

**ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ENFEKSİYON HASTALARINDA BİYOFİLM OLUŞUMUNDA
BAKTERİLERİN VE TLR4 GEN POLİMORFİZMLERİNİN İLİŞKİSİ –İRAK /
THİ-QAR ŞEHİR HASTANESİ ÖRNEĞİ**

Mohammed Yousif Aziz Al-Said JALEL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**ÇANKIRI
2025**

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mohammed Yousif Aziz Al-Said JALEL tarafından hazırlanan “**Enfeksiyon Hastalarında Biyofilm Oluşumunda Bakterilerin ve TLR4 Gen Polimorfizmlerinin İlişkisi - Irak/Thi-Qar Şehir Hastanesi Örneği**” adlı tez çalışması 10/04/2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mehmet SEZGİN

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Wisam Jasim Abed ALI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Mehmet SEZGİN
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Nurhan KESKİN
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Van Yüzüncüyıl Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Atilla ÇAKIR
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Şinasi AŞKAR
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Filiz SARIKAYA PEKACAR
Biyoloji 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 **“Enfeksiyon Hastalarında Biyofilm Oluşumunda Bakterilerin ve TLR4 Gen Polimorfizmlerinin İlişkisi - Irak/Thi-Qar Şehir Hastanesi Örneği”** 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 (10/04/2025).

Mohammed Yousif Aziz Al-Said JALEL

ÖZET

Doktora Tezi

ENFEKSİYON HASTALARINDA BİYOFİLM OLUŞUMUNDA BAKTERİLERİN VE TLR4 GEN POLİMORFİZMLERİNİN İLİŞKİSİ - IRAK/THİ-QAR ŞEHİR HASTANESİ ÖRNEĞİ

Mohammed Yousif Aziz Al-Said JALEL

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Mehmet SEZGİN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Wisam Jasim Abed ALI

Çalışmada, TLR4 rs 10759932, TLR4 rs 12377632 fonksiyonel polimorfizmleri ile bakterilerin biyofilm oluşumu üzerindeki etkisinin enfeksiyon geliştirme duyarlılığı arasındaki ilişkinin araştırılması ve değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Güney Irak Thi-Qar şehri, Al-Rifai Genel Hastanesi'nde Haziran 2023 ile Aralık 2023 arasındaki dönemde bakteriyel biyofilm enfeksiyonlarından şüphelenilen yaşları 10 ila 45 arasında değişen hastalardan 250 numune içeren farklı klinik örnekler toplanmıştır. Mevcut sonuçlar 100 (%40,0) numunenin bakteriyel biyofilm oluşumu için pozitif sonuç verdiğini, 150 (%60,0) numunenin ise negatif sonuç verdiğini göstermiştir. Elde edilen verilere göre bakteriyel biyofilm prevalansının gram-negatif bakterilerde (66 (%66,0)), gram-pozitif bakterilere 34 (%34,0) kıyasla daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Biyofilm içeren bakteriyel izolatların tür dağılımı ise; 36 (%36,0) *E. coli*, 22 (%22,0) *S. epidermidis*, 12 (%12,0) *S. aureus*, 16 (%16,0) *K. pneumoniae* ve 14 (%14,0) *Proteus mirabilis* olarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca, biyofilm üreten bakterilerin çoğu (%???) idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan izole edilmiştir. Bakteriyel biyofilm pozitiflik durumu ileri yaşlardaki (30 yaş ve üstü) hastalarda daha yaygın olduğu saptanmıştır. Cinsiyete ilişkin mevcut sonuçlar, hasta grubunun 40 (%40,0) erkek ve 60 (%60,0) kadından oluştuğu belirlenmiştir. Bakteriyel biyofilmi olan hastaların 60'ının (%60,0) kentsel bölgelerden gelen hastalar olması sebebiyle bakteriyel biyofilm prevalansı, kentsel bölgelerde kırsal bölgelere kıyasla daha fazla bulunmuştur. TLR4-rs10759932 SNP ve TLR4-rs12377632 SNP ile ilgili genotip ve alel frekanslarının bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastalar ve sağlıklı kontroller arasında karşılaştırıldığında, homozigot CC ve heterozigot TC genotipinin önemli bir risk faktörü olduğunu göstermiştir. Sonuç olarak, homozigot CC ve heterozigot TC genotipine sahip hastalar, diğer genotiplere kıyasla hastalık geliştirmeye daha yatkın oldukları ortaya konulmuştur.

2025, 127 sayfa

Anahtar Kelimeler: TLR4, Tek nükleotid polimorfizmi, Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu

ABSTRACT

PhD Thesis

THE RELATION OF BACTERIA AND TLR4 GENE POLYMORPHISMS IN BIOFILM FORMATION IN INFECTED PATIENTS – THE CASE OF IRAQ / THI- QAR CITY HOSPITAL

Mohammed Yousif Aziz Al-Said JALEL

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Co-Advisor: Assist.Prof. Dr . Wisam Jasim Abed ALI

The aim of the study was to investigate and evaluate the relationship between TLR4 rs 10759932, TLR4 rs 12377632 functional polymorphisms and the effect of bacteria on biofilm formation and susceptibility to infection. A case-control study including 250 samples suspected of bacterial biofilm infections were collected from Al-Rifai General Hospital, Thi-Qar city, Southern Iraq, between June 2023 and December 2023 from patients aged between 10 and 45 years. The current results showed that 100 (40.0%) samples were positive and 150 (60.0%) samples were negative for bacterial biofilm formation. These results show that the prevalence of bacterial biofilm is higher in Gram-negative bacteria compared to Gram-positive bacteria (66 (66.0%) vs. 34 (34.0%)). The frequency distribution of biofilm-containing bacterial isolates is as follows; 36 (36.0%) *E. coli*, 22 (22.0%) *S. epidermidis*, 12 (12.0%) *S. aureus*, 16 (16.0%) *K. pneumoniae* and 14 (14.0%) *Proteus mirabilis* were detected. In addition, these results showed that most of the biofilm-producing bacteria were isolated from patients with urinary tract infections. Bacterial biofilm positivity was more common in older patients (30 years and above). The available results regarding gender determined that the patient group consisted of 40 (40.0%) males and 60 (60.0%) females. Since 60 (60.0%) of the patients with bacterial biofilm came from urban areas, the prevalence of bacterial biofilm was found to be higher in urban areas compared to rural areas. Comparison of genotype and allele frequencies of TLR4-rs10759932 SNP and TLR4-rs12377632 SNP between patients with bacterial biofilm formation infection and healthy controls showed that homozygous CC and heterozygous TC genotypes are significant risk factors. As a result, patients with homozygous CC and heterozygous TC genotypes are more prone to develop the disease compared to other genotypes.

2025, 127 pages

Keywords: TLR4, Single nucleotide polymorphism, Bacterial biofilm formation infection



ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Mehmet SEZGİN'e sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Mohammed Yousif Aziz Al-Said JALEL

Çankırı, Nisan 2025



İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER DİZİNİ	viii
KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....	5
2.1 Bakteriyel Enfeksiyonla İlişkili Biyofilmler	5
2.1.1 Cihazla ilişkili biyofilm enfeksiyonları.....	5
2.1.2 Cihazla ilişkili olmayan biyofilm enfeksiyonları	7
2.2 Biyofilmler	8
2.3 Biyofilm Oluşumu	9
2.4 Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	10
2.5 Biyofilmin Yapısal Bileşenleri.....	13
2.6 Biyofilmler ve Patojenite	14
2.6.1 İmmünoglobulinler ve inflamasyon patogenezi.....	15
2.6.2 Patogenez üzerine genetik bir algı	16
2.7 Biyofilm Enfeksiyonları.....	17
2.7.1 Biyofilmler ve nozokomiyal enfeksiyonlar	18
2.8 Biyofilme Neden Olan Gram Pozitif Bakteriler	19
2.8.1 <i>Staphylococcaceae</i> taksonomisi (Jawetz vd. 2013).....	19
2.9 Biyofilme Neden Olan Gram Negatif Bakteriler.....	21
2.9.1 <i>Enterobacteriaceae</i> taksonomi sınıflandırması (Jawetz vd. 2013).....	21
2.10 Toll Benzeri Reseptörler (TLR'ler)	25
2.10.1 TLR ailesinin keşfi	25
2.10.2 TLR ailesinin tanımlanması	27
2.10.3 Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) yapı, konum ve işlevleri	28

2.10.4 Doğuştan gelen bağışıklıkta Toll benzeri reseptörler	30
2.10.5 Fagositoz ve TLR'ler	31
2.11 Toll Benzeri Reseptör Sinyal Yolları.....	31
2.11.1 MyD88	32
2.11.2 ASH'lerin TLR aracılı düzenlenmesi	33
3. MATERYAL VE METOT	36
3.1 Çalışmanın Tasarımı	36
3.2 Malzemeler	37
3.2.1 Alet ve ekipmanlar	37
3.2.2 Kimyasallar ve biyolojik reaktifler.....	38
3.2.3 Kültür ortamı.....	38
3.2.4 Reaktifler ve çözeltiler	39
3.3 Moleküler Çalışma Kitleri	40
3.3.1 PCR bakteriyel DNA ekstraksiyonu.....	40
3.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu primerleri	41
3.3.3 Tetra-ARMS-PCR primerleri.....	42
3.4 Yöntem	43
3.4.1 Numune koleksiyonu.....	43
3.4.2 Tam Kan örneklerinin toplanması	43
3.4.3 Biyofilm oluşumunun kantitatif olarak belirlenmesi.....	43
3.5 Biyolojik Tanımlama	44
3.5.1 Bakteriyel üremenin tanımlanması için kültür ortamının hazırlanması.....	44
3.6 Bakterilerin Tanımlanması için Gram Boyama.....	45
3.7 Biyokimyasal Testler	46
3.7.1 Katalaz testi	46
3.7.2 Koagülaz Testi (Topaklanma faktörü).....	46
3.7.3 Oksidaz testi.....	47
3.7.4 İndol üretim testi	48
3.7.5 Metil kırmızısı testi.....	48
3.7.6 Voges-proskauer testi.....	49
3.8 Bakteriyel Tanımlama Testinin Doğrulanması için Vitek2 Kompakt Sistemi.....	50
3.8.1 Test kartı kurulum prosedürü (Kimlik Kartı ve ADT Kartı).....	50

3.9 Bakterilerin Bakımı ve Korunması	51
3.10 Moleküler Çalışmalar	52
3.10.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)	52
3.10.2 PCR master karışımı hazırlama	55
3.10.3 PCR thermocycler koşulları	55
3.10.5 Tetra- ARMS-PCR yöntemi	56
3.10.6 T-ARMS-PCR ana karışımının hazırlanması	58
3.10.7 PCR thermocycler koşulları	59
3.10.8 T-ARMS-PCR ürün analizi	60
3.11 İstatistiksel Analiz	60
4. BULGULAR	62
4.1 Bakteri İzolasyonu	62
4.1.1 Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların ve sağlıklı kontrol bireylerinin demografik özellikleri	62
4.2 Gram Pozitif ve Gram Negatif Biyofilm Oluşturan Enfeksiyon Bakterilerinin Gram Boyasına Göre Tür Dağılımı	64
4.3 Otomasyon Tanımlama	65
4.3.1 Klinik örnekler arasında bakteri izolatlarının dağılımı	65
4.4 Moleküler Tanı	66
4.4.1 Bakteriyel izolasyonun moleküler tanısı	66
4.5 Gen Polimorfizmlerinin Tespiti	72
4.5.1 TLR4-rs10759932 polimorfizminin tespiti	72
4.5.2 TLR4-rs12377632 polimorfizminin tespiti	76
4.6 Biyofilm Oluşum Genlerinin DNA Dizi Analizi	79
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	92
KAYNAKLAR	107
ÖZGEÇMİŞ	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat Derece
bp	Kare başına pound
CFU/ml	Koloni oluşturan birimler
g	Gram
min	Dakika
mL	Mililitre
ng	Nanogram
nm	Nanometre
rpm	Dakika başına devir
sec	Saniye
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre

KISALTMALAR DİZİNİ

ASH	Antijen sunan hücreler
ARMS-PCR	Amplifikasyon-refrakter mutasyon sistemi- polimeraz zincir reaksiyonu
ADT	Antimikrobiyal duyarlılık testi
ADT-GN	Antimikrobiyal duyarlılık testi - Gram Negatif
ADT-GP	Antimikrobiyal duyarlılık testi - Gram Pozitif
HİMK	Hasarla ilişkili moleküler kalıplar
DH	Dendritik hücreler
DNA	Deoksi ribonükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
HDPM	Hücre dışı polimerik madde
İLA	İnsan lökosit antijeni II
IFN	İnterferon
IG	İmmünoglobulinler
IL-1	İnterlökin-1
MHC	Major histokompatibilite kompleksi
PİMK	Patojenle ilişkili moleküler kalıplar
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ÖTR	Örüntü tanıma reseptörü
RNA	Ribonükleik asit
SNP	Tek nükleotid polimorfizmleri
TIR	Toll/interlökin 1 (IL-1) reseptörü
TLR	Toll benzeri reseptörler
UV	Ultra violet
VAP	Ventilatörle ilişkili pnömoni

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1 Katalaz testi.....	46
Şekil 3.2 Koagülaz testi.....	47
Şekil 3.3 Oksidaz testi.....	48
Şekil 3.4 İndol üretim testi	48
Şekil 3.5 Metil Kırmızısı Testi.....	49
Şekil 3.6 Voges-proskauer testi.....	49
Şekil 3.7 VITEK-2 sistemi ile bakteri tanımlama testi	51
Şekil 3.8 Thermo Scientific Nanodrop lite UV Görünür Spektrofotometre	54
Şekil 3.9 PCR çalışmalarından bazı görüntüler	56
Şekil 4.1 Örneklerin bakteriyel biyofilm oluşum yüzdesi	62
Şekil 4.2 Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı	64
Şekil 4.3 Hasta ve kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı	64
Şekil 4.4 Gram boyamaya göre biyofilm oluşturan enfeksiyon bakterilerinin yüzdeleri.....	65
Şekil 4.5 Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonunun PCR tanısı yüzdeleri.....	67
Şekil 4.6 <i>Escherichia coli</i> izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.	67
Şekil 4.7 <i>Escherichia coli</i> izolatlarında virülans faktörü biyofilm ile ilişkili (FimH) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.	68
Şekil 4.8 <i>Staphylococcus epidermidis</i> izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.	68
Şekil 4.9 <i>Staphylococcus epidermidis</i> izolatlarında virülans faktörü biyofilm oluşumu (icaA) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.	69
Şekil 4.10 <i>Staphylococcus aureus</i> izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	69
Şekil 4.11 <i>Staphylococcus aureus</i> izolatlarında virülans faktörü biyofilm oluşumu (ica) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.	70
Şekil 4.12 <i>Klebsiella pneumoniae</i> izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	70
Şekil 4.13 <i>Klebsiella pneumoniae</i> izolatlarında virülans faktörü biyofilm ile ilişkili (FimH) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.	71
Şekil 4.14 <i>Proteus mirabilis</i> izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	71
Şekil 4.15 <i>Proteus mirabilis</i> izolatlarında virülans faktörü biyofilm oluşumu (mrpA) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	72
Şekil 4.16 TLR4-rs10759932 gen polimorfizmi için T-ARMS-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	72

- Şekil 4.17 TLR4-rs12377632 geni polimorfizmi için T-ARMS-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.....76
- Şekil 4.18 Yerel *Staphylococcus aureus* IQ izolatlarında ve NCBI-Genbank ile ilişkili izolatlarda hücreler arası yapışma proteini (icaA) geninin çoklu dizi hizalama analizi. Çoklu hizalama analizi (ClustalW hizalama aracı. Çevrimiçi) kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama analizi, nükleotid hizalama benzerliğini (*) olarak ve izolatlar arasında hücreler arası yapışma proteini (icaA) genindeki süstitüsyon mutasyonlarını göstermiştir81
- Şekil 4.19 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Staphylococcus aureus* IQ izolatlarında hücreler arası adezyon proteini (icaA) gen kısmi dizisine dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç, (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Staphylococcus aureus* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Staphylococcus aureus* suş 32 (GU471757.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.0060-0.0010) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir.....82
- Şekil 4.20 Yerel *Klebsiella pneumoniae* IQ izolatlarında ve NCBI-Genbank ilişkili izolatlarda fimbrial adhesin (fimH) geninin çoklu dizi hizalama analizi. Çoklu hizalama analizi (ClustalW hizalama aracı. Çevrimiçi) kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama analizi, nükleotid hizalama benzerliğini (*) olarak ve izolatlar arasında fimbrial adhesin (fimH) genindeki süstitüsyon mutasyonlarını göstermiştir83
- Şekil 4.21 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Klebsiella pneumoniae* IQ izolatlarında fimbrial adezin (fimH) gen kısmi dizisine dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Klebsiella pneumoniae* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Klebsiella pneumoniae* suşu TOP52 (EU327536.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.02-0.01) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir.....83
- Şekil 4.22 Yerel *Escherichia coli* IQ izolatları ve NCBI-Genbank ilişkili izolatlarda fimbrial adhesin (fimH) geninin çoklu dizi hizalama analizi. Çoklu hizalama analizi (ClustalW hizalama aracı. Çevrimiçi) kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama analizi, izolatlar arasında fimbrial adezin (fimH) genindeki nükleotid hizalama benzerliğini (*) ve ikame mutasyonlarını göstermiştir ...85
- Şekil 4.23 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Escherichia coli* IQ izolatlarında fimbrial adhesin (fimH) gen kısmi dizisine dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Escherichia coli* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Escherichia coli* suşu ATCC (JF289169.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.01) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir85

- Şekil 4.24 Yerel *Proteus mirabilis* IQ izolatlarında ve NCBI-Genbank ile ilişkili izolatlarda fimbria major alt birim (MrpA) geninin çoklu dizi hizalama analizi. Çoklu hizalama analizi (ClustalW hizalama aracı. Çevrimiçi) kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama analizi, nükleotid hizalama benzerliğini (*) olarak ve izolatlar arasında fimbria major subunit (MrpA) genindeki substitüsyon mutasyonlarını göstermiştir87
- Şekil 4.25 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Proteus mirabilis* IQ izolatlarında fimbria major subunit (MrpA) gen kısmi sekansına dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Proteus mirabilis* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Proteus mirabilis* suşu DP7 (MT294145.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.0040-0.0010) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir.....87
- Şekil 4.26 Yerel *Staphylococcus epidermidis* IQ izolatlarında ve NCBI-Genbank ile ilişkili izolatlarda hücreler arası yapışma proteini (icaA) geninin çoklu dizi hizalama analizi. Çoklu hizalama analizi (ClustalW hizalama aracı. Çevrimiçi) kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama analizi, izolatlar arasında hücreler arası yapışma proteini (icaA) genindeki nükleotid hizalama benzerliğini (*) ve substitüsyon mutasyonlarını göstermiştir89
- Şekil 4.27 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Staphylococcus epidermidis* IQ izolatlarında hücreler arası adezyon proteini (icaA) gen kısmi dizisine dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Staphylococcus epidermidis* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Staphylococcus epidermidis* suşu YT-50 (DQ846811.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.0030-0.0010) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir.....89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Alet ve ekipmanlar ve şirketleri	37
Çizelge 3.2 Kimyasallar ve biyolojik reaktifler	38
Çizelge 3.3 Kültür ortamları ve bunların üretimi	38
Çizelge 3.4 PCR Bakteriyel DNA Ekstraksiyon kitleri	41
Çizelge 3.5 Nükleotid dizileri ve ürün boyutlarıyla birlikte PCR primerleri.....	41
Çizelge 3.6 Biyofilm ile ilgili genler PCR primerleri, nükleotid dizileri ve ürün boyutları ile ilgili	42
Çizelge 3.7 TLR4 rs10759932 gen polimorfizmi için Tetra-ARMS-PCR Primerleri, dizileri ve ampikon boyutlarıyla birlikte.....	42
Çizelge 3.8 TLR4 rs12377632 gen polimorfizmi için Tetra-ARMS-PCR Primerleri, dizileri ve ampikon boyutlarıyla birlikte.....	42
Çizelge 3.9 Standart PCR ana karışım protokolü.....	55
Çizelge 3.10 PCR thermocycler koşulları	55
Çizelge 4.1 Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların ve sağlıklı kontrol bireylerinin demografik özellikleri.....	63
Çizelge 4.2 Klinik örnekler arasında bakteri izolatlarının dağılımı	66
Çizelge 4.3 Hardy Weinberg denklemi	73
Çizelge 4.4 Hastalarda ve sağlıklı kontrolde TLR4-rs10759932 poli genotip sıklığı.....	74
Çizelge 4.5 Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların sosyo-demografik özelliklerinin frekans dağılımının ARMS-PCR sonuçlarına göre karşılaştırılması	74
Çizelge 4.6 ARMS-PCR sonuçlarına göre bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların ikamet sıklığı dağılımının karşılaştırılması.....	75
Çizelge 4.7 Genotip frekans dağılımının bakteri türlerine göre karşılaştırılması	75
Çizelge 4.8 Hardy Weinberg denklemi	77
Çizelge 4.9 Hastalarda ve sağlıklı kontrolde TLR4-rs12377632 POLY genotip sıklığı	77
Çizelge 4.10 ARMS-PCR sonuçlarına göre hastaların sosyo-demografik özelliklerinin frekans dağılımının karşılaştırılması	78
Çizelge 4.11 ARMS-PCR sonuçlarına göre bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların ikamet sıklığı dağılımının karşılaştırılması.....	79
Çizelge 4.12 Genotip frekans dağılımının bakteri türlerine göre karşılaştırılması	79
Çizelge 4.13 NCBI-BLAST Yerel <i>Staphylococcus aureus</i> IQ izolatlarındaki hücreler arası adezyon proteini (icaA) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği	89
Çizelge 4.14 NCBI-BLAST Yerel <i>Klebsiella pneumoniae</i> IQ izolatlarındaki fimbrial adezyon (fimH) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği	90

Çizelge 4.15 NCBI-BLAST Yerel <i>Escherichia coli</i> IQ izolatlarındaki fimbrial adhesin (fimH) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği.....	90
Çizelge 4.16 NCBI-BLAST Yerel <i>Proteus mirabilis</i> IQ izolatlarındaki fimbria major alt birimi (MrpA) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği	90
Çizelge 4.17 NCBI-BLAST Yerel <i>Staphylococcus epidermidis</i> IQ izolatlarındaki hücreler arası adezyon proteini (icaA) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği	90



1. GİRİŞ

Bakteriler tarihsel olarak tek hücreli planktonik organizmalar olarak incelenmiştir, ancak laboratuvar dışında çoğu bakteri, biyofilm adı verilen hücre dışı polimerlerin bir matrisine gömülü organize çok hücreli topluluklarda yaşamıştır (Flemming and Wuertz 2019). Biyofilm, doğada bakteriyel büyümenin doğal bir modudur (Hernández-Jiménez vd. 2013). Bakterilerin hayatta kalma stratejisi olan biyofilmler, enfeksiyonun birincil odağında büyüebilir ve bakterilerin kan dolaşımı yoluyla yayılmasına izin verebilir. Biyofilm hem planktonik bakterileri hem de biyofilm parçalarını hematogen olarak yayabilmektedir (Stoodley vd. 2001).

Biyofilm oluşumu bakterilerin patojenitesinde en etkili faktörlerden biridir. Biyofilm, bakterilerin antimikrobiyal direnç geliştirmesine ve konak savunma mekanizmalarına müdahale etmesine neden olabilmektedir. Ayrıca bu patojenlerin tekrarlanması için bir rezervuar da olabilmektedir. Mikroorganizmalar yüzeye yapışabildiğinden ve bazı türler burada bir biyofilm oluşturduğundan, ventilatör ilişkili pnömoni için bir risk faktörüdür (Mazloomirad vd. 2021). Bu mikroorganizmalar aspirasyon sırasında da akciğerlere bulaşabilir. Bu nedenle, biyofilm üreten bakteriler hastane ortamlarında uzun süre kalarak, özellikle hastane kaynaklı pnömonide hastane enfeksiyonlarına önemli ölçüde katkıda bulunur ve hastalarda tedavi başarısızlığına, tedavi maliyetlerinin artmasına ve ölümlere yol açabilmiştir (Mazloomirad vd. 2021). Bakteriyel biyofilmler, antibiyotik direnci, konağın bağışıklık savunma sistemi ve diğer dış baskılar nedeniyle küresel sağlık sorunlarına önemli bir katkıda bulunur hale gelmiştir. Biyofilmler genellikle hastane aletlerinin ve vücut dokusunun yüzeyinde, endüstride, gıda işleme ünitelerinde ve doğal ortamlarda bulunmuştur (Schulze vd. 2021). Ulusal Sağlık Enstitüleri, bilinen tüm insan enfeksiyonlarının %80'inin biyofilmlerle ilişkili olduğunu öne sürmüş ve Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri, tüm hastane kaynaklı enfeksiyonların %65'inden fazlasının biyofilmlere atfedilebilir olduğunu bildirmiştir. 2004 yılında, biyofilmlerin kavramsal olarak kronik yaraların hepsinde olmasa da çoğunda gözlenen iyileşmeme ve uzamış enfeksiyonların altında yatan bir neden olduğu bildirilmiştir (Percival and Bowler 2004). 2008 yılına kadar James ve arkadaşları bu hipotezi doğrulamış ve örnekledikleri kronik yaraların %60'ının biyofilm içerdiğini

bildirmişlerdir. Daha yakın zamanlarda, biyofilmlerin kronik yaralarda iyileşmenin gecikmesi ve enfeksiyon riskinin artmasındaki rolü hem in vitro hem de in vivo çalışmalarla daha da desteklenmiştir (Fazli vd. 2011). Kalıcı enfeksiyonlarda biyofilmler, konağın bağışıklık tepkisi tarafından nadiren aşılır ve polimorfonükleositlerin ve beyaz kan hücrelerinin aşırı üretimine neden olarak kronik enflamasyona ve dolayısıyla yara iyileşmesinin gecikmesine yol açmaktadır. Bu da doku ortamında daha fazla komplikasyona yol açmaktadır. Akers ve arkadaşları tarafından yakın zamanda yapılan bir çalışma, biyofilmlerin deri ve yara enfeksiyonlarında önemli bir rol oynadığına dair kanıtlar sunmuş ve biyofilmin polimikrobiyal doğasının nükseden deri ve yara enfeksiyonları için bir risk faktörü olduğu vurgulanmıştır (Akers vd. 2014).

Bakteriyel biyofilmin araştırılması çeşitli fenotipik yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Freeman vd. (1989) tarafından geliştirilen Kongo kırmızısı agar testi, bakteri suşlarının süktroz ve Kongo kırmızısı boyası ile desteklenmiş beyin kalp infüzyon agarı üzerinde alt kültürüne dayandırılmıştır. Çalışmalar bu yöntemin doğruluğunun düşük olduğunu, ancak ucuz ve kolay uygulanabilir olduğunu ve değerlendirme kriterlerinin agarda üreyen kolonilerin renginin görsel analizine dayandığını göstermiştir. Mikrotitülasyon polistiren testinde gösterildiği gibi, bazı maddelerin eklenmesi veya ikame edilmesi veya bazı parametrelerin değiştirilmesi bu yöntemin doğruluğunu artırabilmektedir (Kaiser vd. 2013).

TLR'ler, tip-1 trans-membran reseptör ailesine ait evrimsel olarak korunmuş proteinlerdir ve ilk olarak 1990'larda insanlarda keşfedilmiştir (Werling and Jungi 2003). TLR'ler, patojen tanıma ve doğuştan gelen bağışıklık ve enflamatuar yanıtta önemli roller oynayan, evrimsel olarak korunmuş bir reseptör ailesidir (Arancibia vd. 2007). TLR'ler yapılarında üç işlevsel alana sahiptir: bunlardan ilki patojenlerin tanınması ve bağlanması rol oynayan çoklu lösin bakımından zengin tekrarlar içeren bir ektodomain membranı kapsayan bir sitoplazmik alan ve bir toll/interlökin-1 reseptörüdür. TLR ailesinin bugüne kadar on üç üyesi tanımlanmıştır (Yang vd. 2013). Toll benzeri reseptörler (TLR'ler), örüntü tanıma reseptör (ÖTR) ailelerinin en çok çalışılanları arasındadır. TLR4 en çok çalışılan TLR'lerden biridir. TLR4 özellikle

bakteriyel lipopolisakkariti tanır ve aktivasyonu esas olarak proinflatuar sitokinlerin ve kemokinlerin sentezlenmesine yol açmaktadır (Janssens ve Beyaert 2003). Toll benzeri reseptör 4 (TLR4), patojenle ilişkili moleküler kalıpları (PİMK'ler) tanıyarak doğuştan gelen bağışıklık tepkisinde önemli bir rol oynamıştır. TLR4 genindeki polimorfizmler, özellikle biyofilm oluşturan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara karşı konağın duyarlılığını potansiyel olarak değiştirebilir (Allami vd. 2023). TLR4, antijen sunan hücrelerde, fibroblastlarda ve dişeti epitelinin keratinositlerinde bulunmuştur. TLR4'ün ana işlevi, aşağıdaki gibi Gram negatif bakterilerin lipopolisakkaritlerinin tanınmasıdır: *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ve *Veillonella parvula*. Bu tanıma lipopolisakkarit bağlayıcı protein ve CD14 gibi çeşitli protein bileşenlerinin devreye girmesiyle tamamlanmıştır (Yoshimura vd. 2002).

Gen polimorfizmleri gibi konağın bağışıklık ile ilgili DNA moleküllerinin genetik varyasyonları, hastalıkların oluşumunu ve modellerini etkiler (Takashiba ve Naruishi 2006). Genetik polimorfizmler ve özellikle konak savunmasını kodlayan genlerde alelik farklılıklara neden olan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) periodontal hastalığın duyarlılığını ve ilerlemesini etkileyebilir (Berdeli vd. 2007). Gen polimorfizmleri gibi konağın bağışıklık ile ilgili DNA moleküllerinin genetik varyasyonları, hastalıkların oluşumunu ve paternlerini etkilemektedir (Takashiba ve Naruishi 2006). Genetik polimorfizmler ve özellikle konak savunmasını kodlayan genlerde allelik farklılıklara neden olan tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler), hastalıkların duyarlılığını ve ilerlemesini etkileyebilir (Berdeli vd. 2007). Bu nedenle, hastalıkların önlenmesi ve tedavisi için TLR4 gibi bağışıklık ile ilgili moleküllerin farklı formlarının ve fenotiplerinin gözden geçirilmesi önemlidir (Sahingur vd. 2011). Moleküler biyoloji ve üropatojenik bakteri izolatlarının tanımlanmasında PCR, hızla en çok kullanılan yaklaşımlardan biri haline gelen güçlü bir yöntemdir (Overstreet vd. 2012). Tetra-ARMS-PCR, tek nükleotid polimorfizmlerini (SNP'ler) tespit etmek (Islam vd. 2021) ve heterozigot ve homozigot DNA mutasyonları arasında ayırım yapmak için kullanılmıştır (Xu vd. 2023).

Bu çalışma, TLR4 rs 10759932, TLR4 rs 12377632 fonksiyonel polimorfizmleri ile bakterilerin biyofilm oluşumu üzerindeki etkisiyle enfeksiyon nedenlerinin gelişmesine yatkınlık arasındaki ilişkiyi araştırmayı ve değerlendirmeyi amaçlamaktadır. Bunun için:

1. Enfeksiyöz bakteriler tarafından oluşturulan biyofilmin, tıbbi implantlarla ilişkili bir dizi kronik enfeksiyonda yer alan en önemli virülans faktörlerinden biri olarak oluşma yeteneğinin araştırılması.
2. Iraklı hasta popülasyonunda TLR4 gen polimorfizmleri ile biyofilm oluşumuna neden olan bakteriyel enfeksiyon arasındaki ilişkinin ortaya konması.
3. Snapshot SNP genotipleme deneyleri ve DNA dizileme yöntemleri ile gen polimorfizmlerinin tanımlanması ve biyofilm oluşturan bakteriler tarafından enfeksiyon nedenleri ile ilişkili olup olmadıklarının araştırılması.
4. TLR4 (rs10759932 & rs12377632) tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNPS) bakteriyel enfeksiyonla ilişkili genetik risk faktörlerinin araştırılması çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Bakteriyel Enfeksiyonla İlişkili Biyofilmler

Bakteriyel biyofilmlerin tüm bakteriyel hastalıkların yaklaşık %65'inde rol oynadığı düşünülmüştür. Bunlar hem cihazla ilişkili hem de cihazla ilişkili olmayan enfeksiyonları içermiştir. Cihazla ilişkili enfeksiyonlara ilişkin veriler, aşağıdaki gibi çeşitli cihazlar için tahmin edilmiştir: Meme implantları için %2; eklem protezleri için %2; mekanik kalp kapakçıkları için %4; ventriküler şantlar için %10; kalp pilleri ve defibrilatör için %4 ve ventriküler destekli cihazlar için yaklaşık %40 olarak bulunmuştur (Darouiche 2004). Doğal kapak endokarditi, bakterilerin vasküler endotelium ve kalbin pulmonik kapakları ile etkileşiminden kaynaklanan bir enflamasyondur. Bu genellikle Streptokoklar, Stafilokoklar, gram negatif bakteriler ve/veya mantar enfeksiyonlarının sonucudur (Kokare vd. 2009). Bu durumda mikrobiyal hücreler gastrointestinal sistem, idrar yolu ve/veya orofarenks yoluyla kalbe ve kana erişim sağlamıştır. Sağlam kapak endoteli kendisine yapışan mikroorganizmalar tarafından hasar gördüğünden, bakteriler bağışıklık sistemi tarafından temizlendikten sonra bile, yaralanma yerinde bakteriyel olmayan bir trombotik endokardit gelişir ve sonuçta trombositlerin, kırmızı kan hücrelerinin ve fibrinin toplandığı bir durum olan trombüs oluşumu meydana gelmiştir (Donlan ve Costerton 2002).

2.1.1 Cihazla ilişkili biyofilm enfeksiyonları

Biyofilmler genellikle kontakt lensler, santral venöz kateterler, mekanik kalp kapakçıkları, periton diyaliz kateterleri, protez eklemler, kalp pilleri, üriner kateterler ve ses protezleri gibi kalıcı tıbbi cihazların üzerinde veya içinde oluşmuştur. Biyofilmler yalnızca tek bir türden veya farklı türde mikrobiyal türlerden oluşabilir. Bu, cihazlara ve etki sürelerine bağlıdır (Donlan 2002).

Kontakt lensler yumuşak ve sert kontakt lensler olarak kategorize edilmiştir. Mikroorganizmalar her iki lens türüne de yapışabilir. Sınıflandırılmaları yapı

malzemelerine, atılma sıklığına, aşınma programına ve tasarıma dayanmaktadır. Kontakt lenslere yapışan mikroorganizma türleri başlıca *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida*, *Serratia* ve *Proteus* türleri vb. olmakla birlikte, en önemlisi, lenslere yapışma derecesi su içeriğine, substrat yapısına, elektrolit konsantrasyonuna, ilgili bakteri türüne ve son olarak polimerin bileşimine bağlıdır. Taramalı elektron mikroskobu altında, keratit teşhisi konan bir hastanın kontakt lenslerinde *P. aeruginosa* tarafından üretilen biyofilm gözlemlenmiştir. Biyofilmler, genellikle lens saklama kutularında tutulan kontakt lensler üzerinde de daha sık oluşabilir. Bu nedenle lens saklama kutuları lens kontaminasyonunun kaynağı olarak ilan edilmiştir (Donlan ve Costerton 2002).

Santral venöz kateterlerde biyofilm oluşumu evrenseldir, ancak biyofilm oluşumunun yeri ve kapsamı kateterizasyon süresine bağlıdır. Örneğin, kısa süreli (<10 gün) kateterlerde dış yüzeyde daha fazla biyofilm oluşumu görülürken, uzun süreli kateterlerde (30 gün) kateter lümeninde daha fazla biyofilm oluşumu görülmüştür. Mikropların üremesi, santral venöz kateterden verilen sıvının doğasından etkilenmiş olabilir. Örneğin, *S. epidermidis* ve *S. aureus* gibi gram pozitif bakteriler intravenöz sıvılarda iyi üremezken, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* türleri ve *Klebsiella* türleri gibi gram negatif su bakterileri bu tür sıvılarda üremeye devam etmiştir (Maki vd. 1998).

Mikrobiyal hücreler, protez kapak endokarditi olarak bilinen bir durum olan mekanik kalp kapaklarına ve çevre dokulara yapışır ve biyofilm üretir. Bu rahatsız edici durumdan sorumlu bakteri türleri *Streptococcus* türleri, *S. aureus*, *S. epidermidis*, gram-negatif *Bacillus*, *Enterococcus* ve *Candida* türleridir. Bu mikro-organizmaların kökeni deriden veya santral venöz kateterler veya dişçilik işleri gibi diğer kalıcı cihazlardan oluşmuş olabilir. Protez kalp kapakçıklarının cerrahi implantasyonu sırasında, dikiş yerlerinde ve cihazların üzerinde trombosit ve fibrin birikmesi sonucu doku hasarı meydana gelebilir. Mikrobiyal hücreler bu bölgelerde daha iyi kolonize olma yeteneğine sahiptir (Donlan ve Costerton 2002).

Üriner kateterler genellikle silikon veya lateksten yapılır ve normalde cerrahi operasyonlar sırasında idrar üretimini ve atılımını ölçmek için kullanılmıştır. Üriner

kateterler üretra yoluyla idrar kesesine kadar uygulanır. Kapalı sistem veya açık sistem olabilirler. Açık kateter sisteminde idrar açık bir toplama merkezine boşaltılır, ancak bu tür sistemlerde kontaminasyon olasılığı daha yüksektir ve bu da günler içinde idrar yolu enfeksiyonlarına yol açabilir. Kapalı kateter sistemlerinde idrar plastik bir torbada birikir, dolayısıyla bu tür sistemlerde idrar yolu enfeksiyonu olasılığı daha azalmıştır. Bu cihazlarda yaygın olarak kontamine olan ve biyofilm oluşturan mikrobiyal hücreler *E.coli*, *Enterococcus faecalis*, *S.epidermidis*, *P. aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae* ve diğer gram-negatif bakterilerdir (Kokare vd. 2009).

2.1.2 Cihazla ilişkili olmayan biyofilm enfeksiyonları

Periodontitis diş etlerinin bir enfeksiyonudur. Bu enfeksiyonda yumuşak dokuların yanı sıra dişleri destekleyen kemiklerde de hasar meydana gelmiştir. Normalde kötü ağız hijyeninden kaynaklanır. Diş kaybı da mümkündür. *P. aerobius* ve *Fusobacterium nucleatum periodontitis* etkenleri arasındadır. Bu mikroplar aynı zamanda ağız boşluğundaki mukozal yüzeyler de dahil olmak üzere çeşitli yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir (Kokare vd. 2007). Diş yüzeylerinin mikrobiyal kolonizasyonu, mukozal hücreleri istila etmelerine ve epitel hücrelerindeki kalsiyum akışını değiştirmelerine ve toksin salgılamalarına izin verebilir. Daha sonra 2-3 hafta içinde bir plak gelişebilir. Plak, kalsiyum ve fosfat iyonları ile mineralize olarak tartar veya diş taşı olarak adlandırılan tabakayı oluşturabilir (Overman 2000). Osteomyelit, bakteriyel hücreler veya mantarların neden olabileceği bir kemik hastalığıdır. Bakteriler kemiklere kan dolaşımı, travma veya önceki enfeksiyonlar yoluyla girmiştir (Ziran 2007).

Mikroplar kan dolaşımı yoluyla girdiğinde ve kemiğin metafizi enfekte olduğunda, bu durum bölgeye beyaz kan hücrelerinin toplanmasına yol açmaktadır. Beyaz kan hücreleri enzimler salgılayarak patojenleri fagosite etmeye veya parçalamaya çalışmıştır. Bu enzimler kemiği parçalayarak irin oluşumuna yol açabilir ve kemik kan damarları yoluyla yayılarak kanın düzgün akışını durdurarak doku hasarına ve etkilenen kemik bölgelerinin işlevinin bozulmasına neden olabilir (Kumar vd. 2007).

2.2 Biyofilmler

Biyofilmler, “diş kabuklarında” (yani diş plağında) mikroorganizmaların ve lifli yapıların varlığını tanımladığı 1680'ler kadar erken bir tarihte keşfedilmiştir. Ancak 1970'lere kadar bakteriyel biyofilmlerin varlığı, çoğunlukla konfokal lazer tarama mikroskobu ile birleştirilmiş elektron mikroskobu ve floresan in situ hibridizasyon gibi tekniklerin kullanılması yoluyla insan vücudundaki diğer bölgelerde de fark edilmeye başlanmıştır (Høiby 2017). Son birkaç on yılda, biyofilm içeren örnekler, biyofilmlerin genellikle enfeksiyonlarla ilişkilendirildiği, klasik olarak steril olduğu düşünülen çok sayıda dokudan elde edilmiştir (Alhede vd. 2011).

Biyofilmler bir yüzeye ya da birbirlerine tutunmuş ve hücre dışı polimerik madde (HDPM) matrisi içinde yer alan mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanmaktadır. Hücre dışı polimerik madde (HDPM) biyofilmin en büyük bileşenini oluşturur ve biyolojik ortamda genellikle polisakkaritler, proteinler, glikolipidler, kan ürünleri, hücre döküntüler, hücre dışı enzimler, metal iyonları ve hücre dışı DNA'dan oluşur (Branda vd. 2005). Hücre dışı polimerik madde (HDPM) biyofilm hacminin %80'inden fazlasını oluşturur ve fiziksel ve kimyasal konfigürasyonu biyofilmin doğal özelliklerini ve niteliklerini belirlemeye yardımcı olmuştur. Biyofilmler, kistik fibroz, prostatit, diş çürükleri, rinosinüzit ve orta kulak iltihabı gibi birçok hayvan ve insan kronik rahatsızlığında rutin olarak tespit edilmiştir (Cochrane vd. 2009).

Biyofilmler, uzun zamandır kommensal mikrobiyota barındırdığı bilinen dokularda da bulunmuştur; burada biyofilmler patojenik olabilir veya olmayabilir. Bazı örnek türlerinde, biyofilmler öncelikle mukus veya diğer konak salgıları içinde asılı kümeler olarak ortaya çıkmıştır. Diğerlerinde ise biyofilmler, istisnalar olmakla birlikte, tipik olarak mukozal bir arayüzde olmak üzere dokunun kendisine bağlanmıştır. Morfolojik farklılıklarına rağmen, asılı agregatlar ve yüzeye bağlı bakteri toplulukları birçok işlevsel özelliği paylaşır ve bu da her iki biyofilm türünün de temelde benzer bakteri varoluş biçimlerini temsil ettiğini düşündürür (Alhede vd. 2011).

