S.pneum onia	24	15(62,)	0	13(54,1)	9(37,5)	0	7(29,1)	16(66,6)	5(20,3)	11(45,81)	9(37,5)	11(45,8)
	A.baum annii	8	6(75	0	6(75)	4(50)	1(12)	2(25)	0	8(100)	5(62,5)	7(87,3)	8(100)
	P.aurog nosa	10	9(90)	0	7(61,7)	9(90)	0	8(80)	3(30)	6(60)	8(80)	5(50)	10(100)
	K.pneu monia	11	10(90,9)	0	7(63,1)	6(54,5)	0	6(54,5)	5(45,5)	5(45,41)	11(100)	7(63,6)	7(63,6)
	K.Oxyto ca	9	3(33,3)	0	3(33,3)	8(88,8)	0	2(22,4)	4(44,4)	7(77,7)	4(44,4)	6(66,60)	5(55,5)
	M.catar rahis	13	5(38,4)	0	5(38,4)	6(46,1)	0	3(23)	13(100)	7(63,6)	2(15,3)	4(30,7)	9(69,2)
	H.influe nzae	2	0	0	1(50)	0	0	1(50)	2(100)	0	2(100)	2(100)	0
	L. lactis	4	1(25)	0	0	0	0	1(25)	0	0	0	0	1(25)
	Balgam	M.tuber culosis	11	7(63,6)	0	3(27,2)	0	0	4(36,3)		2(18,1)	0	6(54,5)
S.pneum onia		2	1(50)	0	1(50)	0	0	1(50)	0	0	1(50)	1(50)	2(100)
H.influe nzae		6	4(66,6)	0	2(33,3)	116,6	116,6	3(50)	0	1(16,6)	1(16,6)	4(66,6)	3(50)
P.aurog nosa		4	1(25)	0	2(50)	4(100)	0	1(25)	0	3(75)	1(25)	4(100)	0
E.coli		3	2(66,6)	0	0	0	0	1(33,3)	2(66,6)	133,3	3(100)	1(33,3)	2(66,6)
S.aureus		9	0	0	3(33,3)	1(11,1)	0	5(55,5)	0	5(55,5)	4(44,4)	2(22,4)	1(11,1)
	S.Pyoge nes	6	3(50)	0	3(50)	2(33,3)	0	2(33,3)	3(50)	1(25)	4(66,6)	2(33,3)	1(25)

	<i>H.influenzae</i>	3	2(66,6)	0	1(25)	2(66)	0	2(66)	1(25)	3(100)	1(33,3)	0	0
--	---------------------	---	---------	---	-------	-------	---	-------	-------	--------	---------	---	---

Çizelge 4.12 Aşılana grupta izole edilen bakterilerin antibiyotik direnci

Aşılama Grubu	Bakteriler	İzolat sayısı	İMPn(%)	IMP n(%)	CN n(%)	CRO n(%)	OX n(%)	MEM n(%)	TMP n(%)	AK n(%)	TIP n(%)	AMC n(%)	AZM n(%)
Ağız boşluğu	<i>K.pneumonia</i>	3	2 (100)	0	0	0	0	1(33,3)	0	0	1(33,3)	0	0
Nazofarenks	<i>S. Pneumonia</i>	7	5(71,4)	0	4(57,1)	0	0	1(14,2)	0	0	2(28,6)	0	6(85,7)
	<i>H.influenza</i>	1	1(100)	0	0	1(33,3)	0	1(100)	1(100)	0	0	0	1(100)
	<i>P.aeruginosa</i>	10	4(40)	0	2(20)	0	0	2(20)	5(50)	0	4(40)	3(30)	8(80)
Balgam	<i>S. Pneumonia</i>	1	1(100)	0	0	0	0	0	1(100)	0	0	1(100)	1(100)
	<i>P.aeruginosa</i>	4	2(50)	2(50)	0	0	0	0	0	2(50)	0	3(75)	3(50)
	<i>H.influenza</i>	3	1(33,3)	0	0	0	0	0	0	1(33,3)	0	2(66,6)	3(100)

Çizelge 4.13 Sağlıklı grupta izole edilen bakterilerin antibiyotik direnci

Sağlıklı Grup	Bakteriler	İzolat sayısı	İMPn(%)	IMP n(%)	CN n(%)	CRO n(%)	OX n(%)	MEM n(%)	TMP n(%)	AK n(%)	TIP n(%)	AMC n(%)	AZM n(%)
Ağız boşluğu	<i>S. aureus</i>		3(50)	0	0	3(50)	0	0	2(33,3)	1(16,6)	0	1(16,6)	4(66,6)
	<i>Fusobacterium</i>		2(40)	0	0	3(60)	0	0	3(60)	0	0	1(20)	0
Nazofarenks	<i>L. lactis</i>		0	0	0	1	0	-	-	-	0	0	0

Balgam	<i>S. aureus</i>		2(66,6)	0	3(100)	1(33,3)	0	0	0	0	0	2(66,6)	0
Orofarenks	<i>S. pyogenes</i>		1	0	0	0	0	1(20)	0	2(40)	2(40)	0	3(60)

SARS-CoV-2 enfeksiyonu vakalarında antibiyotik kullanımı ile ölümlerin azaltılması arasında belgelenmiş bir ilişki yoktur (Mirzaei *et al.* 2020). Öte yandan, diğer çalışmalar vücudun SARS-CoV-2 enfeksiyonuna uygun antikor üretimini engelleyebileceğini; böylece enfeksiyon oranının arttığını göstermektedir (Huttner *et al.* 2020). Çalışmamızda, enfeksiyonu olmayan kişilere kıyasla enfeksiyonu olan hastalara antibiyotik verilmesine öncelik verilmiştir. Bu çalışmada, enfekte bir grupta, ağız boşluğundan izole edilen *S. aureus*, levofloksasine %100 ve hem azitromisin hem de oksasiline %80, hem trimetoprim hem de amoksoklava %60, siprofloksasin ve Amikasine %40, seftriaksona %20 oranında aşırı duyarlılık gösterirken, Gentamisin ve Meropeneme %100 oranında yüksek direnç göstermiştir (Çizelge 4.12). Balgamdan izole edilen *S. aureus* levofloksasin ve oksasiline %11,1, azitromisine %22,4, siprofloksasine %55,5, amoksoklava %44,4 oranında aşırı duyarlılık gösterirken Gentamisin, Meropenem, seftriakson, trimetoprim ve Amikasine %100 oranında yüksek direnç göstermiştir (Çizelge 4.13).

Sağlıklı bir grupta balgamdan izole edilen *S. aureus* levofloksasin ve seftriaksona %100, imipenem ve azitromisine %66,6 oranında aşırı duyarlılık gösterirken, oksasilin %33,3 oranında kaydedilmiş ve bu çalışmada kullanılan diğer antibiyotiklere %100 oranında yüksek direnç göstermiştir (Çizelge 4.13). Stafilokok bakterilerine karşı çeşitli direnç mekanizmaları bulunmaktadır. Stafilokok bakterileri antibiyotiklere karşı direnç mekanizmalarından biri olarak beta-laktamaz halkasını parçalayan enzimler üretirken, trimetoprime karşı dirençleri, bu bakterilere özgü direnç genleri aracılığıyla DHFR enzimlerinin üretimi yoluyla bu bakterilere karşı kullanılan antibiyotikleri baskılamamanın başka bir yolunu temsil etmektedir. Buna *dfrA* geni de dahildir (Jubeh *et al.* 2020). Çalışmamızda, bu bakterilerin trimetoprime direnç oranı ağız boşluğunda %60 iken,

balgamdan alınan örneklerde bu bakterilere direnç oranı %55 arasında değişmektedir. Çalışmamızın sonuçları, SARS ile enfekte kişilerde bu bakteriler için kullanılan antibiyotiklere karşı yüksek direnç varlığını gösteren (Mobarak-Qamsari *et al.* 2023) ile uyumludur. Çalışmamız ayrıca, bakterilere karşı kullanılan hem meropenem hem de imipenem karşı yüksek hassasiyet olduğu kaydedildiği için Mahmoudi (2020) ile aynı fikirdeyken, diğer çalışmalar Gram-pozitif bakterilerin çoğunun meropenem ve tazobaktam duyarlı olduğunu, Gram-negatif bakterilerin ise çalışma örneklerinde kullanılan antibiyotiklere değişen yanıtlar gösterdiğini göstermiştir. Nazofarenksten izole edilen *S. pneumonia*, gentamisin ve meropenem %100'lük oranlarla aşırı duyarlılık gösterirken, bu çalışmada kullanılan diğer antibiyotiklere %62 gibi farklı yüzdelere yüksek direnç göstermiştir. İmipenem %5, seftriakson %54,1, Amikasin %66,6, amoksoklav ve oksasilinin her ikisi de %45,8, azitromisin ve levofloksasin %37,5, trimetoprim ve amoksoklav %29,1, en az dirençli antibiyotik ise %20,3 ile siprofloksasindir. Balgamdan izole edilen *S. pneumonia* oksasilin, Gentamisin, Meropenem, Amikasin ve siprofloksasine %100 oranında yüksek duyarlılık gösterirken, levofloksasine %100, azitromisin, amoksoklav, seftriakson ve Gentamisine %50 oranında yüksek direnç göstermiştir.

Aşılana grupta Nazofarenksten izole edilen *S. pneumonia* gentamisin, levofloksasin, Meropenem, azitromisin, Amikasin ve siprofloksasine %100 oranında aşırı duyarlılık gösterirken, bu bakterinin en yüksek direnci %85,7 ile levofloksasin olmuş, bunu %71,4 ile imipenem, %57,1 ile seftriakson, %28,6 ile amoksoklav izlemiştir, trimetoprim ise bu grupta %14,2 oranında kaydedilmiştir. Aşılana grupta balgamdan izole edilen *S. pneumonia* gentamisin, levofloksasin, azitromisin ve amoksoklav amikasine %100 oranında aşırı duyarlılık gösterirken, bu bakterinin en yüksek direnç gösterdiği diğer antibiyotikler bu grupta %100 olarak kaydedilmiştir. Nazofarenksten izole edilen *H. influenzae* Amikacin, amoxoclav ve azithromycin'e %100, ceftriaxone ve trimethoprim'e %50 oranında yüksek direnç gösterirken, bu çalışmada kullanılan diğer antibiyotiklere aşırı duyarlılık göstermiştir. Balgamdan izole edilen *H. influenzae* Gentamisin, Amikasin'e %100 oranında yüksek duyarlılık gösterirken, imipenem, azitromisin'e %66,6, trimetoprim, oksasilin'in her ikisine de %50, levofloksasin, Meropenem,

levofloksasin, siprofloksasin ve amoksoklav'a %16,6 oranında yüksek direnç göstermiştir.

Orofarenkste enfekte gruptan izole edilen *H. influenzae* Gentamisin, Meropenem, azitromisin ve oksasiline %100 oranında aşırı duyarlılık gösterirken, siprofloksasine %100, imipenem, trimetoprim ve Meropenem'e %66 oranında yüksek direnç göstermiştir. 6, seftriakson, amoksoklav ve amikasin %25 olarak kaydedilmiştir. Aşılanmış bir grupla karşılaştırıldığında, nazofarenksten izole edilen *H. influenzae* meropenem, gentamisin ve seftriaksona karşı %100 gibi yüksek bir duyarlılık oranı göstermiştir. Siprofloksasin ve amoksoklav %100 iken, bu bakteriler oksasilin, imipenem, Amikasin, Azitromisin ve levofloksasine %100 oranında aynı derecede antibiyotik direnci göstermiştir. Aşılanan grubun balgamından izole edilen *H. influenzae* oksasiline %100 gibi yüksek bir direnç oranı gösterirken, bunu azitromisin izlemiş ve bu bakterilerin imipenem, siprofloksasin direnci Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi %33,3 ile daha az olmuştur.

Enfekte grupta orofarinksten izole edilen *S. pyogenes* gentamisin ve meropeneme %100 oranında aşırı duyarlılık gösterirken, amoksoklava %66,6 oranında yüksek direnç göstermiş, imipenem, seftriakson, amikasin %50 oranında azitromisin, levofloksasin ve trimetoprim %33,3 oranında izlemiş, siprofloksasin ve amoksoklav ise %25 oranında en az direnç gösteren antibiyotikler olmuştur. Sağlıklı grupta orofarinksten izole edilen *S. pyogenes* amoksoklav ve siprofloksasine %40, levofloksasine %60, trimetoprimin her ikisine, imipeneme %20 oranında yüksek direnç gösterirken, bu bakterilerin yüksek duyarlılık gösterdiği diğer antibiyotikler Çizelge 4.12'deki gibidir. Sağlıklı gruptaki *Fusobacterium*'lar amikasin ve oksasilinin her ikisine de %60, imipeneme %40 ve azitromisine %20 oranında yüksek direnç göstermiştir.

Gram-pozitif bakterilerde direnç için çeşitli mekanizmalar vardır. Bakteriyel antibiyotik direnci (AMR) kalıcıdır ve artan bir riski temsil etmektedir. Birçok çalışma antibiyotiklerin ana hedeflerini ve bölgelerini tanımlamıştır. Antibiyotikler için bu bölgelerin hedeflerinden biri ribozom, diğer hedef ise protein sentezlemelerine yardımcı olan bakteriyel koruma için çeşitli direnç mekanizmalarıdır (Lin *et al.* 2018). Antibiyotiklerin hedef aldığı ribozomal alt birimleri (50 S) ve ribozomal RNA

metilasyonunu hedeflemektedir (Lin *et al.* 2018). Ağız boşluğundan izole edilen enfekte bir grupta *K. pneumoniae*, imipenem, oksasilin, siprofloksasin, azitromisin, imipenem ve levofloksasine %100 gibi yüksek bir direnç oranı göstermiştir. Aynı zamanda trimetoprim, amoksoklav, amikasin ve seftriaksona direnç oranı %50'dir. Buna karşılık, Çizelge 4.10'da gösterildiği gibi meropeneme %100 oranında yüksek direnç göstermiştir. Ayrıca Nazofarenksten izole edilen enfekte bir grup durumunda *K. pneumoniae* imipeneme %90, seftriakson, azitromisin ve levofloksasine %63,1 oranında yüksek direnç gösterirken, trimetoprim, oksasilin %54,5, siprofloksasin, amikasin %45,41 ve amoksiklav %41 oranında direnç göstermiştir. Amoksiklav'a karşı çok yüksek direnç %100 olarak kaydedilmiştir. Ağız boşluğundan izole edilen aşılanmış grupta enfekte gruba kıyasla çalışılan antikorların düşük direnç oranı göstermesi durumunda, imipenem %60 olarak kaydedilirken, trimetoprim, amoksoklavın her ikisi de %33,3, gentamisin ise yüksek duyarlılıkta (%100) olarak belirlenmiştir.

Klebsiella pneumoniae izolatları antibiyotiklere karşı ciddi direnç göstermiştir ve bu durum SARS-CoV-2 ile enfeksiyonun birinci ve ikinci dalgaları sırasında yapılan bir çalışmayla (Mobarak-Qamsari *et al.* 2023) uyumludur. Diğer çalışmalar, bu enfeksiyon patojenlerinin antibiyotiklere karşı yüksek direnç gösterdiğini ve yüksek oranda yayıldığını doğrulamıştır. Her iki çalışma da Ameen *et al.* (2021) ile aynı fikirdedir.

Çalışmalar, *K. pneumoniae*'nin amoksoklav, eritromisin, trimetoprim, ampisilin, azitromisin ve seftriaksona karşı yüksek direnç gösterdiğini ortaya koymuştur. Direncin nedenini karbapenemlerin ve birçok antibiyotik direnç geninin varlığı olarak açıklayanlar, bunun Gram-negatif bakterilerin antibiyotiklere karşı direncini açıkladığını belirtirken, başka bir çalışma *K. pneumoniae*'nin antibiyotiklere karşı %97 oranında daha dirençli olduğunu göstermiştir (CIP, CRO), MER %95 ve levofloksasin %93 oranında direnç göstermiştir. *Escherichia coli* meropenem, levofloksasin, seftriakson ve gentamisinin her birine %100'lük yüksek bir duyarlılık oranı gösterirken, azitromisine %100, imipenem, amikasin ve oksasiline %50, siprofloksasin, azitromisin ve trimetoprime ise %33,3'lük yüksek bir direnç oranı göstermiştir. *E. coli*'nin rolü, pnömoni insidansına katkıda bulunan önemli bir faktör olarak ortaya çıkmıştır. Çalışmamızda *E. coli*'nin bazı antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Çalışmamız, bu

bakterilerin imipenem antibiyotiğine duyarlı iken bazı antibiyotiklere dirençli olduğunu açıklayan (Yayan *et al.* 2015) ile uyumludur. Nazofarenksten izole edilen enfekte gruptaki *K. oxytoca* meropeneme %100 gibi yüksek bir duyarlılık oranı göstermiştir. Bu bakteri gentamisine %88,8 oranında yüksek direnç gösterirken, bunu %77,7 ile siprofloksasin, %66,65 ile azitromisin, %55,5 ile oksasilin ve her ikisi de amoksiklav izlemiştir. Amikasin %44,4, aynı zamanda hem imipenem hem de seftriakson %33,3'tür. Trimetoprim yüzdesi Çizelge 4.10'da görüldüğü gibi %22,4'tür.

K. oxytoca, bakterilere antibiyotik direnci kazandıran genlerin aktarılmasında kilit bir rol oynayabilir ve hastane enfeksiyonları için bir vektör görevi görebilir (Neog *et al.* 2021). Chakraborty *et al.* (2016)'e göre, *K. oxytoca* izolatları ampisilin, amoksisilin ve nalidiksik aside karşı önemli ölçüde direnç gösterirken, gentamisin ve seftriaksona karşı duyarlılık göstermiştir. *K. oxytoca* izolatlarının Ameen *et al.* (2021) tarafından gentamisin, amoksoklav, seftriakson, trimetoprim, tetrasiklin ve amikasin hariç tüm antibiyotiklere %100 dirençli olduğu ve bunların da daha az dirençli olduğu gösterilmiştir. Nazofarenksten izole edilen enfekte gruptaki *P. aeruginosa* meropenem ve gentamisine %100 gibi yüksek bir duyarlılık gösterirken, bu bakteri oksasiline %100, imipenem ve levofloksasine %90,9, trimetoprim ve amoksoklava %80, seftriaksona ise %61,7 oranında olmak üzere farklı derecelerde antibiyotik direnci göstermiştir. 60 daha az antibiyotik direnci gösteren siprofloksasini %30 ile amikasin izlemiştir. Aşılınmış grupla karşılaştırıldığında, nazofarenksten izole edilen *P. aeruginosa* meropenem, gentamisin ve seftriaksona %100 gibi yüksek bir duyarlılık oranı göstermiştir. bu bakteri %80 oksasilin ve %50 amikasin olmak üzere farklı derecelerde antibiyotik direnci göstermiştir. İmipenem ve amoksoklav %40, azitromisin %30, seftriakson ve trimetoprim yüzdesi ise Çizelge 4.11'de görüldüğü gibi %20'dir.

Aşılınan grubun balgamından izole edilen *P. aeruginosa* oksasilin ve azitromisine %100, siprofloksasin ve imipeneme ise %50 oranında direnç göstermiştir. Bu bakteri azitromisin ve levofloksasine %100, siprofloksasine %50 oranında olmak üzere farklı derecelerde antibiyotik direnci gösterirken, bu bakteriye karşı kullanılan diğer antibiyotikler %100 oranında yüksek hassasiyet göstermiştir (Çizelge 4.12). *Pseudomonas* izolatları çeşitli antibiyotiklere direnç göstermiştir ve diğer çalışmalar gentamisin, levofloksasin ve

seftazidim gibi antibiyotiklere karşı oldukça dirençli olduklarını doğrulamıştır (Yayan *et al.* 2015). Çalışmamızın sonuçları bu çalışma ile uyumlu iken (Mahmoudi 2020) bu bakterilerin antibiyotiklere dirençli olduğunu doğrulamıştır. Bu bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları iki kısma ayrılmaktadır. Birincisi, genetik mutasyonlar veya direnç genleri yoluyla edinilen mutasyonlar yoluyla kazandıkları dirençtir, bu da diğer proteinleri ve pürinleri kodlar, beta-laktamazlara karşı dirençleri ise beta-laktam halkasının amid bağlanmasından kaynaklanır. Bu direncin bu kişilerde doğuştan var olması da mümkündür. Bakteriler dış membran geçirgenliğinin azalması veya efluks pompalarının aşırı üretiminden kaynaklanır (Breijyeh *et al.* 2020).

A. baumannii siprofloksasin, oksasilin ve ardından azitromisine %100 direnç gösterirken, hem seftriakson hem de imipenem %75, amoksoklav %62,5, levofloksasin %50, trimetoprim %25 olarak kaydedilmiştir. en az dirençli olan meropenem %12 olarak kaydedilirken, bu bakteri Amikasin ve gentamisine %100 oranında yüksek hassasiyet göstermiştir. *A. baumannii* bakterisi, bu bakterinin hastane enfeksiyonlarıyla ilişkili olduğunu bildiren birçok çalışmaya göre SARS-CoV-2'yi tedavi etmek için kullanılan birçok antibiyotiğe direnç göstermiştir (Breijyeh *et al.* 2020, Pourajam *et al.* 2022). *A. baumannii* bakterileri, beta-laktamazlara karşı çalışan beta-laktamazlar da dahil olmak üzere birçok enzimin üretiminin yanı sıra pompalama akışındaki değişiklik (efluks pompası) ve dönüştürme yeteneğine sahip enzimlerin üretimi de dahil olmak üzere çeşitli mekanik mekanizmalar yoluyla antibiyotiklere direnç geliştirir. Ayrıca, direnç yöntemleri, ilacın geçirgenliğini azaltmayı, aktif bölgelerin etkinliğini azaltmayı ve ilacın finansal olarak ayrışmasını içerir. Membran geçirgenliğindeki değişiklikler de dahil olmak üzere genetik materyal düzeyinde meydana gelen değişikliklere ek olarak bakteriyel kromozomların veya plazmidlerin gerçekliğinin yanı sıra, sefalosporinleri parçalayabilen yeni β -laktamaz enzimlerinde bir mutasyon vardır ve antibiyotik direncine neden olur (Breijyeh *et al.* 2020) ve Gram-negatif bakterileri etkileyen en uygun antibiyotiği seçmenin zorluğu göz önüne alındığında, bu bakterilere karşı kullanılan mikrobiyal antibiyotiklere direnç mekanizmalarını kodlayan genlerin düzenlenme düzeyi üzerindeki önemli etkisi bulunmaktadır. Bakterilerin (*A. baumannii*), antibiyotiklere karşı kullanılan direnç yöntemlerinin özelliklerini tanımlayan (*P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumonia*, *K. oxytoca*) dahil olmak üzere (*Enterobacteriaceae*) ailesinin cinslerinden

biri olduğunu belirtmek gerekir. Nazofarenksten izole edilen enfekte bir grupta *M. catarrhalis*, Amikasinine %100, oksasiline %69,2, siprofloksasine %63,6, levofloksasine %46,1, azitromisine %30,7, imipenemin her ikisine de yüksek oranda direnç göstermiştir. Seftriakson %38,4, trimetoprim %23 ve amoksoklav %15,3 ile bu bakterinin en düşük direncini temsil ederken, meropenem ve gentamisine karşı %100 gibi yüksek bir duyarlılık oranına sahipti. Enfekte grupta nazofarenksten izole edilen *M.tuberculosis* imipeneme %63,6, oksasilin ve azitromisine %69,2, trimetoprime %36,3, seftriaksona %38,5 direnç göstermiştir. 4, siprofloksasin %18,1 ile bu bakterinin en az direncini temsil ederken, meropenem, gentamisin, levofloksasin ve amikasinine karşı %100 gibi yüksek bir duyarlılık oranı vardı. *Enterobacteriaceae* ailesinin, geniş spektrumlu (B-laktamaz) veya (karbapenemaz) üreten türler de dahil olmak üzere antibiyotiklere karşı direnç açısından en yaygın aile olduğu bilinmektedir. Önceki çalışmalarda antibiyotik kullanan Covid hastaları arasında direnç oranları kaydedilmiş, bazı çalışmalarda hastaların %82'sine ulaşırken, oranlar dağılım göstermiştir. Semptom göstermeden antibiyotik alan diğer hasta sayısı bazı çalışmalarda %62'yi temsil etmektedir (Nasir *et al.* 2021). Negatif bakterilerin antibiyotiklere karşı direncinin artmasında, aşırı antibiyotik kullanımının yanı sıra kişisel düzeyde dezenfeksiyon için kullanılan çevresel biyositler de dahil olmak üzere kimyasalların yaygın kullanımı da dahil olmak üzere diğer nedenler rol oynamaktadır. Bu nedenler, bu bakterilerin antibiyotiklere karşı dirençli hale gelme riskinin artmasına yol açmıştır (Getahun *et al.* 2020).

4.8 Biyofilm Oluşumunun Tespiti

4.8.1 Kongo kırmızı agar “CRA” yöntemi

Toplam bakteri örneklerinin (150 örnek) 126'sı (%84) CRA üzerinde pozitif biyofilm oluşumu göstermiştir. Pigmentli üreme biyofilm oluşturan suşlar olarak kabul edilirken pigmentless koloniler (kırmızı-pembe) biyofilm oluşturmayan olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 Açık Kongo kırmızısı agar üzerinde bakteri örnekleri

35 izolat (%23,3) çok siyah koloniler olarak görünen güçlü biyofilm, 34 izolat (%22,7), siyah-koyu gri koloniler (bazen kolonilerin etrafında net bir bölge ile) olarak görünen orta derecede biyofilm, 57 izolat (%38) koyu kırmızı koloniler (bordo) şeklinde görülen zayıf biyofilm ve 24 izolat (%16), soluk kırmızı koloniler (pembeye yakın) olarak görünen biyofilm üreticisi olmayanlar olarak kabul edilmiştir.

Farklı kaynaklardan (ağız boşluğu, nazofarenks, orofarenks ve balgam) izole edilen çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler tarafından biyofilm oluşumunun sonucu, veriler dört biyofilm oluşumu seviyesine (ağır, orta, zayıf ve biyofilm olmayan) ayrılmıştır.

Sonuçların yorumlanması: Ağır biyofilm oluşumu yüzdesi gram-pozitiflerde %18,6 iken gram-negatiflerde %16,7, orta biyofilm oluşumu yüzdesi CRA gram-pozitiflerde %35,7 iken gram-negatiflerde %28,67'dir. Zayıf biyofilm oluşumunda, gram-pozitif oluşum yüzdesi %28,57, gram-negatif %30,8 ve film oluşturmeyan gram-pozitif %17,34 olarak kaydedilmiştir. Ağız boşluğu, hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneklerini gösterdiği ilk izolasyon kaynağıdır.

Ağız boşluğunda, pozitif ve negatif patojenler biyofilm oluşumu için farklı kapasiteler göstermektedir. *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*, iyi bilinen biyofilm

oluşturma yeteneklerine uygun olarak önemli biyofilmler oluşturabilmektedir (Fux *et al.* 2005, Hall-Stoodley *et al.* 2004). Son bulgular gerçekten de bu organizmaların hem ağız boşluğunda hem de diğer ortamlarda çok iyi biyofilm oluşturunucuları olabileceğini göstermektedir (Prabhakara *et al.* 2021, Xu *et al.* 2020). Bu bulguların tekrarı, yine Gram-pozitif bir bakteri olan *Staphylococcus aureus* bum-formasyonu ile de gözlemlenmiştir (Azzopardi *et al.* 2020). Nazofarenks (N.p) söz konusu olduğunda, *Acinetobacter baumannii* de orta derecede biyofilm oluşturarak klinik ortamda güçlü bir biyofilm oluşturunucu olarak verilerine katkıda bulunur (Peleg *et al.* 2008). Son çalışmalar, biyofilm formuyla hayatta kalma taktiklerini nasıl adapte edebildiğini ve uyarladığını göstererek bunu desteklemektedir (Pérez-Rodríguez *et al.* 2022). Buna ek olarak, *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus pyogenes* de solunum yollarındaki enfektivite aralıklarıyla ilişkili olabilecek nispeten yüksek derecede biyofilm göstermiştir. Balgamdan izole edilen *Staphylococcus aureus* ve *H. influenzae*, balgam örneklerinde kronik solunum yolu enfeksiyonu rollerine karşılık gelen biyofilm oluşumu varyasyonları göstermektedir (Harris *et al.* 2013). Son literatür de bu davranışı desteklemekte ve bazıları kalıcı enfeksiyonlardaki rollerini vurgulamaktadır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin genellikle ortalamanın üzerinde zayıf biyofilm oluşumuna sahip olduğu bilinmektedir. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae* en iyi çalışılmış biyofilm üreten organizmalar arasındadır, ancak çevresel parametrelere bağlı olarak tutarsızlık gösterdiklerine dair yeni bir rapor bulunmaktadır (Sharma *et al.* 2021).

Gram-pozitif bakteriler;

Bununla birlikte, orta derecede biyofilm oluşumu bunlarda daha yaygın görünmektedir. *Streptococcus pneumoniae* ve *Streptococcus pyogenes*'in, ülkeler arası seyahatlerde bile diğer çevresel etkiler nedeniyle orta derecede biyofilm üreten organizmalar olduğu çok açıktır (Domenech *et al.* 2012).

Biyofilm oluşumu türleri;

- Ağır biyofilm oluşum, Bu kategoride, hem gram-pozitif hem de gram-negatif organizmalar karşılaştırılabilir şekilde ağır biyofilmler oluşturabilir. Örneğin hem

Lactococcus hem de *Acinetobacter baumannii* güçlü biyofilm oluşturma kabiliyeti sergiler (Kearns *et al.* 2005, Peleg *et al.* 2008). Burada bile, son çalışmalar bu faktörleri rapor etmiş ancak bunları belirli çevresel koşullar altında değerlendirmiştir (Pérez-Rodríguez *et al.* 2022).

- Orta derecede biyofilm oluşumu, gram-pozitif üyelerin genellikle orta derecede biyofilm oluşturma yüzdelерinde olduğu genel bir eğilimdir. Bu, *Streptococcus pneumoniae* ve *S. pyogenes*'in orta derecede biyofilm oluşturma konusundaki tutarlı yeteneğini gösteren diğer son çalışmalarla uyumludur (Pérez-Rodríguez *et al.* 2022).
- Zayıf biyofilm oluşumu, Bu kategoride gram-negatif bakteriler yer almaktadır. Yapılan gözlemlere göre gram-negatif bakteriler gram-pozitiflere göre daha az stabil biyofilmler oluşturmaktadır (Sharma *et al.* 2021).
- Biyofilm oluşumu yok, Gram-pozitif bakterilerde gram-negatif bakterilere göre daha az oranda biyofilm oluşumu yoktur. Bu da gram-pozitif türlerin daha yapışık olduğunu ve biyofilm oluşturma kapasitesinin daha yüksek olduğunu göstermektedir (Hall-Stoodley *et al.* 2004, Xu *et al.* 2020) (Çizelge 4.14) (Çizelge 4.15).

Çizelge 4.14 Gram Pozitif bakterilerin CRA ile biyofilm oluşumuna ilişkin sonuçlar

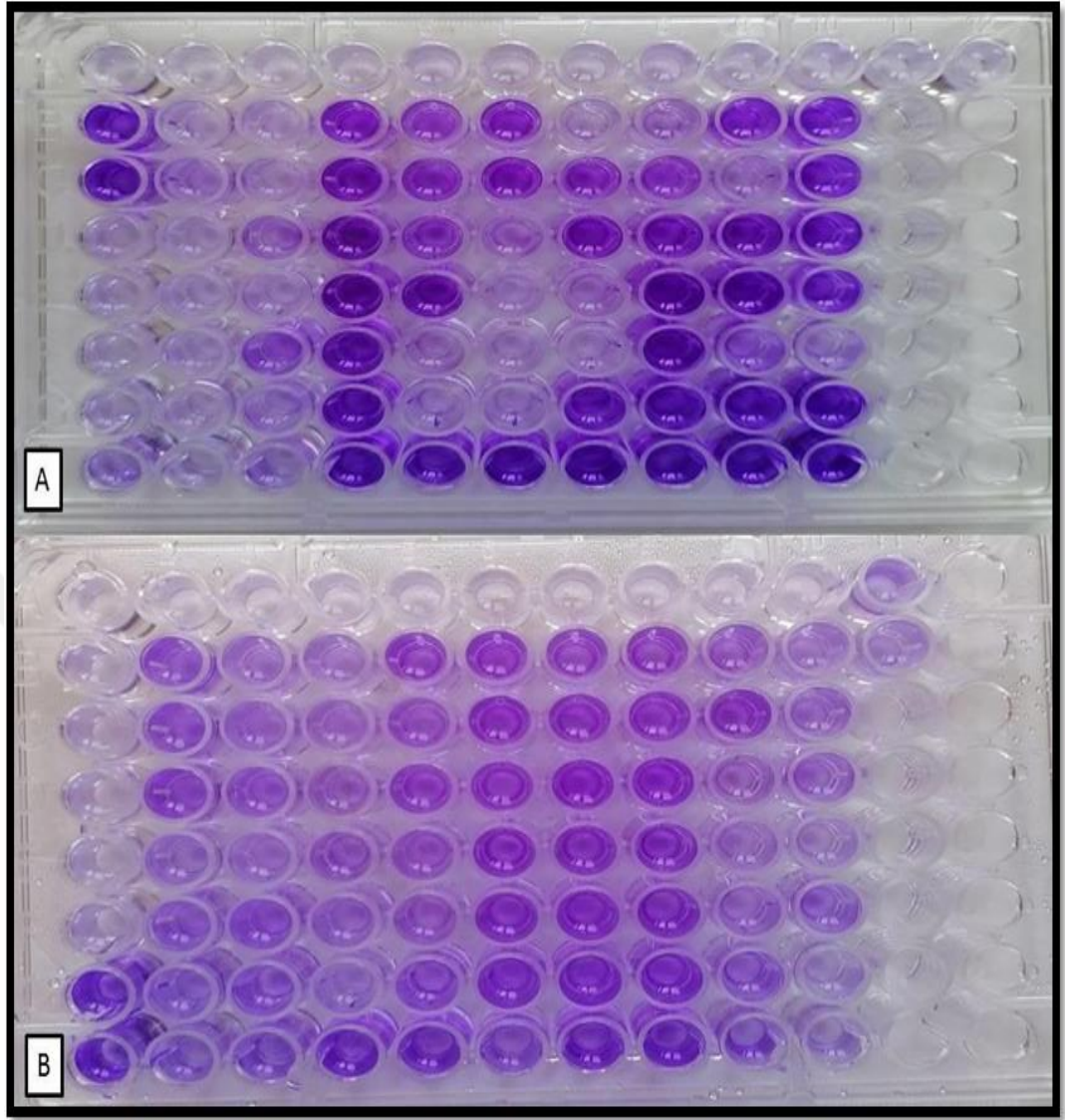
İzA1:G12olasyon kaynağı	Bakteri türleri	İzolasyon Sayısı	Ağır biyofilm	Orta derecede biyofilm	Zayıf biyofilm	Biyofilm üretmeyen
		(Toplam)	(%)	(%)	(%)	(%)
Ağız boşluğu	<i>Staphylococcus aureus</i>	13	1 (7,7)	(46,2) 6	1 (7,7)	5 (38,4)
	<i>Fusobacterium</i>	3	1 (33,3)	1 (33,3)	1 (33,3)	0 (0,0)
Nazofarenks	<i>H.influenzae</i>	3	0 (0,0)	0 (0,0)	3 (100,0)	0 (0,0)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	32	9 (28,1)	8 (25,0)	10 (31,3)	5 (15,6)
Balgam	<i>Streptococcus pyogenes</i>	18	4 (22,2)	7 (38,9)	5 (27,8)	2 (11,1)
	<i>H. influenzae</i>	11	1 (9,1)	3 (27,3)	4 (36,3)	3 (37,3)
Orofarenks	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	1 (16,7)	4 (66,6)	0 (0,0)	1 (16,7)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)
	<i>H. influenzae</i>	9	0 (0,0)	5 (55,6)	3 (33,3)	1 (11,1)
	Toplam	98	18 (18,36)	35(35,71)	28 (28,57)	17 (17,34)

Çizelge 4.15 Gram Negatif bakterilerin CRA ile biyofilm oluşumuna ilişkin sonuçlar

İzolasyon kaynağı	Bakteri türleri	İzolot Sayısı	Ağır biyofilm	Orta derecede biyofilm	Zayıf biyofilm	Biyofilm üretmeyen
		(Toplam)	(%)	(%)	(%)	(%)
Ağız boşluğu	<i>K. pneumonia</i>	6	2 (33,3)	1 (16,7)	2 (33,3)	1 (16,7)
	<i>K. oxytoca</i>	6	1 (16,7)	4 (66,6)	1 (16,7)	0 (0,0)
Nazofarenks	<i>K. pneumonia</i>	34	9 (26,5)	7 (20,6)	10 (29,4)	8 (23,5)
	<i>K. oxytoca</i>	9	1 (11,2)	2 (22,2)	4 (44,4)	2 (22,2)
	<i>A. baumannii</i>	8	0 (0,0)	5 (62,5)	1 (12,5)	2 (25,0)
	<i>P. aeruginosa</i>	20	2 (10,0)	3 (15,0)	9 (45,0)	6 (30,0)
	<i>M. catarrhalis</i>	13	3 (23,1)	4 (30,8)	1 (7,7)	5 (38,4)
	<i>Lactococcus lactis</i>	7	3 (42,8)	2 (28,6)	2 (28,6)	0 (0,0)
Orofarenks	<i>M. catarrhalis</i>	6	0 (0,0)	1 (16,7)	3 (50,0)	2 (33,3)
	<i>M. tuberculosis</i>	7	1 (14,3)	4 (57,1)	2 (28,6)	0 (0,0)
Balgam	<i>M. catarrhalis</i>	6	0 (0,0)	1 (16,7)	1 (16,7)	4 (66,6)
	<i>E. coli</i>	3	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)
	<i>P. aeruginosa</i>	8	0 (0,0)	3 (37,5)	3 (37,5)	2 (25,0)
	Toplam	136	22 (16,17)	39 (28,67)	42 (30,88)	33(24,26)

4.8.2 Mikrotitre plaka (MTP) yöntemi

Patojenlerimizin biyofilm üretme kabiliyeti mikrotitre plaka deneyi kullanılarak kantitatif olarak değerlendirilmiştir. Önceden sterilize edilmiş, düz tabanlı, 96 kuyulu, polistiren mikrotitre plakaları kullanılmış ve ardından absorbands 490 nm'de bir ELISA okuyucu ile belirlenmiştir. Absorbans okuması mikrotitre kuyularının yüzeyine yapışan biyofilmin kalınlık derecesini karakterize etmiştir (Şekil 4.10). Değerin 0,12'den büyük olması biyofilm oluşumu için pozitif kabul edilmiştir (Namvar *et al.* 2013). Toplam 150 örnekten 145 izolat (%96,7) biyofilm oluşturmuştur. Bunlardan %50'si orta düzeyde, %46,7'si ağır ve sadece beş izolat (%3,3) biyofilm oluşturmayan olarak gruplandırılmıştır.