2.3 Biyofilm Oluşumu

Biyofilmeler genellikle bir yüzeye tutunan, genellikle tıbbi cihaz enfeksiyonlarıyla ilişkili, çok türlü veya tek türlü mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanmıştır (O'Toole vd. 2000). Bakteriler, proteinleri, polisakkaritleri ifade etmek ve DNA'yı hücre dışı matrise salmak için çekirdek algılama yoluyla birbirleriyle iletişim kurarak bir biyofilm matrisi oluşturmaktadır. Bu makromoleküller bakteri topluluğunun etrafında bir bariyer oluşturarak antimikrobiyal ajanların kolay nüfuz etmesini ve bağışıklık hücrelerinin yok edilmek üzere tek tek bakteri hücrelerine ulaşmasını engellenmiştir. Ayrıca, bir biyofilm matrisi içindeki bakteriler değişen büyüme oranları sergiler; daha hareketsiz durumdaki hücreler antimikrobiyal zorluklara karşı optimum büyüme hızında büyüyen hücrelerden çok daha iyi hayatta kalır ve hareketsiz hücrelerin konakçı içinde kalmasına izin vererek kronik enfeksiyonlara katkıda bulunmuştur (Stewart 2002).

Biyofilm oluşumu da patojenlerin hayatta kalma stratejisi olarak belgelenmiştir. Biyofilmdeki bazı mikroorganizmalar, plak biyofilmlerindeki karyojenik bakterilerde görüldüğü gibi bakterilerin patojenik potansiyelini bile modüle edebilmektedir. Biyofilmlerin antimikrobiyal ajanlara karşı daha az duyarlı olduğu ve inhibitörlere karşı duyarlılığı azalttığı, böylece hayatta kalmalarına katkıda bulunduğu bildirilmiştir (Jabra-Rizk vd. 2006). Bulgular, siprofloksasinin *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerine penetrasyonunun geciktiğini göstermiştir. *E.coli* biyofilmleri setrimide karşı azalmış duyarlılık sergilemiştir. Benzer raporlar tobramisine maruz kalan *Staphylococcus aureus* için de mevcuttur. Bu biyofilmler tarafından gösterilen direnç, genel olarak, antimikrobiyallerin zayıf penetrasyonu, besin sınırlaması, toksik metabolitlerin birikimi ve oksijen geriliminin azalması gibi faktörlere bağlanmıştır (Tresse vd. 1995).

Araştırmacılar biyofilm oluşumuna bir dizi mekanik, biyokimyasal ve genetik aracın aracılık ettiği görüşündedir. Bunun yanı sıra, hücre yüzeyi hidrofobikliği (apolar veya hafif polar hücreler veya sulu bir çözeltiye daldırılmış diğer moleküller arasındaki çekim olarak tanımlanan uzun menzilli kovalent olmayan etkileşimler), yük, pürüzlülük ve malzemenin kimyasal yapısı gibi bazı fizyokimyasal etkileşimler de biyofilm

oluşumu sırasında yüzeye bakteri yapışmasına aracılık etmek için incelenmiştir (Sousa vd. 2009).

Staphylococcus epidermidis üzerinde yapılan çalışmalar, silikon alt tabakaya akrilikten daha yüksek oranda yapıştığını göstermiştir. Bu davranış, silikonun akriliğe kıyasla daha yüksek yüzey hidrofobikliğine ve pürüzlülüğüne bağlanmıştır (Sousa vd. 2009). Ayrıca, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus epidermidis* üzerinde yapılan son çalışmalar, yapışmanın pirolitik karbon yüzey serbest enerjisi ve pürüzlülüğüne bağlı olduğunu göstermiştir. Bu nedenle, pirolitik karbonun fizikokimyasal özelliklerinin iyileştirilmesi, kapak protezi enfeksiyonlarında azalmaya yol açan bir özellik olarak öne sürülmüştür. Bununla birlikte, biyofilmler tercihen kalp kapakçıkları kadar küçük olan yüksek kayma noktalarında oluşmuştur (Donlan ve Costerton 2002).

2.4 Biyofilm Oluşum Aşamaları

Genetik çalışmalar bize biyofilm oluşumunun birçok adımda gerçekleştiğini söylemektedir. Mikroorganizma hücreleri arasında quorum sensing olarak bilinen özel bir sinyalleşme türü gerektirir. Ayrıca, aynı mikrobiyal organizmaların planktonik formlarına kıyasla farklı gen setlerinin transkripsiyonunu gerektirir (Donlan 2002). Buna ek olarak, biyofilmde mikro kolonileri ayıran kanallar vardır. Bir biyofilmin mekanik stabilitesi HDPM matrisinin viskoelastik özelliklerine bağlanmaktadır. Biyofilm oluşumu karmaşıktır ancak farklı araştırmacılara göre birkaç ortak adımda gerçekleşmiştir:

Yüzeye ilk temas/bağlanma: Biyofilm oluşumunun bu aşamasında, mikrobiyal hücreler yüzeye pilli ve flagella gibi uzantıları aracılığıyla tutunur ve ayrıca van der Waal kuvvetleri, elektrostatik etkileşimler vb. gibi diğer fiziksel kuvvetler aracılığıyla da tutunabilir. Diğer faktörler de bakterilerin bir yüzeye yapışmasını büyük ölçüde etkilemektedir. Yapışma - mikrobiyal hücrelerin bir yüzeye bağlanması ve kohezyon - hücreler içindeki etkileşim / bağlanma, biyofilm oluşumunda meydana gelmiştir (Garrett vd. 2008).

Mikro koloni oluşumu: Mikroorganizmaların biyotik veya abiyotik bir yüzeye tutunması gerçekleştikten ve bu tutunma stabil hale geldikten sonra, hücre dışı polimerik maddeler içindeki belirli kimyasal sinyaller aracılığıyla başlatılan mikrobiyal hücrelerin çoğalması ve bölünmesi süreci başlamıştır. Bu süreç daha sonra mikro kolonilerin oluşmasına yol açmıştır (Tribedi ve Sil 2014).

Olgunlaşma ve mimari: Biyofilm oluşumunun bu aşamasında mikrobiyal hücreler birbirleriyle oto-indükleyici sinyaller aracılığıyla iletişim kurar (Vasudevan 2014). Hücreler arası iletişim, gerekli mikrobiyal hücre yoğunluğunun elde edildiği önemli bir süreçtir. Bu, oto indükleyiciler olarak bilinen sinyal moleküllerinin salgılanmasına yol açar. Bu oto-indüktörler çekirdek algılamayı kolaylaştırır (Federle vd. 2003). Olgunlaşmanın bu aşamasında, hücre dışı polimerik madde oluşumu için önemli olduğu düşünülen bazı gen ürünleri ifade edilir. Hücre dışı polimerik madde biyofilmin üç boyutlu yapısındaki ana materyal olduğundan, matrikste interstisyel boşluklar oluşur. Bu kanallar su ile doldurulur ve biyofilmdeki mikro koloni topluluklarından önemli besin maddelerini dağıtmak ve atık ürünleri uzaklaştırmak için kullanılan bir dolaşım sistemi görevi görmüştür (Parsek ve Singh 2003).

Biyofilmin ayrılması/dağılması: Bu aşamada, biyofilm içindeki mikrobiyal hücreler, sapsız formdan hareketli forma dönüşmek için hızlı çoğalma ve dağılma gerçekleştirir. Daha sonra ayrılma doğal bir şekilde gerçekleşir. Bununla birlikte, bazı bakteri türleri hücre dışı polisakkarit üretmez ve bakteri hücreleri doğrudan çevreye dağılır, ancak bazen mekanik stres de bu sürece dahil olabilir (Baselga vd.1994).

Ayrılma süreci sırasında biyofilm içindeki mikrobiyal topluluklar, mikropların yüzeyini kolonizasyon için yeni bir alana bırakmaya yardımcı olan farklı sakkarolitik enzimler üretir. Örneğin, *Escherichia coli* N-asetil-heparosan liyaz, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Pseudomonas fluorescens* aljinat liyaz ve *Streptococcus equi* HDPM matrisinin parçalanması ve ardından ayrılması için hiyalüronidaz üretir. Bu aşamada mikrobiyal hücreler, bakterilerin yeni bir bölgeye hareket etmesini sağlamak için flagella oluşumuyla ilgili proteinlerin ekspresyonunu düzenlemiştir. Mikrobiyal hücrelerin

ayrılması ve yeni bir bölgeye aktarılması enfeksiyonların yayılmasına yardımcı olmuştur (Otto 2013).



2.5 Biyofilmin Yapısal Bileşenleri

Biyofilmlerde, tek bakteri hücreleri, biyofilm kütesinin %90'ına kadarını oluşturabilen, kendi ürettiği hücre dışı polimerik madde matrisinin içine gömülüdür. Hücre dışı polimerik maddenin yüksek oranda hidratlı doğası nedeniyle, glikokaliks veya balçık gibi takma adlar almıştır. Bununla birlikte, olgun biyofilmlerin genel yapısı oldukça farklılaşmıştır ve biyofilmler yapısal, kimyasal ve biyolojik seviyelerde heterojenlik göstermiştir.

Biyofilm matrisi su; $\beta(1,6)$ bağlantısındaki poli N-asetil-D-glukozamin kalıntılarının doğrusal zincirlerinden oluşan hekzozamin gibi karbonhidrat polimerleri; eDNA; salgılanan proteinler; emilen besinler; metabolitler ve hücre parçalanması ürünlerinden olmuştur. Hücre dışı polimerik madde, biyofilmin yüzeylere tutunmasında, tek hücrelerin toplanmasında ve topluluk yapısının stabilizasyonunda önemli bir rol oynamıştır (Branda vd. 2005). Subgingival biyofilmler gibi in vivo biyofilmler, virüs ve maya türleri içeriği dikkate alınmaksızın yüzlerce farklı bakteri türü içerebilir (Paster vd. 2006) . Bu farklı türler ve hatta farklı bakteri suşları, genel biyofilm mimarisine ve özellikle hücre dışı polimerik madde kıvamına kendi katkılarını yaparlar. Ayrıca, çevresel koşullar da biyofilm yapısını ve oluşumunu etkilemektedir (Branda vd. 2005). Sıcaklık, beslenme koşulları, oksijen mevcudiyeti, pH ve demir seviyesi gibi çeşitli çevresel faktörlerin hepsi biyofilm belirleyicilerinin ifadesi ve biyofilm oluşumu üzerinde etkili olabilir (Goller ve Romeo 2008).

Biyofilm, ürettikleri hücre dışı bir polimerik matris içinde yaşayan ve hızlı bir şekilde durulanmadıkça çıkarılmayacak olan fetiş veya canlı yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanan organize bir mikroorganizma topluluğudur (Hurlow vd. 2015). Hücre dışı polimerik maddelerin oluşumu, bir biyofilmin yüzeye bağlanma aşamasında meydana gelir. Bir mikrobiyal biyofilmin cansız veya katı bir yüzeyde oluşup oluşmayacağı, biyofilmdeki mikroorganizmaların etkileşimine güç sağlayan bir ekzopolisakkarit matrisinin oluşumunun bir sonucudur (Miron vd. 2001).

Genellikle hücre dışı polimerik madde matrisinin kalınlığı 0.2-1.0 µm'dir, ancak biyofilmin boyutu 10-30 nm'yi geçmez. Tipik olarak biyofilm hacminin% 5-35'i mikroorganizmalar tarafından oluşturulurken, kalan hacim hücre dışı matristir. Bu hücre dışı matris kısmen veya çoğunlukla proteinlerden olmuştur (Sun vd. 2005). Bazı önemli besinler ve mineraller, hücre dışı matris tarafından oluşturulan temizleme sistemi aracılığıyla çevredeki ortamdan hapsolür (Costerton vd. 1994). Hücre dışı polimerik maddelerde farklı bileşen türleri bulunur: çoğunlukta protein (>% 2); polisakkaritler (% 1-2) gibi diğer bileşenler; DNA molekülleri (<% 1), RNA (<% 1); iyonlar (bağlı ve serbest) ve son olarak% 97 su. Bir biyofilm içindeki temel besinlerin akışı, su içeriğinedir.

2.6 Biyofilmler ve Patojenite

Biyofilmlerin patojenin virölansına katkıda bulunduğı iyi bir şekilde belgelenmiştir. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri ile Ulusal Sağlık Enstitüleri'nin raporlarına göre, özellikle gelişmiş ölkelerde biyofilmlerin neden olduğı enfeksiyonların sıklığının sırasıyla %65 ile %80 arasında olduğı tahmin edilmiştir. *E. coli*, *Salmonella*, *Yersinia enterocolitica*, *Listeria*, *Campylobacter* gibi gıda kaynaklı birçok patojen, gıda veya depolama ekipmanlarının yüzeyinde biyofilmler oluşturur. Ayrıca, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* gibi potansiyel olarak patojenik bakteriler kateterler, yapay eklemler, mekanik kalp kapakçıkları vb. üzerinde üreme eğilimindedir. Dolayısıyla, bu organizmalar söz konusu odaktan periyodik olarak salınmaları sonucunda kalıcı enfeksiyonlara yol açabilmektedir (Kerksiek 2008).

Biyofilm aktivitesi, diş çürükleri, kistik fibroz, osteoradionekroz, idrar yolu enfeksiyonları, doğal kapak endokarditi, orta kulak iltihabı ve göz enfeksiyonları gibi çeşitli enfeksiyonlarda kaydedilmiştir. Çalışmalar, önemli üropatojenler olan *E. coli* ve *Proteus mirabilis*'in, komplike kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonu olan hastalarda biyofilm oluşturduğunu göstermiştir (Jacobsen vd. 2008). *Staphylococcus aureus*'un klinik izolatlarında da biyofilm oluşumu gözlenmiştir (Smith vd. 2008). Son çalışmalar biyofilmlerin göz enfeksiyonlarındaki rolüne odaklanmıştır. Bu tür vakalardaki

biyofilmler genellikle kontakt lens yoluyla kornea enfeksiyonu ile ilişkilendirilmiştir (Behlau ve Gilmore 2008).

2.6.1 İmmünoglobulinler ve inflamasyon patogenezi

Doğuştan gelen bağışıklık sistemi enfeksiyonlara karşı ilk savunma hattıdır, ancak konağı korumak için genellikle adaptif bağışıklık yanıtlarıyla işbirliği yapmaktadır. Örneğin, alternatif kompleman (C') yolu ve mannoz bağlayıcı lektin yolu, kompleman sisteminin doğuştan gelen unsurlarıdır ve çoğu bulaşıcı tehditle başa çıkmada klasik, antikora bağlı C' sistemi tarafından tamamlanmıştır. Enflamasyonun ilerlemesi sırasında konağın yeterli miktarda immünoglobülin (IG) üretmediği varsayılmaktadır. Bu durum, IG'lerin eksojen replasmanının aday bir tedavi olabileceği hipotezini doğrumuştur (Giamarellos-Bourboulis 2010).

Bununla birlikte, IG'lerin üretimi, konağın genetik yapısına göre farklılık gösterebilen T ve B lenfositlerinin koordinasyonu tarafından düzenlenmiştir. Enflamasyonun kesin patofizyolojisi büyük ölçüde bilinmemekle birlikte, çeşitli faktörler konakçının enfeksiyöz bir uyarana verdiği yanıtı modüle etmek için araya girer ve bunun hem klinik şiddet hem de sonuç üzerinde doğrudan etkileri vardır. Büyük ölçüde basit bir şema kullanılarak, enflamasyonun doğuştan gelen bağışıklık sisteminin örüntü tanıma reseptörleri (ÖTR'ler) tarafından patojenle ilişkili moleküler örüntüler (PİMK'ler) adı verilen iyi evrimsel olarak korunmuş mikrobiyal yapıların tanınmasından sonra başladığı varsayılmaktadır. PİMK'ler ve ÖTR'ler arasındaki etkileşim, konağın klinik durumunu düzenleyen pro-enflamatuar ve anti-enflamatuar araçların üretimine ve ardından salınmasına yol açmaktadır. PİMK- ÖTR etkileşimindeki kilit efektör hücreler, majör insan lökosit antijeni II (İLA) ve CD86 gibi ko-stimülatör moleküllerin aktivasyonu yoluyla naif T hücrelerini ya pro-inflamatuar özelliklere sahip T-yardımcı (Th) hücrelerine (Th1 ve Th17 hücreleri) ya da anti-inflamatuar özelliklere sahip T hücrelerine (Th2 ve T düzenleyici hücreler) aktive eden Ag-sunucu hücrelerdir (Kimura ve Kishimoto 2010). Bu Th hücreleri, başta tümör nekroz faktörü-alfa ve interlökin (IL)-6 olmak üzere sitokinlerin üretimi yoluyla B-lenfositlerin olgunlaşmasını, klonal

genişlemesini ve IG'leri salgılayan plazma hücrelerine farklılaşmasını uyarmıştır (Rauch vd. 2012).

En önemli IG'ler dimer oluşturan IgG ve on bağlanma bölgesine sahip güçlü polivalent pentamerler oluşturan IgM alt sınıflarıdır. IgM antikorları, bilinmeyen bir Ag'nin tanınması üzerine ilk üretilen antikorlardır ve bunu immün hafızanın oluşması üzerine IgG üretimi takip etmiştir. Günümüzde enflamasyonlu hastaların, yaşadıkları inflamatuvar olayların yoğunluğuna göre dört kategoride gruplandırılabilceği düşünülmektedir. Genellikle genç ve sağlıklı bir bireyde inflamasyon geliştiğinde görülen baskın pro-inflamatuvar yanıtlar, bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde gelişen baskın anti-inflamatuvar yanıtlar, enfeksiyon kaynağının yeterince kontrol edilmediği sağlıklı bireylerde gelişen dalgalı pro- ve anti-inflamatuvar yanıtlar ve hastaların çoğunda tipik olay dizisi olan pro-inflamatuvar yanıtlarla başlayıp anti-inflamatuvar bir seyir izleyenlerdir (Reinhart vd. 2012).

2.6.2 Patogenez üzerine genetik bir algı

Bununla birlikte, sepsisli tüm hastalarda aynı şiddette bir klinik durum gelişmemiştir. Bu kısmen, PİMK'ler ve ÖTR'ler etkileşiminin nicel özelliklerinin tüm hastalarda benzer olmamasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, bu etkileşimin nitel karakteristiğinin hastalar arasında büyük ölçüde farklı olması bile söz konusu olabilir. ÖTR'ler ve inflamasyon aracıları çoğunlukla genler tarafından kodlanan protein molekülleridir. Gen nükleotid dizileri konakçılar arasında farklılık gösterebilir ve bu tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) teorik olarak farklı bir konakçı-mikrop etkileşimi dizisi ortaya çıkarabilir ve klinik sonuç üzerinde etkili olabilir. Bu hipoteze göre, aşağıdaki yapıların her birinde bulunan SNP'ler sepsise yatkınlığı veya sepsis sonucunu etkileyebilir:

- I. Ag sunan hücreler üzerindeki Örüntü Tanıma Reseptörleri (ÖTR'ler): ÖTR'ler, yani Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) ve miyeloid hücrelerde ifade edilen tetikleyici reseptör, sitokinlerin üretimiyle sonuçlanan mikrobiyal PİMK'ler tarafından doğrudan uyarılmıştır. TLR4 gibi bazı TLR'ler, Gram-negatif

bakterilerin lipopolisakkaritlerinin bağlanması için CD14 ile etkileşime girmiştir. Sepsis immünosupresyon durumu sırasında, İLA ve CD86 gibi ko-stimülatör moleküllerin ekspresyonu azalmıştır (Hotchkiss vd. 2013).

II. Sitokinler: pro-enflamatuar moleküller TNF α , IL-1 beta, IL-12, tip 1 ve 2 interferonlar gibi sitokinler ve ağırlıklı olarak IL-4, IL-10 ve dönüştürücü büyüme faktörü beta gibi anti-enflamatuar sitokinler.

III. İmmünoglobulinler (IG'ler) ve IG'nin kristalize olabilen immünoglobulin parçası (Fc) üzerinde bulunan reseptör bağlanma bölgeleri, Ag sunan hücreler, fagositler ve doğal öldürücü hücreler üzerinde ifade edilen reseptörlere bağlanmaktadır. Fc gama reseptörleri, beş aktivasyon reseptöründen (Fc γ RI, Fc γ RIIa, Fc γ RIIc, Fc γ RIIIa ve Fc γ RIIIb) biri veya inhibitör Fc reseptörü Fc γ RIIb aracılığıyla aktivasyon sinyallerine aracılık edebilmektedir. Aktive edici Fc reseptörleri, hücre içi alanlarında immünoresptör tirozin bazlı bir aktivasyon motifine sahiptir (Guilliams vd. 2014).

2.7 Biyofilm Enfeksiyonları

Bakteriyel hastalıkların çoğu ilerledikçe biyofilmleri içerir, ancak biyofilm katkısının özellikle dikkate değer ve önemli olduğu biyofilmle ilişkili enfeksiyonların bazı örnekleri vardır. Bunlar arasında intravasküler kateterler, prostetik vasküler greftler, kardiyak cihazlar, prostetik eklemler ve şantlar gibi kalıcı tıbbi cihazlarda görülen enfeksiyonlar yer almaktadır. Başta *S. epidermidis* olmak üzere koagülaz-negatif stafilokoklar bu tür enfeksiyonların en sık görülen nedenleridir (Rogers vd. 2009). Birçok *S. epidermidis* suşunun güçlü biyofilm oluşturma kapasitesine ek olarak, *S. epidermidis*'in insan derisinde bol miktarda bulunması, cihazla ilişkili biyofilm enfeksiyonunda sıkça yer almasını açıklayabilir (Otto 2009).

Biyofilm enfeksiyonları, örneğin doğal kapak endokarditi, açık yaralar veya diş plağı gibi kalıcı tıbbi cihazlardan bağımsız olarak da gelişebilir. Biyofilmle ilişkili diğer

enfeksiyonlar kadar sık olmamakla birlikte, kronik kistik fibrozis hastalardaki biyofilmler, hastalıkla ilişkili yüksek morbidite nedeniyle çok dikkat çekmiştir. KF uzun bir süredir tıbbi biyofilm araştırmalarının merkezinde yer almaktadır ve bu nedenle biyofilmler hakkında bildiklerimizin çoğu ilk olarak ana kistik fibrozis patojeni olan *P. aeruginosa*'da araştırılmıştır. kistik fibrozis hastalarının akciğerleri yalnızca *P. aeruginosa* tarafından enfekte edilmez; ancak kronik kistik fibrozis enfeksiyonlarında bu bakteri, *Burkholderia cepacia* ve *S. aureus* gibi hastalığın erken evrelerinde kistik fibrozis hastalarını enfekte eden diğer bakterilere üstün gelme eğilimindedir. *P. aeruginosa* kronik yaralar gibi diğer enfeksiyonlarda diğer biyofilm bakterilerine üstünlük sağlamadığı için bu olgu kistik fibrozis enfeksiyonlarına özgü görünmektedir (Kirketerp-Møller vd. 2008).

2.7.1 Biyofilmler ve nozokomiyal enfeksiyonlar

Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) bir raporuna göre, 1995-2010 yılları arasında yüksek gelirli ülkelerde sağlık hizmetleriyle ilişkili ortamlarda bulunan hastaların %7.6'sı enfeksiyon kapmıştır. Avrupa'da bu enfeksiyonlar hastanede fazladan 16 milyon gün geçirilmesine neden olmuş, 7 milyar Avro'ya mal olmuş ve 37.000 kişinin ölümüne yol açmıştır. ABD'de 1995 - 2010 yılları arasında 1.7 milyon hasta hastanede enfeksiyon kapmış ve 99,000'i bu enfeksiyonlar sonucunda ölmüştür (WHO 2011). Hastane enfeksiyonlarına neden olan patojenlerin konakçıda başarılı bir şekilde ikamet etme kabiliyeti, kısmen bakterilerin antibiyotiklere direnmek ve konakçının bağışıklık tepkisini manipüle etmek veya modüle etmek için üstlendiği çok sayıda mekanizmaya bağlanabilir. ESKAPE patojenleri olarak adlandırılan *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* spp. küresel olarak hastane enfeksiyonlarının önde gelen nedenleridir ve antibiyotiklerle tedaviden 'kaçma' veya tedaviye direnme yetenekleriyle bilinirler.

Biyofilmler, kendilerini farklı maddelerin içine hapsederek abiyotik ve biyotik yüzeylere tutunmalarını sağlayan mikroorganizma topluluklarıdır (Percival ve Bowler 2004). Hastane kaynaklı enfeksiyonlar genellikle santral hat, kateter, cerrahi bölge veya

ventilatör gibi birden fazla kaynaktan ortaya çıkmaktadır (WHO 2011) ve biyofilmler sıklıkla enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir. İmplant cihazlar bakteriler için bir giriş yolu, biyofilm gelişimi için abiyotik bir yüzey sağlar ve hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %60-70'ine katkıda bulunmaktadır.

Bu biyofilm matriksinde kapsüllenmiş bakteriler, planktonik hücrelere kıyasla antibiyotik tedavisine ve konakçı bağışıklık sisteminin saldırısına önemli ölçüde daha az duyarlıdır (Stewart 2002), bu da tıbbi cihazla ilişkili enfeksiyonların tedavisini inanılmaz derecede zorlaştırmaktadır. Bunun başlıca nedeni, biyofilm matrisi içindeki bakterilerin daha yavaş bir büyüme hızına sahip olması ve 3 planktonik bakteriye kıyasla daha hareketsiz bir yaşam tarzını benimsemesidir. Bu bakteriler çoğalmadıkları için genellikle persister hücreler olarak tanımlanırlar, bu da hücre çoğalmasını hedef alan antibiyotiklerin bu hücreleri öldürmede işe yaramamasına neden olur ve böylece biyofilm içinde ve konakta kalmaya devam etmişler. Dahası, biyofilmin karmaşık matrisi antibiyotiklerin ve bağışıklık hücrelerinin nüfuz etme kabiliyetini azaltarak bakterilerin hayatta kalmasını sağlamıştır. Antibiyotikler biyofilmle ilişkili enfeksiyonların tedavisinde yetersiz kaldığından, bu durum kronik enfeksiyonlarla sonuçlanır ve tıbbi bir cihaz söz konusuysa, genellikle cihazın çıkarılması ve başka bir cihazın takılması gerekmiştir (Lebeaux vd. 2014).

2.8 Biyofilme Neden Olan Gram Pozitif Bakteriler

2.8.1 *Staphylococcaceae* taksonomisi (Jawetz vd. 2013)

Etki alanı: Bakteriler

Filum: Bacillota

Sınıf: Basiller

Aile: *Staphylococcaceae*

Cins: *Staphylococcus*

Türler: *Staphylococcus epidermidis*

Türler: *Staphylococcus aureus*

1. *Staphylococcus epidermidis*

Yabancı cisim yerleştirilmiş veya enfeksiyonlarla ilişkili bağışıklık sistemi bozulmuş hastalarda fırsatçı bir patojendir. Ayrıca insan derisinin normal mikro florasının bir parçasını oluşturmuştur. *Staphylococcus epidermidis* tarihsel olarak hala güçlü bir patojen olarak bilinmemektedir. Ancak tıp bilimindeki gelişmeler, *Staphylococcus epidermidis*'in özellikle implantlar ve bağışıklık sistemini baskılayan ilaçların kullanımı sırasında çevresini geliştirmesi için fırsatlar sunmuştur. Antibiyotiklerin sürekli aşırı kullanımı da *Staphylococcus epidermidis* de dahil olmak üzere birçok patojenin çoklu dirençli suşlarının ortaya çıkmasını tetiklemiştir. Artık günümüz patojeni olarak *Staphylococcus epidermidis*'in etkili bir nozokomiyal patojen olarak yerleşmesinin önemi artmıştır (Cavanagh vd. 2019).

Staphylococcus epidermidis, insanlarda ve hayvanlarda doğal olarak bulunan, patojenik olmayan ve kommensal bir deri ve mukoza zarı bakterisidir. Bununla birlikte, *Staphylococcus epidermidis* ile kontamine olmuş iğnelerin kullanımı veya tıbbi cihazların doğrudan yerleştirilmesi, *Staphylococcus epidermidis*'i enfekte olabilecek bağışıklık sistemi baskılanmış hastalar için fırsatçı bir patojen olarak tanımlayabilir. Biyofilm oluşturma yeteneği, tıbbi implantlarla ilişkili bir dizi kronik enfeksiyonda rol oynayan en önemli virülans faktörlerinden biri olarak bilinmektedir. *Staphylococcus epidermidis* biyofilm oluşumu iki aşamalı bir süreçtir. (i) Hücre duvarına bağlı yüzey proteinleri (örn. Fbe, Bhp) ve hücre duvarı litik enzimi otolizin E gibi birçok faktörün aracılık ettiği ilk bağlanma ve (ii) hücre çoğalması ve hücreler arası yapışmayı içeren birikim aşaması. Hem Fbe hem de AtlE konak faktörleri olan fibrinojen ve vitronektine bağlanırken Bhp birincil bağlanmanın yanı sıra hücre içi yapışmaya da katkıda bulunur. Biyofilm oluşumunda polisakkarit hücreler arası adezin ile birlikte veya bağımsız olarak birikimle ilişkili proteinin rolü de belirlenmiştir. ica RADBC kodlu protein tarafından sentezlenen PIA, CoNS biyofilminin oluşumu için ne gerekli ne de zorunludur. PIA dışında, DNA, RNA, proteinler ve polisakkaritler CoNS biyofilminde önemli hücre dışı matris bileşenleri olabilir (Panda ve Singh 2018).

2. *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus, Staphylococcaceae familyasına bağlı fakültatif anaerobik bir bakteridir (Stark 2013). 0,5 ila 1µm çapında kümeler halinde dizilmiş, katalaz, koagülaz pozitif, spor oluşturmeyen, motil olmayan Gram-pozitif bir bakteridir (Bitrus vd. 2017). Oksidaz negatiftir ve yüksek tuz konsantrasyonunu tolere edebilir ve ısı işleme dirençlidir (Oliveira vd. 2018). *Staphylococcus aureus* hem hastane hem de toplum ortamında bulunur ve deri enfeksiyonları, endokardit, idrar yolu enfeksiyonları, solunum yolu enfeksiyonları, bakteriyemi, sepsis ve gıda zehirlenmesi gibi çok çeşitli enfeksiyonlara neden olmuştur (Dayan vd. 2016). *Staphylococcus aureus*, hastane ve toplum enfeksiyonlarında ana patojenlerden biridir ve hafif deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, enfektif endokardit, osteomiyelit, bakteriyemi ve ölümcül pnömoni gibi birçok bulaşıcı hastalığa neden olabilir (Sinha vd. 2000).

Staphylococcus aureus ilk olarak 1880 yılında İskoçya'nın Aberdeen kentinde cerrah Alexander Ogston tarafından ülserli yaraları olan hastalarda keşfedilmiştir. *Staphylococcus aureus* Gram boyaması pozitif, ~0,8µm çapında, mikroskop altında "üzüm dizisi" şeklinde dizilmiş, aerobik veya anaerobiktir; en iyi 37°C'de ve pH 7,4'te büyümüşür (Guo vd. 2020). Stafilokokların tıbbi cihazlara yapışması ve bu bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneği ile ilişkili olarak bakteriyemi, menenjit, deri enfeksiyonu, protez eklem enfeksiyonları ve endokardit dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyon türlerine neden olabilen fırsatçı bir patojendir. Ekzotoksinler ve nükleazlar, proteazlar, lipazlar ve hemolizinler gibi enzimlerin yanı sıra apoptoz indüksiyonu yoluyla sitotoksik aktivite gibi diğer virülans faktörleri de bu türün patogeneğinde rol oynamıştır (Szczyka vd. 2016).

2.9 Biyofilme Neden Olan Gram Negatif Bakteriler

2.9.1 *Enterobacteriaceae* taksonomi sınıflandırması (Jawetz vd. 2013)

Etki alanı: *Eubacteria*

Filum: *Proteobacteria*

Sınıf: Gamma *Gamma proteobacteria*

Aile: *Enterobacteriaceae*

Cins: - *Klebsiella* spp. - *Escherichia* spp. - *Proteus* spp.

1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella Gram-negatif, motil olmayan ve çubuk şeklinde bir bakteridir. Bakterinin bir kapsülü vardır, çevreye ve dezenfektanların yanı sıra birçok antibiyotiğin etkisine karşı dirençlidir (Al-Nakeeb vd. 2018) *K. pneumoniae*, patojenitesine katkıda bulunan çeşitli virülans genleri barındırabilir Tüm genom dizilimi kullanılarak yapılan yeni bir çalışmada, invaziv *K. pneumonia* arasında önemli ölçüde daha sık görülen yersiniabactin, aerobactin ve mukoid fenotip düzenleyicileri gibi çeşitli virülans faktörleri tespit edilmiştir (Holt vd. 2015).

Yapıştırıcılar arasında Pilli, protein yapımı ve bakterilerin konağa bağlanması yer alır. *MrkD* geni hücre dışı matrise bağlanmaya aracılık eder ve ayrıca tip 3 fimbria yapışmasını kodlamıştır. *K. pneumoniae* tarafından eksprese edilen tip 1 ve tip 3 fimbria, kateterize mesane modelinde üriner kateterler üzerinde biyofilm oluşumunu artırmıştır (Clarke 2015).

2. *Escherichia coli*

Escherichia coli, Gram negatif çomak, laktoz fermentörü, bir dairesel kromozomdan oluşan, insan kolonunda yaygın fakültatif anaerob olan, dağılımı çeşitlilik gösteren ve çoğu zararsız olan *Escherichia* cinsine ait zararlı türler idrar yolu, gastrointestinal sistem, bakteriyemi ve sepsis enfeksiyonlarına neden olmuştur (Lee vd. 2016). O- hücre antijeni, H- flagella antijeni ve k- Kapsüler antijen olmak üzere üç antijene sahiptir (Reisner vd. 2014).

O ve K antijenleri, konak savunmasından kaçınma yoluyla *E. coli*'nin hayatta kalmasına katkıda bulunan iyi tanımlanmış virölans faktörleridir (Miajlovic ve Smith 2014). Üropatojenik *Escherichia coli*, bağırsak florası olarak kommensal statülerinden sapan, idrar yolunda büyüyen ve kalıcı olan ve idrar yolunda enfekte olmalarına ve hastalıklara neden olmalarına izin veren çeşitli virölans faktörleri ve stratejileri sergileyen *Escherichia coli* suşlarıdır, bu *E. coli* suşları sürekli olarak üropatojenite ile ilişkilidir ve UPEC olarak adlandırılır (Shah vd. 2019) Üropatojenik *Escherichia coli*, İYE'lerin birincil ajanıdır (Al-Jamei vd. 2019).

Ekstra bağırsak patojeni *Escherichia coli* oldukça esnek genomlara ve yatay gen transferi yoluyla genleri yakalama ve yayma eğilimine sahiptir. Yatay gen transferi plazmid konjugasyonu, faj transdüksiyonu ve transpozonlar, ekleme dizileri ve integronlar gibi küçük mobil genetik elementler yoluyla gerçekleşebilir ve genetik bilginin türler arası ve tür içi hareketine izin vermiştir (Partridge vd. 2018).

Üropatojenik *Escherichia coli*, yapışma faktörleri (P fimbriae, S ve F1C fimbriae ve tip 1 fimbriae), toksinler (α -hemolizin ve sitotoksik nekrotizan tip 1) flagella ve demir kazanım sistemleri dahil olmak üzere çeşitli VF'leri ifade eder (Tabasi vd. 2016). Çoğu üropatojenik *Escherichia coli* suşu, idrar yolu epitelindeki glikoproteinleri tanıyarak UPEC'nin yapışmasını ve kolonizasyonunu kolaylaştıran tip 1 fimbria ifade etmiştir (Li vd. 2017).

FimH'nin (tip 1 fimbria) yapışması, hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesini ve UPEC'in içselleştirilmesini indükler, bu da bakterileri antibiyotiklerden, nötrofil akışından ve kesme stresinden koruyabilir (Zagaglia vd. 2022). Tip 1 fimbriyaya ek olarak, P fimbriya (altı alt birimden oluşur: *papG*, *papF*, *papE*, *papK*, *papA* ve *papH*) glikolipidleri (örneğin, α -D-Gal-(1,4)- β -D-Gal) tanır ve Toll benzeri reseptör 4 ile etkileşime girerek yerel enflamatuvar yanıtı indükler ve doku yıkımını teşvik etmiştir (Li vd. 2017). P fimbria ayrıca UPEC'in kolonize olmasına ve böbrekte bakteriyel uzaklaştırmayı önlemesine yardımcı olmuştur (Boroum vd. 2019).

Adezinlerin bir kısmı, bazı virölans genleri hemolizin (*hly*), sitotoksik-nekrotizan faktör (*cnf1* geni) ve sidroforlar (*fyuA* geni) gibi toksinleri kodlar ve bunlar esas olarak hücre içi hayatta kalma, demir kazanımı, bağışıklık sisteminden kaçış, enflamatuvar yanıt ve konak doku hasarında rol oynar UPEC izolatları, farklı virölans ilişkili gen setleri taşıyan patojenite ilişkili adalar taşıyabilir (Yazdanpour vd. 2020).

3. *Proteus mirabilis*

Proteus mirabilis, kateterin lüminal yüzeylerinde ve çevresinde biyofilm oluşturan Gram-negatif, çubuk şeklinde, üreaz-pozitif bir bakteridir (Armbruster vd. 2018). *P.mirabilis* tarafından eksprese üreazın birincil işlevi, bakteriler için bir nitrojen kaynağı sağlamaktır. *ureC* geni, idrar pH'sının yükselmesinden ve taş oluşumuyla sonuçlanmasından sorumludur (Mohammed vd. 2014).

Proteus enfeksiyonlarının yüzde doksanı *P. mirabilis*'in bir sonucu olarak ortaya çıkar ve bunlar toplum kaynaklı enfeksiyonlar olarak kabul edilmiştir (Wang vd. 2020). *P. mirabilis üreazı*, idrarda büyüme sırasında yapısal olarak ifade edilir ve üreaz, *Proteus vulgaris*, *Providencia rettgeri* ve *Morganella morganii* gibi diğer türlerinkine kıyasla üreyi birkaç kat daha hızlı amonyak ve karbonata aktif olarak hidrolize etmiştir. Oldukça aktif olan *P. mirabilis üreazı*, bağlı bakteri hücreleri tarafından üretilen polisakkaritler içinde hapsolmuş hızlı kristal oluşumuna neden olur. Kateterler üzerinde kristalin biyofilmler oluşmuşlar (Flores-Mireles vd. 2015).

Proteus mirabilis, flagellar peritrichous bir bakteridir (Fattorini vd. 2020). Bu mikroorganizmanın hareketliliği sürü halindedir, bu mikroorganizma sürü halindeyken virölans ifadesi artmıştır (Kotian vd. 2020).

2.10 Toll Benzeri Reseptörler (TLR'ler)

TLR4, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* gibi patojenik mikrobiyal enfeksiyonlara karşı hem doğal hem de adaptif bağışıklığı aktive ederek konak savunma mekanizmalarında kilit rol oynayan bir tip I trans membran proteinidir.

Tolllike reseptörler (TLR) monositler, makrofajlar ve nötrofiller üzerinde bulunan bir trans membran reseptör ailesidir ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynar. Ana işlevleri lipopolisakkarit, lipoproteinler ve peptidoglikanlar gibi patojenle ilişkili moleküler kalıpların (PİMK'ler) tanınmasıdır (Wicherska-Pawłowska vd. 2021). TLR4 özellikle gram negatif basillerden gelen LPS'yi tanır. TLR4'ün genetik polimorfizmlerinin varlığının, bazı popülasyonlarda gelişen enfeksiyonlara duyarlılığı artırdığına inanılmıştır (Piñero vd. 2017). Daha önce yapılan retrospektif bir çalışmada, TLR4 polimorfizminin varlığı ile bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık arasında bir ilişki bulunmuştur (Guarner-Argente vd. 2010).

TLR4 geninde yaklaşık birkaç Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) tanımlanmış ve fonksiyonel çalışmalar bunlardan bazılarının TLR4 fonksiyonunda değişikliklere yol açabileceğini ortaya koymuştur (Wang vd. 2014).

2.10.1 TLR ailesinin keşfi

TLR'ler, bitkilerden memelilere kadar evrimsel olarak korunmuş olan doğuştan gelen bir reseptör ailesidir. Adlarını, sekans ve fonksiyonel benzerlik paylaştıkları *Drosophila* Toll proteininden alırlar. Bu protein başlangıçta *Drosophila*'nın embriyonik gelişiminde rol oynamıştır. Ancak Toll proteininin sinyal yolu ile memeli LR'leri, NF'nin aktivasyonuna yol açan interlökin (IL)-1 reseptör sinyal yolu arasındaki dikkate değer benzerlik göz önüne alındığında, Toll proteininin sineğin patojenlere karşı bağışıklık savunmasında rol oynayabileceği öne sürülmüştür. Mutant sineklerde daha sonra yapılan birkaç deneysel çalışma, Toll proteininin sineği mantar ve gram-pozitif

bakterilerin enfeksiyonuna karşı korumada rol oynadığını açıkça göstermiştir (Lemaitre vd. 1997).

Bu çalışmalar, omurgasızların yalnızca doğuştan gelen bağışıklığa sahip olmalarına rağmen, patojene uyarlanmış bir yanıt oluşturmak için çeşitli mikroorganizma sınıfları arasında ayırım yapabilen oldukça korunmuş bir savunma stratejisinin omurgasızlarda varlığını ortaya koymuştur. Bu sonuçlar yayınlandığında, Toll proteininin insan homologunun (daha sonra TLR4 olarak adlandırılmıştır) NF kontrollü enflamatuvar genlerin ekspresyonunu ve naif T hücrelerinin aktivasyonu için gerekli ko-stimülatör moleküllerin antijen sunan hücreler üzerindeki ekspresyonunu düzenlediği gösterilmiştir. Bu sonuçlar TLR'lerin sadece doğuştan gelen bağışıklığın efektör yanıtına aracılık etmediğini, aynı zamanda antijen çapraz sunumu sırasında naif lenfositlerin fonksiyonel polarizasyonuna da katıldıklarını göstermiştir (Medzhitov vd. 1997). TLR4 daha sonra bir lipopolisakkarit sensörü olarak tanımlanmıştır (Poltorak vd. 1998). Daha sonra, *Drosophila* Toll ile yapısal olarak ilişkili olan ve geniş bir PİMK spektrumunu tanıyabilen ve bağışıklığı aktive edebilen, evrimsel olarak korunmuş proteinlerin büyüyen bir ailesi tanımlanmıştır. Bugüne kadar farelerde 13 farklı TLR karakterize edilmiş ve insan gen veri tabanında 11 TLR homologu (10 tanesi işlevseldir) bulunmuştur (Takeda ve Akira 2007).