Şekil 4.10 Mikrotitre plaka yönteminde (A) Gram pozitif (B) Gram-negatif bakteriler

Mikrotitre plakası test yönteminin biyofilm tespiti için CRA ve tüp yöntemlerinden daha doğru ve tekrarlanabilir olduğu ve mikroorganizmaların tıbbi izolatları tarafından biyofilm üretiminin belirlenmesi için güvenilir bir kantitatif yöntem olarak hizmet edebileceği bildirilmiştir. MTP yöntemi çok spesifik ve hassastır ve biyofilm tespiti için önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmanın sonuçları (Oliveira and Cunha 2010, Knobloch *et al.* 2002) tarafından açıklanan sonuçlarla tamamen uyumludur ve bunun nedeni büyük olasılıkla negatif ve pozitif biyofilm oluşturucuları ayırt etmek için ELISA okuyucusunun kullanılmasıdır (Çizelge 4.16).

Çizelge 4.16 MTP yönteminde Gram Pozitif bakterilerin biyofilm oluşumu sonuçları

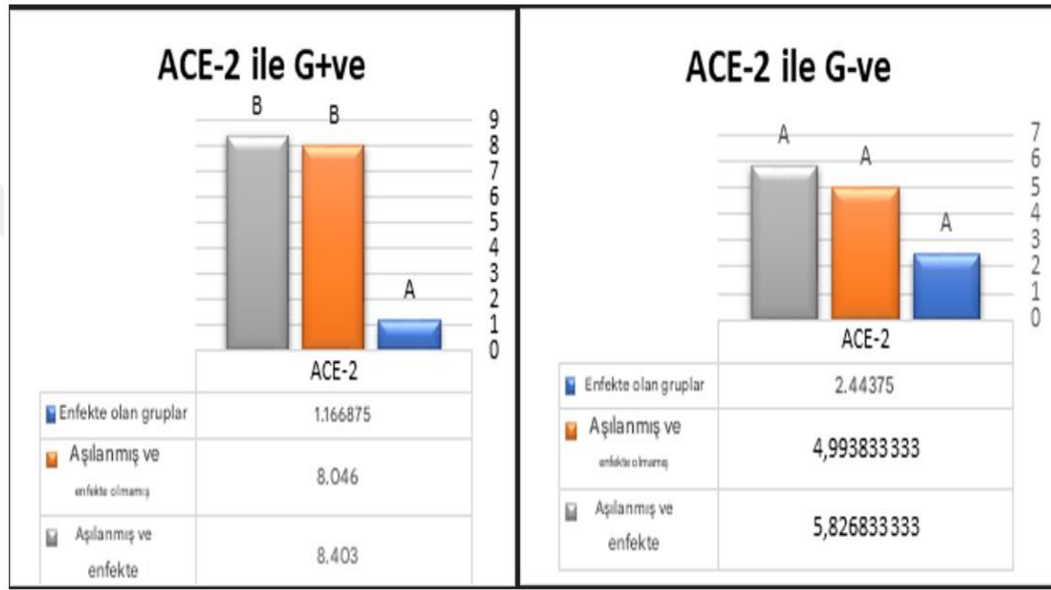
İzolasyon kaynağı	Bakteri türleri	İzolasyon Sayısı (Toplam)	Ağır biyofilm (%)	Orta derecede biyofilm (%)	Zayıf biyofilm (%)	Biyofilm üretmeyen (%)
Ağız boşluğu	<i>Staphylococcus aureus</i>	16	6 (37,5)	5 (31,3)	2 (12,5)	3 (18,7)
	<i>Fusobacterium</i>	3	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0,0)	0 (0,0)
Nazofarenks	<i>H. influenzae</i>	3	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (33,3)	0 (0,0)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	30	13 (43,3)	8 (26,7)	6 (20,0)	3 (10,0)
Orofarenks	<i>Streptococcus pyogenes</i>	17	5(29,4)	7 (41,2)	3 (17,6)	2 (11,8)
	<i>H. influenzae</i>	8	3 (37,5)	2 (25,0)	2 (25,0)	1 (12,5)
Balgam	<i>Staphylococcus aureus</i>	6	2 (33,3)	3 (50,0)	0 (0,0)	1 (16,7)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	5	2 (40,0)	1 (20,0)	2 (40,0)	0 (0,0)
	<i>H. influenzae</i>	10	2 (20,0)	5 (50,0)	3 (30,0)	0 (0,0)
	Toplam	98	37 (37,7)	32 (32,65)	17 (17,34)	10(10,20)

Çizelge 4.17 MTP yönteminde Gram Negatif bakterilerin biyofilm oluşumu sonuçları

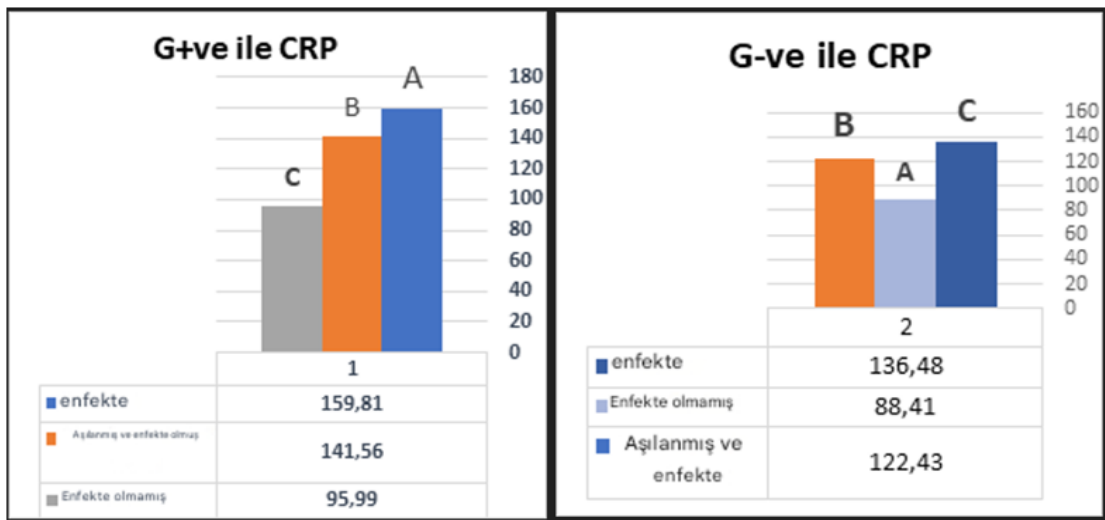
İzolasyon kaynağı	Bakteri türleri	İzolasyon Sayısı (Toplam)	Ağır biyofilm (%)	Orta derecede biyofilm (%)	Zayıf biyofilm (%)	biyofilm üretmeyen (%)
Ağız boşluğu	<i>K. pneumoniae</i>	4	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	0 (0,0)
	<i>K. oxytoca</i>	6	3 (50,0)	2 (33,3)	1 (16,7)	0 (0,0)
Nazofarenks	<i>K. pneumoniae</i>	17	3 (17,6)	8 (47,1)	6 (35,3)	0 (0,0)
	<i>K. oxytoca</i>	9	2 (22,2)	5 (55,6)	2 (22,2)	1 (11,1)
	<i>A. baumannii</i>	8	2 (25,0)	3 (37,5)	2 (25,0)	1 (12,5)
	<i>P. aeruginosa</i>	17	4 (23,5)	6 (35,3)	5 (29,4)	2 (11,8)
	<i>Lactococcus lactis</i>	10	2 (20,0)	4 (40,0)	2 (20,0)	2 (20,0)
Orofarenks	<i>M. catarrhalis</i>	13	4 (30,8)	6 (46,2)	0 (0,0)	3 (23,0)
	<i>Neisseria</i>	4	1 (25,0)	2 (50,0)	0 (0,0)	1 (25,0)
Balgam	<i>M. tuberculosis</i>	11	4 (36,4)	4 (36,4)	1 (9,1)	2 (18,1)
	<i>M. catarrhalis</i>	5	2 (40,0)	1 (20,0)	1 (20,0)	1 (20,0)
	<i>E. coli</i>	3	0 (0,0)	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)
	<i>P. aeruginosa</i>	9	1 (11,1)	4 (44,5)	2 (22,2)	2 (22,2)
	Toplam	116	30 (25,8)	47 (40,5)	25(21,5)	15(12,9)

4.9 Gram-Pozitif ve Gram-Negatif Bakterilerin İmmünolojik Parametrelerle İlişkileri

Çalışmamız, sekonder bakteriyel pnömoni hastalarında ACE-2 düzeyleri açısından Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler arasında anlamlı bir fark ($P<0,05$) olduğunu belirlemiştir (Şekil 4.11) (Şekil 4.12).

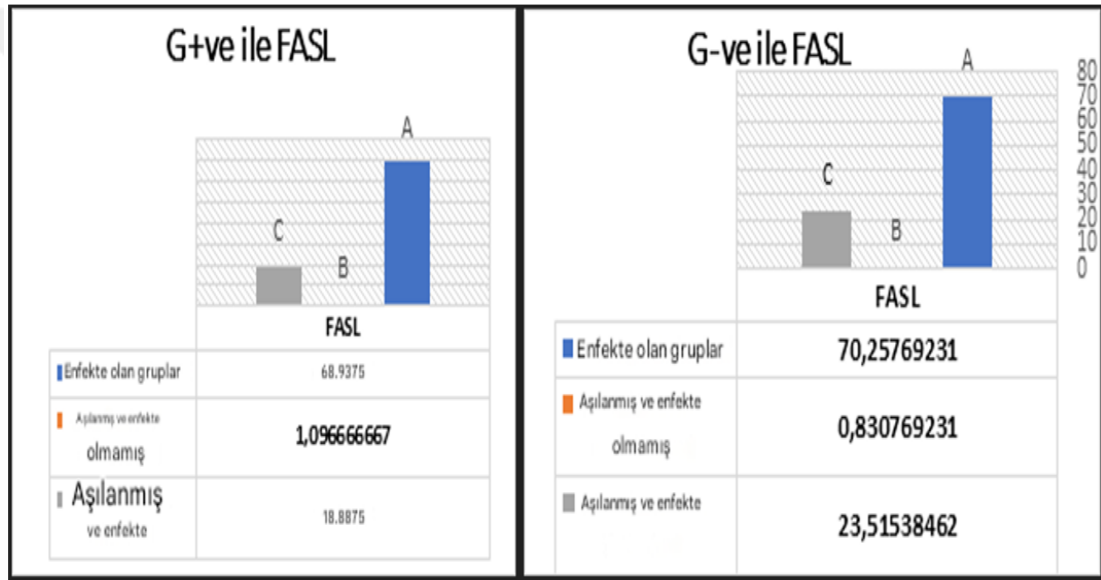


Şekil 4.11 ACE-2'nin G-pozitif ve G-negatif bakterilerle ilişkisi

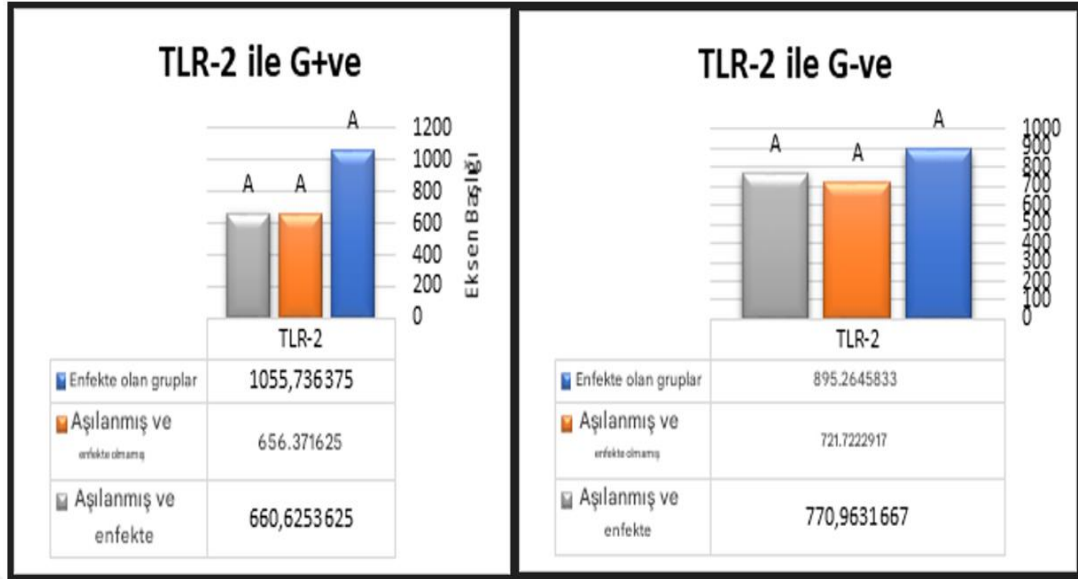


Şekil 4.12 CRP'nin G-pozitif ve G-negatif bakterilerle ilişkisi

Abe *et al.* (2010), Gram-negatif bakteriyemide immünolojik seviyelerin Gram-pozitif bakteriyemiye kıyasla belirgin şekilde daha yüksek olduğunu keşfetmiştir. Kumar and Rizvi (2010) bakteriyel enfeksiyonların Gram-pozitif ya da Gram-negatif olması arasında CRP düzeyleri açısından bir fark bulamamıştır. Liu *et al.* (2017) ve Bassetti *et al.* (2020) tarafından tespit edildiği gibi, enfeksiyonun Gram-pozitif veya negatif olması CRP düzeylerinde farklılık yaratmamıştır. Vandijck *et al.* (2007) artmış WBC ve CRP değerlerinin Gram-negatif bakterilerle ilişkili olduğunu, Gram-pozitif bakterili hastalarda ise WBC ve CRP değerlerinin çok stabil olduğunu belirtmektedir (Şekil 4.13) (Şekil 4.14) (Şekil 4.15).



Şekil 4.13 G-Pozitif ve G-Negatif bakterilerin FASL ile ilişkileri



Şekil 4.14 G-Pozitif ve G-Negatif bakterilerin TLR-2 ile ilişkileri

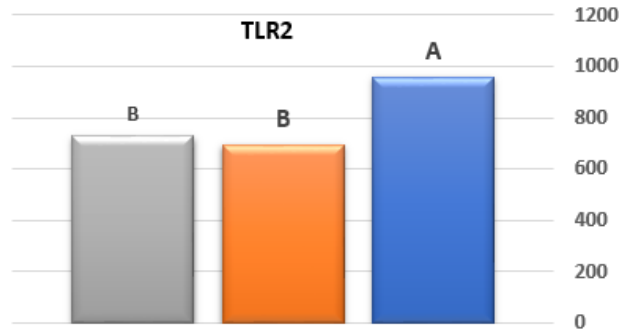


Şekil 4.15 G-Pozitif ve G-Negatif bakterilerin TLR-2 ile ilişkileri

4.10 İkincil Bakteriyel Pnömonisi Olan COVID-19 Hastalarında İmmünolojik Belirteç

4.10.1 İkincil bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında ve kontrol grubunda TLR-2 düzeyi

Araştırma, ikincil bakteriyel enfeksiyonu olan COVID-19 hastalarında ($1121,1 \pm 180,6$ pg/mL) TLR-2 seviyesinde pozitif kontrole ($752 \pm 97,82$ pg/mL) kıyasla oldukça anlamlı bir artış olduğunu gösterirken, ikincil bakteriyel enfeksiyonla enfekte olan COVID-19 aşıklı katılımcılarda ($779,2 \pm 180,6$ pg/mL) TLR-2 seviyeleri pozitif kontrollerden ($752 \pm 97,82$ pg/mL) önemli ölçüde farklı değildir (Şekil 4.16).

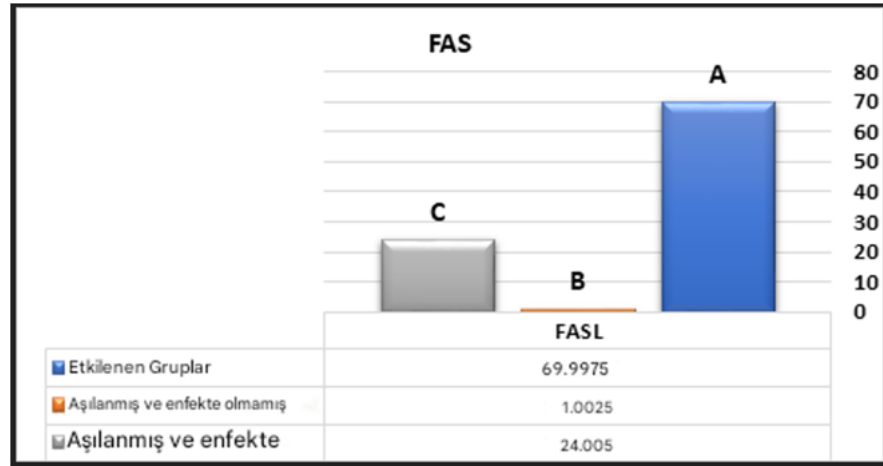


P değeri: 0,012 F testi: 4,773

Şekil 4.16 Bakteriyel pnömonili COVID-19 hastalarında TLR-2 seviyesi

4.10.2 Sekonder pnömonisi olan COVID-19 hastalarında FASL düzeyi

Araştırma, eş zamanlı bakteriyel enfeksiyonu olan COVID-19 hastalarında ($69,99 \pm 8,483$ pg/mL), kontrol bireylerine ($1,002 \pm 0,573$ pg/mL) kıyasla FASL seviyelerinde ve eş zamanlı bakteriyel enfeksiyonu olan COVID-19 aşıklı enfekte bireylerde ($24,00 \pm 5,119$ pg/mL), kontrol bireylerine ($1,002 \pm 0,573$ pg/mL) kıyasla TLR-2 seviyelerinde kayda değer bir artış olduğunu ortaya koymuştur. Bu bulgu istatistiksel olarak anlamlıdır ($P < 0,05$) (Şekil 4.17).

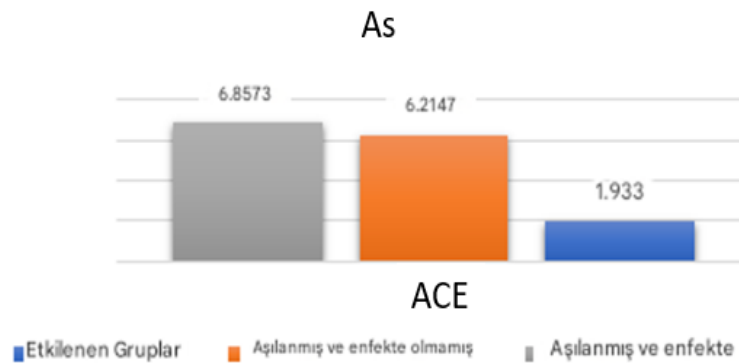


P değeri: 0,000 F test: 751,691

Şekil 4.17 Bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında FASL seviyesi

4.10.3 Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında ACE düzeyi

Araştırma çalışması, ikincil bakteriyel enfeksiyonu olan COVID-19 hastalarındaki ACE seviyelerini (2,195+2,380 pg/mL), enfekte olmayan COVID-19 kontrol grubuyla (1,88+1,206 pg/mL) karşılaştırarak çarpıcı sonuçlar ortaya koymuştur. İkincil bakteriyel enfeksiyonu olan COVID-19 aşıları hastalarda ACE seviyeleri (2,281+1,103) pg/mL seviyeleri de çok daha yüksek enfektif kontrol grubuna (1,88+1,206 pg/mL) kıyasla rapor edilmiştir. Sonuçlar önemli ölçüde farklıdır ($P < 0,05$) (Şekil 4.18).

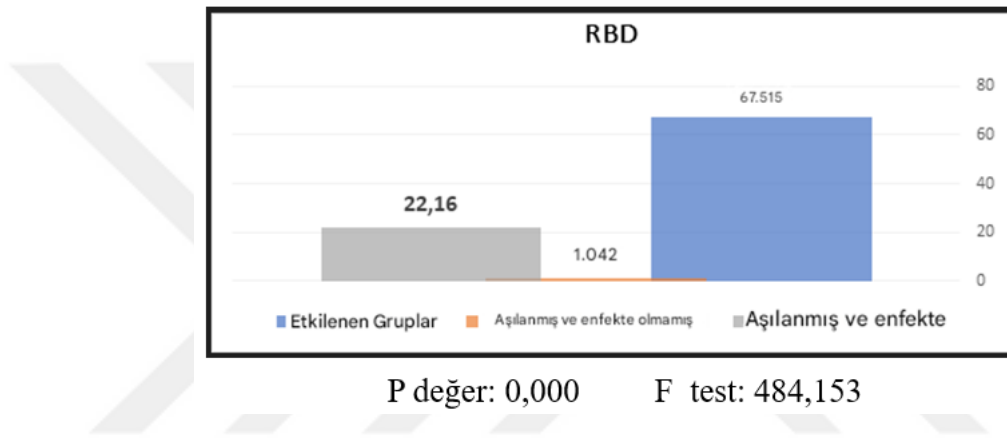


P değeri: 0,039 F test: 3,432

Şekil 4.18 Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında ve kontrol grubunda ACE düzeyi

4.10.4 Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında RBD düzeyi

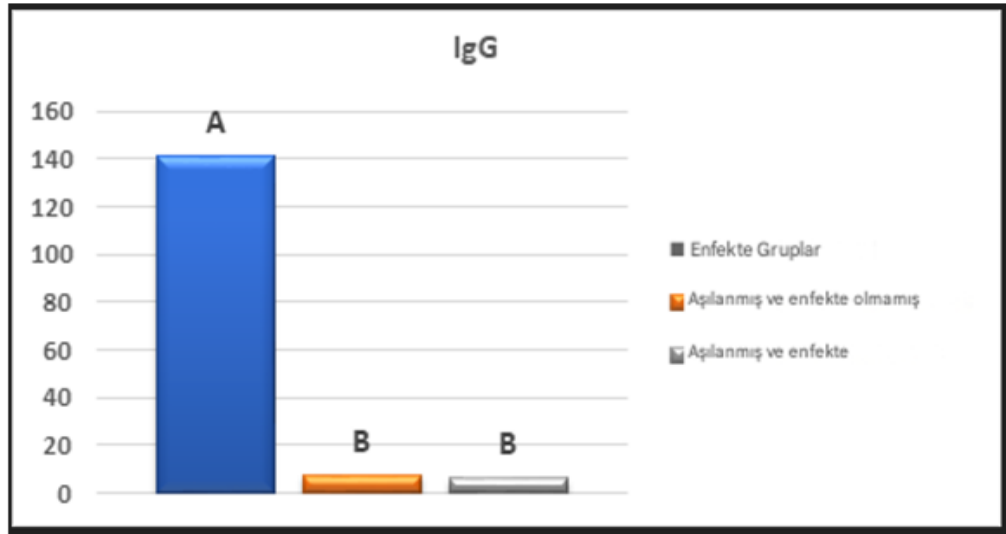
Araştırma, ikincil bakteriyel enfeksiyonu olan COVID-19 hastasında ($67,51 \pm 10,33$ pg/mL) kontrol grubuna kıyasla ($1,042 \pm 0,560$ pg/mL) RBD seviyelerinin oldukça arttığını göstermiştir. Bununla birlikte, sekonder bakteriyel enfeksiyon ile enfekte COVID-19 aşılanmış hasta ile kontrol grubu karşılaştırıldığında RBD seviyelerinde $22,16 \pm 5,983$ pg/mL değerinde bir artış görülmüştür. Sonuç anlamlıdır ($P < 0,05$) (Şekil 4.19).



Şekil 4.19 Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında ve kontrol grubunda RBD düzeyi

4.10.5 Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında IgG düzeyi

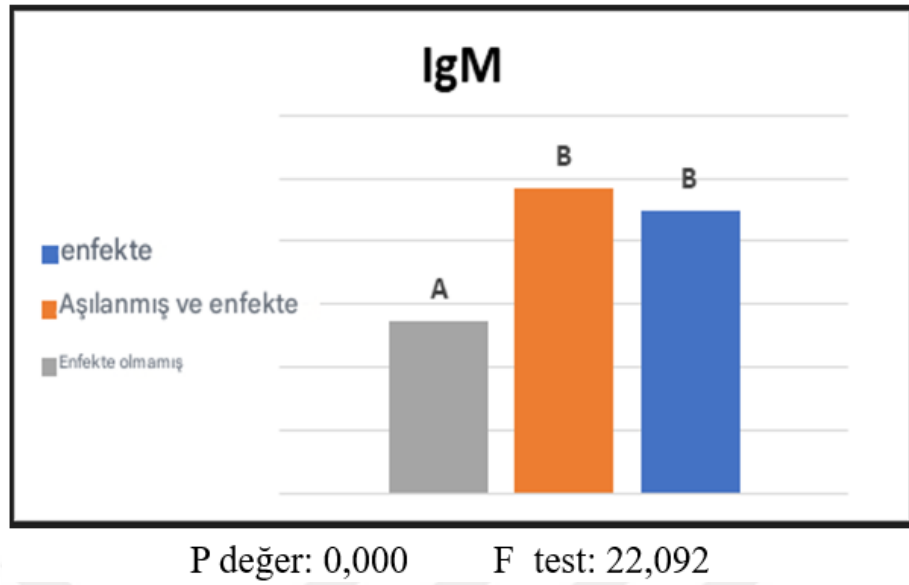
Çalışma, sekonder bakteriyel enfeksiyonu olan COVID-19 hastalarında IgG seviyelerinde ($141,453 \pm 33,38$ pg/mL) kontrol grubuna ($7,565 \pm 1,50$ pg/mL) kıyasla oldukça anlamlı bir artış olduğunu bildirirken, sekonder bakteriyel enfeksiyonla enfekte COVID-19 aşıları hastalarda IgG seviyeleri ($6,184 \pm 0,47$ pg/mL) kontrol grubuna ($7,565 \pm 1,50$ pg/mL) kıyasla oldukça anlamlı bir artış göstermiştir. Sonuç anlamlıdır ($P < 0,05$) (Şekil 4.20).



Şekil 4.20 Sekonder bakteriyel pnömonisi olan COVID-19 hastalarında IgG düzeyi

4.10.6 Sekonder bakteriyel enfeksiyonlu hastalarda IgM düzeyi

Çalışma, sekonder bakteriyel enfeksiyonu olan COVID-19 hastalarında IgM seviyelerinde ($5,48 \pm 0,939$ pg/mL) kontrol grubuna ($1,002 \pm 0,573$ pg/mL) kıyasla oldukça anlamlı bir artış olduğunu, sekonder bakteriyel enfeksiyonla enfekte COVID-19 aşıları hastalarda ise IgM seviyelerinde ($24,00 \pm 5,119$ pg/mL) kontrol grubuna ($1,002 \pm 0,573$ pg/mL) kıyasla oldukça anlamlı bir artış olduğunu bildirmiştir. Sonuç anlamlıdır ($P < 0,05$) (Şekil 4.21).



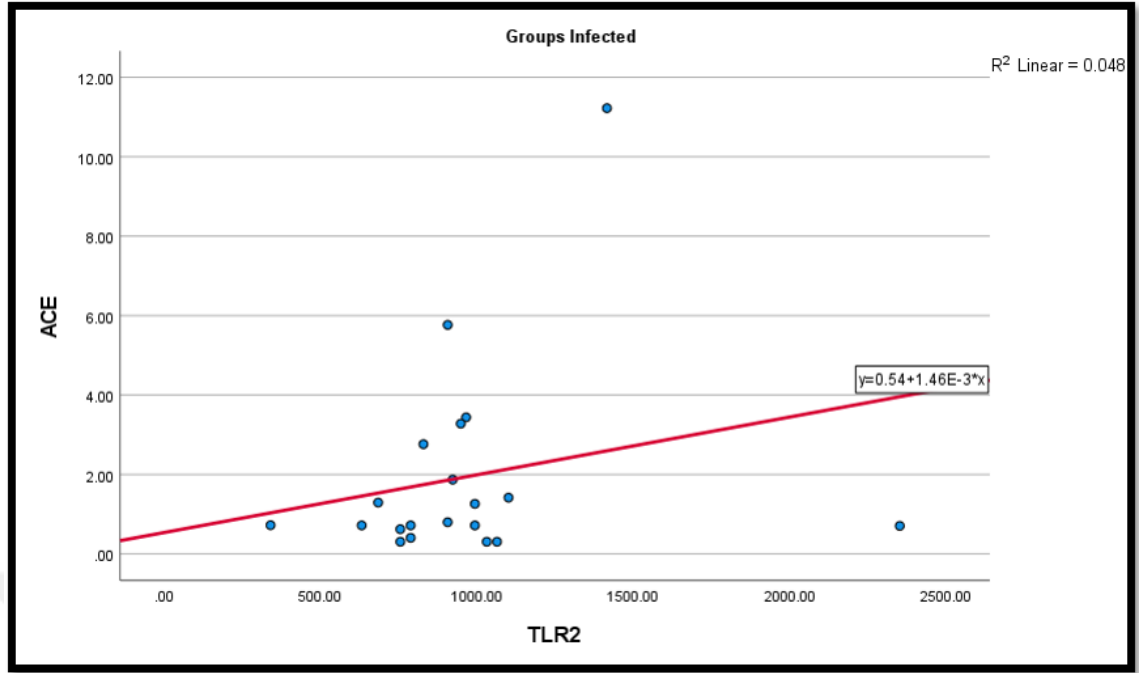
Şekil 4.21 Pnömonili COVID-19 hastalarında ve kontrol grubunda IgM düzeyi

SARS-CoV-2'ye karşı tek koruyucu yanıtın humoral bağışıklık olmadığını belirtmek gerekir. NAb'lere yanıt veren CoronaVac aşı hastaların, yanıt vermeyenlere kıyasla önemli ölçüde daha yüksek anti-spike IgG seviyesine ve daha fazla spike spesifik hafıza B hücresi üretme eğilimine sahip olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, iyileşen hastalara kıyasla benzer bellek CD8 T hücreleri ve bellek CD4 T hücreleri titreleri göstermişlerdir. Grubuna bu adaptif bağışıklık, hastalığın şiddetinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir (Ebinger *et al.* 2021). Üreticinin açıklamasına göre, test sonucunun serokonversiyon oranı, kontrol grubuna kıyasla aşılanmış kişiler için pozitif veya negatif olarak kabul edilir. Öte yandan, aşılanmış bireylerin SARS-Cov2 anti-RBD IgG ile enfekte olma olasılığı daha yüksektir. Çalışmamızla uyumlu diğer çalışmalarda, Sughayer *et al.* (2022) bu vakalarda ortalama anti-RBD IgG antikor titresinin anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmiştir. Ayrıca, Pfizer/BioNTech ile aşılanan kişiler arasında bir aşı dozundan sonra numune almak için geçen ortalama süre gün olarak anlamlı bir fark olmadığından, aşılama zamanının ve numune toplama süresinin Katılımcıların serumundaki serokonversiyon oranı veya antikor titresini üzerinde bir etkisi olmaması mümkündür. Aktif viral gelişim aşamasında, semptomların ortaya çıkmasından iki hafta sonra viral yükler azalır (Zhang *et al.* 2020b). Long *et al.* (2020) IgM ve IgG için ortalama serokonversiyon sürelerinin sırasıyla 12 ve 14 gün olduğunu göstermiştir. Bazı çalışmalar, immünolojik testleri değerlendirirken, bu testlerin pozitifliğinin IgG ve IgM antikorlarını tespit etmek için

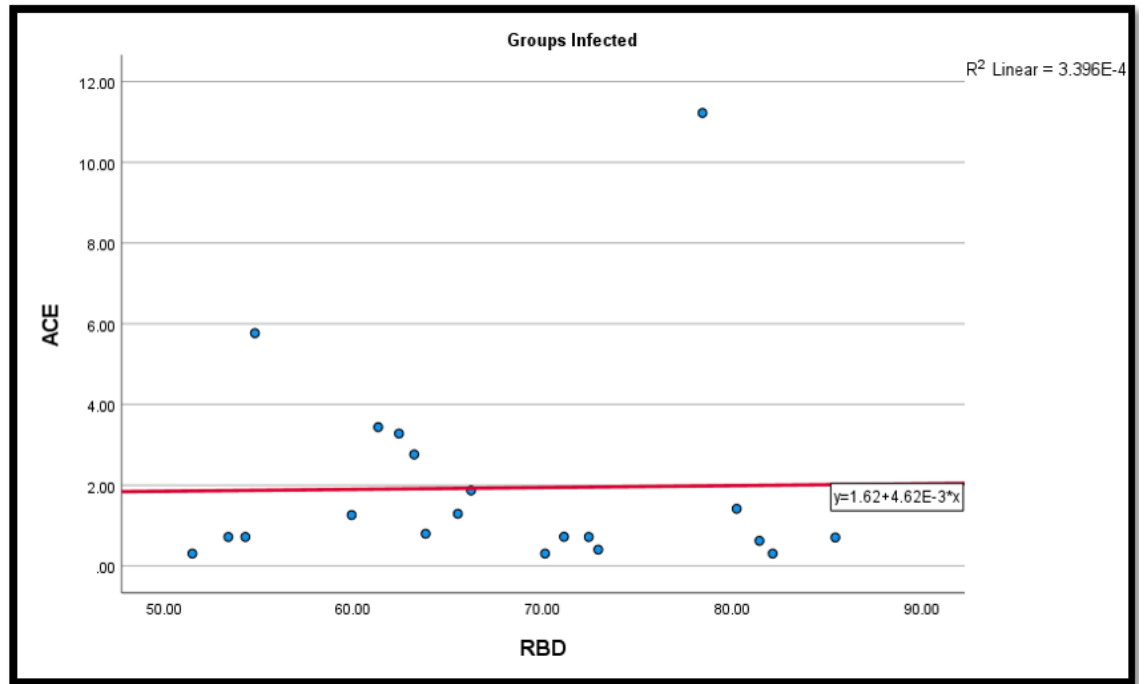
değiştiğini göstermiştir (semptomların ortaya çıkmasından 6-10 gün sonra hariç (Trabaud *et al.* 2020). Hastaların yaklaşık %80'inde antikorların değeri düşerken (Forni and Mantovani 2021), aşılarla karşı az miktarda IgM yanıtı gözlenmiştir ve bu Callegaro *et al.* (2021) ile tutarlıdır (Çizelge 4.18) (Çizelge 4.19) (Çizelge 4.20) (Şekil 4.22) (Şekil 4.23) (Şekil 4.24) (Şekil 4.25) (Şekil 4.26) (Şekil 4.27) (Şekil 4.28) (Şekil 4.29) (Şekil 4.30) (Şekil 4.31) (Şekil 4.32) (Şekil 4.33) (Şekil 4.34) (Şekil 4.35) (Şekil 4.35) (Şekil 4.37) (Şekil 4.38) (Şekil 4.39) (Şekil 4.40) (Şekil 4.41) (Şekil 4.42) (Şekil 4.43) (Şekil 4.44) (Şekil 4.45) (Şekil 4.46) (Şekil 4.47) (Şekil 4.48) (Şekil 4.49) (Şekil 4.50) (Şekil 4.51) (Şekil 4.52) (Şekil 4.53) (Şekil 4.54) (Şekil 4.55) (Şekil 4.56) (Şekil 4.57) (Şekil 4.58) (Şekil 4.59) (Şekil 4.60) (Şekil 4.61) (Şekil 4.62) (Şekil 4.63) (Şekil 4.64) (Şekil 4.65).

Çizelge 4.18 Bağışıklık düzeyi korelasyon sonuçları

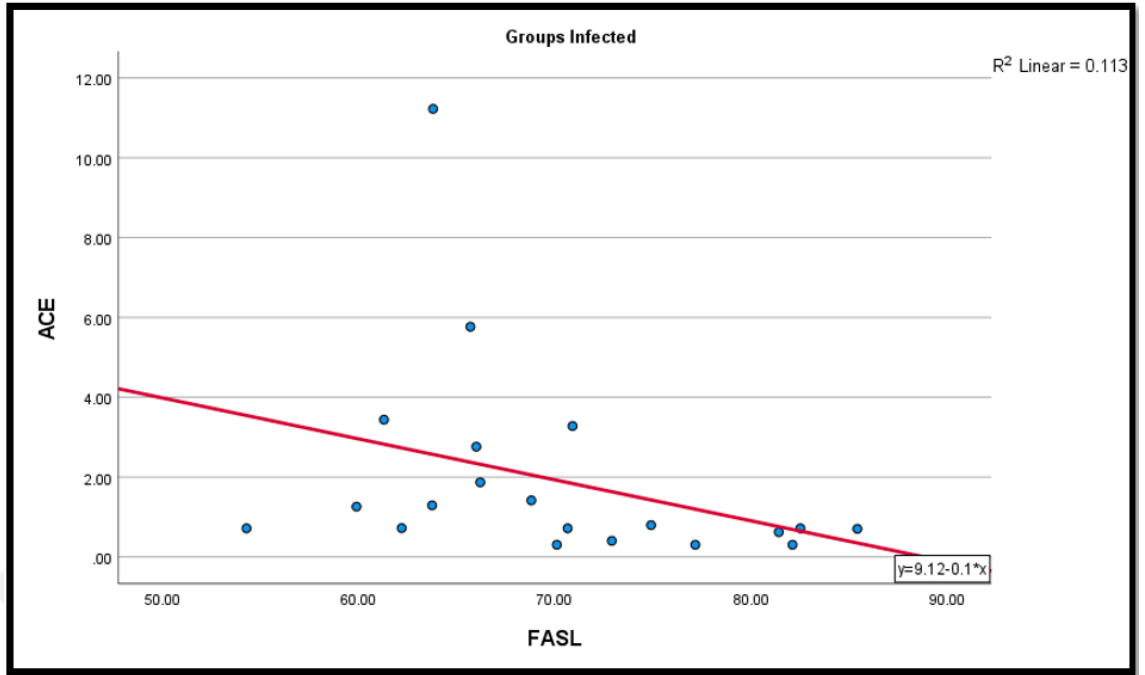
Korelasyonlar							
		TLR2	As	RBD	FAS	IgG	IgM
TLR2	Pearson Korelasyonu	1	.220	.461*	.399	-.079-	-.129-
	Sig. (2-tailed)		.352	.041	.081	.741	.589
As	Pearson Korelasyonu	.220	1	.018	-.336-	.128	.114
	Sig. (2-tailed)	.352		.939	.147	.591	.633
RBD	Pearson Korelasyonu	.461*	.018	1	.515*	.262	-.408-
	Sig. (2-tailed)	.041	.939		.020	.265	.074
FAS	Pearson Korelasyonu	.399	-.336-	.515*	1	.337	-.650-**
	Sig. (2-tailed)	.081	.147	.020		.147	.002
IgG	Pearson Korelasyonu	-.079-	.128	.262	.337	1	-.564-**
	Sig. (2-tailed)	.741	.591	.265	.147		.010
IgM	Pearson Korelasyonu	-.129-	.114	-.408-	-.650-**	-.564-**	1
	Sig. (2-tailed)	.589	.633	.074	.002	.010	
*. Korelasyon 0,05 düzeyinde Sig. (2-tailed) anlamlıdır.							
**. Korelasyon 0,01 düzeyinde Sig. (2-tailed) anlamlıdır.							



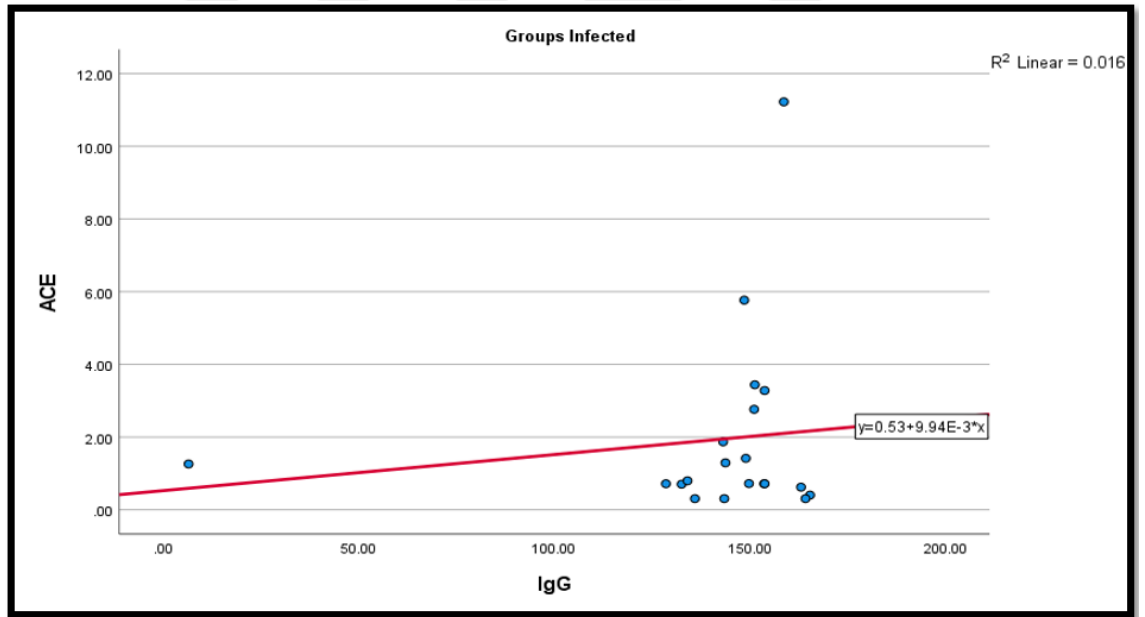
Şekil 4.22 Enfekte TLR-2 grubu ile ACE arasındaki korelasyon



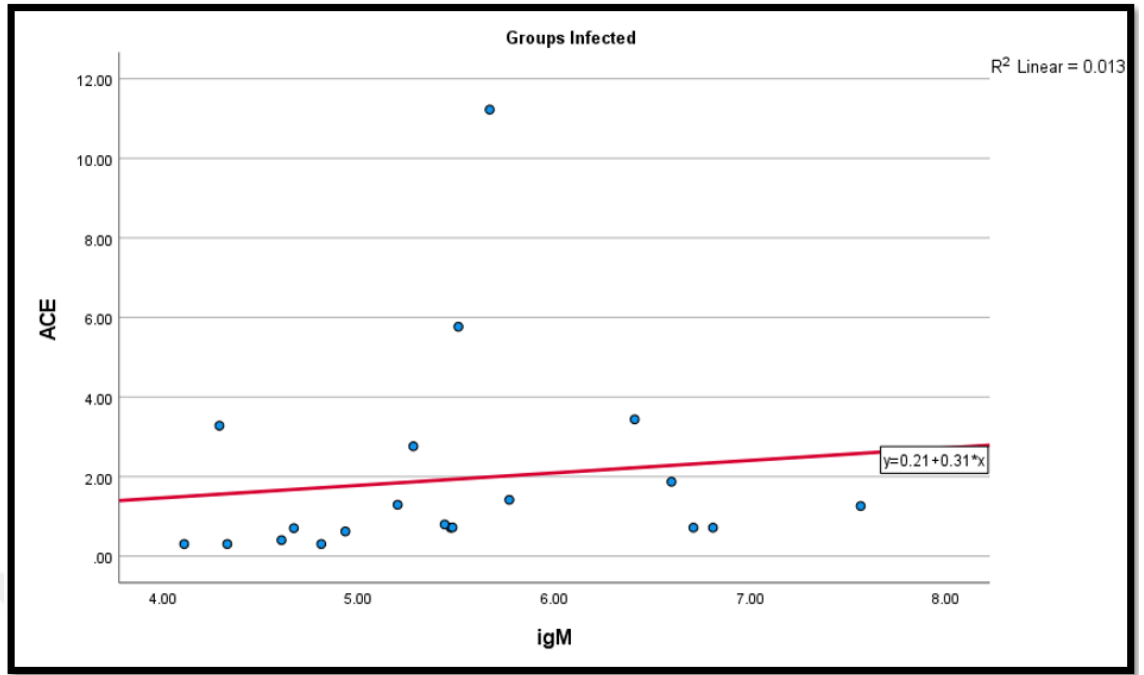
Şekil 4.23 Enfekte RBD grubu ve ACE arasındaki korelasyon



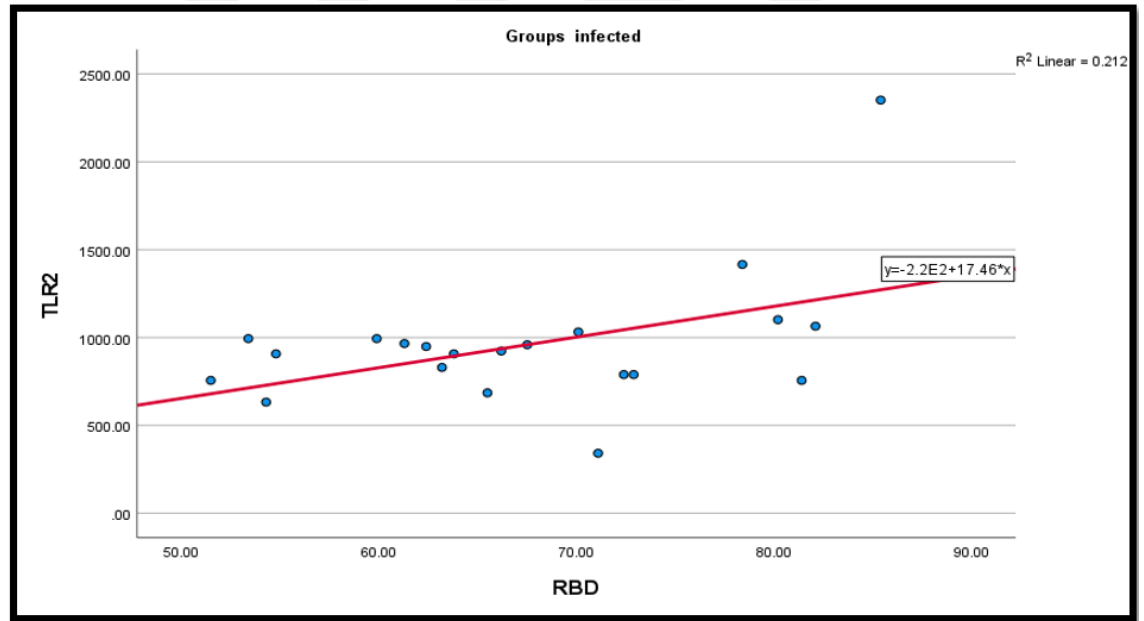
Şekil 4.24 FASL ve ACE'nin enfekte grubu arasındaki korelasyon



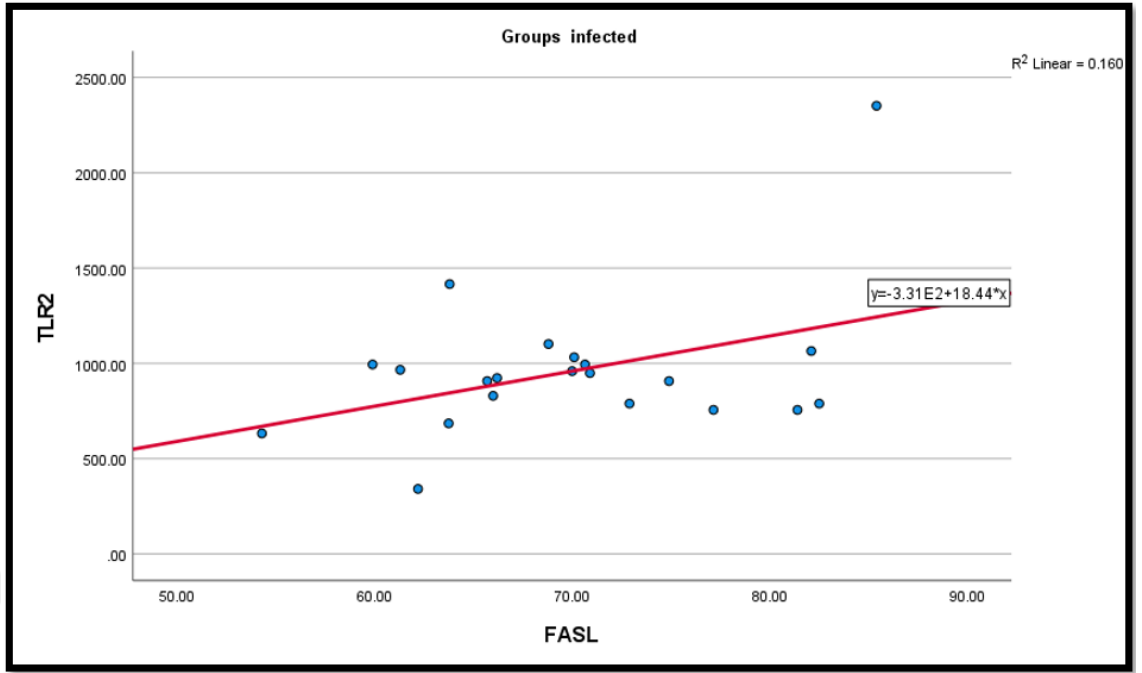
Şekil 4.25 Enfekte IgG grubu ile ACE arasındaki korelasyon



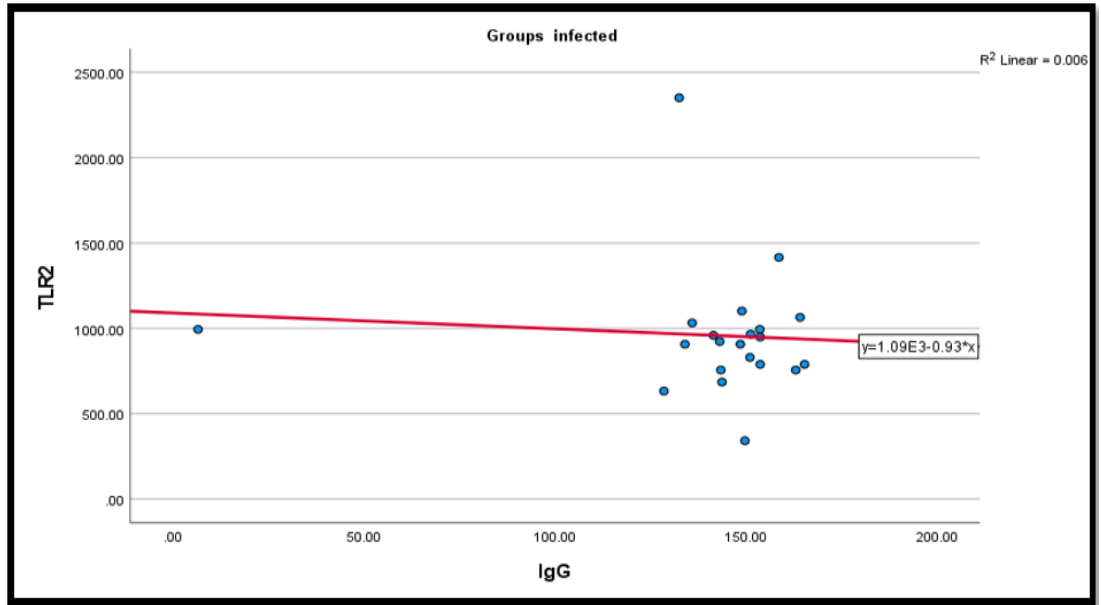
Şekil 4.26 Enfekte IgM grubu ile ACE arasındaki korelasyon



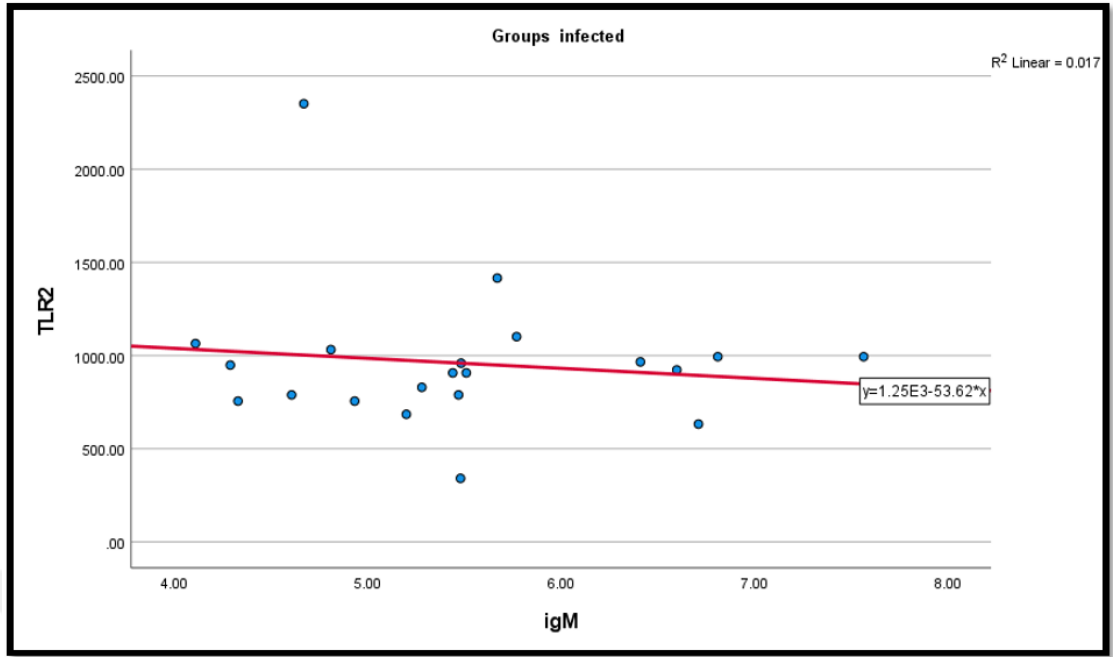
Şekil 4.27 Enfekte RBD grubu ile TLR-2 arasındaki korelasyon



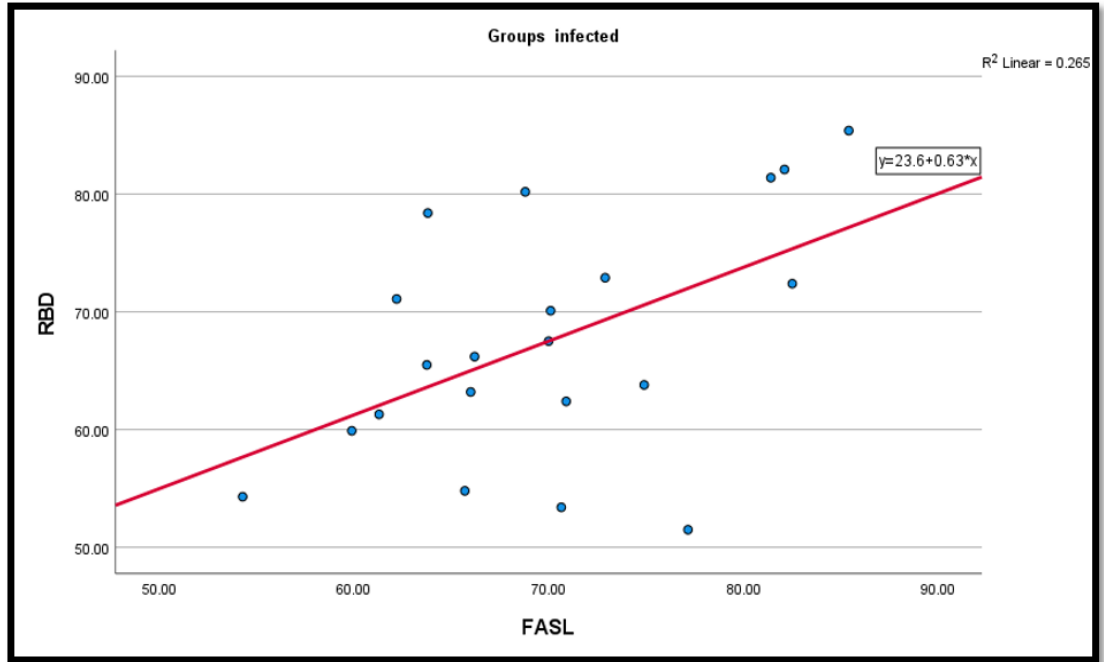
Şekil 4.28 FASL ve TLR-2'nin enfekte grubu arasındaki korelasyon



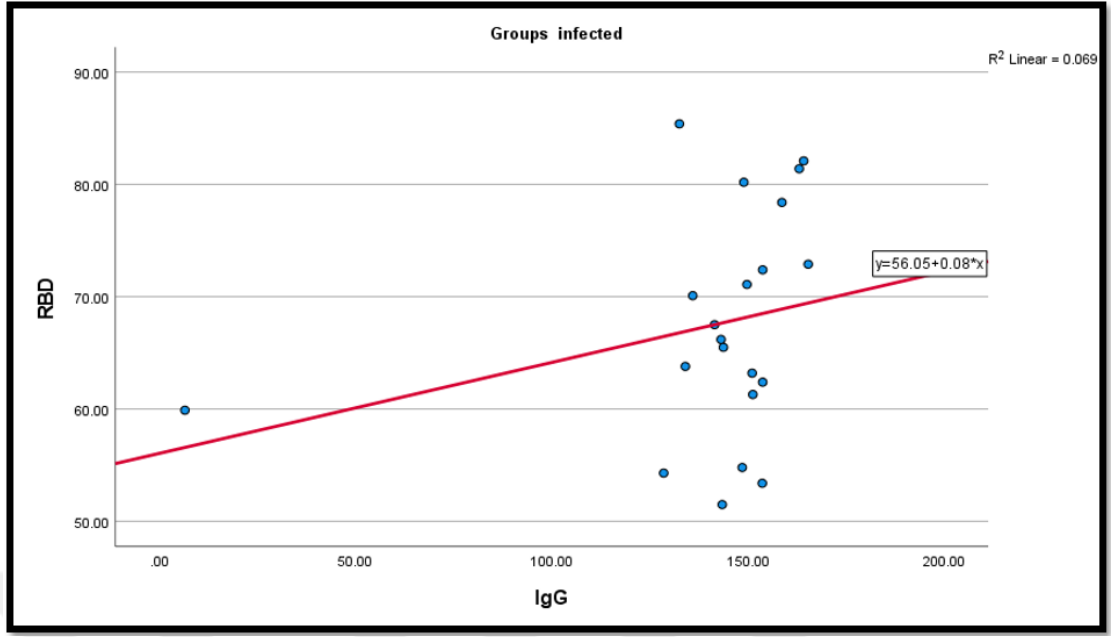
Şekil 4.29 Enfekte IgG grubu ile TLR-2 arasındaki korelasyon



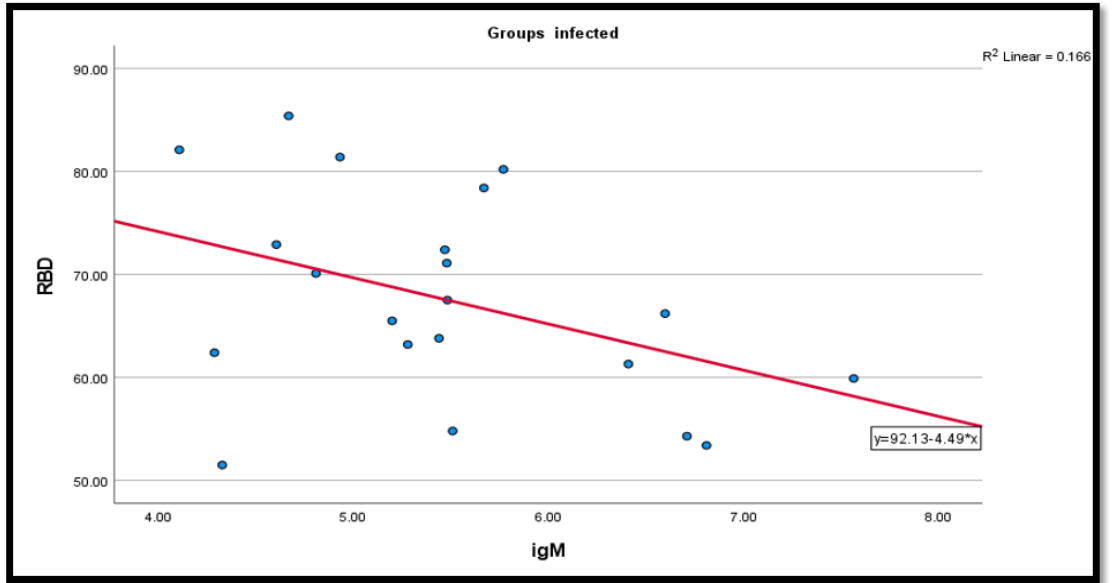
Şekil 4.30 Enfekte IgM grubu ile TLR-2 arasındaki korelasyon



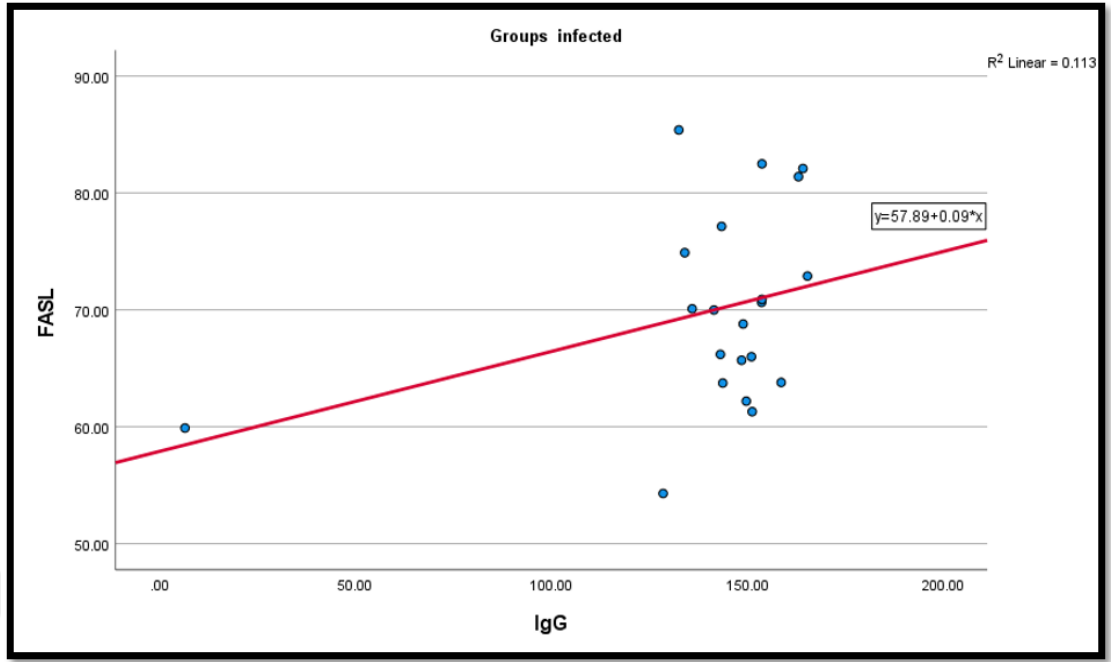
Şekil 4.31 FASL ve RBD'nin enfekte grubu arasındaki korelasyon



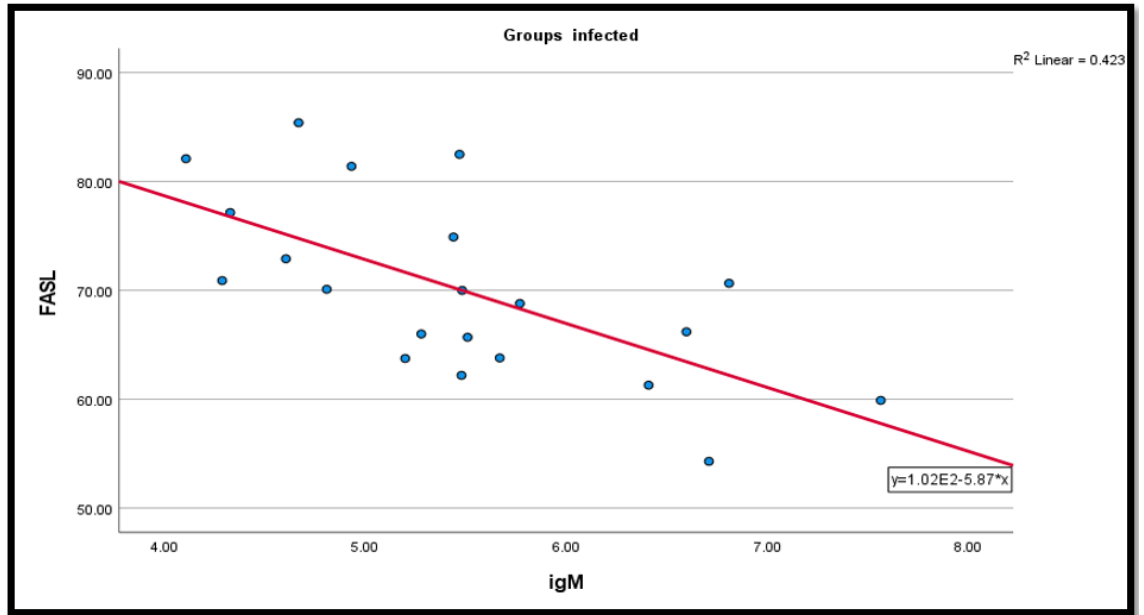
Şekil 4.32 Enfekte IgG grubu ile RBD arasındaki korelasyon



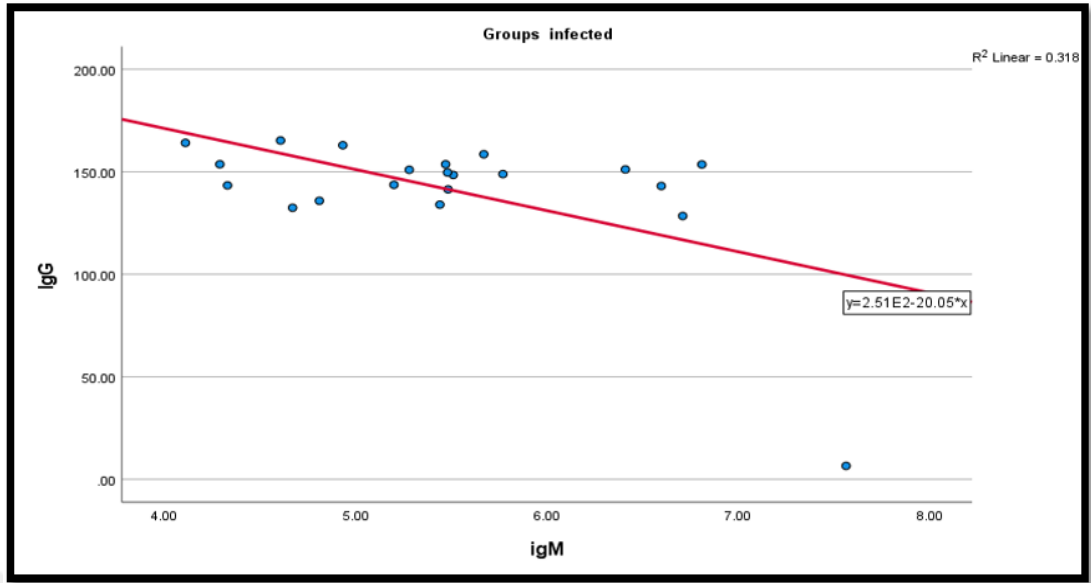
Şekil 4.33 Enfekte IgM grubu ile RBD arasındaki korelasyon



Şekil 4.34 Enfekte IgG grubu ile FASL arasındaki korelasyon



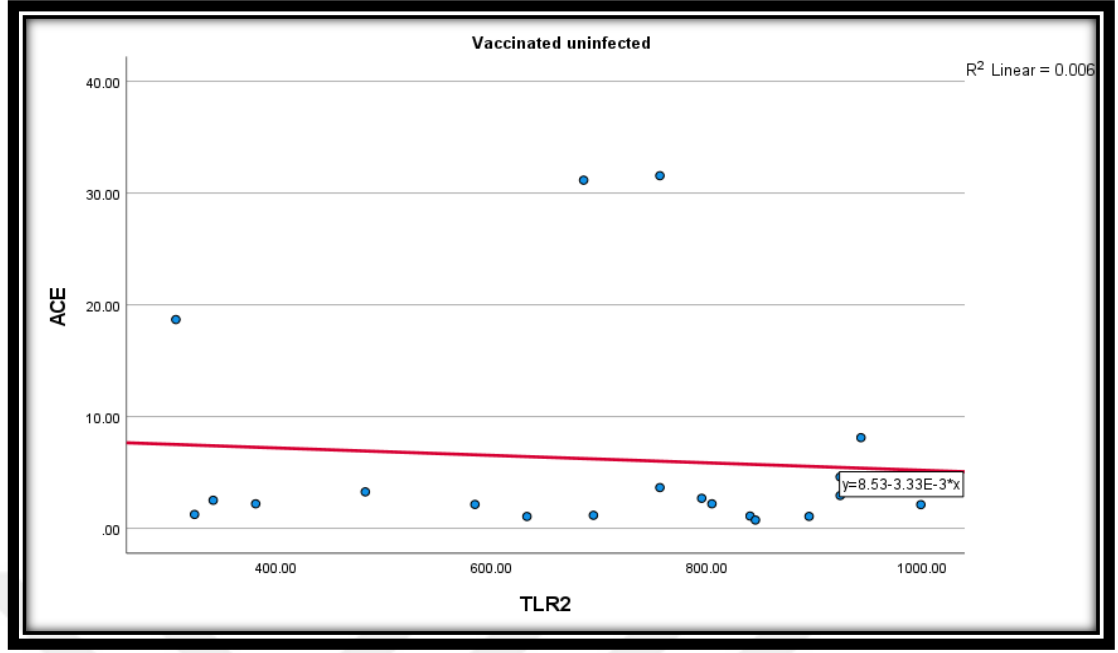
Şekil 4.35 Enfekte IgM ve FASL grubu arasındaki korelasyon



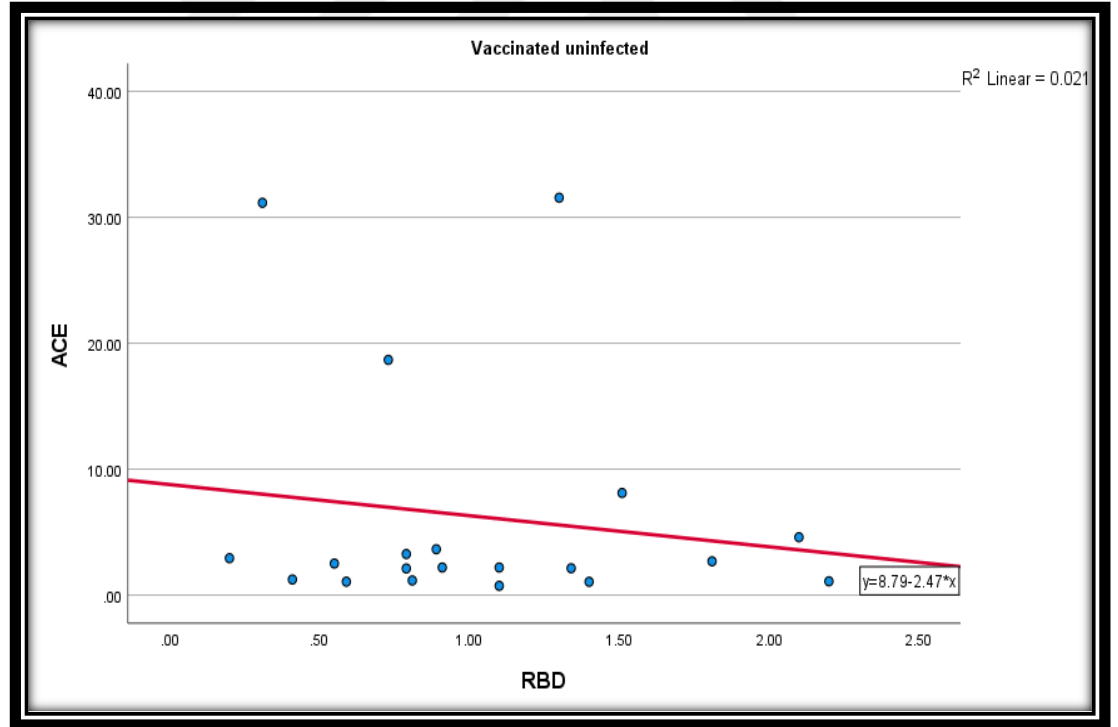
Şekil 4.36 Enfekte grup IgM ve IgG arasındaki korelasyon

Çizelge 4.19 Aşılanmış ve aşılanmamış grupta immünolojik düzey

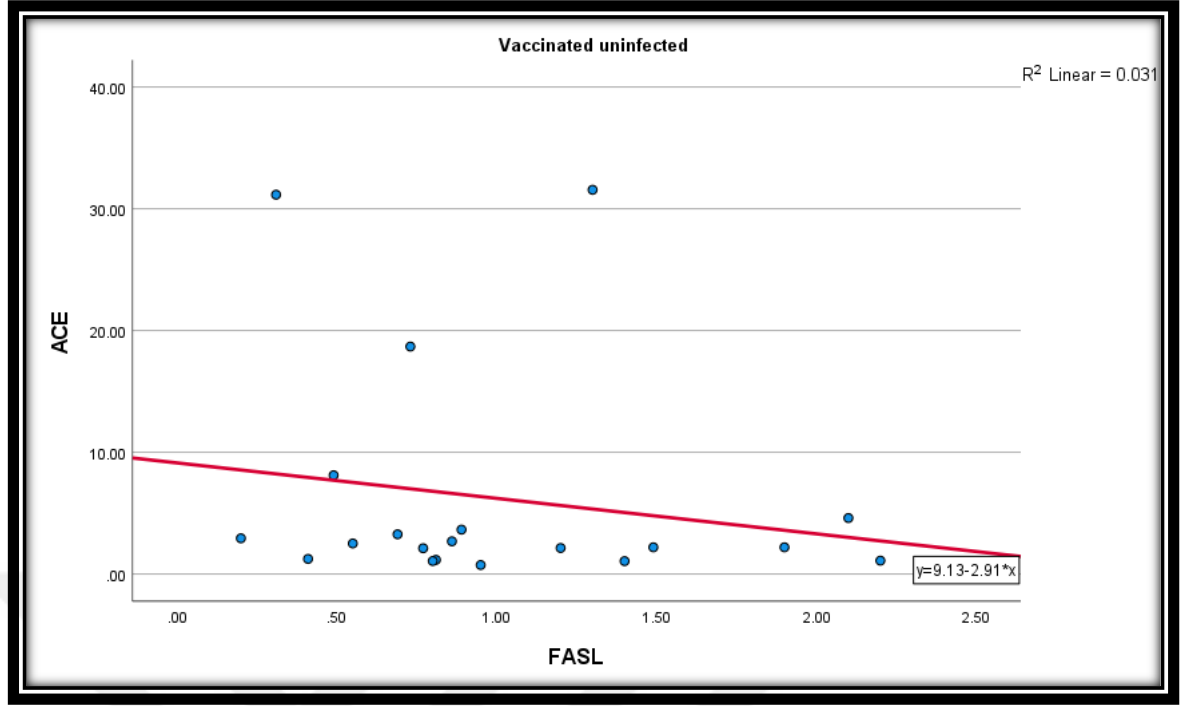
Korelasyonlar							
		TLR2	As	RBD	FAS	IgG	IgM
TLR2	Pearson Korelasyonu	1	-.078-	.354	.185	-.168-	-.117-
	Sig. (2-tailed)		.743	.125	.435	.478	.622
As	Pearson Korelasyonu	-.078-	1	-.146-	-.176-	-.166-	.088
	Sig. (2-tailed)	.743		.538	.457	.484	.711
RBD	Pearson Korelasyonu	.354	-.146-	1	.756**	-.154-	.113
	Sig. (2-tailed)	.125	.538		.000	.516	.634
FAS	Pearson Korelasyonu	.185	-.176-	.756**	1	-.305-	.005
	Sig. (2-tailed)	.435	.457	.000		.190	.983
IgG	Pearson Korelasyonu	-.168-	-.166-	-.154-	-.305-	1	.152
	Sig. (2-tailed)	.478	.484	.516	.190		.523
IgM	Pearson Korelasyonu	-.117-	.088	.113	.005	.152	1
	Sig. (2-tailed)	.622	.711	.634	.983	.523	
**. Korelasyon 0,01 düzeyinde (2-tailed) anlamlıdır.							