Amino asit dizilimleri ve işlevlerine göre insan TLR'leri beş alt aileye ayrılır: TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 ve TLR9. TLR2 alt ailesinin dört üyesi vardır: TLR1, TLR2, TLR6 ve TLR10, bunlar oldukça homologdur ve kendi ligandlarının varlığında ikili bir kombinasyon halinde çalışırlar. TLR9 alt ailesi TLR7, TLR8 ve TLR9'dan oluşur. TLR3, TLR4 ve TLR5 alt aileleri, tek başına veya diğer reseptörler veya moleküllerle birlikte çalışabilen yalnızca bir üye içermiştir. Çoğu doku en az bir TLR için mRNA ifade eder ve birçoğu fareler ve insanlar arasında önemli farklılıklarla birlikte hepsini ifade eder (Zarembek ve Godowski 2002).

Her iki türde de, en bol TLR repertuarları, doğuştan gelen bağışıklıkta rol oynayan hücrelerde ve dokularda ve çevreye yüksek oranda maruz kalan dokularda tespit edilir. Hücresel düzeyde, TLR'ler farklı şekilde dağılmıştır ve konumları ligandlarının doğası

ile ilişkilidir (Krishnan vd. 2007). TLR2, TLR4 ve TLR5 alt ailelerinin üyeleri esas olarak plazma membranında bulunur ve dış ligandları tanımlar. TLR3 ve TLR9 alt aileleri endozomlar gibi hücre içi veziküllerin membranlarında bulunur ve sadece bu hücre içi yapıların lümeninde bulunan ligandları algılar. Bu dağılım kalıcı değildir ve TLR'lerin ifadesi ve konumu hücre ve doku durumuna bağlı olarak değişebilir (Hopkins ve Srisakandan 2005).

Son on yılda, birçok deneysel çalışma TLR'lerin hem doğuştan gelen yanıtın hem de adaptif yanıtın kilit düzenleyicileri olduğunu ortaya koymuştur. Doğuştan gelen bağışıklığın sentinel hücreleri üzerindeki TLR'ler enflamasyonu başlatır ve düzenler, dendritik hücreler üzerinde adaptif bağışıklık yanıtının polarizasyonunda önemli bir rol oynar ve adaptif bağışıklık hücreleri üzerinde işlevlerini düzenler (Granucci vd. 2008).

2.10.2 TLR ailesinin tanımlanması

İlk memeli TLR'si olan TLR4'ün karakterize edilmesinden sonra, TLR4 ile yapısal olarak ilişkili olan birkaç protein tanımlanmış ve Toll benzeri reseptörler olarak adlandırılmıştır (Rock vd. 1998). Memeli TLR'leri en az 11 üyeden oluşan geniş bir aileyi kapsar. TLR1-9 insan ve fare arasında korunmuştur. Bununla birlikte, TLR10 insanda muhtemelen işlevsel olmasına rağmen, fare Tlr10 geninin C-terminal yarısı, fare TLR10'un işlevsel olmadığını gösteren ilgisiz ve üretken olmayan bir diziyle yer değiştirmiştir. Benzer şekilde, fare TLR11 işlevseldir, ancak insan TLR11 geninde bir dur kodonu vardır, bu da insan TLR11'in üretiminin eksikliğine neden olmuştur (Zhang vd. 2004).

TLR'lerin sitoplazmik kısmı IL-1 reseptör ailesininkine yüksek benzerlik gösterir ve Toll/IL-1 reseptör (TIR) alanı olarak adlandırılmıştır. Bu benzerliğe rağmen, her iki reseptör tipinin hücre dışı kısımları yapısal olarak ilişkisizdir. IL-1 reseptörleri immünoglobulin benzeri bir alana sahipken, TLR'ler hücre dışı alanda lözinden zengin tekrarlar taşımıştır. İşlevsel olarak, TLR4'ün mikrobiyal bileşen LPS'nin tanınmasındaki kritik rolü ilk olarak karakterize edilmiştir (Poltorak 1998).

2.10.3 Toll benzeri reseptörler (TLR'ler) yapı, konum ve işlevleri

Toll benzeri reseptörler, geniş ÖTR ailesine dahil olan ilk gruptur. Mutasyona uğramış toll geni tarafından kodlanan ilk reseptörler, gelişimsel süreçlerden ve bağışıklık sisteminden sorumlu oldukları meyve sineklerinde (*Drosophila melanogaster*) tanımlanmıştır (Randow ve Seed 2001). Meyve sineklerinde mantar enfeksiyonlarını tespit ve kontrol etmekten sorumlu reseptörlerin keşfi, diğer türlerde de benzer reseptörler arayan bir araştırma dalgası başlatmıştır. Moleküler ve sitogenetik çalışmalar, mikrobiyal saldırıya maruz kalan tüm canlı çok hücreli organizmalar arasında TLR'leri tanımlamıştır. Toll benzeri reseptörler germline kodlanmış, evrimsel olarak eski proteinlerdir (Yang vd. 2007). Her tür, *Drosophila*'da 9'dan mor denizkestanesinde 222'ye kadar genetik olarak belirlenmiş belirli sayıda TLR'ye sahiptir (Liu vd. 2010).

Memelilerde şu ana kadar TLR'leri kodlayan 13 gen tanımlanmıştır (insanlarda TLR1-TLR10 ve farelerde TLR1-TLR13, ancak TLR10 yoktur). Toll benzeri reseptörler, hem bağışıklık sistemindeki makrofajlar, dendritik hücreler (DH'ler), B hücreleri, NK hücreleri, bazı T hücreleri hem de epitel ve endotel hücreleri ve fibroblastların yüzeyinde olmak üzere birçok hücrede ifade edilmiştir. Bazı TLR'ler hücre yüzeyine lokalize olur (TLR 1, 2, 4, 5, 6) ve geri kalan TLR grubu (TLR 3, 7, 8, 9) hücre içi endozomal membranlara bağlanmıştır (Pelka vd. 2018).

Tüm TLR'ler trans-membran protein I ailesinin üyeleri oldukları için benzer bir domain organizasyonu gösterirler. TLR'ler hücre dışı bir N-terminal lōsin bakımından zengin tekrar, tek bir transmembran alanı ve sitoplazmik TIR alanı olarak bilinen hücre içi bir Toll/IL-1R reseptöründen olmuştur. LRR alanı, LRR motifinin 16-28 tandem tekrarından oluşur ve proteinler (örneğin bakteriyel flagellin), şekerler (örneğin fungal zimojen), lipidler (bakteriyel lipopolisakkarit) ve nükleik asitler (virüslerin DNA ve RNA'sı) gibi ligandları tanımaktan sorumludur. TIR'ın hücre içi alanı yaklaşık 150 amino asitten oluşur ve IL-1 reseptörünün sitoplazmik bölgesine benzerlik gösterir. Sinyal iletim kaskadını aktive etmek için gereklidir (Ohto vd. 2018).

Memelilerde, Toll benzeri reseptörler endoplazmik retikulumda sentezlenir ve daha sonra hedef bölgeye taşınır. Endoplazmik retikulumla ilişkili şaperon proteinleri gp96, PRAT4A ve Unc93B1, reseptörlerin üretilmesinde, olgunlaşmasında ve uygun şekilde katlanmasında önemli roller oynamıştır (Fukui vd. 2018). Farklı TLR'ler vücuttaki farklı PİMK'leri ve HİMK'leri tanır. TLR1, TLR2 ve TLR6 reseptörleri heterodimerler (TLR1/2, TLR2/6) oluşturur ve bu sayede esas olarak Gram-negatif bakterilerden gelen triaçillenmiş lipopeptitleri ve *Mycoplasma* türlerinden gelen diasillenmiş lipopeptitleri tanımlırlardır (Hu vd. 2019). TLR2'nin kendisi en geniş tespit edilebilir ligand yelpazesini sunar ve diğerlerinin yanı sıra bakteriyel proteinlerin (örneğin, *Yersinia*'dan V-antijen), çiçek virüsünden hemagglütininlerin, glikolipidlerin, glikopeptidlerin ve *E. coli*, *B. burgdorferi*, *M. tuberculosis*'ten lipoproteinlerin varlığına yanıt verebilir (Lu vd. 2008). Dectin-1 (C-tipi lektin ailesinin bir üyesi) olarak bilinen bir protein ile birleştiğinde zimozanı tanır. TLR3, örneğin reovirüslerden gelen viral çift sarmallı RNA'yı tanır. Ayrıca, Batı Nil virüsü, RSV veya EMCV (ensefalomiyokardit virüsü) gibi virüslerin tek sarmallı RNA'larının (ssRNA'lar) replikasyonu sırasında ortaya çıkan dsRNA'ları da tanır. TLR3 için ligand, poli(I:C) adı verilen sentetik bir dsRNA analoğu da olabilir (Uematsu vd. 2008).

Yapısal olarak TLR4, hücre yüzeyinde ligand tanıma için gerekli olan diğer birkaç proteinle (örneğin lipopolisakkarit) bir kompleks oluşturur (Miller vd. 2005). TLR'ler, hücre dışı lörin bakımından zengin tekrar alanı ve hücre içi toll/interlökin-1 (IL-1) reseptör benzeri alan ile karakterize edilir. İkincisi yüksek oranda korunmuş bir protein-proteindir. Sinyal iletimi için çok önemli olan etkileşim modölüdür (Kanzler vd. 2007).

Önceki süreç, inflamatuvar hücreler tarafından aktive edilen Nökleer Faktör Kappa beta aracılığıyla sitokin aktivasyonuna yol açar (Uematsu vd. 2008). İnterlökin 6 (IL-6), IL-8 ve Tömör nekroz faktörü-alfa gibi pro-inflamatuvar sitokinler ve matriks metalloproteinaz ve prostaglandin kemik kaybı gibi semptomlara neden olmuştur.

TLR4, Gram-negatif bakterilerin duvarından elde edilen lipopolisakkariti tanır. LPS'nin düzgün bir şekilde tanınması için TLR4'ün membran proteini MD2 ile dimer oluşturması gerekir (Heil vd. 2004). Ayrıca TLR4, *Trypanosoma*'dan

glikozaminofosfolipidleri, RSV'den füzyon proteinlerini ve fare meme tümörü virüsünden zarf proteinlerini de tanıtmıştır (Jin ve Lee 2008). Ayrıca, ısı şoku proteinleri, fibrinojen, hyaluronik asit, beta-defensinler ve diğerleri gibi HİMK'leri dolaylı veya doğrudan tespit etmiştir (Choe vd. 2005).

2.10.4 Doğuştan gelen bağışıklıkta Toll benzeri reseptörler

İstilacı mikrobiyal patojenlere karşı konak savunması, iki bileşenden oluşan bağışıklık sistemi tarafından ortaya çıkarılır: doğuştan gelen bağışıklık ve edinilmiş bağışıklık. Bağışıklığın her iki bileşeni de istilacı mikroorganizmaları kendinden olmayanlar olarak tanır ve bu da onları ortadan kaldırmak için bağışıklık tepkilerini tetikler. Bugüne kadar her iki bileşen de bağımsız olarak karakterize edilmiş ve immünoloji alanındaki ana araştırma ilgisi kazanılmış bağışıklık ile sınırlı kalmıştır. Edinilmiş bağışıklıkta, B ve T lenfositleri kendilerinden olmayanları tanımak için immünoglobulinler ve T hücre reseptörleri gibi antijen reseptörlerini kullanmıştır. Bu antijen reseptörlerinin yabancı antijenleri tanıma mekanizmaları yoğun bir şekilde analiz edilmiş ve çeşitlilik, klonalite ve hafıza gibi ana mekanizmalar iyi bir şekilde karakterize edilmiştir. Bununla birlikte, bu reseptörler sadece omurgalılarda mevcuttur ve dolayısıyla daha az evrimleşmiş organizmalarda kendini tanımama mekanizmasını tam olarak anlayamamıştır.

Buna ek olarak, memelilerde doğuştan gelen bağışıklık sistemi iyi çalışılmamıştır. Sonuç olarak, makrofajlar ve dendritik hücreler gibi memeli doğuştan gelen bağışıklık hücrelerinin Gram-negatif bakterilerden gelen lipopolisakkarit gibi mikrobiyal bileşen (kendinden olmayan) tarafından aktive edildiği bilinmesine rağmen, tanınmasından sorumlu bir reseptör bilinmemektedir. 20 yüzyılın sonunda, Toll'un sadece doğuştan gelen bağışıklığa sahip olan *Drosophila*'da mantar enfeksiyonuna karşı konak savunması için gerekli bir reseptör olduğu gösterilmiştir (Lemaitre vd. 1996). Bir yıl sonra, Toll reseptörünün memeli homologunun (şimdi TLR4 olarak adlandırılmaktadır) enflamatuar tepkilerde yer alan genlerin ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir (Medzhitov vd. 1997). Ayrıca, LPS'ye yanıt vermeyen bir fare türünde *Tlr4* geninde bir nokta mutasyonu tanımlanmıştır (Poltorak 1998).

2.10.5 Fagositoz ve TLR'ler

Fagositoz, mikrobiyal patojenlere karşı konak savunması için önemli bir adımdır, çünkü hem patojenlerin parçalanmasını hem de patojen türevli peptit antijeninin sunumunu tetikler. TLR'nin patojenleri tanınması, inflamatuvar sitokinler ve kostimülatör moleküller gibi genlerin ekspresyonuna yol açmıştır. Fagositoz aracılı antijen sunumu, inflamatuvar sitokinlerin ve ko-stimülatör moleküllerin TLR'ye bağlı gen ekspresyonu ile birlikte, antijene özgü edinilmiş bağışıklık gelişimini yönlendirmiştir. Bu nedenle, fagositoz ve TLR'ler arasındaki ilişkiyi karakterize etmek ilgi çekicidir. TLR sinyalizasyonunda yaygın bir adaptör olan TLR2/TLR4 veya MyD88'in yokluğunda, fagozom olgunlaşmasının bozulması nedeniyle *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakterilerin fagositozunun bozulduğu gösterilmiştir. Daha ileri çalışmalar, TLR aracılı MyD88'e bağlı p38 aktivasyonunun fagozom olgunlaşması için gerekli olduğunu göstermektedir (Blander ve Medzhitov 2004). Dolayısıyla, TLR'ler bakterilerin fagositozu ile bağlantılıdır.

2.11 Toll Benzeri Reseptör Sinyal Yolları

Doğuştan gelen bağışıklığın önceleri spesifik olmayan bir bağışıklık yanıtı olduğu düşünülmektedir. Ancak TLR'lerin keşfi, doğuştan gelen bağışıklığın önemli ölçüde spesifik olduğunu ve kendinden olanla olmayana ayırt etme kabiliyetinin farkına varılmasına yol açmıştır (Aderem ve Ulevitch 2000). Hücre yüzeyi TLR'leri (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR11) esas olarak mikrobiyal membran bileşenlerini tanıyarak inflamatuvar bir yanıtı tetiklemektedir. Buna karşılık, hücre içi TLR'ler (TLR3, TLR7, TLR8 ve TLR9) esas olarak bakteri veya virüslerden türetilen mikrobiyal nükleik asitleri tanıyarak ve Tip I IFN yanıtlarını ve inflamatuvar yanıtları indükler. Bununla birlikte, kendi nükleik asitlerinin yanlış tanınması otoimmün hastalıklara neden olabilir (Blasius ve Beutler 2010).

Spesifik ligandlar tarafından bağlandıktan sonra, TLR ektodomainlerinin ligand aracılı dimerizasyonu, her bir TLR'nin sitozolik TIR domainlerinin koordineli dimerizasyonu ile sonuçlanır. Dimerize reseptör TIR domainleri iki reseptör-proksimal

membran adaptör proteini tarafından tespit edilir: TIR domain içeren adaptör proteini (TIRAP; MAL olarak da bilinir) ve TIRAP-indükleyici IFN- β (TRIF) ile ilişkili adaptör molekülü (TRAM) (Yamamoto vd. 2003). Bu periferik membran proteinleri, TIRAP'ın bir N-terminal fosfoinozitid bağlayıcı alanının veya TRAM'ın bir N-terminal miristoilasyon motifi ve bir fosfoinozitid bağlayıcı motiften oluşan iki parçalı bir lokalizasyon alanının eylemleri yoluyla plazma ve endozomal membranların iç yaprakçıklarını araştırır (Kagan vd. 2008).

TIRAP ve TRAM ayrıca sırasıyla miyeloid farklılaşma birincil yanıt proteini 88 (MyD88) ve TRIF'i işe alabilir ve Myddosome veya Trifosome adı verilen büyük bir oligomerik iskeletin montajını uyarabilir (Fitzgerald ve Kagan 2020). Bu supramoleküler kompleksler, aşağı akış sinyal bileşenleri ve kinaz enzimlerinden oluşur. Sinyal moleküllerinin artan yerel konsantrasyonları, içsel olarak zayıf allosterik etkileşimleri teşvik eder ve sitozolik sinyal iletimini başlatmıştır (Kagan vd. 2014). Oluşan farklı supramoleküler komplekslere bağlı olarak, TLR sinyal yolları temel olarak inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonunu sağlayan MyD88'e bağlı yollar veya Tip I IFN'nin yanı sıra inflamatuvar sitokinlerin indüksiyonundan sorumlu olan TRIF'e bağlı yollar olarak sınıflandırılabilir (Akira vd. 2006).

2.11.1 MyD88

MyD88, TLR ailesinin tanımlanan ilk üyesidir; TLR3 hariç tüm TLR'ler tarafından ortak olarak kullanılır ve NF- κ B sinyal yolunu aktive etmiştir. Spesifik ligandlar tarafından aktivasyonu üzerine MyD88, IRAK kinaz ailesi üyeleri ile bir kompleks oluşturan ve middozom olarak adlandırılan IL-1 reseptörü ile ilişkili kinazları (IRAK)-IRAK4, IRAK1, IRAK2 ve IRAK-M- işe almıştır (Bonham vd. 2014). MyD88 TLR'lere bağlandığında, IRAK ailesi proteinleri bağlanır ve ortaya çıkan komplekse middozom denir. Middozom oluşumu sırasında IRAK4, E3 ubiquitin ligaz TRAF6'nın RING-domainine bağlanan IRAK1'i aktive etmiştir. TRAF6, ubiquitin bağlayıcı enzim UBC13 ve kendisine bağlı UEV1A ile kendi molekülünün K63 bağlantılı poliubikitinasyonuna ve TAK1 kinaz protein kompleksi oluşumuna yol açmıştır. TAK1, MAPKKK protein ailesine ait bir proteindir ve TRAF6 tarafından üretilen poliubikitinlenmiş zincirlerle

reaksiyona girerek TAK1 aktivasyonuna yol açan üç düzenleyici birim olan TAB1, TAB2 ve TAB3 ile bir kompleks oluşturur. TAK1 daha sonra iki yolun aktivasyonuna yol açar: IKK-kompleks-NF-kB yolu ve MAPK yolu. TAK1, IKK kompleksinin IKKB'sini fosforile ederek NF-kB'nin hücre çekirdeğine translokasyonuna ve proinflamatuvar sitokinlerin üretiminden sorumlu genlerin uyarılmasına neden olmuştur. TAK1 aktivasyonu ayrıca Erk1/2, p38 ve JNK gibi MAPK ailesi proteinlerinin aktivasyonuna yol açar, bu da mRNA'yı stabilize eden ve inflamatuvar yanıtın düzenlenmesine yol açan AP-1 ailesi transkripsiyon proteinlerinin aktivasyonuna yol açmıştır.

2.11.2 ASH'lerin TLR aracılı düzenlenmesi

DC'lerin ve makrofajların TLR aracılı aktivasyonu ve olgunlaşması, doğuştan gelen ve adaptif bağışıklık arasındaki kritik bağlantılardır (Akira vd. 2006). DH'ler profesyonel ASH'lerdir ve naif T hücrelerinin aktivasyonunu ve Th tip 1 (Th1) hücrelerine, Th2 hücrelerine ve CTL efektörlerine farklılaşmasını indüklemeye merkezi bir rol oynarlar (Banchereau ve Steinman 1998). DH'ler antijeni aldıktan sonra, aktive olmuş DH'ler ilgili majör histo-uyumluluk kompleksi (MHC) molekülleri üzerindeki antijenik peptitleri sunmak için yerel lenfoid dokulara göç edebilir (Iwasaki ve Medzhitov 2004). Bu süreç, DH'ler tarafından ifade edilen çeşitli ÖTR'ler *aracılığıyla* patojenlerin tanınmasıyla düzenlenir. Bu ÖTR'ler arasında TLR ailesi üyeleri efektör T hücre yanıtlarının oluşturulmasında kritik bir rol oynamaktadır. "Doğuştan gelen" sitokinlerin (tip I IFN, IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α) üretimi, kostimülatör moleküllerin (CD40, CD80 ve CD86) yukarı regülasyonu ve kemokin reseptörlerinin (CCR2, CCR5 ve CCR7) değişen ekspresyonu, DH olgunlaşmasının özellikleridir ve LPS, lipoproteinler ve CpG DNA dahil olmak üzere TLR'lerin ligandları tarafından indüklenebilir (Iwasaki ve Medzhitov 2004). Ayrıca TLR sinyalleri, DH'lerde endozomların asitlenmesini veya MHC Sınıf I içeren endozomların fagozomlarla kaynaşmasını teşvik ederek MHC moleküllerine peptit yüklenmesini veya CD8⁺ T hücre yanıtlarının uyarılması için eksojen antijenlerin çapraz sunumunu da kolaylaştırabilir (Nair-Gupta vd. 2014).

Bununla birlikte, LPS ile indüklenen TLR sinyali, MHC Sınıf I ve II moleküllerinin DH'lerin yüzeyine yeniden dağılımını teşvik edebilir. DH'lerde TLR4 aktivasyonu, MHC Sınıf I'de sunum için dendritik hücreye özgü hücreler arası yapışma molekülü-3-kapan non-integrin (DH-SIGN) hedefli antijenlerin sitozolik yönlendirilmesini ve CD8⁺ T hücre aktivasyonunun artmasını teşvik etmiştir (Horrevorts vd. 2018).

Son zamanlarda, TLR3, TLR4 ve TLR9 ligandlarının DH'lerde otokrin C3a reseptörü ve C5a reseptörü (C3ar1/C5ar1) sinyalini indüklediği, bunun da efektör T hücrelerinin genişlemesine ve düzenleyici T hücrelerinin kararsızlığına neden olduğu ve T hücrelerine bağlı nakil reddine katkıda bulunduğu bildirilmiştir. TLR ligasyonu TLR2, TLR4 veya TLR9 agonistleriyle birlikte IFN- γ , antijene özgü T hücresi yanıtlarını artırmak için DH aktivasyonunu ve işlevini geliştirebilir (Sheng vd. 2013). İlginç bir şekilde, DH'ler üzerindeki tüm TLR'ler in vitro CD8⁺ T hücresi aktivasyonunu indükleyebilmesine rağmen, yüzey ve endozomal TLR'lerin CD8⁺ T hücrelerini aktive etme yetenekleri in vivo olarak farklı olabilir. Nükleik asit tanıyan endozomal TLR'ler CD8⁺ T hücresi aktivasyonunu güçlü bir şekilde indüklerken, yüzey TLR'lerini tanıyan bakteriyel ligandlar CD8⁺ T hücresi primingini indükleyememiştir. Dahası, yüzey TLR'leri, endozomal TLR'lerin aktivasyonu ile indüklenen CD8⁺ T hücresi genişlemesini engelleme konusunda baskın bir etkiye sahip olabilir (Mandraju vd. 2014). Belirli hücre yüzeyi belirteçlerine dayanarak, DH'ler miyeloid DH'ler, pDH'ler, CD8 α ⁺ DH'ler ve CD11b⁺ DH'ler dahil olmak üzere farklı alt kümelere ayrılabilir (Iwasaki ve Medzhitov. 2004).

İnsan kan monositleri TLR1, TLR2, TLR4 ve TLR5'i ifade eder, ancak granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör ve IL-4 varlığında olgun DH'lere farklılaştıkça bu reseptörleri aşamalı olarak kaybeder ve TLR3 ifadesini kazanmıştır. Farklı DH alt kümeleri alt kümeye özgü ÖTR'leri ifade ettiğinden, DH'ler işlevsel olarak heterojendir. Farklı DH alt kümeleri farklı uyaranlara yanıt verir ve farklı sinyal yollarını aktive ederek spesifik sitokinlerin salınmasına yol açar, bu da üretilen ve aktive edilen spesifik Th hücre alt kümelerini belirler. pDH'ler sırasıyla ssRNA ve CpG DNA'yı tanıyan TLR7 ve TLR9'u ifade etmiştir, ancak pDC'ler bakteriyel hücre duvarı bileşenlerini tespit eden diğer TLR'leri ifade etmemiştir. Bu nedenle, pDH'lerin Tip I IFN'leri

indüklemek ve antiviral bağışıklığı kontrol etmek için viral enfeksiyonları spesifik olarak tespit ettiği düşünülmektedir (Merad vd. 2013).



3. MATERİYAL VE METOT

3.1 Çalışmanın Tasarımı

Kontrol vakası çalışması olarak tasarlanan ve 250 örnek içeren çalışmamıza, Haziran 2023'te başlanmıştır. Güney Irak'ın Thi-Qar vilayetindeki, Al-Rifai Genel Hastanesi'nde hastalarla yüz yüze görüşülmüş ve her hastanın klinik geçmişi, laboratuvar sonuçları ve fizik muayene bulguları alınmıştır. Her bir vakayı tanımlanırken hastanın yaşı, cinsiyeti, belirti ve semptomlarının yanı sıra numunenin alınmasından önceki hafta hastaya antibiyotik ilaç verilip verilmediği de sorulmuştur. Klinik ve laboratuvar standartlarına göre, İdrar Yolu Enfeksiyonu (İYE), kulak, boğaz ve yara sürüntü örnekleri alınan ve tanı konulmuş hastalar ile görüşülmüştür. Klinik belirti ve semptomlar temel alınarak klinik kriterler belirlenmiştir. Laboratuvar gerekliliklerine ek olarak, idrar yolu enfeksiyonlarının doğrulanması için orta akım idrar örnekleri, steril vidalı kapaklı kaplarda toplanmıştır.

Bu örnekler mikroskopik olarak irin hücreleri, hasta ve kontrol grubundaki bakteriler ve en az 10^5 CFU/ml bakteri içeren pozitif idrar kültürü varlığı açısından analiz edilmiştir. Ardından, tüm numuneler steril bir standart öze kullanılarak Blood Agar, MacConkey Agar ve Mannitol Salt Agar'da 37°C'de 24 saat boyunca kültüre edilmiştir. Gram boyama kimyasalları kullanılarak saf bakteri kolonilerindeki hücrelerin morfolojisi incelenmiştir. Biyokimyasal (manuel ve otomatik testler) kullanılarak tüm bakteri izolatları tanımlanmıştır. 16SrRNA geni ve direnç geni tespiti kullanılarak tüm izolasyonları doğrulamak için bakteri kolonileri üzerinde PCR testi yapılmıştır. Hastadan ve sağlıklı kontrolden alınan kan örnekleri, TLR4 gen polimorfizmini (rs10759932, rs12377632) belirlemek için ARMS-PCR kullanılarak analiz edilmiştir.

3.2 Malzemeler

3.2.1 Alet ve ekipmanlar

Bu çalışmada kullanılan alet ve ekipmanlar, menşei ve firmaları ile birlikte Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Alet ve ekipmanlar ve üretici firmaları

	Ekipman ve Araçlar	Şirket	Ülke
1	Davlumbaz (Biyogüvenlik kabini)	ESCO	Almanya
2	Otoklav	Euronda	İtalya
3	İnkübatör	Memmert	Almanya
4	Benzen brülörü	Alab Tech	Kore
5	Konik şişeler 500ml, 1000ml	Yaklaşık	Çin
6	Tek kullanımlık Petri kapları	AFCO	Ürdün
7	Işık Mikroskobu	Olympus	Japonya
8	Dijital kamera	Samsung	ÇİN
9	Mikro santrifüj tüpleri	Biyobazik	Almanya
10	Exispin vorteks santrifüj	Bioneer	Kore
11	Steril standart döngü (0.001)	Yüksek medya	Hindistan
12	Jel elektroforezi	Bioneer	Hindistan
13	Hassas Denge	Ohaus	ABD
14	Yüksek Hızlı Santrifüj	Hettich	İtalya
15	Yüksek Hızlı Soğuk Santrifüj	Hettich	Almanya
16	Su Banyosu	Polyscience	ABD
17	VITEK2 compact	Biomeriueux	Fransa
18	Mikropipetler 5-50, 0.5-10,100-1000µl	CYAN	Fransa
19	Mikrodalga	Argose	Belçika
20	Mikrosantrifüj tüpleri	Biyobazik	Almanya
21	Vorteks karıştırıcı	Talboys	ABD
22	Steril standart döngü (0.001)	Yüksek medya	Hindistan
22	Pastör pipeti Disposabl	M.O.H Kimadia	Irak
23	Power Pac HC Elektroforez	BioRad	ABD
24	Spektrofotometre (Nano drop)	TERMO	ABD
25	PCR thermocycler T100	BioRad	ABD
26	Mikrosantrifüj, PCR Santrifüj Tüp Tutucu	P-ABC	ABD
27	Kesintisiz Güç Kaynağı	Çin	Çin
28	U.V transillüminatör	Wised	Kore
29	Barkod Tarayıcı	Adaptus	Çin
30	Hücre Bozucu gen santrifüjü	Bilimsel Endüstriler	ABD
31	DensiCheck plus	Biomeriueux	Fransa

3.2.2 Kimyasallar ve biyolojik reaktifler

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve biyolojik reaktifler, firma ve ülke menşeleriyle birlikte Çizelge 3.2'de listelenmiştir.

Çizelge 3.2 Kimyasallar ve biyolojik reaktifler

	Kimyasallar ve Biyolojik reaktifler	Şirket	Ülke
1	Gram Boyama Reaktifleri	Syrbio	Suriye
2	Hidrojen peroksit	Fluka	İngiltere
3	N,N,N,N-tetrametil-fenilen Dihidroklörür	Biomeriux	Fransa
4	ID-GP kartı	Biomeriux	Fransa
5	ID-GN kartı	Biomeriux	Fransa
6	K3-EDTA	AFCO	Ürdün
7	Sodyum Klorür (Nacl)	Himedia	Hindistan
8	İnsan plazması, İnsan Kanı	Kan Bankası	Rifai-Irak
9	Mutlak etanol	BDH	İngiltere
10	DNA Marker merdiveni 100-2000bp	Bioneer	Kore
11	Agaroz jel		ABD
12	Serbest nükleaz suyu	Bioneer	Kore
13	Etidyum bromür	Biyobazik	ABD

3.2.3 Kültür ortamı

Tüm besiyerleri üretici prosedürüne uygun olarak hazırlanmış ve 1.2 atm basınç altında 121 °C'de 15 dakika boyunca otoklavda sterilize edilmiştir. Bu detaylar Çizelge 3.3'te firma ve ülke menşeleriyle birlikte sunulmuştur.

Çizelge 3.3 Kültür ortamları ve üretimi yerleri

	Kültür Medya	Şirket	Ülke
1	Kanlı Agar	Medya	Hindistan
2	MacConkey Agar	Medya	Hindistan
3	Mannitol Tuz Agarı	Medya	Hindistan
4	Kongo Kırmızı Agar	Sigma-Aldrich	Almanya
5	Beyin-Kalp İnfüzyon Suyu	Medya	Hindistan
6	Gliserol	Medya	Hindistan

3.2.4 Reaktifler ve çözeltiler

Gram Boyası

Mikroskopik özellikleri tespit etmek için, Kristal viyole, iyot çözeltisi, Etil alkol ve Safranin boyaları kullanılarak bakteriler gram boyamsı yapılmıştır (Tille 2015).

Katalaz Testi

Katalaz testi, hidrojen peroksitten su ve oksijen salınımını katalize ettiği için ($H_2O_2 + \text{katalaz} = H_2O + O_2$) birçok gram-pozitif organizmanın tanımlanması süreci esas alınmıştır (Mourabit 2021).

Koagülaz Testi

Staphylococcus aureus tarafından üretilen iki tür koagülaz bağlı ve serbesttir. Bakteriyel bir çözelti plazma ile birleştirildiğinde, "topaklanma faktörü" olarak da bilinen bağlı koagülaz, bakteriyel hücre duvarına bağlanır ve stafilokok hücresi üzerindeki fibrinojen ile doğrudan reaksiyona girer. *Staphylococcus aureus* kolonileri plazma ile muamele pıhtı oluşturan koagülaz adı verilen hücre dışı bir protein enzimi, bağlı koagülaz varlığı ile ilişkilidir. Modifiye edilmiş veya türetilmiş bir trombin molekülü olan plazma koagülaz ile reaksiyona giren faktör (CRF), bir koagülaz-CRF kompleksi oluşturmak için pıhtılaşma sürecinin bir parçası olarak aktive edilir ve daha sonra fibrin pıhtısı yapmak için fibrinojen ile reaksiyona girer (Tille 2015).

Oksidaz Testi

Tetrametil-fenilen dihidroklorür (N,N,N,N) (0,1 g) 10 ml distile su içinde seyreltilmiş ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın oksidaz enzimi üretme kapasitesini test etmek için kullanılmıştır (Cobos-Trigueros vd. 2017).

Metil kırmızısı Reaktifi

Reaktiflerin hazırlanması, 0,1 g metil kırmızısının 300 ml %96'lık etanol içinde çözülmesini ve ardından distile su (D.W) ile 500 ml'lik bir hacme tamamlanmasını içermektedir. Bu preparatın metil kırmızısı testindeki işlevi bir gösterge niteliğindedir (Tille 2015).

Voges Proskauer Reaktifleri (VP):

VP1 Reaktifi %40 sulu KOH çözeltisi, %89 demineralize su ve %11 naftol içerirken, VP2 Reaktifi 6 g naftol ve 100 ml etanol içermektedir (Cobos-Trigueros vd. 2017).

Vitek 2-Test kiti:

ID-GP: 124 *stafilokok*, *streptokok*, *enterokok* türü ve birkaç spesifik gram-pozitif organizma ID-GP kartı tarafından 6 ila 8 saat içinde tanınmıştır.

ID-GN: 154 Enterobacteriaceae türü ve seçkin bir gram-negatif, fermente olmayan organizma grubu ID-GN kartı tarafından 10 saat içinde tanınmıştır .

3.3 Moleküler Çalışma Kitleri

3.3.1 Bakteriyel DNA ekstraksiyonu

PCR yöntemi 16S rRNA genine ve biyofilmle ilgili bazı genlere dayalı olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan tüm PCR tespit kitleri, firma ve ülke menşeleri ile birlikte Çizelge 3.4'te belirtilmiş ve listelenmiştir.

Çizelge 3.4 PCR Bakteriyel DNA Ekstraksiyon kitleri

	Kit	Şirket	Ülke
1	Presto™ Mini gDNA Bakteri Kiti	Geneaid	Tayvan
	Gram+ Tampon		
	GT tamponu lizis tamponu		
	GB tampon bağlayıcı tampon		
	Proteinaz K		
	W1 tampon		
	Yıkama tamponu		
	Elüsyon tamponu		
	GD sütunu		
	Toplama tüpü 2ml		
	Iysozyme		
	Kit	Şirket	Ülke
2	GoTaq® Green PCR ana karışımı	Promega	ABD
	Taq DNA polimeraz		
	dNTP'ler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)		
	Tris-HCl pH 9.0, KCl ve MgCl ₂		
	Stabilizatör ve yükleme boyası		

3.3.2 Polimeraz zincir reaksiyonu primerleri

Biyofilm bakteri bazlı 16S ribozomal RNA geninin moleküler tespiti için PCR primerleri bu çalışmada NCBI Genbank veri tabanı ve Primer 3 programı kullanılmıştır. Ayrıca bu primerler Scientific Researcher.Co.Ltd tarafından, Irak'tan, aşağıdaki Çizelge (3.5) ve Çizelge (3.6) formatında temin edilmiştir:

Çizelge 3.5 Nükleotid dizileri ve ürün boyutlarıyla birlikte PCR primerleri

Primer	Sekans (5'-3')	Ürün Boyutu	Genbank
16S rRNA geni <i>Escherichia coli</i>	F TCCCCATCTTTGTCCATCTC R AGAATACCGGTGACGAATGC	453bp	LR739012.1
16S rRNA geni <i>Staphylococcus aureus</i>	F GAGGGTCATTGGAACTGGA R TAGCACGTGTGTAGCCCCAA	611bp	L37597.1
16S rRNA geni <i>Proteus mirabilis</i>	F CAGAAGAAGCACCGGCTAAC R CGGTTTCAAGACCACAACCT	368bp	LR739004.1
16S rRNA geni <i>Klebsiella pneumoniae</i>	F ACCTTGCGATTGACGTTAC R AAGGCACCAATCCATCTCTG	562bp	HG416956.1
16S rRNA geni <i>Staphylococcus epidermidis</i>	F GAGCTTGCTCCTGACGTT R AGACCAGAAAGTCGCCTTCG	674bp	L37605.1

Çizelge 3.6 Biyofilm ile ilgili genler PCR primerleri, nükleotid dizileri ve ürün boyutları ile ilgili

Primer	Sekans (5'-3')		Ürün Boyutu	Genbank
<i>fimH</i> geni <i>Escherichia coli</i>	F	CTGGTCGGTAAATGCCTGGT	392bp	JF289169.1
	R	AGCCAGCTTTAATCGCCACT		
<i>ica</i> geni <i>Staphylococcus aureus</i>	F	AGCGAAGTCAGACACTTGCT	506bp	KT321150.1
	R	GCGACTATCAATAAAGAGTGCGA		
<i>mrpA</i> geni <i>Proteus mirabilis</i>	F	GTTGTTGCGGGTTCTGCTTT	438bp	NC_010554.1
	R	TGGAACAGCAGCTTCAGATG		
<i>fimH</i> geni <i>Klebsiella pneumoniae</i>	F	TCGTTAATCGCGGTGCTGAT	447bp	FJ483600.1
	R	GATGATCGACTGCACGTTGC		
<i>IcaA</i> <i>Staphylococcus</i>	F	AGCTAATGCACTCAATGAGGGA	423bp	KU595712.1
	R	TCAGGCACTAACATCCAGCA		

3.3.3 Tetra-ARMS-PCR primerleri

Tetra-ARMS-PCR Primerleri bu çalışmada NCBI-SNP veritabanı dizileri ve (PRIMER1: tetra-primer ARMS-PCR için primer tasarımı) kullanılarak kullanılmıştır. Bu primerler (ScientificReseracher. Co. Ltd. Irak) tarafından aşağıdaki Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8 'de sunulmuştur.

Çizelge 3.7 TLR4 rs10759932 gen polimorfizmi için Tetra-ARMS-PCR Primerleri, dizileri ve ampikon boyutlarıyla birlikte verilmiştir.

Primer	Sekans (5'-3')	Ürün boyutu
İleri iç primer C aleli)	TTACAGACCAGAAAGTAATAATACGC	300bp
Ters iç primer (T aleli)	TTTTCACATCTTCACCACCA	252bp
İleri dış primer	TGGAATGTAATGATGATGCTCT	506bp
Ters dış primer	TTATCCATTTGTCTGTTTCATGG	

Çizelge 3.8 TLR4 rs12377632 gen polimorfizmi için Tetra-ARMS-PCR Primerleri, dizileri ve ampikon boyutlarıyla birlikte verilmiştir.

Primer	Sekans (5'-3')	Ürün boyutu
İleri iç primer (T aleli)	TTAAGGTAGACCACCTCACT	285bp
Ters iç primer (C aleli)	TCTTGTTTGAAAAAAAACAG	315bp
İleri dış primer	TCACTCAGGTAGTGAGCATAGT	556bp
Ters dış primer	ATCACAAAGCATTCTTACAAGA	

3.4 Yöntem

3.4.1 Numune koleksiyonu

Mikroskopik inceleme ve bakteri ekimi için temiz yakalama tekniği kullanılmış ve steril bir kaba yerleştirilmiştir. Numune alındıktan sonra iki saatten kısa bir süre içinde numunenin işlenmesi tamamlanmıştır. Mikroskop altında numune irin, kan ve mukus varlığı açısından incelenmiştir. Steril bir standart öze kullanılarak tüm numuneler kanlı agar, MacConkey agar ve Mannitol tuzlu agar plaklarına ekilmiştir. Kültür ortamı 37°C'de 24 saat boyunca aerobik olarak inkübe edilmiştir. Bir bakteri kolonisi, 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra 5 ml Beyin Kalp İnfüzyonu besiyeri içeren bir test tüpüne ekilmiş ve tüpte 5 ml steril gliserol stok çözeltisi (%20 v/v) tutulmuştur. Teşhisi doğrulamak için VITEK2 sistemi (ID-GN, ID-GP) kullanılmıştır.

3.4.2 Tam Kan örneklerinin toplanması

İdrar yolu enfeksiyonu, Yara enfeksiyonu, Boğaz Sürüntüsü ve Kulak Sürüntüsü olan hastalar ve sağlıklı kontrollerin her biri ön kollarındaki bir damardan 3 ml kan alınmıştır. DNA ekstrakte edilip saflaştırılana kadar kan örnekleri K3-EDTA içeren tüplerde ve 4°C'de muhafaza edilmiştir. Hastalardan ve sağlıklı kontrollerden alınan kan örnekleri, amplifikasyon refrakter mutasyon sistemi polimeraz zincir reaksiyonu (ARMS-PCR) kullanılarak TLR4 gen polimorfizmini (rs10759932, rs12377632) belirlemek için kullanılmıştır.