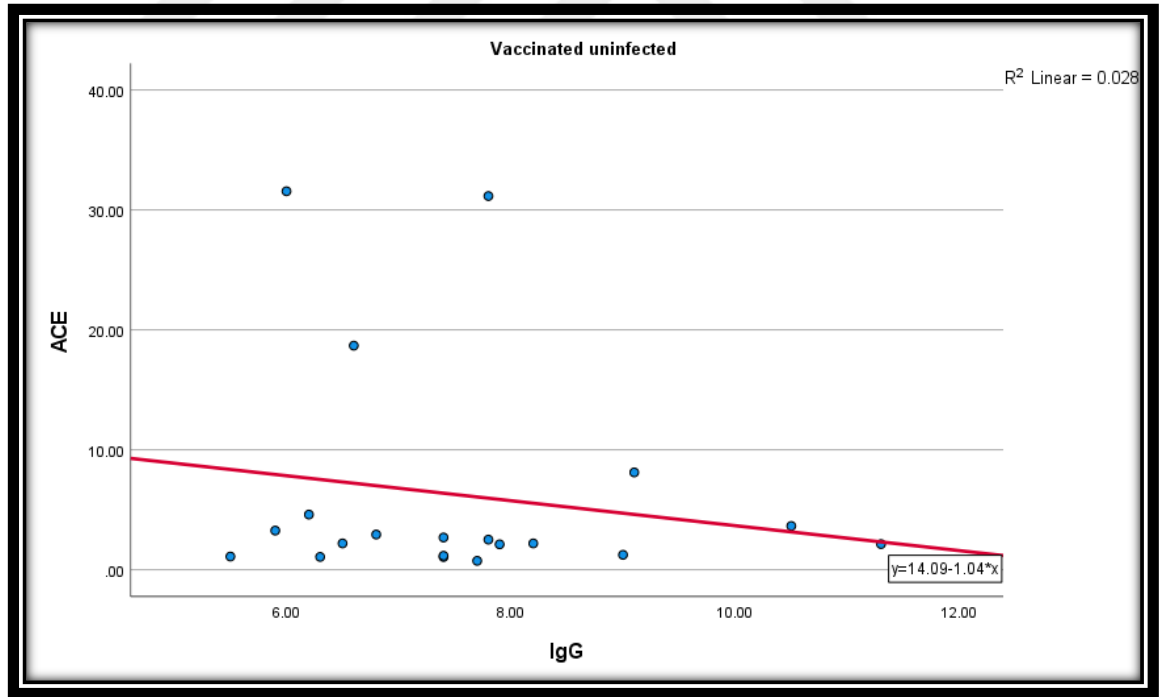
Şekil 4.37 TLR-2 ve ACE'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



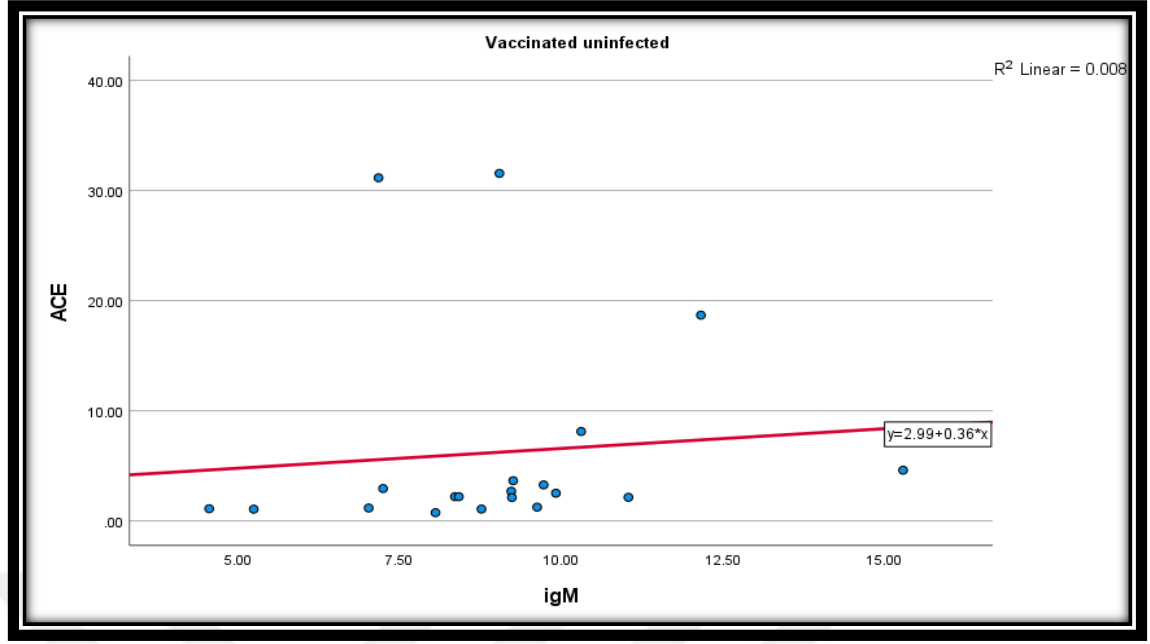
Şekil 4.38 RBD ve ACE'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



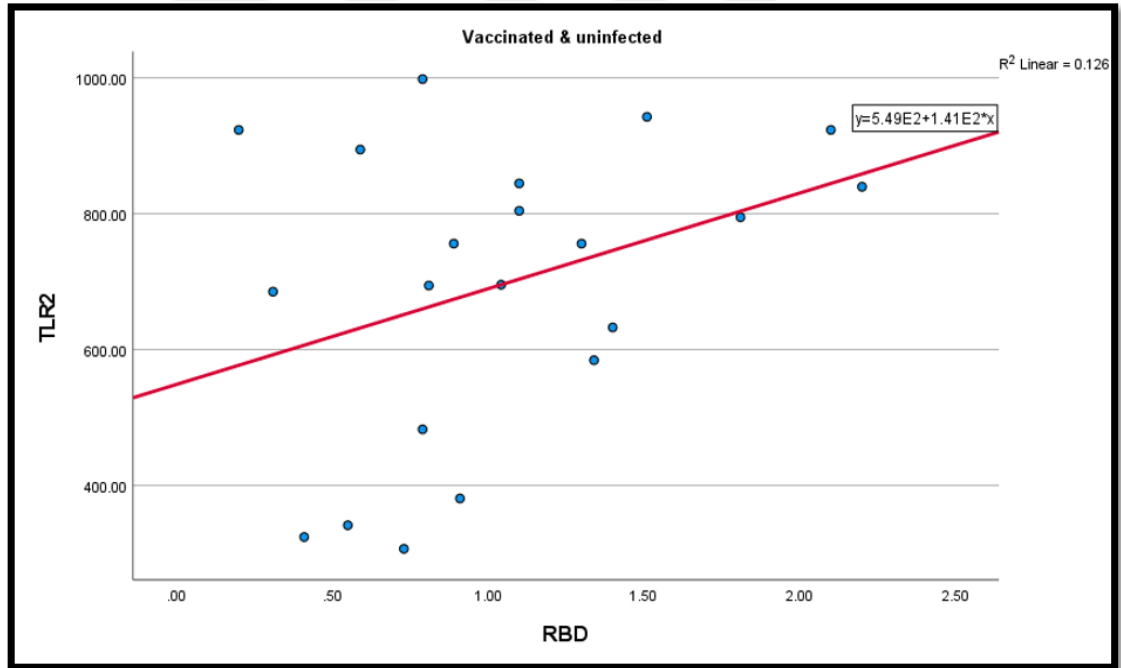
Şekil 4.39 FASL ve ACE'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



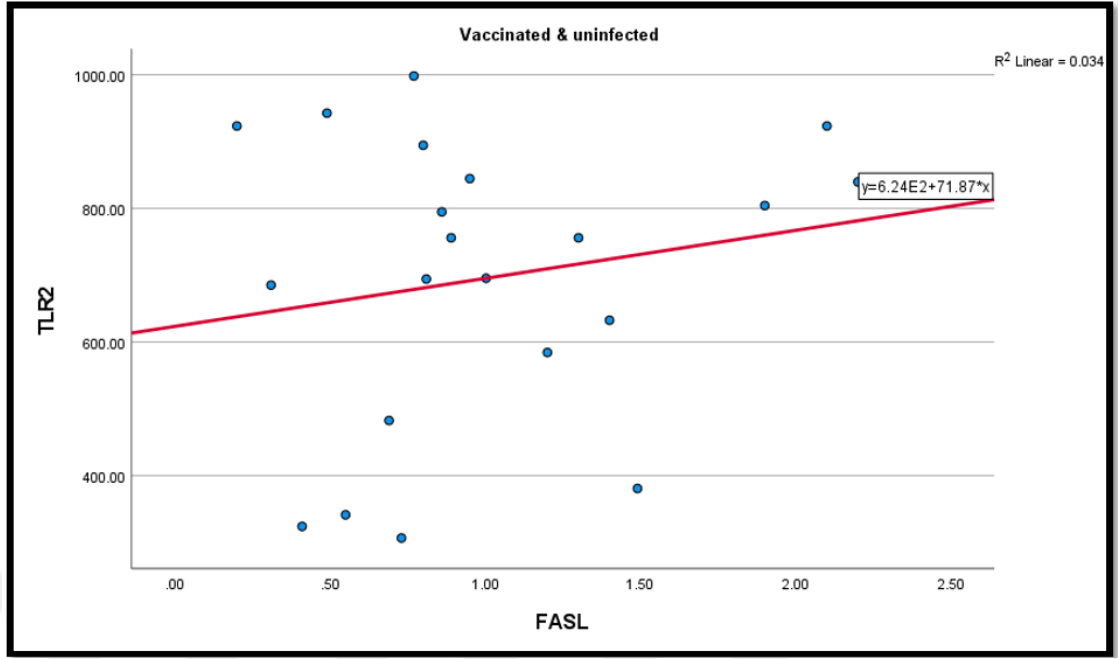
Şekil 4.40 IgG ve ACE'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



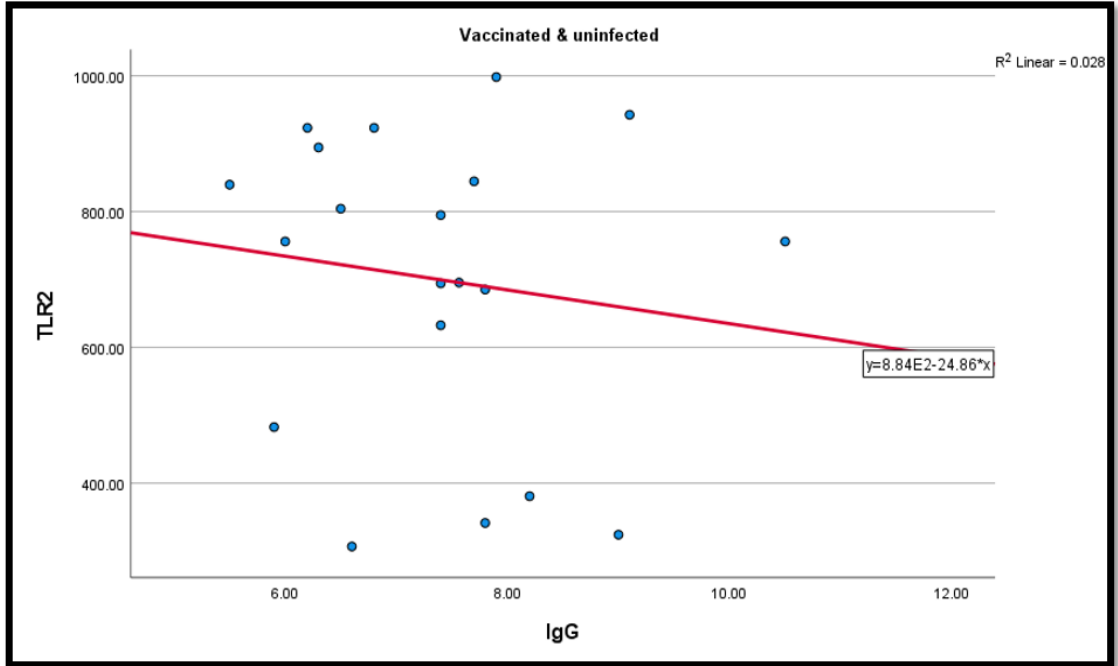
Şekil 4.41 IgM ve ACE'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



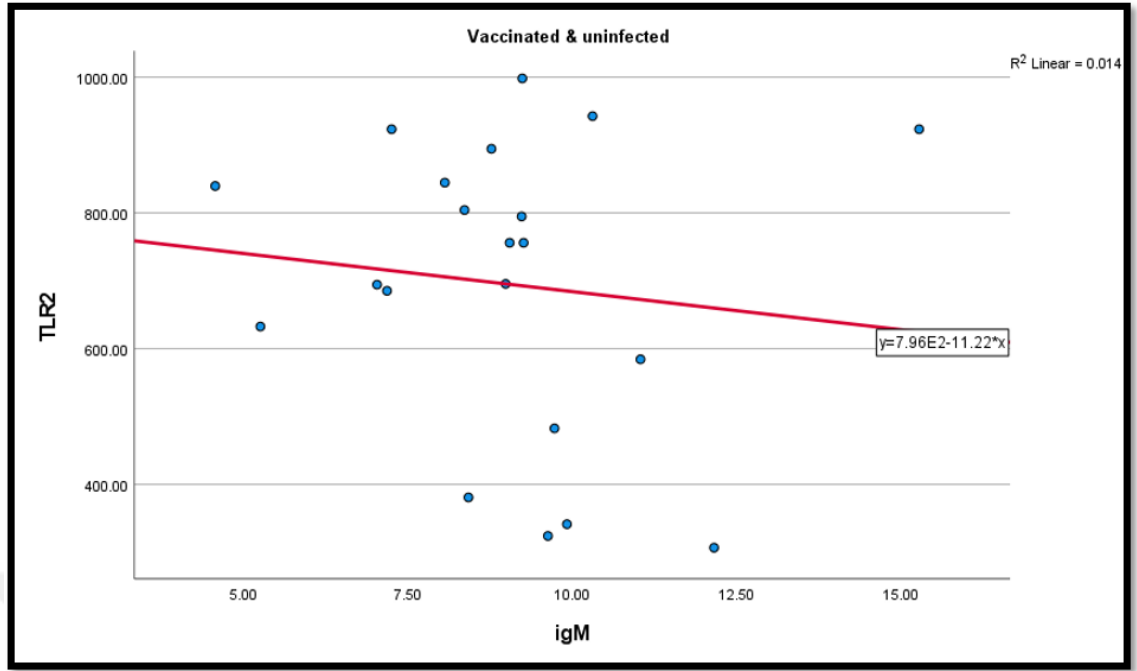
Şekil 4.42 RBD ve TLR-2'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



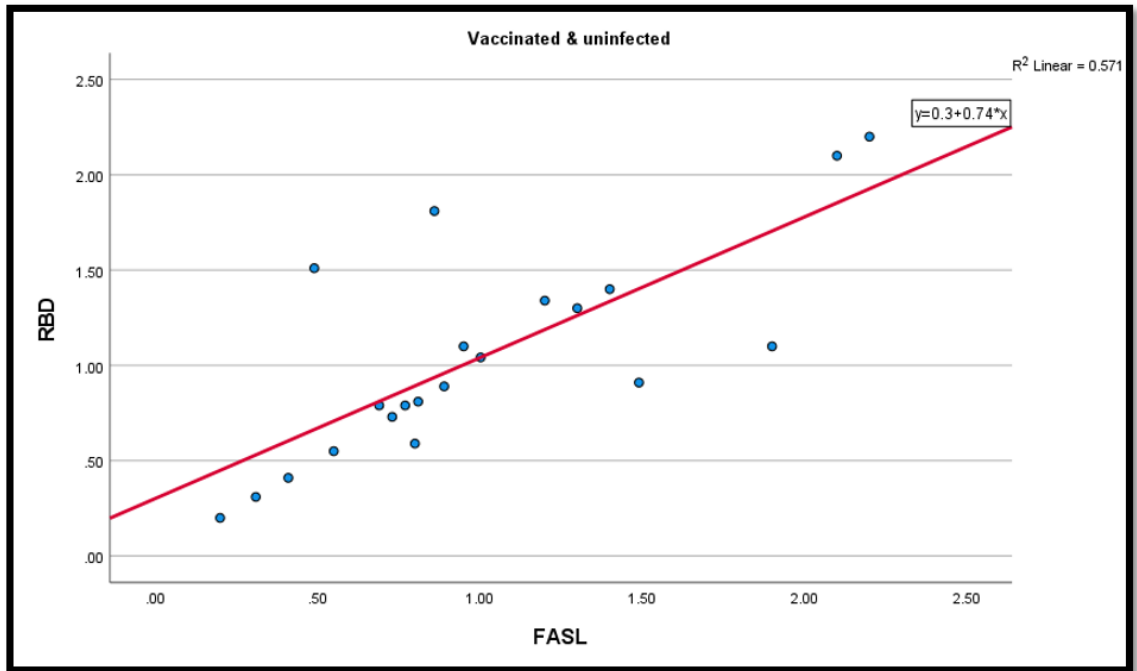
Şekil 4.43 FASL ve TLR-2'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



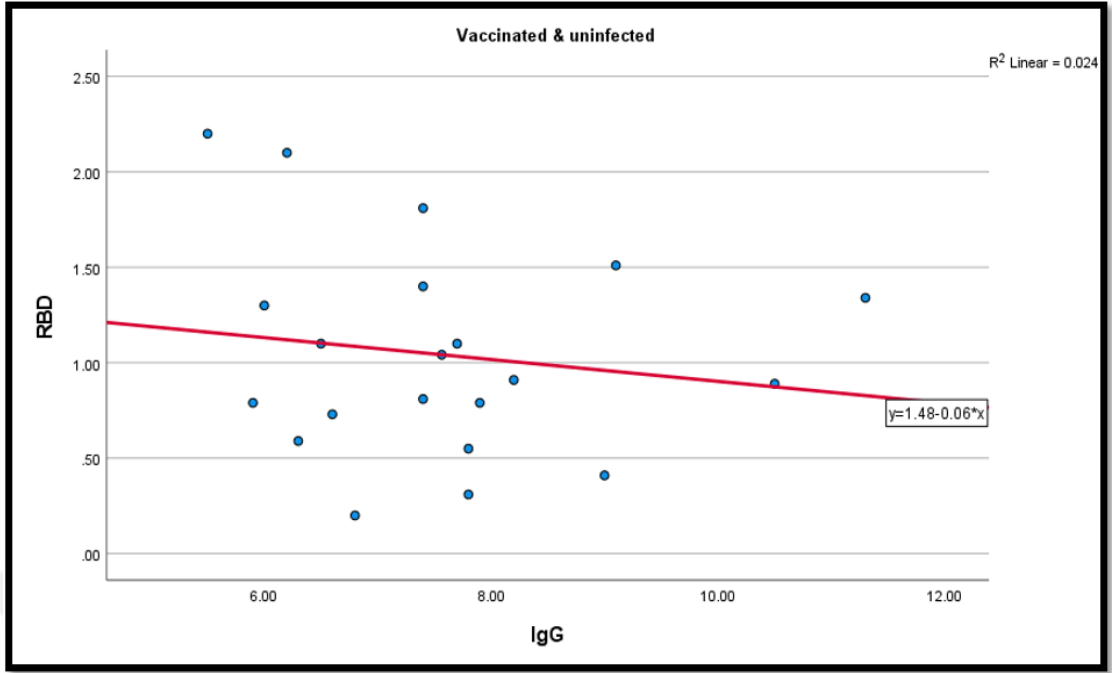
Şekil 4.44 Aşılanmış ve aşılanmamış IgG ve TLR-2 arasındaki korelasyon



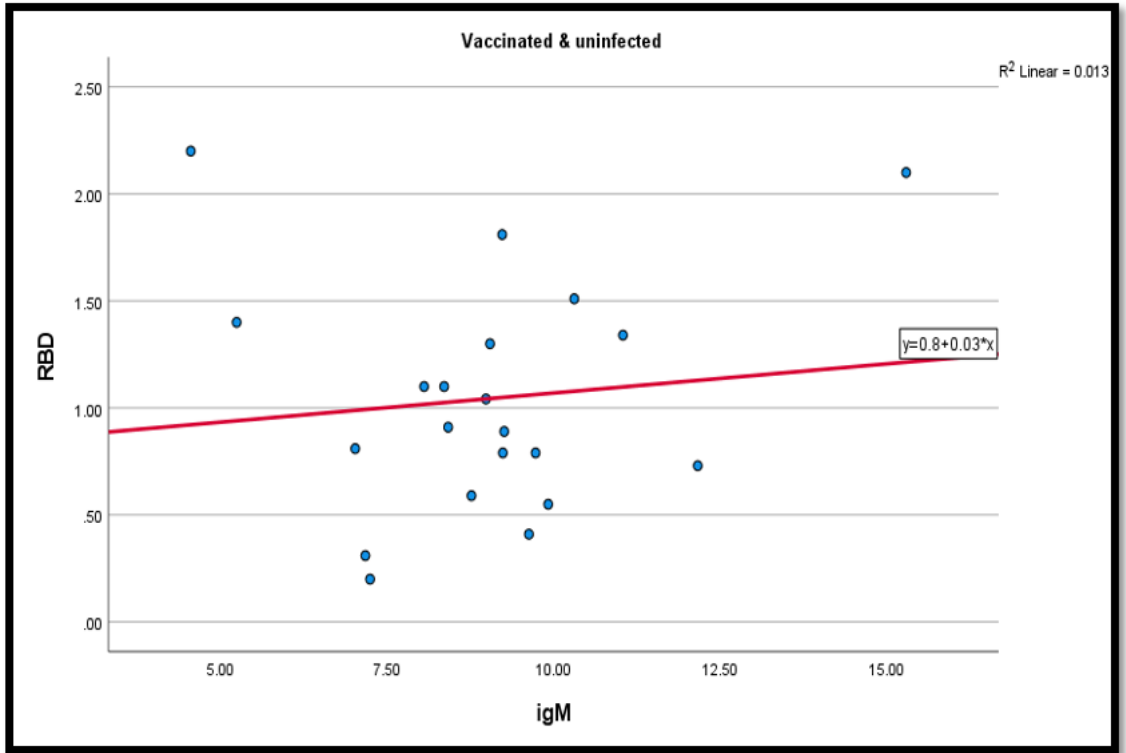
Şekil 4.45 IgM ve TLR-2'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



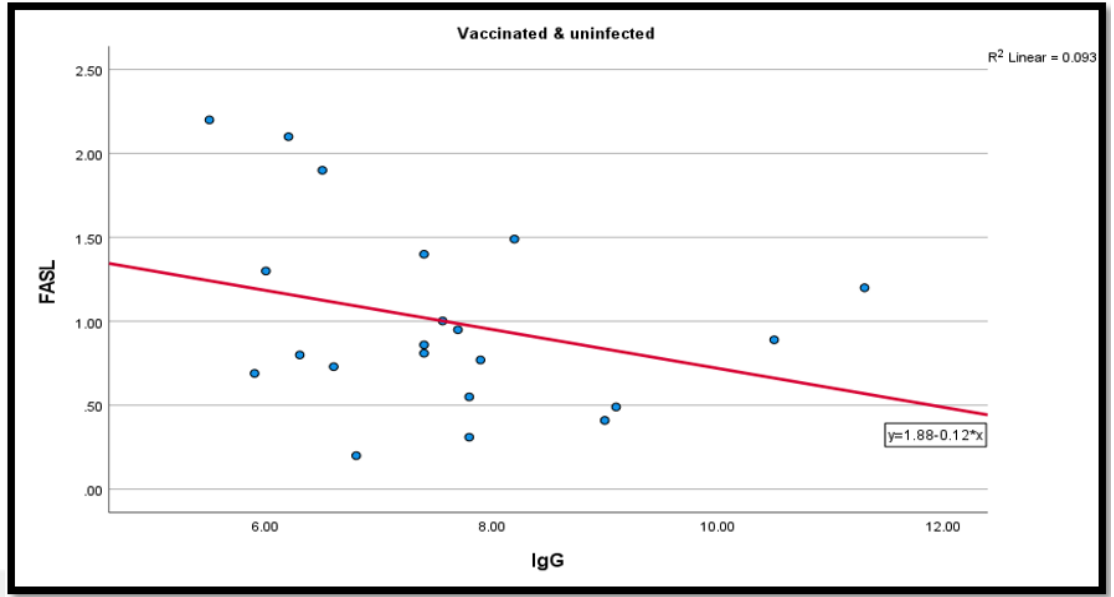
Şekil 4.46 FASL ve RBD'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



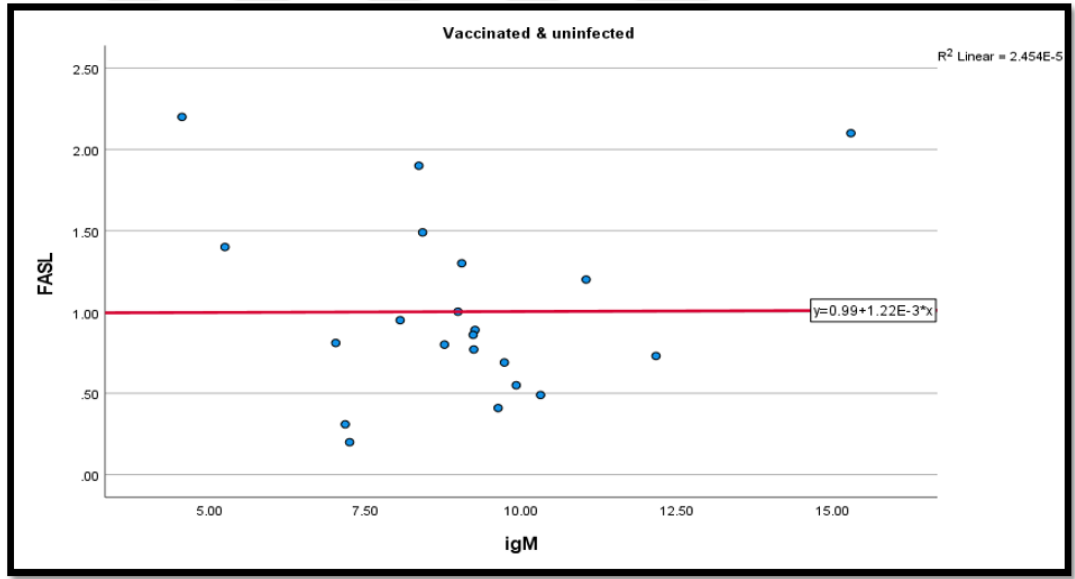
Şekil 4.47 IgG ve RBD'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



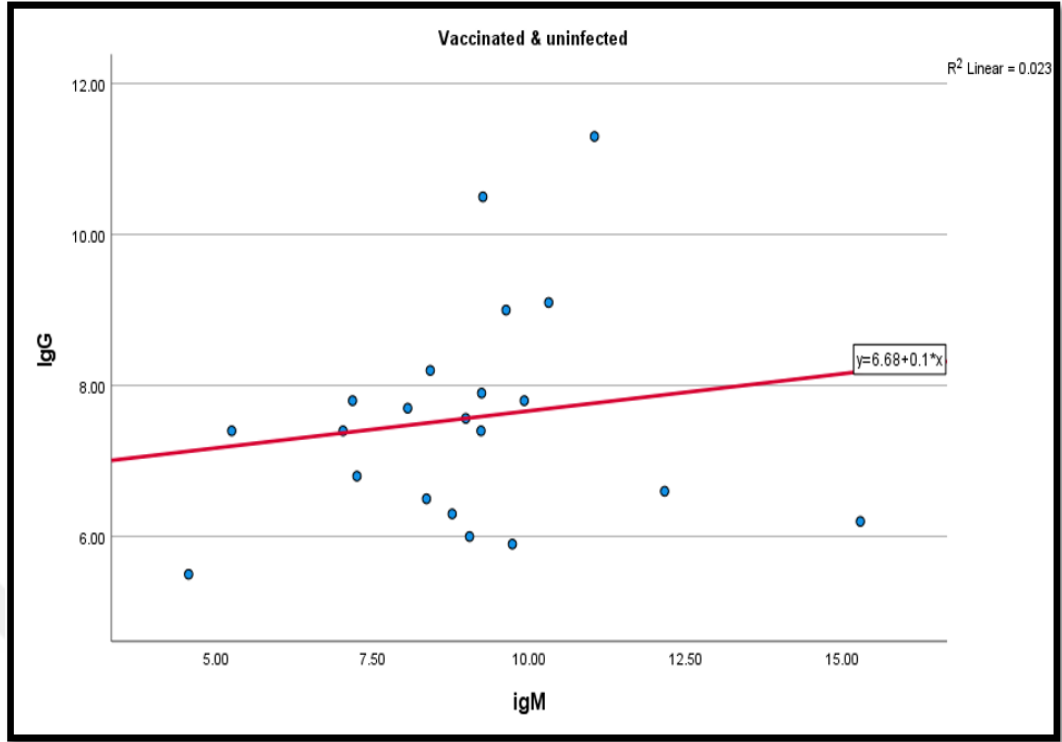
Şekil 4.48 Aşılanmış ve aşılanmamış IgM ve RBD arasındaki korelasyon



Şekil 4.49 IgG ve FASL'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



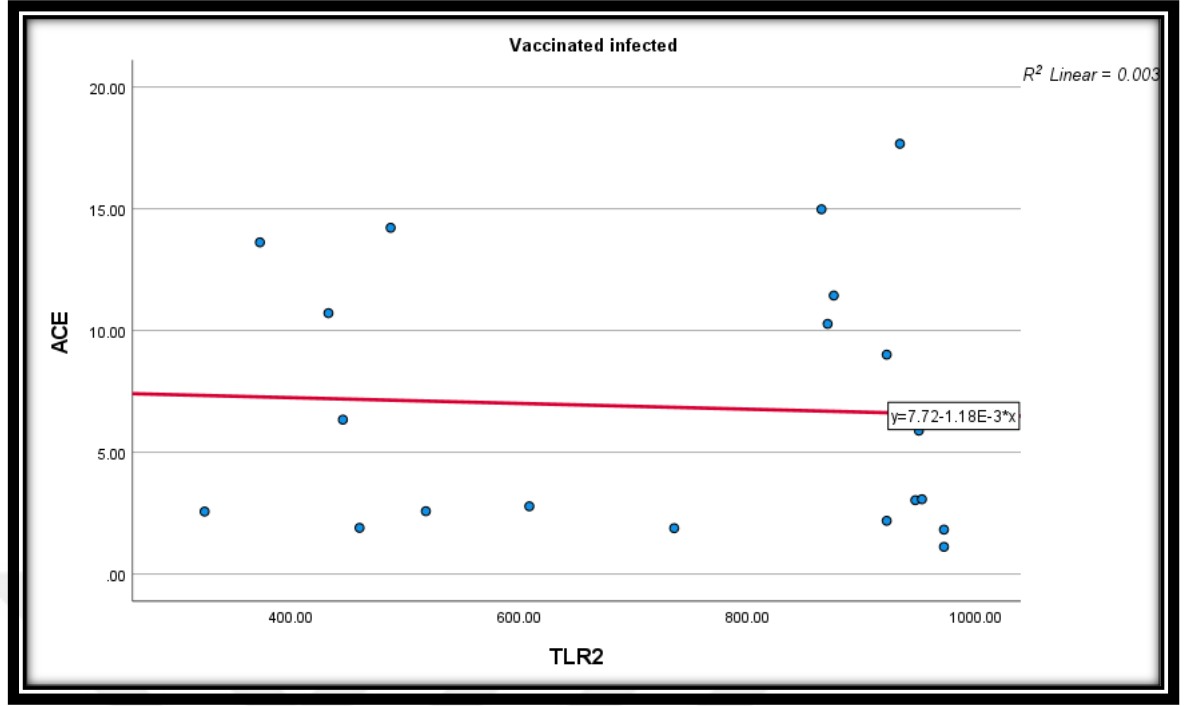
Şekil 4.50 IgM ve FASL'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu



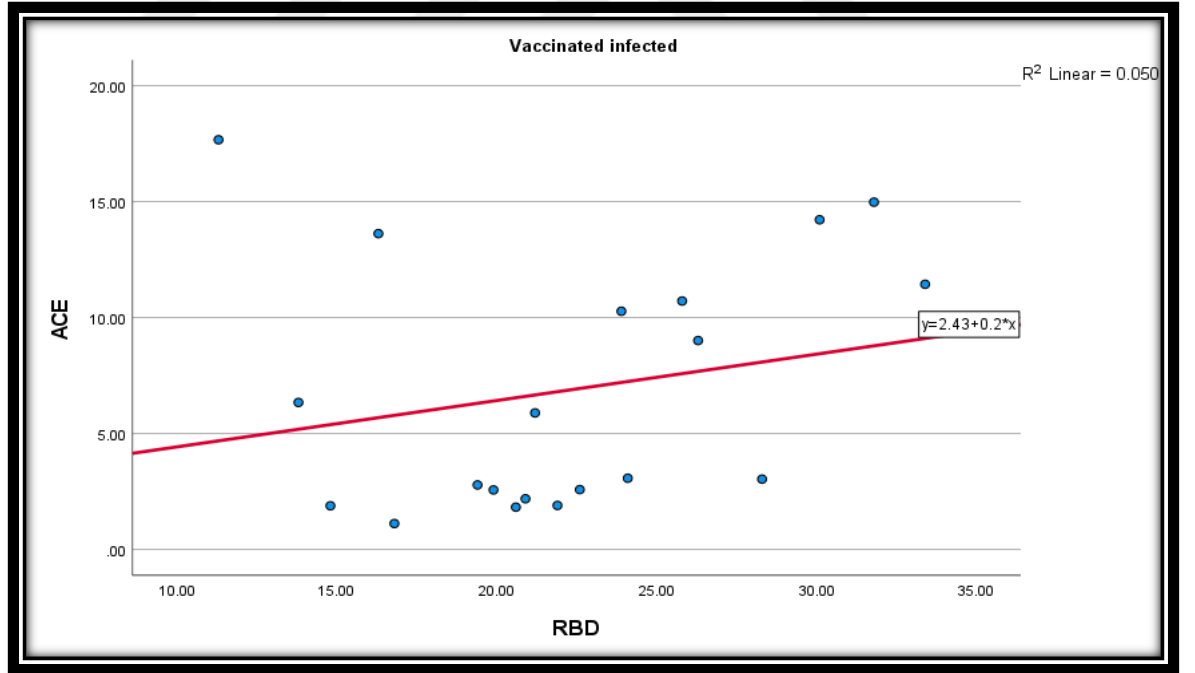
Şekil 4.51 IgM ve IgG'nin aşılanmış ve aşılanmamış olanlar arasındaki korelasyonu

Çizelge 4.20 Aşılanmış ve enfekte grupta immünolojik düzey

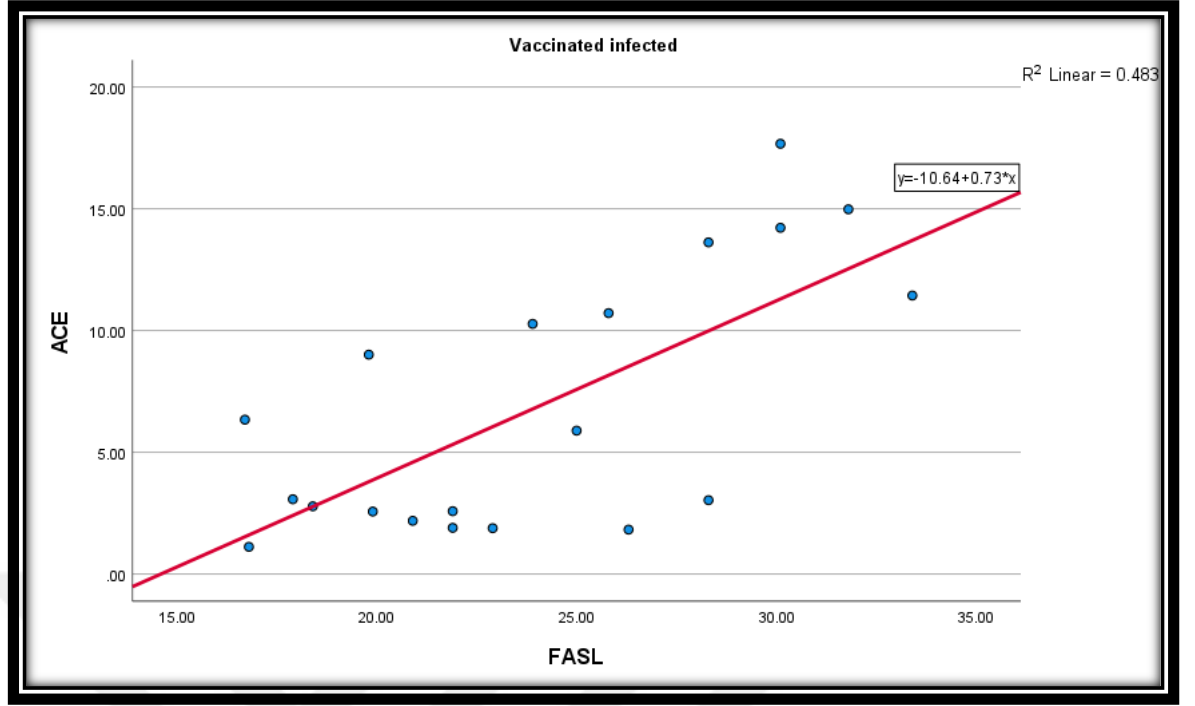
Korelasyonlar							
		TLR2	As	RBD	FAS	IgG	IgM
TLR2	Pearson Korelasyonu	1	-.053-	.149	.117	-.308-	-.074-
	Sig. (2-tailed)		.825	.531	.623	.187	.756
	N	20	20	20	20	20	20
As	Pearson Korelasyonu	-.053-	1	.223	.695**	.082	-.143-
	Sig. (2-tailed)	.825		.345	.001	.731	.548
	N	20	20	20	20	20	20
RBD	Pearson Korelasyonu	.149	.223	1	.469*	-.301-	.019
	Sig. (2-tailed)	.531	.345		.037	.197	.936
	N	20	20	20	20	20	20
FAS	Pearson Korelasyonu	.117	.695**	.469*	1	.066	-.395-
	Sig. (2-tailed)	.623	.001	.037		.782	.085
	N	20	20	20	20	20	20
IgG	Pearson Korelasyonu	-.308-	.082	-.301-	.066	1	-.325-
	Sig. (2-tailed)	.187	.731	.197	.782		.162
	N	20	20	20	20	20	20
IgM	Pearson Korelasyonu	-.074-	-.143-	.019	-.395-	-.325-	1
	Sig. (2-tailed)	.756	.548	.936	.085	.162	
	N	20	20	20	20	20	20
**. Korelasyon 0,01 düzeyinde (2 kuyruklu) anlamlıdır.							
*. Korelasyon 0,05 düzeyinde (2-kuyruklu) anlamlıdır.							



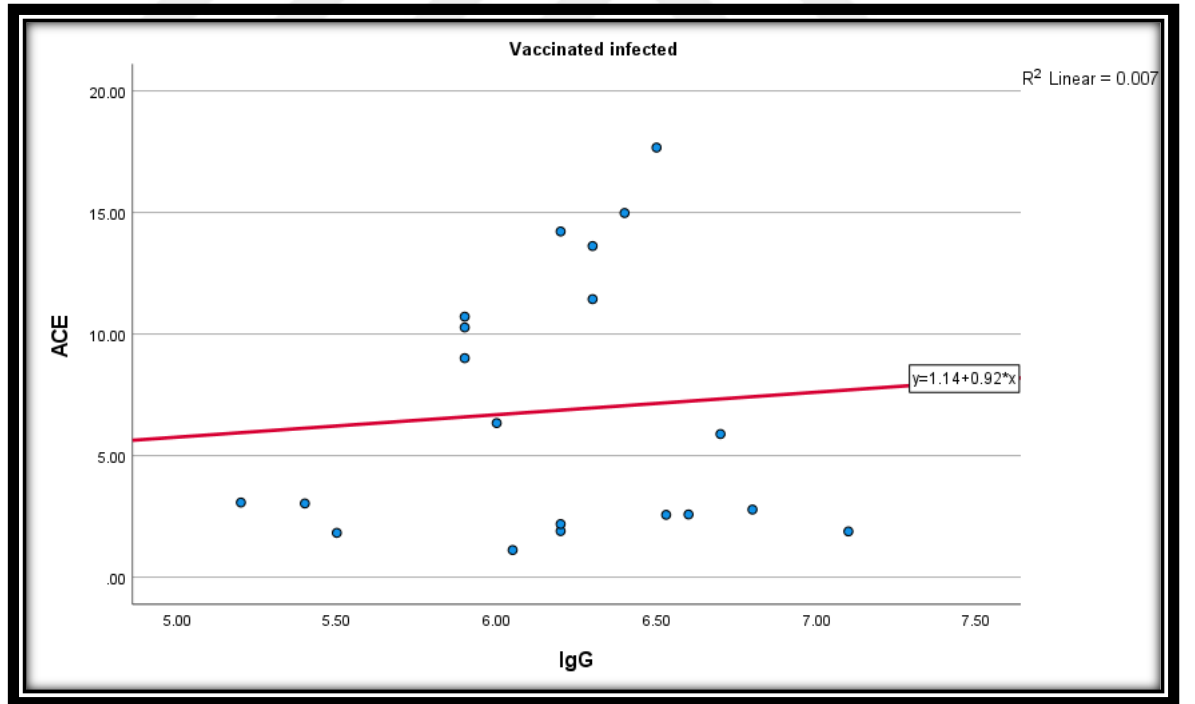
Şekil 4.52 TLR-2 ve ACE'nin aşılanmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu



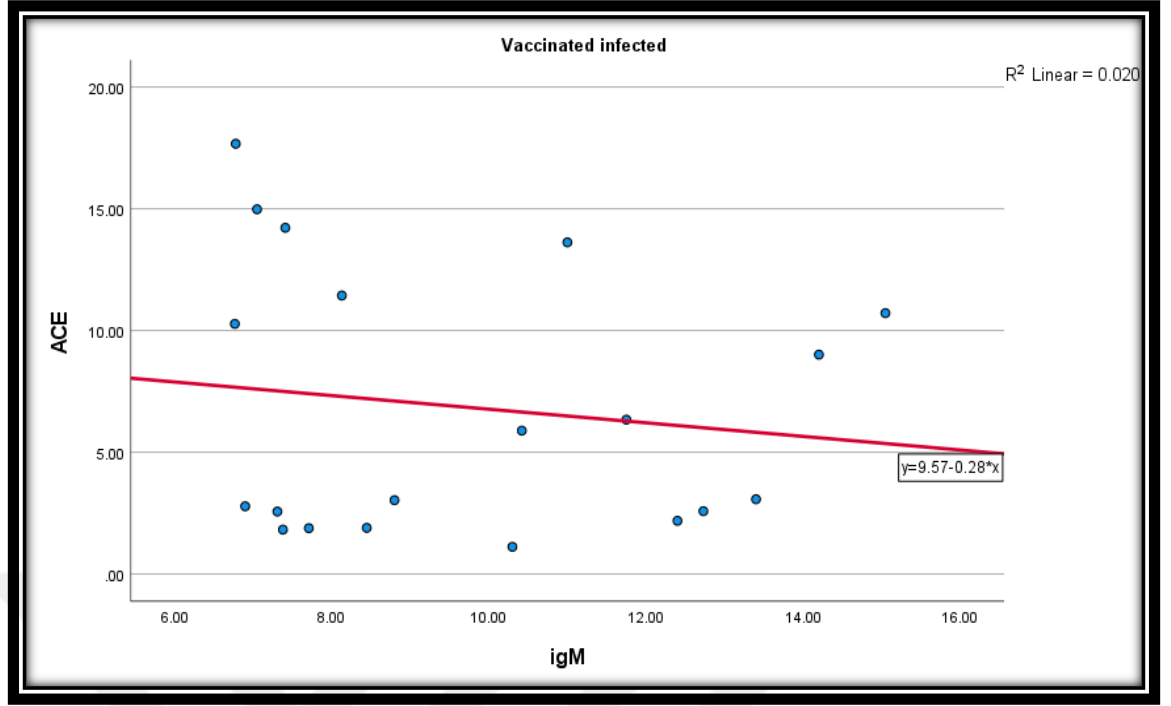
Şekil 4.53 RBD ve ACE'nin aşılanmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu



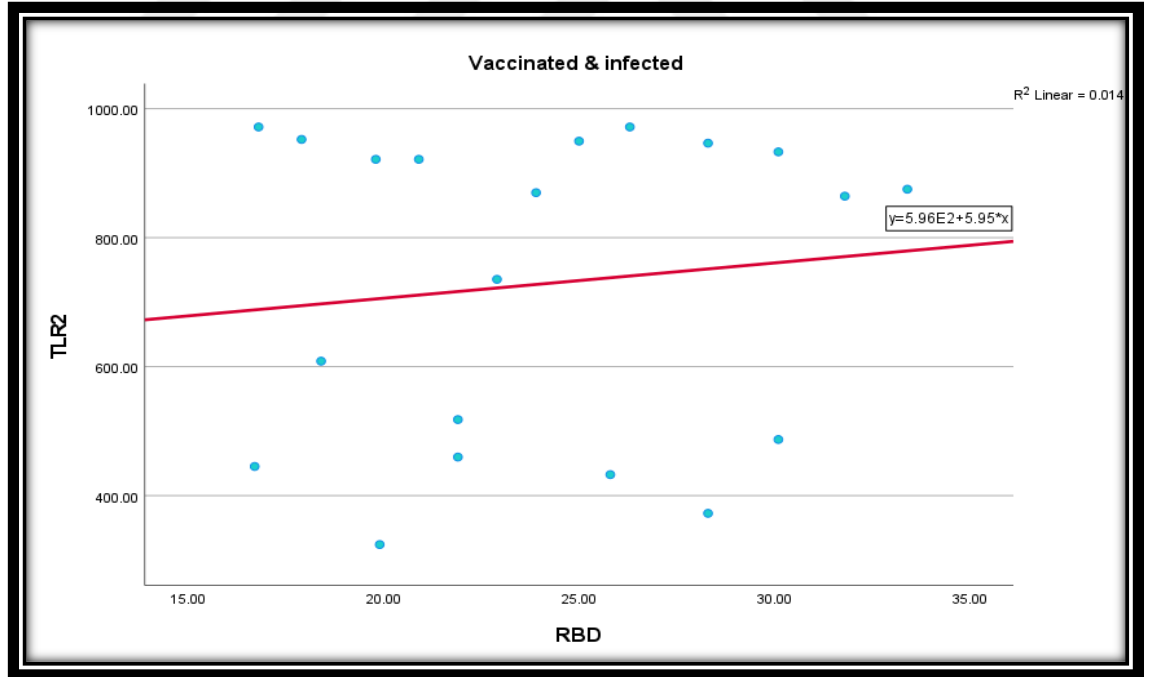
Şekil 4.54 ACE ve FASL'nin aşılanmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu



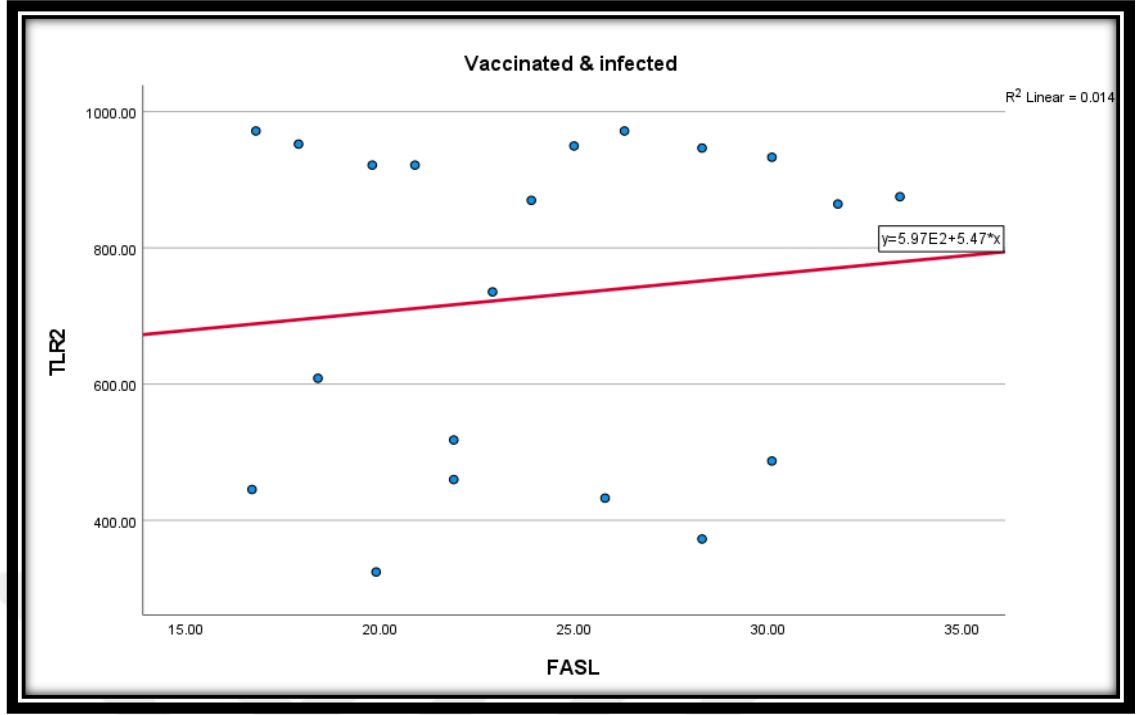
Şekil 4.55 IgG ve ACE'nin aşılanmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu



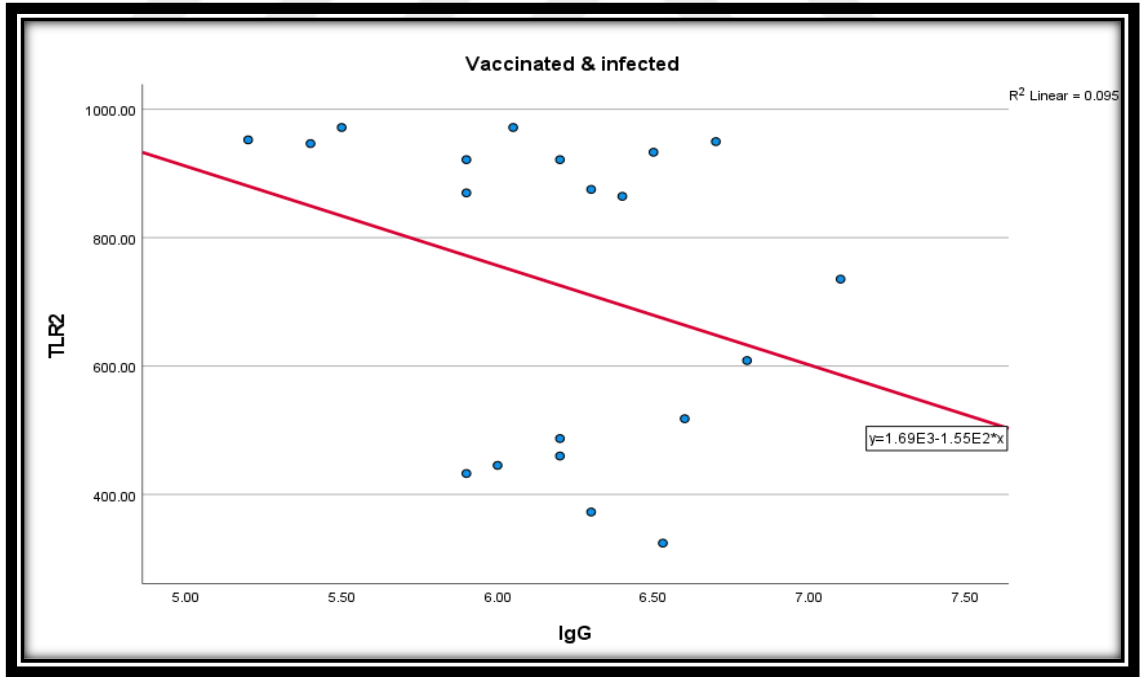
Şekil 4.56 IgM ve ACE'nin aşılanmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu



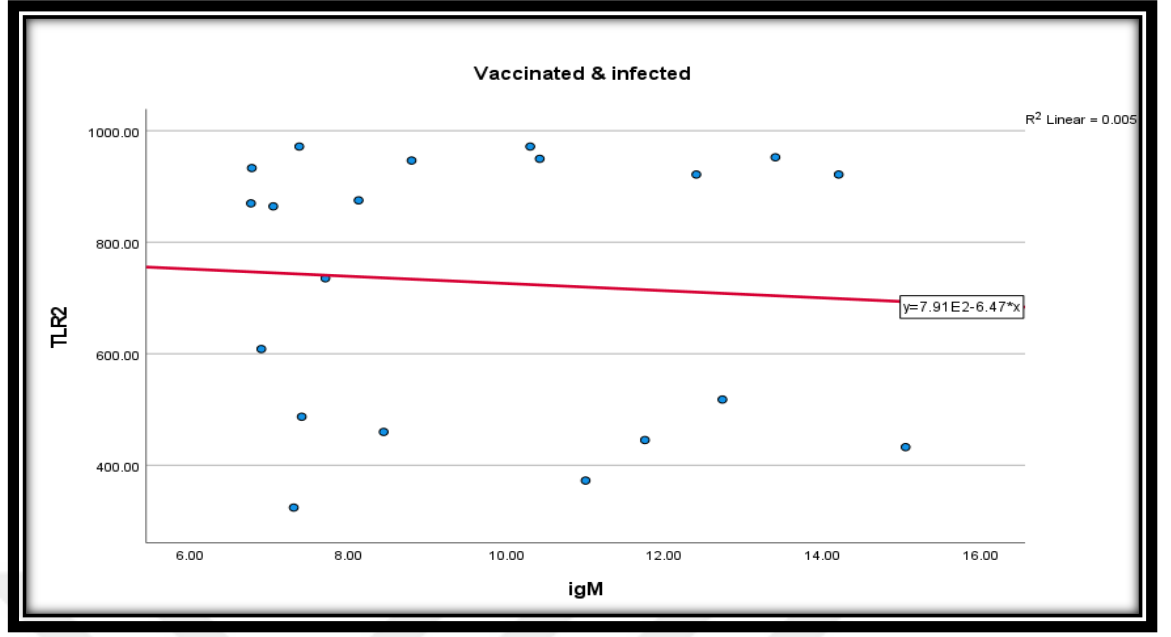
Şekil 4.57 RBD ve TLR-2'nin aşılanmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu



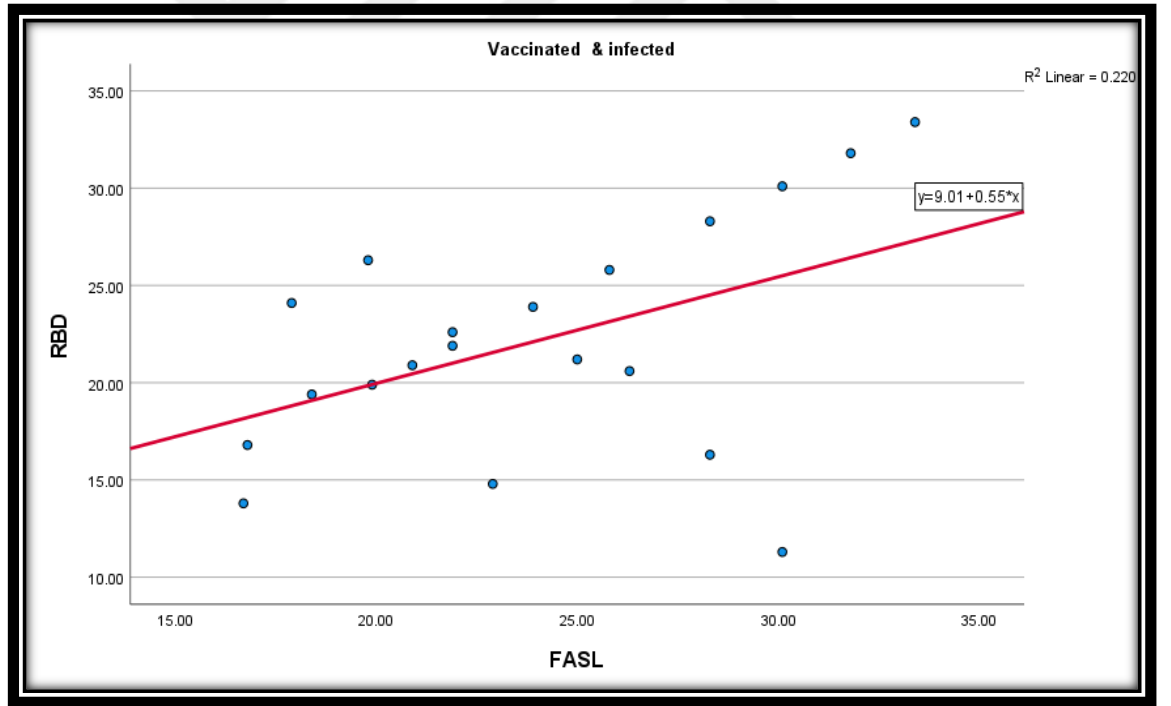
Şekil 4.58 FASL ve TLR-2'nin aşılanmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu



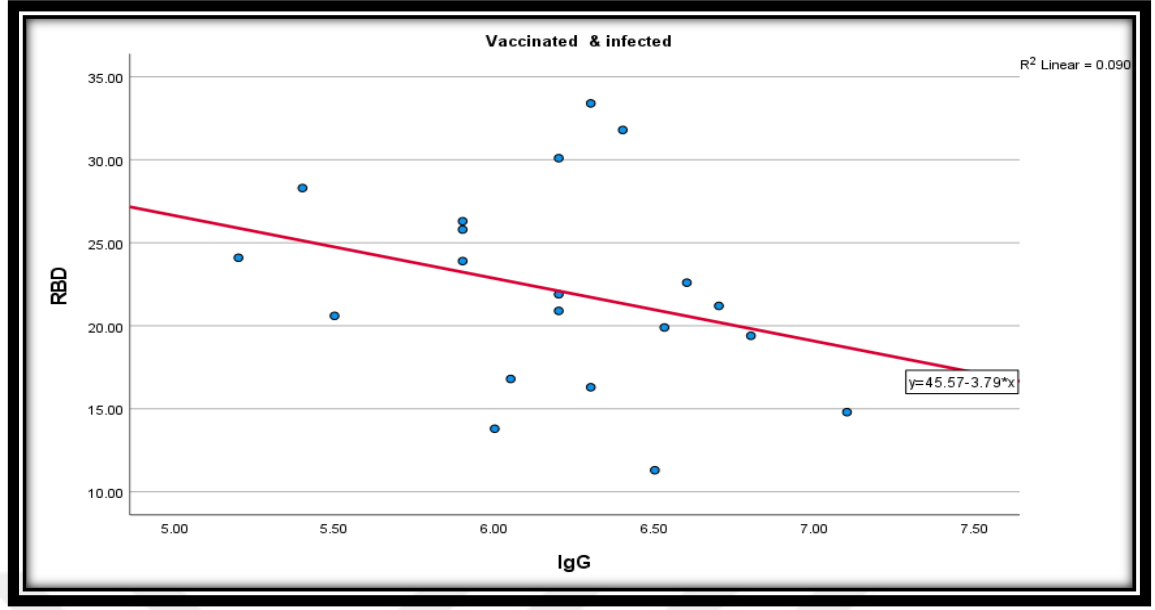
Şekil 4.59 IgG ve TLR-2'nin aşılanmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu



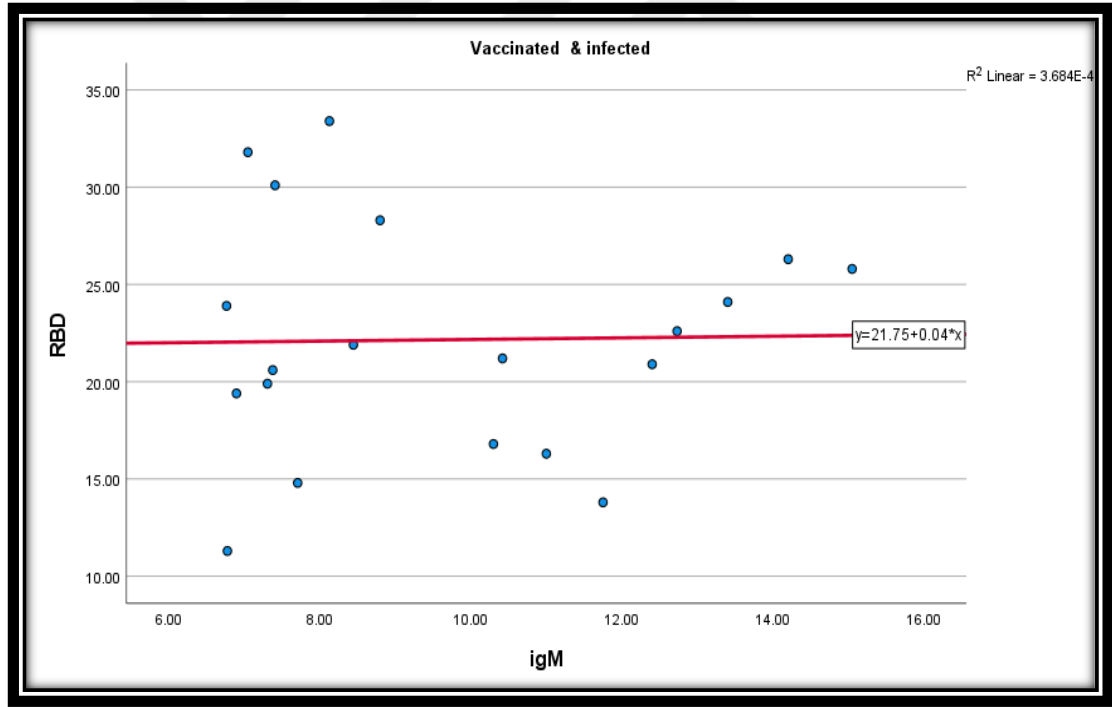
Şekil 4.60 IgM ve TLR-2'nin aşılanmış ve enfekte olanlar arasındaki korelasyonu



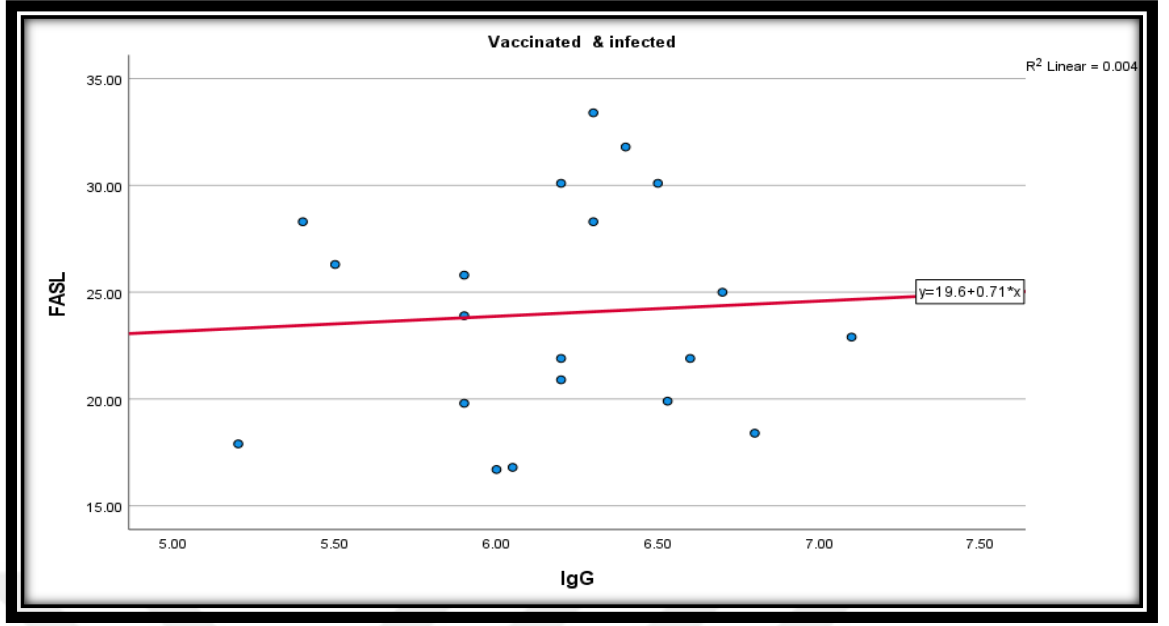
Şekil 4.61 RBD ve FASL'nin aşılanmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon



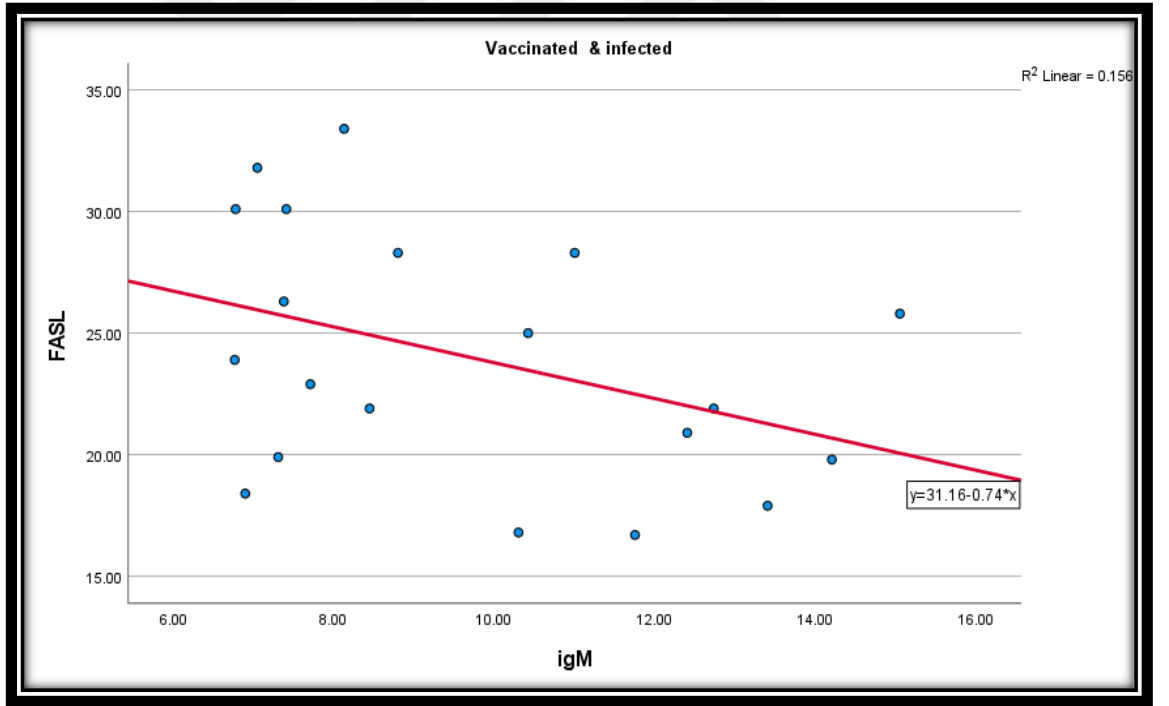
Şekil 4.62 RBD ve IgG'nin aşılanmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon



Şekil 4.63 RBD ve IgM'nin aşılanmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon



Şekil 4.64 FASL ve IgG'nin aşılanmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon



Şekil 4.65 FASL ve IgM'nin aşılanmış ve enfekte olması arasındaki korelasyon

Bu çalışmada, çalışma gruplarında incelenen parametreler arasında farklı düzeylerde ilişkiler gözlenmiştir. Hasta ve aşılanmamış hasta grubunda, TLR2, ACE, FASL ve RBD arasında sırasıyla (0,461, 0,220, 0,399) korelasyon katsayısı ile pozitif bir korelasyon

bulunurken, (IgG ve IgM) değerleri kaydedilmiştir. TLR2 ile negatif korelasyon olup, korelasyon katsayısı değeri $p \geq 0,05$ düzeyinde anlamlı olarak sırasıyla (-0,079, -0,129)'dur. Diğer bağışıklık göstergeleri, bazı korelasyon katsayılarıyla karşılaştırıldığında, (ACE, FASL, IgG, IgM) için anlamlı korelasyonlar gösterirken, TLR2 seviyeleriyle karşılaştırıldığında (RBD) için anlamlı bir korelasyon vardır. ACE ve immün değişkenlerle ilişkisine gelince, hasta grubunda çalışılan ACE için pozitif bir ilişki olduğu ve hem ACE hem de RBD arasında pozitif bir ilişki bulunduğu kaydedilmiştir, IgM, IgG, TLR2 arasında (Sırasıyla 0,81, 0,128, 0,114, 0,220), FASL ve IgM değerleri ACE ile negatif bir korelasyon kaydederken, korelasyon katsayısının değeri (-0,336) olmuştur.

Diğer bağışıklık göstergeleri, bazı korelasyon katsayılarına kıyasla, $P \geq 0,05$ düzeyinde anlamlı olmayan korelasyonlar göstermiştir. Diğer bağışıklık standardı RBD, (ACE, FASL (IgG, TLR2) ile sırasıyla (0,461, 0,018, 0,515, 0,262) korelasyon katsayısı ile pozitif bir korelasyon gösterirken, (IgM) değeri, $P \geq 0,05$ düzeyinde anlamlı korelasyonlarla korelasyon katsayısının değeri (-0,408) olduğu için RBD ile negatif bir korelasyon kaydetmiştir. Diğer bağışıklık indeksi FASL sırasıyla TLR2, RBD ve IgG ile pozitif korelasyon gösterirken, (ACE ve IgM) değerleri FASL ile anlamlı korelasyonlarla negatif korelasyon kaydetmiştir. Anlamlı bir $P \geq 0,01$ düzeyinde, IgG sırasıyla ACE, RBD ve FASL ile “pozitif” bir ilişki gösterirken, (TLR2 ve IgM) değerleri IgG ile negatif bir ilişki olarak kaydedilmiştir ve bu durumda $P \geq 0,01$ düzeyinde anlamlı korelasyonlar söz konusudur ($P \geq 0,01$). Göstergelerin geri kalanında ise $P \geq 0,05$ düzeyinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. İmmünoglobulin IgM'ye gelince, sırasıyla ACE ile pozitif bir korelasyon gösterirken, (TLR2, RBD, FASL ve IgM) değerleri IgM ile negatif bir korelasyon kaydetti ve anlamlı düzeyde anlamlı korelasyonlar gösterdi. (IgG, FASL) durumunda $P \geq 0,01$ 'e ulaşırken, göstergelerin geri kalanı $P \geq 0,01$ düzeyinde anlamlı farklılıklar göstermemiştir.

Sağlıklı grup için, (IgG, ACE ve IgM) değerleri kaydedilirken, FASL ve RBD arasında sırasıyla (0,354, 0,185) korelasyon katsayısı ile pozitif bir korelasyon bulunmuştur. Korelasyon katsayısı değerinin sırasıyla (-0,078, -0,168, -0,117) olduğu TLR2 ile negatif korelasyon. İmmün göstergeler, korelasyon katsayıları ile karşılaştırıldığında, TLR2

seviyeleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan korelasyonlar göstermiştir. Anjiyotensin dönüştürücü enzim ve bağışıklık değişkenleri ile ilişkisine gelince, incelenen anjiyotensin dönüştürücü enzim için pozitif bir ilişki gözlenmiştir. Sağlıklı grupta, ACE ile IgM arasında (0,622) korelasyon katsayısı ile pozitif bir ilişki bulunurken, (FASL, TLR2, RBD, IgG) değerleri ACE ile negatif bir ilişki olarak kaydedilmiştir. Çünkü bağışıklık göstergeleri, bazı korelasyon katsayıları ile karşılaştırıldığında, $P \geq 0.05$ düzeyinde anlamlı olmayan korelasyonlar göstermiştir. Diğer bağışıklık standardı olan RBD, (FASL, IgM ve TLR2) ile sırasıyla (0,354, 0,756, 0,113) korelasyon katsayısı ile pozitif bir korelasyon gösterirken, (IgM) değeri korelasyon katsayısı değeri (-0,408) olduğu için RBD ile negatif bir korelasyon olarak kaydedilmiştir. Diğer bağışıklık göstergesi olan FASL, sırasıyla TLR2, RBD ve IgM ile “pozitif” bir korelasyon gösterirken, (ACE ve IgG) değerleri FASL ile negatif bir korelasyon olarak kaydedilmiştir ve korelasyon katsayısı değeri $P \geq 0,01$ düzeyinde anlamlıdır. IgG sadece (IgM) ile “pozitif” bir korelasyon gösterirken, diğer göstergelerin değerleri IgG ile negatif bir korelasyon olarak kaydedilmiş ve anlamlı düzeyde ($P \geq 0,05$) bir korelasyon bulunmamıştır. IgM, IgM ile negatif korelasyon gösteren (ACE) hariç tüm immün göstergelerle pozitif korelasyon göstermiş, $P \geq 0,05$ düzeyinde anlamlı bir fark bulunmamıştır. Aşılanan ve aşılama sonrası enfekte olan grup için, FASL ve RBD arasında sırasıyla (0,117 ve 0,149) korelasyon katsayısı ile pozitif bir korelasyon bulunurken, (IgG, ACE ve IgM) değerleri kaydedilmiştir. Korelasyon katsayısı değerinin sırasıyla (-0,053, -0,308, -0,074) olduğu TLR2 ile negatif korelasyon. Korelasyon katsayıları ile karşılaştırıldığında immün indeksler TLR2 seviyeleri ile karşılaştırıldığında anlamlı olmayan korelasyonlar göstermiştir. ACE ve bağışıklık değişkenleri ile korelasyonuna gelince, aşılanmış ve enfekte grupta çalışılan ACE için pozitif bir korelasyon olduğu kaydedilmiştir. ACE ile FASL, RBD IgG arasında korelasyon katsayısı (0,223, 0,695, 0,082) ile pozitif bir korelasyon bulunurken, (TLR2, IgM) değerleri ACE ile negatif bir korelasyon olarak bulunmuştur, burada bağışıklık göstergeleri, bazı korelasyon katsayıları ile karşılaştırıldığında, $P \geq 0,01$ düzeyinde anlamlı korelasyonlar göstermiştir. Diğer bağışıklık kriteri olan RBD, (FASL, ACE, (IgM, TLR2) ile sırasıyla (0,149, 0,223, 0,469, 0,019) korelasyon katsayısı ile pozitif bir korelasyon gösterirken, (IgG) değeri, $P \geq 0,01$ düzeyinde anlamlı korelasyonlarla Korelasyon katsayısı (-0,301) değeri olarak RBD ile negatif bir korelasyon olarak kaydedilmiştir.

Diğer bağışıklık göstergesi olan FASL, sırasıyla TLR2, RBD ve IgM ile “pozitif” bir korelasyon göstermiştir. Aynı zamanda, (ACE ve IgG) değerleri FASL ile negatif bir korelasyon olarak kaydedilmiş ve anlamlı düzeyde ($P \geq 0,05$) bir korelasyon göstermiş, IgG ise (ACE ve FASL) ile “pozitif” bir korelasyon göstermiştir. Buna karşılık, diğer göstergelerin değerleri IgG ile negatif bir korelasyon olarak kaydedilmiş ve anlamlı düzeyde ($P \geq 0,05$) anlamlı bir korelasyon göstermemiştir. Aynı zamanda, IgM, (IgM) ile “pozitif” bir korelasyon gösteren (RBD) hariç tüm bağışıklık göstergeleri ile “negatif” bir korelasyon göstermiştir ve $P \geq 0,05$ düzeyinde anlamlı bir fark yoktur TLR2, nükleik asitleri tanıyabilen ve SARS-CoV-2 virüsünden kurtulmaya yardımcı olan belirli hücre parçalarının zarlarında bulunur (Kawai and Akira 2009). Sarımsak, viral enfeksiyonlarda ve enfeksiyon sırasında ikincil bakteriyel enfeksiyonlarda, özellikle gram-pozitif bakterilerde önemli bir rol oynar (Kurt-Jones *et al.* 2000). Birçok çalışma proteini göstermiştir. Diyabet Covid S, hidrofobik bir hidrojen bağı aracılığıyla TLR2'ye bir yay gibi bağlanmada kilit bir rol oynar (Kawai and Akira 2009). Son zamanlarda, TLR2'nin SARS-CoV-2 E proteinini tanıdığı gösterilmiştir. Bu proteini tanıyarak ve TLR2'ye bağlı olan sinyalleri başlatır. Sitosolik organizmaların. Öte yandan, vücuttaki bu TLR2'ye bağlı sinyallerin durdurulması, bu bağlantı nedeniyle meydana gelen sitokin fırtınası nedeniyle kafeinin neden olduğu ölüme karşı koruma sağlar (Zheng *et al.* 2021). Artan TLR2 ekspresyonu, Sitokinlerin salınmasının bir sonucu olarak viral enfeksiyon sürecine dahil olabilir. Diğer çalışmalar, stabil antioksidan kullanımının virüs enfeksiyonu sırasında sitokin salınımını önemli ölçüde azalttığını kanıtlamıştır (Zheng *et al.* 2021). TLR2, hücre yüzeylerindeki ilk bölgeyi temsil ettiği ve reseptörleri veya ligandları SARS-CoV-2 viral enfeksiyonu ile ilişkili bakteriyel lipoproteinlere bağlandığı için incelenmiştir. Daha önce de belirttiğimiz gibi, çalışmalara göre TLR2, TLR2 ekspresyonunu artırarak virüsün veya viral enfeksiyonun ciddiyetinin belirlenmesinde rol oynamakta ve böylece bağışıklık tepkisi, sitokin fırtınası olarak bilinen ve enfeksiyonun ciddiyetinin artmasına yardımcı olan çeşitli sitokinlerin salınımını artırmaktadır. Bu nedenle, diğer çalışmalar TLR2 ifadesine karşı antikor kullanımının enfeksiyonun şiddetini azalttığını kanıtlamıştır. Benzer şekilde, TLR2 antagonistleri, enfeksiyon sırasında sitokinlere karşı bağışıklık tepkisini arttırmaya karşı bir aşı olarak kullanılabilir (Li *et al.* 2019). FASL'nin artmış ekspresyonuna ilişkin verilerimiz, SARS-COV-2 ile enfekte hastalarda, özellikle ağır vakalarda artmış ekspresyonunu gösteren verilerle (Zheng *et al.* 2020) tutarlıdır. FASL

seviyelerindeki artış, lenfosit apoptozunda bir artışa işaret eder ve bu, FASL ile lenfosit sayısı arasında ters bir ilişki olduğu hipotezini destekleyebilir (Wang *et al.* 2020b). Lenfositler, ancak parantezler hastalık şiddeti ile hastalık şiddeti arasındaki anlamlı ilişkiye karşılık gelmedi. Diğer bazı çalışmalar, FASL seviyesinin yaşla birlikte arttığını göstermektedir (Pinti *et al.* 2004) ve bu, ciddi komplikasyonlara karşı daha savunmasız olan yaşlılarda artan inflamasyonu açıklamaktadır. Ayrıca, kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi akciğer hastalıklarından muzdarip hastaların kan serumunda yüksek seviyeler görüyoruz, bu da artan sitokin fırtınasına ve viral komplikasyonlara katkıda bulunuyor. Bu hastalar arasında yoğun bakıma kabul edilenler ve izolasyon ünitelerinde kritik durumda olanlar çok yüksek bağışıklık seviyelerine sahiptir, bu da (Chi *et al.* 2020) ile tutarlıdır. SARS-CoV-2'yi kontrol etmek için dünyanın farklı bölgelerinde kullanılan farklı aşı stratejileri vardır (Al-Asadi *et al.* 2022). Birçok çalışma, antikora karşı bağışıklık yanıtındaki azalma ile aşılama tabi tutulan yaş grubu arasında bir korelasyon olduğunu bildirmiştir, çünkü yaşlı katılımcılarda genç katılımcılara kıyasla düşük ila orta düzeydeydi. Buna immünoşenesans denir.