3.4.3 Biyofilm oluşumunun kantitatif olarak belirlenmesi

Biyofilm oluşumu tüm bakteri izolatları için Kongo Kırmızısı Yöntemi ile tespit edilmiştir. Besiyeri Brain heart infusion broth (37 gr/l), sukroz (5 gr/l), 1 numaralı agar (10 gr/l) ve Kongo kırmızısı boyasından (0.8 gr/l) oluşmaktadır. Kongo kırmızısı boyası konsantre sulu çözelti olarak hazırlanmış ve 121 °C'de 15 dakika otoklavlanmıştır. Daha sonra 55 °C'de otoklavlanmış Brain heart infusion agara sukroz ile eklenmiştir. Plakalar

test organizması ile aşılanmış ve 37 °C'de 24 ila 48 saat aerobik olarak inkübe edilmiştir. Kuru kristal kıvamlı siyah koloniler biyofilm üretimini göstermiştir

3.5 Biyolojik Tanımlama

3.5.1 Bakteriyel üremenin tanımlanması için kültür ortamının hazırlanması

a) Kanlı agar besiyerleri

Kit prosedürüne uygun olarak temin edilmiş ve otoklavda sterilize edilmiştir. 5 insan kanı 45-50 °C'de soğutulduktan sonra karışıma eklenecek (100 ml besiyeri başına yaklaşık 5 ml kan), yumuşak bir şekilde karıştırılacak ve ardından Petri kaplarına dağıtılmıştır (Niederstebruch vd. 2017). Kanlı agar, çeşitli bakterilerin gelişimini destekleyen zenginleştirilmiş bir besiyeridir. Titiz organizmaları besler ve hemolitik özelliklerine göre bakteriler arasında ayırım yapmak için kullanılmıştır. Mevcut bulgular, *Staphylococcus aureus* kolonilerinin öncelikle hemolitik olduğu belirlenen kanlı agarda kültür yapılarak bulunabileceğini gösteren önceki bir çalışmayla tutarlıdır (Kulkarni ve Pathak 2016).

b) MacConkey agar ortamı

Kristal viyole boyası, safra tuzları, laktoz ve nötr kırmızı (bir pH göstergesi) MacConkey besiyerinin önemli unsurlarıdır. Gram-pozitif bakterilerin büyümesi kristal viyole boyası ve safra tuzları tarafından durdurulur. Bu da MAC agarda sadece gram-negatif türlerin koloni oluşturmalarını mümkün kılmıştır. Laktoz fermente edenleri laktoz fermente etmeyenlerden ayırmak ve Gram-negatif bakterilerin çoğunun birincil ayrımı için kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan MacConkey agar (51,5 gm/L) şu şekilde hazırlanmıştır: pH, pH metre gerekliliklerine uygun olarak değiştirilmiştir; 121°C'de 15 dakika boyunca kare başına 15 pound ile otoklavlanarak sterilize edilmiş, daha sonra petri kaplarına gerektiği şekilde dağıtılmış, sterilitiyi sağlamak için 37°C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve kullanıma kadar 4°C'de saklanmıştır (Forbes vd. 2007).

c) Mannitol tuz agar besiyeri

111 g Mannitol Salt Agar'ın çözünmesi için bir litre deiyonize suda kaynatılması. 121°C'de 15 dakika otoklav sterilizasyonundan sonra, sıvı petri kaplarına dökülmeden önce sıcaklık 50°C'ye soğutulmuştur. Diğer stafilokokları mannitol, NaCl (%7,5'i diğer bakterileri engeller) ve kırmızı fenolden ayırt etmek için mannitol tuzlu agar ekimi kullanılmıştır. Mannitol fermantasyonunun bir sonucu olarak *Staphylococcus aureus* kolonilerini sarı bölgeler çevrelemektedir. *Staphylococcus aureus* mannitol fermantasyonu adı verilen özel bir aktiviteye sahiptir (Kateete vd. 2010).

d)Beyin kalp infüzyon suyu (BHI-B)

Hi-Media şirketi tarafından sağlanan talimatlara göre, bu besiyeri aşağıdaki şekilde yapılmış ve sterilize edilmiştir: 37 gm, kullanılacağı gün 1000 ml distile su içinde süspanse edilmiştir ve vidalı kapaklı şişelere dökülmüştür. Sterilizasyon 121°C'de 15 dakika otoklavlama, ardından 50°C'ye soğutma ve steril tüplere dağıtma yoluyla gerçekleştirilmiştir. Sterilizasyonun ardından, 5 ml besiyeri içeren bir tüpe yaklaşık 5 ml miktarında gliserol (%25) eklenmiştir. Bu işlem izolatları korumak için yapılmıştır.

3.6 Bakterilerin Tanımlanması için Gram Boyama

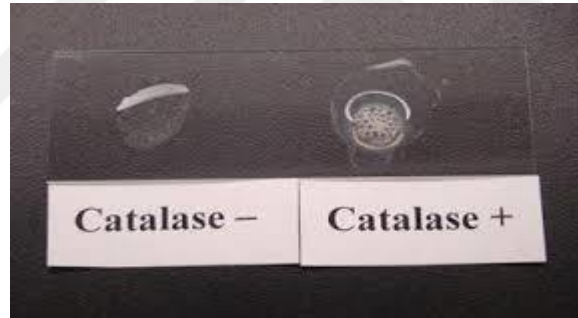
Tüm numuneler aerobik olarak kanlı agar ve MacConkey agar üzerinde kültüre edilmiş ve gece boyunca 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. Öze önce alevle sterilize edilmiş, ardından yaklaşık 30 saniye soğumaya bırakılmıştır. Önce lamın kurumasına izin verilmiştir. Kuru yayma daha sonra Bunsen brülör alevinden iki ila üç kez geçirilerek ısıtılmış ve ardından kristal viyole solüsyonu ile bir dakika boyunca yayma yapılmıştır. Lam lekesi daha sonra yıkama şişesi suyu veya yavaş akan bir musluk kullanılarak çıkarılmıştır. Lam üzerine iyot uygulanmış ve bir dakika sonra yıkanmıştır ve sonra tekrar boyanmıştır. Lam yaklaşık 10-20 saniye boyunca %95 etanol (alkol) ile yıkandıktan, yaklaşık 1 dakika boyunca safranin ile boyanmış su ile durulandıktan ve boyamadan sonra yavaş akan musluk suyu veya yıkama şişesi suyu ile durulandıktan

sonra *Staphylococcus* spp. için bakteriler gram pozitif koklar, küçük ve üzüm benzeri kümeler halinde dizilmiş olarak görünmüştür. *Enterobacteriaceae*, yuvarlak uçlu gram-negatif çubuk şekilli basillerin varlığı ile düşünülmüştür.

3.7 Biyokimyasal Testler

3.7.1 Katalaz testi

Bir halka veya sterilize edilmiş tahta çubuk kullanılarak, az miktarda iyi izole edilmiş bakteri kolonisi gelişimi temiz, kuru bir cam lamın yüzeyine uygulanmıştır. Cam lamın üzerine bir damla %3 hidrojen peroksit çözeltisi eklenmiştir (Şekil 3.1). Anında kabarcıklanma aranmıştır (Mourabit vd. 2021). Kabarcıkların varlığı katalazın düzgün çalıştığını göstermiştir. *S. aureus*'un katalaz testi pozitif çıkmıştır (Sarwar vd. 2014).



Şekil 3.1 Katalaz testi

3.7.2 Koagülaz Testi (Topaklanma faktörü)

Koagülaz, fibrinojeni fibrine dönüştürerek pıhtılaşmaya veya kümelenmeye neden olan bir enzim proteindir ve termotabil trombin benzeri bir moleküldür. Bu teste göre hangi stafilokok izolatlarının koagülaz pozitif olduğunu belirlemek için kullanılmıştır (Kateete vd. 2010).

1- Üç test tüpü kullanılmış ve bunlara "test", "negatif kontrol" ve "pozitif kontrol" etiketleri verilmiştir.

- 2- Her tüpe 1 ml insan plazması yerleştirilmiştir.
- 3- Test" olarak etiketlenmiş tüpe 0,2 ml test bakterisinin gece boyunca besiyeri kültüründen eklenmiştir.
- 4- Bilinen bir gecelik *S. haemolyticus* broth kültürü 0,2 ml ile "pozitif kontrol" olarak işaretlenmiş tüpe eklenmiştir.
- 5- Negatif kontrol" olarak işaretlenmiş tüpe 0,2 ml steril besiyeri eklenmiştir (Şekil 3.2).
- 6- Tüm tüplerin bir gecelik 37°C inkübasyon sonuçları daha sonra değerlendirilmiştir.



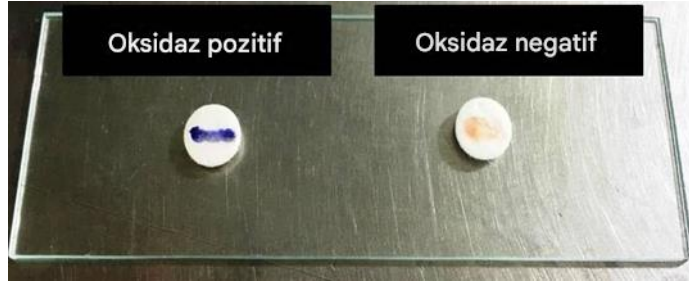
Şekil 3.2 Koagülaz testi

3.7.3 Oksidaz testi

Filtre kağıdı kullanma prosedürü bu çalışmada tasarlanmış ve aşağıdaki adımlarla gerçekleştirilmiştir:

1. Tetrametil-p-fenilen-diamin reaktifi küçük bir filtre kağıdı parçasına uygulanmış ve kurumaya bırakılmıştır.
2. Taze (mannitol tuz agarı üzerinde 18 ila 24 saatlik kültür) bir bakteri plağı kullanılmış ve iyi izole edilmiş bir koloni seçilerek bir ilmek yardımıyla işlenmiş filtre kağıdına sürülmüştür.

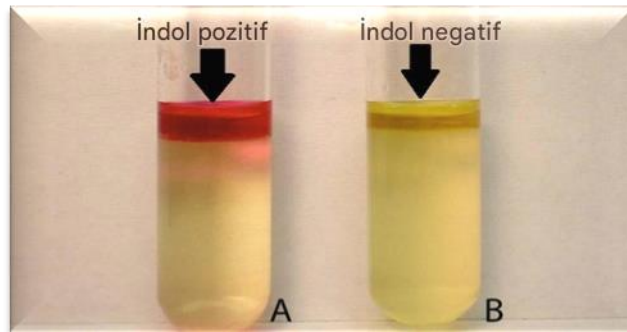
3. Daha sonra renk değişiklikleri fark edilmiştir. Beş ila on saniye içinde menekşe renginin ortaya çıkması pozitif bir sonuç olduğunu göstermiştir (Şekil 3.3) (Shields ve Cathcart, 2010).



Şekil 3.3 Oksidaz testi

3.7.4 İndol üretim testi

Test için izolatlar pepton broth'a eklenmiş ve karışım daha sonra 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Ardından, birkaç damla Kovac reaktifi eklenmiş ve her şey nazıkçe karıştırılmıştır. Avantajlı bir sonuç, kırmızı veya pembe bir halkanın gelişmesidir (Şekil 3.4).

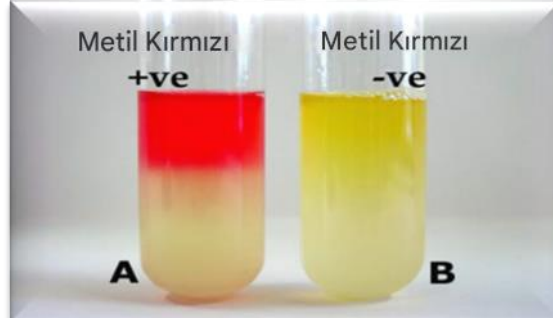


Şekil 3.4 İndol üretim testi

3.7.5 Metil kırmızısı testi

Taze bakteri kültürü Methyl Red-Voges Proskauer broth'a eklenmiş ve ardından 24°C'de 37 saat boyunca kültürlenmiştir. Birkaç damla metil kırmızısı çözeltisi

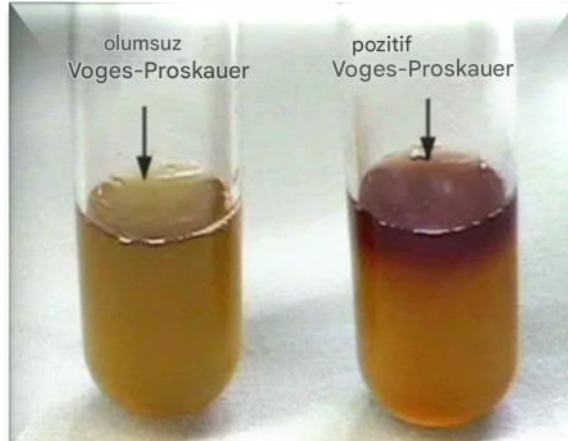
karıştırıldıktan sonra elde edilen parlak kırmızı renk, sonucun başarılı olduğunu göstermiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5 Metil Kırmızısı Testi

3.7.6 Voges-proskauer testi

Taze bakteri kültürü Metil kırmızısı-Voges Proskauer broth ile 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Her tüpe 10 damla %5'lik α -naftol çözeltisi ve 10 damla %40'lık KOH çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra 2 veya 5 dakika içinde pembe bir renk oluşması sonucun pozitif olduğunun göstergesi olarak kabul edilmiştir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6 Voges-proskauer testi

3.8 Bakteriyel Tanımlama Testinin Doğrulanması için Vitek2 Kompakt Sistemi

VITEK 2 sisteminin teknolojisi, geleneksel yaklaşımlar için gereken günlerin aksine saatler içinde gerçekleşen hızlı tanımlama sağlar (Crowley vd. 2012). ADT bakteri tanımlaması için otomatik bir VITEK 2 sistemi (Biomeriueux, Fransa) kullanılmıştır. Bu teknikte bakteriyel inokülasyonun hazırlanması için saf kültürler gereklidir (Tille 2014). GN (Gram Negatif) ve GP (Gram Pozitif) tanımlama için olanlar da dahil olmak üzere çeşitli farklı kart türleri mevcuttur (Maina ve Kagotho 2014). Kart tipi, son kullanma tarihi, lot numarası ve benzersiz kart kimlik numarası hakkında barkodlu bilgiler içeren 64 kuyucuklu bir kart, organizma tanımlaması için VITEK 2 Compact (30 kart kapasiteli) sistemi ve duyarlılık testi için bulanık metrik tekniği tarafından kullanılmıştır.

3.8.1 Test kartı kurulum prosedürü (Kimlik Kartı ve ADT Kartı)

Biomeriueux, Fransa merkezli VITEK2 küçük cihaz sistemi. 64 biyokimyasal teste sahiptir. VITEK2 teknolojisi (Biomeriueux, Fransa), Gram-pozitif bakteriler için (GP-ID kartları) ve Gram-negatif bakteriler için (GN-ID kartları) kullanılarak tam 40 izolat tanımlanmıştır ve doğrulanmıştır.

1. 3,0 mL steril salin (%0,45-%0,5 NaCl, pH 4,5-7,0) şeffaf plastik bir test tüpüne aktarılmıştır.
2. Yeterli miktarda saf bakteri kolonisi steril çubukla hazırlanan salin tüpüne aktarılmıştır. McFarland standardına (0,50 ila 0,63) uyan bir yoğunluğa sahip homojen bir organizma süspansiyonu yapmak Bulanıklığı ölçmek için VITEK 2 DensiCheck Plus kullanılmıştır (Şekil 3.7).
3. ADT-GN kartları için hazırlanan süspansiyonun 145 µl'ünü veya ADT-GP kartları için hazırlanan süspansiyonun 280 µl'ünü 3,0 ml salin içeren ikinci bir tüpe aktarılmıştır. DensiCheck ile optik yoğunluğun kontrol edilmişdaha sonra bu tüp duyarlılık kartının bulunduğu kasete yerleştirilmiştir. İlk bakteri süspansiyonunun bulunduğu tüp, bir tanımlama kartının aşılınması için de kullanılabilir.
4. Kimlik kartı ve tüp, ADT kartı ve tüp kasetin içine yerleştirilmiştir.

5. Aktarma tüpü ve $35,5 \pm 1,0$ °C'deki karusel inkübatöre yerleştirilmeden önce kart mühürlenmiştir. Her kart her 15 dakikada bir karusel inkübatörden çıkarılmıştır. Her kart reaksiyon okumaları için optik sisteme taşınmış ve ardından bir sonraki okuma zamanına kadar inkübatöre geri gönderilmiştir. Kullanılan kaset, kaset bilgileri (Numune Bilgileri, Hasta Bilgileri) iş istasyonu bilgisayarına girilmeden önce cihaza kaydedilmiştir.



Şekil 3.7 VITEK-2 sistemi ile bakteri tanımlama testi

3.9 Bakterilerin Bakımı ve Korunması

a) Kısa süreli bakım

Blood Agar, Mannitol Salt Agar ve MacConkey Agar bakterilerle inoküle edilmiş ve aerobik koşullar altında 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Bunu takiben, plakalar parafilmle sarılmış ve 3-4 gün boyunca 4 °C'de tutulmuştur.

b) Uzun süreli bakım

Steril bir tüp içindeki bir bakteri kültürü kolonisine 5 ml beyin kalp infüzyon suyu gecelik kültürü eklenerek bakteri izolatları birkaç ay boyunca canlı tutulabilir. 37°C'lik

bir inkübasyon süresinin ardından, %25'lik nihai konsantrasyon için inokülasyona 5 ml gliserol eklenmiş ve tüpler daha sonra -20 °C'de 2-8 ay boyunca buzdolabında saklanmıştır.

3.10 Moleküler Çalışmalar

3.10.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

PCR yöntemi, 16S ribozomal RNA genine dayalı bazı bakteriler ve bunların biyofilmle ilgili bazı genleri için kullanılmıştır. Bu teknikte kullanılan PCR primerlerinin tamamı bu çalışmada tasarlanmış ve aşağıdaki adımlar izlenerek gerçekleştirilmiştir:

1. Bakteriyel DNA Ekstraksiyonu.

PrestoTM Mini gDNA Bakteri Kiti kullanılarak bakteriyel izolatlardan genomik DNA elde etmek için şirketin talimatlarına uygun olarak aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- **Örnek Hazırlama:**

Bir ml inkübe edilmiş kültürlenmiş bakteri hücreleri (1×10^9 'a kadar) 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış, ardından 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiş ve süpernatant atılmıştır.

- **Hücre Parçalama Adımları**

a- Tüpe 180 µl GT tamponu eklenmiş ve hücre pelleti vorteks ile süspanse edilmiş, ardından gram pozitif bakteriler için 100 µl lizozim eklenmiş ve karışımlar 60 °C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. Inkübasyon süreleri boyunca karışım tüpleri her 3 dakikada bir ters çevrilmiştir.

- b- Her tüpe 200µl GB tamponu eklenmiş ve 10 saniye boyunca vorteks ile karıştırılmıştır. Daha sonra tüpler 60 °C'de 10 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon süreleri boyunca her 3 dakikada bir tüpler ters çevrilmiştir.

- **DNA bağlama adımları:**

- a- 200 µl mutlak etanol eklenmiş ve hemen vorteks ile karıştırılmış, ardından pipetleme ile çökeltiler kırılmıştır.
- b- b- 2 ml'lik bir toplama tüpüne bir GD kolonu yerleştirilmiş ve tüm karışımlar (herhangi bir çökelti dahil) GD kolonuna aktarılmıştır. Daha sonra 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Akış suyunu içeren 2 ml'lik toplama tüpleri atılmış ve GD kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.

- **Yıkama adımları:**

- a- 400 µl W1 tamponu GD kolonuna eklenmiş, ardından 10000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Akış suyu atılmış ve GD kolonu 2 ml'lik toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.
- b-600 µl Yıkama Tamponu GD kolonuna eklenmiştir. Ardından 10000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Akış suyu atılmış ve GD kolon 2 ml'lik toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir. ve tüpler kolon matrisini kurutmak için 12000 rpm'de 2 dakika daha santrifüj edilmiştir.

- **Elüsyon adımları:**

- a- Kurutulmuş GD kolonu temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve kolon matrisinin merkezine 100 µl önceden ısıtılmış elüsyon tamponu eklenmiştir.

- b- Elüsyon tamponunun matris tarafından emilmesini sağlamak için tüpler en az 3 dakika bekletilmiştir. Ardından saflaştırılmış DNA'yı elüe etmek için 10000 rpm'de 1 dakika santrifüjlenmiştir.

2. Ekstrakte Edilen Toplam DNA'nın Tahmini

Nanodrop (Thermo Scientific NanoDrop Lite UV Visible Spectrophotometer, ABD) kullanarak DNA konsantrasyonunun içeriğini (ng/μL) belirlemek ve DNA'nın kalitesini absorbans (260/280 nm) değerinde değerlendirmek için aşağıdaki adımlar izlenmiştir:

- a. Nanodrop yazılımından uygun uygulama seçilmiştir (Nükleik asit, DNA).
- b. Kuru bir mendil alınmış ve ölçüm kaideleri birkaç kez temizlenmiştir. Ardından 2 μl serbest nükleaz suyu dikkatlice pipetlenmiş ve sistemi boşaltmak için alt ölçüm kaidelerinin yüzeyine yerleştirilmiştir.
- c. Nanodrop örnekleme kolu indirilmiş ve 1μl DNA örneği ölçülmüştür (Şekil 3.8).



Şekil 3.8 Thermo Scientific Nanodrop lite UV Görünür Spektrofotometre

3.10.2 PCR master karışımı hazırlama

Tüm genlerin PCR ana karışım reaksiyonları GoTaq ®Green PCR ana kiti kullanılarak yapılmış ve bu ana karışım Çizelge 3.9'da gösterildiği gibi üreticinin talimatlarına uygun olarak tamamlanmıştır. Daha sonra, tüm PCR tüpleri Exispin vorteks santrifüjüne 3000 rpm'de 3 dakika boyunca aktarılmış ve ardından T100 PCR Thermocycler'a (BioRad-USA) yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.9 Standart PCR ana karışım protokolü

PCR Master karışımı	Hacim
DNA şablonu 5-50ng	5µL
İleri primer (10pmol)	2µL
Revers primer (10pmol)	2µL
GoTaq ®Green PCR master	12,5µL
PCR su	3,5µL
Toplam hacim	25 µL

3.10.3 PCR thermocycler koşulları

Optimase Protocol Writer™ çevrimiçi uygulaması, her gen için PCR termosiklör koşulları protokolünü hesaplamak için kullanılmış ve daha sonra aşağıdaki şekillerdeki formatta geleneksel bir PCR termosiklör kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10 PCR thermocycler koşulları

PCR adımı	Sıcaklık.	Zaman	Tekrar
İlk Denatürasyon	95°C	5 dakika	1
Denatürasyon	95°C	30sn	35 döngü
Bağlama	58°C	30sn	
Uzatma	72°C	1 dakika	
Son uzatma	72°C	5 dakika	1
Bekletme	4°C	∞	∞

3.10.4 PCR ürün analizi

PCR sonuçlarını değerlendirmek için aşağıdaki adımlarda agaroz jel elektroforez yöntemi kullanılmıştır:

- 1- %1,5 Agaroz jel 0,5X TBE kullanılarak hazırlanmış ve 5 dakika boyunca mikrodalgada çözülmüş ve 50°C için soğumaya bırakılmıştır.
- 2- Daha sonra agaroz jel çözeltisine 3 µl etidyum bromür boyası eklenmiştir.
- 3- Agaroz jel solüsyonu, tarak uygun pozisyonda sabitlendikten sonra tepsiye dökülmüş ve oda sıcaklığında 15 dakika katılaşmaya bırakılmış, ardından tarak tepside yavaşça çıkarılmıştır.
- 4- Jel tepsi elektroforez odasında sabitlenmiş ve 0.5X TBE tamponu ile doldurulmuştur.
- İlk kuyucuğa 5 µl (DNA marker Ladder) eklenerek her kuyucuğa 5-10 µl PCR ürünü yüklenmiştir. Daha sonra 1 saat boyunca 100 volt ve 80 AM'de elektrik akımı uygulanmıştır.
- 6- PCR ürünleri UV Transillüminatör kullanılarak görselleştirilmiştir.



Şekil 3.9 PCR çalışmalarından bazı görüntüler

3.10.5 Tetra- ARMS-PCR yöntemi

Hem sağlıklı kontrol örneklerinde hem de biyofilm bakteriyel enfeksiyonu olan hastalarda, TLR4 rs10759932 ve rs12377632 gen polimorfizmini tanımlamak ve

genotiplemek için T-ARMS-PCR yaklaşımı kullanılmıştır. Bu stratejiyi uygulamak için (Rafiei vd. 2012)'ye uygun olarak aşağıdaki aşamalar kullanılmıştır:

1. Genomik DNA Ekstraksiyonu

Geneaid, ABD'den bir gSYAN DNA kiti ekstraksiyon kiti (dondurulmuş kan) kullanılarak kan örneklerinden genomik DNA ekstrakte edilmiştir. Prosedür, üreticinin talimatlarına uygun olarak aşağıdaki adımlar biçiminde gerçekleştirilmiştir:

- a- 200 µl dondurulmuş kan steril 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve ardından 30 µl proteinaz K eklenerek vorteks ile karıştırılmıştır. 5 dakika boyunca 60°C 'de inkübe edilmiştir.
- b- Bundan sonra, her tüpe 200 µl lizis tamponu GSB eklenmiş ve vorteksle kuvvetlice karıştırılmış ve ardından tüm tüpler 70°C adresinde 10 dakika inkübe edilmiş ve inkübasyon süreleri boyunca her 3 dakikada bir ters çevrilmiştir.
- c- Lizata 200 µl mutlak etanol eklenmiş ve hemen kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmıştır.
- d- DNA filtre kolonu 2 ml'lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş ve karışımın tamamı (herhangi bir çökelti dahil) kolona aktarılmıştır. Daha sonra 10000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Ardından akışı içeren 2 ml'lik toplama tüpü içinden alınmış ve kolon yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirilmiştir.
- e- DNA filtre kolonuna 400µl W1 tamponu eklenmiş, ardından 30 saniye boyunca 10000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Akış içinden alınmış ve kolon 2 ml'lik toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.
- f- Her bir kolona 600 µl Yıkama Tamponu (etanol) eklenmiştir. Daha sonra 10000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilmiştir. Akış içinden alınmış ve kolon 2 ml'lik toplama tüpüne geri yerleştirilmiştir.
- g- Kolon matrisini kurutmak için tüm tüpler 10000 rpm'de 3 dakika boyunca tekrar santrifüjlenmiştir.

- h- Kurutulmuş DNA filtre kolonu temiz bir 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne aktarılmış ve kolon matrisinin merkezine 50 µl önceden ısıtılmış elüsyon tamponu eklenmiştir.
- i- Elüsyon tamponunun matris tarafından emilmesini sağlamak için tüpler en az 5 dakika bekletilmiştir. Ardından saflaştırılmış DNA'yı elüe etmek için 30 saniye boyunca 10000 rpm'de santrifüjlenmiştir.

2. Genomik DNA tahmini

Bir Nanodrop spektrofotometre (THERMO ABD) kullanılarak, ekstrakte edilen kan genomik DNA'sı incelenmiştir. DNA saflığını belirlemek ve DNA konsantrasyonunu (ng/µL) ölçmek için 260/280 nm'deki absorbans değerleri okunmuştur. Prosedürler aşağıdaki gibidir:

1. Nanodrop yazılımını açtıktan sonra uygun uygulamayı seçilmiştir (Nükleik asit, DNA).
2. Kuru bir mendil alınmış ve ölçüm kaideleri birkaç kez temizlenmiştir. Ardından, sistemi boşaltmak için alt ölçüm kaidelerinin yüzeyine dikkatlice 2µl serbest nükleaz suyu pipetlenmiştir.
3. Örnekleme kolu indirilmiş ve Nanodrop'u başlatmak için Tamam'a basılmış, ardından kaideler temizlenmiş ve ölçüme 1 µl kan genomik DNA eklenmiştir.

3.10.6 T-ARMS-PCR ana karışımının hazırlanması

T-ARMS-PCR ana karışımı (GoTaq® G2 Green Master Mix kiti) kullanılarak yapılmış ve aşağıdaki tablolarda gösterildiği gibi şirketin talimatlarına göre her numune için iki reaksiyonda kullanılmıştır:

1- TLR4 rs10759932 T-ARMS-PCR reaksiyon Karışımı:

T-ARMS-PCR Ana karışımı	Hacim
DNA şablonu	5µl
İleri iç primer (T aleli) (10pmol)	1µl
Ters iç primer (C aleli) (10pmol)	1µl
İleri dış primer (10pmol)	1µl
Ters dış primer (10pmol)	1µl

G2 Yeşil Ana Karışım	12.5µl
Nükleaz içermeyen su	3.5µl
Toplam hacim	25µl

2- TLR4 rs12377632 ARMS-PCR reaksiyon Karışımı:

T-ARMS-PCR Ana karışımı	Hacim
DNA şablonu	5µl
İleri iç primer (T aleli) (10pmol)	1µl
Ters iç primer (C aleli) (10pmol)	1µl
İleri dış primer (10pmol)	1µl
Ters dış primer (10pmol)	1µl
G2 Yeşil Ana Karışım	12.5µl
Nükleaz içermeyen su	3.5µl
Toplam hacim	25µl

Yukarıdaki tabloda listelenen PCR ana karışım bileşenleri daha sonra bir Exispin vorteks santrifüje konmuş ve 3000 rpm'de üç dakika döndürülmüştür. Daha sonra PCR termosiklörüne (BioRad USA) konulmuştur.

3.10.7 PCR thermocycler koşulları

Aşağıdaki tablolarda her bir gen için ayrı ayrı PCR termosiklörü koşulları gösterilmektedir:

1- TLR4 rs10759932 için PCR thermocycler koşulları

PCR adımı	Sıcaklık.	Zaman	Tekrar
İlk denatürasyon	95°C	5 dakika.	1
Denatürasyon	95°C	30 saniye.	35döngü
Tavlama	60°C	30 saniye.	
Uzatma	72°C	30 saniye.	
Son uzatma	72°C	5 dakika	1
Bekletme	4°C	Süresiz	-

2- TLR4 rs12377632 için PCR thermocycler koşulları

PCR adımı	Sıcaklık.	Zaman	Tekrar
İlk denatürasyon	95°C	5 dakika.	1

Denatürasyon	95°C	30 saniye.	35döngü
Tavlama	55°C	30 saniye.	
Uzatma	72°C	1 dakika.	
Son uzatma	72°C	5 dakika	1
Bekletme	4°C	∞	∞

3.10.8 T-ARMS-PCR ürün analizi

T-ARMS-PCR ürünlerini agaroz jel elektroforezi kullanarak incelemek için aşağıdaki prosedür kullanılmıştır:

- 1- %2 Agaroz jel 1X TBE kullanılarak hazırlanmış ve 100 °C adresindeki su banyosunda 15 dakika boyunca çözüldükten sonra 50°C adresinde soğumaya bırakılmıştır.
 - 2- Daha sonra agaroz jel çözeltisine 3 µl etidyum bromür boyası eklenmiştir.
 - 3- Agaroz jel solüsyonu, tarak uygun pozisyonda sabitlendikten sonra tepsiye dökülmüş, oda sıcaklığında 15 dakika katılaşmaya bırakılmış, daha sonra tarak tepside yavaşça çıkarılmıştır.
 - 4-Jel tepsisi elektroforez odasında sabitlenmiş ve 1X TBE tamponu ile doldurulmuştur.
- Her bir tarak kuyucuğuna 5-10 µl PCR ürünü ve ilk kuyucuğa 3 µl (100bp ladder) eklenmiştir.
- 7-Elektrik akımı 100 volt ve 80 mA'de 1 saat süreyle gerçekleştirilmiştir.
 - 8-T-ARMS-PCR ürünleri UV transillüminatör kullanılarak görselleştirilmiştir.

3.11 İstatistiksel Analiz

Veriler, Sosyal Bilimler için İstatistik Paketi (SPSS) v2- Microsoft Office Excel 2010 kullanılarak toplanmış, özetlenmiş, analiz edilmiş ve sunulmuştur. Sayısal veriler, Kolmogorov-Smirnov normallik testi yapıldıktan ve normal ve normal dağılmayan değişkenler hakkında karar verildikten sonra ortalama, standart sapma olarak sunulmuştur. Bağımsız örneklem T-testi, değişkenin normal dağılması koşuluyla

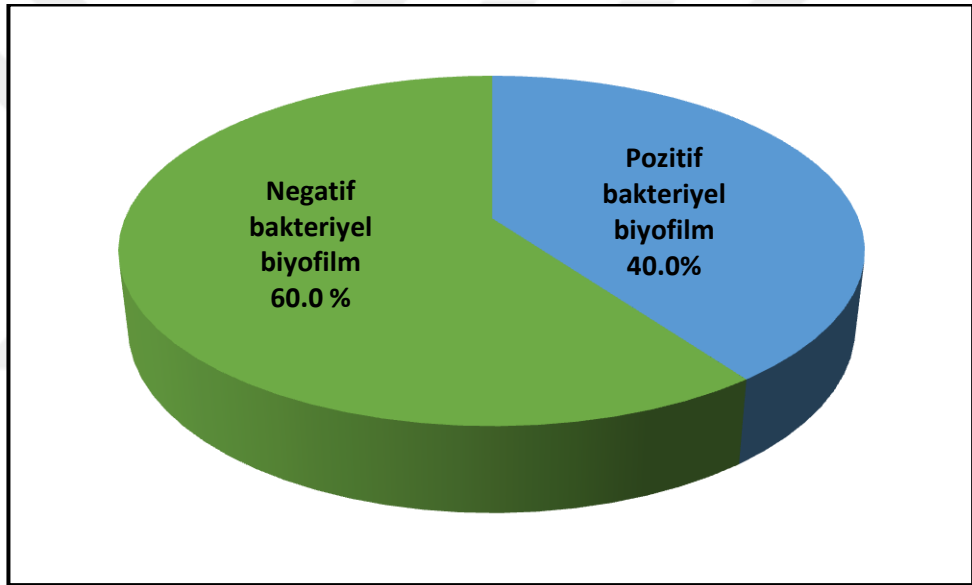
herhangi iki grup arasındaki ortalama farkını incelemek için kullanılmıştır. Tek yönlü Anova testi, değişkenin normal dağılması koşuluyla ikiden fazla grup arasındaki ortalama farkını incelemek için kullanılmıştır. Herhangi iki kategorik değişken arasındaki ilişkiyi incelemek için Ki-kare testi kullanılmıştır. Riski ölçmek için odds oranı ve %95 güven aralığı hesaplanmıştır. Anlamlılık düzeyi 0.05'ten küçük P-değeri ve 0.01 veya daha küçük yüksek anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir (Daniel, 2009).



4. BULGULAR

4.1 Bakteri İzolasyonu

Bakteriyel biyofilm enfeksiyonu olduğundan şüphelenilen 250 numuneyi içeren vaka kontrol çalışması, Haziran 2023 ile Aralık 2023 tarihleri arasında, yaşları (10 ila 45) arasında değişen, Irak'ın güneyindeki Thi-Qar Valiliği'nde, Al-Rifai Genel Hastanesi'nde toplanmıştır. Mevcut sonuçlar, Şekil 4.1'de gösterildiği gibi 100 (%40,0) numunenin bakteriyel biyofilm oluşumu açısından pozitif olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1 Örneklerin bakteriyel biyofilm oluşum yüzdesi

4.1.1 Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların ve sağlıklı kontrol bireylerinin demografik özellikleri

Pozitif bakteriyel biyofilm içeren örneklerin izolasyonundan sonra, bu çalışmada bakteriyel biyofilm içeren hastaların ve kontrol deneklerinin demografik özellikleri araştırılmış ve sonuçlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir. Bakteriyel biyofilmi pozitif olan hastaların yaş ortalaması 28.24 ± 8.51 , kontrol grubunun yaş ortalaması ise 25.64 ± 6.17 olup, hastalar ve kontrol grubu arasında yaş ortalaması açısından anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P = 0.083$). Yine hasta ve kontrol grubunun yaşa göre tür dağılımında

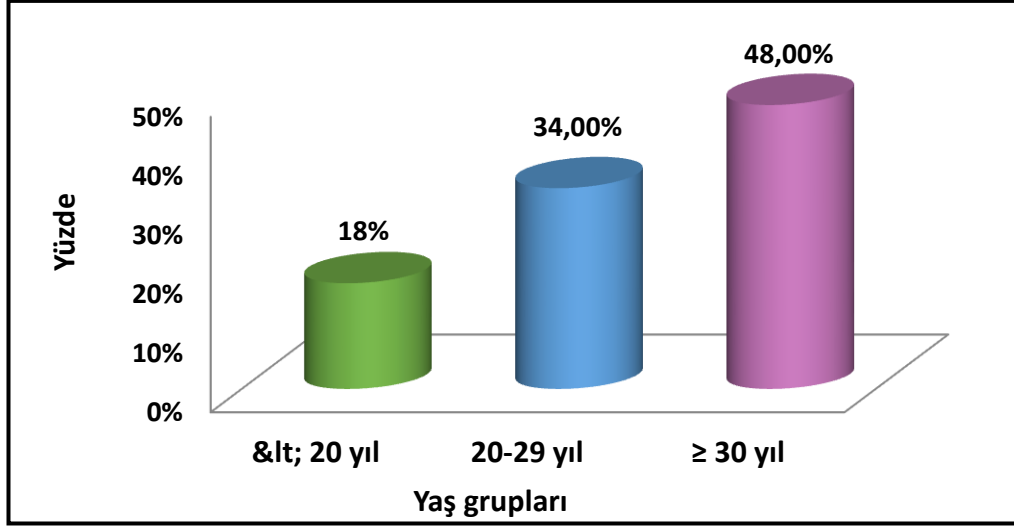
da anlamlı bir fark bulunmamıştır ($P = 0.081$). Öte yandan, mevcut sonuçlar, bu çalışmaya kaydedilen pozitif bakteriyel biyofilmli hastaların çoğunun 30 yaş üstü grupta yer aldığını göstermektedir (Şekil 4.2).

Cinsiyet açısından, hasta grubunda 40 (%40,0) erkek ve 60 (%60,0) kadın bulunurken, kontrol grubunda 54 (%54,0) erkek ve 46 (%46,0) kadın bulunmaktadır (Şekil 4.3). Hasta ve kontrol olgularının cinsiyete göre tür dağılımında anlamlı bir fark yoktur ($P = 0,161$). Mevcut sonuçlara göre, bu çalışmaya dahil edilen pozitif bakteriyel biyofilmli hastaların çoğu kadındır. İkamet yerine göre, hasta grubu kentsel bölgelerden 60 (%60,0) ve kırsal bölgelerden 40 (%40,0) olgudan oluşurken, kontrol grubu kentsel bölgelerden 70 (%70,0) ve kırsal bölgelerden 30 (%30,0) olgudan oluşmaktadır ve ikamet yerine göre hasta ve kontrol olgularının tür dağılımında anlamlı bir fark yoktur ($P = 0.295$). Yukarıdaki sonuçlar, bu tür bir vaka kontrol çalışması için ön koşul olan yaş, cinsiyet ve ikametgah açısından hasta grubu ile kontrol grubu arasında istatistiksel eşleşme sağlamıştır.

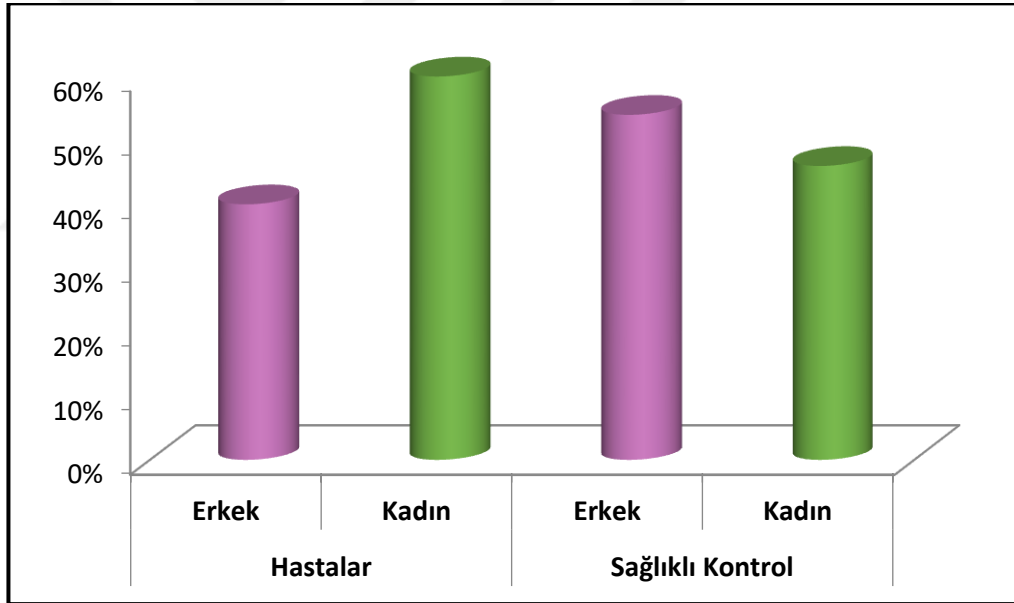
Çizelge 4.1 Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların ve sağlıklı kontrol bireylerinin demografik özellikleri

Karakteristik	Hastalar ile biyofilm bakterileri $n = 100$	Sağlıklı kontrol $n = 100$	P
Yaş (yıl)			
Ortalama $\pm$ SD	28.24 $\pm$ 8.51	25.64 $\pm$ 6.17	0.083
Menzil	10- 45	16 -42	† NS
< 20, n (%)	18 (18.0%)	14 (14.0%)	0.081
20-29, n (%)	34 (34.0%)	56 (56.0%)	¥
≥ 30 , n (%)	48 (48.0%)	30 (30.0%)	NS
Cinsiyet			
Erkek, n (%)	40 (40.0 %)	54 (54.0 %)	0.161
Kadın, n (%)	60 (60.0%)	46 (46.0%)	¥ NS
İkamet			
Kentsel, n (%)	60 (60.0 %)	70 (70.0 %)	0.295
Kırsal, n (%)	40 (40.0%)	30 (30.0%)	¥ NS

n : vaka sayısı; SD: standart sapma; †: bağımsız örneklem t-testi; ¥: Ki-kare testi; S: $P < 0.05$ düzeyinde anlamlı; NS: $P > 0.05$ düzeyinde anlamlı değil



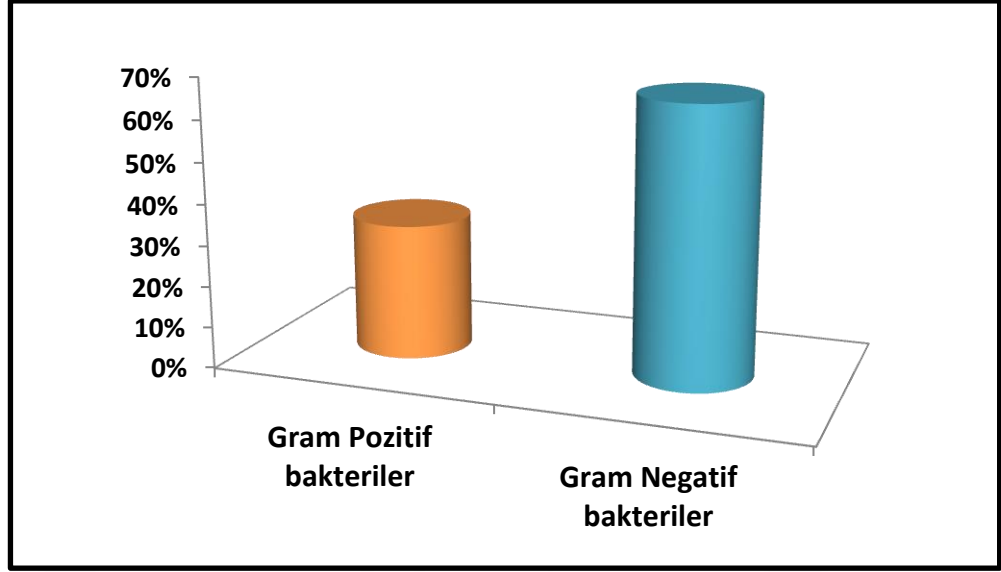
Şekil 4.2 Hastaların yaş gruplarına göre dağılımı



Şekil 4.3 Hasta ve kontrol grubunun cinsiyete göre dağılımı

4.2 Gram Pozitif ve Gram Negatif Biyofilm Oluşturan Enfeksiyon Bakterilerinin Gram Boyasına Göre Tür Dağılımı

Gram pozitif ve gram negatif bakterilerin gram boyasına göre tür dağılımı Şekil 4.4'te gösterilmiştir. Mevcut sonuçlar, bakteri izolatlarının 34'ünün (%34.0) gram pozitif bakteri ve 66'sının (%66,0) gram negatif bakteri olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.4 Gram boyamaya göre biyofilm oluşturan enfeksiyon bakterilerinin yüzdeleri

4.3 Otomasyon Tanımlama

VITEK-2 sistemi, üreticinin talimatlarına göre ID-Gram pozitif kokların (ID-GP kartları) ve ID-Gram negatiflerin (ID-GN kartları) otomatik olarak tanımlanması için kullanılmıştır. VITEK-2 ID-GP kartı 124 *stafilokok*, *streptokok*, *enterokok* türünü ve seçkin bir gram pozitif organizma grubunu 8 saat veya daha kısa bir süre içinde tanımlamaktadır. VITEK-2 ID-GN kartı 10 saat içinde 154 Enterobacteriaceae türünü ve glikoz fermente etmeyen gram negatif organizmaların seçkin bir grubunu tanımlar. VITEK-2 sisteminin sonuçları, seçilmiş bir organizma olarak bakteri türleri için olasılıkla (%98-99) pozitif sonuç teyidi vermiştir. Mevcut çalışmada sonuçlar 36 (%36,0) *Escherichia coli*, 22 (%22,0) *Staphylococcus epidermidis*, 12 (%12,0) *Staphylococcus aureus*, 16 (%16,0) *Klebsiella pneumoniae* ve 14 (%14,0) *Proteus mirabilis* şeklindedir.