4.11 Moleküler Çalışma

4.11.1 Demografik sonuçlar

RNA 12 saat içinde izole edilmiş ve çalışma gününe kadar -80 derecede saklanmıştır. SARS-COV-2 ile enfekte olduğundan şüphelenilen çalışma örnekleri SARS-CoV-2 IgM SARS-CoV-2 IgG ve SARS-CoV-2 RT-PCR testleri için aynı anda incelenmiştir. Çalışmaya dahil edilen toplam 240 hastanın %57,7'si (n=71) erkek ve %42,2'si (n=52) kadın olmak üzere 123 hastadan (%51,2) PCR testi istenmiştir. Hastaların yaş aralıkları aşağıdaki tabloda gösterildiği gibi 15-70 arasında değişmektedir (Çizelge 4.21).

Çizelge 4.21 Çalışmaya katılan hastaların cinsiyet ve yaş dağılımı

	Grup	Sayı (n)	Yüzde (%)
Cinsiyet	Erkek	71	%57,7
	Kadın	52	%42,2
Yaş	Anlam±SD	Minimum	Maksimum
	49±10,108	15	70

4.11.2 SARS-CoV-2 RT-PCR sonuçları

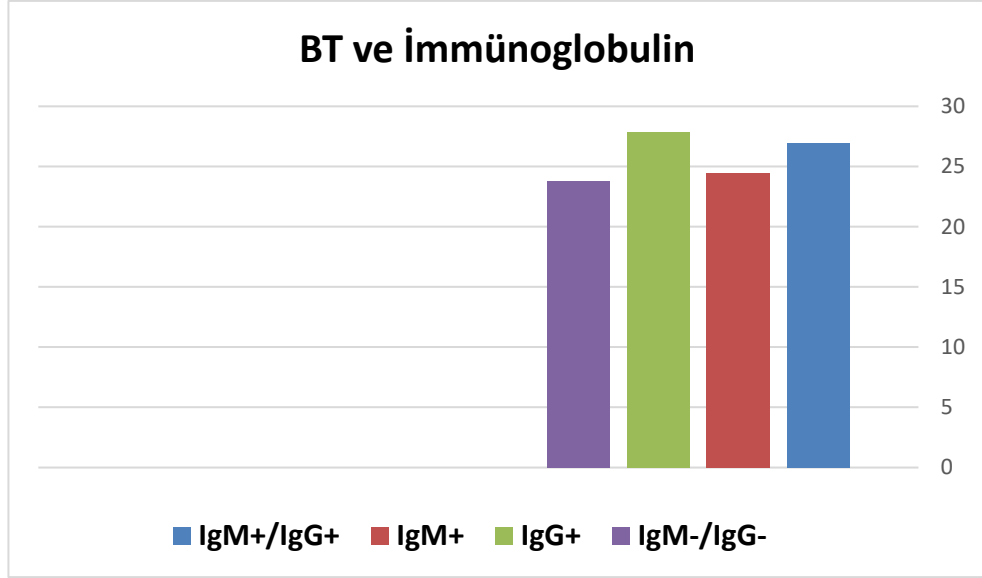
Hastaların SARS-CoV-2 RT-PCR testinin pozitif olduğu bildirilmiş ve nazofarengeal sürüntü örnekleri toplanarak “aktif SARS-CoV-2 enfeksiyonu” grubuna dahil edilmiş ve moleküler yöntemlerle pozitif olarak tanımlanmıştır. Enfeksiyondan kurtulmuş ve aşılanmış kişilerin nazofarenksinden örnekler toplanmış ve çalışma grupları “SARS-CoV-2 enfeksiyonu” grubu ve SARS-CoV-2 RT-PCR için pozitif olan enfekte ve aşılanmış (post-enfekte) hasta grubu oluşturularak sınıflandırılmıştır. Enfekte hastalardan elde edilen ortalama Ct değerleri 27,9’dur. En yüksek ortalama Ct değeri 30 ve en düşük ortalama Ct değeri 19,7 iken, enfeksiyon sonrası ve aynı zamanda aşılanan grup için ortalama Ct değeri 35,3’tür. Ct için en yüksek ortalama değer 40,1 ve en düşük ortalama değer 31 olarak belirlenmiştir. RNA 12 saat içinde izole edilmiş ve çalışma gününe kadar -80°C’de saklanmıştır. Spike geni, zarf geni ve N geninin gen ifadesi, aktif SARS-CoV-2 enfeksiyonu için PCR taraması ve SARS-CoV-2’ye karşı aşılanmış kişilerin enfeksiyon sonrası analizi ile ölçülmüştür. Gruptaki örneklerin ifade varyansı analiz edilmiştir.

4.11.3 SARS-CoV-2 antikor sonuçları ile RT-PCR sonuçlarının karşılaştırılması

SARS-CoV-2 IgM ve SARS-CoV-2 IgG’nin birlikte pozitif saptandığı grupta ortalama Ct değeri 26,97, SARS-CoV-2 IgM ve SARS-CoV-2 IgG pozitif -2 IgG negatif olan grupta ise ortalama Ct değeri 24,50, SARS-CoV-2 IgM negatif ve SARS-CoV-2 IgG pozitif olan grup Medyan Ct değeri 27,9, SARS-CoV-2 IgM ve SARS-CoV-2 IgG testleri. Negatif gruptaki ortalama Ct değeri 23,81 SARS-CoV-2 antikoru olarak bulunmuştur RT-PCR’den elde edilen sonuçlar ve Ct değerleri Çizelge 4.22’de verilmiştir (Şekil 4.66) (Çizelge 4.23).

Çizelge 4.22 SARS-CoV-2 antikorları ve BT değerleri

Antikor Sonuçları	Sayı (N) & Yüzde (%)	Ortalama Ct Değeri
IgM (+) IgG (+)	110 (%45,8)	26,97
IgM (+) IgG (-)	80 (33,3%)	24,50
IgM (-) IgG (+)	18 (7,5%)	27,9
IgM (-) IgG (-)	32 (13,3%)	23,81



Şekil 4.66 SARS-CoV-2 IgM, IgG ve RT-PCR Ct değeri arasındaki ilişki

Çizelge 4.23 SARS-CoV-2 antikorları ile BT değerleri arasındaki karşılaştırma

Değişkenler	IgM		IgG	
	Rho	P	Rho	P
Ct	0,216	0,025	0,203	0,035
IgM			0,683	0,001

4.12 Genlerin Varlığının Konvansiyona Göre Tespiti

Üst solunum yolu enfeksiyonları Covid-19 vakalarında hafif veya ağır vakalarda ortaya çıkar. Asemptomatik enfeksiyon vakalarında genellikle hafiftir ve semptomlar ortaya çıkarsa şiddetli pnömoniye dönüşür. COVID-19'u teşhis etmek için çeşitli kriterler vardır, ancak en etkili kriter numuneler için RT-PCR yöntemidir. Hastaların klinik takibi için bilgisayarlı tomografi gibi ikincil testlere ek olarak oral, balgam ve farengeal sürüntülere ek olarak nazofarengeal boşluklardan alınan farklı sürüntüler kullanılarak çalışılmış ve bu da hem antikor hem de antijen testleri yapıldığı için yaygın serolojik testlerin kullanılmasına yol açmıştır. SARS-CoV-2 virüsü başlangıçta yaygın olarak ve başlangıçta enfeksiyonu belirlemek için kullanılmıştır. Çalışmamızda, testlerin uygulandığı hastalarda her iki tip antikor testi (SARS-COV-2 IgG, SARS-COV-2 IgM) ve (RT-PCR) antikorlar ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, RT-PCR taraması sırasında Ct döngü eşik değeri arasındaki ilişkiyi bulmayı amaçlamış ve (housekeeping gen) Ct

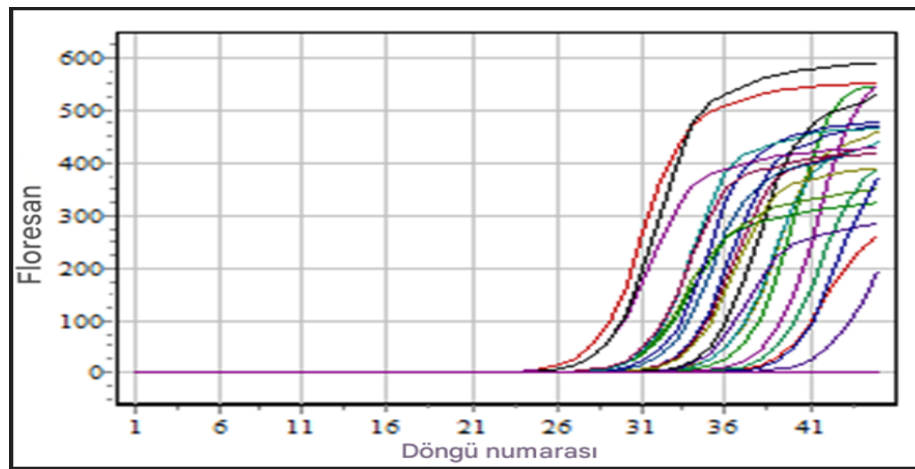
eşik değerinin ölçülmesine ek olarak (S, N, E) dahil olmak üzere çeşitli genler tekrar tekrar tanımlanmıştır. Bu işlem, gen bölgelerinin hedeflenmesi, hedef genin çoğaltılması ve o gen için eşik Ct değerin elde edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Genler, floresan sinyal yoluyla pozitif bir eşik seviyesine ulaşmak için bir dizi termal döngü gerçekleştirilerek hedeflendi. Çalışılan genler için Ct eşik değeri, o örnek için viral yük tarafından temsil edilen örnekte viral DNA varlığını gösteren mümkün olan en düşük değere sahip olarak pozitif bir sonucu temsil eder. Ark eşik değeri ile numunedeki RNA kopyalarının sayısı arasında ters bir ilişki olduğundan, pozitif vaka enfekte bir numune olarak dikkate alınır. Bir numunedeki nükleer yük ne kadar yüksekse, o numunedeki Ct değeri o kadar düşük olur ve bunun tersi de geçerlidir. Örnekteki viral RNA kopya sayısı arttıkça kopya sayısı da artmaktadır (Aranha *et al.* 2021). SARS da dahil olmak üzere bu enfeksiyonu tespit etmek için diğer serolojik yöntemlerin varlığına kıyasla, yoğun bakımda olan güçlü semptomları olan hastalarda viral yükün hafif veya hiç semptomu olmayan hastalara göre daha yüksek olduğu ve viral yükün hastalığın başlangıcında, özellikle ilk evre haftasında en yüksek değerde olduğu görülmüştür (Singanayagam *et al.* 2020). SARS-COV-2 IgG ve SARS-COV-2 IgM ve (RT-PCR) yöntemi ile karşılaştırılmıştır. Antikorları tespit etme yöntemi daha kolay, daha ucuz ve daha hızlı bir yöntem olarak kabul edilir. Özellikle negatif sonuç alınan durumlarda hastalığın teşhisinde yardımcı olarak kullanılmaktadır (Drozdik and Drozdik 2022) Ancak RT-PCR hassas bir sonuç olmaya devam etmektedir ve daha yüksek bir teşhis kalitesine sahiptir. SARS-CoV-2 pozitif hastaların nazofarengeal ve orofarengeal bölgesindeki viral yükler, genlerin Ct değerini yansıtır. 20'den düşük bir ilk CT taraması için hayatta kalanlar belirlendi. Bu vakada Ct değerinin 17,4 olduğu kaydedilmiştir (Alteri *et al.* 2021). Nazofarengeal ve orofarengeal sürüntü örneklerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada; nazofarenks. Sürüntülerin birlikte alındığı iki örnek seti üzerinde gerçekleştirilmiştir; SARS-CoV-2 Nazofarengeal örneklerin Ct değerini tespit etmek için qRT-PCR analizi yapılırken, sürüntü örneği havuzlanmış sürüntü örneğinden daha hassas olmasına rağmen yine de benzer hassasiyet değerlerine sahiptir. İyileşmiş ve asemptomatik kişilerden alınan sürüntülerde IgG antikorlarının varlığı da dahil olmak üzere COVID-19 semptomları ve viral yük ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Huang *et al.* 2021).

4.12.1 Gen ifadesinin ters transkripsiyon kantitatif PCR ile ölçülmesi

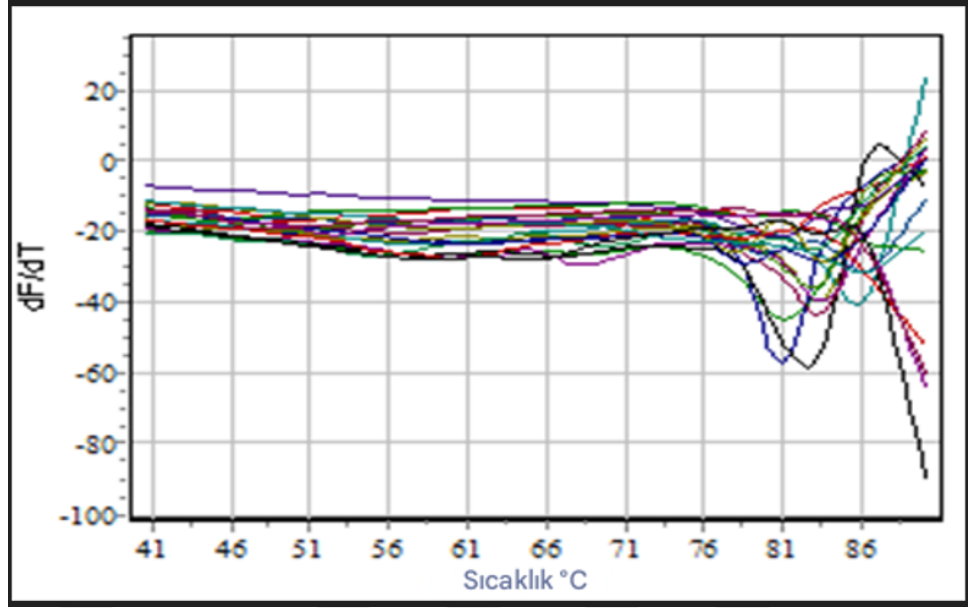
Enfeksiyondan sonra enfekte ve aynı zamanda aşılanmış her numunenin toplam RNA'sı ekstrakte edilmiş ve cDNA'ya dönüştürülmüştür. İki aşamalı yöntem kullanılmıştır, yani RNA önce cDNA'ya dönüştürülmüş ve ardından RT-qPCR ile çoğaltılmıştır. Çalışılan enfeksiyon gruplarının ekspresyonları üzerindeki etkisini görmek için her enfeksiyon durumu için üç gen test edilmiş ve sonuçlar aşağıdaki Şekillerde gösterildiği gibi her tür için spesifik bir housekeeping gen ile normalize edilmiştir.

4.12.2 Gen ifade analizi

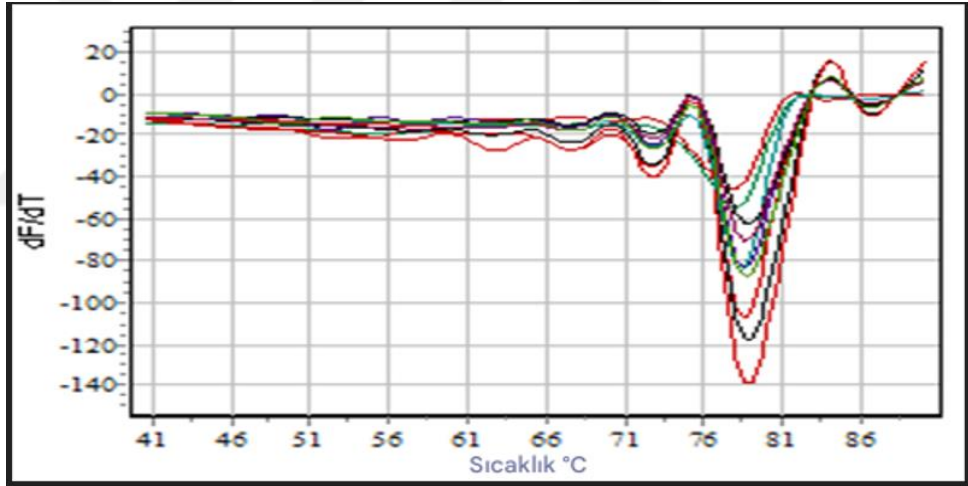
RT-PCR, hastalarda (ağır, orta ve hafif enfeksiyonlu) ve aşılanmış grupta gen ekspresyon analizlerini ölçmüş ve SARS-CoV-2 ile enfekte olmayan kişilerin kontrol gruplarıyla karşılaştırmıştır. Nazofarengeal, orofarengeal ve balgam sürüntülerinde $2^{-\Delta\Delta CT}$ yöntemine göre ekspresyon seviyeleri “Mann Whitney U testi kullanılarak hesaplanmış, çalışma gruplarında genlerin (spike, Envelope ve N protein) gen ekspresyon seviyelerinde farklılıklar gözlenmiş, hasta grubunda gen ekspresyon seviyesi kontrol grubuna kıyasla anlamlı düzeyde artmıştır ($P>0,05$) (Şekil 4.67) (Şekil 4.68) (Şekil 4.69) (Şekil 4.70) (Şekil 4.71) (Şekil 4.72) (Çizelge 4.24) (Şekil 4.73) (Çizelge 4.25) (Şekil 4.74) (Çizelge 4.26) (Şekil 4.75).



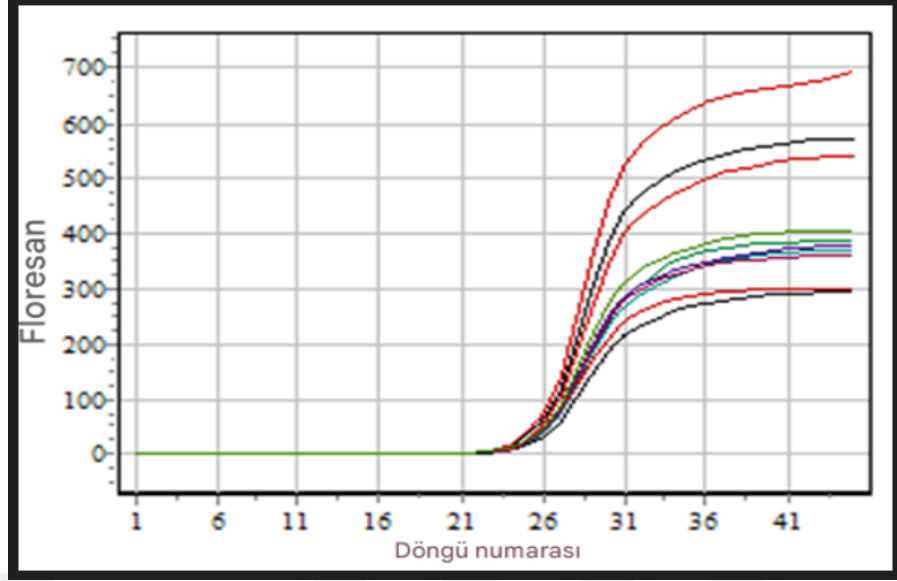
Şekil 4.67 Test edilen bazı genlerin amplifikasyon grafiği



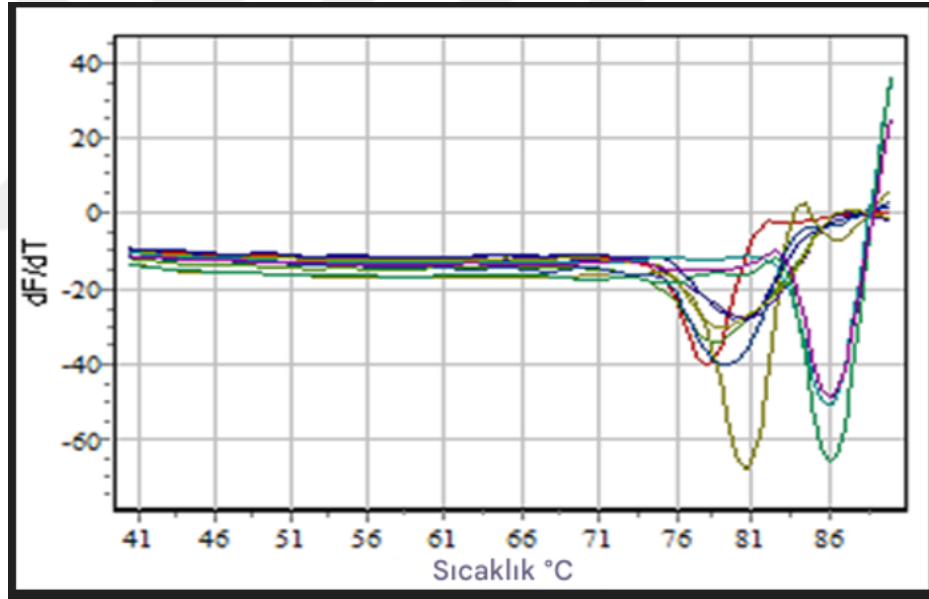
Şekil 4.68 Test edilen genlerden bazılarının erime eğrisi (I)



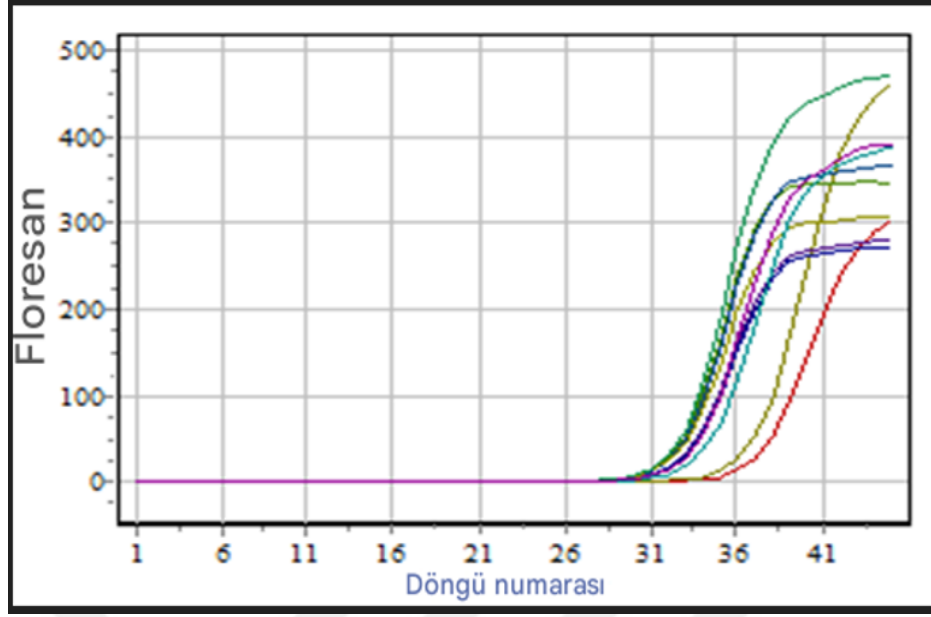
Şekil 4.69 Test edilen genlerden bazılarının erime eğrisi (II)



Şekil 4.70 Bazı housekeeping genlerin amplifikasyon grafiği (I)



Şekil 4.71 Test edilen housekeeping genlerinden bazılarının erime eğrisi

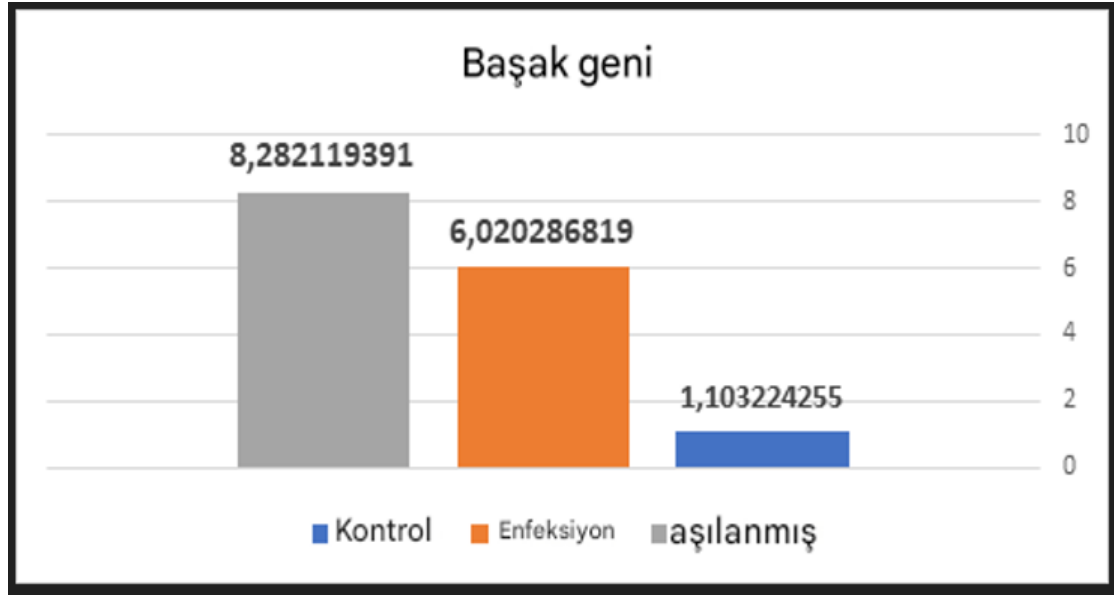


Şekil 4.72 Bazı housekeeping genlerin amplifikasyon grafiği (II)

Çizelge 4.24 $\Delta\Delta Ct$ yöntemine bağlı olarak Spike geninin gen ifadesinin kat sayısı

Grup	S GENİ	HK GENİ	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	İfade kat değişimi ortalaması
Kontrol	38,2	25,65	12,55	0	1,103,224	1,103,224
Enfekte	36,225	25,625	10,6	-1.95	6,020,287	6,020,287
Aşılanmış	35,2	25,7	9,5	-3.05	8,282,119	8,282,119

F değeri 1,536'dır. P değeri 0,280'dir. Sonuç $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

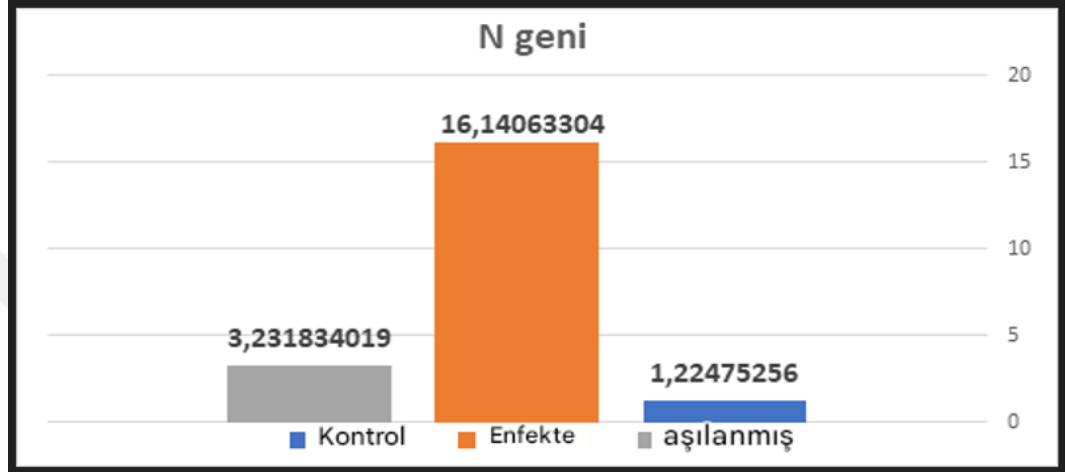


Şekil 4.73 Spike gen ifadesinin kat değişimi ortalaması

Çizelge 4.25 $\Delta\Delta Ct$ yöntemine bağlı olarak N geninin gen ifadesinin kat sayısı

Grup	S GENİ	HK GENİ	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	2- $\Delta\Delta Ct$	İfade kat değişimi ortalaması
Kontrol	33,6	25,65	7,95	0	122,475,256	122,475
Enfekte	29,3	25,2	4,1	-3,85	1,614,063,304	1,614,063
Aşılanmış	32,25	25,75	6,5	-1,45	3,231,834,019	3,231,834

F değeri 21,618'dir. P değeri 0,001'dir. Sonuç $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.

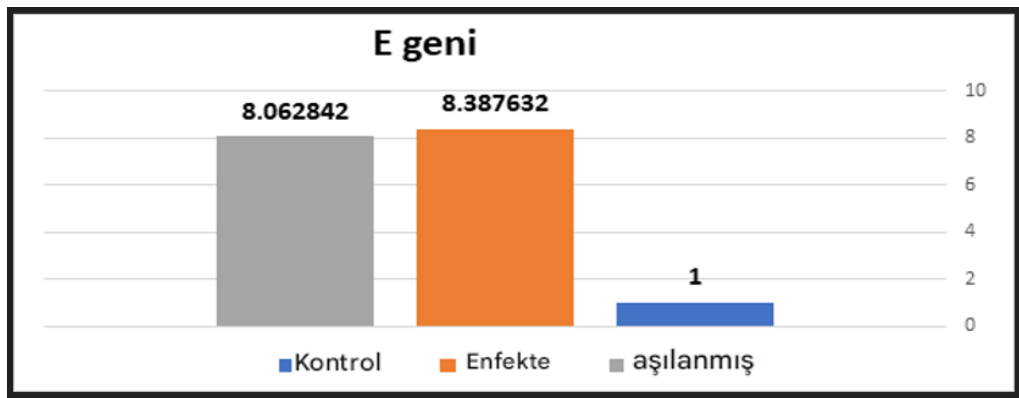


Şekil 4.74 N gen ifadesinin kat değişimi ortalaması

Çizelge 4.26 $\Delta\Delta Ct$ yöntemine bağlı olarak E geninin gen ifadesinin kat sayısı

Grup	S GENİ	HK GENİ	ΔCt	$\Delta\Delta Ct$	2- $\Delta\Delta Ct$	İfade kat değişimi ortalaması
Kontrol	37,05	25,65	11,4	0	1	1
Enfekte	33,75	25,375	8,375	-3,025	8,387,632	8,387,632
Aşılanmış	34,05	25,625	8,425	-2,975	8,062,842	8,062,842

F değeri 8,793'tür. P değeri 0,034'tür. Sonuç $p < 0,05$ düzeyinde anlamlıdır.



Şekil 4.75 E gen ifadesinin kat değişimi ortalaması

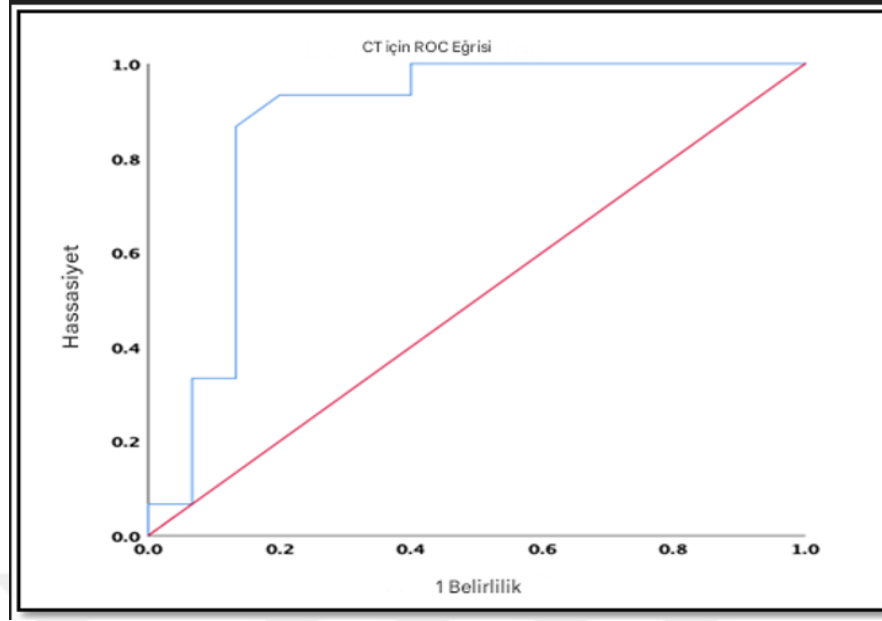
4.13 ROC Eğrisi

ROC eğrisinin her noktası, özgülüğe karşılık gelen duyarlılığı gösterir. ROC eğrisi altındaki alan (AUC), bir parametrenin iki grup arasında ne kadar iyi ayrım yapabildiğini gösterir. ROC eğrisi altındaki alanın büyüklüğü, incelenen tanı testinin ayırt edici yeteneğinin istatistiksel önemini gösterir. Çalışılan tanı testi ayrım yapamıyorsa, ROC eğrisi altındaki alan için beklenen değer 0,50'dir. Test mükemmelse, sıfır yanlış pozitif ve sıfır yanlış negatif varsa, alan değeri 1,00 olacaktır. Test bu iki değer arasında bir bölgeye sahip olmalıdır. Eğri altındaki alanları yorumlamak için aşağıdaki sınıflandırmalar kullanılabilir: 0,90-1,00=Mükemmel, 0,80-0,90=iyi, 0,70-0,80 = ortalama, 0,60-0,70=zayıf Mükemmel ayrımcılığa sahip bir test, sol üst köşeden geçen bir ROC eğrisine sahiptir (%100 duyarlılık, %100 özgülük). Dolayısıyla, ROC eğrisi sol üst köşeye yaklaştıkça testin genel doğruluğu artar. Bu araştırma kapsamında SARS-CoV-2'nin IgM ve IgG değerleri ile SARS-CoV-2'nin döngü eşik değeri için ROC analizi yapılmış, ROC eğrileri ve eğri altında kalan alan (AUC) hesaplanmıştır. Tablo 4-26'da CT seviyelerine dayalı olarak aşılınmış ve enfekte gruplar arasında ayrım yapmak için ROC analizi kriterleri özetlenmektedir. CT parametresi $>31,72$ kesme değeri ile değerlendirilmiştir. Tablo, CT seviyelerinin sırasıyla gerçek pozitif ve negatif sonuçları doğru bir şekilde belirleme yeteneğini gösteren 0,9247'lik bir duyarlılık (SE) ve 0,8572'lik bir özgülük (SP) göstermektedir. Eğri altındaki alan (AUC) 0,873 olarak bildirilmiştir ve bu da orta düzeyde genel tanısal doğruluğa işaret etmektedir. Standart hata (SE) 0,074 olarak verilmiştir ve tahmini AUC değerinde bir miktar değişkenlik olduğunu göstermektedir. 95 güven aralığı (%95 CI) 0,728 ile 1,000 arasında değişmekte olup AUC tahmininin kesinliğini göstermektedir. Özellikle, p-değeri 0,0014 olarak bildirilmiştir, bu da istatistiksel anlamlılığı gösterir ve aşılınmış ve enfekte grupları ayırt etmede CT seviyelerinin tanısal uygunluğunu belirtir (Çizelge 4.27).

Çizelge 4.27 Aşılınmış ve enfekte gruplar arasında CT düzeylerine göre ROC analiz kriterleri

Parametre	Kesme	SE	SP	AUC	Se	95% CI	P değeri
BT	$>31,72$	0,9247	0,8572	0,873	0,074	0,728-1,00	0,0014*

SE: duyarlılık, SP: özgülük, AUC: eğrinin altında kalan alan, Se: standart hata * Önemli (P değeri $<0,05$)



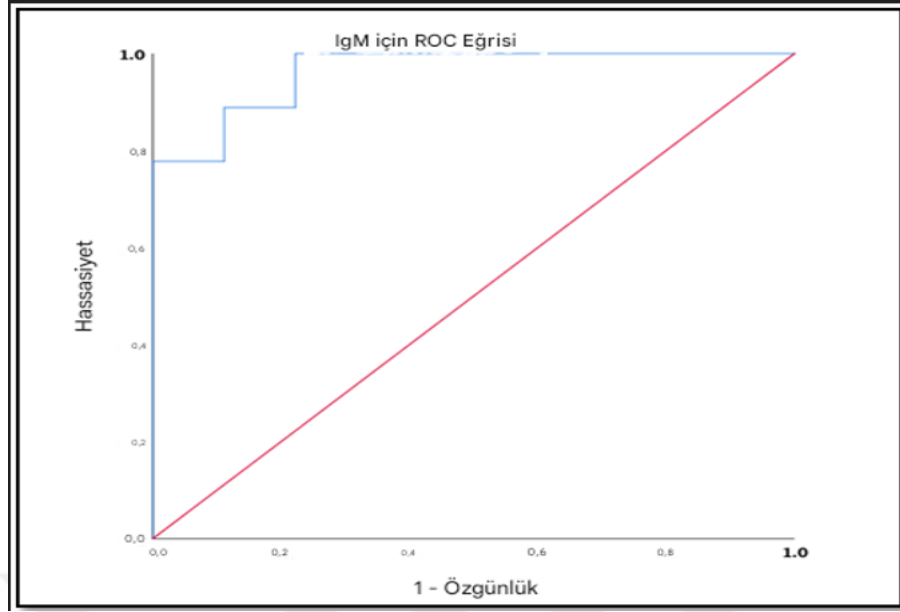
Şekil 4.76 BT düzeylerine göre aşılınmış ve enfekte gruplar arasındaki ayırım için ROC analiz kriterleri

Çizelge 4.28, IgM seviyelerine dayalı olarak aşılınmış ve enfekte gruplar arasında ayırım yapmak için ROC analizi kriterlerine kapsamlı bir genel bakış sunmaktadır. Tabloda duyarlılık (SE), özgüllük (SP), eğri altındaki alan (AUC), standart hata (SE), %95 güven aralıkları (%95 CI) ve p-değerleri gibi temel ölçütler özetlenmektedir. IgM yüksek duyarlılık (0,9002) ve özgüllük (0,8997) gösterirken, 0,963'lük etkileyici bir AUC ile mükemmel tanısal doğruluğa işaret etmektedir. Standart hata (0,039) ve %95 güven aralığı (0,886-1,000) AUC tahmininin değişkenliği ve kesinliği hakkında daha fazla bilgi sağlar. Ayrıca, istatistiksel olarak anlamlı p-değeri (0,001), aşılınmış ve enfekte grupları ayırt etmede IgM seviyelerinin güvenilirliğinin altını çizmektedir. Genel olarak tablo, IgM'nin bu bağlamda güçlü tanı performansına sahip değerli bir biyobelirteç olduğunu vurgulamaktadır.