4.3.1 Klinik örnekler arasında bakteri izolatlarının dağılımı

Klinik numuneler arasında biyofilm bakteriyel izolatlarının tür dağılımı Çizelge 4.2'te gösterilmiştir

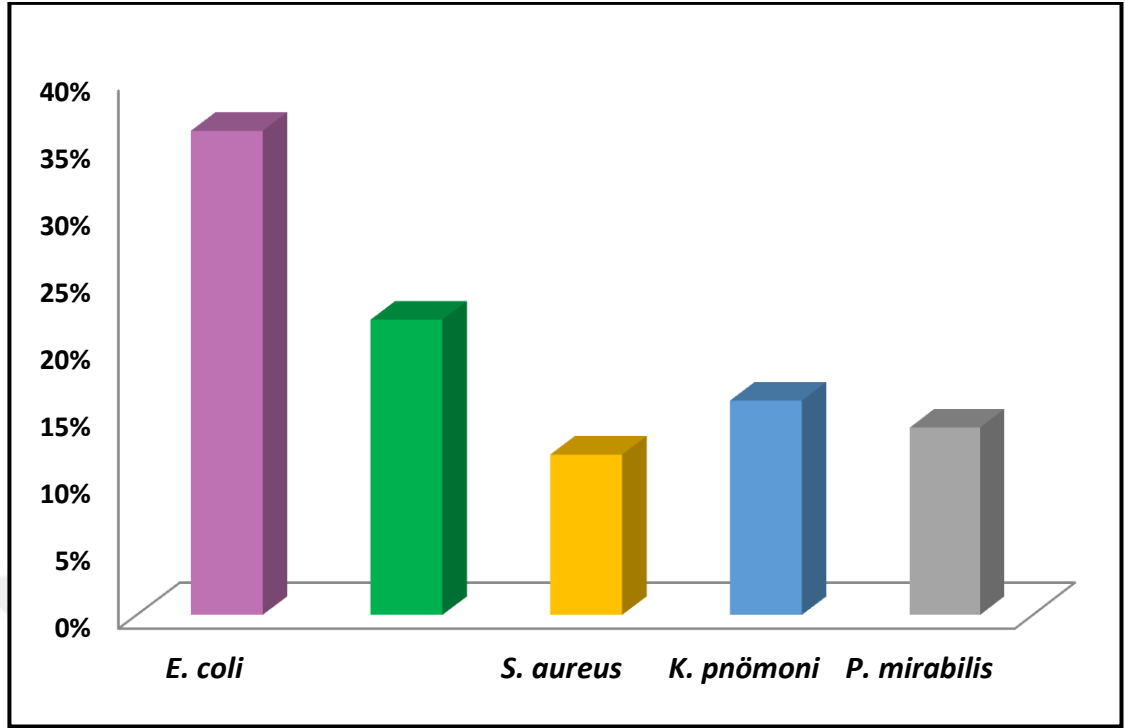
Çizelge 4.2 Klinik örnekler arasında bakteri izolatlarının dağılımı

<i>Türler</i>	<i>Örnek türü</i>	<i>İzolat sayısı</i>	<i>%</i>
<i>E. coli</i>	İYE	22	22.0%
	Kulak çubuğu	4	4.0%
	Boğaz sürüntüsü	6	6.0%
	Yara temizleme çubuğu	4	4.0%
<i>S.epidermidis</i>	İYE	12	12.0%
	Yara temizleme çubuğu	10	10.0%
<i>S. aureus</i>	İYE	6	6.0%
	Boğaz sürüntüsü	2	2.0%
	Kulak çubuğu	2	2.0%
	Yara temizleme çubuğu	2	2.0%
<i>P. mirabilis</i>	İYE	10	10.0%
	Kulak çubuğu	4	4.0%
<i>K. pneumoniae</i>	İYE	4	4.0%
	Kulak çubuğu	6	6.0%
	Boğaz sürüntüsü	6	6.0%

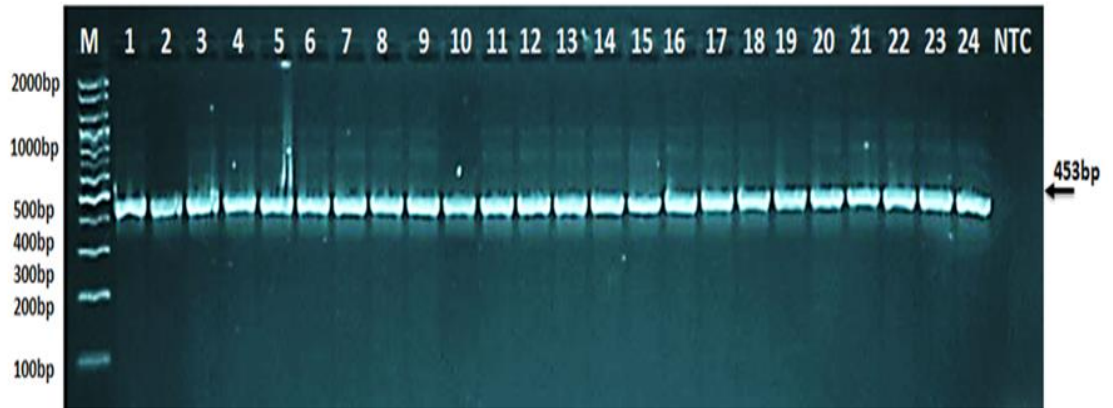
4.4 Moleküler Tanı

4.4.1 Bakteriyel izolasyonun moleküler tanısı

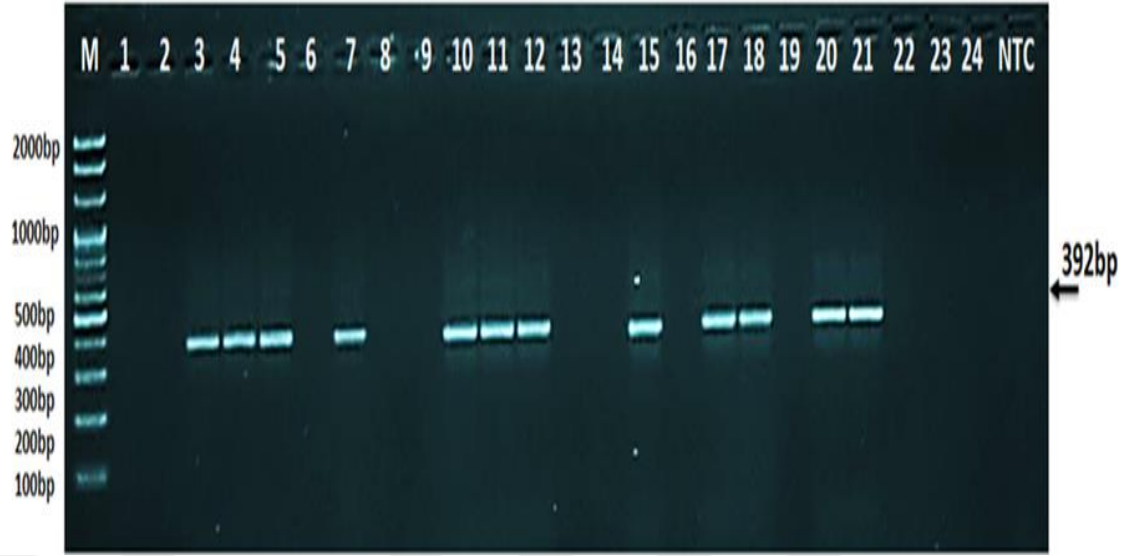
Bakteriyel biyofilm enfeksiyonu olan hastaların farklı bakteri türlerinin 16S rRNA genlerinin tespiti için yapılan PCR sonuçlarına göre tür dağılımı, Şekil 4.5'te gösterilmiştir. Mevcut sonuçlar, *Escherichia coli*'nin tespiti için 16S ribozomal RNA geninin 36 (%36.0) hastada rapor edildiğini Şekil 4.6'da; *S. epidermidis*'in tespiti için 16S ribozomal RNA geni 22 (%22.0) Şekil 4.8'de; *S. aureus*'u tespit etmek için 16S ribozomal RNA geni 12 (%12,0) Şekil 4.10'da; *K. pneumonia*'yı tespit etmek için 16S ribozomal RNA geni 16 (%16,0) ve *P. mirabilis* sırasıyla 14 (%14,0) Şekil 4.6, Şekil 4.7, Şekil 4.8, Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13, Şekil 4.14, Şekil 4.15'te gösterilmiştir.



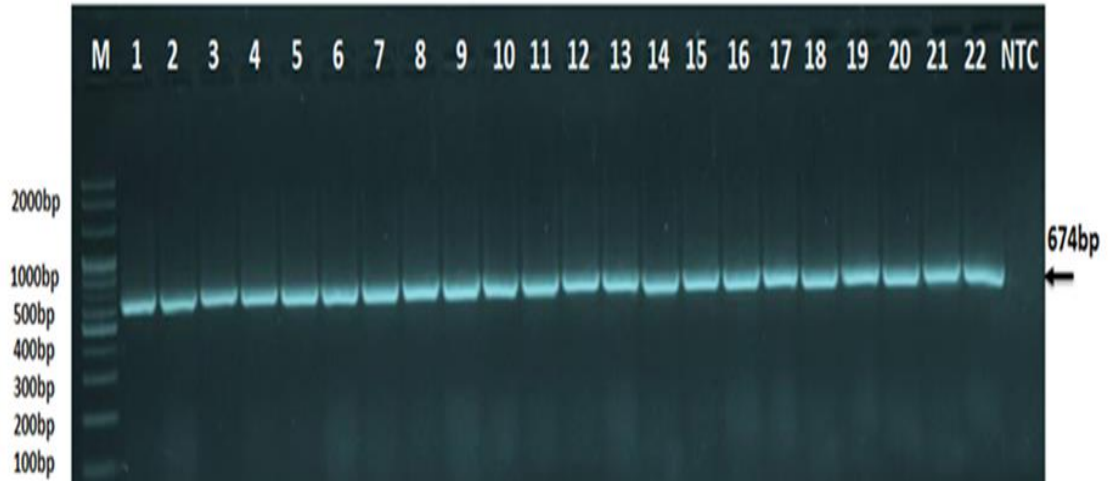
Şekil 4.5 Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonunun PCR tanısı yüzdeleri



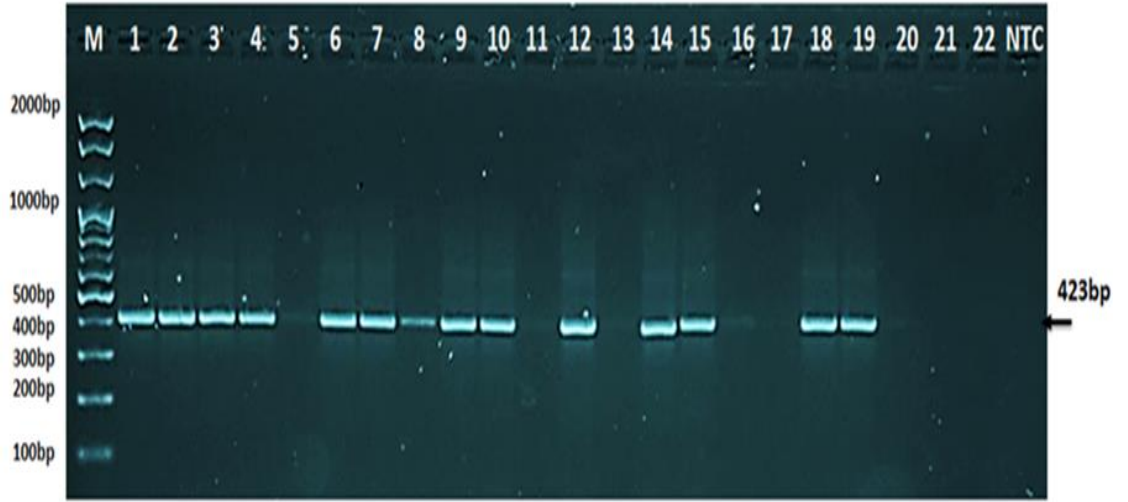
Şekil 4.6 *Escherichia coli* izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. M (Marker ladder 2000-100bp). Şerit (1-24) 453bp ürün boyutunda pozitif *Escherichia coli* izolatları 16S ribozomal RNA genini göstermektedir. NTC: negatif kontrol



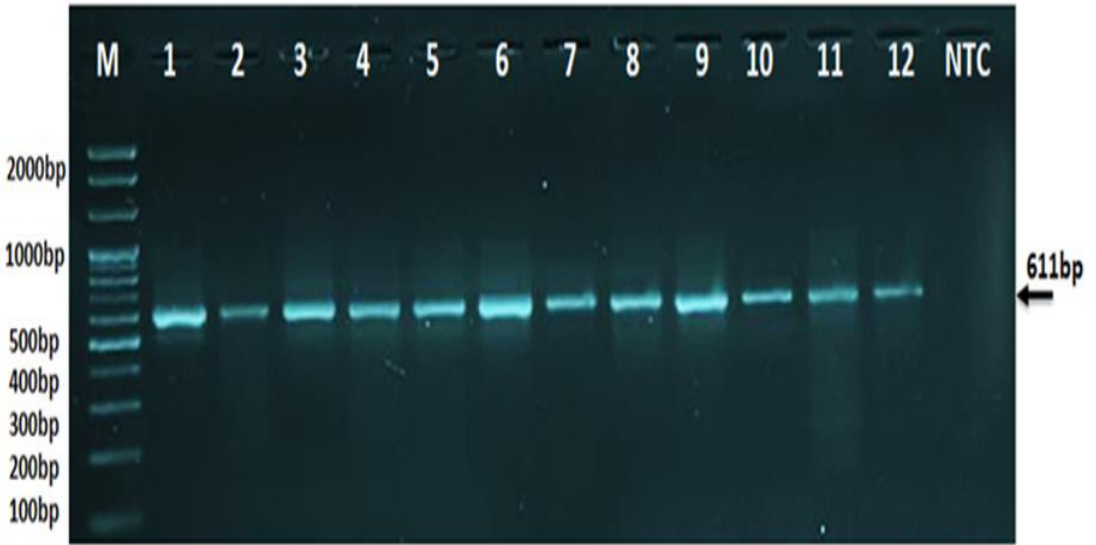
Şekil 4.7 *Escherichia coli* izolatlarında virülans faktörü biyofilm ile ilişkili (*FimH*) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü. M (İşaretleyici merdiveni 2000-100bp). Şerit (1-24) 392bp ürün boyutunda bazı pozitif *Escherichia coli* izolatları *FimH* genini göstermektedir. NTC: negatif kontrol



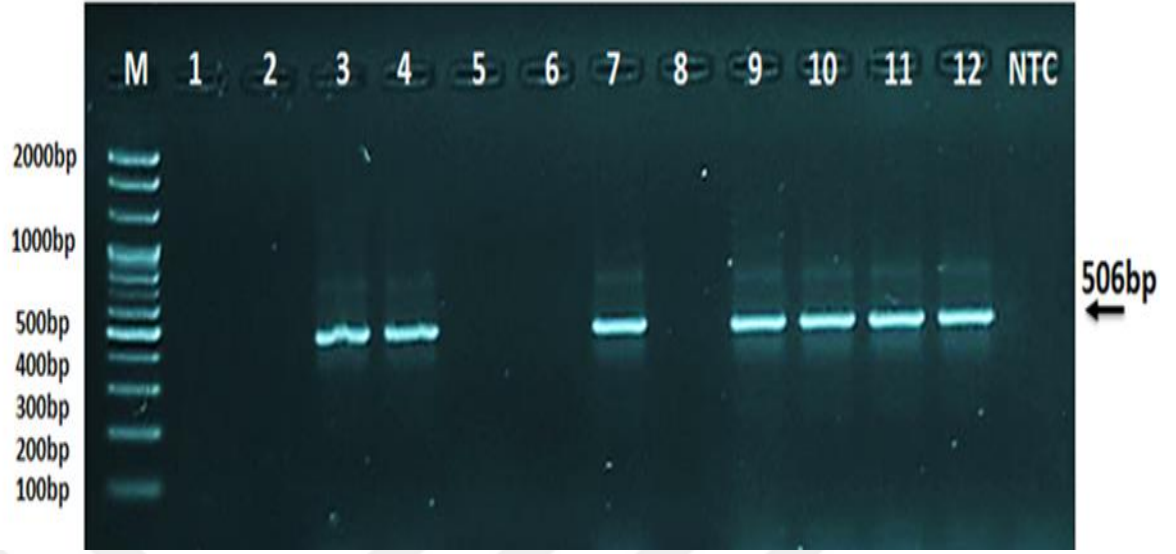
Şekil 4.8 *Staphylococcus epidermidis* izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.



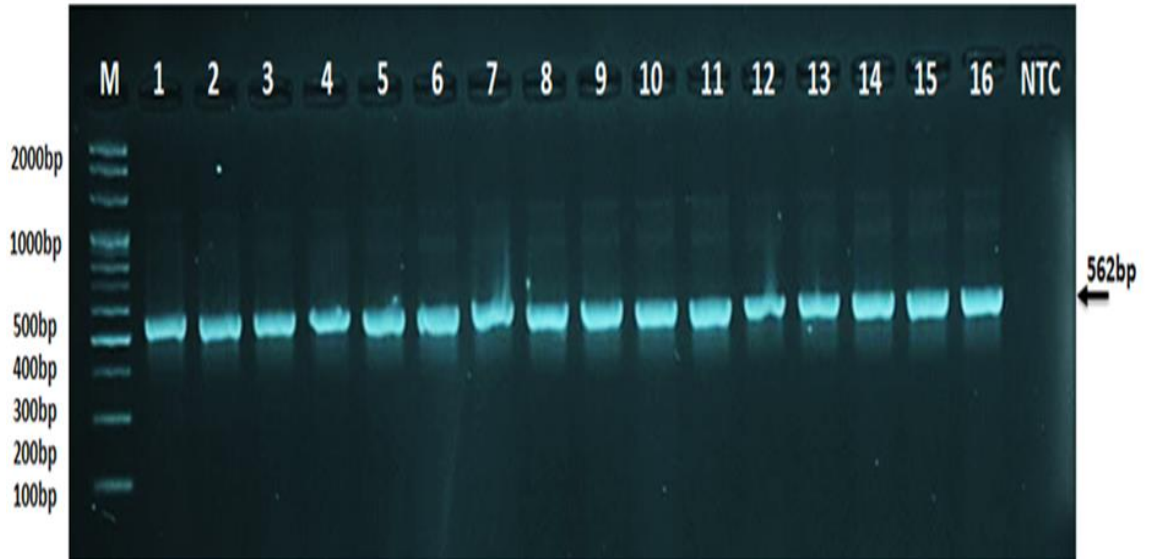
Şekil 4.9 *Staphylococcus epidermidis* izolatlarında virülans faktörü biyofilm oluşumu (icaA) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.



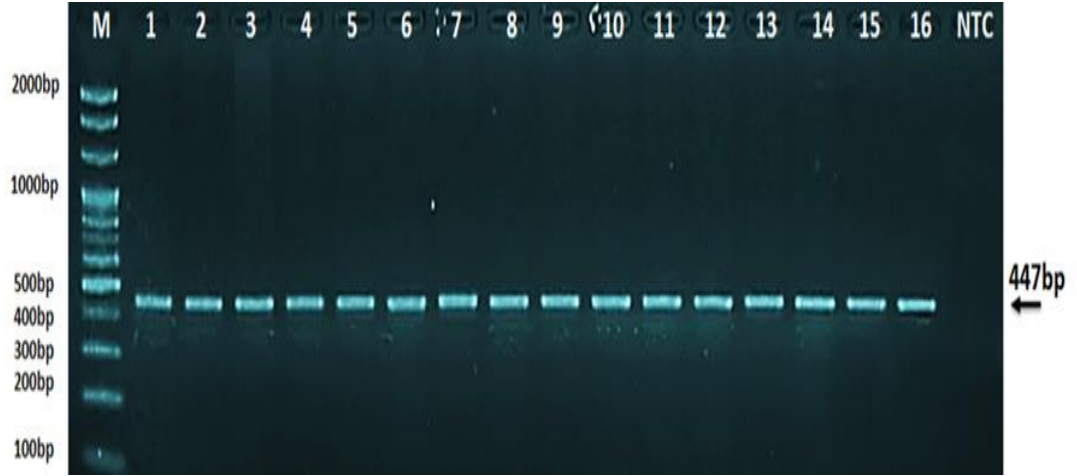
Şekil 4.10 *Staphylococcus aureus* izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.



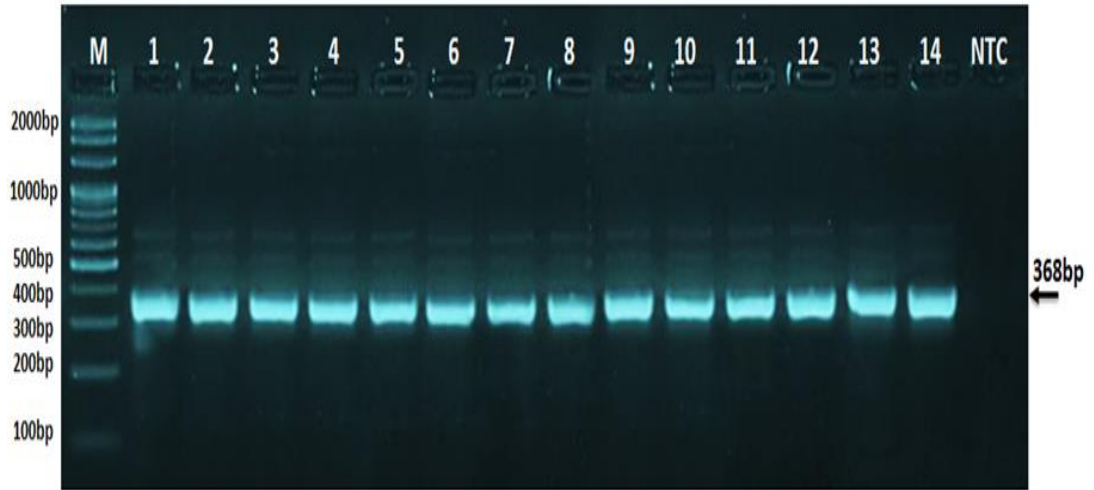
Şekil 4.11 *Staphylococcus aureus* izolatlarında virülans faktörü biyofilm oluşumu (ica) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.



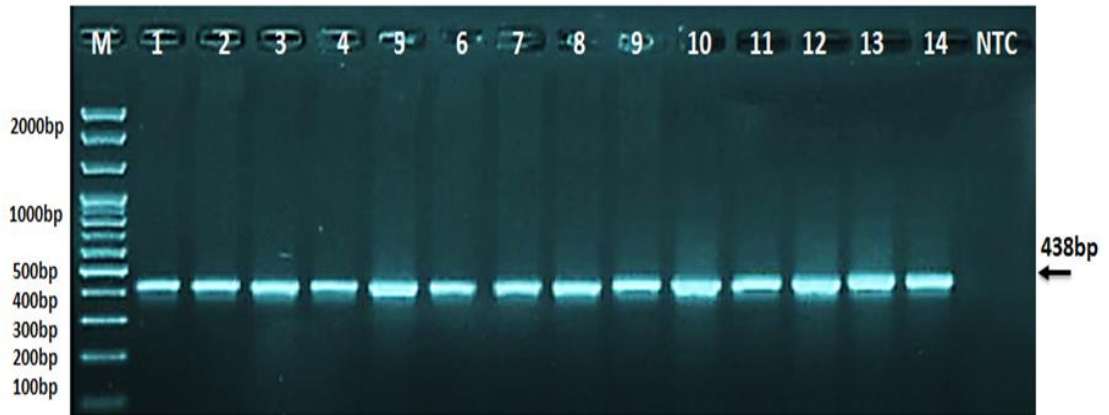
Şekil 4.12 *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.13 *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında virülans faktörü biyofilm ile ilişkili (*FimH*) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.



Şekil 4.14 *Proteus mirabilis* izolatlarının tespiti için 16S ribozomal RNA geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.

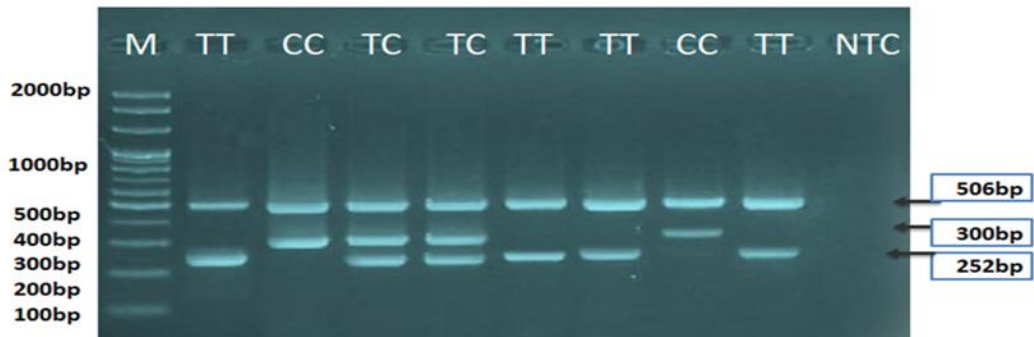


Şekil 4.15 *Proteus mirabilis* izolatlarında virülans faktörü biyofilm oluşumu (mrpA) geninin PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü

4.5 Gen Polimorfizmlerinin Tespiti

4.5.1 TLR4-rs10759932 polimorfizminin tespiti

TLR4-rs10759932 polimorfizminin dağılımı ARMS-PCR tekniği ile tespit edilmiştir. Bu lokusta TT, TC ve CC olmak üzere üç genotip vardır. Yabani tip homozigot genotip 252bp ürün boyutunda sadece T aleli amplifikasyonu göstermiştir. Mutant tip homozigot genotip sadece 300bp ürün boyutunda C aleli amplifikasyonu göstermiştir. Heterozigot genotipte ise T ve C alelleri sırasıyla 252bp ve 300bp ürün boyutunda amplifikasyon göstermiştir. Dış iç kontrol 506bp T-ARMS-PCR ürününde gözlenmiştir (Şekil 4.16).



Şekil 4.16 TLR4-rs10759932 gen polimorfizmi için T-ARMS-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.

a) Hardy Weinberg denklemi

TLR4-rs10759932 genotiplerinin, TT, TC ve CC, kontrol grubu içindeki dağılımına Hardy Weinberg denklemi uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.3'te gösterilmiştir. Homozigot yabani TT genotipine 100 kontrolün 65'inde rastlanmıştır; heterozigot TC genotipi 100 kontrolün 26'sında ve homozigot mutant CC genotipi 100 kontrolün 9'unda görülmüştür (Çizelge 4.3). Kontrol deneklerinin TLR4-rs10759932 genotiplerine göre gözlenen dağılımı beklenenden oldukça farklıdır ($P = 0.053$).

Çizelge 4.3 TLR4-rs10759932 Hardy Weinberg denklemi

Genotipler	Gözlemlenen	Beklenen	χ^2	P
Homozigot referans TT	65	60.8	5.877	0.053
Heterozigot TC	26	34.3		¥
Homozigot varyant CC	9	4.8		NS

¥: Ki-kare testi; NS: P 'de anlamlı değil >0.05

b) Hastalarda ve sağlıklı kontrollerde incelenen gen için genotipik ve alel analizleri

TLR4-rs10759932 SNP'ye ilişkin genotip ve alel frekanslarının hastalar ve sağlıklı kontrol grubu arasındaki karşılaştırması Çizelge 4.4'te gösterilmiştir. Eş baskın mod ile ilgili olarak, hasta ve kontrol grupları arasında genotiplerin frekans dağılımında anlamlı farklılık vardır ($P = 0.001$). Risk analizi homozigot CC genotipinin önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur ($OR = 9.88$).

Bu da homozigot CC genotipine sahip hastaların diğer genotiplere sahip hastalara kıyasla hastalık geliştirme olasılığının yaklaşık on kat daha fazla olduğu anlamına gelmektedir. Dominant mod analizi ve resesif mod ile ilgili olarak, hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark vardır ($P < 0.05$). Alel analizi açısından da hastalar ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark vardır ($P = 0.001$).

Çizelge 4.4 Hastalarda ve sağlıklı kontrolde TLR4-rs10759932 poli genotip sıklığı.

Mod	TLR4 (rs10759932)	Hastalar n = 100	Kontrol n = 100	P	VEYA	95% CI
Eş baskın	CC	52 (52.0%)	9 (9.0 %)	0.001 ¥S	9.88	4.38-22.28
	T/C	10 (10.0%)	26 (26.0 %)		0.65	0.28 -1.51
	TT	38 (38.0 %)	65 (65.0 %)		Referans	
Baskın	CC+ T/C	62 (62.0 %)	35 (35.0 %)	0.001 ¥S	Referans	
	TT	38 (38.0 %)	65 (65.0 %)		0.33	0.18-0.58
Çekinik	CC	52 (52.0%)	9 (9.0 %)	0.001 ¥S	10.95	4.97-24.12
	T/C +TT	48 (48.0%)	91 (91.0%)		Referans	
Aleller	C	114 (57.0%)	44 (22.0%)	0.001 ¥S	4.70	3.03-7.27
	T	86 (43.0%)	156 (78.0%)		Referans	

c) Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastalarda sosyo-demografik özelliklere göre ARMS-PCR bulguları arasındaki karşılaştırma

Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların sosyo-demografik özelliklerinin frekans dağılımının ARMS-PCR sonuçlarına göre karşılaştırılması Çizelge 4.5'de gösterilmiştir. Yaş ortalaması, TT genotipine sahip hastalarda $26,84 \pm 7,79$, TC genotipine sahip hastalarda $29,60 \pm 6,23$ ve CC genotipine sahip hastalarda ise $29,00 \pm 7,34$ 'tür. Yaş ile ARMS-PCR sonuçları arasında hem frekans ($P= 0,630$) hem de yaş ortalaması ($p= 0,664$) açısından anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ayrıca cinsiyet ile ARMS-PCR sonuçları arasında da anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($p = 0.093$).

Çizelge 4.5 Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların sosyo-demografik özelliklerinin frekans dağılımının ARMS-PCR sonuçlarına göre karşılaştırılması

Karakteristik	TT genotipi n = 38	TC genotipi n = 10	CC genotipi n = 52	P
Yaş				
Ortalama ± SD	26.84 ± 7.79	29,60± 6,23	29,00± 7,34	0.664 †NS
< 20, n (%)	6 (15.8%)	2 (20.0%)	10 (19.2%)	0.630 ¥NS
20-29, n (%)	18 (47.4%)	2 (20.0%)	14 (26.9%)	
≥ 30, n (%)	14 (36.8%)	6 (60.0%)	28 (53.9%)	
Cinsiyet				
Erkek, n (%)	8 (21.0%)	6 (60.0%)	26 (50.0%)	0.093 ¥ NS
Kadın, n (%)	30 (79.0%)	4 (40.0%)	26 (50.0 %)	

n: vaka sayısı; SD: standart sapma; †: Anova testi; ¥: Ki-kare testi; NS: P'de anlamlı değil <0.05.

d) Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastalarda ikamet yerine göre ARMS-PCR bulgularının karşılaştırılması

Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların ikametgah özelliklerinin ARMS-PCR sonuçlarına göre frekans dağılımının karşılaştırılması Çizelge 4.6'de gösterilmiştir. Mevcut sonuçlar ikametgah ile ARMS-PCR sonuçları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir ($p = 0.111$).

Çizelge 4.6 ARMS-PCR sonuçlarına göre bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların ikamet sıklığı dağılımının karşılaştırılması

Karakteristik	TT genotipi n = 38	TC genotipi n = 10	CC genotipi n = 52	P
İkamet				
Kentsel, n (%)	16 (42.1%)	6 (60.0%)	38 (72.1%)	0.111 ¥ NS
Kırsal, n (%)	22 (57.9%)	4 (40.0%)	14 (26.9%)	

n: vaka sayısı; ¥: Ki-kare testi; NS: P'de anlamlı değil <0.05 .

e) Bakteri türlerine göre genotip frekans dağılımı

Genotipin bakteri türlerine göre frekans dağılımı Çizelge 4.7'te gösterilmiştir. Mevcut sonuçlar, bakteri türleri ile ARMS-PCR sonuçları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir ($p = 0.532$).

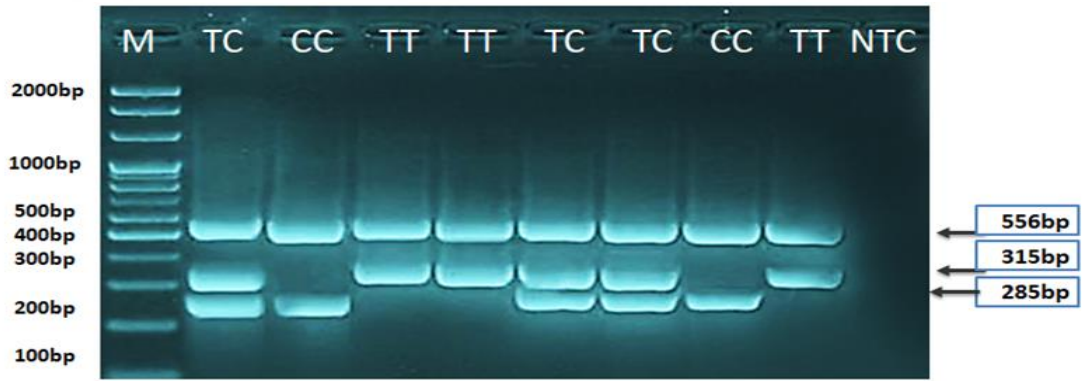
Çizelge 4.7 Genotip frekans dağılımının bakteri türlerine göre karşılaştırılması

Karakteristik	Bakteri türleri					P
	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pnömoni</i>	<i>P. mirabilis</i>	
Genotip						
GG, n (%)	14 (38.8%)	6 (27.3%)	4 (33.3%)	4 (28.6%)	10 (62.5%)	0.532 ¥ NS
GC, n (%)	2 (5.6%)	2 (9.1%)	0	4 (28.6%)	2 (12.5%)	
CC, n (%)	20 (55.6%)	14 (63.4%)	8 (66.7%)	6 (42.8%)	4 (25.0%)	

n: vaka sayısı; ¥: ki-kare testi; NS: $p > 0.05$ 'te anlamlı olmayan

4.5.2 TLR4-rs12377632 polimorfizminin tespiti

TLR4-rs12377632 Polimorfizminin dağılımı ARMS-PCR tekniği ile tespit edilmiştir. Bu lokusta TT, TC ve CC olmak üzere üç genotip vardır. Yabani tip homozigot genotip 315bp ürün boyutunda sadece T aleli amplifikasyonu göstermiştir. Mutant tip homozigot genotip sadece 285 bp ürün boyutunda C aleli amplifikasyonu göstermiştir. Heterozigot genotipte ise T ve C alelleri sırasıyla 315bp ve 285bp ürün boyutunda amplifikasyon göstermiştir. Dış iç kontrol 556bp T-ARMS-PCR ürününde gözlenmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17 TLR4-rs12377632geni polimorfizmi için T-ARMS-PCR ürün analizini gösteren agaroz jel elektroforez görüntüsü.

a) Hardy Weinberg denklemi

TLR4-rs12377632 genotiplerinin, TT, TC ve CC, kontrol grubu içindeki dağılımına Hardy Weinberg denklemi uygulanmış ve sonuçlar Çizelge 4.8'de gösterilmiştir.

Homozigot yabani TT genotipine 100 kontrol deneğinin 58'inde, heterozigot TC genotipine 100 kontrol deneğinin 30'unda ve homozigot mutant CC genotipine 100 kontrol deneğinin 12'sinde rastlanmıştır (Çizelge4.8). Kontrol deneklerinin TLR4-rs12377632 genotiplerine göre gözlenen dağılımı beklenenden oldukça farklıdır ($P = 0.058$).

Çizelge 4.8 TLR4-rs12377632 Hardy Weinberg denklemi

Genotipler	Gözlemlendi	Beklenen	χ^2	P
Homozigot referans TT	58	60.8	5.710	0.058
Heterozigot TC	30	34.3		¥
Homozigot varyant CC	12	4.8		NS

¥: Ki-kare testi; NS: P'de anlamlı değil >0.05

b) Hastalarda ve sağlıklı kontrollerde incelenen gen için genotipik ve alel analizleri

TLR4-rs12377632 SNP'ye ilişkin genotip ve alel frekanslarının hastalar ve sağlıklı kontrol grubu arasındaki karşılaştırması Çizelge 4.9'de gösterilmiştir. Eş baskın mod ile ilgili olarak, hasta ve kontrol grupları arasında genotiplerin frekans dağılımında anlamlı farklılık vardı ($p = 0.001$). Risk analizi homozigot CC genotipinin önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur (OR= 5.59). Bu da homozigot CC genotipine sahip hastaların diğer genotiplere sahip hastalara kıyasla hastalık geliştirme olasılığının yaklaşık altı kat daha fazla olduğu anlamına gelmektedir. Dominant mod analizi ve resesif mod ile ilgili olarak, hastaları ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark vardır ($p < 0.05$). Alel analizi açısından da hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark vardır ($P = .001$).

Çizelge 4.9 Hastalarda ve sağlıklı kontrolde TLR4-rs12377632 POLY genotip sıklığı

Mod	TLR4 rs12377632	Hastalar n = 100	Kontrol n = 100	P	VEYA	95% CI
Eş baskın	CC	44 (44.0%)	12 (12.0 %)	0.001 ¥S	5.59	2.62-11.94
	T/C	18 (18.0%)	30 (30.0 %)		0.915	0.44 -1.86
	TT	38 (38.0 %)	58 (58.0 %)		Referans	
Baskın	CC+ T/C	62 (62.0 %)	42 (42.0 %)	0.004 ¥S	Referans	
	TT	38 (38.0 %)	58 (58.0 %)		0.44	0.25-0.78
Çekinik	CC	44 (44.0%)	12 (12.0 %)	0.001 ¥S	5.76	2.80-11.85
	T/C +TT	56 (56.0%)	88 (88.0%)		Referans	
Aleller	C	106 (53.0%)	54 (27.0%)	0.001 ¥S	3.05	2.03-4.63
	T	94 (47.0%)	146 (73.0%)		Referans	

c) Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastalarda sosyo-demografik özelliklere göre ARMS-PCR bulguları arasındaki karşılaştırma

Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların sosyo-demografik özelliklerinin frekans dağılımının ARMS-PCR sonuçlarına göre karşılaştırılması Çizelge 4.10'da gösterilmiştir. Yaş ortalaması, TT genotipine sahip hastalarda $29,31 \pm 7,86$, TC genotipine sahip hastalarda $24,88 \pm 8,79$ ve CC genotipine sahip hastalarında ise $29,90 \pm 8,08$ 'dir. Yaş ile ARMS-PCR sonuçları arasında hem frekans açısından ($P=0,186$) hem de yaş ortalaması açısından ($P=0,143$) anlamlı bir ilişki bulunmamıştır. Ayrıca cinsiyet ile ARMS-PCR sonuçları arasında da anlamlı bir ilişki bulunmamıştır ($P=0,891$).

Çizelge 4.10 ARMS-PCR sonuçlarına göre hastaların sosyo-demografik özelliklerinin frekans dağılımının karşılaştırılması

Karakteristik	<i>TT genotipi</i> n = 38	<i>TC genotipi</i> n = 18	<i>CC genotipi</i> n = 44	<i>P</i>
Yaş				
Ortalama ± SD	29.31 ± 7.86	24,88± 8,79	29,90± 8,08	0.143 † NS
< 20, <i>n</i> (%)	6 (15.8%)	6 (33.3%)	6 (13.6%)	0.186 ¥ NS
20-29, <i>n</i> (%)	10 (26.3%)	10 (55.6%)	14 (31.8%)	
≥ 30, <i>n</i> (%)	22 (57.9%)	2 (11.1%)	24 (54.6%)	
Cinsiyet				
Erkek, <i>n</i> (%)	16 (42.1%)	8 (44.4%)	16 (36.4%)	0.891 ¥ NS
Kadın, <i>n</i> (%)	22 (57.9%)	10 (55.6%)	28 (63.6 %)	

n: vaka sayısı; SD: standart sapma; †: Anova testi; ¥: Ki-kare testi; NS: P'de anlamlı değil <0.05.

d) Bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastalarda ikamet yerine göre ARMS-PCR bulgularının karşılaştırılması

İdrar yolu enfeksiyonu olan hastaların ikametgah özelliklerinin ARMS-PCR sonuçlarına göre frekans dağılımının karşılaştırılması Çizelge 4.11'de gösterilmiştir. Mevcut sonuçlar, ikametgah ile ARMS-PCR sonuçları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir ($p=0.166$).

Çizelge 4.11 ARMS-PCR sonuçlarına göre bakteriyel biyofilm oluşumu enfeksiyonu olan hastaların ikamet sıklığı dağılımının karşılaştırılması

Karakteristik	<i>TT genotipi</i> n = 38	<i>TC genotipi</i> n = 18	<i>CC genotipi</i> n = 44	P
İkamet				
Kentsel, n (%)	28 (73.6%)	12 (66.7%)	20 (45.5%)	0.166 ¥ NS
Kırsal, n (%)	10 (26.4%)	6 (33.3%)	24 (54.5%)	

n: vaka sayısı; ¥: Ki-kare testi; NS: P'de anlamlı değil <0.05.

e) Bakteri türlerine göre genotip frekans dağılımı

Genotipin bakteri türlerine göre frekans dağılımı Çizelge 4.12'de gösterilmiştir. Mevcut sonuçlar, bakteri türleri ile ARMS-PCR sonuçları arasında anlamlı bir ilişki olmadığını göstermektedir (p = 0.925).

Çizelge 4.12 Genotip frekans dağılımının bakteri türlerine göre karşılaştırılması

Karakteristik	Bakteriyel türler					P
	<i>E. coli</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>K. pnömoni</i>	<i>P. mirabilis</i>	
Genotip						
TT, n (%)	16 (44.4%)	6 (27.3%)	4 (33.3%)	4 (28.6%)	8 (50.0%)	0.925 ¥ NS
TC, n (%)	4 (11.2%)	4 (18.2%)	2 (16.7%)	4 (28.6%)	4 (25.0%)	
CC, n (%)	16 (44.4%)	12 (54.5%)	6 (50.0%)	6 (42.8%)	4 (25.0%)	

n: vaka sayısı; ¥: ki-kare testi; NS: p > 0.05'te anlamlı olmayan

4.6 Biyofilm Oluşum Genlerinin DNA Dizi Analizi

DNA dizileme yöntemi, NCBI-Genbank ile ilişkili suşlarla karşılaştırılan üropatojen bakteri izolatlarındaki biyofilm oluşum genlerindeki genetik ilişkileri ve varyasyon analizini tanımlamak için kullanılmıştır. Filogenetik ağaç analizi, üropatojenik bakteri izolatlarındaki biyofilm oluşum genlerinin genetik ilişkilerini ve varyasyonlarını araştırmıştır. Analiz edilen genler *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*'ten *icaA*, *fimH*, *MrpA*'dır.

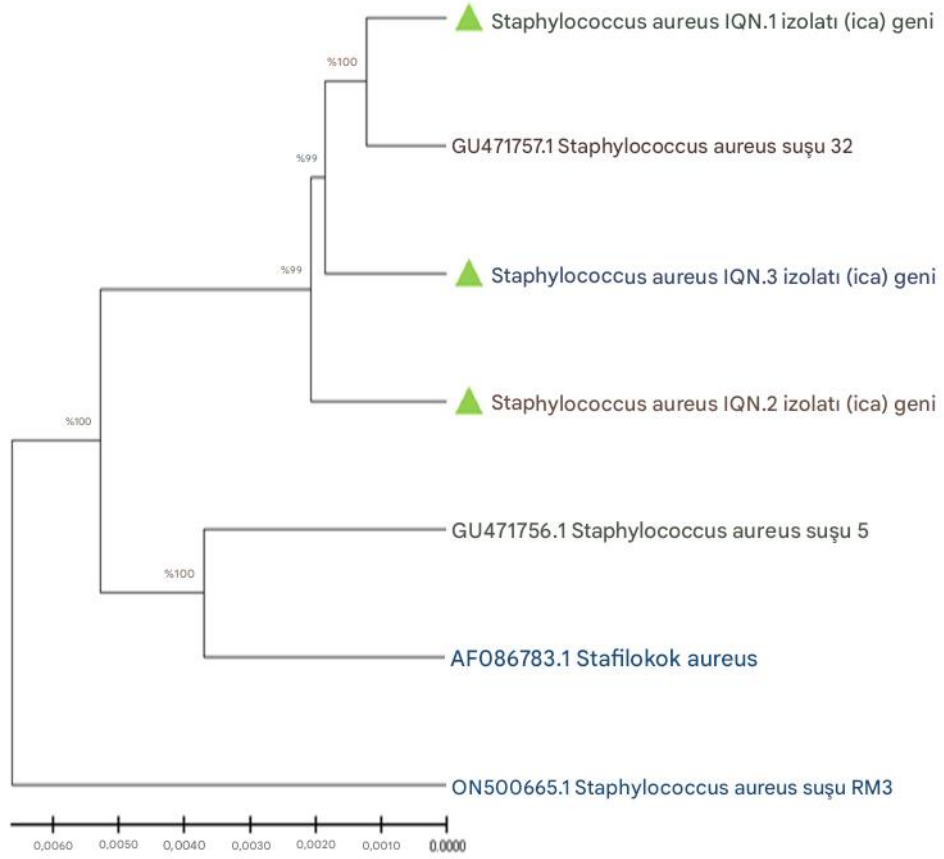
Staphylococcus aureus izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%99,75) ve minimal genetik varyasyonlarla (%0,25) yakın ilişkiler göstermiştir. *Klebsiella pneumoniae* izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%98,01 ile %98,03 arasında değişen) ve minimal genetik varyasyonlarla (%1,97 ile %1,99) yakın ilişkiler göstermiştir.

Escherichia coli izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%98,77 ile %99,18 arasında) ve minimal genetik varyasyonlarla (%0,82 ile %1,33 arasında) yakın ilişkiler göstermiştir. *Proteus mirabilis* izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%99,72) ve minimal genetik varyasyonlarla (%0,28) yakın ilişkiler göstermiştir. *Staphylococcus epidermidis* izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%99,22 ile %99,74 arasında değişen) ve minimal genetik varyasyonlarla (%0,26 ile %0,78 arasında) yakın ilişkiler göstermiştir.

Son olarak analiz, üropatojenik bakteri izolatlarının NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji gösterdiğini ve yakın bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur. Gözlenen genetik varyasyonlar minimal genetik varyasyonlardır(Şekil 4.18, Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27) (Çizelge 4.13, Çizelge 4.14, Çizelge 4.15, Çizelge 4.16, Çizelge 4.17).

DNA Sequences	Translated Protein Sequences	
Species/Abbrev	Δ	* *
1. Staphylococcus aureus IQN.1 isolate (ica) gene	AGTATTACTACGAGACTTTTGTAGCACAAATGAAAACGAAAA	
2. Staphylococcus aureus IQN.2 isolate (ica) gene	AGTATTACTACGAGACTTTTGTAGCACAAATGAAAACGAAAA	
3. Staphylococcus aureus IQN.3 isolate (ica) gene	AGTATTACTACGAGACTTTTGTAGCACAAATGAAAACGAAAA	
4. GU471757.1 Staphylococcus aureus strain 32	AGTATTACTACGAGACTTTTGTAGCACAAATGAAAACGAAAA	
5. GU471756.1 Staphylococcus aureus strain 5	AGTATTACTACGAGACTTTTGTAGCACAAATGAAAACGAAAA	
6. AF086783.1 Staphylococcus aureus	AGTATTACTACGAGACTTTTGTAGCACAAATGAAAACGAAAA	
7. ON500665.1 Staphylococcus aureus strain RM3	AGTATTACTACGAGACTTTTGTAGCACAAATGAAAACGAAAA	
Species/Abbrev	Δ	* *
1. Staphylococcus aureus IQN.1 isolate (ica) gene	GTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAAATCATCTCGATTTTA	
2. Staphylococcus aureus IQN.2 isolate (ica) gene	GTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAAATCATCTCGATTTTA	
3. Staphylococcus aureus IQN.3 isolate (ica) gene	GTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAAATCATCTCGATTTTA	
4. GU471757.1 Staphylococcus aureus strain 32	GTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAAATCATCTCGATTTTA	
5. GU471756.1 Staphylococcus aureus strain 5	GTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAAATCATCTCGATTTTA	
6. AF086783.1 Staphylococcus aureus	GTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAAATCATCTCGATTTTA	
7. ON500665.1 Staphylococcus aureus strain RM3	GTTTCCTTTATATATTTTGATGTTTGAGCAAAATCATCTCGATTTTA	
Species/Abbrev	Δ	* *
1. Staphylococcus aureus IQN.1 isolate (ica) gene	GGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTTATAACAGC	
2. Staphylococcus aureus IQN.2 isolate (ica) gene	GGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTTATAACAGC	
3. Staphylococcus aureus IQN.3 isolate (ica) gene	GGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTTATAACAGC	
4. GU471757.1 Staphylococcus aureus strain 32	GGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTTATAACAGC	
5. GU471756.1 Staphylococcus aureus strain 5	GGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTTATAACAGC	
6. AF086783.1 Staphylococcus aureus	GGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTTATAACAGC	
7. ON500665.1 Staphylococcus aureus strain RM3	GGGTATATATAGTGCTTCTATATTTAGGCTATTTGTTTATAACAGC	
Species/Abbrev	Δ	* *
1. Staphylococcus aureus IQN.1 isolate (ica) gene	AGCAAAC TTCTTAGACTATACATTTATGACCTATAGTTTATCAAT	
2. Staphylococcus aureus IQN.2 isolate (ica) gene	AGCAAAC TTCTTAGACTATACATTTATGACCTATAGTTTATCAAT	
3. Staphylococcus aureus IQN.3 isolate (ica) gene	AGCAAAC TTCTTAGACTATACATTTATGACCTATAGTTTATCAAT	
4. GU471757.1 Staphylococcus aureus strain 32	AGCAAAC TTCTTAGACTATACATTTATGACCTATAGTTTATCAAT	
5. GU471756.1 Staphylococcus aureus strain 5	AGCAAAC TTCTTAGACTATACATTTATGACCTATAGTTTATCAAT	
6. AF086783.1 Staphylococcus aureus	AGCAAAC TTCTTAGACTATACATTTATGACCTATAGTTTATCAAT	
7. ON500665.1 Staphylococcus aureus strain RM3	AGCAAAC TTCTTAGACTATACATTTATGACCTATAGTTTATCAAT	

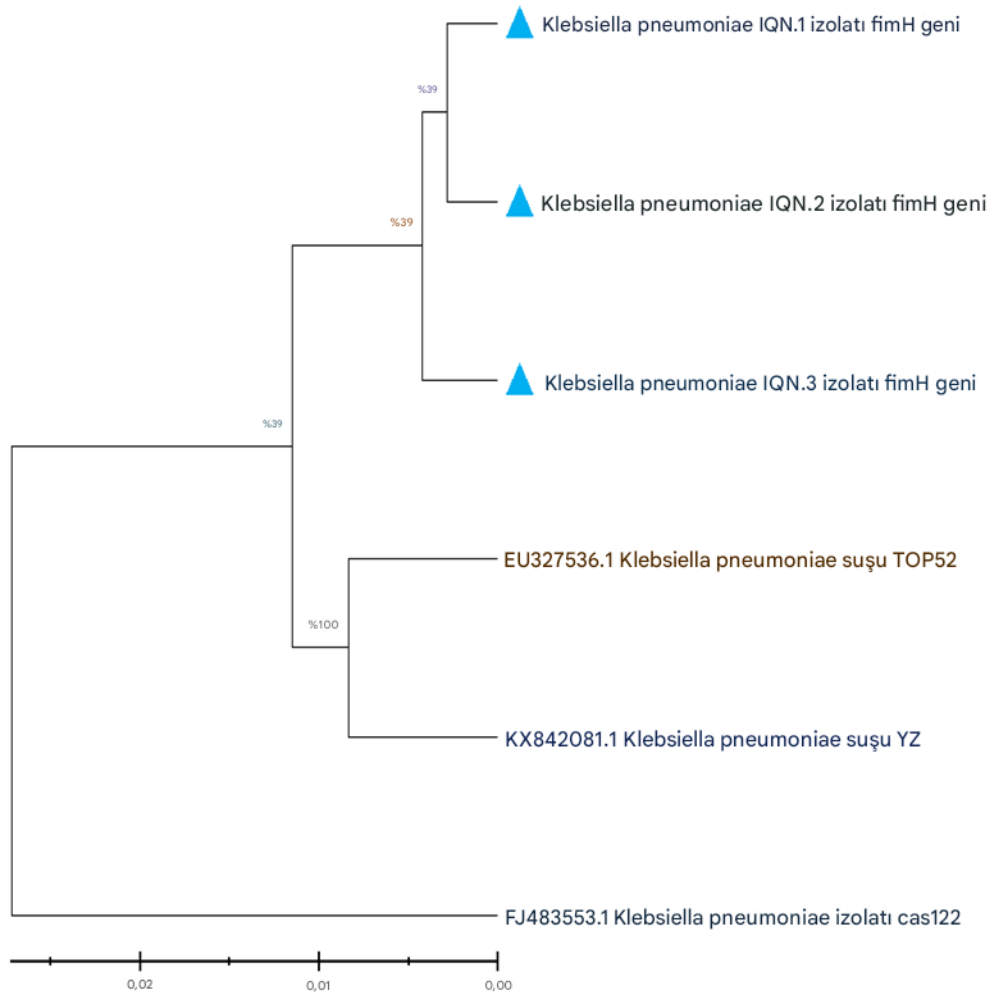
Şekil 4.18 Yerel *Staphylococcus aureus* IQ izolatlarında ve NCBI-Genbank ile ilişkili izolatlarda hücreler arası yapışma proteini (icaA) geninin çoklu dizi hizalama analizi. Çoklu hizalama analizi (ClustalW hizalama aracı. Çevrimiçi) kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama analizi, nükleotid hizalama benzerliğini (*) olarak ve izolatlar arasında hücreler arası yapışma proteini (icaA) genindeki sübstitüsyon (nokta) mutasyonlarını göstermiştir.



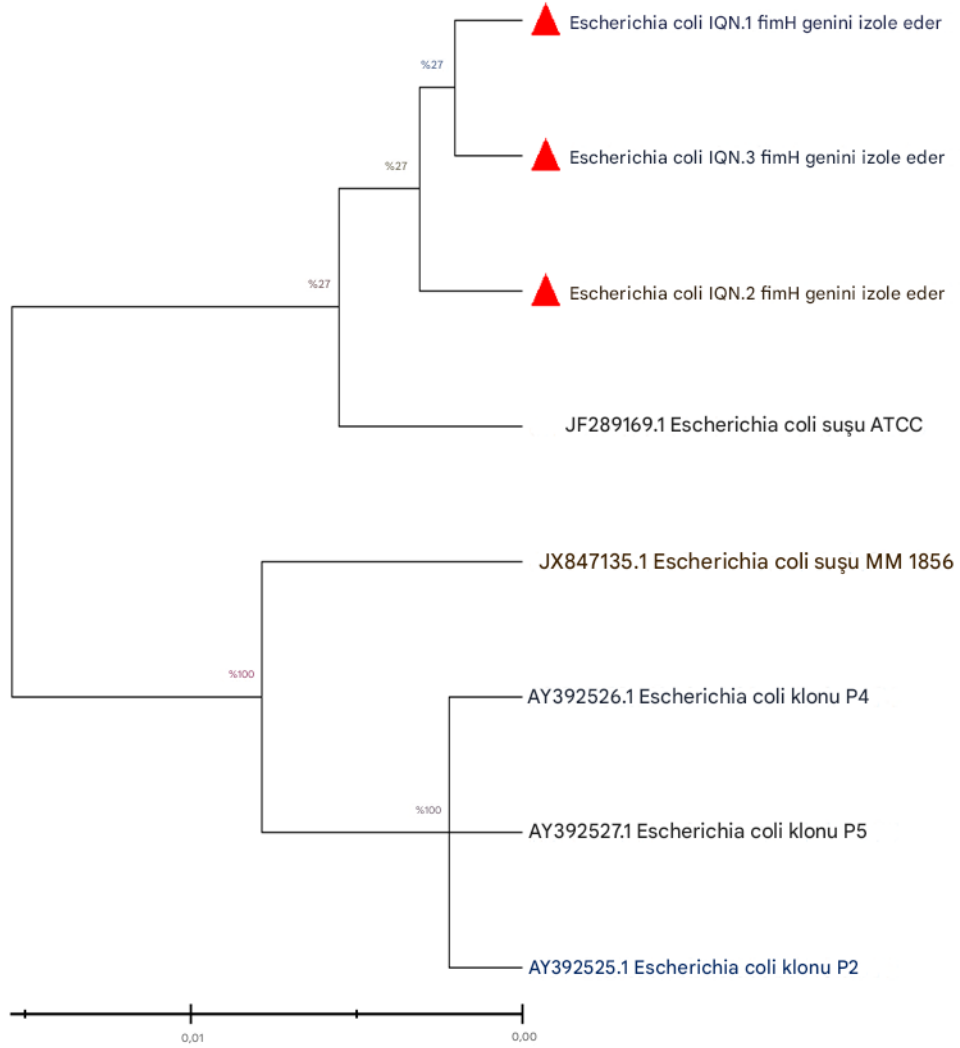
Şekil 4.19 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Staphylococcus aureus* IQ izolatlarında hücreler arası adezyon proteini (*icaA*) gen kısmi dizisine dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç, (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Staphylococcus aureus* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Staphylococcus aureus* suş 32 (GU471757.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.0060-0.0010) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences	
Species/Abbrev	Δ	* * * * *
1. Klebsiella pneumoniae IQN.1 isolate fimH gene	G A C T C C T T C C A T T T C A T C T G G A A C A T C T A C G C C A A T A A C G A C G T	
2. Klebsiella pneumoniae IQN.2 isolate fimH gene	G A C T C C T T C C A T T T C A T C T G G A A C A T C T A C G C C A A T A A C G A C G T	
3. Klebsiella pneumoniae IQN.3 isolate fimH gene	G A C T C C T T C C A T T T C A T C T G G A A C A T C T A C G C C A A T A A C G A C G T	
4. EU327536.1 Klebsiella pneumoniae strain TOP52	G A C T C C T T C C A G T T C A T C T G G A A C A T T T A C G C C A A C A A C G A C G T	
5. KX842081.1 Klebsiella pneumoniae strain YZ	G A C T C C T T C C A G T T C A T C T G C A A C A T T T A C G C C A A C A A C G A C G T	
6. FJ483553.1 Klebsiella pneumoniae isolate cas122	G A C T C C T T C C A G T T C A T C T G G A A C A T T T A C G C C A A C A A C G A C G T	
Species/Abbrev	Δ	* * * * *
1. Klebsiella pneumoniae IQN.1 isolate fimH gene	G T G G T C C C C A C C G G C G G C T G C G A C G T C T C C G C C C G C G A T G T C A C C	
2. Klebsiella pneumoniae IQN.2 isolate fimH gene	G T G G T C C C C A C C G G C G G C T G C G A C G T C T C C G C C C G C G A T G T C A C C	
3. Klebsiella pneumoniae IQN.3 isolate fimH gene	G T G G T C C C C A C C G G C G G C T G C G A C G T C T C C T C C C G C G A T G T C A C C	
4. EU327536.1 Klebsiella pneumoniae strain TOP52	G T G G T C C C C A C C G G C G G C T G C G A C G T C T C C G C C C G C G A T G T C A C C	
5. KX842081.1 Klebsiella pneumoniae strain YZ	G T G G G C C C C A C C G G C G T C T G C G A T G T C T C C G C C C G C G A T G T C A C C	
6. FJ483553.1 Klebsiella pneumoniae isolate cas122	G T G G T C C C C A C C G G C G G C T G C G A T G T C T C C G C C C G C G A T G T C A C C	
Species/Abbrev	Δ	* * * * *
1. Klebsiella pneumoniae IQN.1 isolate fimH gene	T C A C C C T C C C G G A C T A C C C G G G A T C G A T G G C C G T G C C G C T C A C C	
2. Klebsiella pneumoniae IQN.2 isolate fimH gene	T C A C C C T C C C G G A C T A C C C G G G A T C G A T G G C C G T G C C G C T C A C C	
3. Klebsiella pneumoniae IQN.3 isolate fimH gene	T C A C C C T C C C G G A C T A C C C G G G A T C G A T G G C C G T G C C G C T C A C C	
4. EU327536.1 Klebsiella pneumoniae strain TOP52	T C A C C C T C C C G G A C T A C C C G G G A T C G A T G G C C G T G C C G C T C A C C	
5. KX842081.1 Klebsiella pneumoniae strain YZ	T C A C C C T C C C G G A C T A C C C G G G A T C G A T G G C C G T G C C G C T C A C C	
6. FJ483553.1 Klebsiella pneumoniae isolate cas122	T C A C C C T C C C G G A C T A C C C G G G A T C G A A G G C C G T G C C G C T C A C C	
Species/Abbrev	Δ	* * * * *
1. Klebsiella pneumoniae IQN.1 isolate fimH gene	T C C A C T G C G C G C A G A G C C A G C A G C T G G G G T A T T A C C T C T C C G G	
2. Klebsiella pneumoniae IQN.2 isolate fimH gene	T C C A C T G C G C G C A G A G C C A G C T G C T G G G G T A T T A C C T C T C C G G	
3. Klebsiella pneumoniae IQN.3 isolate fimH gene	T C C A C T G C G C G C A T A G C C A G C A G C T G G G G T A T T A C C T C T C C G G	
4. EU327536.1 Klebsiella pneumoniae strain TOP52	T C C A C T G C G C G C A A A G C C A G C A G C T G G G G T A T T A C C T C T C C G G	
5. KX842081.1 Klebsiella pneumoniae strain YZ	T C C A C T G C G C G C A A A G C C A G C A G C T G G G G T A T T A C C T C T C C G G	
6. FJ483553.1 Klebsiella pneumoniae isolate cas122	T G C A C T G C G C G C A A A G C C A G C A G C T G G G G T A T T A C C T C T C C G G	
Species/Abbrev	Δ	* * * * *
1. Klebsiella pneumoniae IQN.1 isolate fimH gene	A C C A C C G C G G A C A G C G C C A A C G C G A T C T T C A C C A A T A C C G C C	
2. Klebsiella pneumoniae IQN.2 isolate fimH gene	A C C A C C G C G G A C A G C G C C A A C G C G A T C T T C A C C A A T A C C G C C	
3. Klebsiella pneumoniae IQN.3 isolate fimH gene	A C C A C C G C G G A C A G C G C C A A C G C G A T C T T C A C C A A T A C C G C C	
4. EU327536.1 Klebsiella pneumoniae strain TOP52	A C C A C C G C G G A C A G C G C C A A C G C G A T C T T C A C C A A T A C C G C C	
5. KX842081.1 Klebsiella pneumoniae strain YZ	A C C A C C G C G G A C A G C G C C A A C G C G A T C T T C A C C A A T A C C G C C	
6. FJ483553.1 Klebsiella pneumoniae isolate cas122	A C C A C C G C G G A T A G C G C C A A C G C G A T C T T C A C C A A T A C C G C C	

Şekil 4.20 Yerel *Klebsiella pneumoniae* IQ izolatlarında ve NCBI-Genbank ilişkili izolatlarda fimbrial adhesin (fimH) geninin çoklu dizi hizalama analizi. Çoklu hizalama analizi (ClustalW hizalama aracı, Çevrimiçi) kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama analizi, nükleotid hizalama benzerliğini (*) olarak ve izolatlar arasında fimbrial adhezini (fimH) genindeki substitüsyon mutasyonlarını göstermiştir.



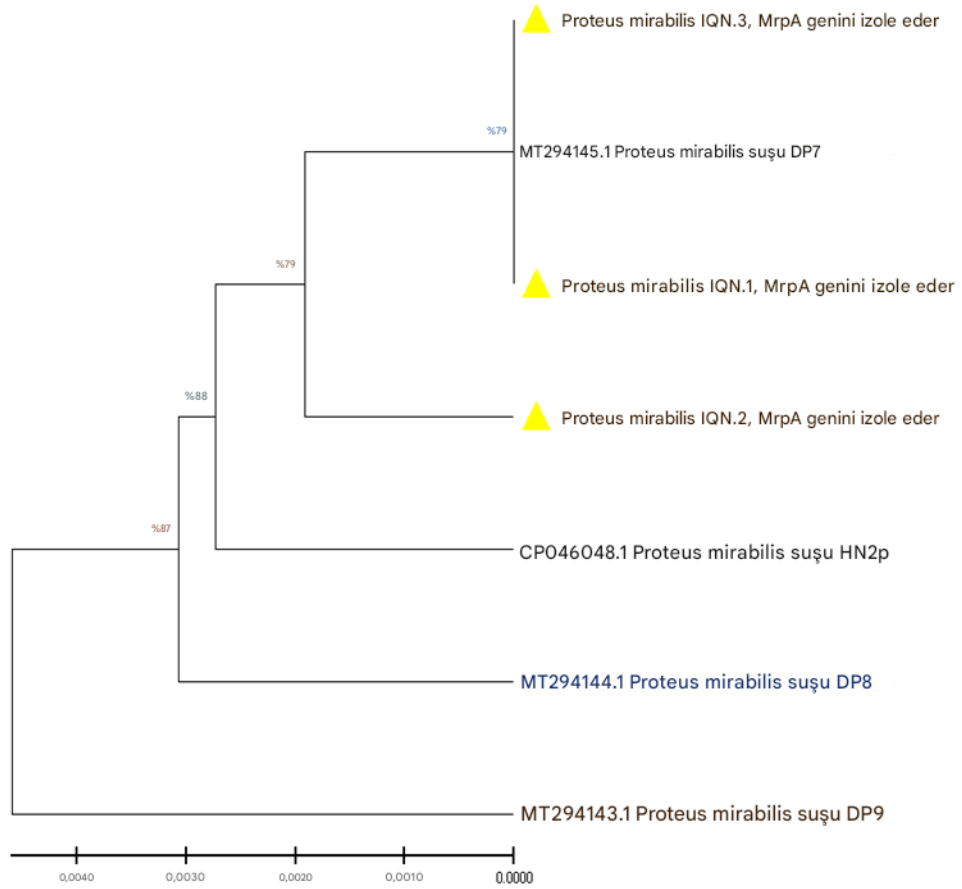
Şekil 4.21 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Klebsiella pneumoniae* IQ izolatlarında fimbrial adezin (fimH) gen kısmi dizisine dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Klebsiella pneumoniae* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Klebsiella pneumoniae* suşu TOP52 (EU327536.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.02-0.01) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.23 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Escherichia coli* IQ izolatlarında fimbrial adhesin (fimH) gen kısmi dizisine dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Escherichia coli* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Escherichia coli* suşu ATCC (JF289169.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.01) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	Δ
1. Proteus mirabilis IQN.1 isolate MrpA gene	CTGC TTTAGCTGCAGATCAAGGT CATGGTACTGTTAAA TTTGTTGGT
2. Proteus mirabilis IQN.2 isolate MrpA gene	CTGC TTTAGCTGCAGATCAAGGT CATGGTACTGTTAAA TTTGTTGGT
3. Proteus mirabilis IQN.3 isolate MrpA gene	CTGC TTTAGCTGCAGATCAAGGT CATGGTACTGTTAAA TTTGTTGGT
4. MT294145.1 Proteus mirabilis strain DP7	CTGC TTTAGCTGCAGATCAAGGT CATGGTACTGTTAAA TTTGTTGGT
5. MT294144.1 Proteus mirabilis strain DP8	CTGC TTTAGCTGCAGATCAAGGT CATGGTACTGTTAAA TTTGTTGGT
6. MT294143.1 Proteus mirabilis strain DP9	CTGC TTTAGCTGCAGATCAAGGT CATGGTACTGTTAAA TTTGTTGGT
7. CP046048.1 Proteus mirabilis strain HN2p	CTGC TTTAGCTGCAGATCAAGGT CATGGTACTGTTAAA CTTGTTGGT
Species/Abbrv	Δ
1. Proteus mirabilis IQN.1 isolate MrpA gene	CAATCATTGATGCTCCTTGCTCAATTACTCCTGATACTGAAAATCAA
2. Proteus mirabilis IQN.2 isolate MrpA gene	CAATCATTGATGCTCCTTGCTCAATTACTCCTGATACTGAAAATCAA
3. Proteus mirabilis IQN.3 isolate MrpA gene	CAATCATTGATGCTCCTTGCTCAATTACTCCTGATACTGAAAATCAA
4. MT294145.1 Proteus mirabilis strain DP7	CAATCATTGATGCTCCTTGCTCAATTACTCCTGATACTGAAAATCAA
5. MT294144.1 Proteus mirabilis strain DP8	CAATCATTGATGCTCCTTGCTCAATTACTCCTGATACTGAAAATCAA
6. MT294143.1 Proteus mirabilis strain DP9	CAATCATTGATGCTCCTTGCTCAATTACTCCTGATACTGAAAATCAA
7. CP046048.1 Proteus mirabilis strain HN2p	CAATCATTGATGCTCCTTGCTCAATTACTCCTGATACTGAAAATCAA
Species/Abbrv	Δ
1. Proteus mirabilis IQN.1 isolate MrpA gene	AGTTCCTAGGTCAAATTTCTACTGCTGCATTAAAAGATGGTGGCC
2. Proteus mirabilis IQN.2 isolate MrpA gene	AGTTCCTAGGTCAAATTTCTACTGCTGCATTAAAAGATGGTGGCC
3. Proteus mirabilis IQN.3 isolate MrpA gene	AGTTCCTAGGTCAAATTTCTACTGCTGCATTAAAAGATGGTGGCC
4. MT294145.1 Proteus mirabilis strain DP7	AGTTCCTAGGTCAAATTTCTACTGCTGCATTAAAAGATGGTGGCC
5. MT294144.1 Proteus mirabilis strain DP8	AGTTCCTAGGTCAAATTTCTACTGCTGCATTAAAAGATGGTGGCC
6. MT294143.1 Proteus mirabilis strain DP9	AGTTCCTAGGTCAAATTTCTACTGCTGCATTAAAAGATGGTGGCC
7. CP046048.1 Proteus mirabilis strain HN2p	AGTTCCTAGGTCAAATTTCTACTGCTGCATTAAAAGATGGTGGCC
Species/Abbrv	Δ
1. Proteus mirabilis IQN.1 isolate MrpA gene	AGTAATTCCTGAGCTTTAAAAATCTCTTTAGAAAA TTGTACTACAGAG
2. Proteus mirabilis IQN.2 isolate MrpA gene	AGTAATTCCTGAGCTTTAAAAATCTCTTTAGAAAA TTGTACTACAGAG
3. Proteus mirabilis IQN.3 isolate MrpA gene	AGTAATTCCTGAGCTTTAAAAATCTCTTTAGAAAA TTGTACTACAGAG
4. MT294145.1 Proteus mirabilis strain DP7	AGTAATTCCTGAGCTTTAAAAATCTCTTTAGAAAA TTGTACTACAGAG
5. MT294144.1 Proteus mirabilis strain DP8	AGTAATTCCTGAGCTTTAAAAATCTCTTTAGAAAA TTGTACTACAGAG
6. MT294143.1 Proteus mirabilis strain DP9	AGTAATTCCTGAGCTTTAAAAATCTCTTTAGAAAA TTGTACTACAGAG
7. CP046048.1 Proteus mirabilis strain HN2p	AGTAATTCCTGAGCTTTAAAAATCTCTTTAGAAAA TTGTACTACAGAG
Species/Abbrv	Δ
1. Proteus mirabilis IQN.1 isolate MrpA gene	TACAAAAC TGTTCAAACAAC TTTCACTGGCTCTGAAGCAACTGAAGTT
2. Proteus mirabilis IQN.2 isolate MrpA gene	TACAAAAC TGTTCAAACAAC TTTCACTGGCTCTGAAGCAACTGAAGTT
3. Proteus mirabilis IQN.3 isolate MrpA gene	TACAAAAC TGTTCAAACAAC TTTCACTGGCTCTGAAGCAACTGAAGTT
4. MT294145.1 Proteus mirabilis strain DP7	TACAAAAC TGTTCAAACAAC TTTCACTGGCTCTGAAGCAACTGAAGTT
5. MT294144.1 Proteus mirabilis strain DP8	TACAAAAC TGTTCAAACAAC TTTCACTGGCTCTGAAGCAACTGAAGTT
6. MT294143.1 Proteus mirabilis strain DP9	TACAAAAC TGTTCAAACAAC TTTCACTGGCTCTGAAGCAACTGAAGTT
7. CP046048.1 Proteus mirabilis strain HN2p	TACAAAAC TGTTCAAACAAC TTTCACTGGCTCTGAAGCAACTGAAGTT

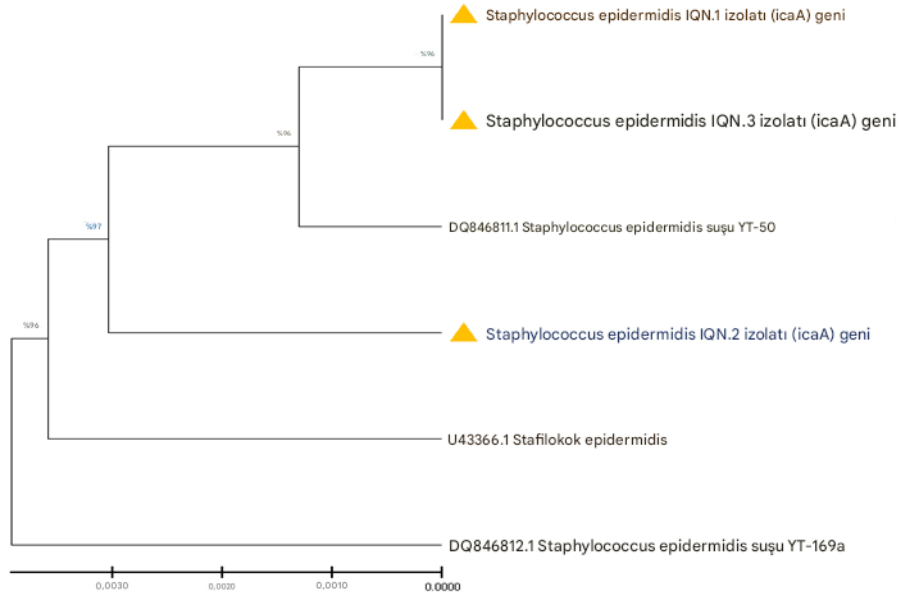
Şekil 4.24 Yerel *Proteus mirabilis* IQ izolatlarında ve NCBI-Genbank ile ilişkili izolatlarda fimbria major alt birim (MrpA) geninin çoklu dizi hizalama analizi. Çoklu hizalama analizi (ClustalW hizalama aracı, Çevrimiçi) kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama analizi, nükleotid hizalama benzerliğini (*) olarak ve izolatlar arasında fimbria major subunit (MrpA) genindeki substitüsyon mutasyonlarını göstermiştir.



Şekil 4.25 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Proteus mirabilis* IQ izolatlarında fimbria major subunit (MrpA) gen kısmi sekansına dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Proteus mirabilis* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Proteus mirabilis* suşu DP7 (MT294145.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.0040-0.0010) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir.

DNA Sequences	Translated Protein Sequences
Species/Abbrv	Δ *
1. Staphylococcus epidermidis IQN.1 isolate (icaA) gene	C A A A C A A G C A T C T T A C G A A T A T G T T A T G T G T T T A G A T G C T G A
2. Staphylococcus epidermidis IQN.2 isolate (icaA) gene	C A A A C A A G C A T C T T A C G A A T A T G T T A T G T G T T T A G A T G C T G A
3. Staphylococcus epidermidis IQN.3 isolate (icaA) gene	C A A A C A A G C A T C T T A C G A A T A T G T T A T G T G T T T A G A T G C T G A
4. DQ846812.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-169a	C A A A C A A G C A T C T T A C G A A T A T G T T A T G T G T T T A G A T G C T G A
5. DQ846811.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-50	C A A A C A A G C A T C T T A C G A A T A T G T T A T G T G T T T A G A T G C T G A
6. U43366.1 Staphylococcus epidermidis	C A A A C A A G C A T C T T A C G A A T A T G T T A T G T G T T T A G A T G C T T A
Species/Abbrv	Δ *
1. Staphylococcus epidermidis IQN.1 isolate (icaA) gene	C A C T G T C A T T G A T G A C G A T G C G C C T T T T T A T A T G A T T G A A G A
2. Staphylococcus epidermidis IQN.2 isolate (icaA) gene	C A C T G T C A T T G A T G A C G A T G C G C C T T T T T A T A T G A T T G A A G A
3. Staphylococcus epidermidis IQN.3 isolate (icaA) gene	C A C T G T C A T T G A T G A C G A T G C G C C T T T T T A T A T G A T T G A A G A
4. DQ846812.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-169a	C A C T G T C A T T G A T G A C G A T G C G C C T T T T T A T A T G A T T G A A G A
5. DQ846811.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-50	C A C T G T C A T T G A T G A C G A T G C G C C T T T T T A T A T G A T T G A A G A
6. U43366.1 Staphylococcus epidermidis	C A C T G T C A T T G A T G A C G A T G C G C C T T T T T A T A T G A T T G A A G A
Species/Abbrv	Δ *
1. Staphylococcus epidermidis IQN.1 isolate (icaA) gene	T T T A A A A A G A A T C C A A A A T T A G G C G C A G T T A C A G G T A A T C C A C
2. Staphylococcus epidermidis IQN.2 isolate (icaA) gene	T T T A A A A A G A A T C C A A A A T T A G G C G C A G T T A C A G G T A A T C C A C
3. Staphylococcus epidermidis IQN.3 isolate (icaA) gene	T T T A A A A A G A A T C C A A A A T T A G G C G C A G T T A C A G G T A A T C C A C
4. DQ846812.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-169a	T T T A A A A A G A A T C C A A A A T T A G G C G C A G C T A C A G G T A A T C C A C
5. DQ846811.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-50	T T T A A A A A G A A T C C A A A A T T A G G C G C A G T T A C A G G T A A T C C A C
6. U43366.1 Staphylococcus epidermidis	T T T A A A A A G A A T C C A A A A T T A G G C G C A G T T A C A G G T A A T C C A C
Species/Abbrv	Δ *
1. Staphylococcus epidermidis IQN.1 isolate (icaA) gene	T A T T C G T A A T A A A A G T T C T A T T T T A G G A A A A A T A C A G A C C A T
2. Staphylococcus epidermidis IQN.2 isolate (icaA) gene	T A T T C G T A A T A A A A G T C C T A T T T T A G G A A A A A T A C A G A C C A T
3. Staphylococcus epidermidis IQN.3 isolate (icaA) gene	T A T T C G T A A T A A A A G T T C T A T T T T A G G A A A A A T A C A G A C C A T
4. DQ846812.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-169a	T A T T C G T A A T A A A A G T T C T A T T T T A G G A A A A A T A C A G A C C A T
5. DQ846811.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-50	T A T T C G T A A T A A A A G T T C T A T T T T A G G A A A A A T A C A G A C C A T
6. U43366.1 Staphylococcus epidermidis	T A T T C G T A A T A A A A G T T C T A T T T T A G G A A A A A T A C A G A C C A T
Species/Abbrv	Δ *
1. Staphylococcus epidermidis IQN.1 isolate (icaA) gene	T G A A T A T G C A A G T A T T A T T G G T T G T A T C A A G C G A A G T C A A T
2. Staphylococcus epidermidis IQN.2 isolate (icaA) gene	T G A A T A T G C A A G T A T T A T T G G T T G T A T C A A G C G A A T T C A A T
3. Staphylococcus epidermidis IQN.3 isolate (icaA) gene	T G A A T A T G C A A G T A T T A T T G G T T G T A T C A A G C G A A G T C A A T
4. DQ846812.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-169a	T G A A T A T G C A A G T A T T A T T G G T T G T A T C A A G C G A A G T C A A T
5. DQ846811.1 Staphylococcus epidermidis strain YT-50	T G A A T A T G C A A G T A T T A T T G G T T G T A T C A A G C G A A G T C A A T
6. U43366.1 Staphylococcus epidermidis	T G A A T A T G C A A G T A T T A T T G G T T G T A T C A A G C G A A G T C A A T

Şekil 4.26 Yerel *Staphylococcus epidermidis* IQ izolatlarında ve NCBI-Genbank ile ilişkili izolatlarda hücreler arası yapışma proteini (icaA) geninin çoklu dizi hizalama analizi. Çoklu hizalama analizi (ClustalW hizalama aracı. Çevrimiçi) kullanılarak yapılmıştır. Bu hizalama analizi, izolatlar arasında hücreler arası yapışma proteini (icaA) genindeki nükleotid hizalama benzerliğini (*) ve süstitüsyon mutasyonlarını göstermiştir.



Şekil 4.27 Genetik ilişki analizi için kullanılan yerel *Staphylococcus epidermidis* IQ izolatlarında hücreler arası adezyon proteini (icaA) gen kısmi dizisine dayalı filogenetik ağaç analizi. Filogenetik ağaç (MEGA 6.0 versiyonunda) Aritmetik Ortalama ile Ağırlıklandırılmamış Çift Grup yöntemi (UPGMA ağacı) kullanılarak oluşturulmuştur. *Staphylococcus epidermidis* IQ izolatlarının (IQN.1-IQN3) NCBI-BLAST *Staphylococcus epidermidis* suşu YT-50 (DQ846811.1) ile toplam genetik değişikliklerde (%0.0030-0.0010) kapalı ilişkili olduğu gösterilmiştir.

Çizelge 4.13 NCBI-BLAST Yerel *Staphylococcus aureus* IQ izolatlarındaki hücreler arası adezyon proteini (icaA) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği

Yerel izolat	Erişim numarası	Homoloji dizisi özdeşliği (%)		
		Mutasyon	Genetik Varyasyon %	Toplam Kimlik (%)
<i>Staphylococcus aureus</i> IQN.1		KLIMA	0.25%	99.75%
<i>Staphylococcus aureus</i> IQN.2		T/A	0.25%	99.75%
<i>Staphylococcus aureus</i> IQN.3		KLIMA	0.25%	99.75%

Çizelge 4.14 NCBI-BLAST Yerel *Klebsiella pneumoniae* IQ izolatlarındaki fimbrial adezyon (fimH) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği

Yerel izolat	Erişim numarası	Homoloji dizisi özdeşliği (%)		
		Mutasyon	Genetik Varyasyon %	Toplam Kimlik (%)
<i>K. pneumoniae</i> IQN.1		G/T, T/C, C/T, G/C, C/T, A/G, A/G	1.99%	98.01%
<i>K. pneumoniae</i> IQN.2		G/T, T/C, C/T, G/C, C/T, A/T, A/G	1.97%	98.03%
<i>K. pneumoniae</i> IQN.3		G/T, T/C, C/T, G/C, C/T, A/T, A/G	1.97%	98.03%

Çizelge 4.15 NCBI-BLAST Yerel *Escherichia coli* IQ izolatlarındaki fimbrial adhesin (fimH) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği

Yerel izolat	Erişim numarası	Homoloji dizisi özdeşliği (%)		
		Mutasyon	Genetik Varyasyon %	Toplam Kimlik (%)
<i>E. coli</i> IQN.1		T/A, T/C, T/G	1.33%	98.77%
<i>E. coli</i> IQN.2		T/A, T/C, T/G	1.33%	98.77%
<i>E. coli</i> IQN.3		T/A, T/G	0.82%	99.18%

Çizelge 4.16 NCBI-BLAST Yerel *Proteus mirabilis* IQ izolatlarındaki fimbria major alt birimi (MrpA) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği

Yerel izolat	Erişim numarası	Homoloji dizisi özdeşliği (%)		
		Mutasyon	Genetik Varyasyon %	Toplam Kimlik (%)
<i>P. mirabilis</i> IQN.1		C/T	0.28%	99.72%
<i>P. mirabilis</i> IQN.2		G/A	0.28%	99.72%
<i>P. mirabilis</i> IQN.3		C/T	0.28%	99.72%

Çizelge 4.17 NCBI-BLAST Yerel *Staphylococcus epidermidis* IQ izolatlarındaki hücreler arası adezyon proteini (icaA) geni ile NCBI-Genbank kapalı ilgili izolat arasındaki homoloji dizisi özdeşliği

Yerel izolat	Erişim numarası	Homoloji dizisi özdeşliği (%)		
		Mutasyon	Genetik Varyasyon %	Toplam Kimlik (%)
<i>S. epidermidis</i> IQN.1		A/G	0.26%	99.74%
<i>S. epidermidis</i> IQN.2		T/C, A/G, G/T	0.78%	99.22%
<i>S. epidermidis</i> IQN.3		A/G	0.26%	99.74%

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Irak/Thi-Qar Şehir Hastanesi'nde enfeksiyon hastalarında yapılan çalışmada, bakteriyel biyofilm oluşumu ve hastaların TLR4 gen polimorfizmlerinin ilişkisi (TLR4 rs 10759932, TLR4 rs 12377632 fonksiyonel polimorfizmleri) incelenerek, bakterilerin biyofilm oluşumu ve enfeksiyon nedenlerinin gelişmesine yatkınlık arasındaki ilişki araştırılmıştır.

Bakteriyel biyofilm oluşumu, sağlık hizmetlerinde ve çevrede çeşitli sorunlara yol açan kritik bir süreçtir (Zhao vd. 2023). Yüzeyle yapışan bakteri toplulukları olan biyofilmler, antibiyotiklere ve konakçı bağışıklık tepkilerine karşı yüksek direnç göstererek kronik ve hastane enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Sharma vd. 2023). Biyofilm oluşumu bakteriyel bağlanma ile başlar, bunu çoğalma ve olgunlaşma takip eder ve antimikrobiyal ajanlara karşı direncin artmasına yol açar. Bu biyofilmler bariyer görevi görerek enfeksiyonların tedavisini zorlaştırır ve enfeksiyonların kalıcılığına katkıda bulunur (Khan vd. 2021). Bakteriyel biyofilm oluşumuyla ilişkili enfeksiyonlar, sağlık hizmeti ortamlarında önemli bir zorluk teşkil etmektedir (Mendhe vd. 2023). Özellikle, biyofilm üreten izolatlar, biyofilm üretmeyenlere kıyasla daha fazla çoklu ilaç direnci göstermekte ve *MRSA* ve *P. aeruginosa* gibi grupların gelişimine katkıda bulunmaktadır (Pokharel vd. 2022). Biyofilm oluşum mekanizmalarını anlamak, biyofilmle ilişkili enfeksiyonlarla mücadele etmek için etkili tespit yöntemleri ve alternatif tedaviler geliştirmek için çok önemlidir.

Mevcut sonuçlar, örneklerin 100'ünün (%40,0) bakteriyel biyofilm oluşumu açısından pozitif olduğunu göstermektedir. Örneklerin %40,0'ının bakteriyel biyofilm oluşumu açısından pozitif olduğunu belirten Agarwal vd. (2022)'nin sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Irak'ta bakteriyel biyofilm oluşumunun önemli ölçüde yaygın olduğunu gösteren çeşitli araştırmalar bulunmaktadır. Örneğin Bağdat'taki farklı klinik kaynaklardan elde edilen *Acinetobacter baumannii* izolatları üzerinde yapılan bir çalışma, test edilen izolatların %80'inin güçlü biyofilm üretimi gösterdiğini ortaya koymuştur (Abdulhussein ve Mahdi 2023). Ayrıca, Salahadin vilayetinde yapılan bir çalışmada, Kongo kırmızısı agar yöntemiyle izolatların %81,3'ünün biyofilm oluşturu

olduğu bulunmuştur (Naji ve Awadh 2022). Genel olarak, veriler Irak'ta bakteriyel biyofilm oluşumunun yüksek prevalansına işaret etmekte olup, farklı bakteri türleri ve klinik koşullar arasında %50 ila %100 arasında değişen oranlar söz konusudur. Özellikle, biyofilm üretiminin izolatların önemli bir kısmında çoklu ilaç direncine katkıda bulunduğu ve klinik ortamlarda ciddi bir zorluk oluşturduğu görülmüştür. Bulgular, uygun antibiyotik tedavisine rehberlik etmek ve çoklu ilaca dirençli bakterilerin artan prevalansını ele almak için klinik laboratuvarlarda biyofilm oluşumunun izlenmesinin önemini vurgulamaktadır (Gedefie vd. 2023).

Bakteriyel biyofilmler, özellikle idrar yolu enfeksiyonları (İYE) gibi enfeksiyonlar bağlamında, yaşlı hastalarda yaygındır (Perry ve Tan 2023). Bakteriyel biyofilmi pozitif olan hastaların yaş ortalaması $28,24 \pm 8,51$ iken kontrol grubunun yaş ortalaması $25,64 \pm 6,17$ 'dir. Hastalar ile kontrol grubu arasında yaş ortalaması açısından anlamlı bir fark yoktur ($P = 0,083$). Öte yandan, mevcut sonuçlar, bu çalışmaya katılan pozitif bakteriyel biyofilm 48 (%48.0) hastalarının çoğunun 30 yaş üstü grupta yer aldığını göstermektedir. Mevcut sonuçlar, bakteriyel biyofilmin yaşlı hastalarda daha yaygın olduğunu göstermektedir ve biyofilmlerin yaşlı bireyleri etkileyen çeşitli enfeksiyonlarda önemli bir rol oynadığını gösteren çeşitli çalışmalarla tutarlıdır (Yeo vd. 2018, Zhang vd. 2016). Oumer vd. (2021), kalıcı üriner kateteri olan yaşlı hastalardan alınan numunelerin %80'inin mikroorganizmalar açısından pozitif olduğunu ve yüksek bir kısmının biyofilm üreterek kalıcı enfeksiyonlara yol açabildiğini tespit etmiştir. Ayrıca, kalıcı kateteri olan kronik geriatric hastalar üzerinde yapılan bir çalışmada, biyofilm üretebilen yüksek oranda Gram-negatif mikroorganizma bulunmuş ve yeni antimikrobiyal ajanlara duyulan ihtiyaç vurgulanmıştır (Cangui-Panchi vd. 2022). Geriatric hastalar, azalan bağışıklık sistemi nedeniyle daha yüksek bir prevalansa sahip olabilir (Schrack ve Branch-Elliman 2017).

Bakteriyel biyofilm oluşumunun yaygınlığı, farklı tıbbi durumlar arasında cinsiyete dayalı tutarlı bir tercih göstermemektedir. Kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonları (CA-UTI) üzerine yapılan çalışmalar, kadın cinsiyetin idrar sondalarında artmış biyofilm oluşumu riskiyle ilişkili olduğunu göstermektedir (Sengupta vd. 2022). Mevcut sonuçlar, bu çalışmaya kaydedilen pozitif bakteriyel biyofilimli hastaların 60'ının (%60,0) kadın

olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, kadın cinsiyetin biyofilm oluşumuyla ilişkili risk faktörü olduğunu ve dolayısıyla CAUTI riskini belirlediğini öne süren Gunardi vd. (2021) ile uyumludur.

Bakteriyel biyofilmler, farklı çevresel koşullara bağlı olarak kentsel ve kırsal alanlarda değişen yaygınlık göstermektedir. Mevcut çalışma, bakteriyel biyofilmlili hastaların 60'ının (%60,0) kentsel alanlardan geldiğini göstermektedir. Bu nedenle kentsel alanlardan gelen hastalarda en çok bakteriyel biyofilm görülmesi, antibiyotik direnç genlerinin (ARG'ler) yayılması ve biyofilm oluşumu için bir sıcak nokta olarak hastane atık suyunun varlığına bağlı olabilir (Buelow vd. 2023). Çalışmamız, bakteriyel biyofilm prevalansının kentsel alanlarda kırsal alanlara kıyasla daha yüksek olduğunu tespit eden Widyarman vd. (2021) ile tutarlıdır. Kentsel ortamlarda, çalışmalar kentleşmenin bakteriyel çeşitlilik ve topluluk kompozisyonunda değişimlere neden olduğunu ve kentsel alanlarda kırsal alanlara göre daha yüksek bakteriyel çeşitliliğe yol açtığını göstermiştir (Gao vd. 2023). Ayrıca, kentsel Birinci Basamak Sağlık Hizmeti Merkezlerinin (BSHM) kırsal BSHM'lere kıyasla daha yüksek bakteriyel hava kaynaklı kontaminasyona sahip olduğu ve örnekleme alanlarının çoğunun kentsel ortamlarda daha yüksek bakteri yükü gösterdiği bulunmuştur (Monteiro vd. 2021). Bu bulgular, kentsel alanların, potansiyel olarak artan insan aktivitesi, nüfus yoğunluğu ve kentleşmeyle ilişkili çevresel koşullar gibi faktörler nedeniyle daha yüksek bir bakteriyel biyofilm prevalansı barındırdığını göstermektedir.

Çalışmamızda, bakteriyel biyofilm prevalansının gram-negatif bakterilerde gram-pozitif bakterilere kıyasla daha yüksek olduğunu göstermektedir (66 (%66,0) vs 34 (%34,0)). Gram-negatif bakterilerin, antimikrobiyal ajanlara ve konakçı bağışıklık tepkilerine karşı bir savunma mekanizması olarak biyofilm oluşturdıkları ve bu sayede varlıklarını sürdürerek tekrarlayan enfeksiyonlara neden oldukları bilinmektedir (Ruhel ve Kataria 2021). Gram-negatif bakteriler, gram-pozitif bakterilere kıyasla daha sık biyofilm oluşturma eğilimindedir. Bu durum büyük ölçüde hücre duvarı yapıları ve bileşimlerindeki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Gram-negatif bakteriler, ek koruma ve esneklik sağlayan bir dış zara sahiptir ve bu da onları çeşitli ortamlarda biyofilm oluşturma konusunda daha becerikli hale getirir. Ayrıca, gram-negatif bakteriler

genellikle biyofilm oluşumuna yardımcı olan pili ve fimbriae gibi yapışkan yapılarla sahiptir (Pompilio vd. 2021). Buna karşılık, kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarında (CAUTI) gram-pozitif bakteriler daha düşük biyofilm oluşum oranları göstermiştir; gram- pozitif kokların %84,8'i ve gram-negatif basillerin %89,2'si biyofilm oluşurmaktadır (Pokharel vd. 2022).

Çalışmamızın sonuçları biyofilm içeren bakteriyel izolatların tür dağılımı, 36 (%36.0) *E. coli*, 22 (%22.0) *S. epidermidis*, 12 (%12.0) *S. aureus*, 16 (%16.0) *K. pneumoniae* ve 14 (%14.0) *Proteus mirabilis* şeklinde olmuştur. Ayrıca mevcut sonuçlar, biyofilm üreten bakterilerin çoğunun İYE'li hastalardan izole edildiğini göstermektedir. Bakteriyel biyofilmler, hastane enfeksiyonlarının yaklaşık %65'ini ve tüm mikrobiyal enfeksiyonların %80'ini oluşturan önemli bir İYE nedenidir (Mancuso vd. 2024). Üroepitel üzerinde bir biyofilm gelişir, bakteriler kendilerini idrarın mekanik akışından, konak savunmasından ve antibiyotiklerden koruyan bu biyofilmin içine girerek bakteriyel eliminasyonu zorlaştırır ve kolonizasyon ve persistansdan sorumlu hale gelir (Sharma vd. 2023). Çeşitli bakteri türleri, diğer çoklu ilaç direnci mekanizmalarından farklı olarak bir hayatta kalma stratejisi olarak biyofilmler oluşturabilir. Bu özellikle İYE'lerin en yaygın nedenlerinden birini temsil eden *E. coli* ile ilgilidir (Zhou vd. 2023). *E. coli*, menenjit, peritonit ve sepsiseminin yanı sıra bağırsak, bağırsak dışı, idrar yolu ve gastrointestinal enfeksiyonlar gibi hastalıklara neden olan fırsatçı veya gerçek bir patojen olarak hareket eder (Denamur vd. 2021). Örneğin, üropatojenik *E. coli* (UPEC) idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) en sık görülen nedenidir (Alvarez-Fraga vd. 2022). Önceki çalışmalar, biyofilmlerin *E. coli*'nin konakçı hücrelere yapışmasına yardımcı olduğunu, idrar akışıyla ilişkili kesme kuvvetlerine direndiğini ve bakterilerin kalıcılığına ve enfeksiyonun kronikleşmesine katkıda bulunduğunu göstermiştir (Behzadi vd. 2020). *E. coli* tarafından biyofilm oluşumu, çeşitli enfeksiyonların ortaya çıkmasına katkıda bulunur ve eradikasyonunu zorlaştırır. *E. coli* yüzey kolonizasyonuna katkıda bulunan farklı hücre dışı uzantılar gibi faktörler ve bunların hassas bir şekilde düzenlenen ekspresyonu ve aktivitesi, olgun biyofilm oluşumuna yol açmaktadır (Alshaikh vd. 2024).

E. coli enfeksiyonlara neden olur ve 'biyofilm' oluşumu nedeniyle ortadan kaldırılması zordur (Ballén vd. 2022). Biyofilm bir topluluk olarak birlikte yaşayan ve genellikle nemli ortamda katı yüzeylere bağlı olarak bulunan mikroorganizmaların bir toplamı olarak tanımlanır. Bir biyofilmdeki mikroplar, hayatta kalma etkinliklerini artıran hücre dışı polimerik madde adı verilen çeşitli koruyucu maddeler salgırlar (Sharma vd. 2023). Biyofilmdeki yoğun bakteri hücreleri, quorum sensing (QS) olarak bilinen kimyasal sinyal yolu aracılığıyla birbirleriyle iletişim kurar. QS sırasında, bakteri hücreleri hücre dışı ortama oto-indükleyici maddeler (AI) salgırlar ve gerekli yüksek yoğunluğa ulaşıldığında, biyofilm oluşumunu ve olgunlaşmasını yukarı doğru düzenlerler (Sturbelle vd. 2015). Daha da önemlisi, biyofilmler içindeki bakteri hücreleri, planktonik (serbestçe asılı duran) muadillerinden önemli ölçüde farklılık gösteren bir dizi ortaya çıkan özellik sergilemektedir (Flemming vd. 2016). Buna göre, biyofilmlerin birçok kronik enflamatuvar hastalığa katkıda bulunan önemli bir faktör olduğu ve halk sağlığı için çok sayıda ciddi sonuçlara yol açtığı bildirilmiştir (Vestby vd. 2020).

Mevcut sonuçlar, bakteriyel biyofilm enfeksiyonu olan hastaların 36'sında (%36,0) *Escherichia coli*'yi tespit etmek için 16S ribozomal RNA geninin rapor edildiğini göstermiştir. *E. coli* biyofilmleri birçok enfeksiyonun ana etkeni olarak bulunmuştur, örneğin *E. coli*'nin kateterler üzerinde biyofilm oluşturması kateter ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarını (CAUTI) en sık görülen hastane enfeksiyonlarından biri haline getirmektedir (Reisner vd. 2014). Çin'de, bazı çalışmalar insanlardan *E. coli* suşlarının izole edildiğini bildirmiştir; ancak, az sayıda çalışma, ilişkili biyofilm oluşturma yeteneği ile bağlantılı olarak bebeklerden ve dört yaşından küçük çocuklardan izole edilen *E. coli* suşlarını tanımlamıştır (Huang vd. 2016).

Staphylococcus epidermidis, memelilerin deri ve mukoza zarlarında kolonize olan kommensal bir bakteridir ve insanlarda bulunan en yaygın *stafilokok* türüdür. Epidemiyolojik çalışmalar, sağlıklı insanların herhangi bir zamanda 10 ila 24 farklı *S. epidermidis* suşu taşıdığını göstermiştir (Landemaine vd. 2023). Çok daha virülan olan ve bir dizi toksin ve diğer virülans faktörlerini sentezleyen *S. aureus*'un aksine, *S. epidermidis* ile ilişkili ana tanımlanmış virülans faktörü biyofilm oluşturma yeteneğidir

(Severn ve Horswill 2022). *S. epidermidis* biyofilmi, antibiyotiklerin zararlı etkilerine karşı dirençlidir ve konağın bağışıklık tepkisini engeller. Bu nedenle, *S. epidermidis* biyofilm aracılı enfeksiyonları olan hastaların tedavisi tipik olarak suç işleyen cihazın çıkarılmasını ve ardından değiştirilmesini içerir ve bu da morbiditede artışa neden olur. Neyse ki, son 10 yıl içinde genetik tekniklerindeki gelişmeler, araştırmacıların *S. epidermidis*'teki virülans mekanizmalarını, özellikle de biyofilm oluşumuna aracılık eden faktörleri incelemelerine olanak sağlamıştır (Oliveira vd. 2021).

Mevcut sonuçlar tüm *S. epidermidis* izolatlarının 22'sinin (%100.0) biyofilm ürettiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, izolatların (%6) güçlü biyofilm oluşturunca, altısının (%12) orta düzeyde biyofilm oluşturunca ve 36'sının (%72) zayıf biyofilm oluşturunca olduğunu, 5 (%10) izolatın ise biyofilm oluşturmadığını tespit eden Akbar vd. (2023) sonuçlarına benzerlik göstermektedir.

S. aureus, uzun zamandır insan enfeksiyonlarının sık görülen bir kaynağı olarak kabul edilen fırsatçı bir patojendir. *S. aureus*, insan florasının doğal bir bileşeni olmasına rağmen, nispeten küçük cilt enfeksiyonlarından felaketle sonuçlanabilecek sonuçlara kadar çok çeşitli hastalıklara neden olma potansiyeline sahiptir. Bu hastalıkların çoğu, uygun şekilde kontrol ve tedavi edilmezse hızla hayatı tehdit edici hale gelebilir (Moses vd. 2020). Bazı fenotipik ve genotipik göstergeleri kullanarak biyofilm oluşturma yeteneği, enfekte olmuş örneklerde antibiyotik direncinin, özellikle de metisilin direncinin yayılmasıyla ilgilidir. *Staphylococcus aureus*'un sağlığı tehdit etme kabiliyeti ile ilgili temel endişelerden biridir. Biyofilm yapılarının oluşturulmasında çok katmanlı birimlerin oluşumu göz önünde bulundurulduğunda, biyofilm örneklerinin genişlemesi, enfeksiyonun artmasında ve antibiyotik direncinin genişlemesinde anahtar ve gösterge bir adım olarak kabul edilebilir (Lister ve Horswill 2014).

Biyofilm olgunlaşması hücre bölünmesi ve hücre dışı polimerik matris üretimi yoluyla gerçekleşir. Biyofilm matrisinin bileşimi suşlar arasında değişmekle birlikte genellikle konak faktörleri, polisakkaritler, proteinler ve hücre dışı DNA (eDNA) içerebilir (Cue vd. 2012). *Stafilokoklar* tarafından biyofilmlerin üretilmesi ve sürdürülmesinde çeşitli genler rol oynamaktadır; bunlardan en yaygın olarak çalışılanları, biyofilm içindeki

bakteri hücrelerini çevreleyen ekzopolisakkarit matrisinin birincil bileşeni olarak N-asetil glukozamin içeren polisakkarit hücreler arası yapışma (PIA) üretiminden sorumlu *icaA* ve *icaD* (hücreler arası yapışma A ve B) genleridir (Tang vd. 2013).

Mevcut sonuçlar, incelenen tüm *S. aureus* 12'nin (%100) biyofilm ürettiğini göstermektedir. Bu sonuçlar, incelenen tüm MRSA suşlarının (n=32) (%100) biyofilm ürettiğini gösteren Hamad (2023)'ın sonuçlarıyla tutarlıdır. Biyofilm üreten *S. aureus*'un bağışıklık sistemine ve antibiyotiklere karşı bir savunma görevi gördüğü için kronik veya kalıcı enfeksiyonlara neden olduğu düşünülmektedir (Piechota vd. 2018). *Staphylococcus aureus*'un biyofilm oluşturma kabiliyetinin yüksek olması, enfeksiyonların ortaya çıkmasında ve çoklu antibiyotik suşlarının oluşmasında özellikle önemli olabilir. *Staphylococcus aureus* bakterisinin bir hastane patojeni olarak önemi ve klinik izolatlarda artan antibiyotik direnci göz önüne alındığında, biyofilm oluşumunu ve bakterilerin hastane araçlarında ve ortamında kolonizasyonunu önlemek için uygun şekilde gözlemlenmesi önerilmektedir (Hamad 2023).

K. pneumoniae'nin birincil tanımlanması biyokimyasal testler gibi fenotipik belirteçlere bağlıdır ve bu da bazen yanlış tanımlamaya neden olabilir. Klinik olarak önemli bakterilerin tanımlanması için çeşitli moleküler yaklaşımlar önerilmektedir. Örneğin, doğru tür tanımlaması için yaygın olarak kullanılan *16S rRNA geni* (de Melo vd. 2017). *K. pneumoniae* çok sayıda virülans faktörüne sahiptir ve *K. pneumoniae* patogeneğinde yer alan birçok gen keşfedilmiştir. Ancak virülanstaki rolleri henüz ortaya çıkarılmamıştır (Liu vd. 2017). Biyofilmler olarak bilinen karmaşık yüzey ilişkili topluluklar, vücudun bağışıklık sistemine ve çevredeki ortam tarafından üretilen baskılara karşı bir savunma biçimi olarak hizmet edebilen hücre dışı matris içerir (Choby vd. 2020).

Biyofilm oluşumunun genetik temeli tam olarak anlaşılmamış olsa da, *K. pneumoniae* tarafından biyofilm üretimi yaygın olarak anlaşılmıştır. *K. pneumoniae* tarafından üretilen biyofilm, organizmaların gastrointestinal, solunum ve idrar yollarında kolonize olmasını sağladığından, biyofilmin enfeksiyonun invazivliğini artırması mümkündür (Huang vd. 2014).

Mevcut sonuçlar, bakteriyel biyofilm enfeksiyonu olan hastaların 16'sında (%16,0) *K. pneumoniae*'yı tespit etmek için 16S ribozomal RNA geninin rapor edildiğini göstermiştir. Alansary ve Al-Saryi (2022), *K. pneumoniae*'nın sadece %33'ünün biyofilm ürettiğini göstermiştir.

P. mirabilis, komplike idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) yaygın bir nedenidir ve farklı yüzeylerin kolonizasyonuna katılabilecek geniş ve karmaşık bir virülans faktörleri yelpazesi sergiler. Bu durum, kateterle ilişkili idrar yolu enfeksiyonları (CAUTI) geliştirebilen uzun süreli kalıcı üriner kateterizasyon uygulanan hastalarda özellikle sorun teşkil etmektedir. Bu tür enfeksiyonlar, *P. mirabilis*'in kristal biyofilmler oluşturma konusundaki benzersiz yeteneği nedeniyle karmaşıklaşır ve sonunda kateterlerin kabuklanmasına ve tıkanmasına neden olur (Jamil vd. 2020). *P. mirabilis* tarafından bağırsak kolonizasyonu, periüretal bölgenin aralıklı kolonizasyonu için bir rezervuar sağlar. Yerleştirme sırasında üriner kateterler, daha sonra idrar kesesine bulaşan organizma tarafından kontamine olur. Kateter yüzeyine veya mesane epiteline yapışma, ekzopolisakkarit üretimini ve biyofilm oluşumunu indükler (Nicolle 2014). *P. mirabilis* özellikle kendine özgü kümelenme yeteneği ile tanınmaktadır. Organizmanın katı yüzeylerde büyümesi, kısa çubuk şeklindeki "yüzücü hücrelerin" çok hücreli sallar halinde hizalanabilen oldukça uzun ve hiper-kanatlı "swarmer hücrelere" dönüşmesini tetikler. Bu nedenle sürü halinde hareket kabiliyeti, *P. mirabilis*'in periüretal bölgeden kateter yüzeyi boyunca idrar kesesine göçünü kolaylaştırarak CAUTI'leri başlatabilir. Mutasyonlar nedeniyle sürme yeteneğinin kaybı, *P. mirabilis*'in kateter yüzeyleri üzerinden göç edememesiyle ilişkilendirilmiştir. Ayrıca, swarmer hücreler genellikle virülans faktörlerinin daha yüksek ekspresyonunu göstermekte ve bu da kateter yüzeylerine ve mesane epiteline yapışma yeteneklerini daha da artırmaktadır. Bununla birlikte, bazı çalışmalar *P. mirabilis*'in kateter yüzeylerine bağlı kalması ve biyofilm oluşumunu başlatması için sürünün bastırılması gerektiğini bulmuştur (Wasfi vd. 2020).

Mevcut sonuçlar, bakteriyel biyofilm enfeksiyonu olan hastaların 14'ünde (%14,0) *P. mirabilis*'i tespit etmek için 16S ribozomal RNA geninin rapor edildiğini göstermiştir. Bu sonuçlar, idrar yolu enfeksiyonlu hastaların (%15,83) *P. mirabilis* olarak tanımlandığını, tüm izolatların *ureC* *genine* sahip olduğunu ve yüksek bir yüzdesinin

biyofilm oluşumu ve sürü fenomeni için pozitif sonuçlar gösterdiğini gösteren Sanches vd. (2019)'un sonuçlarıyla benzerlik göstermektedir. Başka bir çalışmada, virülans faktörleri açısından test edilen örnekler arasında *P. mirabilis* izolatlarının yaygınlığı (%20,0) bildirilmiş ve tüm izolatların spesifik virülans genleri sergilediği görülmüştür (Al Obeidi vd. 2023). Ayrıca, *P. mirabilis* biyofilmi oluşumu üzerine yapılan araştırmalar, kamçının bu süreçte rol oynadığını, ancak yokluğunun biyofilm oluşumunu tamamen engellemediğini göstermiştir (Scavone vd. 2023).

Enfeksiyonlar yaygındır ve önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Bu nedenle bakteriyel enfeksiyonları önlemeye yönelik girişimler makuldür ve son yıllarda özellikle antibiyotik profilaksisi kullanan başarılı stratejiler geliştirilmiştir. Ancak antibiyotik profilaksisi, özellikle uzun süreli tedavilerde, bakteriyel direnç gelişimi başta olmak üzere yan etkilerden yoksun değildir. Bu sadece genel popülasyonda değil, profilaktik antibiyotiklerin etkinliğini azaltan ve morbidite ve mortaliteyi artıran dünya çapında ciddi bir sorundur. Bakteriyel direnci en aza indirmek için, antibiyotik profilaksisini yüksek risk gruplarıyla sınırlayan kapsamlı önleme stratejileri geliştirmek amacıyla enfeksiyon için risk faktörlerini belirlemek önemlidir (Fernandez vd. 2016). Bağışıklık tepkisini değiştirebilen genetik varyantlar ile enfeksiyonların görülme sıklığı arasındaki ilişki son yıllarda giderek artan bir ilgi görmektedir. Son çalışmalar, NOD2 (nükleotid bağlayıcı oligomerizasyon alanı içeren), TLR2 ve NDP52'nin (nükleer nokta proteini 52 kDa) bazı genetik varyantlarının, muhtemelen bağırsak bariyerindeki ve bağışıklık yanıtındaki değişiklikler yoluyla spontan bakteriyel peritonite yatkınlıkta rol oynadığını göstermiştir (Lutz vd. 2016). TLR4'ün genetik polimorfizmlerinin varlığının da gram negatif basillerden gelen LPS'ye karşı bağışıklık tepkisini değiştirdiği düşünülmektedir (Guarner-Argente vd. 2010).

Tolllike reseptörler (TLR) monositler, makrofajlar ve nötrofiller üzerinde bulunan bir transmembran reseptör ailesidir ve doğuştan gelen bağışıklık yanıtında önemli bir rol oynar. Ana işlevleri, lipopolisakkarit (LPS), lipoproteinler ve peptidoglikanlar gibi patojenle ilişkili moleküler kalıpların (PİMK'ler) tanınmasıdır (Wicherska-Pawłowska vd. 2021). TLR4 özellikle gram negatif basillerden gelen LPS'yi tanır. TLR4'ün genetik polimorfizmlerinin varlığının bazı popülasyonlarda enfeksiyon geliştirme duyarlılığını

artırdığına inanılmaktadır (Piñero vd. 2017). Daha önce yapılan retrospektif bir çalışmada, TLR4 polimorfizminin varlığı ile bakteriyel enfeksiyonlara yatkınlık arasında bir ilişki bulunmuştur (Guarner-Argente vd. 2010).

Bildiğimiz kadarıyla bu çalışma Irak'ta yapılan ilk çalışmadır ve *TLR4-(rs10759932)* farklı genetik modellerde bakteriyel biyofilm enfeksiyonu riskine karşı artan duyarlılıkla önemli ölçüde ilişkilendirilmiştir. İlginç bir şekilde, *TLR4-(rs10759932)* 10 ila 45 yaş arası Iraklı popülasyonlarda bakteriyel enfeksiyon riskini belirgin bir şekilde artırmıştır, *TLR4-(rs10759932)*'deki genetik varyasyon bakteriyel enfeksiyon gelişme riskini etkilemektedir.

Çalışma, *TLR4-(rs10759932)* içindeki yaygın genetik varyantların Irak popülasyonunda bakteriyel enfeksiyon riski oluşturduğunu bildirmektedir. Önceki çalışmalar, TLR4'ün işlevsizliğini gösteren işlevsel kanıtlarla desteklenen TLR4 polimorfizmlerinin bakteriyel enfeksiyondaki rollerini araştırmıştır (Liu vd. 2024). Oldukça kısa bir süre içinde, birkaç araştırma grubu *TLR4-(rs10759932)* polimorfizmlerinin önemi üzerinde çalışmış ve hastalık gelişimi ile güçlü bir ilişki olduğunu öne sürmüştür (Varshney vd. 2022). Bu nedenle mevcut çalışma tarafından bildirilen sonuçlar yeni bir replikasyon görevi görmektedir ve *TLR4-(rs10759932)* ile bakteriyel enfeksiyon arasında gözlemlenen ilişkiye güç katmaktadır. *TLR-4'te (rs10759932), (rs11536889), (rs1927911) ve (rs2737190)* dahil olmak üzere yaygın olarak bilinen birkaç SNP vardır. Buna göre, *TLR4-(rs10759932)* seçilmiş ve *TLR4-(rs10759932)*'deki genetik varyantların bakteriyel enfeksiyon duyarlılığını tahmin etmek için potansiyel bir genetik belirteç olup olamayacağını belirlemek için T-ARMS-PCR analizi kullanılarak bakteriyel enfeksiyon riski ile genetik ilişkileri değerlendirilmiştir.

TLR4-(rs10759932) polimorfizminin gen ve alel frekansları, bu çalışma için bakteriyel enfeksiyonu olan 100 hastada ve 100 sağlıklı kontrolde ölçülmüştür (Şekil 4.10). Pulmoner ile ilgili olarak, genel olarak, hastalar ve sağlıklı kontroller arasında *TLR4-(rs10759932)* genotip frekanslarının dağılımında istatistiksel olarak anlamlı farklılıklar bulunabilir. Bu sonuçlar, *TLR4-(rs10759932)* polimorfizminin bakteriyel enfeksiyona karşı artan bir duyarlılıkla ilişkili olduğunu göstermiştir.

TT, TC ve CC genotiplerinin frekansları, vakalar ve kontroller arasında sırasıyla 38, 10, 52 ve 65, 26, 9 olarak ortaya çıkmıştır. *TLR4*-(*rs10759932*) polimorfizmi yüksek bakteriyel enfeksiyon riski ile anlamlı şekilde ilişkiliydi (CC vs TT: OR = 9.88; %95 CI = 4.38-22.28). Bakteriyel enfeksiyonu olan hastalar arasında CC genotipinin 52 (%52,0) daha fazla bulunması, mevcut çalışma grubunda bu alel için yüksek bir taşıyıcılık oranı olduğunu göstermektedir. Öte yandan, mevcut sonuçlar *TLR4*-(*rs10759932*) varyantı C aleli ile daha yüksek bakteriyel enfeksiyon riski arasında anlamlı bir ilişki olduğunu göstermiştir (OR= 4.70; %95 GA= 3.03-7.27). Bu sonuçlar, *TLR4*-(*rs10759932*) CC genotipinin hasta grubunda sağlıklı kontrole kıyasla daha yüksek olduğunu ve farkların anlamlı olduğunu gösteren Al-Hasnawi ve Al-Hasnawy (2019) ile tutarlıdır (OR= 12.55; %95 GA= 0.6697 ila 235.2). Ayrıca C aleli bakteriyel enfeksiyonu olan hasta grubunda daha yüksektir (37 (%46,3) vs 17 (%21,3)).

TLR4, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *A. baumannii* ve *P. aeruginosa* gibi patojenik mikrobiyal enfeksiyonlara karşı hem doğal hem de adaptif bağışıklığı aktive ederek konak savunma mekanizmalarında anahtar rol oynayan bir tip I transmembran proteindir. Bazı bağışıklık ve inflamatuvar hastalıklarda önemli bir rol oynar. Birçok çalışma *TLR4* gen polimorfizmlerinin fonksiyonel önemini bildirmiştir. Önceki çalışmalar, *TLR4* *geninin* promotör bölgesinde bulunan iki SNP'nin lipopolisakkarite karşı hipo yanıtılığa yol açabileceğini bildirmiştir (Wang vd. 2014). Bu SNP'lerin bakteriyel enfeksiyon gelişimine olası katılımı yaygın olarak rapor edilmiştir (Guarner-Argente vd. 2010, Yuan vd. 2008).

TLR4 geninde yaklaşık birkaç Tek Nükleotid Polimorfizmi (SNP) tanımlanmış ve fonksiyonel çalışmalar bunlardan bazılarının *TLR4*'ün işlevinde değişikliklere yol açabileceğini ortaya koymuştur (Wang vd. 2014). Buna göre, *TLR4*'teki (*rs12377632*) genetik varyantların bakteriyel enfeksiyona yatkınlığı tahmin etmek için potansiyel bir genetik belirteç olup olamayacağını belirlemek için *TLR4* (*rs12377632*) seçilmiş ve bakteriyel enfeksiyon riskiyle genetik ilişkileri T-ARMS-PCR analizi kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada üç genotipin dağılım analizi, kontroller arasında TT, TC ve CC genotipik frekansını 58, 30 ve 12 olarak ortaya koyarken, hastalarda genotip frekansları sırasıyla 38, 18 ve 44'tür (Şekil 4.11). Genel olarak, mevcut sonuçlar, *TLR4*

geninin aday *rs12377632* SNP'si için bakteriyel enfeksiyon riski ile istatistiksel olarak anlamlı ilişkilerin gözlemlendiğini göstermektedir ($P < 0.05$). TLR4'teki *rs12377632*, promotör bölgedeki konumu göz önüne alındığında TLR4 ekspresyonu veya sinyal aktivitesi üzerinde işlevsel sonuçlara sahip olabilir. Bu durum yalnızca doğuştan gelen bağışıklığı ve enflamasyonu etkileyebilir ve bu da bakteriyel enfeksiyon şiddetini ve ilerlemesini etkileyebilir. Sonuçlarımız, *rs10759932*, *rs7873784*, *rs12377632*, *rs1927907* ve *rs1153879*'un bakteriyel enfeksiyona duyarlılıkla ilişkili olduğuna dair hiçbir kanıt bulamayan Wang vd. (2014)'ün sonuçlarıyla tutarsızlık göstermektedir.

Homozigot CC genotipi hasta gruplarında kontrol grubuna kıyasla daha sık görülmüştür (sırasıyla 44'e karşı 12). Dolayısıyla, CC genotipi Çizelge 4.8'de gösterildiği gibi 5,59'luk bir olasılık oranıyla (%95 güven aralığı 2,62-11,94) bakteriyel enfeksiyon için bir risk faktörüdür. Mevcut sonuçlar, CC genotipinin Japon popülasyonunda orta ve şiddetli periodontitis ile ilişkili olduğunu öne süren Fukusaki vd. (2007) ile uyumludur. Hishida vd. (2011)'de, CC genotipinin *Helicobacter pylori* enfeksiyonuna bağlı şiddetli gastrik atrofi ile ilişkili olabileceğini göstermiştir. Zhou vd. (2011)'de, TLR genlerindeki polimorfizmlerin karaciğer naklinden sonra hepatit B virüsü nüksü ile ilişkili olup olmadığını incelemişlerdir. Bir SNP'nin karaciğer naklinden sonra hepatit B virüsü nüksü ile anlamlı bir ilişkisi olduğunu göstermişlerdir. Karaciğer nakli sonrası hepatit B virüsü nüksü, CC genotipine sahip hastalarda diğer genotiplere kıyasla daha yüksek olarak ortaya çıkmıştır.

Ayrıca, C aleli her iki hasta grubunda da kontrol grubuna kıyasla daha sık görülmüştür (sırasıyla 106'ya karşı 54) ve aradaki fark anlamlıdır ($P < 0.05$). Dolayısıyla, C aleli 3,05'lik bir odds oranıyla bir risk faktörüdür. Bu da, C aleline sahip bireylerin T aleline sahip bireylere kıyasla bakteriyel enfeksiyon geliştirme olasılığının yaklaşık üç kat daha fazla olduğu anlamına gelmektedir.

DNA dizileme yöntemi, NCBI-Genbank ile ilişkili suşlarla karşılaştırılan üropatojen bakteri izolatlarındaki biyofilm oluşum genlerindeki genetik ilişkileri ve varyasyon analizini tanımlamak için kullanılmıştır.

Filogenetik ağaç analizi, üropatojenik bakteri izolatlarındaki biyofilm oluşum genlerinin genetik ilişkilerini ve varyasyonlarını araştırmıştır. Analiz edilen genler *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus epidermidis*'ten *icaA*, *fimH*, *MrpA*'dır.

Staphylococcus aureus izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%99,75) ve minimal genetik varyasyonlarla (%0,25) yakın ilişkiler göstermiştir. *Klebsiella pneumoniae* izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%98.01 ila %98.03 arasında değişen) ve minimal genetik varyasyonlarla (%1.97 ila %1.99) yakın ilişkiler göstermiştir. *Escherichia coli* izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%98,77 ile %99,18 arasında) ve minimal genetik varyasyonlarla (%0,82 ile %1,33 arasında) yakın ilişkiler göstermiştir. *Proteus mirabilis* izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%99,72) ve minimal genetik varyasyonlarla (%0,28) yakın ilişkiler göstermiştir. *Staphylococcus epidermidis* izolatları (IQN.1-IQN.3) NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji dizisi özdeşliği (%99,22 ile %99,74 arasında değişen) ve minimal genetik varyasyonlarla (%0,26 ile %0,78 arasında) yakın ilişkiler göstermiştir.

Son olarak analiz, üropatojenik bakteri izolatlarının NCBI-Genbank'taki referans suşlarla yüksek homoloji gösterdiğini ve yakın bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur.

Bu çalışma, Irak'ta yapılan ilk çalışmadır. TLR4-(rs10759932), farklı genetik modellerde bakteriyel biyofilm enfeksiyonu riskine karşı artan duyarlılıkla önemli ölçüde ilişkilendirilmiştir. Bu çalışma, Irak popülasyonunda bakteriyel enfeksiyon riskini artıran TLR4-(rs10759932) içindeki yaygın genetik varyantları bildirmektedir.

Gram boyama yöntemine göre, bakteriyel biyofilm oluşumu için gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin tür dağılımı incelenmiştir. Mevcut sonuçlar, gram-negatif bakterilerin, gram-pozitif bakterilere göre biyofilm oluşturma eğilimlerinin daha yüksek

olduğunu göstermektedir. Ayrıca, mevcut sonuçlar, kadın cinsiyetinin biyofilm oluşumuyla ilişkili bir risk faktörü olduğunu öne sürmektedir.

Bakteriyel biyofilm enfeksiyonu olan hastaların tür dağılımı, farklı bakteriyel türlerin 16SrRNA genlerinin tespiti için yapılan PCR sonuçlarına göre incelendiğinde, *Escherichia coli*'nin 16S ribozomal RNA geninin en sık izole edilen bakteri olduğu ve biyofilm oluşumu için pozitif sonuç gösteren yüksek bir yüzdeye sahip olduğu, ardından *Staphylococcus epidermidis* ve *Klebsiella pneumoniae*'in geldiği, *Proteus mirabilis* ve *Staphylococcus aureus*'un ise en az sıklıkta olduğu görülmüştür.

TLR4-rs10759932 SNP'ye ilişkin genotip ve alel frekanslarının, dominant modelde hastalar ve sağlıklı kontrol grupları arasında karşılaştırılmasında, genotiplerin frekans dağılımında hastalar ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p = 0.001$). Risk analizi, homozigot CC genotipinin önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur ($OR = 9.88$). Bu, homozigot CC genotipine sahip hastaların, diğer genotiplere sahip hastalara kıyasla hastalık geliştirme olasılığının yaklaşık on kat daha yüksek olduğunu göstermektedir.

TLR4-rs12377632 SNP genotipleri ve alel frekanslarının, ko-dominant modda, hastalar ve sağlıklı kontrol grupları arasındaki karşılaştırılmasında, genotiplerin frekans dağılımı arasında anlamlı bir fark bulunmuştur ($p = 0.001$). Risk analizi, homozigot CC genotipinin önemli bir risk faktörü olduğunu ortaya koymuştur ($OR = 5.59$). Bu, homozigot CC genotipine sahip hastaların, diğer genotiplere sahip hastalara kıyasla hastalığa yakalanma olasılığının yaklaşık altı kat daha fazla olduğunu göstermektedir.

Enfeksiyon hastalarında biyofilm oluşumunda bakterilerin ve TLR4 gen polimorfizmlerinin ilişkisi- Irak/Thi-Qar Şehir Hastanesi Örneği'nde yapılan çalışmamız, Biyofilm oluşturan bakteriler ile TLR4 reseptörü arasındaki ilişki TLR4 genlerine dayalı olarak biyofilmle ilişkili enfeksiyonlara daha duyarlı bireylerin tanımlanmasına ve TLR4 varyasyonlarına rağmen biyofilm karşısında bağışıklık yanıtını artıran hedeflenmiş tedavilerin geliştirilmesi konusunda bir öncü niteliğindedir.

Ayrıca, Anti-biyofilm stratejilerini anlamak, biyofilm yapısını parçalamaya ve bakterileri antibiyotiklere duyarlı hale getirmeye yardımcı olabileceği ortaya konulmuştur. Çünkü biyofilm oluşturan bakteriler ile TLR4 reseptörü arasındaki etkileşim mekanizmalarını anlamak, bakteriyel enfeksiyonlarla ilişkili kronik hastalıklar için yeni ve daha etkili tedavilerin geliştirilmesi açısından önemlidir. TLR konusu yeni bir alandır. Bunların biyofilm gibi hastalık yapıcı etmenlerle ilişkileri konusunu pekiştirmek amacıyla daha fazla araştırma yapılması da gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdulhussein, N. and Mahdi, M. 2023. Isolation and identification of multi-drug resistance *Acinetobacter baumannii* isolated from clinical samples at Baghdad, Iraq. *Journal of Applied and Natural Science*, 15(2): 663-671.
- Aderem, A. and Ulevitch, R. J. 2000. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*, 406(6797): 782-787.
- Agarwal R., Gupta E., Rathore R.S., Ashopa V., Gupta E., Prakash P. 2022. To study drug resistance & biofilm production in gram negative isolates from clinical samples. *Indian Journal of Microbiology Research*, 9(3): 200-206.
- Akbar U., Haque A. and Liaquat S. 2023. Biofilm Formation by *Staphylococcus epidermidis* and Its Inhibition Using Carvacrol, 2-Aminobenzimidazole, and 3-Indole Acetonitrile. *ACS Omega*, 8: 682–687
- Akers, K. S., Mende, K., Cheattle, K. A., Zera, W. C., Yu, X., Beckius, M. L. and Infectious Disease Clinical Research Program Trauma Infectious Disease Outcomes Study Group. 2014). Biofilms and persistent wound infections in United States military trauma patients: a case–control analysis. *BMC Infectious Diseases*, 14: 1-11.
- Akira, S., Uematsu, S. and Takeuchi, O. 2006. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124(4): 783-801.
- Al Obeidi, D.N., Alzubaidy, Z.M., Ammari, A. 2023. Molecular detection of some virulence factors of uropathogenic *Proteus mirabilis* using PCR technique. *AIP Conference Proceedings.*, 2475: 41-46.
- Alansary, I.M. and Al-Saryi, N.A. 2022. Detection of Biofilm Formation in Classical and Hypervirulent *K. pneumoniae*. *Al-Mustansiriyah Journal of Science*, 23(5): 65-71.
- Al-Hasnawi, A. and Al-Hasnawy, H. 2019. Role of Toll Like Receptor-9 Gene Polymorphism among Patients with Exacerbation Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Holy Karbala, Iraq. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 6 (10): 1-7.
- Alhede, M., Kragh, K. N., Qvortrup, K., Allesen-Holm, M., van Gennip, M., Christensen, L. D. and Bjarnsholt, T. 2011. Phenotypes of non-attached

- Pseudomonas aeruginosa* aggregates resemble surface attached biofilm. PloS One, 6(11): e27943.
- Al-Jamei, S. A., Albsoul, A. Y., Bakri, F. G., and Al-Bakri, A. G. 2019. Extended-spectrum β -lactamase producing *E. coli* in urinary tract infections: A two-center, cross-sectional study of prevalence, genotypes and risk factors in Amman, Jordan. Journal of Infection and Public Health, 12(1): 21-25.
- Allami, R. H., Abdullah, M. N., Al-Ani, B. K., AlChalabi, R. and Hamzah, S. S. 2023. Study of the association of toll like-4 receptor gene polymorphism (rs1927911) and susceptibility to urinary tract infection among Iraqi patients. Biomedicine, 43(1): 221-224.
- Al-Nakeeb, N. K., Radi, J., Hamdan, K. and Fouad, Z. 2018. Clinical and immunological effects of experimental infection with *Klebsiella pneumoniae* in lambs in Iraq. Al-Qadisiyah Journal of Veterinary Medicine Sciences, 17(1): 44-48.
- Alshaikh S.A., El-banna T. and Sonbol F. 2024. Correlation between antimicrobial resistance, biofilm formation, and virulence determinants in uropathogenic *Escherichia coli* from Egyptian hospital. Annals Clinical Microbiology Antimicrobial, 23: 20-24 .
- Alvarez-Fraga L., Phan M.D. and Goh K.G.K. 2022. Differential Afa/Dr fimbriae expression in the multidrug-resistant *Escherichia coli* ST131 clone. Biology., 13: e0351921
- Arancibia, S. A., Beltrán, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F. and Hermoso, M. A. 2007. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. Biological Research, 40(2): 97-112.
- Armbruster, C. E., Mobley, H. L. and Pearson, M. M. 2018. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* infection. EcoSal Plus, 8(1): 55-59.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, 392(6673): 245-252.
- Baselga, R., Albizu, I. and Amorena, B. 1994. *Staphylococcus aureus* capsule and slime as virulence factors in ruminant mastitis. A review. Veterinary Microbiology, 39(3-4): 195-204.

- Behlau, I. and Gilmore, M. S. 2008. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. *Archives of Ophthalmology*, 126(11): 1572-1581.
- Behzadi P., Urban E., Gajdacs M. 2020. Association between biofilm-production and antibiotic resistance in uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): an in vitro study. *Diseases*. 8(2):17.
- Berdeli, A., Emingil, G., Han Saygan, B., Gürkan, A., Atilla, G., Köse, T. and Baylas, H. 2007. TLR2 Arg753Gly, TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile gene polymorphisms are not associated with chronic periodontitis in a Turkish population. *Journal of Clinical Periodontology*, 34(7): 551-557.
- Bitrus, A. A., Zunita, Z., Bejo, S. K., Othman, S. and Nadzir, N. A. A. 2017. In vitro transfer of methicillin resistance determinants *mec A* from methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) to methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA). *BMC Microbiology*, 17: 1-10.
- Blander, J. M. and Medzhitov, R. 2004. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science*, 304(5673): 1014-1018.
- Blasius, A. L. and Beutler, B. 2010. Intracellular toll-like receptors. *Immunity*, 32(3): 305-315
- Bonham, K. S., Orzalli, M. H., Hayashi, K., Wolf, A. I., Glanemann, C., Weninger, W. and Kagan, J. C. 2014. A promiscuous lipid-binding protein diversifies the subcellular sites of toll-like receptor signal transduction. *Cell*, 156(4): 705-716.
- Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L. and Kolter, R. 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology*, 13(1): 20-26.
- Buelow E., Dauga C. and Carrion C. 2023. Hospital and urban wastewaters shape the matrix and active resistome of environmental biofilms. *Water Research* 244 (2023) 120408.
- Cangui-Panchi S.P., Ñacato-Toapanta A.L., Enríquez-Martínez L.J. and Reyes J. 2022. Biofilm-forming microorganisms causing hospital-acquired infections from intravenous catheter: A systematic review. *Current Research Microbiological Sciences*, 3: 100175.
- Cavanagh, J. P., Pain, M., Askarian, F., Bruun, J. A., Urbarova, I., Wai, S. N. and Johannessen, M. 2019. Comparative exoproteome profiling of an invasive and a

- commensal *Staphylococcus haemolyticus* isolate. *Journal of Proteomics*, 197: 106-114.
- Choby J.E., Howard-Anderson J., Weiss D.S. 2020. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* - clinical and molecular perspectives. *J Intern Med*. 287(3):283-300.
- Choe, J., Kelker, M. S. and Wilson, I. A. 2005. Crystal structure of human toll-like receptor 3 (TLR3) ectodomain. *Science*, 309(5734): 581-585.
- Clarke, K. 2015. "Catheter-Associated Urinary Tract Infections (CAUTIs." *Austin Journal of Clinical Medicine* 2(1): 1021–22
- Cobos-Trigueros, N., Zboromyrska, Y., Morata, L., Alejo-Cancho, I., Calle, C. D. L., Vergara Gómez, A. and Martínez, J. A. M. M. 2017. Time-to-positivity, type of culture media and oxidase test performed on positive blood culture vials to predict *Pseudomonas aeruginosa* in patients with Gram-negative bacilli bacteraemia. *Revista Espanola de Quimioterapia*, 30(1): 9-13.
- Cochrane, C. A., Freeman, K., Woods, E., Welsby, S. and Percival, S. L. 2009. Biofilm evidence and the microbial diversity of horse wounds. *Canadian Journal of Microbiology*, 55(2): 197-202.
- Crowley, E., Bird, P., Fisher, K., Goetz, K., Boyle, M., Benzinger, Jr, M. J., . and Johnson, R. 2012. Evaluation of the VITEK 2 Gram-negative (GN) microbial identification test card: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 95(3): 778-785.
- Cue D.R., Lei M.G., Lee C. 2012. Genetic regulation of the intercellular adhesion locus in staphylococci. *Frontiers Cell Infection Microbiology*, 2: 38-51.
- Daniel W.W., 2009. *Biostatistics: A Foundation for Analysis in the Health Sciences*, John Wiley and Sons New York, 412 page, USA.
- Darouiche RO. 2004. Treatment of infections associated with surgical implants. *New England Journal of Medicine*, 350: 1422-1429.
- Dayan, G. H., Mohamed, N., Scully, I. L., Cooper, D., Begier, E., Eiden, J. and Anderson, A. S. 2016. *Staphylococcus aureus*: the current state of disease, pathophysiology and strategies for prevention. *Expert Review of Vaccines*, 15(11): 1373-1392.

- De Melo F., do Nascimento C., Souza D.O., de Albuquerque R.F. 2017. Identification of oral bacteria on titanium implant surfaces by 16S rDNA sequencing. *Clinical Oral Implants Research*, 28(6): 697-703.
- Denamur E., Clermont O. and Bonacorsi S. 2021. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Review of Microbiology*, 19(1): 37–54.
- Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9): 881.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2): 167-193.
- Fattorini, C., Lopez-Beltran, A. and Raspollini, M. R. 2020. Urothelial Carcinoma, Sarcomatoid Type. *Uropathology*, 491-493.
- Fazli, M., Bjarnsholt, T., Kirketerp-Møller, K., Jørgensen, A., Andersen, C. B., Givskov, M. and Tolker-Nielsen, T. 2011. Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 19(3): 387-391.
- Federle, M. J. and Bassler, B. L. 2003. Interspecies communication in bacteria. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(9): 1291-1299.
- Fernandez J., Tandon P., Mensa J., Garcia-Tsao G. 2016. Antibiotic prophylaxis in cirrhosis: Good and bad. *Hepatology*, 63: 2019-2031
- Fitzgerald, K. A. and Kagan, J. C. 2020. Toll-like receptors and the control of immunity. *Cell*, 180(6): 1044-1066.
- 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., 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.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. and Hultgren, S. J. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5): 269-284.
- Forbes, B. A., Sahm, D. F. and Weissfeld, A. S. 2007. *Diagnostic microbiology*. St Louis: Mosby, pp. 288-302, UK.

- 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.
- Fukui, R., Yamamoto, C., Matsumoto, F., Onji, M., Shibata, T., Murakami, Y. and Miyake, K. 2018. Cleavage of toll-like receptor 9 ectodomain is required for in vivo responses to single strand DNA. *Frontiers in Immunology*, 9: 1491.
- Fukusaki T., Ohara N., Hara Y., Yoshimura A., Yoshiura K. 2007. Evidence for association between a Toll-like receptor 4 gene polymorphism and moderate/severe periodontitis in the Japanese population. *J Periodontal Res*, 42(6): 541–545.
- Gao D., Zhang N. and Liu S. 2023. Urbanization Imprint on Soil Bacterial Communities in Forests and Grasslands. *Forests*, 14(1): 38.
- Garrett, T. R., Bhakoo, M. and Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Progress in Natural Science*, 18(9): 1049-1056.
- Gedefie A., Alemayehu E., Mohammed O. and Bambo G.M. 2023. Prevalence of biofilm producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 18(11): e0287211.
- Giamarellos-Bourboulis, E. J. 2010. What is the pathophysiology of the septic host upon admission?. *International journal of antimicrobial agents*, 36: S2-S5.
- Goller, C. C. and Romeo, T. 2008. Environmental influences on biofilm development. *Bacterial Biofilms*, 37-66.
- Granucci, F., Zanoni, I. and Ricciardi-Castagnoli, P. 2008. Central role of dendritic cells in the regulation and deregulation of immune responses. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65: 1683-1697.
- Guarner-Argente C., Sánchez E., Vidal S. and Román E. 2010. Toll-like receptor 4 D299G polymorphism and the incidence of infections in cirrhotic patients. *Aliment Pharmacological Therminology*, 31: 1192-1199
- Guilliams, M., Bruhns, P., Saeys, Y., Hammad, H. and Lambrecht, B. N. 2014. The function of Fcγ receptors in dendritic cells and macrophages. *Nature Reviews Immunology*, 14(2): 94-108..
- Gunardi, W. D., Karuniawati, A., Umbas, R., Bardosono, S., Lydia, A., Soebandrio, A. and Safari, D. 2021. Biofilm-producing bacteria and risk factors (gender and

- duration of catheterization) characterized as catheter-associated biofilm Formation. *International Journal of Microbiology*, 2021(1): 8869275.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J. and Wang, Y. 2020. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10: 107.
- Hamad P.A. 2023. Phenotypic and Molecular Detection of Biofilm Formation in Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Isolated from Different Clinical Sources in Erbil City. *Mediterranean Journal of Hematological Infectious Diseases*., 15(1):e2023016.
- Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S. and Bauer, S. 2004. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663): 1526-1529.
- Hernández-Jiménez, E., Del Campo, R., Toledano, V., Vallejo-Cremades, M. T., Muñoz, A., Largo, C. and López-Collazo, E. 2013. Biofilm vs. planktonic bacterial mode of growth: which do human macrophages prefer?. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(4): 947-952.
- Høiby, N. 2017. A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*, 125(4): 272-275.
- Holt, K. E., Wertheim, H., Zadoks, R. N., Baker, S., Whitehouse, C. A., Dance, D. and Thomson, N. R. 2015. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(27): E3574-E3581.
- Hopkins, P. A. and Sriskandan, S. 2005. Mammalian Toll-like receptors: to immunity and beyond. *Clinical & Experimental Immunology*, 140(3): 395-407.
- Horrevorts, S. K., Duinkerken, S., Bloem, K., Secades, P., Kalay, H., Musters, R. J. and van Kooyk, Y. 2018. Toll-like receptor 4 triggering promotes cytosolic routing of DC-SIGN-targeted antigens for presentation on MHC class I. *Frontiers in Immunology*, 9: 1231.
- Hotchkiss, R. S., Monneret, G. and Payen, D. 2013. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. *The Lancet Infectious Diseases*, 13(3): 260-268.

- Hu, L., Xu, J., Xie, X., Zhou, Y., Tao, P., Li, H. and Xia, Z. 2017. Oligomerization-primed coiled-coil domain interaction with Ubc13 confers processivity to TRAF6 ubiquitin ligase activity. *Nature Communications*, 8(1): 814.
- Hu, T., Yu, H., Lu, M., Yuan, X., Wu, X., Qiu, H. and Huang, S. 2019. TLR4 and nucleolin influence cell injury, apoptosis and inflammatory factor expression in respiratory syncytial virus-infected N2a neuronal cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(9): 16206-16218.
- Huang, T. W., Lam, I., Chang, H. Y., Tsai, S. F., Palsson, B. O. and Charusanti, P. 2014. Capsule deletion via a λ -Red knockout system perturbs biofilm formation and fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* MGH 78578. *BMC Research Notes*, 7: 1-8.
- Huang, Z., Pan, H., Zhang, P., Cao, X., Ju, W., Wang, C. and Xu, X. 2016. Prevalence and antimicrobial resistance patterns of diarrheagenic *Escherichia coli* in Shanghai, China. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 35(8): 835-839.
- Hurlow, J., Couch, K., Laforet, K., Bolton, L., Metcalf, D. and Bowler, P. 2015. Clinical biofilms: a challenging frontier in wound care. *Advances in Wound Care*, 4(5): 295-301.
- Islam, M. T., Alam, A. R. U., Sakib, N., Hasan, M. S., Chakrovarty, T., Tawyabur, M. and Anwar Hossain, M. 2021. A rapid and cost-effective multiplex ARMS-PCR method for the simultaneous genotyping of the circulating SARS-CoV-2 phylogenetic clades. *Journal of Medical Virology*, 93(5): 2962-2970.
- Iwasaki, A. and Medzhitov, R. 2004. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature Immunology*, 5(10): 987-995.
- Jabra-Rizk, M. A., Meiller, T. F., James, C. E. and Shirtliff, M. E. 2006. Effect of farnesol on *Staphylococcus aureus* biofilm formation and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4): 1463-1469.
- Jacobsen, S. M., Stickler, D. J., Mobley, H. L. and Shirtliff, M. E. 2008. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(1): 26-59.
- Jamil R.T., Foris L.A., and Snowden J. 2020. *Proteus mirabilis* infections,” in StatPearls. Treasure Island, FL: StatPearls Publishing. Available online at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK442017/>.

- Janssens, S. and Beyaert, R. 2003. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(4): 637-646.
- Jawetz, E., Brooks, G.F., Carroll, K.C., Butel, J.S., Morese, S.A. and Mietzner, T.A. 2013. *Jawetz-Melnick and Adelberg's Medical Microbiology*. 26rd ed. McGraw Hill Com., 412 psge, Singapore.
- Jin, M. S. and Lee, J. O. 2008. Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity*, 29(2): 182-191.
- Kagan, J. C., Magupalli, V. G. and Wu, H. 2014. SMOCs: supramolecular organizing centres that control innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 14(12): 821-826.
- Kagan, J. C., Su, T., Horng, T., Chow, A., Akira, S. and Medzhitov, R. 2008. TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon- β . *Nature Immunology*, 9(4): 361-368.
- Kaiser, T. D. L., Pereira, E. M., Dos Santos, K. R. N., Maciel, E. L. N., Schuenck, R. P. and Nunes, A. P. F. 2013. Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75(3): 235-239.
- Kanzler, H., Barrat, F. J., Hessel, E. M. and Coffman, R. L. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nature Medicine*, 13(5): 552-559.
- Kateete, D. P., Kimani, C. N., Katabazi, F. A., Okeng, A., Okee, M. S., Nanteza, A. and Najjuka, F. C. 2010. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 9: 1-7.
- Kerksiek, K. 2008. A life in slime-biofilms rule the world. *Infectionresearch News and Perspectives*, 9: 1571-1578.
- Khan J., Tarar S.M., Gul I., Nawaz U., Arshad M. 2021. Challenges of antibiotic resistance biofilms and potential combating strategies: a review. *3 Biotechnology*. 11(4):169.
- Kimura, A. and Kishimoto, T. 2010. IL-6: regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, 40(7): 1830-1835.

- Kokare, C. R., Chakraborty, S., Khopade, A. N. and Mahadik, K. R. 2009. Biofilm: Importance and applications. *Indian Journal of Biotechnology (IJBT)*, 159-168
- Kokare, C. R., Kadam, S. S., Mahadik, K. R. and Chopade, B. A. 2007. Studies on bioemulsifier production from marine *Streptomyces*. *Indian Journal of Biotechnology*, 6: 78-84.
- Kotian, H. S., Abdulla, A. Z., Hithysini, K. N., Harkar, S., Joge, S., Mishra, A. and Varma, M. M. 2020. Active modulation of surfactant-driven flow instabilities by swarming bacteria. *Physical Review E*, 101(1): 012407.
- Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. 2007. Toll-like receptor signal transduction. *Experimental Molecular Medicine*, 39(4): 421-38.
- Kulkarni K. and Pathak N. 2016. Asymptomatic Bacteriuria due to MDR Organisms in Type 2 Diabetes Mellitus Patients. *International Journal of Health Sciences and Research*, 7(1): 68-74.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. 2007. Robbins basic pathology. 8th ed. Elsevier, 810-811
- Landemaine, L., Da Costa, G., Fissier, E., Francis, C., Morand, S., Verbeke, J. and Richard, M. L. 2023. *Staphylococcus epidermidis* isolates from atopic or healthy skin have opposite effect on skin cells: potential implication of the AHR pathway modulation. *Frontiers in Immunology*, 14: 1098160.
- Lee, J. H., Subhadra, B., Son, Y. J., Kim, D. H., Park, H. S., Kim, J. M., and Choi, C. H. 2016. Phylogenetic group distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from patients with urinary tract infections in South Korea. *Letters in Applied Microbiology*, 62(1): 84-90.
- Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle*/Toll/cactus controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86(6): 973-983.
- Lemaitre, B., Reichhart, J. M. and Hoffmann, J. A. 1997. *Drosophila* host defense: differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26): 14614-14619.

- Li, K., Wu, K. Y., Wu, W., Wang, N., Zhang, T., Choudhry, N. and Zhou, W. 2017. C5aR1 promotes acute pyelonephritis induced by uropathogenic *E. coli*. JCI Insight, 2(24): 55-57.
- Lister, J. L. and Horswill, A. R. 2014. Staphylococcus aureus biofilms: recent developments in biofilm dispersal. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 4: 178.
- Liu, B., Yang, Y., Qiu, Z., Staron, M., Hong, F., Li, Y. and Li, Z. 2010. Folding of Toll-like receptors by the HSP90 paralogue gp96 requires a substrate-specific cochaperone. Nature Communications, 1(1): 79.
- Liu, L., Ye, M., Li, X., Li, J., Deng, Z., Yao, Y. F. and Ou, H. Y. 2017. Identification and characterization of an antibacterial type VI secretion system in the carbapenem-resistant strain *Klebsiella pneumoniae* HS11286. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 7: 442.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C. and Ohashi, P. S. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. Cytokine, 42(2): 145-151.
- Lebeaux, D., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2014). Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78(3), 510-543.
- Lutz, P., Krämer, B., Kaczmarek, D. J., Hübner, M. P., Langhans, B., Appenrodt, B. and Nischalke, H. D. 2016. A variant in the nuclear dot protein 52 kDa gene increases the risk for spontaneous bacterial peritonitis in patients with alcoholic liver cirrhosis. Digestive and Liver Disease, 48(1): 62-68.
- Maina, D. and Kagotho, E. 2014. Suitability of Vitek 2 System in Identification and Susceptibility Testing of Gram Negative Bacteremias by Direct Inoculation. East African Medical Journal, 91(4): 115-118.
- Maki, D. G., Mermel, L. A., Bennett, J. V. and Brachman, P. S. 1998. Hospital infections. In Infections due to infusion therapy. Lippincott-Raven Philadelphia, 44: 689-724.
- Mancuso, G., Trinchera, M., Midiri, A., Zummo, S., Vitale, G. and Biondo, C. 2024. Novel Antimicrobial Approaches to Combat Bacterial Biofilms Associated with Urinary Tract Infections. Antibiotics, 13(2): 154.

- Mandraj, R., Murray, S., Forman, J. and Pasare, C. 2014. Differential ability of surface and endosomal TLRs to induce CD8 T cell responses in vivo. *The Journal of Immunology*, 192(9): 4303-4315.
- Mazloomirad, F., Hasanzadeh, S., Sharifi, A., Nikbakht, G., Roustaei, N. and Khoramrooz, S. S. 2021. Identification and detection of pathogenic bacteria from patients with hospital-acquired pneumonia in southwestern Iran; evaluation of biofilm production and molecular typing of bacterial isolates. *BMC Pulmonary Medicine*, 21(1): 1-11.
- Mendhe S., Badge A., Ugemuge S., Chandi D. 2023. Impact of Biofilms on Chronic Infections and Medical Challenges. *Cureus*. 15(11): e48204.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. and Mortha, A. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology*, 31: 563-604.
- Miajlovic, H., and Smith, S. G. 2014. Bacterial self-defence: how *Escherichia coli* evades serum killing. *FEMS Microbiology Letters*, 354(1): 1-9.
- Miller, S. I., Ernst, R. K. and Bader, M. W. 2005. LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 3(1): 36-46.
- Miron, J., Ben-Ghedalia, D. and Morrison, M. 2001. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*, 84(6): 1294-1309.
- Mohammed, S. O., Ahmed, E. S., Hafez, E. E., Khalid, A. and ElShahaby, O. A. 2014. Characterization and purification of urease enzyme from new *Proteus mirabilis* strain". *Journal of Advanced Scientific Research*, 5(4): 55-56.
- Monteiro A., Almeida B. and Paciência I. 2021. Bacterial Contamination in Health Care Centers: Differences between Urban and Rural Settings. *Atmosphere*, 12(4): 450.
- Moses, V.K., Kandi, V. and Rao, S.K. 2020. Minimum inhibitory concentrations of vancomycin and daptomycin against methicillin-resistant *Staphylococcus Aureus* isolated from various clinical specimens: A study from south india. *Cureus*, 12.
- Mourabit, N., Arakrak, A., Bakkali, M., Zian, Z., Bakkach, J. and Laglaoui, A. 2021. Antimicrobial resistance trends in *Staphylococcus aureus* strains carried by

- poultry in North of Morocco: A preliminary analysis. *Journal of Food Quality*, 1-5.
- Nair-Gupta, P., Baccharini, A., Tung, N., Seyffer, F., Florey, O., Huang, Y. and Blander, J. M. 2014. TLR signals induce phagosomal MHC-I delivery from the endosomal recycling compartment to allow cross-presentation. *Cell*, 158(3): 506-521.
- Naji, S. and Awadh, H. 2022. A Study of Urinary Tract Infections Prevalence, Antibiotics Resistance, and Biofilm Formation Capability of the Bacterial Causal Agents. *Tikrit Journal of Pure Science*, 27 (6): 71-75.
- Nicolle L.E. 2014. Catheter associated urinary tract infections. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, 3: 23
- Niederstebruch, Nils, Doris Sixt, Benard Isah Benda, and Nestor Banboye. 2017. “A Suitable Blood Agar Containing Human Blood Especially for the Use in Laboratories of Developing Countries.” *The Journal of Infection in Developing Countries* 11(05): 399–406.
- Ohto, U., Ishida, H., Shibata, T., Sato, R., Miyake, K. and Shimizu, T. 2018. Toll-like receptor 9 contains two DNA binding sites that function cooperatively to promote receptor dimerization and activation. *Immunity*, 48(4): 649-658.
- Oliveira F., Rohde H., Vilanova M., Cerca N. 2021. Fighting *Staphylococcus epidermidis* Biofilm-Associated Infections: Can Iron Be the Key to Success? *Frontiers Cell Infectious Microbiology*, 11: 798563.
- Oliveira, D., Borges, A. and Simões, M. 2018. *Staphylococcus aureus* toxins and their molecular activity in infectious diseases. *Toxins*, 10(6): 252.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1): 49-79.
- Otto, M. 2013. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, 64: 175-188.
- Oumer Y., Regasa Dadi B., Seid M., Biresaw G., Manilal A. 2021. Catheter-Associated Urinary Tract Infection: Incidence, Associated Factors and Drug Resistance Patterns of Bacterial Isolates in Southern Ethiopia. *Infectious Drug Resistant*, 14: 2883-2894.

- Overman, P. R. 2000. Biofilm: a new view of plaque. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 1(3): 18-29.
- Overstreet, A. M. C., Ramer-Tait, A. E., Jergens, A. E. and Wannemuehler, M. J. 2012. The role of the microbiota in gastrointestinal health and disease. In *Inflammatory bowel disease*. IntechOpen, 11-14.
- Panda, S. and Singh, D. V. 2018. Biofilm formation by ica-negative ocular isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. *Frontiers in Microbiology*, 9: 294109.
- Parsek, M. R. and Singh, P. K. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1): 677-701.
- Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., and Jensen, S. O. 2018. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4): e00088-17.
- Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A. and Dewhirst, F. E. 2006. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontology* 2000, 42(1): 44-47.
- Pelka, K., Bertheloot, D., Reimer, E., Phulphagar, K., Schmidt, S. V., Christ, A. and Latz, E. 2018. The chaperone UNC93B1 regulates Toll-like receptor stability independently of endosomal TLR transport. *Immunity*, 48(5): 911-922.
- Percival, S.L. and Bowler, P.G. 2004. Biofilms and their potential role in wound healing. *Wounds*, 16: 234-240.
- Perry, E.K. and Tan M.W. 2023. Bacterial biofilms in the human body: prevalence and impacts on health and disease. *Frontiers Cell Infectious Microbiology*, 13: 1237164.
- Piechota M., Kot B., Frankowska-Maciejewska A., Gruzewska A., Woźniak-Kosek A. 2018. Biofilm formation by methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* strains from hospitalized patients in Poland. *Biomed Research International*, 2018:1-7.
- Piñero, P., Juanola, O., Caparrós, E. and Zapater, P. 2017. Toll-like receptor polymorphisms compromise the inflammatory response against bacterial antigen translocation in cirrhosis. *Science Reports*, 7: 46425

- Pokharel K., Dawadi B.R., Shrestha L.B. 2022. Role of Biofilm in Bacterial Infection and Antimicrobial Resistance. JNMA Journal of Nepal Medical Association., 60(253): 836-840.
- Poltorak, A. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *TL*. *Science*, 4: 282.
- Poltorak, A., Smirnova, I., He, X., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Birdwell, D. and Beutler, B. 1998. Genetic and physical mapping of the *Lps* Locus: identification of the Toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, 24(3): 340-355.
- Pompilio A., Scribano D., Sarshar M., Di Bonaventura G. 2021. Gram-Negative Bacteria Holding Together in a Biofilm: The *Acinetobacter baumannii* Way. *Microorganisms*. 9(7):1353.
- Rafiei, A., Abedini, M., Hosseini, S. H., Hosseini-Khah, Z., Bazrafshan, B., and Tehrani, M. 2012. Toll like receptor-4 896A/G gene variation, a risk factor for migraine headaches. *Iranian Journal of Immunology*, 9(3): 159.
- Randow, F. and Seed, B. 2001. Endoplasmic reticulum chaperone gp96 is required for innate immunity but not cell viability. *Nature Cell Biology*, 3(10): 891-896.
- Rauch, P. J., Chudnovskiy, A., Robbins, C. S., Weber, G. F., Etzrodt, M., Hilgendorf, I. and Swirski, F. K. 2012. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science*, 335(6068): 597-601.
- Reinhart, K., Bauer, M., Riedemann, N. C. and Hartog, C. S. 2012. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clinical Microbiology Reviews*, 25(4): 609-634.
- Reisner, A., Maierl, M., Jörger, M., Krause, R., Berger, D., Haid, A., . and Zechner, E. L. 2014. Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 196(5): 931-939.
- Rock, F. L., Hardiman, G., Timans, J. C., Kastelein, R. A. and Bazan, J. F. 1998. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2): 588-593.
- Ruhal R. and Kataria R. 2021. Biofilm patterns in gram-positive and gram-negative bacteria. *Microbiology Research*, 251:126829.

- Sahingur, S. E., Xia, X. J., Gunsolley, J., Schenkein, H. A., Genco, R. J. and De Nardin, E. 2011. Single nucleotide polymorphisms of pattern recognition receptors and chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, 46(2): 184-192.
- Sanches, M. S., Baptista, A. A. S., de Souza, M., Menck-Costa, M. F., Koga, V. L., Kobayashi, R. K. T. and Rocha, S. P. D. 2019. Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50: 685-694.
- Sarwar, F. Y. M. I., Sherwani, A. H. S. K., Hussain, M. S., Zeb, M., and Sarwar, I. 2014. Identification of *Staphylococcus aureus* in Pus samples and its Anti-microbial Susceptibility against Imipenem, Tobramycin and Linezolid. *International Journal of Basic Medical Sciences and Pharmacy (IJBMS)*: 4(1): 22-23.
- Scavone, P., Iribarnegaray, V., González, M. J., Navarro, N., Caneles-Huerta, N., Jara-Wilde, J. and Zunino, P. 2023. Role of *Proteus mirabilis* flagella in biofilm formation. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(3): 226-234.
- Schrank G. and Branch-Elliman S. 2017. “Breaking the chain of infection in older adults: a review of risk factors and strategies for preventing device-related infections,” *Infectious Disease Clinics of North America*, 31(4): 649–671.
- 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.
- Sengupta, S., Ganesh, S., Meenakshi, S., Rao, R. M. and Swamy, K. R. 2022. Gender-based predilection for the microbial load of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* present in anterior versus posterior implant sites: A preliminary observational study. *Journal of Dental Implants*, 12(2): 95-105.
- Severn, M.M. and Horswill, A.R. 2022. *Staphylococcus epidermidis* and its dual lifestyle in skin health and infection. *Nature Review Microbiology*, 21(2): 97-111.
- Shah, C., Baral, R., Bartaula, B., and Shrestha, L. B. 2019. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and correlation with antimicrobial resistance. *BMC Microbiology*, 19(1): 1-6.

- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L. and Aalinkeel, R. 2023. Microbial biofilm: a review on formation, infection, antibiotic resistance, control measures, and innovative treatment. *Microorganisms*, 11(6): 1614.
- Sheng, K. C., Day, S., Wright, M. D., Stojanovska, L. and Apostolopoulos, V. 2013. Enhanced Dendritic Cell-Mediated Antigen-Specific CD4. *Journal of Drug Delivery*, 41-43.
- Shields, P. and Cathcart, L. 2010. Oxidase test protocol. American Society for Microbiology, 1-9.
- Sinha, B., Francois, P., Que, Y. A., Hussain, M., Heilmann, C., Moreillon, P. and Herrmann, M. 2000. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infection and Immunity*, 68(12): 6871-6878.
- Smith, K., Perez, A., Ramage, G., Lappin, D., Gemmell, C. G. and Lang, S. 2008. Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Medical Microbiology*, 57(8): 1018-1023.
- Sousa, C., Teixeira, P. and Oliveira, R. 2009. Influence of surface properties on the adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to acrylic and silicone. *International Journal of Biomaterials*, 22-24.
- Stark, L. 2013. *Staphylococcus aureus*: aspects of pathogenesis and molecular epidemiology (Doctoral dissertation, Linköping University Electronic Press, 415 page, USA).
- Stewart, P. S. 2002. Mechanisms of antibiotic resistance in bacterial biofilms. *International Journal of Medical Microbiology*, 292(2): 107-113.
- Stoodley, P., Wilson, S., Hall-Stoodley, L., Boyle, J. D., Lappin-Scott, H. M. and Costerton, J. W. 2001. Growth and detachment of cell clusters from mature mixed-species biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(12): 5608-5613.
- Sturbelle, R. T., de Avila, L. F. D. C., Roos, T. B., Borchardt, J. L., Dellagostin, O. A. and Leite, F. P. L. 2015. The role of quorum sensing in *Escherichia coli* (ETEC) virulence factors. *Veterinary Microbiology*, 180(3-4): 245-252.

- Sun, D., Accavitti, M. A. and Bryers, J. D. 2005. Inhibition of biofilm formation by monoclonal antibodies against *Staphylococcus epidermidis* RP62A accumulation-associated protein. *Clinical and Vaccine Immunology*, 12(1): 93-100.
- Szczuka, E., Krajewska, M., Lijewska, D., Bosacka, K. and Kaznowski, A. 2016. Diversity of staphylococcal cassette chromosome mec elements in nosocomial multiresistant *Staphylococcus haemolyticus* isolates. *Journal of Applied Genetics*, 57: 543-547.
- Tabasi, M., Karam, M. R. A., Habibi, M., Mostafavi, E. and Bouzari, S. 2016. Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from patients with acute cystitis, pyelonephritis and asymptomatic bacteriuria. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 10(12): DC01.
- Takashiba, S. and Naruishi, K. 2006. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. *Periodontology*, 40(1): 91-96.
- Takeda, K. and Akira, S. 2007. Toll-like receptors. *Current Protocols in Immunology*, 77(1): 14-12.
- Tang J., Chen J., Li H., Zeng P. and Li J. 2013. Characterization of adhesin genes, staphylococcal nuclease, hemolysis, and biofilm formation among *Staphylococcus aureus* strains isolated from different sources. *Foodborne Pathogloy Diseases.*, 10: 757-63
- Tille, P. 2015. *Bailey & Scott's diagnostic microbiology-E-Book*. Elsevier Health Sciences, 543 page, USA.
- Tille, P. M. and Bailey, S. 2014. *Diagnostic microbiology*. Missouri: Elsevier, 202-927.
- Tresse, O., Jouenne, T. and Junter, G. A. 1995. The role of oxygen limitation in the resistance of agar-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* to aminoglycoside and β -lactam antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36(3): 521-526.
- Tribedi, P. and Sil, A. K. 2014. Cell surface hydrophobicity: a key component in the degradation of polyethylene succinate by *Pseudomonas* sp. AKS2. *Journal of Applied Microbiology*, 116(2): 295-303.
- Uematsu, S., Fujimoto, K., Jang, M. H., Yang, B. G., Jung, Y. J., Nishiyama, M. and Akira, S. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina

- propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nature Immunology*, 9(7): 769-776.
- Vasudevan, R. 2014. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *Journal Microbiology Experiments*, 1(3): 00014.
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. 2020. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2), 59.
- Wang, J., Yang, C., Liu, Z., Li, X., Liu, M., Wang, Y. and Sun, N. 2020. Association of the TLR4 gene with depressive symptoms and antidepressant efficacy in major depressive disorder. *Neuroscience Letters*, 736: 135292.
- Wang, M. G., Zhang, M. M., Wang, Y., Wu, S. Q., Zhang, M. and He, J. Q. 2014. Association of TLR8 and TLR9 polymorphisms with tuberculosis in a Chinese Han population: a case-control study. *BMC Infectious Diseases*, 18: 1-8.
- Wasfi R., Hamed S.M., Amer M.A., Fahmy L.I. 2020. *Proteus mirabilis* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. *Front Cell Infectious Microbiology*, 10:414.
- Werling, D. and Jungi, T. W. 2003. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 91(1): 1-12.
- Wicherska-Pawłowska K., Wróbel T., Rybka J. 2021. Toll-Like Receptors (TLRs), NOD-Like Receptors (NLRs), and RIG-I-Like Receptors (RLRs) in Innate Immunity. TLRs, NLRs, and RLRs Ligands as Immunotherapeutic Agents for Hematopoietic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24):13397.
- Widyarman, A. S., Theodorea, C. F., Udawatte, N. S., Drestia, A. M., Bachtiar, E. W., Astoeti, T. E. and Bachtiar, B. M. 2021. Diversity of oral microbiome of women from urban and rural areas of Indonesia: a pilot study. *Frontiers in Oral Health*, 2: 738306.
- Xu, X., Hu, X., Ma, G., Wang, T., Wu, J., Zhu, X. and Chen, J. 2023. Detecting fa leptin receptor mutation in Zucker rats with tetra-primer amplification-refractory mutation system (ARMS)-PCR. *Heliyon*, 9(9): 46-49.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Uematsu, S., Hoshino, K., Kaisho, T. and Akira, S. 2003. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nature Immunology*, 4(11): 1144-1150.

- Yang, H., Wang, B., Wang, T., Xu, L., He, C., Wen, H. and Zhu, X. 2014. Toll-like receptor 4 prompts human breast cancer cells invasiveness via lipopolysaccharide stimulation and is overexpressed in patients with lymph node metastasis. *PloS One*, 9(10): e109980.
- Yang, H., Wei, C., Li, Q., Shou, T., Yang, Y., Xiao, C. and Zheng, B. 2013. Association of TLR4 gene non-missense single nucleotide polymorphisms with rheumatoid arthritis in Chinese Han population. *Rheumatology International*, 33(5): 1283-1288.
- Yang, S., Sugawara, S., Monodane, T., Nishijima, M., Adachi, Y., Akashi, S. and Takada, H. 2001. *Micrococcus luteus* teichuronic acids activate human and murine monocytic cells in a CD14-and toll-like receptor 4-dependent manner. *Infection and Immunity*, 69(4): 2025-2030.
- Yazdanpour, Z., Tadjrobehkar, O. and Shahkhah, M. 2020. Significant association between genes encoding virulence factors with antibiotic resistance and phylogenetic groups in community acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *BMC Microbiology*, 20(1): 1-9.
- Yeo, H. J., Yoon, S. H., Lee, S. E., Cho, W. H., Kim, D., Jeon, D. and Kim, Y. S. 2018. Bacterial biofilms on extracorporeal membrane oxygenation catheters. *ASAIO Journal*, 64(4): e48-e54.
- Yoshimura, A., Kaneko, T., Kato, Y., Golenbock, D. T. and Hara, Y. 2002. Lipopolysaccharides from periodontopathic bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Campylobacter jejuni* are antagonists for human toll-like receptor 4. *Infection and Immunity*, 70(1): 218-225.
- Zagaglia, C., Ammendolia, M. G., Maurizi, L., Nicoletti, M. and Longhi, C. 2022. Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli* Strains—New Strategies for an Old Pathogen. *Microorganisms*, 10(7): 1425.
- Zarembek, K. A. and Godowski, P. J. 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *The Journal of Immunology*, 168(2): 554-561.

- Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M. S., Greenblatt, M. B., Bussey, C., Flavell, R. A. and Ghosh, S. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 303(5663): 1522-1526.
- Zhang, Y., Luo, F., Cai, Y., Liu, N., Wang, L., Xu, D. and Chu, Y. 2011. TLR1/TLR2 agonist induces tumor regression by reciprocal modulation of effector and regulatory T cells. *The Journal of Immunology*, 186(4): 1963-1969.
- Zhao, A., Sun, J. and Liu, Y. 2023. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13, 1137947.
- Zhao, Y., Kuang, M., Li, J., Zhu, L., Jia, Z., Guo, X. and You, F. 2021. SARS-CoV-2 spike protein interacts with and activates TLR41. *Cell Research*, 31(7): 818-820.
- Zhou, L., Wei, B., Xing, C., Xie, H., Yu, X., Wu, L. and Zheng, S. 2011. Polymorphism in 3'-untranslated region of toll-like receptor 4 gene is associated with protection from hepatitis B virus recurrence after liver transplantation. *Transplant Infectious Disease*, 13(3): 250-258.
- Zhou, Y., Zhou, Z., Zheng, L., Gong, Z., Li, Y., Jin, Y. and Chi, M. 2023. Urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli*: mechanisms of infection and treatment options. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13): 10537.
- Ziran, B. H. 2007. Osteomyelitis. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*, 62(6): S59-S60.