Çizelge 4.28 IgM seviyelerine dayalı olarak aşılınmış ve enfekte gruplar arasında ayırım için ROC analizi kriterleri

Parametre	Kesme	SE	SP	AUC	Se	95% CI	P değeri
IgM	>7,034	0,9002	0,8997	0,963	0,039	0,886-1,000	0,001*

SE: duyarlılık, SP: özgüllük, AUC: eğrinin altında kalan alan, Se: standart hata * Önemli (p değeri<0,05)



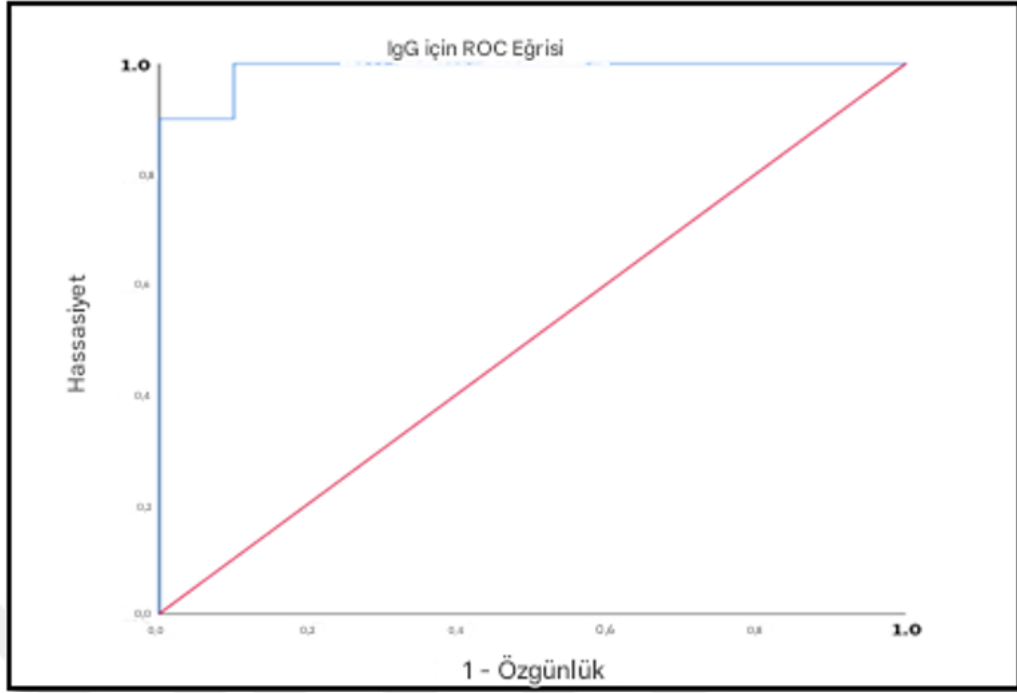
Şekil 4.77 IgM düzeylerine göre aşılınmış ve enfekte gruplar arasındaki ayırım için ROC analiz kriterleri

Çizelge 4.29, IgG seviyelerine dayalı olarak aşılınmış ve enfekte gruplar arasında ayırım yapmak için ROC analizi kriterlerini sunmaktadır. IgG parametresi “>19.48” kesme değeri ile değerlendirilmiştir. Tablo, IgG seviyelerinin sırasıyla gerçek pozitif ve gerçek negatif sonuçları doğru bir şekilde belirleme yeteneğini gösteren 0,9947'lik yüksek duyarlılık (SE) ve 0,9597'lik özgüllük (SP) değerlerini rapor etmektedir. Eğri altındaki alan (AUC) 0,990 ile oldukça yüksektir ve mükemmel genel tanısal doğruluğa işaret etmektedir. Standart hata (SE) 0,016 olarak raporlanmıştır ve tahmini AUC değerinde düşük değişkenliğe işaret etmektedir. 95 güven aralığı (%95 CI) 0,958 ile 1,000 arasında değişmektedir ve bu da gerçek AUC değerinin kesin bir şekilde tahmin edildiğini göstermektedir. Ayrıca, p-değeri 0,0003 ile oldukça anlamlı olup, güçlü istatistiksel anlamlılığa işaret etmekte ve IgG seviyelerinin aşılınmış ve enfekte gruplar arasında ayırım yapmadaki tanısal faydasını daha da doğrulamaktadır.

Çizelge 4.29 IgG düzeylerine göre aşılınmış ve enfekte gruplar arasında ayırım yapmak için ROC analiz kriterleri

Parametre	Kesme	SE	SP	AUC	Se	95% CI	P değeri
IgG	>19,48	0,9947	0,9597	0,99	0,016	0,958-1,00	0,0003*

SE: duyarlılık, SP: özgüllük, AUC: eğrinin altında kalan alan, Se: standart hata*Önemli (p değeri<0,05)



Şekil 4.78 IgG düzeylerine göre aşılanmış ve enfekte gruplar arasındaki ayırım için ROC analiz kriterleri

Bir geçerlilik çalışması, bir kontrol Pozitif popülasyonun tespiti ile karşılaştırıldığında, PDO-ICLIA IgG veya IgM ve CT değerinin alıcı işletim özellikleri (ROC) uzayında görselleştirme grafikleri sağladığını göstermiş ve bu değerlerin ayrı zaman noktalarında kombinasyonunun, özellikle SARS-CoV-2 için aşılanmış denekler arasında enfeksiyon nedeniyle pozitif ve negatifi temsil eden optimize edilmiş ayrılabilir bölgeler ürettiğini öne sürmüştür. Bu göstergelerin sonuçları diğer birçok çalışma ile uyumludur.

IgM/IgG'nin Tanısal Performansı, IgM'nin yüksek hassasiyete (0,9002) ve özgüllüğe (0,8997) sahip olduğunu ve bu çalışmada IgM değerlerinin 0,963 AUC ile olağanüstü tanısal doğruluk çalışması olduğunu göstermiştir. Sonuçlar, Kundu ve diğerleri gibi diğer grupların bulgularıyla uyumludur. SARS-CoV-2 için erken teşhise yönelik IgM'nin yüksek tanısal değerlerini de bildiren Ting *et al.* (2022) tarafından yapılan çalışma doğrultusunda, çalışmaları IgM için 0,901'lik bir AUC göstermiştir, bu da IgM'nin erken tanı için kullanımını desteklemektedir, ancak enfeksiyonun ilerlemesi ve/veya çözülmesiyle duyarlılıkta bir düşüş olduğunu düşündürmektedir. IgG için %99,8'lik (%75,6) duyarlılıklar (özgüllükler) AUC=0,990'ı vermiştir. IgG'nin geçmiş enfeksiyon

veya immün yanıtın önemli bir göstergesi olduğu gösterilmiştir. Örneğin, Zheng *et al.* (2022) tarafından yapılan sistematik bir incelemede IgG testlerinin özgüllüklerinin daha iyi olduğu ve seroprevalans çalışmaları için en çok ihtiyaç duyulan test olduğu belirtilmiştir. Gutierrez-Cobos *et al.* (2021) tarafından yapılan farklı bir çalışmada, IgG'nin koruyucu bağışıklığın bir belirteci olarak konumunu destekleyen benzer yüksek AUC değerleri belirlenmiştir. Diğerleri ve en yenilerinden biri olan Van Zonneveld *et al.* (2021) meta-analizi, IgG testinin yüksek bir özgüllüğe sahip olduğunu, ancak aynı zamanda test doğruluğunun testin ELISA veya fotokimyasal ile RDT kullanmasına bağlı olarak değişebileceğini göstermiştir ve bu nedenle insanların güvenilir serolojik sonuçlar elde etmek için genellikle uygun serum test platformunu tercih etmelerini önermektedir. CT değeri (döngü eşiği), IgM ve IgG gibi serolojik belirteçlere kıyasla nispeten daha düşük olan ve diğer çalışmalarla karşılaştırılabilir olan 0-9247, duyarlılık 0-8572 ve AUC 0-873 ile orta düzeyde bir tanısal doğruluk ortaya koymuştur. Teixeira Da Silva *et al.* (2021) tarafından belirtildiği üzere, CT değerleri test sırasında mevcut olan viral yükten büyük ölçüde etkilenmektedir ve düşük viral yükler nedeniyle (daha yüksek CT değerleriyle korele) daha az doğru sonuçlar bildirmiştir; ancak aynı zamanda, diğer araştırmalar, örneğin (Phan *et al.* 2022) CT değerlerinin kullanımıyla ilgili olarak Perchetti *et al.* (2021), CT değerlerinin viral replikasyonun akut varlığının veya yokluğunun göstergesi olduğunu, ancak hastalık şiddeti veya bağışıklık durumu ile kesin olarak ilişkili olmadığını kabul etmektedir. Bu nedenle, daha güvenilir bir tanı sağlamak için BT verileriyle birlikte COVID-19'u tespit etmek için IgM ve IgG gibi serolojik belirteçlerin entegre edilmesini önermektedirler; Serolojik belirteçleri moleküler testlerle birleştirme stratejisi, daha eksiksiz bir teşhis tablosu oluşturmak için IgM ve IgG kullanan sonuçlarınızın gösterdiği gibi, zaman içinde gözlemlenen Ct değerlerindeki değişkenliği telafi etmeye yardımcı olabilir. Bu değer IgM ve IgG gibi serolojik belirteçlerden daha düşüktür ancak diğer çalışmalarla aynı aralıktadır. Örneğin, Teixeira Da Silva *et al.* (2021) tarafından belirtildiği gibi viral yük, test anındaki DT değerlerini çok etkilerken, genellikle tespit edilebilen düşük miktarda virüs vardır; bu genel olarak daha yüksek DT değerleri (ve dolayısıyla daha az güvenilirlik) ile ilişkilidir, ancak Phan *et al.* (2022) gibi diğer çalışmalar DT değerleri bir virüsün varlığını göstermek için yararlıdır, ancak her zaman Koşulların şiddeti veya bağışıklık durumu ile ilişkili değildir veya bunları yansıtmaz.

Bu nedenle yazarlar, daha iyi ve daha kapsamlı bir teşhis yaklaşımı için BT'nin IgM ve IgG gibi serolojik belirteçlerle birleştirilebileceğini öne sürmektedir. Serolojik belirteçlerin katma değeri bu yaklaşımı desteklemektedir ve IgM ve IgG gibi testler aynı anda kullanıldığında moleküler test için BT değerleri gibi sonuçlar daha az değişkendir ve daha eksiksiz bir teşhis sağlar. Bulguları diğer gruplar tarafından yapılan çeşitli çalışmalarla desteklense de, Zheng *et al.* (2022) tanısal gücü en üst düzeye çıkarmak için enfeksiyonun farklı aşamalarına ilişkin serolojik ve moleküler testleri tamamlama gerekliliği gibi, birçoğu bu belirteçleri tek başına kullanmanın fizibilitesini sorgulamaktadır.

Bir geçerlilik çalışması, bir kontrol Pozitif popülasyonun, PDO-ICLIA IgG veya IgM ve BT değerinin karşılaştırılmış tanısının alıcı işletim karakteristikleri (ROC) alanında görselleştirme çizimleri sağladığını ve bu değerlerin ayrı zaman noktalarında birleştirilmesinin, özellikle SARS-CoV-2 için aşılanmış denekler arasında enfeksiyon nedeniyle pozitif ve negatif temsil eden optimize edilmiş ayrılabilir bölgeler üretmesiyle sonuçlandığını göstermiştir. Bu göstergelerin sonuçları diğer birçok çalışmayla uyumludur.

Tanısal Performansı, IgM'nin yüksek duyarlılığa (0,9002) ve özgüllüğe (0,8997) sahip olduğunu, 0,963'lük bir AUC ile bulunduğunu gösterdi; bu çalışmada IgM değerleri olağanüstü tanısal doğruluk çalışmasını önermektedir. Sonuçlar, Kundu ve ark. gibi diğer grupların bulgularıyla uyumludur. SARS-CoV-2 için erken teşhise yönelik yüksek IgM tanı değerleri bildiren (Ting *et al.* 2022) tarafından yapılan çalışmayla uyumlu olarak, çalışmalarında IgM için 0,901'lik bir AUC gösterildi ve bu, erken tanı için IgM kullanımını destekledi ancak enfeksiyonun ilerlemesi ve/veya çözülmesiyle duyarlılıkta bir düşüş olduğunu öne sürdü. IgG için %99,8'lik (%75,6) duyarlılıklar (özgüllükler) AUC = 0,990 verdi. IgG'nin geçmiş enfeksiyonun veya bir bağışıklık tepkisinin önemli bir göstergesi olduğu gösterilmiştir. Örneğin, Zheng *et al.* (2022) tarafından yürütülen sistematik bir inceleme, IgG testlerinin özgüllük açısından daha iyi olduğunu ve seroprevalans çalışmaları için en çok ihtiyaç duyulan testler olduğunu göstermiştir. Gutierrez-Cobos *et al.* (2021) tarafından yapılan farklı bir çalışma, IgG ile ilgili olarak koruyucu bağışıklığın bir belirteci olarak konumunu destekleyen benzer yüksek AUC

değerleri belirlemiştir. Diğerleri ve en sonuncularından biri olan Van Zonneveld *et al.* (2021) tarafından yapılan meta-analiz ise, IgG testinin yüksek bir özgüllüğe sahip olduğunu, ancak test doğruluğunun testin bir ELISA veya fotokimyasal veya bir RDT kullanmasına bağlı olarak değişebileceğini ve bu nedenle insanların güvenilir serolojik sonuçlar elde etmek için genellikle uygun serum test platformunu tercih ettiğini göstermektedir. BT değeri (döngü eşiği), 0,9247'lik bir tanısal doğruluk, 0,8572'lik bir duyarlılık ve 0,873 ile orta düzeyde bir AUC ortaya koymuştur; bu, diğer çalışmalarla karşılaştırılabilir olan IgM ve IgG gibi serolojik belirteçlere kıyasla nispeten daha düşüktür. Teixeira Da Silva *et al.* (2021) tarafından belirtildiği gibi, BT değerleri test sırasında mevcut viral yükten büyük ölçüde etkilenir ve düşük viral yükler (daha yüksek BT değerleriyle ilişkili) nedeniyle daha az doğru sonuçlar bildirmiştir; ancak Phan *et al.* (2022) gibi diğer araştırmalar da BT değerlerinin kullanımıyla ilgili olarak Perchetti *et al.* (2021), BT değerlerinin viral replikasyonun akut varlığını veya yokluğunu gösterdiğini, ancak hastalığın şiddeti veya bağışıklık durumu ile kesin bir korelasyon göstermediğini kabul etmektedir. Bu nedenle, daha güvenilir bir tanı sağlamak için BT verileriyle birlikte COVID-19'u tespit etmek için IgM ve IgG gibi serolojik belirteçleri entegre etmeyi öneriyorlar; Serolojik belirteçleri moleküler testlerle birleştirme stratejisi, daha eksiksiz bir tanı tablosu oluşturmak için IgM ve IgG'yi kullanarak elde ettiğiniz sonuçlarla gösterildiği gibi, zaman içinde gözlemlenen Ct değerlerindeki değişkenliği telafi etmeye yardımcı olabilir. Bu, IgM ve IgG gibi serolojik belirteçlerden daha düşüktür, ancak diğer çalışmaların aynı aralığındadır. Örneğin, Silva ve ark. tarafından belirtildiği gibi viral yük, test anındaki BT değerlerini çok etkiler. Haklı olmasına ve bu nedenle genellikle tespit edilebilen düşük miktarda virüs olmasına rağmen; bu genel olarak daha yüksek BT değerleriyle (ve dolayısıyla daha az güvenilirlikle) ilişkilidir, ancak Phan *et al.* (2022) gibi diğer çalışmalar, DT değerleri bir virüsün varlığını göstermek için yararlıdır ancak her zaman Durumların ciddiyeti veya bağışıklık durumuyla ilişkili değildir veya bunları yansıtmaz.

Böylece yazarlar, daha iyi ve daha kapsamlı bir tanı yaklaşımı için BT'nin IgM ve IgG gibi serolojik belirteçlerle birleştirilebileceğini öne sürmektedir. Serolojik belirteçlerin katma değeri bu yaklaşımı doğrulamaktadır ve IgM ve IgG gibi testler aynı anda kullanıldığında moleküler test için BT değerleri gibi sonuçlar daha az değişkendir ve daha

eksiksiz bir tanı sağlar. Bulguları diğer gruplar tarafından yapılan çeşitli çalışmalarla desteklenmesine rağmen, birçoğu bu belirteçlerin tek başına kullanılmasının uygulanabilirliğini sorgulamaktadır, örneğin ve Zheng *et al.* (2022) tanı gücünü en üst düzeye çıkarmak için farklı enfeksiyon aşamaları açısından serolojik ve moleküler testleri tamamlamanın gerekliliğini öne sürmektedir.

4.14 Çalışma Sonuçlarının Analizi

Spearman'ın sıra korelasyon katsayısı veya Spearman'ın rho'su, iki değişken arasındaki bağımlılığı veya korelasyonu ölçmek için kullanılan parametrik olmayan bir istatistiksel ölçüdür. Spearman'ın rho katsayısı (ρ) iki değişken arasındaki ilişkinin ne ölçüde tanımlanabildiğini değerlendirmek için kullanılır. Çalışmada SARS-CoV-2 IgM, SARS-CoV-2 IgG ve SARS-CoV-2 RT-PCR Ct değerleri arasındaki ilişkiyi incelemek için Spearman's rho analizi yapılmıştır. Spearman katsayısı veya Spearman's rho, iki değişken arasındaki korelasyonun bir ölçüsü olarak kullanılan parametrik olmayan bir istatistiksel ölçüdür. Spearman'ın rho katsayısı (ρ), iki değişken arasındaki ilişkinin ne ölçüde tanımlanabileceğini değerlendirmek için kullanılır Bu sonuçlara göre; SARS-CoV-2 Ct değerleri ile IgM değerleri arasında pozitif ve anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($\rho=0,216$; $p<0,05$). SARS-CoV-2 Ct değerleri ile IgG değerleri arasında pozitif ve anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir ($\rho=0,203$; $p<0,05$). SARS-CoV-2 için IgM ve IgG değerleri arasında pozitif ve anlamlı bir korelasyon tespit edilmiştir ($\rho=0,683$; $p<0,001$).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

COVID-19'lu yaşlı bireylerde bakteriyel pnömoni prevalansı 50 yaşın üzerindeki yaşlı yetişkinlerde artmıştır ve özellikle erkeklerde kadınlara göre daha fazla enfeksiyon insidansı görülmektedir. COVID-19'un hastalık şiddeti yaştan ve komorbiditelerin varlığından etkilenebilir ve bu popülasyonda yüksek hedefli tedaviler için potansiyel bir rol vardır.

COVID-19 hastalarında bakteriyel enfeksiyonlar bakımından çalışmada geniş spektrum COVID-19 hastalarında hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif ikincil bakteriyel enfeksiyonları, özellikle de en yaygın olan *K. pneumoniae* pnömonisi ve *M. catarrhalis* pnömonisini doğrulamıştır. Enfeksiyon oranları, numune türüne göre her grupta değişiklik göstererek, ko-enfeksiyonların karmaşık potansiyelini ortaya koymuştur.

Bakteriyel virülans faktörlerinin önem bakımından doku istilası, bağışıklık sisteminden kaçınma ve konakçıya zarar verme söz konusu olduğunda enfeksiyon için bakteriyel virülans faktörlerinin anlaşılması önem taşımaktadır. Biyofilm oluşum sürecinin *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* gibi daha sağlam veya *Acinetobacter baumannii* gibi daha zayıf enfeksiyonlara göre değişiklik göstermesi nedeniyle biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi, SARS-CoV-2 hastalarında biyofilm ile ilişkili ikincil enfeksiyonların tanımlanması ve yönetiminde kritik öneme sahiptir; Gram-pozitif kohorttaki bakteriler, dişli doğum ağzında Gram-negatif kohorttakilere kıyasla genellikle esasen stabil biyofilmler oluşturur.

COVID-19'un bağışıklık parametreleri arasındaki ilişkiler karmaşıktır ve aşılınmamış bireylerde daha derindir. Artan TLR2 ve FASL seviyeleri arasındaki korelasyonel yanıtlar, hastalanan kohort örnekleminde yinelenerek yaş ve COVID-19 hastalığı açısından bağışıklık yanıtının karmaşık doğasına vurgu yapılmıştır.

Hastalardaki SARS-CoV-2 enfeksiyonu, yanlış enfeksiyonu önlemek amacıyla enfeksiyonun varlığını tespit etmek için çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanılarak

değerlendirilmiş ve RT-PCR kullanımı gibi birbirleriyle karşılaştırılarak isimlendirilmiştir. Çalışmada gruplar arasında oransal olarak Ct değerlerinde farklılık ve ortalama olduğu, enfekte olmamış ve aşılanmış kişiler arasında viral yük değerinin ortalamasının Ct 27,9 enfekte olmuş kişilerde 35,3 aşılanmış hastalarda veya gruplarda Ct değerlerinin her iki hasta grubu arasında viral yükte bir farklılığa işaret edecek şekilde farklılık gösterdiği bulunmuştur. Buna ek olarak, çalışma SARS-CoV-2'ye karşı nötralize edici antikorlar ile Ct değerleri arasındaki ilişkiyi doğrulamış ve bağışıklık tepkisizliği ile viral etki tespiti arasındaki etkileşimi göstermiştir.

SARS-CoV-2 hastalarının gen ekspresyonu, hastalarda yapısal proteinlerin (spike, cover ve N genleri) ekspresyonunun değerlendirilmesinde gerçekleştirilmiştir. Revers transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu olarak bildirilen aşılanmış hastalar için 35,3'e kıyasla hafif enfeksiyonlu hastaların genel ortalama Ct'si 27,9'dur ve bu da çalışmada önemli sinyal sonucunun kanıtıdır. Mevcut çalışmada, aşılanmış hastalara kıyasla enfekte olmuş hasta gruplarında spike, zarf ve N genlerinin skaler gen ekspresyonunda artış gözlenmiş ve bu da immün yanıtın etkinliğini göstermiştir. Bu çalışma, SARS-CoV-2 virüs dinamiklerini yorumlamak ve değerlendirmek için gen ekspresyon analizinin etkinliğini ve SARS-CoV-2'nin biyolojisi ve/veya dinamikleri üzerinde enfeksiyonun ilerlemesini değerlendiren önemli bilgileri gösteren viral yük ile antikor seviyeleri ve aktivitesinin ilişkisini desteklemektedir.

Virüs dinamiklerini anlamaya yönelik bir yaklaşım olarak gen ifadesinin önemi, orta ve hafif derecede SARS-CoV-2 enfeksiyonu olan hastalarda ve aşılanmış bireylerde, enfekte olmamış kontrollere kıyasla spike, N ve E genlerinin başlangıç seviyelerinin normalleştirilmesi değerlendirilerek gösterilmiştir. Genel analizler, enfekte (spike kat değişimi 6,02, n: 16,14, p 8,39) ve aşılanmış (spike kat değişimi 8,28, n: 3,23, p 8,06) gruplardaki genlerin ekspresyon seviyelerinin kontrollere kıyasla önemli ölçüde yükseldiğini göstermiştir; bu da hem enfekte hem de aşılanmış gruplardaki katılımcıların spike ve N genleri için istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olağanüstü yüksek bağışıklık tepkilerine sahip olduğunu göstermektedir ($p < 0,05$). Genel olarak, bu veriler ve analizler, SARS-CoV-2 enfeksiyonu ve SARS-CoV-2 aşılmasında bağışıklık dinamikleri hakkında sonuçlar çıkarırken gen ekspresyon analizinin değerini desteklemektedir.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda; tükürük, dışkı, idrar ve diğer vücut salgıları gibi diğer bölgelerden izole edilen bakteriler üzerinde böyle bir çalışma yapılması ve bu izolatların bölgeye özgü bakteriyel adaptasyon mekanizmaları hakkında bilgi sağlama olasılığının belirlenmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, farklı ortamlardaki bakteri davranışlarını ve etkileşimlerini anlamak için çoklu gen analizlerinin (metagenomik, transkriptomik) kullanılması, viral yapısal proteinlerin farklı bölgelerdeki bakteriyel biyofilmler üzerindeki etkisinin belirlenmesi ve viral proteinlerin yerel ortamlardaki bakteriyel davranışları modüle etmedeki spesifik rollerinin keşfedilmesi, biyofilm oluşumunu önlemek ve böylece enfeksiyonla ilişkili solunum yolu enfeksiyonlarını azaltmak için potansiyel yeni inhibitörler olarak peptitlerden, küçük moleküllerden ve nanopartiküllerden terapötik bileşiklerin tasarlanması, viral yapısal ve yapısal olmayan proteinlerin, diğer virülans faktörleri ve metabolik süreçler gibi biyofilm oluşumundan sorumlu bakteriyel genler üzerindeki etkisinin incelenmesi, viral proteinlerin varlığında biyofilm oluşumunda rol oynayan düzenleyici değişiklikleri belirlemek için viral proteinlere maruz kalan bakteri hücrelerinin transkripsiyonel analizini yaparak viral enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ilaçların ve aşılarda bakteriyel biyofilm oluşumunu engelleme yeteneklerinin karşılaştırılması, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık tepkilerini değerlendirmek için COVID-19 aşılarda güçlendirici dozlarının farklı bağışıklık parametrelerinin seviyeleri üzerindeki etkisini kanıtlamak için gelecekteki çalışmaların yürütülmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abassi, Z., Higazi, A. A. R., Kinaneh, S., Armaly, Z., Skorecki, K. and Heyman, S. N. 2020. ACE2, COVID-19 infection, inflammation, and coagulopathy: missing pieces in the puzzle. *Frontiers in Physiology*, 11(9): 574753.
- Abe, R., Oda, S., Sadahiro, T., Nakamura, M., Hirayama, Y., Tateishi, Y. and Hirasawa, H. 2010. Gram-negative bacteremia induces greater magnitude of inflammatory response than Gram-positive bacteremia. *Critical Care*, 14(2): 1-7.
- Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., Gómez, F. and Amils, R. 2007. Development and structure of eukaryotic biofilms in an extreme acidic environment, Río Tinto. *Microbial Ecology*, 53(8): 294-305.
- Ahmadi, K., Hashemian, A. M., Pouryaghobi, S. M., Akhavan, R., Rozmina, S. and Bolvardi, E. 2016. Antibiotic resistance properties of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from cases of superficial infections at the emergency unit. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1): 1-10.
- Al Amin, M., Arefin, M. S., Alam, M. R., Ahammad, T. and Hoque, M. R. 2021. Using mobile food delivery applications during COVID-19 pandemic: An extended model of planned behavior. *Journal of Food Products Marketing*, 27(2): 105-126.
- Al Rawi K. M. 2000. Entrance to statistics. Springer, 19(7): 1-3.
- Al-Asadi, A. B., Al-Nuaimi, B. N., Abdul-Ghani, M. N. and Al-Maadhidi, J. F. 2022. Immune response among different types of SARS-CoV-2 vaccines in Iraq. *Journal of Communicable Diseases*, 22(4): 103-108.
- Alfred, E. B. 2005. *Benson's microbiological applications in laboratory manual in general microbiology*. McGraw-Hill, 239 page, New York.
- Alteri, C., Cento, V., Piralla, A., Costabile, V., Tallarita, M., Colagrossi, L. and Baldanti, F. 2021. Genomic epidemiology of SARS-CoV-2 reveals multiple lineages and early spread of SARS-CoV-2 infections in Lombardy, Italy. *Nature Communications*, 12(1): 434.
- Ameen, H. M., Mahdi, N. B. and Eldin, A. K. 2021. Investigation of secondary Bacterial Lung Infections associated with Corona virus Covid19, and the extent of their Resistance to some types of Antibiotics in the city of Kirkuk. *NVEO*, 21(9): 9153-9161.

- Andersen, K. G., Rambaut, A., Lipkin, W. I., Holmes, E. C. and Garry, R. F. 2020. The proximal origin of SARS-CoV-2. *Nature medicine*, 26(4): 450-452.
- Aranha, C., Patel, V., Bhor, V. and Gogoi, D. 2021. Cycle threshold values in RT-PCR to determine dynamics of SARS-CoV-2 viral load: An approach to reduce the isolation period for COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*, 93(12): 6794-6797.
- Armbruster, C. R. and Parsek, M. R. 2018. New insight into the early stages of biofilm formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(17): 4317-4319.
- Arnold, F. W. and Fuqua, J. L. 2020. Viral respiratory infections: a cause of community-acquired pneumonia or a predisposing factor?. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 26(3): 208-214.
- Arunachalam, P. S., Scott, M. K., Hagan, T., Li, C., Feng, Y., Wimmers, F. and Pulendran, B. 2021. Systems vaccinology of the BNT162b2 mRNA vaccine in humans. *Nature*, 596(7872): 410-416.
- Aslan, Ö., Mızraklı, A., Aktar, G. S. and Onur, A. R. 2021. Evaluation of anti-SARS-CoV-2 antibody levels: two different methods. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 67(4): 597-601.
- Atlas, R. M. 2006. *The handbook of microbiological media for the examination of food*. CRC press, 464 page, Boca Raton.
- Atlas, R. M. and Snyder, J. W. 2013. *Handbook of media for clinical and public health microbiology*. CRC Press, 578 page, Boca Raton.
- Azkur, A. K., Akdis, M., Azkur, D., Sokolowska, M., van de Veen, W., Brüggen, M. C. and Akdis, C. A. 2020. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. *Allergy*, 75(7): 1564-1581.
- Azzopardi, E. A., Duncan, R. T., Kearns, M., Marangoni, F., Ibrahim, N., Azzopardi, E. A. and Mursion, M. S. 2020. *Staphylococcus aureus* biofilm formation and resistance mechanisms. *Frontiers in Microbiology*, 11(6): 1017.
- Bahador, N., Shoja, S., Faridi, F., Dozandeh-Mobarrez, B., Qeshmi, F. I., Javadpour, S. and Mokhtary, S. 2019. Molecular detection of virulence factors and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* obtained from different clinical specimens in Bandar Abbas. *Iranian Journal of Microbiology*, 11(1): 25.
- Ball, A. S. 1997. *Bacterial cell culture*. CABI, 7(7): 102.

- Bassetti, M., Russo, A., Righi, E., Dolso, E., Merelli, M., D'Aurizio, F. and Curcio, F. 2020. Role of procalcitonin in predicting etiology in bacteremic patients: Report from a large single-center experience. *Journal of Infection and Public Health*, 13(1): 40-45.
- Beig Parikhani, A., Bazaz, M., Bamehr, H., Fereshteh, S., Amiri, S., Salehi-Vaziri, M. and Azadmanesh, K. 2021. The inclusive review on SARS-CoV-2 biology, epidemiology, diagnosis, and potential management options. *Current Microbiology*, 78(7): 1099-1114.
- Beloin, C., Roux, A. and Ghigo, J. M. 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Bacterial Biofilms*, 8(7): 249-289.
- Bengoechea, J. A. and Bamford, C. G. 2020. SARS-CoV-2, bacterial co-infections, and AMR: The deadly trio in COVID-19? *EMBO Molecular Medicine*, 12(7): 12560.
- Berkowitz, F. E. and Jerris, R. C. 2016. *Practical medical microbiology for clinicians*. John Wiley and Sons, 480 page, New York.
- Beyerstedt, S., Casaro, E. B. and Rangel, É. B. 2021. COVID-19: Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) expression and tissue susceptibility SARS-CoV-2 infection. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 40(5): 905-919.
- Bosch, B. J., Van Der Zee, R., de Haan, C. A. M. and Rottier, P. J. M. 2003. The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: The Coronavirus Spike Protein Is a Class I Virus Fusion Protein: Structural and Functional Characterization of the Fusion Core Complex. *Journal of Virology*, 77(16): 8801-8811.
- Bowen, W. H., Burne, R. A., Wu, H. and Koo, H. 2018. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. *Trends in Microbiology*, 26(3): 229-242.
- Braciale, T. and Hahn, Y. 2013. Immunity to viruses. *Immunology*, 255 (1): 5-12.
- Bradley, B. T. and Bryan, A. 2019. Emerging respiratory infections: the infectious disease pathology of SARS, MERS, pandemic influenza, and Legionella. In *Seminars in diagnostic pathology*. WB Saunders, 36(3): 152-159.
- Breijyeh, Z., Jubeh, B. and Karaman, R. 2020. Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 25(6): 1340.

- Bundschuh, C., Egger, M., Wiesinger, K., Gabriel, C., Clodi, M., Mueller, T. and Dieplinger, B. 2020. Evaluation of the EDI enzyme linked immunosorbent assays for the detection of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in human plasma. *Clinica Chimica Acta*, 509(4): 79-82.
- Burke, R. M., Midgley, C. M., Dratch, A., Fenstersheib, M., Haupt, T., Holshue, M. and Rolfes, M. A. 2020. Active monitoring of persons exposed to patients with confirmed COVID-19—United States, January–February 2020. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 69(9): 245.
- Callegaro, A., Borleri, D., Farina, C., Napolitano, G., Valenti, D., Rizzi, M. and Maggiolo, F. 2021. Antibody response to SARS-CoV-2 vaccination is extremely vivacious in subjects with previous SARS-CoV-2 infection. *Journal of medical Virology*, 93(7): 4612-4615.
- Cañete, P. F. and Vinuesa, C. G. 2020. COVID-19 makes B cells forget, but T cells remember. *Cell*, 183(1): 13-15.
- Capolunghi, F., Rosado, M. M., Sinibaldi, M., Aranburu, A. and Carsetti, R. 2013. Why do we need IgM memory B cells?. *Immunology Letters*, 152(2): 114-120.
- Chakraborty, S., Mohsina, K., Sarker, P. K., Alam, M. Z., Karim, M. I. A. and Sayem, S. A. 2016. Prevalence, antibiotic susceptibility profiles and ESBL production in *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* among hospitalized patients. *Periodicum Biologorum*, 118(1): 2-5.
- Chanukya, G. V. and Srikantam, A. 2021. Comparative quantitative analysis of SARS-CoV-2 Spike neutralizing antibody titers following two anti COVID-19 vaccines in India. *MedRxiv*, 21(2): 2021-2108.
- Chauhan, N. K., Shadrach, B. J., Garg, M. K., Bhatia, P., Bhardwaj, P., Gupta, M. K. and Misra, S. 2021. Predictors of Clinical Outcomes in Adult COVID-19 Patients Admitted to a Tertiary Care Hospital in India: an analytical cross-sectional study. *Acta Bio Medica: Atenei Parmensis*, 92(3): 98-104.
- Chen, Z. and John Wherry, E. 2020. T cell responses in patients with COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, 20(9): 529-536.
- Chertow, D. S. and Memoli, M. J. 2013. Bacterial coinfection in influenza: a grand rounds review. *the Journal of the American Medical Association*, 309(3): 275-282.

- Chi, Y., Ge, Y., Wu, B., Zhang, W., Wu, T., Wen, T. and Cui, L. 2020. Serum cytokine and chemokine profile in relation to the severity of coronavirus disease 2019 in China. *The Journal of Infectious Diseases*, 222(5): 746-754.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M. and Beachey, E. H. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6): 996-1006.
- Colafrancesco, S., Alessandri, C., Conti, F. and Priori, R. 2020. COVID-19 gone bad: A new character in the spectrum of the hyperferritinemic syndrome? *Autoimmunity Reviews*, 19(7): 102573.
- Collins, A. M. and Jackson, K. J. 2013. A temporal model of human IgE and IgG antibody function. *Frontiers in Immunology*, 4(6): 235.
- Corman, V. M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D. K. and Drosten, C. 2020. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance*, 25(3): 2000045.
- Crozet, P., Margalha, L., Confraria, A., Rodrigues, A., Martinho, C., Adamo, M. and Baena-González, E. 2014. Mechanisms of regulation of SNF1/AMPK/SnRK1 protein kinases. *Frontiers in Plant Science*, 5(1): 190.
- Cucchiari, D., Egri, N., Bodro, M., Herrera, S., Del Risco-Zevallos, J., Casals-Urquiza, J. and Diekmann, F. 2021. Cellular and humoral response after mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine in kidney transplant recipients. *American Journal of Transplantation*, 21(8): 2727-2739.
- Davies, A. M., Jefferis, R. and Sutton, B. J. 2014. Crystal structure of deglycosylated human IgG4-Fc. *Molecular Immunology*, 62(1): 46-53.
- Davies, D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2): 114-122.
- De Bruijn, F. J., Smidt, H., Cocolin, L. S., Sauer, M., Dowling, D. N. and Thomashow, L. 2022. Good microbes in medicine, food production, biotechnology, bioremediation, and agriculture. John Wiley and Sons, 592 page, New York.
- De Bruyn, A., Verellen, S., Bruckers, L., Geebelen, L., Callebaut, I., De Pauw, I. and Dubois, J. 2022a. Secondary infection in COVID-19 critically ill patients: A retrospective single-center evaluation. *BMC Infectious Diseases*, 22(1): 207.

- Dempsey, L. A., Fehervari, Z. and Visan, I. 2010. A new light on migration. *Cell Host Microbe*, 11(5): 372-373.
- Dinç, H. Ö., Demirci, M., Özdemir, Y. E., Sirekbasan, S., Aktaş, A. N., Karaali, R. and Kocazeybek, B. 2022. Anti-SARS-CoV-2 IgG and neutralizing antibody levels in patients with past COVID-19 infection: a longitudinal study. *Balkan Medical Journal*, 39(3): 172.
- Domenech, M., García, E. and Moscoso, M. 2012. Biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. *Microbial Biotechnology*, 5(4): 455-465.
- Drozdzik, A. and Drozdik, M. 2022. Oral pathology in COVID-19 and SARS-CoV-2 infection—Molecular aspects. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3): 1431.
- Du, R. H., Liang, L. R., Yang, C. Q., Wang, W., Cao, T. Z., Li, M. and Shi, H. Z. 2020. Predictors of mortality for patients with COVID-19 pneumonia caused by SARS-CoV-2: a prospective cohort study. *European Respiratory Journal*, 55(5): 1-9.
- Dudoignon, E., Caméléna, F., Deniau, B., Habay, A., Coutrot, M., Ressaire, Q. and Dépret, F. 2021. Bacterial pneumonia in COVID-19 critically ill patients: a case series. *Clinical Infectious Diseases*, 72(5): 905-906.
- Düzgüneş, N. 2015. Medical microbiology and immunology for dentistry. Quintessence Publishing 15(7): 83.
- Ebinger, J. E., Fert-Bober, J., Printsev, I., Wu, M., Sun, N., Prostko, J. C. and Sobhani, K. 2021. Antibody responses to the BNT162b2 mRNA vaccine in individuals previously infected with SARS-CoV-2. *Nature Medicine*, 27(6): 981-984.
- Engelkirk, P. G., Duben-Engelkirk, J. and Fader, R. C. 2020. *Burton's microbiology for the health sciences*. Jones and Bartlett Learning, 478 page, Massachusetts.
- Fei, Y., Tang, N., Liu, H. and Cao, W. 2020. Coagulation Dysfunction A Hallmark in COVID-19. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 144(10): 1223-1229.
- Feng, Y., Ling, Y., Bai, T., Xie, Y., Huang, J., Li, J. and Qu, J. 2020. COVID-19 with different severities: a multicenter study of clinical features. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 201(11): 1380-1388.
- Flemming, H. C. and Wuertz, S. 2019. Bacteria and archaea on Earth and their abundance in biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, 17(4): 247-260.

- Flemming, H. C., Neu, T. R. and Wozniak, D. J. 2007. The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, 189(22): 7945-7947.
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A. and Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9): 563-575.
- Flisiak, R., Horban, A., Jaroszewicz, J., Kozielowicz, D., Mastalerz-Migas, A., Owczuk, R. and Zarębska-Michaluk, D. 2021. Management of SARS-CoV-2 infection: Recommendations of the Polish Association of Epidemiologists and Infectiologists as of April 26, 2021. *Polish Archives of Internal Medicine*, 131(5): 487-496.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. *Diagnostic microbiology*. Mosby, 855 page, Missouri.
- Foresta, C., Rocca, M. S. and Di Nisio, A. 2021. Gender susceptibility to COVID-19: A review of the putative role of sex hormones and X chromosome. *Journal of Endocrinological Investigation*, 44(5): 951-956.
- Forni, G. and Mantovani, A. 2021. COVID-19 vaccines: where we stand and challenges ahead. *Cell Death and Differentiation*, 28(2): 626-639.
- Freeman, D. J., Falkiner, F. R. and Keane, C. T. 1989. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*, 42(8): 872-874.
- Fu, Y., Yang, Q., Xu, M., Kong, H., Chen, H., Fu, Y. and Zhou, J. 2020. Secondary bacterial infections in critical ill patients of COVID-19. *Oxford University Press*, 7(6): 220.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Stoodley, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1): 34-40.
- Gad, G. F. M., El-Feky, M. A., El-Rehewy, M. S., Hassan, M. A., Abolella, H. and Abd El-Baky, R. M. 2009. Detection of *icaA*, *icaD* genes and biofilm production by *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from urinary tract catheterized patients. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3(5): 342-351.
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J. and Lombó, F. 2018. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. *Frontiers in Microbiology*, 9(7): 898.

- Gellatly, S. L. and Hancock, R. E. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathogens and Disease*, 67(3): 159-173.
- Getahun, H., Smith, I., Trivedi, K., Paulin, S. and Balkhy, H. H. 2020. Tackling antimicrobial resistance in the COVID-19 pandemic. *Bulletin of the World Health Organization*, 98(7): 442.
- Giannis, D., Ziogas, I. A. and Gianni, P. 2020. Coagulation disorders in coronavirus infected patients: COVID-19, SARS-CoV-1, MERS-CoV and lessons from the past. *Journal of Clinical Virology*, 127(8): 104362.
- Goldman, E. and Green, L. H. 2015. *Practical handbook of microbiology*. CRC Press, 975 page, Boca Raton.
- Gordon, R. J. and Lowy, F. D. 2008. Pathogenesis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Clinical Infectious Diseases*, 46(5): 350-359.
- Grasselli, G., Tonetti, T., Protti, A., Langer, T., Girardis, M., Bellani, G. and Seccafico, C. 2020. Pathophysiology of COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome: a multicentre prospective observational study. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(12): 1201-1208.
- Grice, E. A. and Segre, J. A. 2011. The skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 9(4): 244-253.
- Guan, W. J., Ni, Z. Y., Hu, Y., Liang, W. H., Ou, C. Q., He, J. X. and Zhong, N. S. 2020. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine*, 382(18): 1708-1720.
- Guo, L., Ren, L., Yang, S., Xiao, M., Chang, D., Yang, F. and Wang, J. 2020. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clinical Infectious Diseases*, 71(15): 778-785.
- Gutierrez-Cobos, A., Gomez de Frutos, S., Domingo Garcia, D., Navarro Lara, E., Yarci Carrion, A., Fontan Garcia-Rodrigo, L. and Cardenoso Domingo, L. 2021. Evaluation of diagnostic accuracy of 10 serological assays for detection of SARS-CoV-2 antibodies. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 40(8): 955-961.
- Gülbudak, H., Karvar, Ş., Soydan, G., Kandemir, Ö., Tamer, L., Altunkan, A. A. and Aslan, G. 2021. Comparison of real time PCR cycle threshold values in

- symptomatic and asymptomatic COVID-19 patients. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 55(3): 435-444.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. and Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2): 95-108.
- Hamming, I., Timens, W., Bulthuis, M. L. C., Lely, A. T., Navis, G. V. and Van Goor, H. 2004. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 203(2): 631-637.
- Harris, L. G., Nigam, Y., Sawyer, J., Mack, D. and Pritchard, D. I. 2013. *Lucilia sericata* chymotrypsin disrupts protein adhesin-mediated staphylococcal biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(4): 1393-1395.
- Hendaus, M. A., Jomha, F. A. and Alhammadi, A. H. 2015. Virus-induced secondary bacterial infection: a concise review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 11(5): 1265.
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E. and Stanley-Wall, N. R. 2015. Giving structure to the biofilm matrix: an overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(5): 649-669.
- Hoffmann, M., Kleine-Weber, H. and Pöhlmann, S. 2020. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Molecular Cell*, 78(4): 779-784.
- Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H. K., Song, Z. J., Moser, C., Jensen, P. Ø. and Bjarnsholt, T. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *International Journal of Oral Science*, 3(2): 55-65.
- Hou, H., Zhang, B., Huang, H., Luo, Y., Wu, S., Tang, G. and Sun, Z. 2020. Using IL-2R/lymphocytes for predicting the clinical progression of patients with COVID-19. *Clinical and Experimental Immunology*, 201(1): 76-84.
- Hsieh, M. J., Tsai, P. H., Chiang, P. H., Kao, Z. K., Zhuang, Z. Q., Hsieh, A. R. and Chen, Y. C. 2024. Genomic insights into mRNA COVID-19 vaccines efficacy: Linking genetic polymorphisms to waning immunity. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 20(1): 2399382.

- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y. and Cao, B. 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, 395(10223): 497-506.
- Huang, N., Pérez, P., Kato, T., Mikami, Y., Okuda, K., Gilmore, R. C. and Byrd, K. M. 2021. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nature Medicine*, 27(5): 892-903.
- Huttner, B. D., Catho, G., Pano-Pardo, J. R., Pulcini, C. and Schouten, J. 2020. COVID-19: don't neglect antimicrobial stewardship principles!. *Clinical Microbiology and Infection*, 26(7): 808-810.
- Ilonzo, N., Rao, A., Safir, S., Vouyouka, A., Phair, J., Baldwin, M. and Faries, P. 2021. Acute thrombotic manifestations of coronavirus disease 2019 infection: Experience at a large New York City health care system. *Journal of Vascular Surgery*, 73(3): 789-796.
- Jain, A. and Agarwal, A. 2009. Biofilm production, a marker of pathogenic potential of colonizing and commensal staphylococci. *Journal of Microbiological Methods*, 76(1): 88-92.
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A. and Kamil, M. A. 2018. Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1): 7-11.
- Jamil, B., Abbasi, R., Abbasi, S., Imran, M., Khan, S. U., Ihsan, A. and Imran, M. 2016. Encapsulation of cardamom essential oil in chitosan nano-composites: In-vitro efficacy on antibiotic-resistant bacterial pathogens and cytotoxicity studies. *Frontiers in Microbiology*, 7(2): 1580.
- Ji, H. L., Zhao, R., Matalon, S. and Matthay, M. A. 2020. Elevated plasmin (ogen) as a common risk factor for COVID-19 susceptibility. *Physiological Reviews*. 100(7): 1065 1075.
- Jin, J. M., Bai, P., He, W., Wu, F., Liu, X. F., Han, D. M. and Yang, J. K. 2020. Gender differences in patients with COVID-19: focus on severity and mortality. *Frontiers in Public Health*, 8(7): 545030.
- Johansen, B. and Brandtzaeg, B. 2000. Role of J chain in secretory immunoglobulin formation. *Scandinavian Journal of Immunology*, 52(3): 240-248.

- Jones, V. G., Mills, M., Suarez, D., Hogan, C. A., Yeh, D., Segal, J. B. and Mathew, R. 2020. COVID-19 and Kawasaki disease: novel virus and novel case. *Hospital Pediatrics*, 10(6): 537-540.
- Jorgensen, J. H. and Pfaller, M. A. 2015. Introduction to the 11th Edition of the Manual of Clinical Microbiology. *Manual of Clinical Microbiology*, 3(4): 1-4.
- Jubeh, B., Breijyeh, Z. and Karaman, R. 2020. Resistance of gram-positive bacteria to current antibacterial agents and overcoming approaches. *Molecules*, 25(12): 2888.
- Kang, Y. J. 2020. Mortality rate of infection with COVID-19 in Korea from the perspective of underlying disease. *Disaster Medicine and Public Health Preparedness*, 14(3): 384-386.
- Kawai, T. and Akira, S. 2009. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *International Immunology*, 21(4): 317-337.
- Kaye, K. S. and Pogue, J. M. 2015. Infections caused by resistant gram-negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(10): 949-962.
- Kearns, D. B., Chu, F., Branda, S. S., Kolter, R. and Losick, R. 2005. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 55(3): 739-749.
- Keyt, B. A., Baliga, R., Sinclair, A. M., Carroll, S. F. and Peterson, M. S. 2020. Structure, function, and therapeutic use of IgM antibodies. *Antibodies*, 9(4): 53.
- Kim, D., Lee, J. Y., Yang, J. S., Kim, J. W., Kim, V. N. and Chang, H. 2020. The architecture of SARS-CoV-2 transcriptome. *Cell*, 181(4): 914-921.
- Kim, Y. G., Park, J. H., Reimer, T., Baker, D. P., Kawai, T., Kumar, H. and Núñez, G. 2011. Viral infection augments Nod1/2 signaling to potentiate lethality associated with secondary bacterial infections. *Cell Host and Microbe*, 9(6): 496-507.
- Kirchdoerfer, R. N., Cottrell, C. A., Wang, N., Pallesen, J., Yassine, H. M., Turner, H. L. and Ward, A. B. 2016. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature*, 531(7592): 118-121.
- Knobloch, J. K. M., Horstkotte, M. A., Rohde, H. and Mack, D. 2002. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Medical Microbiology and Immunology*, 191(4): 101-106.

- Koneman, E. W., Allen, S. D., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C. and Winn, W. C. 2006. Guidelines for the collection, transport, processing, analysis, and reporting of cultures from specific specimen sources. *Microbiology*, 6(77): 121-162.
- Krupovic, M., Dolja, V. V. and Koonin, E. V. 2019. Origin of viruses: primordial replicators recruiting capsids from hosts. *Nature Reviews Microbiology*, 17(7): 449-458.
- Kumar, S. and Rizvi, M. 2010. Serum tumor necrosis factor α and C-reactive protein in pediatric patients with sepsis and its correlation with microbiologic findings. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 53(3): 494-497.
- Kurt-Jones, E. A., Popova, L., Kwinn, L., Haynes, L. M., Jones, L. P., Tripp, R. A. and Finberg, R. W. 2000. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nature Immunology*, 1(5): 398-401.
- Laird, K., Armitage, D. and Phillips, C. 2012. Reduction of surface contamination and biofilms of *Enterococcus* sp. and *Staphylococcus aureus* using a citrus-based vapour. *Journal of Hospital Infection*, 80(1): 61-66.
- Lamas, A., Regal, P., Vázquez, B., Miranda, J. M., Cepeda, A. and Franco, C. M. 2018. Influence of milk, chicken residues and oxygen levels on biofilm formation on stainless steel, gene expression and small RNAs in *Salmonella enterica*. *Food Control*, 90(7): 1-9.
- Leber, A. L. 2016. *Clinical microbiology procedures handbook*. John Wiley & Sons, 3782 page, New York.
- Letko, M., Marzi, A. and Munster, V. 2020. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nature Microbiology*, 5(4): 562-569.
- Levinson, W. E. 2018. *Review of medical microbiology and immunology*. McGraw-Hill Education, 18(98): 120-128.
- Li, B., Zhao, Y., Liu, C., Chen, Z. and Zhou, D. 2014. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiology*, 9(9): 1071-1081.
- Li, X., Xu, S., Yu, M., Wang, K., Tao, Y., Zhou, Y. and Zhao, J. 2020. Risk factors for severity and mortality in adult COVID-19 inpatients in Wuhan. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 146(1): 110-118.

- Li, Y., Reeves, R. M., Wang, X., Bassat, Q., Brooks, W. A., Cohen, C. and Zar, H. J. 2019. Global patterns in monthly activity of influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, and metapneumovirus: a systematic analysis. *The Lancet Global Health*, 7(8): 1031-1045.
- Lin, J., Chen, X., Chen, C., Hu, J., Zhou, C., Cai, X. and Liu, H. 2018. Durably antibacterial and bacterially antiadhesive cotton fabrics coated by cationic fluorinated polymers. *ACS Applied Materials and Interfaces*, 10(7): 6124-6136.
- Lipsky, B. A., Kollef, M. H., Miller, L. G., Sun, X., Johannes, R. S. and Tabak, Y. P. 2010. Predicting bacteremia among patients hospitalized for skin and skin-structure infections: derivation and validation of a risk score. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 31(8): 828-837.
- Liu, H. H., Zhang, M. W., Guo, J. B., Li, J. and Su, L. 2017. Procalcitonin and C reactive protein in early diagnosis of sepsis caused by either Gram-negative or Gram positive bacteria. *Irish Journal of Medical Science*, 186(1): 207-212.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4): 402-408.
- Long, Q. X., Liu, B. Z., Deng, H. J., Wu, G. C., Deng, K., Chen, Y. K. and Huang, A. L. 2020. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients with COVID-19. *Nature Medicine*, 26(6): 845-848.
- Mahmoudi, H. 2020. Bacterial co-infections and antibiotic resistance in patients with COVID-19. *GMS Hygiene and Infection Control*, 15(2): 89-90.
- Mahon, C. R. and Lehman, D. C. 2022. Textbook of diagnostic microbiology-e-book. Elsevier Health Sciences, 1088 page, Amsterdam.
- Maine, G. N., Lao, K. M., Krishnan, S. M., Afolayan-Oloye, O., Fatemi, S., Kumar, S. and Sun, Q. 2020. Longitudinal characterization of the IgM and IgG humoral response in symptomatic COVID-19 patients using the Abbott Architect. *Journal of Clinical Virology*, 133(7): 104663.
- Mallia, P., Footitt, J., Sotero, R., Jepson, A., Contoli, M., Trujillo-Torralbo, M. B. and Johnston, S. L. 2012. Rhinovirus infection induces degradation of antimicrobial peptides and secondary bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 186(11): 1117-1124.

- Manohar, P., Loh, B., Nachimuthu, R., Hua, X., Welburn, S. C. and Leptihn, S. 2020. Secondary bacterial infections in patients with viral pneumonia. *Frontiers in Medicine*, 7(2): 420.
- Marcelino, J., Farinha, S., Silva, R., Didenko, I., Proença, M. and Tomáz, E. 2021. Nonirritant concentrations for skin testing with SARS-CoV-2 mRNA vaccine. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 9(6): 2476-2477.
- Marques, S. C., Rezende, J. D. G. O. S., Alves, L. A. D. F., Silva, B. C., Alves, E., Abreu, L. R. D. and Piccoli, R. H. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38;(7): 538-543.
- Martines, R. B., Ritter, J. M., Matkovic, E., Gary, J., Bollweg, B. C., Bullock, H. and COVID-19 Pathology Working Group. 2020. Pathology and pathogenesis of SARS-CoV-2 associated with fatal coronavirus disease, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 26(9): 2005.
- Mason, C., Dooley, N. and Griffiths, M. 2016. Acute respiratory distress syndrome. *Clinical Medicine*, 16(31): 66-70.
- McCullers, J. A. 2011. Preventing and treating secondary bacterial infections with antiviral agents. *Antiviral Therapy*, 16(2): 123-135.
- McIntosh, K., Hirsch, M. S. and Bloom, A. J. L. I. D. 2020. Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, virology, and prevention. *Lancet*, 11(98): 2019-2020.
- McMurray, J. J., Wheeler, D. C., Stefánsson, B. V., Jongs, N., Postmus, D., Correa-Rotter, R. and DAPA-CKD Trial Committees and Investigators. 2021. Effect of dapagliflozin on clinical outcomes in patients with chronic kidney disease, with and without cardiovascular disease. *Circulation*, 143(5): 438-448.
- McPherson, R. A. 2017. *Henry's clinical diagnosis and management by laboratory*. Elsevier Health Sciences, 1618 page, Amsterdam.
- Melenotte, C., Silvin, A., Goubet, A. G., Lahmar, I., Dubuisson, A., Zumla, A. and Zitvogel, L. 2020. Immune responses during COVID-19 infection. *Oncoimmunology*, 9(1): 1807836.
- Mellet, J. and Pepper, M. S. 2021. A COVID-19 vaccine: Big strides come with big challenges. *Vaccines*, 9(1): 39.

- Merad, M. and Martin, J. C. 2020. Pathological inflammation in patients with COVID-19: a key role for monocytes and macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 20(6): 355-362.
- Meunier, M., Schwarzenberger, F. and Mulot, B. 2022. Use of a simplified non-invasive technic to monitor fecal progesterone metabolites and reproduction function in several zoo species: Efficacy of mini VIDAS® automate (bioMérieux). *Theriogenology*, 179(5): 69-77.
- Millet, J. K. and Whittaker, G. R. 2014. Host cell entry of Middle East respiratory syndrome coronavirus after two-step, furin-mediated activation of the spike protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(42): 15214-15219.
- Mirzaei, R., Mohammadzadeh, R., Alikhani, M. Y., Shokri Moghadam, M., Karampoor, S., Kazemi, S. and Yousefimashouf, R. 2020. The biofilm-associated bacterial infections unrelated to indwelling devices. *IUBMB Life*, 72(7): 1271-1285.
- Mobarak-Qamsari, M., Jenaghi, B., Sahebi, L., Norouzi-Shadehi, M., Salehi, M. R., Shakoori-Farahani, A. and Feizabadi, M. M. 2023. Evaluation of *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus* respiratory tract superinfections among patients with COVID-19 at a tertiary-care hospital in Tehran, Iran. *European Journal of Medical Research*, 28(1): 314.
- Moreno-Torres, V., de Mendoza, C., de la Fuente, S., Sánchez, E., Martínez-Urbistondo, M., Herráiz, J. and Cuervas-Mons, V. 2022. Bacterial infections in patients hospitalized with COVID-19. *Internal and Emergency Medicine*, 17(2): 431-438.
- Morens, D. M., Taubenberger, J. K. and Fauci, A. S. 2008. Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *The Journal of Infectious Diseases*, 198(7): 962-970.
- Morris, D. E., Cleary, D. W. and Clarke, S. C. 2017. Secondary bacterial infections associated with influenza pandemics. *Frontiers in Microbiology*, 8(1): 1041.
- Murray, P. R, Rosenthal, K. S. and Pfaller, M. A. 2020. Medical microbiology e-book. Elsevier Health Sciences, 1903 page, Amsterdam.
- Nag, V. L. and Kaur, N. 2021. Superinfections in COVID-19 patients: role of antimicrobials. *Dubai Medical Journal*, 4(2): 117-126.

- Nahavandinejad, M. and Asadpour, L. 2017. Mucoviscosity determination and detection of magA and rmpA genes in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Northern Iran. *Crescent Journal of Medical and Biological Sciences*, 4(3): 104-107.
- Namvar, A. E., Asghari, B., Ezzatifar, F., Azizi, G. and Lari, A. R. 2013. Detection of the intercellular adhesion gene cluster (ica) in clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *GMS Hygiene and Infection Control*, 8(1): 1903.
- Nasir, N., Rehman, F. and Omair, S. F. 2021. Risk factors for bacterial infections in patients with moderate to severe COVID-19: A case-control study. *Journal of Medical Virology*, 93(7): 4564-4569.
- Neog, N., Phukan, U., Puzari, M., Sharma, M. and Chetia, P. 2021. *Klebsiella oxytoca* and emerging nosocomial infections. *Current Microbiology*, 78(4): 1115-1123.
- Oliveira, A. and Cunha, M. D. L. R. 2010. Comparison of methods for the detection of biofilm production in coagulase-negative staphylococci. *BMC Research Notes*, 3(260): 1-8.
- O'Toole, G. A. and Kolter, R. 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2): 295-304.
- Pachetti, M., Marini, B., Benedetti, F., Giudici, F., Mauro, E., Storici, P. and Ippodrino, R. 2020. Emerging SARS-CoV-2 mutation hot spots include a novel RNA-dependent-RNA polymerase variant. *Journal of Translational Medicine*, 18(1): 1-9.
- Palmer, J., Flint, S. and Brooks, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9): 577-588.
- Patel, M. K., Bergeri, I., Bresee, J. S., Cowling, B. J., Crowcroft, N. S., Fahmy, K. and Feikin, D. R. 2021. Evaluation of post-introduction COVID-19 vaccine effectiveness: Summary of interim guidance of the World Health Organization. *Vaccine*, 39(30): 4013-4024.
- Peleg, A. Y., Seifert, H. and Paterson, D. L. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(3): 538-582.
- Perchetti, G. A., Huang, M. L., Mills, M. G., Jerome, K. R. and Greninger, A. L. 2021. Analytical sensitivity of the Abbott BinaxNOW COVID-19 Ag card. *Journal of Clinical Microbiology*, 59(3): 10-1128.

- Pérez-Rodríguez, S., García-Aznar, J. M. and Gonzalo-Asensio, J. 2022. Microfluidic devices for studying bacterial taxis, drug testing and biofilm formation. *Microbial Biotechnology*, 15(2): 395-414.
- Peters, J. M., Koo, B. M., Patino, R., Heussler, G. E., Hearne, C. C., Qu, J. and Rosenberg, O. S. 2019. Enabling genetic analysis of diverse bacteria with Mobile-CRISPRi. *Nature Microbiology*, 4(2): 244-250.
- Petrova, O. E. and Sauer, K. 2012. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of Bacteriology*, 194(10): 2413-2425.
- Phan, T. T., Nguyen, T. B., Phung, Q. G. T., Tran, V. T., Ho, T. T., Pho, S. P. and Nguyen, S. T. 2022. Incidence of SARS-CoV-2 infection during the Omicron variant emergence in Southern Vietnam: prior infection versus third-dose vaccination. *Microbiology Spectrum*, 10(5): 01175-22.
- Pillaiyar, T., Meenakshisundaram, S. and Manickam, M. 2020. Recent discovery and development of inhibitors targeting coronaviruses. *Drug Discovery Today*, 25(4): 668-688.
- Pinti, M., Troiano, L., Nasi, M., Bellodi, C., Ferraresi, R., Mussi, C. and Cossarizza, A. 2004. Balanced regulation of mRNA production for Fas and Fas ligand in lymphocytes from centenarians: how the immune system starts its second century. *Circulation*, 110(19): 3108-3114.
- Pourajam, S., Kalantari, E., Talebzadeh, H., Mellali, H., Sami, R., Soltaninejad, F. and Solgi, H. 2022. Secondary Bacterial Infection and Clinical Characteristics in Patients With COVID-19 Admitted to Two Intensive Care Units of an Academic Hospital in Iran during the First Wave of the Pandemic. *Frontiers in cellular and Infection Microbiology*, 141(32): 13-27.
- Prabhakara, C., Godbole, R., Sil, P., Jahnavi, S., Gulzar, S. E. J., van Zanten, T. S. and Mayor, S. 2021. Strategies to target SARS-CoV-2 entry and infection using dual mechanisms of inhibition by acidification inhibitors. *PLoS Pathogens*, 17(7): 1009706.
- Promptchara, E., Ketloy, C. and Palaga, T. 2020. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, 38(1): 1-9.

- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E. and Sintim, H. O. 2015. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4): 493-512.
- Rai, P., Kumar, B. K., Deekshit, V. K., Karunasagar, I. and Karunasagar, I. 2021. Detection technologies and recent developments in the diagnosis of COVID-19 infection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(3): 441-455.
- Rashedi, J., Mahdavi Poor, B., Asgharzadeh, V., Pourostadi, M., Samadi Kafil, H., Vegari, A. and Asgharzadeh, M. 2020. Risk factors for COVID-19. *Infez Med*, 28(4): 469-474.
- Rawson, T. M., Moore, L. S., Zhu, N., Ranganathan, N., Skolimowska, K., Gilchrist, M. and Holmes, A. 2020. Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. *Clinical Infectious Diseases*, 71(9): 2459-2468.
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J. H. and Ferraro, M. J. 2009. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49(11): 1749-1755.
- Richards, R. L.; Haigh, R. D.; Pascoe, B.; Sheppard, S. K.; Price, F.; Jenkins, D. and Morrissey, J. A. 2015. Persistent *Staphylococcus aureus* isolates from two independent cases of bacteremia display increased bacterial fitness and novel immune evasion phenotypes. *Infection and Immunity*, 83(8): 3311-3324.
- Riddell, S. W. and Sanyal, S. 2019. Essentials of diagnostic microbiology. An Introduction to Clinical Infectious Diseases. Springer, 19(8): 439-460.
- Rothe, C., Schunk, M., Sothmann, P., Bretzel, G., Froeschl, G., Wallrauch, C. and Hoelscher, M. 2020. Transmission of 2019-nCoV infection from an asymptomatic contact in Germany. *New England Journal of Medicine*, 382(10): 970-971.
- Sarmast, E., Fallah, A. A., Jafari, T. and Khaneghah, A. M. 2021. Occurrence and fate of mycotoxins in cereals and cereal-based products: a narrative review of systematic reviews and meta-analyses studies. *Current Opinion in Food Science*, 39(8): 68-75.
- Schmidt, M. E. and Varga, S. M. 2018. The CD8 T cell response to respiratory virus infections. *Frontiers in Immunology*, 9(21): 678.
- Schoeman, D. and Fielding, B. C. 2019. Coronavirus envelope protein: Current knowledge. *Virology Journal*, 16(1): 1-22.

- Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J. P. and Schild, S. 2021. Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance-development, composition and regulation-therapeutical strategies. *Microbial Cell*, 8(2): 28.
- Sharifipour, E., Shams, S., Esmkhani, M., Khodadadi, J., Fotouhi-Ardakani, R., Koohpaei, A. and Golzari, S. 2020. Evaluation of bacterial co-infections of the respiratory tract in COVID-19 patients admitted to ICU. *BMC Infectious Diseases*, 20(7): 1-7.
- Sharma, M., Singh, T. U., Lingaraju, M. C. and Parida, S. 2021. Different Therapeutic Strategies to Tackle the Infection Associated with COVID-19. In *Biotechnology to Combat COVID-19*. IntechOpen, 21(7): 453-458.
- Shereen, M. A., Khan, S., Kazmi, A., Bashir, N. and Siddique, R. 2020. COVID-19 infection: Emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. *Journal of Advanced Research*, 24(2): 91-98.
- Shi, Y., Wang, Y., Shao, C., Huang, J., Gan, J., Huang, X. and Melino, G. 2020. COVID-19 infection: the perspectives on immune responses. *Cell Death and Differentiation*, 27(5): 1451-1454.
- Singanayagam, A., Patel, M., Charlett, A., Bernal, J. L., Saliba, V., Ellis, J. and Gopal, R. 2020. Duration of infectiousness and correlation with RT-PCR cycle threshold values in cases of COVID-19, England, January to May 2020. *Eurosurveillance*, 25(32): 2001483.
- South, A. M., Tomlinson, L., Edmonston, D., Hiremath, S. and Sparks, M. A. 2020. Controversies of renin–angiotensin system inhibition during the COVID-19 pandemic. *Nature Reviews Nephrology*, 16(6): 305-307.
- Stasi, C., Fallani, S., Voller, F. and Silvestri, C. 2020. Treatment for COVID-19: An overview. *European Journal of Pharmacology*, 889(65): 173644.
- Sughayer, M. A., Souan, L., Alhowr, M. A., Al Rimawi, D., Siag, M., Albadr, S. and Al Atrash, T. 2022. Comparison of the effectiveness and duration of anti-RBD SARS-CoV-2 IgG antibody response between different types of vaccines: Implications for vaccine strategies. *Vaccine*, 40(20): 2841-2847.
- Takeuchi, O. 2016. Posttranscriptional regulation of cytokine mRNA controls the initiation and resolution of inflammation. *Chronic Inflammation: Mechanisms and Regulation*, 28(1): 319-332.

- Tamang, M. D., Dey, S., Makaju, R. K., Jha, B. K., Shivananda, P. G. and Bhramadatan, K. N. 2005. Prevalence of *Moraxella catarrhalis* infections of the lower respiratory tract in elderly patients. *Kathmandu University Medical Journal*, 3(1): 39-44.
- Tang, Y. W., Schmitz, J. E., Persing, D. H. and Stratton, C. W. 2020. Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(6): 10-1128.
- Teijaro, J. R., Walsh, K. B., Long, J. P., Tordoff, K. P., Stark, G. V., Einfeld, A. J. and Oldstone, M. B. 2014. Protection of ferrets from pulmonary injury due to H1N1 2009 influenza virus infection: immunopathology tractable by sphingosine-1-phosphate 1 receptor agonist therapy. *Virology*, 452(2): 152-157.
- Teixeira Da Silva, J. A., Tsigaris, P. and Erfanmanesh, M. 2021. Publishing volumes in major databases related to Covid-19. *Scientometrics*, 126(2): 831-842.
- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A. and Fitzgerald, K. A. 2011. Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*, 3(6): 920-940.
- Tille, P. 2015. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology e-book*. Elsevier Health Sciences, 1136 page, Amsterdam.
- Tillett, R. L., Sevinsky, J. R., Hartley, P. D., Kerwin, H., Crawford, N., Gorzalski, A. and Pandori, M. 2021. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: A case study. *The Lancet Infectious Diseases*, 21(1): 52-58.
- Ting, N. L. N., Lau, H. C. H. and Yu, J. 2022. Cancer pharmacomicrobiomics: targeting microbiota to optimise cancer therapy outcomes. *Gut*, 71(7): 1412-1425.
- Trabaud, M. A., Icard, V., Milon, M. P., Bal, A., Lina, B. and Escuret, V. 2020. Comparison of eight commercial, high-throughput, automated or ELISA assays detecting SARS-CoV-2 IgG or total antibody. *Journal of Clinical Virology*, 132(5): 104613.
- Truant, A. L. 2016. *Manual of commercial methods in clinical microbiology*. John Wiley and Sons, 616 page, New York.
- Turner, A. J. 2015. ACE2 cell biology, regulation, and physiological functions. The protective arm of the renin angiotensin system (RAS). *PubMed Central*, 15(7): 185.
- Van Wolferen, M., Orell, A. and Albers, S. V. 2018. Archaeal biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 16(11): 699-713.

- Van Zonneveld, A. J., Kölling, M., Bijkerk, R. and Lorenzen, J. M. 2021. Circular RNAs in kidney disease and cancer. *Nature Reviews Nephrology*, 17(12): 814-826.
- Vanaparthi, R., Mohan, G., Vasireddy, D. and Atluri, P. 2021. Review of COVID-19 viral vector-based vaccines and COVID-19 variants. *Le Infezioni in Medicina*, 29(3): 328.
- Vandijck, D. M., Hoste, E. A., Blot, S. I., Depuydt, P. O., Peleman, R. A. and Decruyenaere, J. M. 2007. Dynamics of C-reactive protein and white blood cell count in critically ill patients with nosocomial Gram positive vs. Gram negative bacteremia: a historical cohort study. *BMC Infectious Diseases*, 7(8): 1-7.
- Vasudevan, R. 2014. Biofilms: Microbial cities of scientific significance. *Journal of Microbiology and Experimentation*, 1(3): 14.
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R. and Nesse, L. L. 2020. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2): 59.
- Vidarsson, G., Dekkers, G. and Rispens, T. 2014. IgG subclasses and allotypes: From structure to effector functions. *Frontiers in Immunology*, 5(6): 520.
- Vinciguerra, M. and Greco, E. 2020. Sars-CoV-2 and black population: ACE2 as shield or blade?. *Infection, Genetics and Evolution*, 84(7): 104361.
- Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G. and Varaldo, P. E. 2014. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 3(3): 743-758.
- Walls, A. C., Park, Y. J., Tortorici, M. A., Wall, A., McGuire, A. T. and Veasler, D. 2020. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, 181(2): 281-292.
- Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R. S. and Li, F. 2020. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *Journal of Virology*, 94(7): 10-1128.
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J. and Peng, Z. 2020a. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. *Jama*, 323(11): 1061-1069.
- Wang, D., Li, R., Wang, J., Jiang, Q., Gao, C., Yang, J., Ge, L. and Hu, Q. 2020b. Correlation analysis between disease severity and clinical and biochemical

- characteristics of 143 cases of COVID-19 in Wuhan, China: a descriptive study. *BMC Infectious Diseases*, 20(1): 519.
- Wang, H., Anthony, D., Selemidis, S., Vlahos, R. and Bozinovski, S. 2018. Resolving viral-induced secondary bacterial infection in COPD: a concise review. *Frontiers in Immunology*, 9(4): 2345.
- Wanger, A., Chavez, V., Huang, R., Wahed, A., Dasgupta, A. and Actor, J. K. 2017. *Microbiology and molecular diagnosis in pathology: a comprehensive review for board preparation, certification and clinical practice*. Elsevier, 304 page, Amsterdam.
- WHO, World Health Organization. 2020. Report of the WHO-China joint mission on coronavirus disease 2019 (COVID-19). World Health Organization, 308 page, Geneva,
- Wilson, M. L., Weinstein, M. P. and Reller, L. B. 2015. Laboratory detection of bacteremia and fungemia. *Manual of Clinical Microbiology*, 13(98): 15-28.
- Wrapp, D., Wang, N., Corbett, K. S., Goldsmith, J. A., Hsieh, C. L., Abiona, O. and McLellan, J. S. 2020. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science*, 367(6483): 1260-1263.
- Wruck, W. and Adjaye, J. 2020. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is co-expressed with genes related to transmembrane serine proteases, viral entry, immunity and cellular stress. *Scientific Reports*, 10(1): 1-14.
- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C. and Wang, F. S. 2020. Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine*, 8(4): 420-422.
- Yamaguchi, M., Goto, K., Hirose, Y., Yamaguchi, Y., Sumitomo, T., Nakata, M. and Kawabata, S. 2019. Identification of evolutionarily conserved virulence factor by selective pressure analysis of *Streptococcus pneumoniae*. *Communications Biology*, 2(1): 96.
- Yao, X. H., Li, T. Y., He, Z. C., Ping, Y. F., Liu, H. W., Yu, S. C. and Bian, X. W. 2020. A pathological report of three COVID-19 cases by minimal invasive autopsies. *Chinese Journal of Pathology*, 49(5): 411-417.

- Yashavantha Rao, H. C. and Jayabaskaran, C. 2020. The emergence of a novel coronavirus (SARS-CoV-2) disease and their neuroinvasive propensity may affect in COVID-19 patients. *Journal of Medical Virology*, 92(7): 786-790.
- Yayan, J., Ghebremedhin, B. and Rasche, K. 2015. No development of imipenem resistance in pneumonia caused by *Escherichia coli*. *Medicine*, 94(25): 1020.
- Yuki, K., Fujiogi, M. and Koutsogiannaki, S. 2020. COVID-19 pathophysiology: A review. *Clinical Immunology*, 215(3): 108427.
- Zhang, H., Penninger, J. M., Li, Y., Zhong, N. and Slutsky, A. S. 2020b. Angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) as a SARS-CoV-2 receptor: molecular mechanisms and potential therapeutic target. *Intensive Care Medicine*, 46(4): 586-590.
- Zhang, H., Zhang, Y., Wu, J., Li, Y., Zhou, X., Li, X. and Zhang, W. 2020. Risks and features of secondary infections in severe and critical ill COVID-19 patients. *Emerging Microbes and Infections*, 9(1): 1958-1964.
- Zheng, H. Y., Zhang, M., Yang, C. X., Zhang, N., Wang, X. C., Yang, X. P. and Zheng, Y. T. 2020. Elevated exhaustion levels and reduced functional diversity of T cells in peripheral blood may predict severe progression in COVID-19 patients. *Cellular and Molecular Immunology*, 17(5): 541-543.
- Zheng, M., Karki, R., Williams, E. P., Yang, D., Fitzpatrick, E., Vogel, P. and Kanneganti, T. D. 2021. TLR2 senses the SARS-CoV-2 envelope protein to produce inflammatory cytokines. *Nature Immunology*, 22(7): 829-838.
- Zheng, X., Duan, R. H., Gong, F., Wei, X., Dong, Y., Chen, R. and Lu, L. 2022. Accuracy of serological tests for COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Frontiers in Public Health*, 10(2): 923525.
- Zobell, C. E. 1943. The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1): 39-56.
- Zou, L., Ruan, F., Huang, M., Liang, L., Huang, H., Hong, Z. and Wu, J. 2020. SARS-CoV-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *New England Journal of Medicine*, 382(12): 1177-1179.

EKLER

EK 1. Reaktiflerin ve çözeltilerin hazırlanması

EK 2. Hazırlık yöntemi



EK 1. Reaktiflerin ve çözeltilerin hazırlanması

***Oksidaz reaktifi:**

10 mL D.W içinde 0,1 gm tetrametil-P-fenilen diamin dihidroklorür tozu, sıkıca kapalı koyu renkli şişede 4°C'de saklanır.

***Katalaz reaktifi:**

Hidrojen peroksit (%3) koyu renkli bir şişede stok çözeltiliden hazırlanmış ve koyu renkli şişede 4°C'de saklanmıştır.

***0,5 McFarland:**

0,5 mL %1,175 (ağırlıkça/vol) baryum klorür dihidrat ($\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi

99,5 mL %1 (vol/vol) H_2SO_4 : 625 nm dalga boyunun absorbansı 0,08 ile 0,1 olmalıdır, karanlık şişede (4°C'de) saklanmalıdır.

***Fosfat Tampon Tuzlu Su (PBS)**

Bu tampon 8 gm NaCl, 0,2 gm KCl, 0,2 gm KH_2PO_4 ve 1,15 gm K_2HPO_4 'ün 950 mL DW içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. pH 7,4'e ayarlanmış ve 15 dakika boyunca (121°C 15 lb/in²) otoklavlanmıştır.

***SB Tampon**

-0,4 NaOH

-2.25 Borik asit

-500 mL DW PH: 8.5 içinde çözündürülür; daha sonra 1000 ml'ye tamamlanır. Oda sıcaklığında saklanır.

***Lizis Tampon Çözeltisi:**

1) 0,242 g Tris Baz, 57 µL Glacial asetik asit ve 1 mL 0,5 M EDTA çözeltisi çözülür. 2) Yukarıdaki çözeltiliye 0,02 g sodyum asetat ve 0,1 g SDS ekleyin. 3) Damıtılmış su ile hacmi 8 mL'ye tamamlayın. pH değerini (7,8)'e ayarlayın, hacim damıtık su ile 10 mL'ye tamamlanır. 4) İyi karıştırın, çözünmeye yardımcı olmak için çözeltiliyi su banyosunda ısıtarak çözün.

***5 M NaCl Çözeltisi**

2,92 g Sodyum Klorürün 10 mL damıtık suda çözülmesiyle hazırlanır.

***Etanol %70:**

70 mL mutlak etanol ve 30 mL damıtık su içerir.

EK 2. Hazırlık yöntemi

Vaka sayfası

Vaka No.

Hastaneye yatış tarihi

Örnek Toplama tarihi ve yeri:

Hasta adı:

Yaş:

Cinsiyet:

Adres ve Mob. numarası:

Semptomların başlangıç tarihi:

Semptomlar:

Kronik hastalıklar:

Diğer hastalıklar:

Alınan tedavi:

İzole edilen bakteriler:

İmmünolojik parametreler:

CRP:

FASL:

RBD:

ACE-2:

TLR-2:

IgM:

IgG:

Bakteri kültürü:

Antibiyotik duyarlılığı:

Gen ifadesi:

