



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**COVID-19 HASTALARININ BAĞIRSAK MİKROBİYOTA
PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hatice ERDEM

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Uğur ARSLAN

Konya-2023

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

**COVID-19 HASTALARININ BAĞIRSAK MİKROBİYOTA
PROFİLLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Dr. Hatice ERDEM

UZMANLIK TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Uğur ARSLAN

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 21122006 proje numarası ile desteklenmiştir.

Konya-2023

ÖNSÖZ

‘COVID-19 Hastalarının Bağırsak Mikrobiyota Profillerinin Araştırılması’ adlı tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, eğitimimde emeği geçen ve birlikte çalışmaktan onur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Uğur ARSLAN’ a, çalışmam boyunca destek ve yardımlarından dolayı değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Duygu FINDIK, Sayın Prof. Dr. Hatice TÜRK DAĞI, Sayın Doç. Dr. Salih MAÇİN’ e, birlikte çalıştığım araştırma görevlisi arkadaşlarıma, desteklerinden dolayı, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına, her daim tüm özverileriyle yanımda olan değerli ailem, sevgili eşim ve biricik kızıma teşekkürlerimi sunarım.

Hatice ERDEM

2023

İÇİNDEKİLER

SİMGELER VE KISALTMALAR.....	iv
ÇİZELGE VE ŞEKİLLER.....	vii
1.GİRİŞ	1
1. 1. Giriş ve Amaç.....	1
1.2. COVID-19 Enfeksiyonu.....	2
1.2.1. Koronavirüsler	2
1. 2. 2. Tarihçe	7
1. 2. 3. Patogenez	10
1. 2. 4. Covid-19 Klinik Özellikler	12
1. 2. 5. Laboratuvar Bulguları.....	13
1. 2. 6. COVID-19 Tanısı	14
1. 2. 7. COVID-19 Varyantları	21
1. 2. 8. Tedavi	23
1. 2. 9. Korunma	25
1. 3. Mikrobiyota	27
1. 3. 1. Mikrobiyotanın Gelişimi.....	28
1. 3. 2. Mikrobiyotayı Etkileyen Faktörler	30
1. 3. 3. Bağırsak Mikrobiyotası.....	35
1. 3. 4. Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri	36
1. 3. 5. Bağırsak Mikrobiyotasının İlişkili Olduğu Hastalıklar	40
1. 3. 6. Mikrobiyota Analiz Yöntemleri.....	44
2. GEREÇ VE YÖNTEM	51
2. 1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması.....	51
2. 2. Örneklerinin Toplanması ve Saklanması.....	51
2. 3. Dışkı Örneklerinden DNA İzolasyonu	51
2. 4. Sekanslama	53
2. 4. 1. 16S Hiperdeğişken Bölgelerinin Amplifikasyonu.....	53
2. 4. 2. Amplikonların Jelde Yürütülmesi.....	54
2. 4. 3. Ürünlerin Saflaştırılması.....	55
2. 4. 4. DNA Miktarlarının Ölçülmesi	56
2. 4. 5. DNA Fragmanlarının Uç Tamiri.....	57
2. 4. 6. Barkod ve Adaptör Reaksiyonu Kurma.....	57
2. 4. 7. Kütüphane Oluşturulması	58

2. 4. 8. Dizileme.....	59
2. 5. Biyoinformatik Analiz.....	60
2. 6. Çeşitliliğin Hesaplanması.....	61
2. 7. İstatistiksel Analiz	62
3. BULGULAR.....	64
3. 1. Demografik Bulgular.....	64
3. 2. Çalışma Gruplarının Bağırsak Mikrobiyota Kompozisyonu.....	64
4. TARTIŞMA	80
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	90
KAYNAKLAR	93
ÖZET.....	101
SUMMARY	102
EKLER.....	103

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ACE-2: Anjiyotensin dönüştürücü enzim 2

ALT: Alanin aminotransferaz

AMPK: Aktive edilmiş protein kinaz

AST: Aspartat aminotransferaz

aPTT: Aktif parsiyel tromboplastin zamanı

ARDS: Akut Solunum Distres Sendromuna

BGD: Biyogüvenlik Düzeyi

BT: Bilgisayarlı tomografi

CLpro: Kimotripsin benzeri proteaz

CRP: C-reaktif protein

DNA: Deoksiribonükleik asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

E proteini: Zarf proteini

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

ER: Endoplazmik retikulum

ESR: Eritrosit sedimantasyon hızı

FFAR: Serbest yağ asidi reseptörleri

GM-CSF: Granülosit monosit koloni stümüle edici faktör

HBV: Hepatit B virüsü

HCV: Hepatit C virüsü

HE proteini: Hemaglutinin Esteraz Proteini

IFN: İnterferon

IL: İnterlökkin

ICTV: Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi

kDa: Kilo dalton

LDH: Laktat dehidrojenaz

LPS: Lipopolisakkarit

M proteini: Membran proteini

Mpro: Main protease

MERS: Orta Doğu Solunum Sendromu

MetaHIT: METAgenomics of the Human Intestinal Tract

µl: Mikrolitre

N proteini: Nükleokapsit proteini

NAAT: Nükleik asit amplifikasyon testleri

NK: Naturel killer

Nsp: Yapısal olmayan protein

NTD: N terminal domain

OC: Organ culture

OTU: Operasyonel taksonomik birim

ORF: Open Reading Frame

PT: Protrombin zamanı

RAS: Renin-anjiyotensin sistemi

RBD: Receptör binding domain

RNA: Ribonükleik asit

rRT-PCR: Gerçek zamanlı revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu

RTC: Replikasyon transkripsiyon kompleksi

S protein: Spike proteini

SARS: Şiddetli akut solunum sendromu

SCFA: Kısa zincirli yağ asidi

TLR: Toll-benzeri reseptörler

TNF: Tümör nekroz faktör

USG: Ultrasonografi



ÇİZELGE VE ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Koronavirüslerin sınıflandırılması

Şekil 1.2. DSÖ bölgelere göre doğrulanmış vaka sayıları

Şekil 1.3. DSÖ bölgelere göre COVID-19 bağlı toplam ölüm sayıları

Çizelge 1.1. İnsanda hastalık yapan koronavirüsler

Çizelge 1.2. Acil kullanım onayı almış COVID-19 aşılıları

Çizelge 2.1. Reaksiyon tüpündeki bileşenler

Çizelge 2.2. PCR döngülerinin sıcaklık ve süreleri

Şekil 2.1. SimpliAmp™ Thermal Cycler (ThermoFisher, ABD) PCR cihazı

Şekil 2.2. Amplikonların jelde yürütülmesi

Şekil 2.3. Safılaştırma işleminde kullanılan manyetik plate

Şekil 2.4. DNA miktarının Qubit 3 (ThermoFisher, ABD) ile ölçülmesi

Çizelge 2.5. PCR döngülerinin sıcaklık ve süreleri

Şekil 2.5. Ion Chef (ThermoFisher, ABD) cihazı

Şekil 2.6. Ion S5 (ThermoFisher, ABD) sekans cihazı

Şekil 2.7. Ion Reporter programından bir mikrobiyota analiz sonucu

Çizelge 3.1. Katılımcıların demografik özellikleri

Çizelge 3.2. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyotalarının alfa çeşitliliklerinin değerlendirilmesi

Şekil 3.1. Gaita örneklerinde A) Shannon indeksi B)Simpson indeksi C)Chao-1 indeksi ile alfa çeşitlilik analizi

Çizelge 3.3. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde incelenmesi

Şekil 3.2. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde dağılımı

Çizelge 3.4. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun aile düzeyinde incelenmesi

Şekil 3.3. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun aile düzeyinde dağılımı

Çizelge 3.5. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde incelenmesi

Şekil 3.4. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde dağılımı

Çizelge 3.6. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde incelenmesi

Şekil 3.5. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde dağılımı

Çizelge 3.7. Katılımcıların demografik özellikleri

Çizelge 3.8. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyotalarının alfa çeşitliliklerinin değerlendirilmesi

Şekil 3.6. Kontrol ve COVID-19 hastalarının A)Shannon indeksi, B)Simpson indeksi, C) Chao-1 indeksi ile alfa çeşitlilik analizi

Çizelge 3.9. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde değerlendirilmesi

Şekil 3.7. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde dağılımı

Çizelge 3.10. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun aile düzeyinde değerlendirilmesi

Şekil 3.8. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun aile düzeyinde dağılımı

Çizelge 3.11. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde değerlendirilmesi

Şekil 3.9. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde dağılımı

Çizelge 3.12. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde değerlendirilmesi

Şekil 3.10. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde dağılımı



1.GİRİŞ

1. 1. Giriş ve Amaç

Çin' in Wuhan şehrinde 2019 Aralık ayında ilk defa karşılaşılan ve kısa bir sürede salgına neden olan COVID-19, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 11 Mart 2020' de küresel salgın olarak ilan edilmiştir. 11 Mart 2020' de ise ülkemizde ilk COVID-19 vakası görülmüş sonrasında vaka sayısı hızla artmıştır.

Koronaviruslar pozitif polariteli tek sarmallı RNA virüsleridir ve genellikle üst solunum yolu hastalıklarına yol açarlar. Koronavirüsler, küresel olarak insanlarda ve birçok farklı hayvan türünde enfeksiyon yapabilirler. Orthocoronaviridae alt ailesinde sınıflandırılırlar ve alfa, beta, gama, delta olarak dört tipe ayrılır. Alfakoronavirüsler ve betakoronavirüsler sıklıkla memelileri enfekte ederken, gamakoronavirüsler ve deltakoronavirüsler ise kuşları enfekte ederler. Koronaviral genom; spike, membran, envelope ve nükleokapsit protein olmak üzere 4 yapısal protein kodlamaktadır. Zarf bağlantılı spike proteini, virusun konak hücrede Anjiyotensin dönüştürücü enzim-2 (ACE-2) reseptörüne bağlanarak hücreye girişinden sorumludur. ACE-2 reseptörleri tip 1 ve tip 2 pnömositlerde, ince barsaktaki enterositlerde, endotel hücrelerinde ve arteriyel düz kas hücrelerinde bulunmaktadır (Ludwig ve Zarbock 2020).

SARS-CoV-2 ile enfekte hastalar, hafifden şiddetliye kadar değişen semptomlar gösterebilirler ve hastaların çoğunluğu asemptomatik taşıyıcıdır. Sıklıkla bildirilen semptomlar ateş, öksürük ve nefes darlığıdır. Pnömonili hastalarda, göğüs röntgeni genellikle çoklu beneklenme ve buzlu cam opaklığı gösterir. Koronavirüs enfeksiyonunun ana hedefi akciğer olsada, ACE2 reseptörlerinin birçok farklı vücut bölgesinde bulunmasından dolayı gastrointestinal, kardiyovasküler, karaciğer, böbrek, merkezi sinir sistemi ve oküler hasara yol açabilir. İshal, karın ağrısı ve kusma gibi gastrointestinal semptomlar, %2-10 COVID-19 hastalarında tanımlanmıştır (Ciotti ve ark 2020).

Mikrobiyota, insan vücudunun farklı bölgelerinde bulunan ve organizma ile simbiyotik bir ilişki içinde olan bakteri, mantar ve virüs gibi mikroorganizmalara denir. İnsan mikrobiyotasında bulunan mikroorganizmaların sayısı, konak hücre sayısının yaklaşık 10 katı kadardır. Tüm bu mikroorganizmaların genomuna mikrobiyom denir. İnsan mikrobiyotasının büyük kısmı en fazla sindirim sisteminde

olmak üzere, deri, solunum sistemi ve genitoüriner sistemde bulunmaktadır. Son dönemde teknolojik gelişmelerle birlikte ileri moleküler teknikler sayesinde bakteri kültürüne ihtiyaç kalmadan, mikroorganizma DNA fragmanlarının tespit edilmesine dayalı yöntemler geliştirilerek bu şekilde insan mikrobiyomları daha rahat tanımlanabilmektedir. Bağırsak mikrobiyotasının sindirim sistemi üzerinde metabolik , koruyucu ve immunolojik etkileri vardır. Sindirim sisteminde; musin yapımı, sindirim enzimleri, peristaltik hareketler, sıkı bağlantılı epitel bariyerinin yanı sıra bağırsak mikrobiyotası da mukozal bağışıklığı oluşturan sistemin vazgeçilmez bir üyesidir (ACARKAN ve ark 2020).

Mikrobiyotanın konumuna ve bolluğuna bağlı olarak, virüslerin de mikrobiyota ile yakın etkileşimleri olduğu bilinmektedir. Çok sayıda kanıt, kommensal mikrobiyotanın çeşitli mekanizmalar yoluyla virüsleri istila ederek düzenlediğini ve dolayısıyla viral enfeksiyonlarda uyarıcı veya baskılayıcı rollere sahip olduğunu göstermektedir (Li ve ark 2019).

Bu çalışmada COVID-19 hastalarından rutin mikrobiyolojik inceleme amacıyla gönderilen dışkı örnekleri ve COVID-19 olmayan sağlıklı insanlardan alınan dışkı örneklerinin mikrobiyota analizleri yapılarak, sağlıklı popülasyonlar ile hasta grupları kıyaslanacaktır. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında mikrobiyotadaki değişikliklerin analizi, bu hastalığın etkisinin tüm popülasyonlarda ve bağışıklığı zayıflamış hastalarda en aza indirilebilmesini sağlayacak mikrobiyota bazlı tedavilerin geliştirilmesine katkı sağlayacaktır.

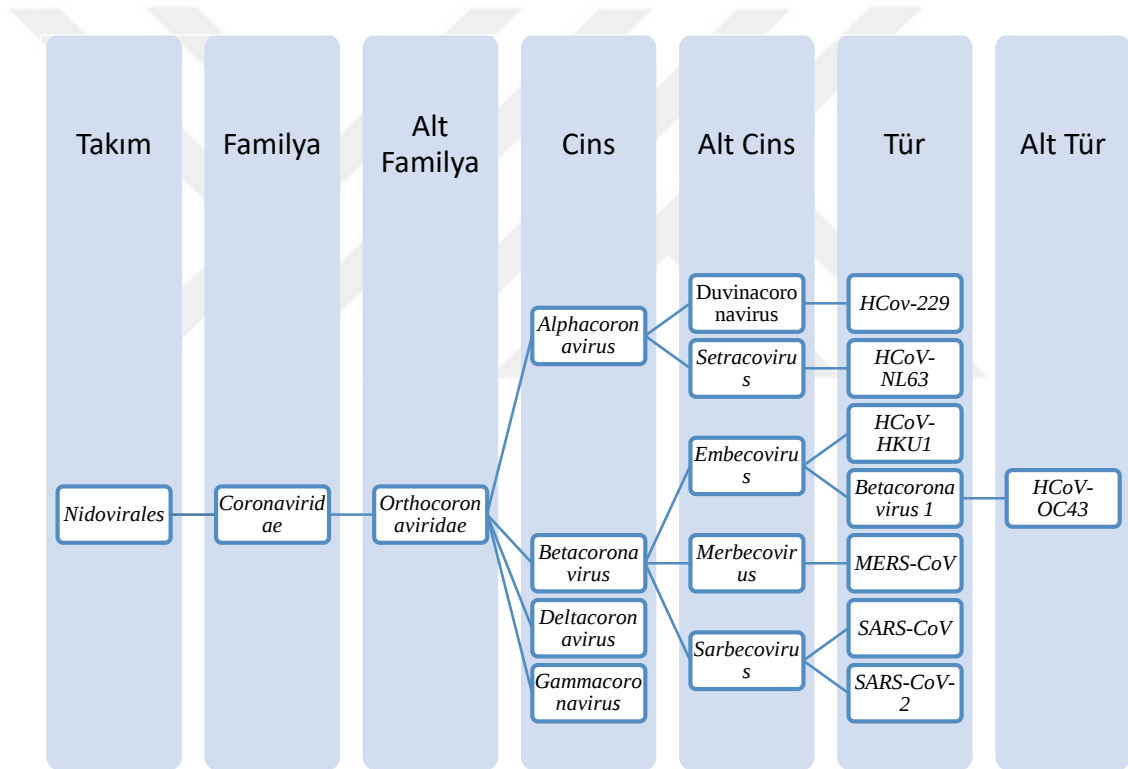
1.2. COVID-19 Enfeksiyonu

1.2.1. Koronavirüsler

Koronavirüsler, insanlarla birlikte birçok canlıyı enfekte edebilen bir virüs ailesidir. Koronavirüs ailesine ait virüsler toplumda yaygındır hatta son yıllara kadar rinovirüslerden sonra soğuk algınlığının ikinci en sık sebebi olarak bilinmekteydiler. Virüs, insanda dışında köpek, at, sığır, hindi, domuz, kedi, sıçan ve fare gibi birçok farklı hayvan türünü de enfekte edebilmektedir (Memikoğlu ve Genç 2020).

‘Koronavirüs’ terimi, elektron mikroskobu altında gözlemlendiğinde, virüs zarından çıkan sivri çıkıntıların bir taç şekline benzetilmesi ile Latince taç anlamında gelen “corona” kelimesinden türetilmiştir (Su ve ark 2016).

Koronavirüsler, Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi (ICTV)’ nin yaptığı sınıflandırmaya göre, Nidovirales takımında, Coronaviridae ailesi içerisindeki Orthocoronavirinae alt ailesinde yer almaktadır. Orthocoronavirinae alt ailesi ise Alfakoronavirüs, Betakoronavirüs, Gamakoronavirüs ve Deltakoronavirüs olmak üzere dört cinse ayrılmaktadır. Şekil 1.1.’ de koronavirüslerin sınıflandırılması gösterilmiştir (Fung, 2019).



Şekil 1.1. Koronavirüslerin sınıflandırılması

Yalnızca alfakoronavirüsler ve betakoronavirüslerin insanları enfekte ettiği bilinmektedir (Pal ve ark 2020). Çizelge 1.1.’ de insanda hastalık yapan koronavirüsler ve yaptığı belirtiler gösterilmiştir (Liu ve ark 2020).

Çizelge 1.1. İnsanda hastalık yapan koronavirüsler

Virüs	Cins	Keşif yılı	Belirtiler
HCoV-229E	α -koronavirüs	1966	Hafif solunum yolu enfeksiyonu
HCoV-NL63	α -koronavirüs	2004	Hafif solunum yolu enfeksiyonu
HCoV-OC43	β -koronavirüs	1967	Hafif solunum yolu enfeksiyonu
HCoV-HKU1	β -koronavirüs	2005	Pnömoni
SARS-CoV	β -koronavirüs	2003	Ciddi akut solunum sendromu
MERS-CoV	β -koronavirüs	2012	Ciddi akut solunum sendromu
SARS-CoV-2	β -koronavirüs	2019	Ciddi akut solunum sendromu

Coronaviridae ailesine mensup bakteriler zarflı, büyük, tek sarmallı RNA virüsleridir. Genomları 25 ila 32 kb arasında değişir ve 118-136 nm çapındaki virionları ile bilinen en büyük RNA virüsleridir. Virionlar küreseldir ve virüs zarfından 16-21 nm uzanan büyük spike (S) glikoproteini bulunur (Payne 2017).

Koronavirüslerin genomu ve subgenomları en az altı adet ORF içermektedir. İlk ORF' ler (ORF1a/b), genomun tüm uzunluğunun neredeyse üçte ikisini kaplar ve burada 16 tane yapısal olmayan protein kodlanır. Genomun diğer üçte birini oluşturan ORF' lerden ise yapısal protein kodlanır, bunlar 4 adettir: spike-çıkıntı (S), envelope-zarf (E), membran (M) ve nükleokapsit (N) proteinleri. Tüm koronavirüslerde aynı olmamak üzere bazı koronavirüslerde bu yapısal proteinlerin ilaveten, o koronavirüse özgü 3a/b proteini, 4a/b protein, HE proteini gibi yapısal proteinler ve aksesuar proteinler kodlanır. Farklı koronavirüslere ait genom dizilimleri analiz edildiğinde, yapısal proteinleri kodlayan bölgelerin genom dizilimleri arasında %43, yapısal olmayan proteinleri kodlayan bölgelerin genom dizilimleri arasında %58 ve tüm genom düzeyinde ise %54 oranında benzerlik bulunmuştur (Memikoğlu ve Genç 2020). Koronavirüs genomunda bulunan yapısal proteinler ve yapısal olmayan proteinler aşağıda sıralanmıştır.

Yapısal proteinler

S (Spike) proteini: Yapısal proteinler viral genomun 3' ucundan kodlanmaktadır. virionun dışında S glikoproteinleri bulunur ve virionların tipik şekliinden sorumludur. S proteini, konak hücreye ait proteaz enzimiyle S1alt birimi ve S2 alt birimi olmak üzere iki farklı polipeptide bölünür. S1 alt birimi, reseptör bağlanma alanının büyük çoğunluğunu oluşturur, S2 alt birimi ise S proteininin sap kısmını temsil eder. S1 alt

birimi, reseptör bağlanma alanından (RBD), N-terminal alanından (NTD) oluşur. S1 proteininin temel görevi virionun konak hücre reseptörüne bağlanmasını sağlamaktır. S1 proteininin konak hücre reseptörüne bağlanması, viral membranın konakçı hücre membranına füzyonunu tetikler. S proteinin S2 alt birimi, heptad tekrar 1 (HR1), heptad tekrar 2 (HR2), füzyon peptidi (FP), merkezi sarmal (CH), bağlayıcı alan (CD), transmembran alanı (TM) ve sitoplazmik kuyruk (CT) içerir. S2 alt birimi membran füzyonundan sorumludur. S proteinleri virion zarına C-terminal transmembran bölgeleri ile bağlanırlar ve M proteinleri ile de iletişim halindedirler. Virionlar spike proteinlerinin N-terminali vasıtasıyla konak hücreye ait plazma zarındaki spesifik yüzey reseptörlerine bağlanırlar ve SARS-CoV-2 için bu reseptör ACE2 reseptörüdür (Tanrıverdi ve ark 2020).

M (Membran) proteini: Koronavirüs M proteinin virüs oluşumu ve salınımda önemli rolü vardır. M glikoproteini üç adet transmembran bölgesi içerir ve golgi aygıtında glikolize edilirler. Membran proteini bu modifikasyonu sayesinde virionun hücre içine füzyon yeteneği ve proteinin antijenik özellikte olma yeteneği kazanır. Nükleokapsit proteini genomik RNA' ya bağlanır ve bir kompleks oluşturur, ardından membran proteini de bu kompleks ile ERGIC adı verilen endoplazmik retikulum-Golgi aygıtı ara kompartmanında (ERGIC) biraraya gelerek virionların oluştuşması sağlanır. M proteini virüs tarafından konak hücrenin duyarlanmasıyla önem taşır. Interferon beta (IFN-beta) yolağının aktivasyonunu, Toll-like reseptör bağımlı mekanizma ile sağlar (Arabacı ve ark 2020).

E (Zarf) Proteini: E proteini, moleküler ağırlığı 8,4-12 kDa olan 76 ila 109 aminoasit kalıntısı içeren küçük bir integral membran polipeptididir. E proteini, koronavirüs replikasyon döngüsünün toplanma, tomurcuklanma, zarf oluşumu ve patogeneş gibi çeşitli aşamalarında önemli roller oynar. İlginç bir şekilde, protein, enfekte olmuş hücrelerin içinde yüksek oranda eksprese edilmesine rağmen, viral zarfa proteinin sadece küçük bir kısmı dahil edilir. Ayrıca E proteininin oligomerizasyonu, iyon kanalı oluşumuna yol açar. E proteini, diğer proteinlerle de etkileşime girerek protein aktivasyonuna katkı sağlar (Artika ve ark 2020).

N (Nükleokapsid) Proteini: Koronavirüs nükleokapsidi (N) proteini, sarmal nükleokapsidin bir bileşeni olan 43-46 kDa' lık yapısal bir fosfoproteindir. N proteininin ana işlevi, genomik RNA' yı korumak ve onun canlı bir viriona dahil

edilmesi için viral genomu bir ribonükleoprotein (RNP) partikülü halinde paketlemektir. Virion oluşumu sırasında viral membran proteini (M proteini) ile de etkileşime girer ve virüs transkripsiyonu ve birleşmesinde önemli rol oynar. N proteini sentezini takiben hızlı fosforilasyona uğrar. N proteinlerinin üç farklı ve yüksek oranda korunmuş alana, yani N terminal alanı (NTD), bağlayıcı bölge (LKR) ve C-terminal alanı (CTD) na sahiptir. Üç alanın hepsi de viral RNA ile bağlanır. C-terminali aracılığıyla nükleokapsitin temel yapı taşı oluşturarak bir dimer oluşturur. N proteinini kodlayan gen, koronavirüs moleküler tespiti için hedef genler arasındadır (Masters 2006).

HE (Hemagglutinin Esteraz) Proteini: HE proteini zarf üzerinde bulunur. HE geni, orf1b ve S geni arasında, A soyunun Betacoronavirüslerinin genomunda bulunur ve kodlanmış HE proteini, viral zarfın dördüncü protein bileşenini oluşturur. HE, uzun S protein sivri uçlarının altında görünen küçük sivri uçlar oluşturur. HE, hemagglütinasyon ve asetilesteraz aktivitelerine sahiptir. Sialik asit içeren reseptörlere virüsün tutunmasını sağlar. HE ayrıca, konakçı hücrelere viral bağlanmayı kolaylaştıran S proteini için bir kofaktör olarak işlev görür (Masters 2006).

Yapısal olmayan proteinler

Koronavirüslerin genomunda bulunan 16 adet yapısal olmayan protein (Nsp) RNA' nın transkripsiyonu, protein sentez ve modifikasyonu gibi birçok farklı noktada görev almaktadır. Bunlar arasında PL-pro, 3CL-pro, RdRp ve helikaz, enzim aktif bölgeleri ve fonksiyonel yapıları ile küçük inhibitör moleküllerin gelişimi için önemli hedeflerdir (Arabacı ve ark 2020).

Nsp1: Tip 1 interferon sinyalini inhibe eder. Hücresel mRNA' nın degradasyonuna neden olur ve translasyonu inhibe eder.

Nsp2: Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir

Nsp3: Koronavirüs genomunun kodladığı en büyük proteindir. Papain benzeri proteaz aktivitesi gösterir ve polipeptitleri keser. Tip I interferon (IFN) üretimi ve sinyal inhibisyonu yapar, interleukin-6 (IL-6) düzeyini artırır (Hartenian ve ark 2020). Diğer viral proteinleri keserek onların görevlerini yerine getirmelerini sağlar. Ayrıca konakçı proteinlerini posttranslasyonel modifikasyona uğratarak konağın immün sistemini

baskılar. Koronavirüs yaşlanmış proteinlerin yıkımını engelleyerek, konakçıdaki protein dengesini değiştirir ve konakçının virüsle savaşıma kabiliyetini azaltır.

Nsp4: Diğer proteinlerle birleşerek, enfekte olmuş hücrelerin membranında vezikül oluşumuna neden olur. Bu veziküllerin içinde virüsün yeni kopyaları için parçalar bulunur (Tanrıverdi ve ark 2020).

Nsp5: Kimotripsin benzeri proteaz (3CLpro), ana protease (Mpro) aktivitesi gösterir. Tip I IFN sinyal inhibisyonu yapar ve konakçı immün yanıtını baskılar.

Nsp6: Konakçı membranında veziküller oluşturur. Otofagozom büyümesini sınırlandırır.

Nsp7: Nsp8 ile birlikte Nsp12' nin RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesine yardımcı olurlar.

Nsp8: Nsp7 ile birlikte Nsp12' nin RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesine yardımcı olurlar.

Nsp9: Tek zincirli nükleik asit bağlayıcı protein olarak görev yapar

Nsp10: Nsp14 ve Nsp16 ile birlikte virüsü, konakçının immün yanıtından kaçıtır.

Nsp11: Fonksiyonu tam olarak bilinmemektedir

Nsp12: RNA bağımlı RNA polimeraz aktivitesi vardır.

Nsp13: 3' -5' RNA helikaz ve 5' trifosfataz aktivitesi vardır

Nsp14: Hatalı dizileri ekzonükleaz aktivitesi ile keserek hataları düzeltir. N-7-metiltransferaz aktivitesi vardır

Nsp15: Endoribonükleaz aktivitesi vardır. Artık virüs RNA' larını parçalar.

Nsp16: 2' -O-metiltransferaz aktivitesine sahiptir. İmmün sistemin virüsleri tespit etmesinde görevli ve dsRNA helikaz aktivitesine sahip olan melanoma differentiation-associated protein-5 (MDA-5) reseptöründen virüsün kaçışını sağlar (Hartenian ve ark 2020).

1. 2. 2. Tarihçe

İlk koronavirüsü 1937 de Beaudette ve Hudson tavuklarda solunum yolu enfeksiyon etkeni olarak tanımladılar (Fabricant 1998). İlk insan koronavirüsleri;

1960' da Tyrell ve Bynoe tarafından, insan embriyonik trakeal doku kültürlerinde B814 adı verilen bir virüsün pasajlanarak elde edilmesiyle tanımlandı. Bu virüs gönüllü insanlara intranazal yolla uygulandığında, soğuk algınlığı benzeri semptomların ortaya çıktığı görüldü (Berry ve ark 2015). Hamre ve Procknow ise 1966' da soğuk algınlığı semptomları gösteren deneklerden aldıkları örneklerde doku kültüründe üreyebilen bir virüs izole ettiler. Bu virüs daha sonra insan koronavirüsü 229E (HCoV-229E) olarak adlandırıldı (Hamre ve Procknow 1966).

McIntosh ve arkadaşları ise 1967' de insan solunum yollarından izole edilip doku kültüründe üreyebilen, etere duyarlı farklı bir virüs grubu elde ettiler ve bu virüslere doku kültüründe ürediklerini belirtmek amacıyla "OC (organ culture) virüsleri" ismini verdiler (McIntosh, 1967). Bu ajanların karakteristik morfolojisini tanımlayan "Koronavirüs" terimi ise 1968 yılında kabul edilmiştir (Tyrell ve ark 1968).

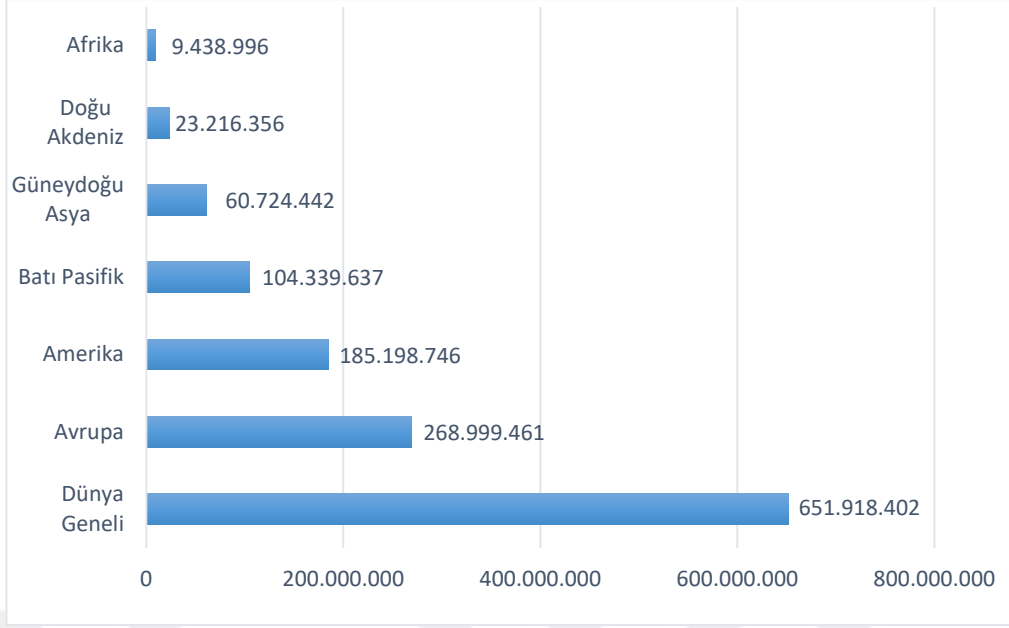
İnsanlar için patojen olan ancak hafif klinik semptomlarla ortaya çıkan çok sayıda başka koronavirüs tespit edilmiştir. Bununla birlikte, DSÖ' nün Şubat 2003' de alarma geçtiği Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) etkeni olan SARS-CoV, son 20 yılda ortaya çıkan en yüksek derecede patojenik koronavirüstür. İlk salgın 2002 yılında Çin' in Guangdong eyaletindeki bir pazar kaynaklı olarak bildirilmiştir. Toplamda, 29 ülkede 916 ölümle sonuçlanmış, 8.422 SARS vakası bildirilmiştir. SARS için tahmini mortalite oranı %11 olarak bildirilmiştir. 2004 yılından itibaren ise bu virüse bağlı yeni SARS vakası bildirilmemiştir (Park ve ark 2020). Bu salgından sonra 2004 yılında HCoV NL- 63 ve 2005 yılında HCoV HKU1 adlı koronavirüsler tanımlanmıştır (Arabacı ve ark 2020).

Başka bir koronavirüs, Orta Doğu solunum sendromu (MERS)-CoV, Suudi Arabistan' da 2012 yılında böbrek yetmezliği ve akut pnömonisi olan bir hastanın solunum örneğinden izole edilmiştir. Orta Doğu Solunum Sendromu (MERS) koronavirüsü, 2012 yılında Orta Doğu' da şiddetli solunum yolu hastalığı salgını sebebi olmuştur. 858 ölümle sonuçlanan 2.494 doğrulanmış vaka bildirilmiştir ve %34,4 gibi yüksek ölüm oranı MERS' i diğer koronavirüslerden ayırmıştır (Park ve ark 2020).

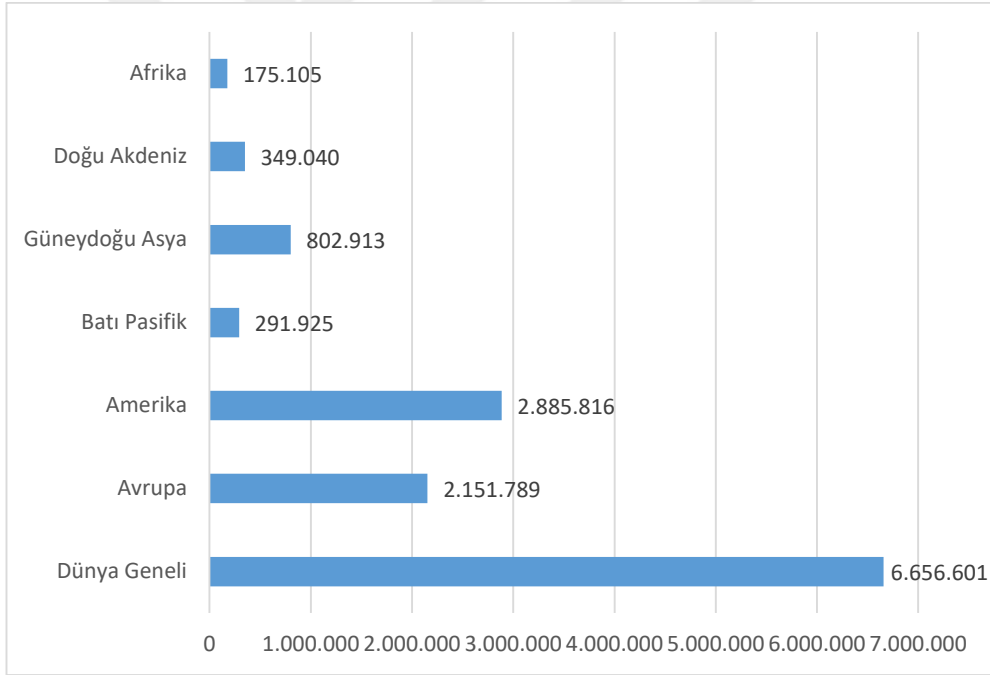
Aralık 2019' da Çinli sağlık çalışanları, çalışmalarını Çin' in Hubei Eyaleti, Wuhan' daki bir deniz ürünleri ve hayvancılık pazarındaki insanlarda meydana gelen

atipik pnömonili hasta grubu üzerinde yoğunlaştırmıştır. Hastalarda en sık olarak ateş, öksürük ve göğüste rahatsızlık ve solunum semptomları bildirilmiştir. Akciğer grafisi ve bilgisayarlı tomografi gibi radyolojik tanı testleri ile hastalara ilk olarak pnömoni tanısı konulmuştur. Hastaların bronkoalveolar lavaj örneklerinin dizilenmesiyle yarasa SARS virüsü benzeri koronavirüs ile yaklaşık %80 dizi homolojisi gösteren değişken bir betakoronavirüs (betaCoV) tanımlanmıştır (Zhu ve ark 2020). 7 Ocak 2020’ de bu virüsün ilk kez insanlarda tespit edilmiş yeni bir koronavirüs (2019 nCoV) olduğu bildirilmiştir. Sonrasında 2019-nCoV’ un adı COVID-19 olarak değiştirilmiş ve diziliminin SARS-CoV’ e yakın benzerliğinden ötürü SARS-CoV-2 olarak isimlendirilmiştir. DSÖ, COVID-19 salgını 30 Ocak 2020’ de “uluslararası boyutta halk sağlığı acil durumu” şeklinde sınıflandırmış, salgının başladığı Çin dışında 113 ülkede de yeni COVID-19 vakalarının görülmesi, virüsün hızlı yayılımı ve şiddeti sebebiyle 11 Mart 2020’ de küresel salgın olarak tanımlamıştır. Türkiye’ de ise COVID-19 ile ilgili çalışmalar 10 Ocak 2020’ de başlamış ve ilk COVID-19 vakası 11 Mart’ ta görülmüştür (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2020a).

Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 03 Ocak 2023 tarihi itibarıyla dünya genelinde toplam 651.918.402 COVID-19 vakası ve 6.656.601 COVID-19’ a bağlı ölüm bildirilmiştir. Aynı tarih itibarıyla ülkemizde ise toplam 17.042.722 vaka ve 101.492 COVID-19’ a bağlı ölüm bildirilmiştir. Şekil 1.2’ de DSÖ’ nün belirlediği bölgelere göre doğrulanmış vaka sayıları gösterilmiştir. Şekil 1.3’ de ise DSÖ’ nün belirlediği bölgelere göre COVID-19 bağlı toplam ölüm sayıları gösterilmiştir (WHO 2022a)



Şekil 1.2. DSÖ bölgelere göre doğrulanmış vaka sayıları (WHO 2022a)



Şekil 1.3. DSÖ bölgelere göre COVID-19 bağlı toplam ölüm sayıları (WHO 2022a)

1. 2. 3. Patogenez

Koronavirüs enfeksiyonu virüsün konakçı hücreye tutunması ve S proteini ile reseptörünün etkileşimiyle başlar. SARS-CoV-2 reseptör olarak anjiyotensin dönüştürücü enzim 2' yi kullanır. ACE2 reseptörleri insan vücudunda akciğer, kalp,

bağırsak, böbrek, endotel hücreleri gibi birçok dokuda bulunmaktadır (MAVİ ve İNKAYA 2020) .

Koronavirüs, reseptör ile bağlanmasını takiben, S proteininin konak tip II transmembran serin proteaz (TMPRSS2) ile bölünmesi sonucu konakçı hücreye girer, ardından viral ve hücrel zarların füzyonu gerçekleşir. viral genomik RNA viral polimeraz proteinlerine çevrilmek üzere sitoplazmaya salınır. Çıplak RNA, pp1a ve pp1ab isimli 2 poliprotein sentezler. Bu poliproteinler yapısal olmayan proteinleri kodlar ve çift membranlı vezikülde bir replikasyon transkripsiyon kompleksi (RTC) oluşturur. Replikasyon transkripsiyon kompleksi, yapısal proteinleri ve yardımcı proteinleri kodlayan alt genomik RNA' ları çoğaltır. Negatif polariteli genomik RNA sentezlenir ve bu RNA genomik pozitif polariteli RNA' yı oluşturmak için kalıp görevi üstlenirler. Viral RNA ve nükleokapsit proteini sitoplazmada çoğaltılır, kopyalanır veya sentezlenirken, spike, membran ve zarf proteinleri endoplazmik retikulumda (ER) transkripte edilir ve golgi aygıtına iletilir. Tam bir virion oluşturmak üzere, Viral RNA-Nükleokapsit kompleksi, spike, membran ve zarf proteinleri ERGIC bölgesinde birleştirilir. Bu birleşmeyle birlikte konakçı hücreden ekstraselüler alana ekzositoz yoluyla salınırlar (Demirci ve ark 2020).

Virüs girişi sırasında ACE2' nin de hücre içine alınarak parçalanması renin-anjiyotensin sistemini (RAS) aktive ederek, anjiyotensin-2 artışına yol açar. Endotel hücresinin enfeksiyonu ile meydana gelen endotelyozis, apoptozis ve renin-anjiyotensin sistemi dengesindeki bu değişme; vücutta ki iskemi, ödem, hiperkoagülabilité ve benzeri birçok durumdan sorumludur (MAVİ ve İNKAYA 2020).

Koronavirüs hastalığına karşı birçok yoldan immün cevap oluşmaktadır. Doğal bağışıklık yanıtının oluşumunda ilk tetikleyici faktör virüse ait protein, lipid ve nükleik asit yapılarının toll-benzeri reseptörler (TLR) tarafından tanınmasıdır. Replikasyon sürecinde oluşan dsRNA' nın TLR3, spike proteininin TLR4 ve ssRNA' nın TLR7/8 tarafından tanınabileceği belirtilmiştir. Ayrıca TLR3 ve TLR4' ün IRF-3 (interferon regulatory factor 3)' ü indükleyerek çekirdeğe yönlendirilmesi ve interferon (IFN) sentezini başlatmasına sebep olması gibi rolleri vardır (MAVİ ve İNKAYA 2020). Bu indüklenme antiviral etkili tip I / III interferonların yanısıra, tümör nekroz faktörü alfa (TNF- α) ve interleukin-1 (IL-1) gibi proinflatuar sitokinlerin, IL-6 ve IL-18' in

üretimini de artırır. Kazanılmış bağışıklık, virüsle enfekte hücreleri yok eden aktif CD8 sitotoksik T hücreleri ve virüse özgül antijenlere karşı antikor üreten B hücreleri yoluyla SARS-CoV-2' ye karşı immün yanıtta önemli bir rol oynar (Demirci ve ark 2020).

Koronavirüs enfeksiyonu sırasında; hastalarda periferik kan toplam lenfosit sayısı, B lenfosit, CD4 ve CD8 T hücreleri, ve Naturel Killer (NK) hücre sayılarında azalma görülür. T helper hücre ve T regülatör hücre sayısı da düşüktür. Ek olarak hastalığı daha ağır geçirenlerde; daha hafif geçirenlere göre toplam lenfosit, CD4 ve CD8 T hücre ve B lenfosit sayılarının daha düşük olduğu görülmüştür (MAVİ ve İNKAYA 2020).

Virüse bağlı meydana gelen doku hasarı, granülosit ve makrofajların aşırı aktivasyonu ve proenflamatuar sitokinlerin fazla üretimi, makrofaj aktivasyon sendromu veya sekonder hemofagositik lenfohistiyositoz olarak adlandırılan sitokin fırtınası ile sonuçlanır ve doku hasarının daha da artmasına yol açar. Yapılan çalışmalar sitokin fırtınası görülen ciddi vakaların sıklıkla Akut Solunum Distres Sendromuna (ARDS) ilerlediğini göstermiştir. SARS-CoV-2 ile enfekte olmuş hastaların incelenmesinde; IFN- γ , IL-1 β , IL-1RA, IL-7, IL-8, IL-10, tümör nekroz faktörü-alfa (TNF- α), granülosit koloni stimüle edici faktör (G-CSF), monosit kemoatraktan peptid (MCP)-1, makrofaj enflamatuar protein (MIP)-1A ve MIP-1B' nin plazmadaki seviyelerinin arttığı bildirilmiştir (Tufan ve ark 2020).

1. 2. 4. Covid-19 Klinik Özellikler

SARS-CoV-2 insandan insana damlacık yoluyla bulaşır. Bunun yanı sıra hasta kişilerin öksürmesi, hapşırması yoluyla ortama bıraktıkları damlacıklara temas edilmesi ve mukozalara sürülmesiyle de dolaylı olarak bulaşabilmektedir. Hastalar asemptomatik olsalar dahi solunum yolu salgılarında virüs bulunduğu için bunlar da bulaştırıcıdır. Temastan sonra hastalığın inkübasyon süresi 2 ila 14 gün arasındadır ve yaklaşık 4-5 gün içinde hastalık semptomları görülmeye başlar ki bu dönemde bulaştırıcılık devam etmektedir (Memikoğlu ve Genç 2020).

Virüsle karşılaştıktan 3 ila 7 gün içinde ateş ve solunum yolu belirtileri ortaya çıkar. Hastalarda en sık bulunan semptomlar ateş, kuru öksürük ve yorgunluk iken, burun tıkanıklığı, rinore, kas ağrısı, yeni ortaya çıkmış tat-koku kaybı ve boğaz ağrısı

olabilir. Bazı hastalarda klinik belirtiler ishal, baş ağrısı gibi solunum dışı belirtiler ile de başlayabilir. Klinik seyir asemptomatik enfeksiyondan ciddi pnömoni, böbrek yetmezliği, çoklu organ yetmezliği ve hatta ölüme kadar değişken bir spektrumdadır. Yaşlı ve ek hastalığı olan kişilerde hastalığın seyri daha kötüdür. Gebelerde COVID-19 enfeksiyonunu seyri aynı yaştaki kişilerle benzer bulunmuştur. Çocuklarda COVID-19 semptomları daha hafiftir (Sevim ve Ağaçfıdan 2020).

Klinik sınıflandırma, hafif, orta, şiddetli ve kritik olarak yapılır:

- Hafif olgu: semptomlar ılımlıdır, görüntülemelerde bulgu saptanmaz.
- Orta olgu: ateş ve solunum yolu enfeksiyonu semptomları görülür ve görüntülemelerde pnömoni bulgusu bulunabilir.
- Şiddetli olgu: solunum sayısı ≥ 30 /dakika. veya oksijen saturasyonu $\leq 93\%$ veya $PaO_2/FiO_2 \leq 300$ mmHg veya akciğer görüntülemelerinde lezyonlar 24-48 saat içinde yüzde 50' den fazla ilerler.
- Kritik olgu: şok tablosu, mekanik ventilasyon gerektirecek kadar ciddi solunum yetmezliği, yoğun bakım takibi gerektiren diğer organ yetmezlikleri bulunabilir. (Liang 2020).

1. 2. 5. Laboratuvar Bulguları

COVID-19 hastalarında bakılan rutin testler tam kan sayımı, protrombin zamanı (PT), aktif parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) ve D-dimer gibi testler ve eritrosit sedimentasyon hızı, C reaktif protein (CRP), ferritin, prokalsitonin gibi inflamasyonla ilgili parametrelerdir. Tam kan sayımı sonuçlarına göre hastalarda genellikle lenfopeni saptanırken bazı çalışmalarda nötrofil sayısında artış olabileceği belirtilmiştir. Bir miktar trombositopeni ile birlikte lenfosit sayısında azalma, COVID-19 hastalarında en sık karşılaşılan bozulmuş tam kan sayımı parametrelerindendir. Ayrıca bazı COVID-19 hastalarında aPTT ile birlikte PT' nin arttığı da bildirilmiştir. Bunlara ilaveten, D-dimer yükselişi, koagülopati oluşumunu daha da destekler ve hastalığın ilerlemesinin önemli bir göstergesidir. Enflamasyonla ilgili parametreler erken dönemde oldukça yüksek tespit edilmektedir. COVID-19 hastaların serumlarında ESR, CRP ve prokalsitonin ve ferritin düzeyleri artmış olarak bulunmaktadır. CRP' nin tanısal değeri ve hastalığın ilerlemesini tahmin etmek için potansiyeli prokalsitonininden daha yüksektir. Biyokimyasal parametrelerden ise laktat

dehidrojenaz (LDH), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve toplam bilirubin seviyelerinde artış ve albümin seviyelerinde azalma COVID-19 hastalarında sık rastlanan laboratuvar bulguları arasındadır (Pourbagheri-Sigaroodi ve ark 2020).

1. 2. 6. COVID-19 Tanısı

Olası vaka ve kesin vaka tanımları T.C Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü tarafından hazırlanan COVID-19 rehberinde aşağıdaki şekilde yapılmıştır.

Olası Vaka; Ateş, öksürük, nefes darlığı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, kas ağrıları, tat ve koku alma kaybı veya ishal belirti ve bulgularından en az biri ve klinik tablonun başka bir neden/hastalık ile açıklanamaması ve semptomların başlamasından önceki 14 gün içerisinde kendisi veya yakın temasının hastalık açısından yüksek riskli bölgede bulunma öyküsü veya ateş, öksürük, nefes darlığı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, kas ağrıları, tat ve koku alma kaybı veya ishal belirti ve bulgularından en az biri ve semptomların başlamasından önceki 14 gün içerisinde doğrulanmış COVID-19 vakası ile yakın temas eden veya ateş ve ağır akut solunum yolu enfeksiyonu belirti ve bulgularından en az biri (öksürük ve solunum sıkıntısı), ve hastanede yatış gerekliliği varlığı ve klinik tablonun başka bir neden/hastalık ile açıklanamaması veya ateş, öksürük, nefes darlığı, boğaz ağrısı, baş ağrısı, kas ağrıları, tat ve koku alma kaybı veya ishal belirti ve bulgularından en az ikisinin bir arada olması ve bu durumun başka bir neden/hastalık ile açıklanamaması.

Kesin Vaka; Olası vaka tanımına uyan olgulardan moleküler yöntemlerle SARS-CoV-2 saptanan olgular.

SARS CoV-2 enfeksiyonun tanısında tüm genom sekanslanması, gerçek zamanlı revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PCR, Real-time RT-PCR) ve seroloji olmak üzere temel olarak üç yaklaşım bulunmaktadır (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2020a).

SARS-CoV-2 enfeksiyonu için tanıda altın standart, ilgili klinik örneklerde viral RNA' nın RT-PCR ile gösterilmesidir. COVID-19 enfeksiyonun klinik tanısı, hastaların semptomları ile laboratuvar ve radyolojik bulgularının birlikte ele alınmasıyla konulabilse de, COVID-19 semptomlarının ve radyolojik bulgularının nonspesifik olması sebebiyle, RT-PCR gibi nükleik asit amplifikasyon testleri ile

tanının doğrulanması gereklidir. Olası vaka tanımına uyan hastalar, farklı bir solunum yolu hastalık etkeninin bulunup bulunmamasına bakılmaksızın SARS-CoV-2 için test edilmelidir. Olası vaka tanımını karşılayan ve hastalık semptomları devam eden hastalardan alınan bir veya daha fazla RT-PCR testinin negatif olarak sonuçlanması; COVID-19 için enfeksiyon şüphesini ortadan kaldırmaz. Bu hastalar için klinik semptomlar, radyolojik görüntüleme ve laboratuvar bulguları değerlendirilerek uygun vaka yönetimi yapılır (Memikoğlu ve Genç 2020).

SARS-CoV-2' nin neden olduğu viral pnömonilerin teşhisinde en önemli ilk adım, hastadan doğru zamanda doğru numunenin alınmasıdır. Viral RNA izolasyonu için orofarenks ve nazofarenks gibi üst solunum yolları sürüntüleri kullanılabileceği gibi balgam ve bronkoalveolar lavaj gibi alt solunum yolu örnekleri de kullanılabilir. Nazofarenks örneklerinin orofarenks örneklerine göre daha iyi sonuç verdiği gösterilmiştir. Ancak en iyi sonuç alt ve üst solunum yollarının birlikte test edilmesiyle elde edilmektedir. Hem nazofarenks hem orofarenks örneğinin alınması durumunda, örneklerin ortak bir tüpte birleştirilmesi önerilmektedir. Üst solunum yolu örnekleri semptomlar başladıktan sonra ilk birkaç gün içinde alınmalıdır. SARS-CoV, MERS-CoV ve SARS-CoV-2' nin en duyarlı tespiti için üst ve alt solunum yolu örneklerinin (balgam, bronkoalveolar lavaj sıvısı) toplanması ve test edilmesi önerilir. Özellikle akciğer semptomları baskın bazı ağır vakalarda virüs yalnızca alt solunum yolu örneklerinden izole edilebilmektedir. Ancak bronkoskopi yoluyla balgam ve özellikle BAL toplanması, aerosol damlacıkları oluşturarak sağlık çalışanları için biyogüvenlik riskini artırır. Viral RNA, solunum örneklerinden daha az güvenilir olmakla birlikte dışkı, idrar ve kan örneklerinden de saptanabilir (Loeffelholz ve Tang 2020).

Dışkı örneklerinden yapılan PCR testinin, solunum örneklerin pozitifleşmesinden 2-5 gün sonra pozitifleştiği tespit edilmiştir. Hatta birçok hastada respiratuvar örneklerin negatifleşmesinden sonra da fekal testlerin pozitifliğinin 1-11 gün daha devam ettiği gösterilmiştir (Loeffelholz ve Tang 2020).

Serum örnekleri, SARS-CoV-2' nin tespiti için başka bir kaynaktır. Ancak, pnömoni ile hastaneye yatırılan hastaların sadece %15' inde serumda viral RNA tespit edilebilmiştir (Huang ve ark 2020).

Dünya Sağlık Örgütü, COVID-19 şüpheli hastalarda orofaringeal ve nazofaringeal sürüntü örneklerinin birlikte alınmasını önermektedir. Solunum yolu

numuneleri gerekli eğitimler verilmiş görevli sağlık personeli tarafından kişisel koruyucu ekipmanlar kullanılarak alınmalıdır. Üst solunum yolu örnekleri alınırken kullanılacak olan eküvyonlar plastik veya tel şaftlı sentetik elyaf özellikte olmalıdır. Tahta saplı eküvyonlar veya kalsiyum aljinat çubuklar bazı virüsleri inaktive edebilecek maddeler içerebileceği ve moleküler testleri inhibe edebileceği için tercih edilmemelidir. Önce orofaringeal bölgeden sürüntü örneği alınmalı daha sonra aynı eküvyon ile nazal bölgeden sürüntü örneği alınmalıdır ve aynı virüs taşıma ortamında en kısa sürede laboratuvara ulaştırılmadır, bu sürede örnekler +4 derecede muhafaza edilmelidir. Örnek kurum içinde taşınacaksa ikili taşıma sistemi ile, kurum dışına nakledilecekse soğuk zincir ilkelerine uyarak üçlü taşıma sistemi ile göndermelidir (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2020a).

Sekanslama, nükleik asit amplifikasyon testleri gibi tanısal laboratuvar çalışmaları yapılırken Biyogüvenlik Düzeyi 2 (BGD-2) prosedürleri uygulanır. Virüs kültürü, izolasyon, nötralizasyon testleri gibi bulaştırıcı testler ise Biyogüvenlik Düzeyi 3 laboratuvarlarda çalışılmalıdır (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2020b).

Nükleik Asit Amplifikasyon Testleri (NAAT)

Gerçek zamanlı RT-PCR testi ile nazofaringeal ve orofaringeal sürüntü örneklerinde, balgamda, bronkoalveolar lavaj sıvısında ve alt solunum yolu örneklerinde amplifiye edilmiş SARS-CoV-2 genomu tespit edilmektedir. rRT-PCR testlerinin en önemli avantajı amplifikasyon ve analizin birarada yapılabilmesi ve olası kontaminasyonu en aza indirecek kapalı bir sistem kullanılmasıdır. PCR testlerinde hedef bölge olarak SARS-CoV-2 genomunda bulunan spike, zarf, membran ve nükleokapsid proteini gibi yapısal proteinler kullanılır. Bunların dışında, aksesuar genlerden rRNA' ya bağlı RNA polimeraz (RdRp), ORF1a ve ORF1b genleride kullanılmaktadır. PCR testleri için hedef gen bölgesi seçiminde CDC, viral nükleokapsid proteinin iki gen bölgesini (N1 ve N2) ve internal kontrol olarak insan RNAase P genini, DSÖ ise ilk tarama için zarf proteinin ve sonrasında doğrulama için RdRp gen bölgesinin kullanılmasını önermektedir (Tang ve ark 2020).

Ülkemizde Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarınca yetkilendirilmiş laboratuvarlarda bakanlığın temin ettiği, hedef gen bölgesi olarak çift viral gen bölgesi (RbRp ve N

geni), internal kontrol olarak da insan ribonükleaz P (RNase P) geni bölgesini kullanan gerçek-zamanlı reverse transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (rRT-PCR) testi kullanılmaktadır (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2020a).

Tipik bir gerçek zamanlı RT-PCR yönteminde öncelikle örnekten viral RNA izolasyonu yapılır. Daha sonra ters transkripsiyon yöntemiyle viral RNA, cDNA' ya dönüştürülür ve PCR ile çoğaltılır. Amplifikasyon için hedef gen bölgesine özgü iki adet primer, DNA polimeraz enzimi, tampon solüsyonu, dört farklı deoksiniükleozit trifosfat (dNTP), floresan boyayla işaretli prob ve örnekten elde edilen cDNA gereklidir. Gerçek zamanlı PCR cihazlarında ısı protokolüne uyularak amplifikasyon işlemi yapılır ve bu sırada sinyal toplanması ile reaksiyonun izlenir. Ortaya çıkan floresan ölçümler kontrol ve örnekler için değerlendirilir. Ölçümün eşik değerin üzerine çıktığı PCR döngü sayısı "cycle treshold" (Ct) belirlenir. Çoğunlukla Ct değeri 40' dan küçük ise sonuç pozitif olarak değerlendirilir (DİNÇ ve ark).

Gerçek zamanlı PCR testinde bir veya birden çok negatif sonuç almış olmak COVID-19 ihtimalini dışlamaz. Birçok faktör yanlış negatif sonuca sebep olabilir. Bunlar hasta örneğinin yetersiz alınması veya enfeksiyonun çok erken ya da geç evresinde alınması, örneğin prosedüre uygun olarak işlenmemesi, PCR inhibisyonu veya virüs mutasyonu gibi teste ait teknik sebepler ve SARS-CoV-2 viral yükünün semptomatik ve asemptomatik vakalarda dalgalı bir seyrinin olması gibi nedenlerdir (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2020a).

Sekans analizi

Yeni nesil sekanslama yöntemleri ile SARS-CoV-2 virüsünün tüm genom dizi analizi yapılmaktadır. Bu yöntem moleküler epidemiyolojik çalışmalar yapmak, mutasyonları araştırmak, virüsün ve şüpheli rRT-PCR sonuçlarını doğrulamak için kullanılabilir. Ancak, bu testler COVID-19 enfeksiyonunun tanısında rutinde kullanmak için uygun değildir (Tang ve ark 2020).

Serolojik testler

Koronavirüs enfeksiyonun tanısında kullanılan serolojik testler SARS-CoV-2' e karşı hasta tarafından üretilen antikorların ve SARS-CoV-2 proteinlerinin serumda saptanması esasına dayanan testlerdir. COVID-19 tanısında immünoassay yöntemlere dayalı testler ve hasta başı kromatografik testler olmak üzere iki tür serolojik tanı testi

kullanılmaktadır. SARS-CoV-2 enfeksiyonunda, yapılan çalışmalarda hastaların çoğunda virüse maruz kaldıktan sonraki 7. günden sonra serokonversiyon olduğu gösterilmiştir dolayısıyla serolojik testlerin akut hastalığın tanısında yeri yoktur ancak tanıyı doğrulamak için kullanılabilir (Tang ve ark 2020).

Hasta başında uygulanan kromatografik testlerde, klinik örnekteki virüse ait antijenleri saptamak için monoklonal antikorlar (mAb) veya virüse karşı oluşmuş antikorları saptamak için klonlanmış viral antijenler kullanılır. “Lateral akım” test tekniğinde, kasete gömülü, üzerinde nitrosellüloz membrana sabitlenmiş reaktif içeren bir şerit bulunur. Hastadan alınan numune şerit üzerine damlatılır ve reaktif ile reaksiyona girer. Bu testler için hasta serumu, plazması veya tam kan örnekleri kullanılabilir. Pozitif reaksiyon oluştuğunda şerit üzerinde renkli bir çizgi belirir. Ayrıca test kasetinde bir kontrol bandı da bulunur. Sonuçlar gözle okunur ve çok kısa sürede kalitatif olarak sonuç alınır. Ülkemizde, Sağlık Bakanlığı tarafından temin edilen antikor testlerinden bazıları IgM ve IgG’ yi ayrı iki bant olarak verirken, bazı testlerde ikisini birlikte (total antikor) tek bir bant olacak şekilde sonuç vermektedir (Arabacı ve ark 2020).

Enzim immünoassay (EIA) testler daha kolaydır ve sonuç verme süresi daha kısadır ancak moleküler testlere kıyasla duyarlılık ve özgüllükleri daha düşüktür. Akut enfekte hastaları tespit edebilen nükleik asit amplifikasyonu testlerinden farklı olarak bu testler, hiç semptom göstermemiş hastanın bile önceden virüsle enfekte olup olmadığını belirleyebilir. Koronavirüs nükleokapsid ve spike proteinlerinden sorumlu antikorların (IgM ve IgG) konsantrasyonunun tespiti için, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) ve kemilüminesans yöntemleri geliştirilmiştir. ELISA yöntemi doğrudan veya dolaylı şekilde örnekte ilgili antijen veya antikoru tespit edilebildiği hassas bir tekniktir. Doğrudan çalışan yöntemde, enzimle bağlanmış antikor direkt örnekteki antijeni tespit eder. Dolaylı çalışan yöntemde ise antijenle kaplanmış kuyucuklara bağlanmak için bir antikor ve daha sonra bu antikoru saptamak için ikinci bir enzimle işaretli antikor kullanılır. SARS-CoV-2’ ye karşı oluşan IgM, IgA ve IgG antikorlarını tespit etmek için kaplama antijeni olarak saflaştırılmış rekombinant N proteinleri kullanılmaktadır (Tanrıverdi ve ark).

Hücre kültürü

Hücre kültürü yöntemiyle virüs izolasyonu, uzun zaman aldığı ve çalışması uzmanlık gerektirdiği için rutin tanı yöntemleri arasında ter almamaktadır. Bu yöntem virüsün özelliklerini belirlemek, teröpatik ajanlar ve aşı geliştirme çalışmaları amacıyla biyogüvenlik düzeyi 3 laboratuvarlarda yapılabilir (Goldsmith ve ark 2003).

Radyolojik bulgular

Koronavirüs hastalığında tanıda altın standart gerçek zamanlı revers transkriptaz-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) testi olmakla birlikte testin bazı bölgelerde uygulanması ve erişiminde ki yetersizlikler ve erken dönemde ortaya çıkan yalancı negatiflikler nedeniyle radyolojik görüntüleme de sıklıkla kullanılmaktadır. Koronavirüs enfeksiyonunun en ciddi tutulum yerinin akciğer olduğu düşünüldüğünde radyolojik olarak akciğer tutulumunun gösterilmesi önemlidir. Bununla birlikte COVID-19 tanısında radyolojik yöntemlerin tarama amaçlı değil; tanı koyma ve hastalık takibinde yardımcı bir yöntem olarak kullanılması gerekmektedir. Görüntülemelerde akciğer grafisi, toraks bilgisayarlı tomografisi (BT) ve bazı sınırlı koşullarda toraks ultrasonografisi (USG) bu amaçla kullanılmaktadır (Ceylan ve Savaş 2020).

Akciğer Grafisi

COVID-19' a bağlı akciğer bulgularının görüntülenmesinde, akciğer grafisinin tanı değeri %30 ila 60 arasındadır. Akciğerde oluşan buzlu cam görünümü direkt grafide görülemeyebilir. Akciğer grafisi tamamen normal de olabilir ki bu COVID-19 pnömonisini dışlamaz çünkü akciğer grafisinin tanıda duyarlılığı düşüktür. Ancak akciğer grafisinin avantajı, portabl cihazların kullanımı ile enfekte hastaların transportu ve görüntüleme sırasında bulaş riski olmamasıdır. Hasta başında kullanılabilir oluşu, cihaz temizliğinin kolay olması ve radyasyon maruziyetinin düşük olması sebebiyle özellikle hastalığın ilerleyişinin takibinde akciğer grafisi kullanılabilir. Ayrıca çocuk ve genç yaştaki hastalarda bilgisayarlı tomografiden önce tercih edilmelidir. Direkt akciğer grafisinde COVID-19 hastalarında sıklıkla bilateral, orta ve alt zonlarda, periferik yerleşimli ve sınırları düzensiz, homojen olmayan opasite artışları görülür. Akciğer grafisinde bu değişiklikler olmamış dahi olsa gerekli hallerde bilgisayarlı tomografi çekilmelidir (Comert ve Kiral 2020).

Bilgisayarlı Tomografi

Toraks bilgisayarlı tomografisi (BT), henüz PCR testinin pozitifleşmediği erken dönem için duyarlı bir tanısal testtir. Toraks bilgisayarlı tomografisi PCR testi negatif olan hastaların triyajını hızlandırmak için kullanılmaktadır. Ancak COVID-19 PCR testi pozitif, klinik bulguları ağır olmayan ve hastalığın ilerlemesi için risk faktörleri bulunmayan hastalar ile COVID-19 PCR testi negatif ve klinik bulgularıda hafif olan hastalar için bilgisayarlı tomografi önerilmez. Bilgisayarlı tomografinin, hastanın ilerleyen bir kliniği varsa, COVID-19' un ilerleyişini takip etmek, pulmoner emboli, sekonder kardiyopulmoner anormallikler veya miyokard hasarına bağlı oluşmuş kalp yetmezliğini değerlendirmek için kullanılması önerilmektedir (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2020a).

Bilgisayarlı tomografi yüksek çözünürlükte, ince kesit ve kontrastsız şekilde çekilmelidir. Ancak bilgisayarlı tomografi düşük doz olarak çekilirse tipik buzlu cam opasitelerinin atlanabileceği unutulmamalıdır. Hastalığın ilerleyişinin takibi için çekiliyorsa düşük doz olarak çekilmesi önerilmektedir. Normalde hastalığın tanısı için kontrastlı BT çekilmesine gerek olmamakla birlikte pulmoner emboli riski olduğu düşünülen hastalarda toraks BT-anjiyo yapılması gerekmektedir (Comert ve Kiral 2020).

Buzlu cam opasitesi, hastaların %98 kadarında görülen en yaygın ve en erken ortaya çıkan BT bulgusudur. Buzlu cam opasitesi alttaki damarların kapanmadığı puslu hiper-zayıf bir alan olarak tanımlanır ve hava boşluklarının kısmen dolmasından veya interstisyel kalınlaşmadan kaynaklanır. COVID-19 pnömonisinde tipik olarak periferik ve subplevral dağılımlı tek taraflı yada bilateral buzlu cam opasiteleri görülür.

Konsolidasyon genellikle buzlu cam opasitelerinden sonra oluşur ve hastalık başlangıcından 10-12 gün sonra pik yapar. Konsolidasyon, alveolar hava boşluklarının tamamen dolmasından kaynaklanan, alttaki damarların obstrüksiyonu ile birlikte artmış yoğunlukta alanlar olarak tanımlanır. COVID-19 pnömonisinde periferik ve subplevral yerleşimli multifokal, yamalı veya segmental tipte konsolidasyonlar görülür.

Buzlu cam görünümü ve konsolidasyondan sonra en sık görülen üçüncü BT görüntüsü retikülasyondur. Retikülasyon, bilgisayarlı tomografi de lineer opasite şeklinde görünen kalınlığı artmış interlobüler septalar ve intralobüler çizgiler olarak tanımlanır. Buzlu cam opasiteleri ve konsolidasyon ile karşılaştırıldığında, nispeten

geç bir bulgudur. Kaldırım taşı manzarası buzlu cam opasitelerine eklenmiş kalınlığı artmış interlobüler ve intralobüler septalar olarak tanımlanır. Bu görüntü şiddetli akut solunum sendromunda (SARS) da görülen alveolar ödem ve akut interstisyel inflamasyonla ilişkili olabilir. Bu lezyon COVID-19 pnömonisi olan hastaların %5-36' sında bildirilmiştir. Ayrıca Covid -19 pnömonisinde hava bronkogramı, nodüller, pulmoner vasküler genişleme, subplevral ve parankimal bantlar, fibrozis gibi diğer belirtilere de rastlanabilir (Güneyli ve ark 2020).

Ultrasonografi

COVID-19' da sıklıkla kullanılan görüntüleme yöntemleri direkt grafi ve bilgisayarlı tomografidir. Hastalık daha fazla akciğerin subplevral bölgelerinde tutulum yaptığı için ultrasonografi de COVID-19 tanısında kullanılabilir. Ultrasonografi de subplevral parankimde kalınlaşan interlobüler septumları ifade eden B çizgileri ile aynı seviyede kalınlaşmış plevra çizgisinin görülmesi beklenir. Hastalıktan etkilenmemiş akciğer parankiminde ise reverberasyon artefaktı olan A-çizgileri görülebilir. Hastalık yayılma riskini arttırması ile sınırlı merkezde yapılması ve deneyim gerektirmesi ultrasonografinin kullanımını sınırlamaktadır (Memikoğlu ve Genç 2020).

1. 2. 7. COVID-19 Varyantları

SARS-CoV-2 gibi virüsler, genom replikasyonu sırasında genetik kodda oluşan genetik mutasyonlar veya viral rekombinasyondan kaynaklanan değişiklikler sonucunda sürekli olarak gelişir. Mutasyon, bir virüsün genetik kodunda ki tek bir değişikliği ifade eder. Mutasyonlar sıklıkla görülür, ancak yalnızca bazı durumlarda virüse ait özellikleri değiştirir. Varyant ise bir veya daha fazla mutasyon içerebilen bir viral genomdur (CDC, 2022). Sıklıkla SARS-CoV-2' nin konak hücreye bağlanması ve hücre içine girmesinde rol alan spike proteininde mutasyonlara rastlanılmaktadır. S proteinindeki önemli mutasyonlar receptör binding domain (RBD) bölgesi, amino terminal bölge (NTD) ve furin bölünme bölgesinde görülmüştür (Harvey ve ark 2021).

Varyantlar genel olarak dört sınıfta incelenmektedir;

- İzlenen varyantlar (VBM) : Alınan tıbbi önlemleri aşacak şekilde potansiyel bir etki sinin olduğu gösterilmiş veya daha ciddi hastalık veya artan bulaşma ile ilişkilendirilmiş ancak artık tespit edilmeyen veya çok düşük seviyelerde

dolaşımda olan varyantlardır. Alfa (B.1.1.7 ve Q soyları), Beta (B.1.351 ve alt soylar), Gama (P.1 ve alt soylar), Delta (B.1.617.2 ve AY soyları), Epsilon (B.1.427 ve B.1.429), Eta (B.1.525), Iota (B.1.526), Kappa (B.1.617.1), 1.617.3, Mu (B.1.621, B.1.621.1), Zeta (S.2)

- İlgiilenilen varyant (VOI) : Reseptör bağlanmasındaki değışiklikler, önceki enfeksiyona veya aşlamaya karşı oluşturulan antikorlar tarafından azaltılmış nötralizasyon, tedavilerin etkinliğinde azalma, bulaşıcılık veya hastalık şiddetinde öngörülen artış ile ilişkilendirilmiş spesifik genetik belirteçlere sahip varyantlardır. Mevcut durumda hiçbir SARS-CoV-2 varyantı VOI olarak tanımlanmamıştır
- Endişe edilen varyant (VOC) : Bulaşabilirlikte artış, daha şiddetli hastalık, önceki enfeksiyon veya aşılama sırasında üretilen antikorların etkinliğinde ciddi azalma, tedavi veya aşılarda etkinliğinde azalma, tanısal tespit başarısızlıklarında kanıt bulunan varyantlardır. Omicron (B.1.1.529, BA.1, BA.1.1, BA.2, BA.3, BA.4 ve BA.5 soyları)
- Sonucu ağır olan varyant (VOHC) : Tanı testi hedeflerinin kanıtlanmış başarısızlığı, aşılarda etkinliğinde ciddi azalma, aşıli bireylerde yüksek miktarda enfeksiyon veya şiddetli hastalığa karşı aşı kaynaklı korumanın çok düşük olduğunu gösteren kanıtlar, onaylanmış terapötiklere karşı önemli azalmış duyarlılık, daha şiddetli klinik hastalık ve hastaneye yatışlarda artışla karakterize varyantlardır. Mevcut durumda hiçbir SARS-CoV-2 varyantı VOHC olarak tanımlanmamıştır (CDC, 2022).

Alfa (B.1.1.7) varyantı

Alfa varyantı, ilk tanımlanan varyanttır, İngiltere’ de Eylül 2020’ de bildirilmiştir. Alfa varyantında 17 mutasyon bulunmuştur ki bunların birçoğu spike protein ile ilişkilidirler. Tespit edilen mutasyonların 14’ ü nokta mutasyon, 3’ü kısa aminoasit zincir delesyonudur. COVID-19’ un bulaşıcılığını artırma ihtimali en yüksek olan mutasyonlar N501Y, H69-V70del ve P681H olarak bildirilmiştir.

Beta (B.1.351) varyantı

Beta varyantının ilk bildirimi Ekim 2020’ de Güney Afrika’ dan olmuştur. Beta varyantında ki mutasyonlar spike proteinde 3 RBD mutasyonu (K417N, E484K ve

N501Y) ve 5 NTD mutasyonu şeklindedir. Yeniden enfekte etme riskinin yüksek olduğu ve azalmış aşı etkinliği ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir.

Gama (P.1) varyantı

2021 Ocak ayında de Brezilya’ dan ilk bildirim yapılmıştır. Bu varyant, N501Y, E484K ve K417T RBD mutasyonlarını, ayrıca beş NTD mutasyonu içermektedir. Daha önceki varyantlardan 3-4 kat daha yüksek virüs seviyeleri ile sonuçlandığı ve tahmini 1,1 -1,8 kat daha yüksek ölüm oranlarını olduğu tahmin edilmektedir (Tao ve ark 2021).

Delta (B.1.617.2) varyantı

Delta varyantı ilk olarak Ekim 2020’ de Hindistan’ da keşfedilmiştir. Daha sonra 2021’ in ikinci yarısında en az 185 ülkeye yayılarak küresel olarak baskın bir varyant haline gelmiştir. Spike proteininde L452R ve P681R mutasyonlarını taşır. Alfa varyantından %40-60 daha fazla bulaşıcı olduğu ve orijinal Wuhan SARS-CoV-2 suşundan kabaca iki kat daha fazla bulaşıcı olduğu bildirilmiştir (Rudan ve ark 2022).

Omicron (B.1.1.529) varyantı

Omicron varyantı, Güney Afrika’ daki Gauteng eyaletinde artmaya başladıktan sonra 26 Kasım 2021’ de DSÖ tarafından bir endişe verici varyant olarak ilan edilmiştir. Ardından, Kasım 2021’ de çok sayıda ülkede hızla tespit edilmiş ve Aralık 2021’ in başlarında, tüm kıtalarda dünya çapında 22 yerde doğrulanmıştır. Bilinen N501Y, D614G, K417N ve T478K mutasyonlarını taşır, ancak etkileri hala belirsiz olan daha fazla sayıda başka mutasyona da sahip olduğu düşünülmektedir. Şu ana kadarki en bulaşıcı varyant olduğu ve ayrıca bağışıklık tepkisinden kaçabildiği, ancak akciğerlere daha az afinitesi olduğu ve dolayısıyla daha az ölümcül olduğu düşünülmektedir (Rudan ve ark 2022).

1. 2. 8. Tedavi

COVID-19 için spesifik bir antiviral tedavi olmayıp özellikle yatan hastalarda destek tedavisi ön plandadır. Bu nedenle öncelikle hastaların ayaktan izlemine veya yatışına karar vermek gerekmektedir. T.C. Halk Sağlığı COVID-19 Erişkin Hasta Tedavi Rehberi’ ne göre COVID-19 olgu tanımına uyan hastaların ilk değerlendirmesi yapılır. Ateş, öksürük, boğaz ağrısı, kas/eklem ağrıları gibi semptomları olup solunum

sıkıntısı olmayan (dakika solunum sayısı < 24/dakika, SpO₂ ≥ %93 oda havasında) ve Akciğer filmi veya akciğer bilgisayarlı tomografisi normal olan hastalar komplike olmamış hastalık olarak değerlendirilir ve ayaktan izleme alınır. Ateş, kas/eklem ağrıları, öksürük ve boğaz ağrısı gibi semptomları olup, solunum sayısı < 30/dakika SpO₂ > 90 olan ve akciğer grafisinde veya akciğer bilgisayarlı tomografisinde hafif-orta pnömoni bulgusu olan hastalarda kötü prognostik ölçütlere bakılarak yatış kararı verilir.

COVID-19 enfeksiyonu için etkene karşı etkinliği ve tedavide güvenilirliği tam olarak kanıtlanmış bir ilaç tedavisi henüz bulunmamaktadır. Pandeminin başladığı dönemde, hastalığın ölümcül olabildiği ve etkili bir antiviral ilacı olmadığı için, birçok ülkede önceden farklı enfeksiyonların tedavisi için ruhsat almış, güvenli olarak bildirilmiş ve in vitro çalışmalarda SARS-CoV-2' ye karşı etkinliği belirtilmiş ya da klinik olarak etkili olabileceği düşünülen hidroksiklorokin, favipiravir, remdesivir, lopinavir-ritonavir gibi ilaçların yeniden konumlandırılarak tedavide kullanılması önerilmiştir. Devamında bu ilaçların COVID-19 hastalarında kullanılmasıyla elde edilen, geniş çaplı hasta gruplarını içeren gözlemsel klinik araştırmaların sonuçlarının elde edilmesi ve COVID-19' daki etkinliğini analiz eden randomize kontrollü klinik çalışmaların sonuçlanmasıyla tedavi stratejileri yenilenmiştir. Hidroksiklorokin ve lopinavir/ritonavirle ilgili randomize kontrollü çalışmalar salgının ilk dönemlerinde sonuçlanmış ve COVID-19 hastalığı için yeteri derecede etkili olmadıkları kanaatine varılarak kullanımları durdurulmuştur. Özellikle Amerika Birleşik Devletleri (ABD) ve Avrupa' da tercih edilen remdesivir üzerinde yapılan çalışmalarda da bu ilacın ağır COVID-19 vakalarında önemli bir etkisinin olmadığı gözlemlenmiş, fakat bu ülkelerde mevcut antiviral ilaç gereksinimi sebebiyle remdesivirin ağır COVID-19 vakalarında kullanımına devam edilmiştir. Bir diğer antiviral olan favipiravirle ilgili önemli sonuçlar veren çalışmalar ise daha geç bildirilmiş ve bu sonuçlar favipiravirin COVID-19 hastalığının tedavisindeki yerinin tekrar değerlendirilmesine neden olmuştur. Yapılmış randomize kontrollü çalışmalarla, favipiravirin hastane yatış açısından ve COVID-19' un sebep olduğu ölümleri azaltma açısından mevcut tedaviye göre bir avantaj sağlamadığı sonucuna varılmıştır. Ancak favipiravirle ilgili alakalı yapılmış birkaç klinik araştırmada COVID-19 hastalarının semptom gösterme sürelerini kısaltabileceği bildirilmiştir bu yüzden, hasta değerlendirilerek hekiminin

uygun gördüğü hallerde kullanılabileceği düşünülmüştür (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2020c).

1. 2. 9. Korunma

COVID-19 enfeksiyonundan korunmanın ana kuralı ilk olarak enfeksiyonu olan kişilerle temastan korunmaktır. DSÖ, COVID-19 bulaşmasını önlemek ve enfeksiyondan korunmaya yönelik çeşitli öneriler yayınlamıştır. Ülkemizde de salgın yönetimi T.C. Sağlık Bakanlığı' nın koordinasyonunda sektörler arası iş birliği ile yönetilmektedir. Diğer solunum yolu etkenlerinin bulaş riskini azaltmak için uygulanan temel kurallar COVID-19 enfeksiyonu için de önerilmektedir. Bunlar;

1. Ellerin temizliğine önem verilmeli, eller en az 20 saniye süresince su ve sabunla yıkanmalı, bunlar bulunmuyorsa alkol bazlı el antiseptiği kullanılmalıdır.
2. Eller temizlenmeden ağız, göz, burun gibi mukozalarla temas ettirilmemelidir.
3. Hasta kişilerle temas edilmemeli, araya en az 1 metre mesafe konulmalıdır.
4. Hasta kişilerle direk temas edilecekse eller sık sık yıkanmalıdır.
5. Hastalarla temas riski nedeniyle sağlık merkezlerine gidilmemeli, gidilmesi mecburi ise en az temasa özen gösterilmelidir.
6. Öksürme, hapşıрма gibi damlacık saçılan durumlarda ağız ve burun tek kullanımlık kağıt mendil ile kapatılmalı, kağıt mendil yok ise dirsek içi kullanılmalı, kalabalık yerlerden uzak durulmalı, girilecekse, tıbbi maske ile ağız ve burun kapatılmalıdır.
7. Çiğ veya az pişmiş hayvansal ürünler yenilmemeli, iyi pişmiş yiyecekler tüketilmelidir.
8. Çiftlik, canlı hayvan pazarı ve hayvan kesim noktası gibi enfeksiyon açısından yüksek risk barındıran yerlerde bulunulmamalıdır.
9. Herhangi bir yere seyahatten sonra 14 gün içinde herhangi bir solunum yolu bulgusu görülürse, tıbbi maske kullanarak en yakın sağlık kuruluşuna başvurulmalıdır (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2020d).

Dünya Sağlık Örgütü, akut solunum yolu enfeksiyonu semptomları ile sağlık kuruluşuna başvuran, COVID-19 olması olası veya COVID-19 tanısı konulmuş hastalar için temas kurallarına, damlacık ve solunum yolu önlemlerine uyulmasını önermektedir. COVID-19 şüpheli veya kesin tanısı konmuş bir hastayla temas etmesi gereken sağlık çalışanları, eldiven, önlük, N95/FFP2 veya N99/FFP3 maske, göz koruması veya yüz koruması kullanılmalıdır. Hastanın odasına girerken eldiven ve tek

kullanımlık önlük giyilmeli, N95/FFP2 veya N99/FFP3 maske takılmalı, muayene bitiminde atık kutusuna atılmalıdır. COVID-19 şüpheli kişilerden alınan tüm örnekler bulaşıcı kabul edilmeli ve kişiler buna yönelik kişisel koruyucu ekipmanları kullanılmalıdır. Klinik örnekleri toplayan, işleyen veya taşıyan sağlık personeli de standart önlemlere ve biyogüvenlik uygulamalarına uymalıdır (WHO 2021).

Aşılanmanın, bulaşıcı hastalıkların önlenmesi ve kontrol edilmesinde en etkili ve en ekonomik yöntem olduğu kanıtlanmıştır (Rémy ve ark 2015). SARS-CoV-2' ye karşı aşı geliştirme çalışmaları da henüz salgının ilk aylarında başlatılmıştır. Dünya' da ABD, Almanya, Rusya ve Çin başta olmak üzere birçok ülkede SARS-CoV-2' ye karşı aşı çalışmaları yapılmıştır. COVID-19' a karşı farklı aşı türleri geliştirilmektedir. Bunlar canlı attenüe ve inaktif viron aşıları, nükleik asit bazlı DNA ve mRNA aşıları, viral vektör aşıları (replikatif ve nonreplikatif) ve rekombinant protein aşılarıdır (Kaur ve Gupta 2020). Dünya Sağlık Örgütü verilerine göre 6 Haziran 2022 tarihi itibariyle tüm dünya genelinde toplam 11.864.214.773 doz aşı yapılmıştır. Tam aşıli kişi sayısı 4.721.625.990 iken, en az bir doz aşı yaptırmış kişi sayısı 5.191.662.043 olarak bildirilmiştir (WHO 2022b).

Ülkemizde ise Sağlık Bakanlığı verilerine göre 14 Haziran 2022 tarihi itibariyle toplam uygulanan aşı sayısı 147.789.589 dur. 1.doz aşı uygulanan kişi sayısı 57.852.170 iken, 2.doz aşı uygulanan kişi sayısı 53.079.699 ve 3.doz aşı uygulanan kişi sayısı 27.817.306 olarak bildirilmiştir. 1.doz aşı uygulama oranı %93,20 iken, 2.doz aşı uygulama oranı %85,51 olarak belirtilmiştir (Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı 2022). 12 Ocak 2022 itibariyle, tüm dünyada acil kullanım onayı almış aşılarda ve onay tarihleri Çizelge 1.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 1.2. Acil kullanım onayı almış COVID-19 aşıları

COVID-19 Aşısı	Aşı türü	Onay Tarihi
Pfizer/BioNTech	mRNA	31 Aralık 2020
AstraZeneca/AZD1222	Viral Vektör	16 Şubat 2021
Janssen/Ad26.COV 2.S	Viral Vektör	12 Mart 2021
Moderna	mRNA	30 Nisan 2021
Sinopharm	Viral vektör	7 Mayıs 2021
Sinovac-CoronaVac	İnaktif Aşı	1 Haziran 2021
Bharat Biotech BBV152 COVAXIN	İnaktif Aşı	3 Kasım 2021
Covovax(NVX-CoV2373)	Protein subunit	17 Aralık 2021
Nuvaxovid(NVX-CoV2373)	Protein subunit	20 Aralık 2021

(WHO 2022c)

Ülkemizde uygulanan aşılarından olan Pfizer/BioNTech (BNT162b2) aşısı mRNA temelli bir aşıdır ve semptomatik COVID-19 enfeksiyonuna etkinliği %95' tir. 3'er hafta arayla iki doz 0,3 ml intramüsküler yoldan uygulanmaktadır. Bu aşının varyantlara etkinliğini değerlendiren bir çalışma, iki doz aşı uygulamasının alfa varyantı üzerinde %93,7, delta varyantı üzerinde %88,0 etkinliği olduğunu belirtmiştir. Yan etkilerden nadir görülen yaklaşık beş milyonda bir anafilaksi ve 16 ila 39 yaşları arasında milyonda onaltı oranında miyokardit/perikardit yer almaktadır. Ülkemizde faz 3 klinik çalışmaları yapılan Sinovac (CoronaVac) aşısı ise inaktive edilmiş bir tam virüs aşısıdır. Bir alüminyum hidroksit adjuvanına sahiptir. Aşı uygulaması 28 gün arayla iki doz şeklinde intramüsküler yoldan yapılmaktadır (Dayan 2021). Yapılan bir çalışmada ikinci dozdan 14 gün sonra aşının etkinliği %83,5 olarak bildirilmiştir. Aşılanan grupta görülen en sık yan etki ise %18,9 oranında halsizlik gibi basit semptomlardır (Tanrıover ve ark 2021).

1. 3. Mikrobiyota

İnsanlar ve diğer çok hücreli organizmalar kendilerini çevreleyen mikroplarla yakın ilişki içinde yaşarlar. İnsan vücudunda çok sayıda bakteri, arkea, virüs ve tek hücreli ökaryot bulunur. Konaklarıyla barış içinde bir arada yaşayan bu mikroorganizmaların koleksiyonuna mikrobiyota, mikroflora veya normal flora denir. Bu mikroorganizma topluluğunun genetik materyaline ise mikrobiyom denmektedir (Sekirov ve ark 2010)

İnsan vücudunun 10^{13} hücreden oluşurken, 10^{14} mikroorganizma içerdiği düşünülmektedir ki bu insanın kendi hücre sayısından 10 kat fazla mikroorganizma içerdiği anlamına gelmektedir. Mikrobiyomun ise insan genomundan en az 100 kat fazla farklı gen barındırdığı bildirilmektedir (Qin ve ark 2010).

İnsan genomu projesinin 2003 yılında tamamlanmasından sonra, insan biyolojik yapısının tam olarak anlaşılması için insanın genetik kodunun yeterli olmadığı, insan vücudunda yaşayan diğer mikroorganizmaların da insan sağlığını etkilediği ve insan hücreleri ile etkileşim içinde olabileceği belirtilmiştir. 2007 yılında Amerika Birleşik Devletleri' nde NIH(National Institutes of Health)(ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü) tarafından 'İnsan Mikrobiyomu Projesi' başlatılmıştır (Gevers ve ark

2012). İnsan Mikrobiyomu Projesi kapsamında ilk etapta 300 adet gönüllü arasından seçilen 242 kişinin (129 erkek, 113 kadın) oral kavite, deri, burun, gastrointestinal sistem ve ürogenital sistem örnekleri toplanmış ve çalışmadaki katılımcıların 131' inden değişik zamanlarda yeniden örnekler alınarak mikrobiyomun stabilitesi değerlendirilmiştir (Mitreva ve Consortium 2012). Bu proje ile insan vücudunda bulunan tüm mikroorganizmaları belirlemek, bireyler arasındaki mikrobiyom farklılıklarını ortaya çıkarmak ve mikrobiyomda ki farklılıkların hastalıklarla ilişkisi olup olmadığını anlamak amaçlanmıştır (Peterson ve ark 2009).

İnsan mikrobiyotasının çoğunluğu, en fazla gastrointestinal sistem olmak üzere solunum sistemi, deri ve genitoüriner sistemde yerleşmiştir. Gastrointestinal sistemin geniş yüzey alanı ve mikroorganizmalar için zengin besin öğeleri içermesiyle kolonizasyon için ideal bir alandır. Bu özelliğiyle kolon, insan vücudunda ki mikroorganizmaların %70' inden fazlasını barındırmaktadır (Yılmaz ve Altındış 2017).

2012 yılında tamamlanan Avrupa birliği destekli MetaHIT (METAgenomics of the Human Intestinal Tract) insan bağırsak sistemi metagenomu projesiyle de bağırsak yolunun mikrobiyal gen kataloğunun oluşturulması amaçlanmıştır. Bu proje ile 124 deneğin dışkı örneklerinin tam metagenomik analizi ile toplam 3,3 milyon mikrobiyal gen karakterize edilmiştir (Qin ve ark 2010).

Son yıllarda yapılan çalışmalarla bilim dünyasının mikrobiyom ve mikrobiyotaya olan ilgisi artmış ve mikrobiyotanın sağlıkla ve birçok farklı hastalıkla ilgili olabileceği düşünülmeye başlanmıştır.

1. 3. 1. Mikrobiyotanın Gelişimi

İnsan mikrobiyal kolonizasyonu doğumla başlar ve yaklaşık 3 yıl süresince mikrobiyota yetişkin benzeri hale gelene kadar gelişmeye ve değişmeye devam eder. Daha sonra mikrobiyotada büyük ölçüde değişiklik olmazken, yaşlılıkta ise tekrar bir miktar değişim yaşanmaktadır (Arrieta ve ark 2014). Doğumdan yetişkinliğe kadar mikrobiyota, birkaç büyük bakteri grubunun hakim olduğu basit bir topluluktan, konakçıya hem fayda hem de zarar verebilen oldukça çeşitli bir ekosisteme dönüşür (Rogier ve ark 2014).

Tarih boyunca, insan fetüsü mikrobiyolojik olarak steril olarak kabul edilmiştir, ilk mikrobiyal maruziyetin vajinal doğumda yenidoğanın annenin vajinal ve gastrointestinal mikrobiyotası ve çevresindeki ortam ile teması yoluyla gerçekleştiği düşünülmektedir. Bununla birlikte, son yıllarda elde edilen bulgular, gelişmekte olan fetüs için bakteriyel maruziyetin başlangıcı olarak hamileliği işaret etmektedir. *Enterococcus* türleri ve *Lactobacillus* türleri gibi maternal gastrointestinal ve/veya ürogenital bölgeden gelen bakteriler, göbek kordonu kanında, amniyotik sıvıda, mekonyumda, plasenta ve fetal membranlarda tespit edilmiştir (Thum ve ark 2012).

Bu konuda yapılan çalışmalarda mekonyum mikrobiyotasının, plasenta ve amniyotik sıvının mikrobiyotasına benzer olduğu bulunmuştur (Ardissone ve ark 2014).

Edinilen bulgular ışığında fetal mikrobiyotanın ilk gelişiminin maternal ortamın kontrolü altında olduğu anlaşılmaktadır. Annenin kan faktörlerinin fetüse transplasental transferi, rahimde amniyotik sıvının fetal yutulması ve perinatal dönemde maternal mikrobiyota tarafından neonatal gastrointestinal sistemin kolonizasyonu ile fetal mikrobiyota için ilk adımlar atılır (Thum ve ark 2012).

Bunun yanı sıra hamilelik sırasında kullanılan ilaçlar, beslenme, hastalık, stres veya ağır metal maruziyeti gibi dış faktörlerinde bebeğin mikrobiyal kolonizasyonu üzerinde etkisi olabileceği düşünülmektedir. Konuyla ilgili yapılmış bir hayvan deneyinde, gebelik sırasında strese maruz kalan annelerden doğan bebek maymunlarda, stresli olmayan annelerden doğan kontrol bebekleriyle karşılaştırıldığında *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus*' un ciddi şekilde daha az miktarda olduğu belirtilmiştir (Matamoros ve ark 2013).

Fetüsün mikroorganizmalarla karşılaştığı ikinci aşama doğum anıdır. Bebeklerde doğum şekli de mikrobiyotanın şekillenmesinde kritik bir basamaktır. Fetüs doğum kanalından geçerken çok çeşitli mikroorganizmalara maruz kalmaktadır. Yapılan çalışmalarda vajinal olarak doğan bebeklerin mikrobiyotalarının, sezaryan ile doğan bebeklerden belirgin şekilde farklı olduğu belirtilmektedir. Fetüs, vajinal doğum sırasında vajen ve bağırsak mikrobiyotasına maruz kalırken, sezeryan ile doğum sırasında maternal deri mikrobiyotasına maruz kalmaktadır. Dolayısıyla vajinal yolla dünyaya gelen bebeklerin kendi annelerinin vajinal mikrobiyotasına benzer

şekilde *Lactobacillus*, *Prevotella* veya *Sneathia* gibi bakteri toplulukları edindiği buna karşın sezaryen ile doğan bebeklerin ise annelerinin cilt floralarına benzer şekilde *Staphylococcus*, *Corynebacterium* ve *Propionibacterium* gibi bakterilerce kolonize oldukları tespit edilmiştir (Dominguez-Bello ve ark 2010).

Doğumdan sonra da anne sütü aracılığıyla anneden bebeğe mikrobiyota transferi devam etmektedir. Anne sütü *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Bacteroides*, *Enterococcus*, *Streptococcus* ve *Clostridium* gibi farklı bakteri cinslerini içerir (LaTuga ve ark 2014).

Dolayısıyla anne sütü, doğumdan sonraki birkaç saat içinde bebek bağırsağına giren erken bir bakteri ve besin kaynağıdır. 107 sağlıklı anne-bebek çifti üzerinde yapılan bir çalışmada, anne sütüyle beslenen bebeklerin, yaşamlarının ilk ayında bağırsak bakterilerinin %27,7' sini anne sütünden ve %10,4' ünü meme başı derisinden aldıkları sonucu elde edilmiştir. Anne sütünden ve meme başı derisinden gelen bakteriler, bebeklerin bağırsaklarında yaşamın ilk ayında en belirgin olduğu ve anne sütü ile beslenen bebeklerde bağırsak bakterilerinin yaklaşık %40' ını oluşturdıkları tespit edilmiştir (Pannaraj ve ark 2017).

Anne sütü, oligosakkaritler gibi prebiyotikleri ve *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* gibi probiyotikleri aynı anda içeren bir besindir. Anne sütünün içeriğindeki laktoferrin, oligosakkaritler, lizozomlar, antikorlar ve sitokinler bağırsaktaki *Bifidobacterium* sayısını artırmaktadır (Özdemir ve Demirel 2017). Prebiyotik içerikli anne sütü ile beslenen bebeklerde bifidobakteri ve laktobasil proliferasyonu artarken formül mama ile beslenen bebeklerde daha fazla enterokok ve enterobakteri türlerine rastlanılır (Forchielli ve Walker 2005). Daha sonra mikrobiyota, yaşamın ilk iki yılında kolonizasyon, gelişme ve olgunlaşma gibi farklı aşamalarla büyük ölçüde değişir. Yukarıda açıklanan faktörlerin yanı sıra antibiyotiklere maruz kalma, beslenme şekli, prebiyotik/probiyotik kullanımı, genetik ve çevresel faktörler de mikrobiyal topluluğun değişkenliğinde önemli rol oynar (Kumar ve ark 2016).

1. 3. 2. Mikrobiyotayı Etkileyen Faktörler

Genetik

Konak genomu mikrobiyota profili üzerine etki eden faktörlerden biridir. Ancak maternal genotipin fetal mikrobiyom üzerindeki etkilerini tanımlamak için fetal genetik etkiler ve çevresel faktörler kontrol altına alınmalıdır (Romano-Keeler ve Weitkamp 2015). Monozigotik ikizlerin bağırsak mikrobiyotalarının incelendiği bir çalışmada dışkı bakteri profilleri arasındaki benzerlik, akraba olmayan bireylere göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (Zoetendal ve ark 2001).

Bir başka araştırmada da monozigotik ikizlerin bağırsak mikrobiyal gen profillerinin dizigotik ikizlere göre daha benzer oldukları ortaya konulmuştur (Xie ve ark 2016).

Beslenme

Diyet alışkanlıkları, bağırsak mikrobiyotasının çeşitliliğine etki eden temel faktörlerden biri olarak kabul edilir. Yapılan araştırmalarda farklı besin içeriklerinin farklı bakteriyel topluluklarca kullanıldığı ve o topluluğun kolonizasyonunu sağladığı; bu şekilde dominant bakteri türlerinin oluşmasında beslenmenin etkisinin olduğu ortaya konmuştur. Değişik coğrafyalarda hayatlarını sürdüren insan topluluklarının mikrobiyotalarının karşılaştırılması beslenme alışkanlıklarının uzun dönemde mikrobiyota üzerindeki etkisinin değerlendirilmesini sağlamıştır. Bu bağlamda, batı tarzı beslenme modeli ile ABD ve Avrupa Birliği ülkelerinde yaşayanlar ile Afrika ve Güney Amerika' nın kırsal kesimlerinde yaşayan kişilerin bağırsak mikrobiyotalarında belirgin değişiklikler gözlenmiştir (Özdemir ve Demirel 2017).

Bitkisel kaynaklı yüksek lif içeren diyetle beslenen Afrikalı çocukların bağırsak mikrobiyotası, Avrupa da yaşayan çocuklarla karşılaştırıldığında, mikrobiyotalarında özellikle *Prevotella* ve *Xylanibacter* açısından zengin olacak şekilde *Bacteroidetes*' te önemli bir artış ve *Firmicutes* içeriğinde azalma tespit edilmiştir. Ayrıca Afrikalı çocuklarda anlamlı olarak daha fazla kısa zincirli yağ asidi ve daha az *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakteryal içerik tespit edilmiştir. Bu çalışmayla yüksek lifli diyetle ilişkili çeşitli çevresel mikroplara maruz kalmanın potansiyel olarak faydalı bakteri genomlarını artırarak mikrobiyomu zenginleştirebileceği bunun yanı sıra küreselleşmenin ve besin açısından zengin, kirlenmemiş gıdaları yemenin ise mikrobiyal zenginliği azaltmak gibi istenmeyen bir etkisinin olacağı belirtilmiştir (De Filippo ve ark 2010).

Beslenme ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi ortaya koymak için yapılan bir kontrollü beslenme araştırmasında yağdan zengin liften fakir olan veya yağdan fakir liften zengin olan bir diyetin başlatılmasından sonra ilk 24 saat içinde mikrobiyom bileşiminin saptanabilir şekilde değiştiği, ancak enterotip çeşitliliğinin 10 gün boyunca aynı kaldığı belirtilmiştir. Bu nedenle, enterotip düzeyindeki değişimler ancak uzun süreli diyetle ilişkilendirilmiştir. Hayvansal proteinleri ve yağları fazla tüketenlerde bunların sindirimi için *Bacteroides* enterotipi artarken, karbonhidrat ve bitkisel proteinleri fazla tüketenlerde *Prevotella* enterotipinde artış görülmektedir (Wu ve ark.).

Prebiyotik ve probiyotik kullanımı da mikrobiyotayı etkilemektedirler. Prebiyotikler bağırsakta yaşayan bir veya birkaç bakteri topluluğunun büyümesini ve aktivitesini seçici şekilde artırarak konakçıyı faydalı yönde etkileyen sindirilemeyen gıda bileşeni olarak tanımlanmışlardır. En çok bilinen prebiyotikler fruktooligosakkaritler, inülin, galaktooligosakkaritlerdir ve *Bifidobacterium* sayısında artışa neden olurlar. Probiyotik ise konağa ait yerli mikroflorayı implantasyon veya kolonizasyon yoluyla değiştiren yeterli sayıda canlı, tanımlanmış mikroorganizma içeren ve bu yolla konakta yararlı sağlık etkileri gösteren ürün olarak tanımlanmıştır. Probiyotik olarak en sık kullanılan bakteriler ise *Bifidobacteria* ve *Lactobacillus* tür. Ayrıca prebiyotik ve probiyotikleri birarada bulunduran ürünlere de sinbiyotik adı verilmiştir (Schrezenmeir ve de Vrese 2001).

Antibiyotik kullanımı

Antibiyotikler sadece hedef bakterilere etki edecek seçici toksisiteye sahip olmadığı için mikrobiyota üzerinde de etki gösterirler. Antibiyotik uygulamasının bağırsak mikrobiyota disbiyozuna, yani bileşim ve işlevinde bozulmaya neden olabileceği bildirilmiştir. Geniş spektrumlu antibiyotikler, bağırsak topluluğundaki bakterilerin %30' unun bolluğunu etkileyerek taksonomik zenginlik, çeşitlilik ve düzgünlükte hızlı ve önemli düşüşlere neden olabilir. Antibiyotik tedavisi durdurulduğunda ise mikrobiyota, eski bileşimine benzer bir bileşime geri dönebilir ancak başlangıç durumu genellikle tamamen geri kazanılmaz. Aslında, antibiyotik kaynaklı mikrobiyota değişiklikleri, aylar hatta yıllar süren uzun zaman periyotlarından sonra da kalabilir (Francino 2016). Mikrobiyom bileşiminin değişimi, kullanılan antibiyotik sınıfına, dozuna ve ilaca maruz kalma süresine göre değişir.

Çocuk ve yetişkin hastalarda sıklıkla kullanılan bir antibiyotik olan makrolidler ile ilgili yapılan bir çalışmada çocuklarda makrolid kullanımının bağırsak mikrobiyotasında *Actinobacteria*' yı azaltan ve *Bacteroides* ve *Proteobacteria*' yı artıran bir değişikliğe yol açtığı gösterilmiştir. Başka bir çalışmada ise Vankomisin in *Firmicutes* de azalma ve *Proteobacteria*' da artış ile fekal mikrobiyota çeşitliliğinde büyük bir düşüş yaptığı tespit edilmiştir (Iizumi ve ark 2017).

İdrar yolu enfeksiyonu tedavisinde kullanılan iki antibiyotik olan nitrofurantoin ve siprofloksasin in mikrobiyotaya etkilerini araştıran bir çalışmada ise siprofloksasin kullanımına bağlı *Firmicutes* ve *Actinobacteria*' nın (özellikle *Bifidobacterium*) azaldığı ve *Bacteroides*' in arttığı, nitrofurantoin e bağlı ise kısmi bir değişiklik olduğu bildirilmiştir (Stewardson ve ark 2015).

Antibiyotiklerin mikrobiyotaya uzun vadeli etkilerini araştıran başka bir çalışmada, gönüllü deneklere yedi gün boyunca klindamisin verilip 2 yıl süresince belli aralıklarla mikrobiyota profilleri değerlendirilmiş ve önemli değişiklikler olduğu saptanmıştır. 7. Günün sonunda özellikle *Bacteroides* cinsinde ciddi bir azalma tespit edilmiş ve 2 yıl sonra bile mikrobiyotanın başlangıç kompozisyonuna dönemediği saptanmıştır. Ayrıca 7. günde yapılan analizde klindamisin dirençli *bacteriodes* sayısında artış bulunmuş ve 2 yıl sonra da artmış direncin devam ettiği belirtilmiştir (Jernberg ve ark 2007).

Yaşlanma

Yapılan çalışmalar, insan sağlığının her yaşta fiziksel ve zihinsel gelişim için yararlı bir mikrobiyotaya ihtiyaç duyduğunu ve yaşlanma sürecinde fizyolojik işlevlerdeki değişimin mikrobiyotadaki türlerin kompozisyonunu ve işlevlerini etkileyebileceğini ortaya koymuştur. Yaşlanmaya bağlı bağışıklık sisteminin işlevselliğinde bir azalma meydana gelir ki bu bağırsakta kronik bir inflamatuvar duruma neden olur. Bunun bir sonucu olarak yaşlı insanlarda bağırsak mikrobiyotasının bileşiminde ve yapısında olumsuz değişiklikler meydana gelir. Yaşlı deneklerde yapılan bir çalışmada özellikle *Firmicutes* filumunun çok düşük bolluk ve düşük çeşitlilikte olduğu saptanmıştır. Başka bir çalışma, genç deneklere kıyasla yaşlılarda *Bacteroidetes* bolluğunun önemli ölçüde daha yüksek ve *Clostridium* küme IV bolluğunun daha düşük olduğunu bildirmiştir.

Bağırsak mikrobiyotasının yaşa bağlı değişiminin ciddi etkilerinden biri de, *Enterobacteriaceae* ve diğer Gram negatif bakterilerin bolluğundaki artıştır. Bu Gram-negatif bakteriler, endotoksin gibi davranarak bağırsakta iltihaplanmaya neden olabilen lipopolisakkaritleri salgılama yeteneğine sahiptir. Yaşlı insanların bağırsaklarında, özellikle asetat, bütirat ve propiyonat olmak üzere kısa zincirli yağ asidi (SCFA) seviyesinin genç deneklere kıyasla azaldığı belirlenmiştir. Yaşlıların bağırsak mikrobiyotası tarafından SCFA üretiminde yaşa bağlı düşüş, bağışıklık sistemini engelleyebilir ve bu da yaşlı insanlarda bağırsakla ilgili çeşitli hastalıklara neden olabilir (Kumar ve ark 2016).

Çevresel faktörler

Yaşanılan coğrafya, kentsel veya kırsal yaşam, mevsimler, hijyen koşulları, sigara içme, fiziksel aktivite, stres gibi birçok çevresel faktörde insan mikrobiyota kompozisyonunu üzerine etki eder.

Coğrafya bağırsak mikrobiyal popülasyonlarının bileşimi üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir. Afrika' nın kırsal kesimlerdeki çocuklarda dışkı bakterilerinin çeşitliliği, Avrupa Birliğindeki gelişmiş toplulukların çocuklarınkinden daha fazladır. Yapılan bir çalışmada, dışkı bakterilerinin tipi ve fonksiyonel genlerinin ABD' deki, Venezuela ve Malavi' nin kırsal bölgelerindeki bireyler arasında farklılık gösterdiği tespit edilmiştir (Conlon ve Bird 2014).

Sigaranın bağırsak mikrobiyota bileşimi üzerinde etkisini araştıran bir çalışmada, Crohn Hastalığı olan bireylerde ve sağlıklı bireylerde sigara kullanmanın *Bacteroides-Prevotella'* yı artırdığı bulunmuştur (Benjamin ve ark 2012).

Egzersizin mikrobiyota ile ilişkisini araştıran bir çalışmada da ise aşırı egzersiz yapanların yüksek bir bağırsak mikroorganizma çeşitliliğine sahip oldukları bulunmuştur ve aşırı egzersizin aşırı protein tüketimiyle birlikte olabileceği de ayrıca vurgulanmıştır (Clarke ve ark 2014).

Seyahat, vardiyalı çalışma veya diğer nedenlerle meydana gelen sirkadiyen düzensizlik de bağırsak sağlığını etkiler ve bağırsak mikrobiyal popülasyonunu değiştirebilir (Voigt ve ark 2014).

1. 3. 3. Bağırsak Mikrobiyotası

İnsan gastrointestinal sistemi, 100 trilyondan fazla mikroorganizma içeren bol ve çeşitli bir mikrobiyal topluluk barındırır. Özofagustan distal rektuma doğru gidildikçe, bakteri çeşitliliği ve sayısında artış olur. İnsan bağırsağında ki bakteri yoğunluğunun 10^{11} - 10^{12} /mL arasında olduğu varsayılmaktadır ki bu kolonun bilinen en yoğun nüfuslu mikrobiyal habitat olduğu anlamına gelir.

Son zamanlarda teknolojiye ki yeni gelişmelerle birlikte direkt dışkıdan izole edilen nükleik asitlerin analiz edilerek bağırsak mikrobiyotasının bileşenlerinin filogenetik tanımlaması ve miktar olarak ortaya konulması mümkün hale gelmiştir. Bağırsak mikrobiyotasının içeriğinde bakteriler, mayalar ve virüsler dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar bulunur. İnsan bağırsak mikrobiyotasında baskın olarak bulunan filumlar; *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* ve *Verrucomicrobia* filumlarıdır. Bunlar arasında da *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumları yaklaşık %90 oranında bulunur. *Firmicutes* filumu, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* ve *Ruminococcus* gibi çok sayıda farklı türden oluşur. *Firmicutes* filumunun %95' ini *Clostridium* cinsi temsil eder. Bir diğer baskın filum olan *Bacteroidetes* filumunu ise *Bacteroides* ve *Prevotella* gibi cinsler temsil eder. *Actinobacteria* filumunun bolluğu ise diğerlerine göre daha azdır ve daha çok *Bifidobacterium* cinsi bu filumu temsil eder (Rinninella ve ark 2019).

MetaHIT tarafından önerilen bir diğer sınıflandırma ise, coğrafya ve cinsiyete göre stabil olan, ancak beslenme ve ilaçlara farklı cevap verebilen enterotip olarak adlandırılan kümelerdir. Temel olarak üç farklı enterotip vardır: Yüksek oranda *Bacteroides* içeren Enterotip 1; *Prevotella* bolluğu yüksek olan Enterotip 2; ve *Ruminococcus* bolluğuna sahip Enterotip 3. Enterotip 1 grubunda bulunan bakteriler, proteazlar, galaktosidazlar ve heksoaminidazlar gibi enzimleri kodlayan genleri içerir. Bu enzimatik potansiyel, bu organizmaların enerjiyi diyet karbonhidratlarından ve proteinlerden elde ettiğini düşündürür. Enterotip 2, ağırlıklı olarak bağırsak mukoza tabakasını kaplayan müsin glikoproteinlerinin bir indirgeyicisi gibi görev alır. Enterotip 3 ise şekerlerin zardan transportunun yanı sıra müsin yıkımıyla da ilişkilidir. Enterotipler bunlar dışında başka metabolik etkilere de sahiptir. Örneğin biotin, pantotenat, riboflavin ve askorbat sentezi daha çok enterotip 1' de görülürken, enterotip 2' de folat ve tiamin sentezi daha fazla görülür (Toscano ve ark 2017).

1. 3. 4. Bağırsak Mikrobiyotasının İşlevleri

Bağırsakta yaşıyan mikroorganizmalar konağın bağırsak mukozası ile simbiyotik ilişki içindedir ve önemli metabolik, immünolojik ve koruyucu işlevleri vardır. Besinlerini konakçı diyet bileşenlerinden ve dökülen epitel hücrelerinden elde eden bağırsak mikrobiyotası, kendi başına geniş bir metabolik kapasiteye ve önemli fonksiyonel görevlere sahip bir organdır (Toscano ve ark 2017).

Metabolik işlevler

Bağırsak mikrobiyotası, besinlerini büyük ölçüde diyet karbonhidratlarından alır. Polisakkaritler, insanların proksimal bağırsaklarında sindirilmez; bunun yerine, distal bağırsaktaki bağırsak mikrobiyotası tarafından şekerler veya SCFA' lar gibi sindirilebilir bileşiklere dönüştürülürler. Bu enerji substratları, özellikle kolonositler ve genel olarak konakçı tarafından kullanılır (Boulangé ve ark 2016).

Bacteroides, *Fecalibacterium*, *Roseburia*, *Bifidobacterium* ve *Enterobacteria* gibi bakteriler tarafından, proksimal sindirimden kaçan karbonhidratlar ve sindirilemeyen oligosakkaritlerin fermantasyonu, konak için zengin enerji kaynakları olan butirat, propiyonat ve asetat gibi kısa zincirli yağ asitlerinin sentezi ile sonuçlanır. Karbonhidrat metabolizmasına etki eden baskın mikroorganizmalar olan *Bacteroides* cinsinin üyeleri, bunu glikozil transferazlar, glikozit hidrolazlar ve polisakkarit liyazlar gibi enzimleri eksprese ederek gerçekleştirir. Bu bakteriler içinde en önemlisi 260' dan fazla hidrolazı kodlayabilen bir genoma sahip olan *Bacteroides thetaiotaomicron*' dur (Toscano ve ark 2017).

Dışkıda en fazla tespit edilen üç SCFA, asetat, propiyonat ve butirattır. Bu üç temel kısa zincirli yağ asidi, insan vücudu için önemli farklı roller üstlenirler. Bütirat, insan sağlığı için en önemli kısa zincirli yağ asididir. Bütirat insan kolon hücreleri için temel bir enerji kaynağıdır, aynı zamanda kolon kanseri hücrelerinin apoptozunu indükler ve histon deasetilazı inhibe ederek gen ekspresyonunu düzenleme yoluyla kanser önleyici aktivite gösterir. Bütiratın, glukoz ve enerji homeostazı üzerinde yararlı etkileri olan cAMP' ye bağlı bir mekanizma yoluyla bağırsak glukoneogenezini aktive edebileceğine dair kanıtlar da vardır. Propionat ise epitel hücreleri için potansiyel bir enerji kaynağıdır, bunun yanı sıra glukoneogenezde de rol oynadığı karaciğere aktarılır. Propionatın intestinal glukoneogenezde glukozu dönüştürülmesi,

karaciğerde glukoz üretimini azaltarak enerji homeostazına katkı sağlar ve sonuç olarak adipoziteyi azaltır. Diğer bir bol bulunan SCFA asetattır ve bakterilerin büyümesinde etkili bir kofaktördür. İnsan vücudunda asetat, periferik dokulara taşınır ve kolesterol metabolizmasında ve lipogeneze kullanılır ve farelerde yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular, merkezi iştah düzenlemesinde de önemli rolü olduğunu göstermiştir.

Bakteriler, fumarat, süksinat ve laktat dahil olmak üzere birçok ara fermentasyon ürünleri üretir, ancak bunlar, diğer bakteriler tarafından yaygın olarak kullanılması nedeniyle normal olarak sağlıklı bireylerin dışkılarında düşük seviyelerde tespit edilir. Örneğin, laktat tipik olarak diğer bakteriler tarafından ya propiyonata ya da bütirata dönüştürülür ve bu nedenle yetişkin dışkısında ihmal edilebilir seviyelerde bulunur (Rowland ve ark 2018).

Karbonhidrat fermentasyonu ve bakteri metabolizmasının bir sonucu olarak bağırsakta sentezlenen oksalat, *Oxalobacter formigenes*, *Lactobacillus türleri* ve *Bifidobacterium türleri* gibi organizmalar tarafından karşılanır böylece böbrekte oksalat taşı oluşum riski azaltılır (Sidhu ve ark 1998).

Bağırsak mikrobiyotası lipid metabolizması üzerinde ki etkilerini adipositlerde ki lipoprotein lipaz aktivitesinin inhibe edilmesini önleyerek gösterir. Ayrıca, *Bacteroides thetaiotaomicron* türünün lipid sindirimi için pankreatik lipaz tarafından gerekli olan bir kolipazın ekspresyonunu artırarak lipid hidrolizini arttırdığı gösterilmiştir.

Bağırsak mikrobiyotasının metabolik işlevlerinden bir diğeri ise K vitamini ve B vitamininin birçok bileşeninin sentezidir. *Bacteroides* cinsinin antidiyabetik, antiaterojenik, antiobezojenik, hipolipidemik ve immünomodülatör olduğu bilinen konjuge linoleik asidi (CLA) sentezlediği gösterilmiştir. Bağırsak mikrobiyotasında ki bakteriler piruvik asit, fumarik asit, sitrik asit ve malik asit miktarlarını da artırır ki bunlar yüksek enerji metabolizmasının göstergeleridir (Toscano ve ark 2017).

Bağırsak mikrobiyotası, metabolik strese (hipoksi, glukoz yoksunluğu, egzersiz gibi) yanıt olarak öncelikle iskelet kası, beyin ve karaciğerde eksprese edilen adenosin monofosfatla aktive edilmiş protein kinazın (AMPK) salınımını baskılar. Bağırsak bakterileri tarafından teşvik edilen AMPK inhibisyonu, mitokondriyal yağ asidi oksidasyonu, ketogenez, glukoz alımı ve insülin

sekresyonunun azalmasına ve lipogenez ile kolesterol ve trigliserit sentezinin artışına yol açar (Boulangé ve ark 2016).

Meyve ve sebzelerden elde edilen polifenollerin çoğu, ince bağırsakta zayıf bir şekilde emilir ve kolona geçer. Mikropsuz ve insan mikrobiyotası ile ilişkili hayvanlarda ve in vitro fekal inkübasyonlarda yapılan çalışmalar sonucunda, ana polifenollerin, biyoaktivitelerini etkileyebilecek olan kolon mikrobiyotası tarafından geniş ölçüde metabolize edildiği ortaya konmuştur. Özellikle *Lachnospiraceae*, *Bacteroides distasonis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Bacteroides uniformis*, *Bacteroides ovatus* ve *Eubacterium cellulosolvens CG19-1* ve *Eubacterium ramulus* polifenol metabolizması ile ilişkilendirilmiş türlerdir (Rowland ve ark 2018).

İmmünolojik işlevler

Bağırsak mikrobiyotası ve bağışıklık sistemi arasındaki etkileşim, doğum sonrası erken dönemde immün sisteminin olgunlaşma süreciyle başlar ve tüm yaşam boyunca immün sistemin modülasyonu ve kendi antijenlerine yanıtı ile devam eder. Bağırsak mikrobiyotasının doğum sonrası erken yaşamda konakçı bağışıklık sisteminin gelişimi ve olgunlaşmasındaki rolü, mikropsuz fare deney modeli ile ortaya konmuştur. Bağırsak mikrobiyotasının yokluğunun lenfoid organların oluşumunu olumsuz etkilediği, özellikle mikropsuz farelerin dalak ve mezenterik lenf düğümlerinin kusurlu oluşuma sahip olduğu, bağırsak Peyer plaklarının daha küçük olduğu, azalmış sayıda CD4⁺ T hücresi ve azalmış IgA üretimi tespit edilmiştir.

Bağırsak mikrobiyotası, bağışıklık hücrelerini etkileyebilecek bağışıklık düzenleyici ve anti-enflamatuar işlevlere sahip moleküllerin üretimi yoluyla bağışıklık sistemini modüle eder. Mikrobiyotanın, konakçı ürünleri modifiye ederek ve novo sentez yoluyla sindirilmiş gıdalardan ürettiği, kısa zincirli yağ asitleri enflamasyonun ve bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde en yaygın olarak araştırılanlardır. Kısa zincirli yağ asitleri, serbest yağ asidi reseptörleri (FFAR) olarak da adlandırılan G-protein-bağlı reseptörler aracılığıyla birkaç enteral olmayan hücre tipine sinyal verir. Bu reseptörlerden biri olan GPR109A/HCA2, bütirat tarafından bağışıklık sisteminde aktive edilir ve bağırsak mikrobiyotası ile bağışıklık sistemi arasındaki sinyal, homeostazı düzenlemek ve ortak bakterilere karşı bağışıklık toleransı ile patojenlere karşı bağışıklık arasındaki dengeyi korumak için esastır. Bütirat ve GPR109A/HCA2' nin etkileşimi, immün tolerans oluşumunda iş birliği yapar ve özellikle regülatör T

hücre gelişimine aracılık eder. Butirat ve propiyonat gibi SCFA' lar, Histon deasetilaz inhibisyonu ve FFAR ile etkileşim yoluyla dendritik hücrelerin gelişimini inhibe ederek antijen sunumunu da modüle eder (D' Amelio ve Sassi 2018).

Yapılan bir çalışmada *Lactobacillus kefir* ile tedavi edilen farelerde IL-6 ve Granülosit monosit koloni stümüle edici faktör (GM-CSF) üretiminde önemli bir düşüş olduğu bulunmuştur, bu da *Lactobacillus kefir*' nin bağırsak inflamatuvar disbiyozunun önemli bir faktörü olduğunu gösterir. Bir tür simbiyotik bakteri olan *Bacteroides fragilis* ise, IL-17 üretimini inhibe ederek ve bağırsak Treglerinin etkinliğini artırarak anti-inflamatuvar etkileri olan polisakkarit A üretebilir (Shi ve ark 2017).

Bağırsak mukozal plazma hücreleri dendritik hücreler tarafından indüksiyon üzerine salgısal IgA üretir. Bu fonksiyona lamina propria ve foliküler dendritik hücrelerde ki My-D88 sinyalleşmesinin aracılık ettiği tahmin edilmektedir. My-D88 sinyali, bağırsak mikrobiyotası tarafından aktive edilebilir. Ayrıca, bağırsak mikrobiyotası, Peyer plaklarındaki dendritik hücreleri TGF- β , CXCL13 ve B-hücresi aktive edici proteini (BAFF) salgılamak için uyarır, bu da IgA üretimine yol açar (Jandhyala ve ark 2015).

Yapılan bir çalışmada, prebiyotiklerle tedavi sonrası dışkıdaki IgA miktarının ciddi şekilde arttığı, mezenterik lenf düğümlerinde ve peyer plaklarında proinflamatuvar faktörün ekspresyonunun önemli ölçüde azaldığı gösterilmiştir. Ek olarak, IL-10, CXCL-1 ve Mucin-6 genlerinde artış, IFN -gamma, GM-CSF ve IL-1beta genlerinde ise azalma tespit edilmiştir (Shi ve ark 2017).

Bağırsak mikrobiyotası, sindirilmiş gıdalardan önemli immünomodülatör işlevi olan indol türevleri ve poliaminler gibi metabolitler üretir. İndol türevleri, anti-mikrobiyal peptitlerin, müsinlerin üretimini ve bağırsak goblet hücrelerinin çoğalmasını uyararak enteral mukozanın bütünlüğünü ve patojenlere karşı bariyer savunmasını destekler. Putresin, spermidin ve spermin gibi poliaminler, gen ekspresyonu ve proliferasyonunda önemli roller üstlenirler ve bağırsak mukozasının ve yerleşik bağışıklık hücrelerinin gelişimini artırır (D' Amelio ve Sassi 2018).

Koruyucu işlevler

Yerli ve patojen mikroorganizmalar, mukozal yüzeylerin en dıştaki fiziksel bariyerini oluşturan bir mukus tabakası ile epitel hücrelerinden fiziksel olarak ayrılır. Mukus tabakasının ana bileşeni, müsin adı verilen glikoproteinlerdir. Müsinler, epitelin apikal tarafından lümen içine salgılanır, ana bağırsak müsinini, MUC2 ‘ dir. Yapılan çalışmalarda mikropsuz fareler MUC2 üretiminde bir azalma gösterdiğinden ve mukus tabakası SPF (spesifik-patojen içermeyen) farelerde *Bifidobacterium* cinsine ait türler tarafından korunduğundan, müsin üretimi yerli mikrobiyotanın varlığından ve bileşiminden etkilendiği açıktır (Libertucci ve Young 2019).

Kommensal mikrobiyota, bağırsak mukozasının patojen istilasına engel oluşturan “bariyer etkisine” katkıda bulunur. Yapılan çalışmalar, prebiyotik ile diyet takviyesi yoluyla bağırsak mikrobiyotasının modülasyonunun, sıkı bağlantı proteinlerinin (ZO-1 ve okludin) ekspresyonunu artırarak epitelyal bariyer bütünlüğünü arttırdığını göstermiştir (Fava ve Danese 2011).

Bağırsak mikrobiyotası ayrıca lokal immünoglobulinleri indüklemek yoluyla patojenik suşların aşırı büyümesinin önüne geçmektedir. Bağırsak mikrobiyotasının, özellikle *Bacteroides* cinsi gibi gram negatif organizmaların, bağırsak mukozasındaki plazma hücrelerini salgılayan IgA’ yı (sIgA) eksprese etmesine neden olan bağırsak dendritik hücrelerini (DC’ ler) aktive ettiği gösterilmiştir (Jandhyala ve ark 2015).

1. 3. 5. Bağırsak Mikrobiyotasının İlişkili Olduğu Hastalıklar

Sağlıklı bağırsak mikrobiyal topluluğu, ekosistemin zenginliği, bozulmaya yatkınlığı ve bozulma öncesi duruma geri dönme yeteneklerini tanımlayan çeşitlilik, kararlılık, direnç ve esneklik gibi kavramlarla karakterizedir. Birçok çevresel ve konakçıya ait faktör tarafından mikrobiyal ekosistemin direnç ve esneklik yeteneklerini aşacak şekilde mikrobiyotada meydana gelen bileşimsel ve işlevsel değişiklikler disbiyozis olarak tanımlanmaktadır (Levy ve ark 2017). Sağlıklı mikrobiyotanın nasıl olacağı halen tartışma konusu iken sağlıklı kontrollerle yapılan çalışmalarda hastalık varlığında oluşan “sağlıksız” mikrobiyota için “disbiyozis”, sağlıklı mikrobiyotaya için ise “öbiyozis” terimleri sıklıkla kullanılmaktadır. İntestinal mikrobiyota; esas olarak gastrointestinal sistem hastalıkları üzerine bağırsak epiteli, bağırsak peristaltizmi gibi pekçok ana faktörle etki ederken, aynı zamanda inflamasyon, immün sistem, beslenme ve endokrin sistem üzerinde ki etkileriyle de

sindirim sistemi dışında birçok hastalığın patogeneğinde rol oynar (Yılmaz ve Altındış 2017). Birçok çalışmada mikrobiyotada oluşan disbiyozun hepatit, tip 2 diyabet, atopi, astım, kanser, inflamatuvar bağırsak hastalığı gibi sindirim sistemi hastalıkları, Alzheimer gibi nörolojik hastalıklar, obezite ve ateroskleroz gibi metabolik hastalıklarla ilişkili olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda bazı hastalık durumlarında bağırsak mikrobiyotasında ki bakterilerin kompozisyonunda değişiklikler olduğu tespit edilmiş ve değişik hastalıklarda değişik bakteri türlerinin arttığı veya azaldığı belirlenmiştir (Sever Kaya ve Saka). Örneğin tip 1 diyabette *Clostridium*, *Bacteroides* ve *Veillonella* cinslerinde artma *Firmicutes/Bacteroidetes* oranında azalma (Murri ve ark 2013), tip 2 diyabette *Firmicutes* konsantrasyonlarında, artma, obezitede *Firmicutes* filumunda artma ve *Bacteroidetes* filumunda azalma (Muscogiuri ve ark 2019), inflamatuvar bağırsak hastalıklarında *Firmicutes* filumunda azalma *Bacteroidetes* filumunda ve *Enterobacteriaceae* ailesinde artma (Carding ve ark 2015), romatoid artritte yeni tanı almış hastalarda *Bacteroides* cinsinde azalma *Prevotella copri* türünde artma (Bodakikahe ve ark 2019) yapılan çalışmalarla ortaya konmuş hastalık mikrobiyota ilişkilerindendir.

Bağırsak mikrobiyotası ve viral enfeksiyonlar

Mikrobiyotanın konumuna ve bolluğuna bağlı olarak, virüslerin de şüphesiz mikrobiyota ile etkileşimleri vardır. Çok sayıda kanıt, kommensal mikrobiyotanın çeşitli mekanizmalar yoluyla virüsleri istila ederek düzenlediğini ve dolayısıyla viral enfeksiyonlarda uyarıcı veya baskılayıcı rollere sahip olduğunu göstermektedir. Ayrıca, ortak mikrobiyotanın bütünlüğünün istilacı virüsler tarafından bozulması konakta disbiyozu neden olur ve bu virüs enfektivitesini daha da etkiler. Mikrobiyotanın viral enfeksiyona katkısı konakçı ve/veya virüs üzerinde doğrudan veya dolaylı etkiler yoluyla ortaya çıkabilir. Genetik rekombinasyonu kolaylaştırmak, virion stabilitesini artırmak, hedef hücrelerin çoğalmasının sürdürülmesini sağlamak, hücrelere bağlanmayı uyarmak ve viral replikasyona katkı sağlamak gibi doğrudan etkilerin yanısıra bağışıklık düzenleyici mikro-ortamı indüklemek, antiviral bağışıklık tepkilerini bastırmak gibi mekanizmalarla dolaylı olarak da etki edebilir (Bodakikahe ve ark 2019). Örneğin, mikrobiyota ve ürünleri, enfektiviteyi veya tepkileri değiştirmek için viral partiküllerle doğrudan etkileşime girebilir. Aynı zamanda mikrobiyota, immün reaksiyonları indükleyerek viral enfeksiyonu dolaylı olarak da etkileyebilir. Aslında, TLR sinyali yoluyla mikrobiyota aracılı immün sistem

aktivasyonunun, mikrobiyotadan olumsuz etkilenen tüm virüsler için geçerli olduğu görülmektedir. Mikrobiyotanın her virüsü birden fazla mekanizma ile etkilemesi mümkündür.

Örneğin dünyada viral ishalin en önemli sebebi olan rotavirüs enfeksiyonunda probiyotiklerin viral diyare süresini azalttığı ve *Lactobacillus rhamnosus* GG uygulamasının rotavirüs yayılımını azalttığı gösterilmiştir. Aynı zamanda kommensal bakterilerden kaynaklanan çözünür faktörlerin, bağırsak epitelyal hücre yüzeyi glikanlarını değiştirmek ve rotavirüs bağlanmasını önlemek suretiyle intestinal epitel hücrelerinde rotavirüs enfeksiyonunu bloke ettiği belirlenmiştir.

Orthomyxoviridae ailesinden zarflı bir RNA virüsü olan influenza virüs patogenezi incelediğinde ise mikropsuz farelerin, normal farelere kıyasla influenza A virüsüne daha duyarlı olduğu ve normal farelere kıyasla antibiyotikle tedavi edilen farelerde daha yüksek pulmoner influenza virüsü titreleri görüldüğü belirlenmiştir. Antibiyotikle tedavi edilen farelerde artan viral replikasyon ve hastalık, virüse özgü CD8+ T hücre tepkilerinin ve IgG ile IgM antikor seviyelerinin azalmasıyla bağıntılıdır, bu da mikrobiyotası tükenmiş farelerde bozulmuş adaptif bağışıklık tepkilerini düşündürür. Hem bağırsak hem de üst solunum yollarından gelen ortak bakterilerin, bağışıklık sistemini kalibre eden sinyaller sağlayarak influenza virüsü enfeksiyonlarını sınırlamada önemli rolü olduğu bilinmektedir.

Fekal-oral yolla yayılan enterik bir virüs olmasına rağmen, nadiren insan merkezi sinir sistemini istila ederek felce neden olabilen *Picornaviridae* ailesinden zarfsız, tek sarmallı RNA virüsü *Poliovirüs* için ise antibiyotikle tedavi edilen farelerde virüs replikasyonu ve patogenezinin azaldığı gösterilmiştir, bu da mikrobiyotanın poliovirüs enfeksiyonunu desteklediğini düşündürmektedir. Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerden gelen bakteriyel polisakkaritler, poliovirüse bağlanır ve erken RNA salınımını önlemek için virionu stabilize eder. Peptidoglikan ve lipopolisakkarit (LPS) dahil N-asetilglukozamin içeren bakteriyel polisakkaritler, poliovirüsü bağlar ve termal inaktivasyonu sınırlar. Ayrıca LPS, poliovirüs reseptörüne viral bağlanmayı güçlendirerek, poliovirüsün konak hücrelere bağlanmasına yardımcı olur (Robinson ve Pfeiffer 2014).

Mikrobiyotanın viral enfeksiyonlar üzerinde ki etkileri araştırılmaya devam ederken, öte yandan virüsler tarafından kommensal mikrobiyotanın modülasyonu ile

ilgili yapılan çalışmalar da virüs enfeksiyonunun mikrobiyota disbiyozunu indüklemekte önemli bir rolü olduğunu öne sürmektedir. Örneğin HIV ile enfekte hastalarda, potansiyel patojenik bakteri ailelerinin zenginleşmesiyle kommensal mikrobiyota bileşiminin bozulduğunu görölmüştür. HIV hastalarının tükürüğindeki mikrobiyal çeşitliliğin, potansiyel patojenik *Megasphaera*, *Campylobacter*, *Veillonella* ve *Prevotella* türlerinin bolluğunun artması ve kommensal *Veillonella* ve *Streptococcus* türlerinin azalması ile birlikte önemli ölçüde değiştiği gösterilmiştir. Dışkı örneklerinde ise genel mikrobiyota zenginliğinde tutarlı bir azalma, ancak *Firmicutes* ve *Proteobacteria*'nin seçici zenginleşmesiyle karakterize değişiklikler saptanmıştır. Ek olarak, fekal mikrobiyotadaki türlerin alfa çeşitliliği, hastalarda immün yetmezliğin şiddeti ile negatif ilişkili olarak bulunmuştur (Li ve ark 2019).

İnfluenza enfeksiyonu olan hastalarda yapılan çalışmada ise özellikle *Prevotella* spp. ve anaerob bakterilerin önemli ölçüde azaldığı, *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium propinquum* türlerinin ise arttığı bulunmuştur (Edouard ve ark 2018).

Hepatit B virüsü (HBV) ile enfekte hastalarda, barsak mikrobiyotasının bileşimindeki değişiklik, önemli ölçüde zenginleşmiş *Actinomyces*, *Megamonas*, *Lachnospiraceae*, *Bacteroides*, *Asaccharobacter*, *Parabacteroides*, *Butyri cimonas*, *Clostridium* IV, *Coriobacteriaceae*, *Escherichia/Shigella*, *Ruminococcus*, *Clostridiales*, *Enterobacteriaceae*, *Ruminococcaceae* ile ilişkilendirilmiştir. Tür düzeyinde yapılmış bir çalışmada ise fırsatçı patojenik yapıya sahip bakteri türlerinde önemli ölçüde artış, HBV ile enfekte hastaların dışkı örneklerinde potansiyel yararlı etkileri olan türlerde azalma tespit edilmiştir. Hepatit C virüsü (HCV)'de ise *Streptococcus* ve *Lactobacillus* düzeninde artış ve *Clostridiales*'te azalma ile bakteri çeşitliliğinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca HCV hastalarının dışkı örneklerinde daha düşük *Firmicutes*, *Proteobacteria* ve *Actinobacteria* bolluğu ve daha yüksek *Bacteroidetes* bolluğu saptanmıştır (Li ve ark 2019).

Norovirüs enfeksiyonunun bağırsak mikrobiyotası üzerindeki etkisini araştıran insan temelli bir çalışmada enfekte olmuş bireylerin çoğunda dışkı mikrobiyotasının, enfekte olmayan kontrollerinkine benzer bir bileşim sergilediği halde, bağırsak

mikrobiyotasında önemli bir çeşitlilik ve zenginlik kaybı olduğunu bulmuşlardır. *Proteobakteri* sayısında açık bir artış ve buna karşılık gelen *Bacteroidetes*’ te azalma ile karakterize değişiklikler saptanmıştır (Nelson ve ark 2012).

Bağırsak mikrobiyotası ve COVID-19 enfeksiyonu

SARS-CoV-2 hücrelere protein S’ nin Anjiyotensin Converting Enzim II (ACE2) reseptörlerine bağlanması yoluyla girer. ACE2 reseptörleri, akciğerlerdeki epitel hücreleri, ince bağırsak ve kolon, böbreğin tübüler hücreleri, beyindeki nöronal ve glial hücreler, enterositler, düz kas hücreleri, kardiyomiyositler ve vasküler endotel hücreler dahil olmak üzere viral enfeksiyona duyarlı çeşitli insan hücrelerinde eksprese edilir. SARS-CoV-2 ayrıca enfekte hücrelere giriş için ince bağırsak epitel hücrelerinde eksprese edilen bir enzim olan transmembran proteaz serin 2 (TMPRSS2) için reseptörleri kullanır. SARS-CoV-2 aktivitesi, bağırsakta bağırsak iltihabı ve ishale duyarlılığı artıran ACE2 modifikasyonlarına neden olabilir. ACE2 sadece bağırsak iltihabında önemli bir rol oynamakla kalmaz, aynı zamanda bağırsak mikrobiyotasının bileşimi üzerinde de önemli bir etkiye sahiptir (Villapol 2020).

COVID-19’ un kötü klinik gidişat ve ölümlerinin büyük çoğunluğunun, sağlıklı mikrobiyom ile de karakterize edilen yaşlanma ve bir veya daha fazla komorbiditenin varlığı gibi spesifik risk faktörlerine sahip kişilerde geliştiği bilinmektedir (Donati Zeppa ve ark 2020).

COVID-19 hastalarının %3.34- 11.4 ‘ ünün, özellikle kritik hastaların, kusma ve ishal gibi gastrointestinal semptomlara sahip olduğu bulunmuştur. Ayrıca, dışkı örneklerinde viral RNA ve canlı virüsler tespit edilmiş ve bu da sindirim sisteminin bir viral replikasyon ve aktivite bölgesi olabileceğini düşündürmüştür. Bununla birlikte, COVID-19 ve bağırsak mikroorganizmaları arasındaki etkileşim tam olarak anlaşılamamıştır (Gu ve ark 2020).

1. 3. 6. Mikrobiyota Analiz Yöntemleri

Bağırsak mikrobiyotası, konakçı ile simbiyotik ilişki içinde olan karmaşık bir ekosistemdir. Bağırsak mikrobiyotası ile hastalıklar arasındaki ilişki ilk olarak 20. yüzyılın başlarında öne sürülmüştür ve o tarihten bu yana bağırsak mikrobiyotası bileşimini karakterize etmek için pek çok teknik geliştirilmiştir ve kullanılmıştır. 1990’ lı yıllara kadar kültür temelli yöntemler kullanılmış olsa da, bağırsak mikrobiyotasının

yalnızca tahmini olarak %30 kadarlık bir kısmının kültürü yapılabilmektedir. 1990' lardan bu yana ise, kültürden bağımsız tekniklerdeki gelişmelerle birlikte bu ekosistemin içeriğine ve çeşitliliğine dair bilgi birikimi artmaya başlamıştır (Fraher ve ark 2012).

Bağırsak mikrobiyotasını incelemek kullanılan yöntemler kültür temelli, moleküler temelli ve küçük metabolitlerin saptanmasına dayalı yöntemler olmak üzere 3 grupta incelenmektedir. Moleküler temelli yöntemler ise sekansa temelli yöntemler ve sekans dışı yöntemler olmak üzere gruplandırılmıştır ve aşağıda gösterilmiştir (Sarangi ve ark 2019)

A. Kültüre Temelli Yöntemler

B. Moleküler Temelli Yöntemler

a. Sekans temelli yöntemler

1. 16S rRNA ve hiperdeğişken bölgelerin sekansı
2. Tüm genom sekansı (metagenom)
3. Tüm RNA sekansı (meta-transkriptom)

b. Sekans dışı yöntemler

1. Floresan insitu hibridizasyon flow sitometri
2. Pulse field jel elektroforezi
3. Denatürasyon gradient jel elektroforezi
4. Isı gradient jel elektroforezi

c. Küçük metabolitlerin saptanması temelli yöntemler

1. Gaz koromotografisi, Kitle spektrometrisi
2. Kitle spektrometrisine eşlenmiş kapiller elektroforez
3. Nükleer ve proton manyetik rezonans spektrometrisi
4. Infrared spektrometri

Mikrobiyota çalışmaları için örnek alımı ve saklama koşulları

Bağırsak mikrobiyotasının analiz edileceği çalışmalarda kullanılabilecek örnekler; gaita, fekal swab örnekleri, rektal swab örnekleri, doku örnekleri, mukoza

biyopsisi ve intestinal mukozal lavaj örnekleridir ve sıklıkla gaita örneği kullanılır. Ancak, gastrointestinal sistemin farklı alanlarında farklı bakteri popülasyonları barındırabileceği göz önüne alındığında dışkı mikrobiyotasının farklı bağırsak kısımlarındaki mikrobiyota ile aynı olmayacağı unutulmamalıdır. Ancak gerek non-invaziv oluşu, gerekse kolay ve ucuz bir işlem olması sebebiyle bağırsak mikrobiyota çalışmalarında en sık kullanılan örnek dışkıdır. Dışkı örneği sağlık kuruluşunda veya evde alınabilir, tüm genom sekanslanacak ise en az 1 gr gaita gereklidir. Alınan örneği anaerobik koşullarda +4°C' de 24 saate kadar, anaerob/normal ortam koşullarında ve -20°C' de birkaç gün (maksimum 1 hafta), anaerob/aerob ortam koşullarında -80°C' de birkaç aydan birkaç yıla kadar saklamak mümkündür. Uygun koşullarda alınmış fekal örneğin hızlıca -80°C' de dondurulması referans yöntemdir. Bu yöntemle ile taze örnekten direkt DNA izolasyonu ile arasında anlamlı fark yoktur. Hızlı dondurma yöntemiyle hücrenin bütünlüğü korunur veya kısmen bozulur. Kolon mukoza biyopsileri ve kolon lavaj sıvısı da nadiren de olsa mikrobiyota çalışmalarında kullanılmaktadır. Dışkı örneklerinin mukozal biyopsi örneklerine göre dezavantajı ise; bağırsak lümen içeriğinin geçici oluşu, mukozal mikrobik çeşitliliği yansıtmayı ve diyetten kolaylıkla etkileniyor oluşudur. Mukozal mikrobiyota ise bağırsak epitel yüzeyinde bulunduğu için daha az değişkendir ve konak hücreleri ile doğrudan etkileşim göstermektedir. Ayrıca daha fazla sayıda mikroorganizma içerdiği de düşünülünce mukozal biyopsi örneklerin altın standart örnekleme tipi olarak görülmektedir. Ancak kolonoskopik biyopsinin invaziv bir işlem oluşu, kolon hazırlığı ihtiyacı ve alınacak biyopsi materyalinin boyutunun da sonucu etkilemesi bu yöntemin dezavantajları olarak kabul edilmektedir (KÖROĞLU 2017).

Kültüre dayalı yöntemler

Mikrobiyota ile ilgili yapılan ilk çalışmalar geleneksel bakteri kültürü tekniklerine ve kültürü yapılan bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri kullanılarak fenotiplendirmelerine dayanmaktaydı. Ancak bağırsaktaki bakterilerin büyük bir kısmı zorunlu anaeroblardır ve gastrointestinal sistemden numune alma, laboratuvara taşıma ve depolama esnasında genellikle hayatta kalamazlar. Ayrıca, insan bağırsağında bulunan çeşitli organizmaların kültürde büyüme eğilimlerinde farklılık gösterir. Bu nedenle, kültüre dayalı teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda ortaya çıkan sonuçların anaerobik bakterileri yok sayıp in vitro kültürde

kolayca üreyen aerobik organizmalar lehine baskın olacağını dikkate almak gerekir (Sarangi ve ark 2019).

Kültür temelli yöntemler oldukça ucuz olmasına rağmen, zahmetlidir ve bağırsak mikrobiyota profili hakkında kısmi bilgi sağlar ki bugüne kadar bağırsak mikrobiyotasında ki bakterilerin sadece <%30 kadarının kültürü yapılabilmektedir. 1990 lı yıllardan itibaren kültürden bağımsız tekniklerin gelişimine paralel olarak, kültüre dayalı teknikler de gelişme göstermiştir. Örneğin jel mikrodamlacıkları ve mikrobiyal kültür çipleri gibi yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu teknikler yüksek verimlidir ve daha önce kültürü yapılmamış organizmaların kültürünü mümkün kılar. Bununla birlikte, bazı bağırsak mikrobiyota elemanlarının birbirleriyle simbiyotik bir ilişkisi vardır, bu tür organizmalar büyüme için diğer organizmaların metabolik aktivitesine bağlıdır ki bu da yeni kültür tekniklerinin kullanılabilirliğini sınırlamıştır (Fraher ve ark 2012).

Moleküler yöntemler

21. yüzyıla doğru gidildikçe mikrobiyolojide kültüre dayalı tekniklerden ziyade, özellikle 16S rRNA geninin dizilenmesi gibi yöntemlerin ortaya konulmasıyla, kültürden bağımsız yöntemler ön plana çıkmıştır. Moleküler yöntemlerde mikroorganizmaların tanımlanması ve sınıflandırılması, genetik bilginin saklandığı DNA ve RNA' nın tespiti ile gerçekleştirilmektedir. Yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip moleküler yöntemler, kültürü yapılamayan mikroorganizmalar için avantaj sağlar ve etkenler kültür yöntemlerinden çok daha hızlı şekilde tespit edilebilirler. Kullanılan ilk DNA temelli yöntemler, bakteri kümesinden izole edilen DNA' lar içinde, ilgili genlere özel problemlerin kullanıldığı hibridizasyon teknikleri ya da dizileme teknikleri öncesinde hedeflenen genlerin PCR yöntemiyle çoğaltılması yöntemleridir. Bu çalışmalarla geniş kapsamda bakteri çeşitliliği tanımlanabilir veya biyokimyasal fonksiyonların dair bilgiler edinilebilir. Genellikle ribozomal RNA' nın küçük altbirimi olan 16S rRNA' daki dizi farklılıkları üzerine çalışan bu yöntemlerle; mikrobiyotadaki bakteriyel çeşitlilik, mikrobiyal topluluğu oluşturan bakterilerin kalitatif ve kantitatif miktarları ve hastalıklarla ilişkili mikrobiyota profilindeki değişimler araştırılabilir hale gelmiştir (Gürsoy ve Barış 2017).

DNA izolasyonu

Moleküler yöntemler kullanılırken, DNA dizilimi ortaya koymak için DNA'nın örneklerden izole edilmesi gerekir. DNA izolasyonu için farklı protokoller geliştirilmiştir. Bu yöntemler, analiz için kullanılan numunenin türüne göre değişmektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar da kullanılan yöntemle göre farklılık gösterebilmektedir (Sarangi ve ark 2019). Fekal DNA ekstraksiyon işlemi genellikle numuneyi homojenleştirme, hücreyi parçalama, DNA olmayan maddelerin uzaklaştırılması ve DNA'yı saflaştırma adımlarını içermektedir (Wu ve ark 2019).

Bakteriyel 16S ribozomal RNA

70S ribozomlar her bakteri hücresinin sitoplazması boyunca dağılmıştır ve 30S, 50S olmak üzere iki alt birimden oluşurlar. 50S alt birimi 5S ve 23S olarak iki RNA molekülü içerir. 30S alt birimi veya küçük alt birim ise 16S ribozomal rRNA adı verilen bir RNA molekülü içerir. 16S rRNA'nın işlevi, protein sentezinin başlatılması ve devam ettirilmesidir (Fraher ve ark 2012).

Bakteriyel 16S rRNA, türler arasında bazı varyasyonlarla birlikte yaklaşık 1500 nükleotit uzunluğundadır. Bu genin birkaç uzantısı, tüm bakteri gruplarında yüksek oranda korunmuştur. Bu korunmuş diziler, belirgin çeşitlilik gösteren hiperdeğişken bölgeler arasına serpiştirilmiş şekilde yer alır. V1 ila V9 arasında dokuz hiperdeğişken bölge tanımlanmıştır. Bu hiperdeğişken bölgelerdeki nükleotid dizilerindeki varyasyonlar, bakterilerin evrimsel farklılıklarını göstermekle birlikte, bakteri türlerinin tanımlanması ve filogenetik sınıflandırması içinde yol göstericidir. Başlangıçta geliştirilen moleküler teknikler, çeşitli bakteri türleri boyunca bu hiperdeğişken bölgelerin yalnızca uzunluklarındaki ve nükleotid dizilerindeki büyük varyasyonlardaki farklılıklardan yararlanmaktaydı. Bununla birlikte, son yıllarda, nükleik asit dizileme teknolojisindeki hızla artan gelişmeler, yüksek verimli birçok paralel dizilemenin geniş çapta erişilebilir olmasına yol açmıştır ve böylece bu teknikler bağırsak mikrobiyotasının incelenmesi için neredeyse altın standart haline gelmiştir (Sarangi ve ark 2019).

a. Sekans dışı yöntemler

Bu tekniklerde, öncelikle analiz edilecek numuneden bakteriyel nükleik asit ekstrakte edilir, ardından 16S rRNA geninin tamamının veya seçilmiş hiperdeğişken bölge içeren bir bölümünün amplifikasyonu yapılır. Bu, tüm 16S rRNA genini veya onun seçilmiş hiperdeğişken bölgelerini çevreleyen korunmuş bölgelere karşılık gelen

primerler ile Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) kullanılarak yapılabilir. Örnekte bulunan tüm bakterilerin 16S rRNA genlerinin veya hiperdeğişken fragmanlarının amplifiye karışımı daha sonra birkaç teknikten biri kullanılarak ölçülebilir. Bu teknikler, floresan insitu hibridizasyon flow sitometri, pulse field jel elektroforezi, ısı gradient jel elektroforezi ve denatürasyon gradient jel elektroforezi yöntemleridir. Bu yöntemlerin dezavantajı, yakın ilişkili bakterilerin 16S rRNA gen dizilerinin ve uzunluklarının büyük ölçüde benzer olmaları durumunda ayrımlarının güçlüğüdür. Ayrıca, düşük miktarda bulunan bakteri grupları da gözden kaçabilir. Bu nedenlerle, zamanla bu yöntemlerin yerini yeni nesil dizileme teknikleri almıştır (Sarangi ve ark 2019).

b. Sekansa dayalı yöntemler

Kullanılan ilk nükleik asit dizilimi yöntemlerinden olan Sanger tekniği, başlangıç materyali olarak saf DNA' ya ihtiyaç duyar ve deney başına yalnızca bir dizi oluşturur. Bu nedenle, bu nükleik asit moleküllerinin her birini ayrı vektörlere klonlamak ve her bir klonu sekanslamak suretiyle bu tekniği kullanarak birçok nükleik asit içeren bir numuneyi sıralamak mümkün değildir ayrıca yüksek maliyet ve emek gerektirir. Mikrobiyota, çeşitli genomik materyale sahip bir bakteri karışımı içerdiğinden, bunlar bu teknik kullanılarak dizilenemez.

Son yıllarda geliştirilen yeni dizileme teknolojileri ile bir mikrobiyota örneğinden izole edilen DNA karışımında bulunan her molekülün aynı anda dizilenmesi mümkün olmuştur. Bu teknikler ile büyük miktarlarda veri üretilir ve her bir numuneden gelen dizi sayısı genellikle birkaç milyona ulaşır. Geliştirilmiş çeşitli hesaplama yazılım araçları ile çok sayıda nükleotid dizisi tek seferde büyük bir veritabanıyla eşleşir ve analiz edilebilir (Sarangi ve ark 2019).

Yeni nesil dizileme teknikleri sekans verilerini daha az maliyetle ve daha hızlı şekilde sunan teknolojilerdir. Ticari olarak 454 Pyrosequencing® (Roche Diagnostics GMBH Ltd, Mannheim, Almanya), Illumina® (Illumina, San Diego, CA, ABD), Ion Torrent® (ThermoFisher, ABD) ve SOLiD™ (Life Technologies, Carlsbad, CA, ABD) gibi çeşitleri bulunmaktadır. Bu yöntemler tipik olarak klonlanmış amplikonlara değil, doğrudan amplikon DNA' sına veya toplam topluluk DNA' sına uygulanmaktadır.

16S rRNA gen amplikonlarına direkt sekans yönteminde ise çok miktarda 16S rRNA gen amplikonlarının masif paralel dizilenmesinde, yani aynı zamanda ve aynı

reaksiyon içinde dizilenebilmesi için, slaytlar (Illumina®), boncuklar (454 Pyrosequencing®) ve katı yüzeyler (SOLiD™) kullanılır. Pyrosequencing ile tek seferde %99 doğrulukta 500 milyon baz dizilenebilmektedir. Bu da Sanger dizileme yöntemine kıyasla yaklaşık iki bin kat daha fazla verim alınması demektir. Bu yöntemin diğer avantajları ise filogenetik identifikasyon, bilinmeyen bakterilerin tespiti ve tanımlanması, kısa sürede kantitatif veriler sunabilmesidir.

Ion Torrent yani iyon-yarı iletkenli sekanslama yöntemi 2007 yılında kurulan Jonathan Rothberg' ın şirketi tarafından geliştirilmiştir. Dizisi belirlenecek kalıp DNA' yı içeren kuyucuğa, türü bilinen tek bir deoksiribonükleotit trifosfat (dNTP) ilave edilir. Eklenen dNTP' ler kuyucukta ki kalıp DNA' ya komplementer ise kovalent bağ kurulur ve pirofosfat ile H⁺ iyonu açığa çıkar. Hidrojen iyonu kuyucuktaki pH' ı değiştirir ve kuyucukların zemininde ki ISFET dedektörü bu pH değişikliğini algılar. Ayrıca bütün kuyucuklar CMOS (Bütünleyici Metal Oksit Yarı iletkeni) ile kaplıdır. Kovalent bağ oluşumuyla ortaya çıkan hidrojen iyonu ISFET dedektörünce algılanır ve CMOS devresine elektrik sinyali olarak gönderilir. Bu yöntemin diğer yöntemlere göre avantajı düşük maliyetli, hızlı bir yöntem olması ve modifiye edilmiş enzim ve nükleotitlerin kullanılmasına gerek olmamasıdır (Rothberg ve ark 2011).

İlk olarak 1998 de toprak mikrobiyotasının araştırılması amacıyla kullanılan metagenom tekniği ise belirli DNA parçalarını dizilemek yerine, tüm DNA fragmanlarının dizilendiği bir yöntemdir. İnsan mikrobiyom projesi de dahil birçok çalışmada metagenom tekniği kullanılmaktadır (Fraher ve ark 2012).

Metatranskriptomik tekniği ise, DNA yerine RNA' nın ekstrakte edilmesi ve dizilenmesi dışında metagenomik yöntemlere benzerdir. DNA analizi, belirli bir mikrobiyal toplulukta bulunan bakterilerde bulunan genomik materyalin işlevsel kapasitesini değerlendirmemizi sağlar; ancak bu genlerin gerçekten ifade edilip edilmediğinden emin olunamaz. RNA çalışması ise, bakteri genomlarındaki çeşitli genlerin ekspresyonunu incelememize izin vererek, numunenin gerçek hayattaki fonksiyonel karakterizasyonuna hakkında bilgi verir (Sarangi ve ark 2019).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Çalışmaya 1 Kasım 2020–1 Şubat 2021 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi’ ne başvuran COVID-19 hastalarından nonsevere ve severe iki grup hasta dahil edildi. Nonsevere gruba COVID-19 semptomları ılımlı olup, görüntüleme bulgusu olmayan hafif olgular ile ateş ve solunum yolu enfeksiyonu semptomları bulunan ve görüntülemede pnömoni bulgusu olan orta olgulardan 16 hasta dahil edildi. Severe gruba solunum sayısı ≥ 30 /dakika. veya oksijen saturasyonu $\leq 93\%$ veya $PaO_2 / FiO_2 \leq 300$ mmHg veya akciğer görüntülemelerinde lezyonları 24-48 saat içinde yüzde 50’ den fazla ilerleyen şiddetli olgular ile şok tablosu, mekanik ventilasyon gerektirecek kadar ciddi solunum yetmezliği, yoğun bakım takibi gerektiren diğer organ yetmezlikleri bulunan kritik olgulardan 16 hasta dahil edildi. Ayrıca kontrol grubu olarak COVID-19’ u olmayan 16 sağlıklı bireyden rutin tetkikler amacıyla laboratuvara gönderilen dışkı örneklerinden arta kalan kısımlar çalışmaya dahil edildi. Hasta ve sağlıklı kontrollerin çalışmaya dahil edilme kriterleri; 18- 65 yaş aralığında olması, son 3 ay içerisinde antibiyotik kullanmamış olması, son 3 ay içerisinde prebiyotik/probiyotik tedavisi almamış olması, kronik hastalığı ve malignitesi olmaması olarak belirlendi.

2. 2. Örneklerinin Toplanması ve Saklanması

Çalışmaya dahil edilen bireylerin rutin tetkikler amacıyla alınan dışkı örnekleri steril burgu kapaklı dışkı taşıma kabına konarak bekletilmeden mikrobiyoloji laboratuvarına gönderildi. Laboratuvara ulaşan dışkı örneklerinin rutin tetkiklerinden arta kalan kısımları 200 mg olacak şekilde tartılarak 2 mL’ lik 3 adet mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzeri etiketlendi. DNA izolasyonu yapılınca kadar -80°C ’ de saklandı.

2. 3. Dışkı Örneklerinden DNA İzolasyonu

Çalışmamızda DNA izolasyonu için gaitaya özel ekstraksiyon kiti olan QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden Germany) kullanıldı ve üretici firma talimatları doğrultusunda DNA izole edildi. DNA ekstraksiyonu aşağıda sırası ile belirtilen protokole göre gerçekleştirildi.

1. 200 mg dışkı içeren ependorf tüpler buz üzerine alındı.
2. Her tüpe 2 mL Tampon ASL eklendi. 1 dakika vortekslenerek dışkının iyice homojenize olması sağlandı.
3. 1,6 mL supernatant etiketli 2 mL' lik mikrosantrifüj tüplerine pipetlendi.
4. Süspansiyon 70°C' de 5 dakika ısıtıldı.
5. Tüpler 15 saniye vortekslendi ve tam hızda 1 dakika boyunca santrifüj edildi.
6. 1.2 mL süpernatant yeni bir 2 mL' lik mikrosantrifüj tüpüne pipetlendi ve pellet atıldı.
7. Her tüpe 1 InhibitEX Tablet eklendi ve 1 dakika boyunca sürekli vortekslenerek tabletin tamamen erimesi sağlandı. Süspansiyon 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
8. Tüpler 3 dakika boyunca tam hızda santrifüj edildi.
9. Tüm süpernatant yeni bir 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüpüne pipetlendi ve pellet atıldı. Tüpler tam hızda 3 dakika santrifüj edildi.
10. Yeni bir 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüpüne 15 µL proteinaz K pipetlendi.
11. 200 µL süpernatant proteinaz K içeren 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüpüne pipetlendi.
12. Tüplere 200 µL AL Tamponu eklendi ve 15 saniye vortekslendi.
13. Tüpler 70°C' de 10 dakika inkübe edildi.
14. Lizata 200 µL etanol (%96-100) eklendi ve vortekslendi.
15. 2 mL' lik bir toplama tüpüne yerleştirilmiş QIAamp spin kolonunun kapağı etiketlendi ve tüm lizat QIAamp spin kolonuna aktarıldı. Kapağı kapatılarak tam hızda 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp spin kolonu 2 mL' lik yeni bir toplama tüpüne yerleştirildi.
16. QIAamp spin kolonuna 500 µL Buffer AW1 eklendi ve tam hızda 1 dakika santrifüj edildi. QIAamp spin kolonu 2 mL' lik yeni bir toplama tüpüne alındı.
17. QIAamp spin kolonunu açılarak 500 µL Buffer AW2 eklendi ve tam hızda 3 dakika santrifüj edildi.
18. QIAamp spin kolonu 2 mL' lik yeni bir toplama tüpüne alındı ve tam hızda 1 dakika santrifüj edildi.
19. QIAamp spin kolonu etiketlenmiş yeni bir 1,5 mL' lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. QIAamp spin kolonuna 200 µL Buffer AE doğrudan membran üzerine pipetlendi ve oda sıcaklığında 1 dakika inkübe edildi. Ardından tam hızda 1 dakika santrifüj edildi.

20. Elde edilen örnekler çalışılacağı güne kadar buzdolabının -20°C' lik bölümünde muhafaza edildi.

2. 4. Sekanslama

2. 4. 1. 16S Hiperdeğişken Bölgelerinin Amplifikasyonu

DNA izolasyonu yapılan tüm örnekler +4°C' ye getirildi ve buz üzerinde çalışıldı. Çizelge 2.1' de belirtilen bileşenler ile her örnek için 2 reaksiyon tüpü hazırlandı. Örnekler Çizelge 2.2' de belirtilen ısı döngülere ayarlanmış SimpliAmp™ Thermal Cycler (ThermoFisher, ABD) PCR cihazına yüklendi.(Şekil 2.1)

Çizelge 2.1. Reaksiyon tüpündeki bileşenler

PCR İÇERİĞİ	MİKTAR
2X Environmental Master Mix	7,5 µL
16S Primer Set (10X) (V2-4-8 veya V3-6,7-9)	1,5 µL
DNA (2,5 ng/µl)	1,5 µL
Su	4,5 µL
Toplam	15 µL

Çizelge 2.2. PCR döngülerinin sıcaklık ve süreleri

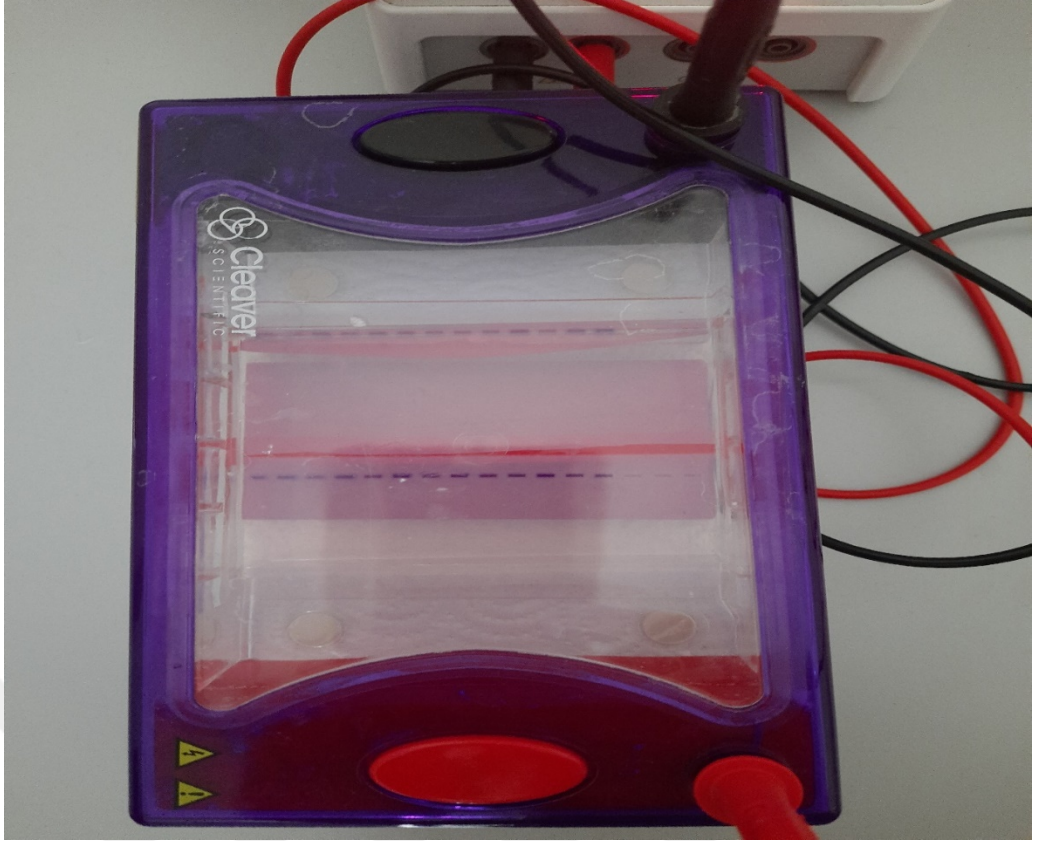
Evre	Sıcaklık	Süre
1 döngü	95 °C	10 dakika
25 döngü	95 °C	30 sn
	58 °C	30 sn
	72 °C	20 sn
	72 °C	7 dakika



Şekil 2.1. SimpliAmp™ Thermal Cycler (ThermoFisher, ABD) PCR cihazı

2. 4. 2. Amplikonların Jelde Yürütülmesi

PCR işlemi ile amplifikasyonu yapılan 15 µL PCR ürünlerinden, 3 µL alınıp %2 lik jelde 30 dakika yürütüldü (Şekil 2.2). 200-300 bp aralığında bir yerde parlak veya hafif silik bantların varlığı tespit edildi. Kalan 12 µL PCR ürünleri ise saflaştırma işlemi için tüpe alındı.



Şekil 2.2. Amplikonların jelde yürütülmesi

2. 4. 3. Ürünlerin Saflaştırılması

Amplifiye PCR ürünlerinin enzimatik temizliği için ExoSAP-IT PCR Ürün Temizleme Reaktifi (ThermoFisher, ABD) kullanıldı. Ekzonükleaz 1 ve alkalin fosfotaz içeren 4 µL reaktif, PCR ürünlerine doğrudan eklenerek 37 °C de 30dakika, 80 °C de 15 dakika orjinal ExoSAP protokolüne uygun purifikasyon yapıldı. Böylece fazla primerler ve birleşik olmayan nükleotitler enzimatik olarak çıkarıldı.

Daha sonra amplifikasyon ürünlerinin manyetik plate üzerinde Clean NGS (CleanNA, Hollanda) kullanılarak saflaştırma işlemi aşağıdaki protokole uygun olarak yapıldı (Şekil 2.3)

1. Her kuyucuğa örnek hacminin 1.8 katı miktarda Clean NGS eklendi.
2. İyice Vorteks edilip homojen karışım sağlandıktan sonra 5 dakika oda ısısında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 700 rpm’ de 5 saniye Quick spin atıldı.

3. Plate manyetik plate üzerine yerleştirildi, 3 dakika inkübe (solüsyon berraklaşana kadar) edildi.
4. Pellete dokunmadan süpernatant çekildi ve plate manyetik plate' den uzaklaştırılmadan 150 μ L %70' lik etanol eklendi. 10 defa sola ve sağa 13 kuyucuk üzerinde hareket ettirilerek manyetik bead' lerin yıkanması sağlandı ve aynı işlem bir kere daha tekrarlandı
5. Plate üzeri açık şekilde santrifuj edildi, tekrar magnetik plate üzerine konuldu ve 1 dakika sonra pellete dokunmadan kalan etanol 10 μ L' lik uç ile çekildi.
6. Pelletin manyetik plate üzerinde oda ısısında 1-2 dakika kuruması sağlandı.
7. Plate manyetik plateten alındı, pelletin üzerine 25 μ L nükleazsız su eklendi ve manyetik beadlar resüspense olana kadar iyice vorteks yapıldı ve 1 dakika oda sıcaklığında inkubasyona bırakıldı.
8. 700 rpm' de 5 saniye Quick spin atıldı. Plate manyetik plate üzerine konuldu ve 1 dakika solüsyon berrak hale gelene kadar bekletildikten sonra supernatant pellete dokunulmadan 1.5 mL' lik eppendorf tüplere alındı.

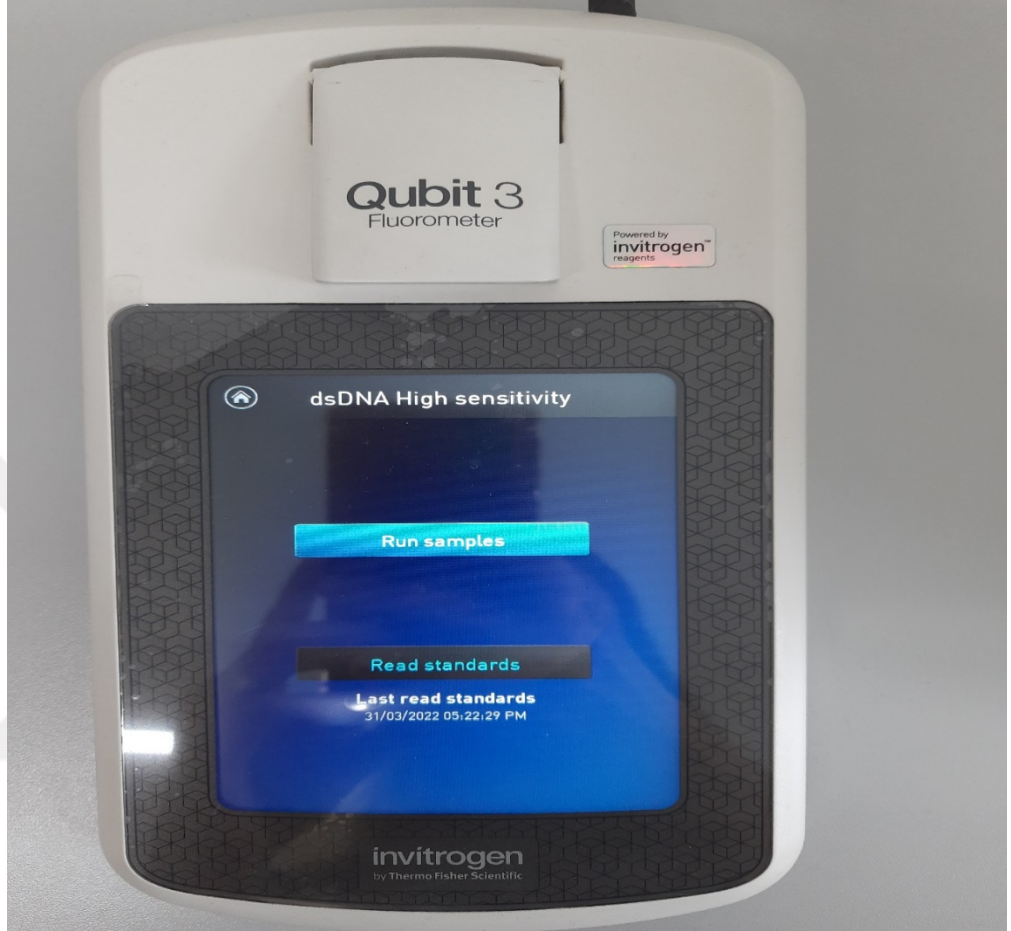


Şekil 2.3. Saflaştırma işleminde kullanılan manyetik plate

2. 4. 4. DNA Miktarlarının Ölçülmesi

Kütüphane hazırlanması için amplifikasyon ürününün içerdiği total nükleik asit miktarı florometrik yöntem (Qubit 3, ThermoFisher, ABD) ile ölçüldü (Şekil 2.4.). Her örnek için bir Qubit® assay tüpü hazırlandı. 199 μ L Quant-iT™ buffer ile 1 μ L Quant-iT™ dsDNA HS reagent karıştırıldı. Örnek tüplerine 197 μ L dağıtıldı. Üzerine ölçüm yapılacak DNA' dan 3 μ L eklendi ve 2-3 sn vorteks yapıldı. Oda ısısında 2

1 dakika inkübasyondan sonra Qubit ile ölçümleri yapıldı. Tüm örnekler 350 ng/ mL den yüksek olarak ölçüldü ve hepsi çalışmaya dahil edildi.



Şekil 2.4. DNA miktarının Qubit 3 (ThermoFisher, ABD) ile ölçülmesi

2. 4. 5. DNA Fragmanlarının Uç Tamiri

Qubit ile ölçümleri yapılan örneklerin DNA konsantrasyonları 50 ng (40 µL içinde, 1.25 ng/µL) olacak şekilde seyreltmeleri yapıldı. 40 µL çalışma örneği, 10 µL uç tamir buffer ve 0,5 µL uç tamir enzimi karıştırıldı ve plate oda ısısında 20 dakika inkübe edildi. Daha sonra uç tamiri yapılan DNA fragmanlarının manyetik plate üzerinde saflaştırılması işlemi uygulandı.

2. 4. 6. Barkod ve Adaptör Reaksiyonu Kurma

Uç tamiri yapılan örneklerle barkod ve adaptör eklemek üzere 1,5 ml lik ependorf içinde 5 µL 10X Ligase Buffer, 1 µL Ion P1 Adapter, 1 µL dNTP Mix, 12

μ L nükleazsız su, 1 μ L DNA Ligase, 4 μ L Nick Repair Polymerase, 1 μ L Ion Xpress Barcode ve 25 μ L DNA karıştırıldı. Oluşan 50 μ L karışım 25°C de 15 dakika, 72°C de 5 dakika bekletildi.

Adaptör bağlanmış ve uç tamiri yapılmış DNA' lara manyetik plate üzerinde saflaştırma işlemi uygulandı.

2. 4. 7. Kütüphane Oluşturulması

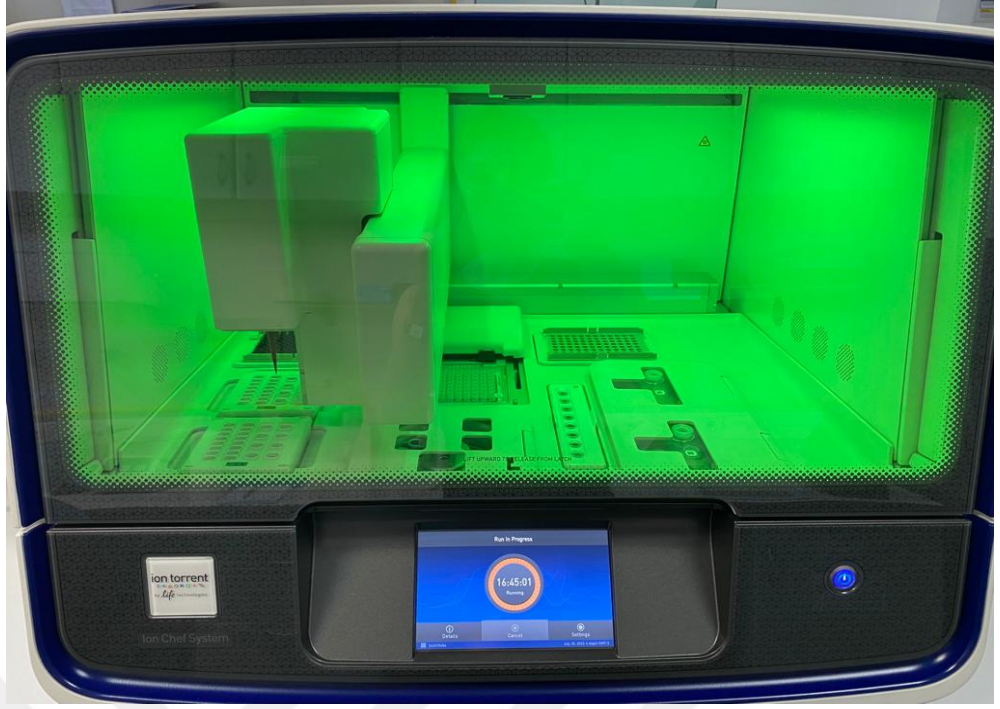
Barkod ve adaptör reaksiyon eklenmiş örneklerle kütüphane hazırlamak için Ion Plus Fragment Library kit (ThermoFisher, ABD) kullanıldı. Kit içerisinde bulunan 45 μ L Platinum™ PCR SuperMix HiFi ve 1,8 μ L Library Amplification Primer Mix karıştırıldı. Çalışma örneklerinin üzerine toplam hacim 45 μ L olacak şekilde hazırlanan karışım ilave edildi ve iyice vorteks yapılarak süspansiyon olması sağlandı. Manyetik rak üzerinde 1 dakika inkübe edildi ve supernatantlar temiz kuyucuklara aktarılıp aşağıdaki döngü ayarlanarak PCR cihazına yüklendi.

Çizelge 2.3. PCR döngülerinin sıcaklık ve süreleri

Evre	Sıcaklık	Süre
1 döngü	98 °C	2 dakika
	98 °C	15 sn
5 döngü	64 °C	1 dakika
1 döngü	10 °C	

PCR işlemi tamamlanan örneklerle tekrar manyetik plate üzerinde saflaştırma işlemi uygulandı.

Hazırlanan kütüphane konsantrasyonu florometrik yöntem (Qubit 3, ThermoFisher, ABD) ile ölçüldü. Konsantrasyonu Qubit ile belirlenmiş olan her kütüphane son dilüsyon olarak 16ng/mL olacak şekilde dilüe edilip hazırlandı. Tüm 16s örnekleri aynı hacimde alındı ve tek bir ependorf tüpünde karıştırıldı. İyice vortex yapıldıktan sonra Ion Chef (ThermoFisher, ABD) kitiyle gelen örnek kartuşundaki ilgili tüpe aktarıldı ve Ion Chef cihazına yüklendi.



Şekil 2.5. Ion Chef (ThermoFisher, ABD) cihazı

Ion Chef (ThermoFisher, ABD) cihazı gece boyunca çalışacak şekilde başlatıldı. Bu aşamada ilk olarak kütüphanede bulunan DNA fragmanları emülsiyon PCR yöntemi ile özel boncuklar üzerindeki adaptör/primerlere bağlanarak amplifiye edilirler. Ardından boncuklara bağlı amplikonlar santrifüj işlemi ile çipteki kuyucuklara çöktürülürler.

2. 4. 8. Dizileme

16S geninin V2, V4, V8 ve V3-6, V7-9 hiperdeğişken bölgelerini hedefleyen primer çiftleri ile DNA örneklerinden PCR amplikonları üretildi. PCR ürünlerinin eldesi için Ion 16S™ Metagenomics Kit (A26216, Thermo Scientific) kullanıldı. Elde edilen amplikonlardan NGS Kütüphanelerin hazırlanmasında ise Ion Plus Fragment Library kit (4471252, Thermo Scientific) kullanıldı. Yeni nesil sekanslama cihazında yarı iletken çip teknolojisi ile tüm örnekler barkodlanarak dizilendi. Bu amaçla, elde edilen kütüphaneler kalıp oluşturulması, çipe yüklenmesi ve zenginleştirilmesi için Ion Chef™ Instrument (4484177, Ion Torrent™) cihazına yüklendi. Her 48 örnek için kullanılan Ion 530 Chip (A27764, ThermoFisher Scientific) çipleri hazır halde Ion Chef cihazından alınarak Ion S5 sekanslama cihazına (A27212, Ion Torrent™) sırası ile yüklendi. Dizileme işlemi Ion Semi-conductor yöntemi ile DNA dizisine PCR ile nükleotid eklenmesi sırasında açığa çıkan Hidrojen iyonlarının CMOS – ISFET

sensörü tarafından tespit edilmesiyle gerçekleştirildi. Elde edilen veriler Torrent suite (ThermoFisher, ABD) ve sonrasında Ion Reporter (ThermoFisher, ABD) programında işlendi ve dizisi belirlenmiş olan fragmanlar alt alta getirilerek tüm dizi ortaya konuldu.



Şekil 2.6. Ion S5 (ThermoFisher, ABD) sekans cihazı

2. 5. Biyoinformatik Analiz

Barkodlu ve adaptörlü NGS okumaları, bulut ortamında çalışan ve Ion Torrent sistemi orijinal yazılımı olan Ion Reporter programına cihaz tarafından koşum sonrası yüklendi. Her bir örnek için yüksek kalitede (Q20) ortalama 200.000 okuma alındı ve tüm bölgeler için (V2, V4, V8, V3-6, V7-9) bölge başına minimum 15.000 okuma derinliği elde edildi.

Analiz, Ion Reporter programı veri tabanında entegre olarak çalışan GreenGene, Microseq ID ve Qiime2 ile otomatik olarak gerçekleştirilmiştir. UBAM dosyaları olarak oluşturulan ve sonrasında Ion Reporter programına aktarılan dizi verileri, Ion Torrent Suite Programında kalite kontrolleri (>Q20), adaptör ve barkod uzaklaştırmaları, adaptör dimer uzaklaştırmaları ve 16S referans genom harici sekansların uzaklaştırmaları otomatik olarak tamamlandı. Ion reporter programına

Bu formülde H ; biyolojik çeşitlilik, s ; tür sayısı, p_i ; bir alandaki i türünün bolluğunun tüm bolluk miktarına oranıdır.

Simpson indeksi aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır.

$$D = \frac{\sum n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

Bu formülde D ; çeşitlilik, n_i ; her türe ait birey sayısı, N ; toplam birey sayısıdır.

Chao 1 indeksi aşağıdaki formülle hesaplanmaktadır.

$$S_1 = S_{obs} + \frac{F_1^2}{2 F_2}$$

Bu formülde S_{obs} ; numunedeki türlerin sayısıdır, F_1 , tekillerin sayısıdır yani, numunede yalnızca bir kez görülen türlerin sayısı ve F_2 , çift ton sayısıdır yani örnekte iki kez görülen türlerin sayısıdır.

2. 7. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler R version 4.0.1 (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria; <https://www.r-project.org>) programı yardımıyla gerçekleştirildi. Analizler öncesinde verilerin normalliği Shapiro-Wilk normallik testi ile; grup varyanslarının homojenliği ise Levene testi ile kontrol edildi. Sayısal değişkenlere ilişkin bulgular ortalama $\pm$ standart sapma veya medyan (interquartile range: IQR, 1.çeyreklik – 3.çeyreklik) olarak, kategorik değişkenler ise sıklık (n) ve yüzdelik (%) olarak sunuldu. Sağlıklı kontroller, COVID-19 non-severe ve severe hastalarına göre bireylerin yaşları, cinsiyet dağılımları ve alfa çeşitlilik indeksleri tek yönlü varyans analizi devamında Tukey HSD post-hoc testi, pearson ki-kare, Welch F testi devamında Games-Howell post-hoc testi ile kıyas edilirken; sağlıklı kontroller ile COVID-19 hastaları arasında bağımsız örneklem t -testi, Welch' in t -testi ve Pearson ki-kare testi ile karşılaştırıldı. Ayrıca, filum düzeyinden tür düzeyine mikroorganizmaların nisbi bollukları sağlıklı kontroller ile COVID-19 non-severe ve severe hastaları arasında Kruskal Wallis testi ile; sağlıklı kontroller ile COVID-19 hastaları arasında ise Mann-Whitney U testi ile kıyas edildi. Anlamlı fark tespit edilen mikroorganizmalarda ikili karşılaştırmalar için Bonferroni düzeltmeli Dunn testi kullanıldı. Anlam düzeyi %5 alındı.

Etik Kurul Onayı

Çalışma için etik kurul onayı Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Yerel Etik Kurulu tarafından 25.11.2020 tarih ve 2020/23 sayılı kararı ile verilmiştir.



3. BULGULAR

3. 1. Demografik Bulgular

Çalışmaya 16 non-severe (8 kadın,8 erkek), 16 severe (8 kadın, 8 erkek) COVID-19 olgusu ve 16 sağlıklı (9 kadın, 7 erkek) kontrol dahil edildi. Kontrol grubunun yaş ortalaması 45.938 ± 15.80 , non-severe grubunun yaş ortalaması 47.563 ± 10.28 ve severe grubunun yaş ortalaması $49.125 \pm 11,70$ yıl idi. Çalışma grupları arasında yaş ve cinsiyet açısından anlamlı bir farklılık yoktu ($p=0.809$).

Katılımcıların demografik özellikleri Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Katılımcıların demografik özellikleri

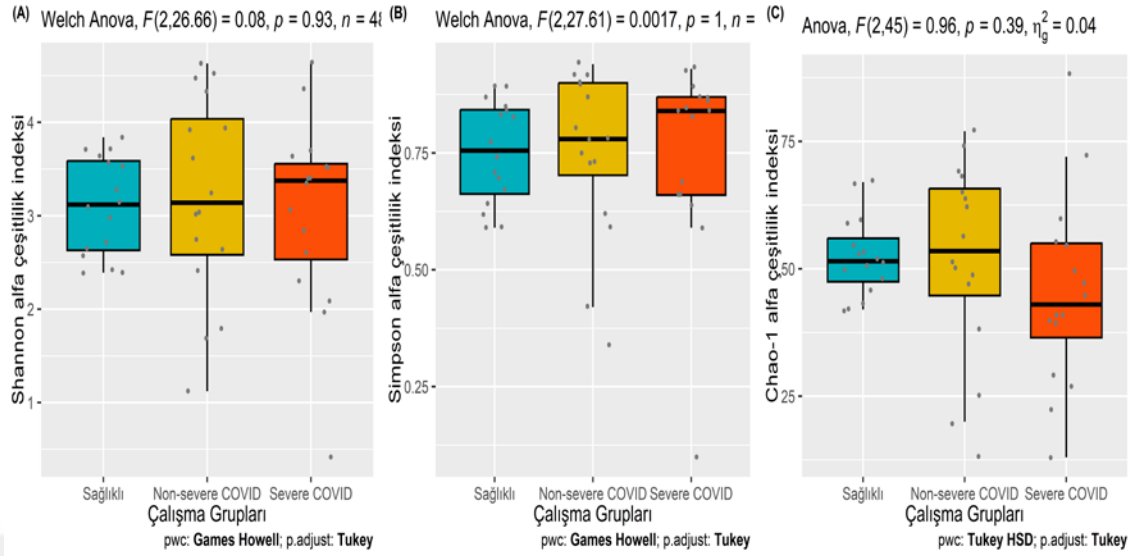
	Çalışma Grupları			p-değeri
	Sağlıklı (n=16)	Non-severe (n=16)	Severe (n=16)	
Yaş (yıl)	45.938 ± 15.80	47.563 ± 10.28	49.125 ± 11.70	.809 ¹
Cinsiyet (E/K)	7/9	8/8	8/8	.920 ²

3. 2. Çalışma Gruplarının Bağırsak Mikrobiyota Kompozisyonu

Çalışılan gaita örneklerinde mikrobiyota kompozisyonunun alfa çeşitliliklerini ortaya çıkaran analizler yapılmıştır. Çalışmamızda gaita örneklerinde alfa çeşitliliğin değerlendirilmesinde Shannon, Simpson ve Chao1 indeksleri kullanıldı. Her üç indeks için de grupların bağırsak mikrobiyal alfa çeşitlilikleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla $p=.241$, $p=.503$, $p=.691$). (Şekil 3.1.) Çalışma gruplarının alfa çeşitlilik analizi için kullanılan Shannon, Simpson ve Chao1 indeks verileri Çizelge 3.2’ de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyotalarının alfa çeşitliliklerinin değerlendirilmesi

	Çalışma Grupları			p-değeri
	Sağlıklı (n=16)	Non-severe (n=16)	Severe (n=16)	
Shannon	3.10 ± 0.52	3.19 ± 1.08	3.05 ± 1.02	.903 ³
Simpson	0.75 ± 0.10	0.74 ± 0.17	0.75 ± 0.20	.998 ³
Chao	52.43 ± 7.78	51.75 ± 19.30	45.25 ± 18.72	.389 ¹



Şekil 3.1. Gaita örneklerinde A) Shannon indeksi B) Simpson indeksi C) Chao-1 indeksi ile alfa çeşitlilik analizi

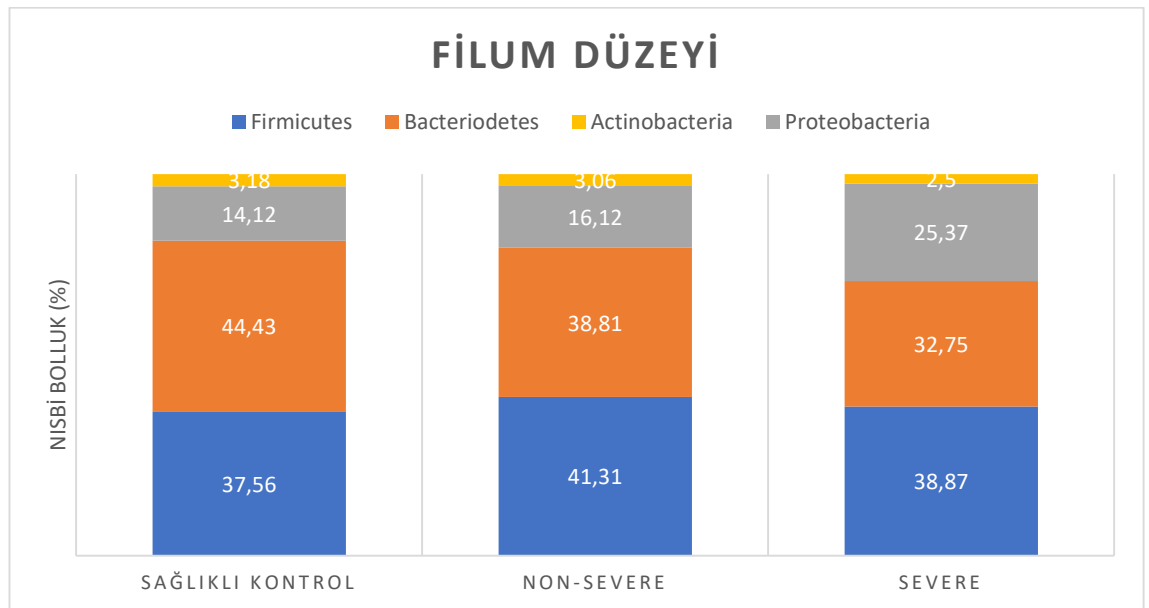
Bağırsak mikrobiyotasına ait örneklerde OTU' ların taksonomik dağılımları filum düzeyinde incelendiğinde her üç grupta da mikrobiyotanın 4 temel filumdan oluştuğu görülmüştür. Bunlar; *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* filumlarıdır. Nispi bolluğun analizi gruplara göre; sağlıklı grupta *Bacteroidetes* ortalama yüzde 44.43 ± 12.53 , *Firmicutes* ortalama yüzde 37.56 ± 10.87 , *Proteobacteria* ortalama yüzde 14.12 ± 9.58 , *Actinobacteria* ortalama yüzde 3.18 ± 3.88 oranlarında görüldü. Nonsevere COVID-19' lu hasta grubunda *Firmicutes* ortalama yüzde 41.31 ± 24.71 , *Bacteroidetes* ortalama yüzde 38.81 ± 23.93 , *Proteobacteria* ortalama yüzde 16.12 ± 16.66 , *Actinobacteria* ortalama yüzde 3.06 ± 5.34 oranlarında, severe COVID-19' lu hasta grubunda *Firmicutes* ortalama yüzde 38.87 ± 28.65 , *Bacteroidetes* ortalama yüzde 32.75 ± 20.80 , *Proteobacteria* ortalama yüzde 25.37 ± 19.30 , *Actinobacteria* ortalama yüzde 2.50 ± 6.24 oranlarında tespit edildi.

Severe ve non-severe COVID-19 hasta gruplarında filum düzeyinde en fazla oranda *Firmicutes* tespit edilmişken, kontrol grubunda *Bacteroidetes* filumunun en fazla olduğu tespit edildi. Hastalık şiddetinin artışı ile birlikte *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* filumlarının azalma eğiliminde olduğu, *Proteobacteria* filumunun ise artma eğiliminde olduğu bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı

(sırasıyla $p=.162$, $p=.403$, $p=.213$). Ayrıca çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyotaları arasında *Firmicutes* / *Bacteriodes* oranları incelendi, *Firmicutes* / *Bacteriodes* oranının hastalık şiddeti arttıkça azalma eğiliminde olduğu görüldü ($p=.707$). Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde değerlendirme verileri Çizelge 3.3’ de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde incelenmesi

	Çalışma Grupları			
	Sağlıklı (n=16)	Non-severe (n=16)	Severe (n=16)	p-değeri
<i>Firmicutes</i>				.804 ⁴
Ortalama ± SD	37.56 ± 10.87	41.31 ± 24.71	38.87 ± 28.65	
Medyan (IQR)	41.5 (28-45)	42.5 (20.5-52.5)	36 (16.25-49.25)	
<i>Bacteriodes</i>				.162 ⁴
Ortalama ± SD	44.43 ± 12.53	38.81 ± 23.93	32.75 ± 20.80	
Medyan (IQR)	46.5 (40.75-53.75)	41 (24 – 50.5)	34.5(18.25– 44.5)	
<i>Proteobacteria</i>				.213 ⁴
Ortalama ± SD	14.12 ± 9.58	16.12 ± 16.66	25.37 ± 19.30	
Medyan (IQR)	12 (7.75-19.25)	11.5 (5.75-18.25)	22 (8.75-37.25)	
<i>Actinobacteria</i>				.403 ⁴
Ortalama ± SD	3.18 ± 3.88	3.06 ± 5.34	2.50 ± 6.24	
Medyan (IQR)	2(0-4.75)	0.5 (0-2.25)	0 (0-1.75)	
<i>Firmicutes/</i> <i>Bacteriodes</i>	0.84 (0.49-1.05)	0.81 (0.20-1.47)	0.55 (0.22-1.56)	.707 ⁴



Şekil 3.2. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde dağılımı

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonları familya düzeyinde incelendiğinde *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* familyaları en bol bulunan familyalar oldu. (Çizelge 3.4.) Nispi bolluğun analizi gruplara göre; sağlıklı grupta *Bacteroidaceae* ortalama yüzde 19.06 ± 18.42 , *Enterobacteriaceae* ortalama yüzde 4.68 ± 6.60 , *Prevotellaceae* ortalama yüzde 21.75 ± 22.16 , *Ruminococcaceae* ortalama yüzde 10.43 ± 5.07 , *Lachnospiraceae* ortalama yüzde 11.12 ± 6.68 oranlarında görüldü. Nonsevere COVID-19' lu hasta grubunda *Bacteroidaceae* ortalama yüzde 17.12 ± 21.95 , *Enterobacteriaceae* ortalama yüzde 11.81 ± 24.11 , *Prevotellaceae* ortalama yüzde 15.87 ± 19.96 , *Ruminococcaceae* ortalama yüzde 9.81 ± 7.00 , *Lachnospiraceae* ortalama yüzde 6.06 ± 6.12 oranlarında, severe COVID-19' lu hasta grubunda *Bacteroidaceae* ortalama yüzde 20.50 ± 18.78 , *Enterobacteriaceae* ortalama yüzde 17.56 ± 19.68 , *Prevotellaceae* ortalama yüzde 7.62 ± 12.14 , *Ruminococcaceae* ortalama yüzde 10.12 ± 8.04 , *Lachnospiraceae* ortalama 5.12 ± 6.20 yüzde oranlarında görüldü

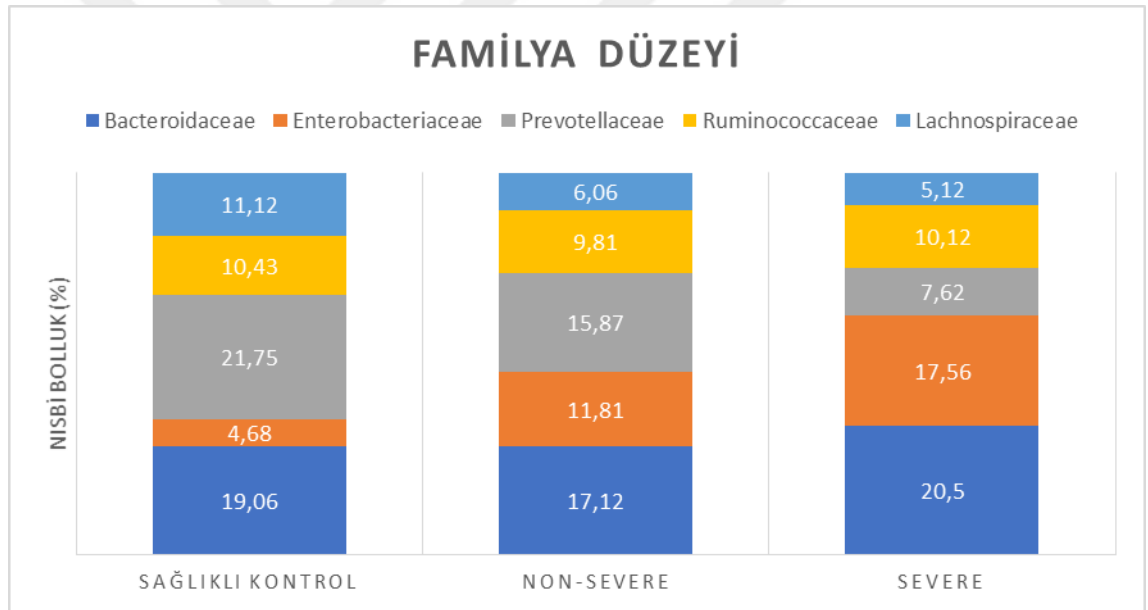
Lachnospiraceae familyasının nispi bollukları arasında çalışma gruplarına göre anlamlı farklılık tespit edildi ($p=.024$). Yapılan çoklu karşılaştırma sonucu severe COVID-19 hasta grubunda *Lachnospiraceae* familyasının sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edildi (0 [IQR, 0– 10.5] vs.9 [IQR, 6.5 – 16] adj. $p=.049$)

Ayrıca istatistiksel olarak anlamlı seviyeye ulaşamamış olsa da *Enterobacteriaceae* familyası severe COVID-19 hasta grubunda, non-severe hasta grubu ve kontrol grubuna göre yüksek oranda tespit edildi ($p=.200$). Buna karşın *Prevotellaceae* familyasının ise sağlıklı grupta, severe ve non-severe hasta gruplarına göre yüksek oranda olduğu görüldü ($p=.146$).

Çalışmaya katılan hasta grupları ve kontrol grubunda familya düzeyinde bakılan *Bacteroidaceae* ve *Ruminococcaceae* oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı (sırasıyla $p=.713$, $p=.894$). Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun familya düzeyinde değerlendirme verileri Çizelge 3.4' de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun familya düzeyinde incelenmesi

Çalışma Grupları		Sağlıklı (n=16)	Non-severe(n=16)	Severe(n=16)	p değeri
<i>Bacteroidaceae</i>					.713 ⁴
Ortalama ± SD		19.06 ± 18.42	17.12 ± 21.95	20.50 ± 18.78	
Medyan (IQR)		13.5(4-31.75)	7.5 (0.75-29.75)	14 (3.75 -39)	
<i>Enterobacteriaceae</i>					.200 ⁴
Ortalama ± SD		4.68 ± 6.60	11.81 ± 24.11	17.56 ± 19.68	
Medyan (IQR)		1.5 (0- 7)	0 (0-4.25)	11 (0- 30.75)	
<i>Prevotellaceae</i>					.146 ⁴
Ortalama ± SD		21.75 ± 22.16	15.87 ± 19.96	7.62 ± 12.14	
Medyan (IQR)		20 (0-43)	12.5 (0.75-16)	0 (0-12.5)	
<i>Ruminococcaceae</i>					.894 ⁴
Ortalama ± SD		10.43 ± 5.07	9.81 ± 7.00	10.12 ± 8.04	
Medyan (IQR)		10.5 (6.75-14.25)	8.5 (7-12.25)	9 (3-14.75)	
<i>Lachnospiraceae</i>					.024 ⁴
Ortalama ± SD		11.12 ± 6.68	6.06 ± 6.12	5.12 ± 6.20	
Medyan (IQR)		9 (6.5-16)	4.5 (1.5-10.25)	0 (0-10.5)	



Şekil 3.3. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun familya düzeyinde dağılımı

Çalışmaya katılan grupların bağırsak mikrobiyotalarında cins düzeyinde *Bacteroides*, *Prevotella*, *Faecalibacterium* ve *Gemmiger* taksonları incelendi. Nispi bolluğun analizi gruplara göre; sağlıklı grupta *Bacteroides* ortalama yüzde 18.25 ± 18.38 , *Prevotella* ortalama yüzde 20.50 ± 21.59 , *Faecalibacterium* ortalama yüzde 7.50 ± 3.59 , *Gemmiger* ortalama yüzde 0.81 ± 1.79 oranlarında görüldü. Nonsevere COVID-19' lu hasta grubunda *Bacteroides* ortalama yüzde 17.37 ± 20.91 , *Prevotella* ortalama yüzde 13.62 ± 19.09 , *Faecalibacterium* ortalama yüzde 5.87 ± 3.53 ,

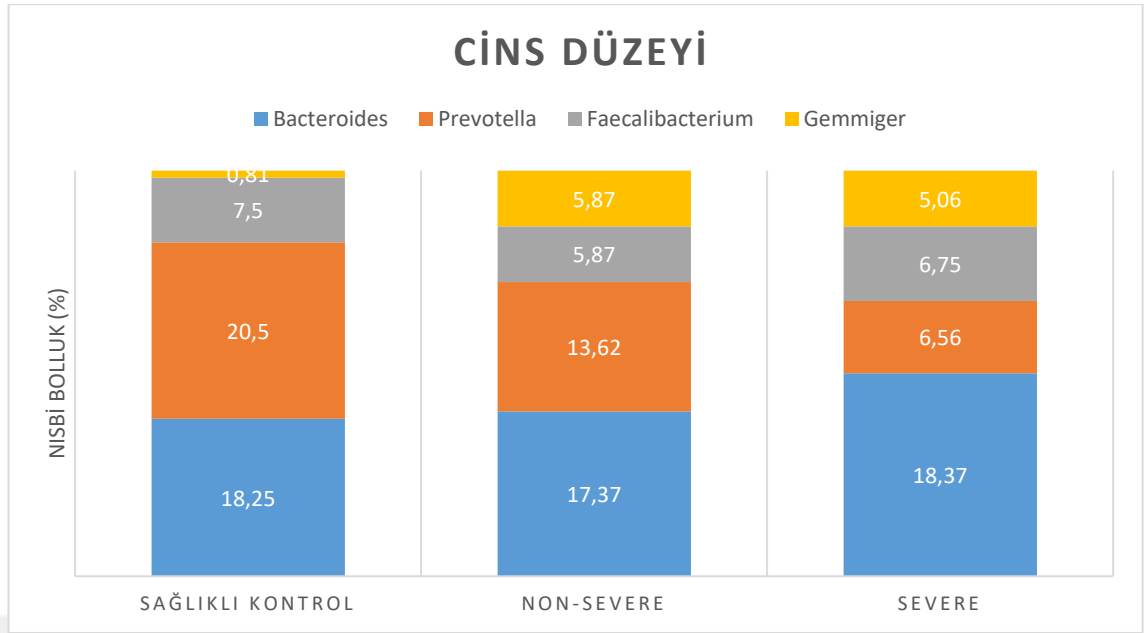
Gemmiger ortalama yüzde 5.87 ± 3.53 oranlarında, severe COVID-19' lu hasta grubunda *Bacteroides* ortalama yüzde 18.37 ± 18.72 , *Prevotella* ortalama yüzde 6.56 ± 10.99 , *Faecalibacterium* ortalama yüzde 6.75 ± 5.41 , *Gemmiger* ortalama yüzde 5.06 ± 7.92 oranlarında görüldü.

Bacteriodes ve *Provetella* cinsleri sağlıklı grupta, severe ve non-severe hasta gruplarına göre yüksek oranda bulundu ancak istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=.936$, $p=.169$).

Gemmiger cinsinin nispi bollukları arasında çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı ($p=.014$). Yapılan çoklu karşılaştırma sonucunda severe COVID-19 hasta grubunda *Gemmiger* cinsinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve non severe hasta grubunda da *Gemmiger* cinsinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi (sırasıyla 0 [IQR, 0– 0] vs.3 [IQR, 0 – 4.5] adj. $p=.022$, 0 [IQR, 0– 0] vs.2 [IQR, 0 – 4.5] adj. $p=.025$). *Faecalibacterium* cinsi açısından ise çalışma grupları arasında anlamlı farklılık bulunmadı ($p=.568$). Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde değerlendirme verileri Çizelge 3.5' de verilmiştir.

Çizelge 3.5. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde incelenmesi

	Çalışma Grupları			p-değeri
	Sağlıklı (n=16)	Non-severe (n=16)	Severe (n=16)	
<i>Bacteroides</i>				.936 ⁴
Ortalama $\pm$ SD	18.25 $\pm$ 18.38	17.37 $\pm$ 20.91	18.37 $\pm$ 18.72	
Medyan (IQR)	13(3.75-31.5)	8.5 (1-26.5)	8(1.5-37.75)	
<i>Prevotella</i>				.169 ⁴
Ortalama $\pm$ SD	20.50 $\pm$ 21.59	13.62 $\pm$ 19.09	6.56 $\pm$ 10.99	
Medyan (IQR)	17 (0-38)	11.5 (0-14.5)	0 (0-8)	
<i>Faecalibacterium</i>				.568 ⁴
Ortalama $\pm$ SD	7.50 $\pm$ 3.59	5.87 $\pm$ 3.53	6.75 $\pm$ 5.41	
Medyan (IQR)	8.5(4.75- 9.5)	6 (3- 8)	6(1.75 $\pm$ 12.25)	
<i>Gemmiger</i>				.014 ⁴
Ortalama $\pm$ SD	0.81 $\pm$ 1.79	5.87 $\pm$ 3.53	5.06 $\pm$ 7.92	
Medyan (IQR)	0 (0-0)	2 (0-4.5)	3 (0-4.5)	



Şekil 3.4. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde dağılımı

Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyotalarında tür düzeyinde *Faecalibacterium prausnitzii*, *Prevotella copri* ve *Gemmiger formicilis* türleri incelendi. Nispi bolluğun analizi gruplara göre; sağlıklı grupta *F.prausnitzii* ortalama yüzde 6.31 ± 3.97 , *P.copri* ortalama yüzde 18.43 ± 19.77 , *G.formicilis* ortalama yüzde 0.81 ± 1.79 oranlarında görüldü. Nonsevere COVID-19' lu hasta grubunda *F.prausnitzii* ortalama yüzde 5.12 ± 3.26 , *P.copri* ortalama yüzde 11.00 ± 17.70 , *G.formicilis* ortalama yüzde 3.87 ± 4.71 oranlarında, severe COVID-19' lu hasta grubunda *F.prausnitzii* ortalama yüzde 5.25 ± 4.46 , *P.copri* ortalama yüzde 6.00 ± 10.44 , *G.formicilis* ortalama yüzde 5.00 ± 7.95 oranlarında görüldü.

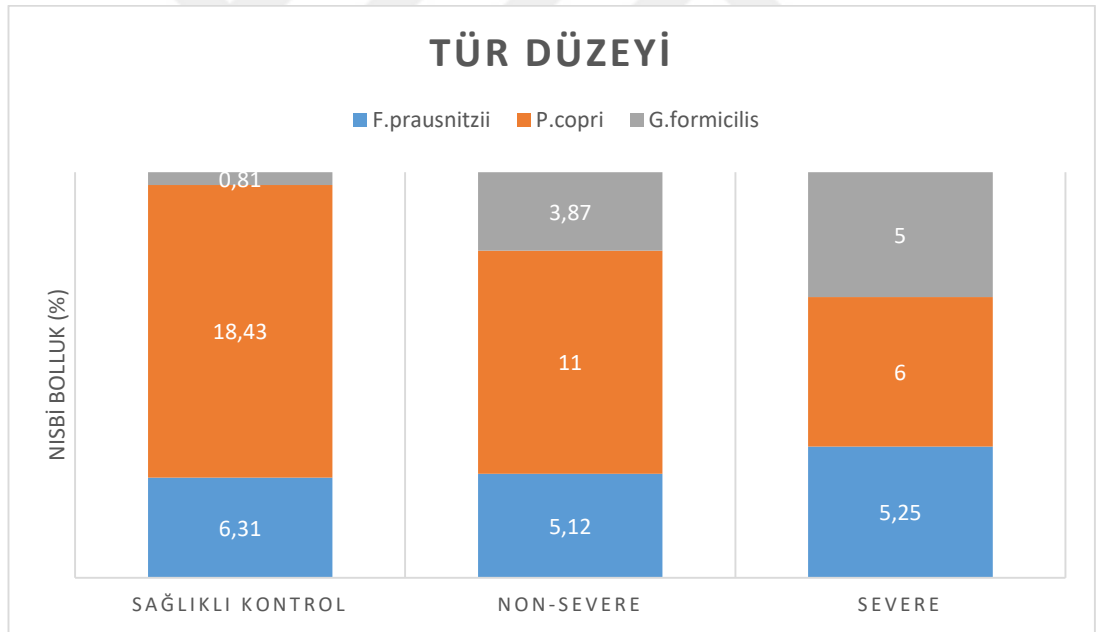
G.formicilis' in hasta gruplarında hastalık şiddetiyle orantılı olarak artma eğilimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. ($p=.014$) Yapılan çoklu karşılaştırma sonucunda severe COVID-19 hasta grubunda *G.formicilis* türünün sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve non severe hasta grubunda da *G.formicilis* türünün sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi. (sırasıyla 0 [IQR, 0– 0] vs.3 [IQR, 0 – 4.5] adj. $p=.024$, 0 [IQR, 0– 0] vs.2 [IQR, 0 – 4.5] adj. $p=.025$).

P.copri türünün sağlıklı kontrollerden severe hasta grubuna doğru azalma eğiliminde olduğu görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p=.211$).

Ayrıca *F.prausnitzii* türü açısından çalışma grupları arasında anlamlı farklılık bulunamadı ($p=.626$). Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde değerlendirme verileri Çizelge 3.6’ da verilmiştir.

Çizelge 3.6. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde incelenmesi

	Çalışma Grupları			p-değeri
	Sağlıklı (n=16)	Non-severe (n=16)	Severe (n=16)	
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>				.626 ⁴
Ortalama $\pm$ SD	6.31 $\pm$ 3.97	5.12 $\pm$ 3.26	5.25 $\pm$ 4.46	
Medyan (IQR)	7 (3.5-8.5)	5 (3-7.25)	4 (1-8)	
<i>Prevotella copri</i>				.211 ⁴
Ortalama $\pm$ SD	18.43 $\pm$ 19.77	11.00 $\pm$ 17.70	6.00 $\pm$ 10.44	
Medyan (IQR)	13(0-34)	9.5 (0-12.25)	0 (0-7.25)	
<i>Gemmiger formicilis</i>				.014 ⁴
Ortalama $\pm$ SD	0.81 $\pm$ 1.79	3.87 $\pm$ 4.71	5.00 $\pm$ 7.95	
Medyan (IQR)	0 (0-0)	0 (0- 4.5)	3 (0-4.5)	



Şekil 3.5. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde dağılımı

COVID-19 enfeksiyonunun hastalık şiddetinden bağımsız olarak bağırsak mikrobiyotasını nasıl etkilediğini değerlendirmek amacıyla katılımcılar, sağlıklı kontroller ve COVID-19 hastaları olmak üzere iki grup olarak da değerlendirildi.

Kontrol grubu ile COVID-19 hastalarının demografik özellikleri Çizelge 3.7’ de verilmiştir. COVID-19 hastalarının yaş ortalaması ile sağlıklı kontrollerin yaş ortalaması arasında istatistiksel anlamlı fark yoktu ($p=.539$). Cinsiyetler açısından da her iki grup arasında anlamlı farklılık yoktu ($p=.919$).

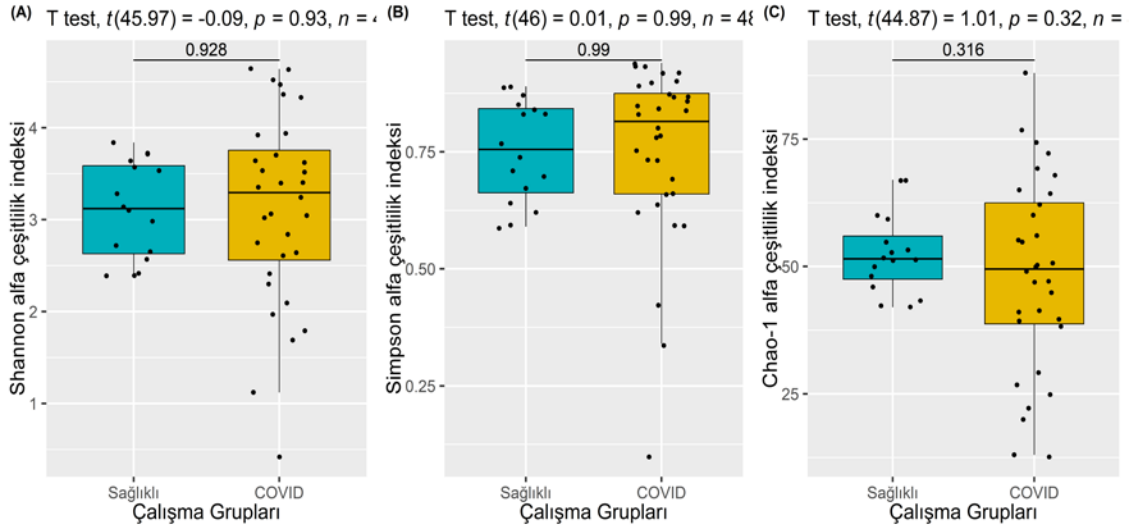
Çizelge 3.7. Kontrol grubu ve COVID-19 hastalarının demografik özellikleri

	Çalışma Grupları		
	Sağlıklı (n=16)	COVID-19 (n=32)	p-değeri
Yaş (yıl)	45.93 ± 15.80	48.34 ± 10.86	.539 ¹
Cinsiyet (E/K)	7/9	16/16	.919 ²

COVID-19 hastaları ile sağlıklı kontrollerin bağırsak mikrobiyotalarının alfa çeşitlilikleri arasında Shannon, Simpson ve Chao1 indeksleri ile değerlendirildi. Hasta ve sağlıklı gruplar arasında Shannon, Simpson ve Chao1 indeksleri açısından anlamlı farklılık saptanmadı (sırasıyla $p=.998$, $p=.750$, $p=.942$). Çalışma gruplarının alfa çeşitlilik analizi için kullanılan Shannon, Simpson ve Chao1 indeks verileri Çizelge 3.8’ de verilmiştir.

Çizelge 3.8. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyotalarının alfa çeşitliliklerinin değerlendirilmesi

	Çalışma Grupları		
	Sağlıklı (n=16)	COVID-19 (n=32)	p-değeri
Shannon	3.10 ± 0.52	3.12 ± 1.03	.928 ³
Simpson	0.75 ± 0.10	0.75 ± 0.19	.990 ³
Chao	52.43 ± 7.78	48.50 ± 18.99	.316 ¹



Şekil 3.6. Kontrol ve COVID-19 hastalarının A)Shannon indeksi, B)Simpson indeksi, C) Chao-1 indeksi ile alfa çeşitlilik analizi

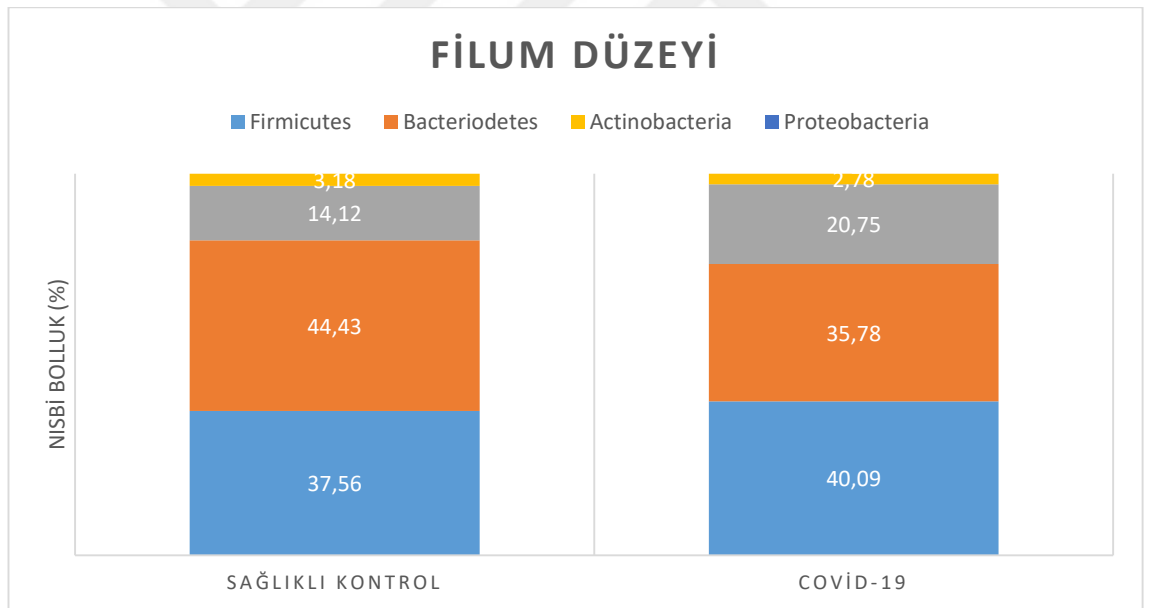
Gruplar arasında bağırsak mikrobiyota kompozisyonu filum düzeyinde incelendiğinde Nispi bolluğun analizi gruplara göre; sağlıklı grupta *Bacteroidetes* ortalama yüzde 44.43 ± 12.53 , *Firmicutes* ortalama yüzde 37.56 ± 10.87 , *Proteobacteria* ortalama yüzde 14.12 ± 9.58 , *Actinobacteria* ortalama yüzde 3.18 ± 3.88 oranlarında görüldü. COVID-19 hasta grubunda ise *Firmicutes* ortalama yüzde 40.09 ± 26.34 , *Bacteroidetes* ortalama yüzde 35.78 ± 22.27 , *Proteobacteria* ortalama yüzde 20.75 ± 18.35 , *Actinobacteria* ortalama yüzde 2.78 ± 5.72 oranlarında tespit edildi.

Gruplar arasında bağırsak mikrobiyota kompozisyonu filum düzeyinde karşılaştırıldığında COVID-19 hastalarında *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* filumlarının nispi bolluğu kontrol grubuna göre azalmış olarak, *Proteobacteria* filumu ise COVID-19 hastalarında kontrol grubuna göre artmış olarak bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeyde değildi (sırasıyla $p=.078$, $p=.232$ ve $p=.463$). *Firmicutes* filumunda ise gruplar arasında herhangi bir farklılık gözlenmedi ($p=.956$).

Ayrıca çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyotaları arasında *Firmicutes* / *Bacteriodes* oranları incelendi, *Firmicutes* / *Bacteriodes* oranının COVID-19 hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre azaldığı görüldü ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p=.412$). Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde değerlendirme verileri Çizelge 3.9’ da verilmiştir.

Çizelge 3.9. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde değerlendirilmesi

	Çalışma Grupları		p-değeri
	Sağlıklı (n=16)	COVID-19 (n=32)	
<i>Firmicutes</i>			.956 ⁴
Ortalama ± SD	37.56 ± 10.87	40.09 ± 26.34	
Medyan (IQR)	41.5 (28-45)	41 (18.5 – 50.5)	
<i>Bacteroidetes</i>			.078 ⁴
Ortalama ± SD	44.43 ± 12.53	35.78 ± 22.27	
Medyan (IQR)	46.5 (40.75 – 53.75)	37.5 (20.25 – 49.25)	
<i>Proteobacteria</i>			.463 ⁴
Ortalama ± SD	14.12 ± 9.58	20.75 ± 18.35	
Medyan (IQR)	12 (7.75- 19.25)	15 (6.75-32.5)	
<i>Actinobacteria</i>			.232 ⁴
Ortalama ± SD	3.18 ± 3.88	2.78 ± 5.72	
Medyan (IQR)	2 (0-4.75)	0 (0-25)	
<i>Firmicutes/Bacteriodes</i>	0.84 (0.49-1.05)	0.74 (0.21-1.47)	.412 ⁴



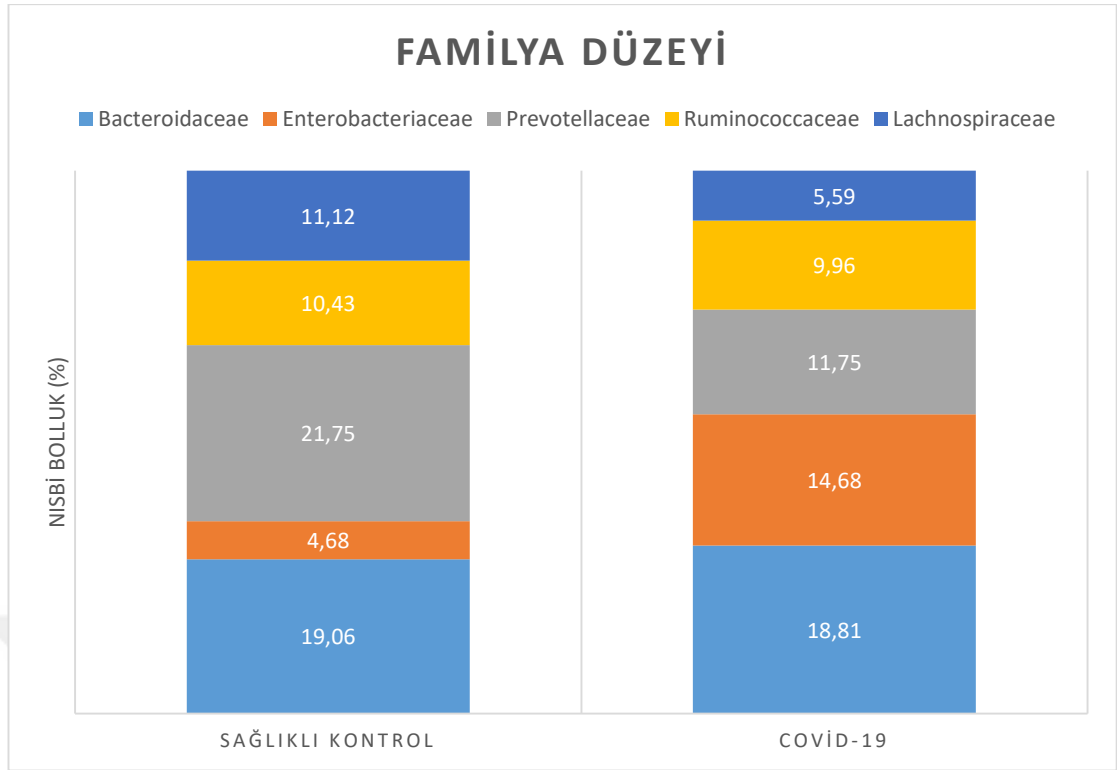
Şekil 3.7. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun filum düzeyinde dağılımı

Hasta ve kontrol gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonlarında aile düzeyinde *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* aileleri incelendi. Aile düzeyinde COVID-19 hastalarında *Lachnospiraceae*'nin nispi bolluğu sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde düşük bulundu (3.5 [IQR, 0 – 10.25] vs. 9 [IQR, 6.5 – 16], $p=.008$).

Bacteroidaceae, *Prevotellaceae* ve *Ruminococcaceae* ise COVID-19 hastalarında sağlıklı kontrollere göre daha az oranda bulunmasına rağmen istatistiksel açıdan anlamlı değildi. (sırasıyla $p=.669$, $p=.258$, $p=.645$) *Enterobacteriaceae*'nin nispi bolluğu ise COVID-19 hastalarında kontrol grubuna göre yüksek oranda bulundu ancak istatistiksel anlamlı farklılık göstermedi ($p=.595$). Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun familya düzeyinde değerlendirme verileri Çizelge 3.10' da verilmiştir.

Çizelge 3.10. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun familya düzeyinde değerlendirilmesi

Çalışma Grupları			
	Sağlıklı (n=16)	COVID-19 (n=32)	p-değeri
<i>Bacteroidaceae</i>			.669 ⁴
Ortalama ± SD	19.06 ± 18.42	18.81 ± 20.17	
Medyan (IQR)	13.5 (4-31.75)	9.5 (1- 31.75)	
<i>Enterobacteriaceae</i>			.595 ⁴
Ortalama ± SD	4.68 ± 6.60	14.68 ± 21.84	
Medyan (IQR)	1.5 (0-7)	2 (0- 23.25)	
<i>Prevotellaceae</i>			.258 ⁴
Ortalama ± SD	21.75 ± 22.16	11.75 ± 16.78	
Medyan (IQR)	20 (0-43)	5 (0-16)	
<i>Ruminococcaceae</i>			.645 ⁴
Ortalama ± SD	10.43 ± 5.07	9.96 ± 7.42	
Medyan (IQR)	10.5 (6.75-14.25)	8.5(3.75-14)	
<i>Lachnospiraceae</i>			.008 ⁴
Ortalama ± SD	11.12 ± 6.68	5.59 ± 6.08	
Medyan (IQR)	9 (6.5-16)	3.5 (0-10.25)	

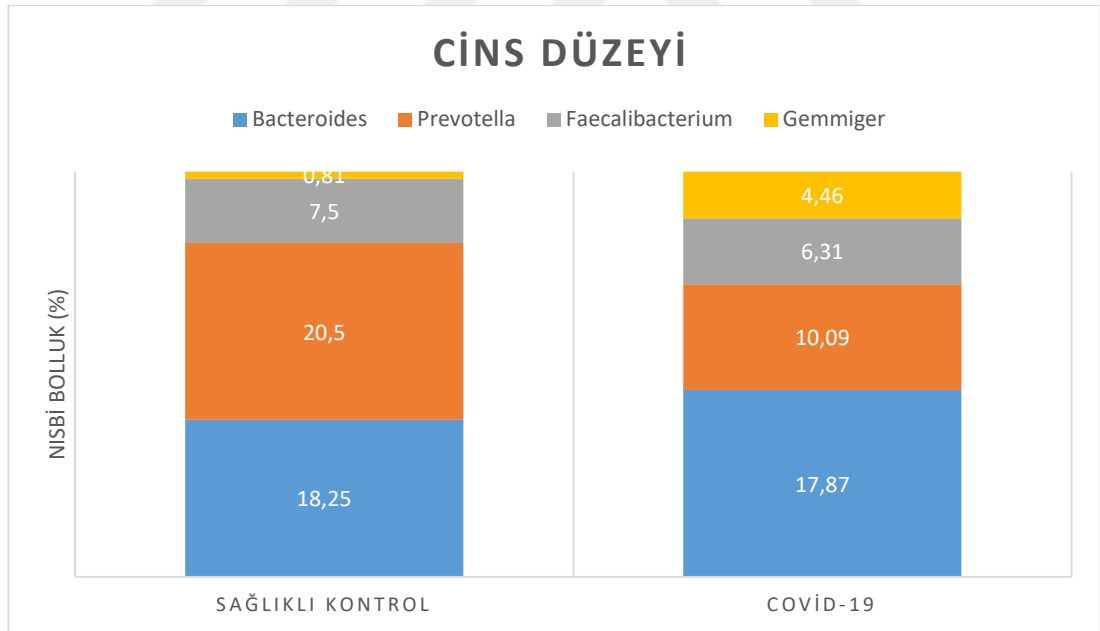


Şekil 3.8. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun familya düzeyinde dağılımı

Hasta ve kontrol gruplarının bağırsak mikrobiyotalarında cins düzeyinde *Bacteroides*, *Prevotella*, *Faecalibacterium* ve *Gemmiger* taksonları incelendi. *Gemmiger* cinsinin nispi bollukları arasında çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptandı, *Gemmiger* cinsinin COVID-19 hastalarında yüksek olduğu bulundu ($p=.004$). Yapılan çoklu karşılaştırma sonucunda severe COVID-19 hasta grubunda *Gemmiger* cinsinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve non severe hasta grubunda da *Gemmiger* cinsinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi (0 [IQR, 0–0] vs.3 [IQR, 0 – 4.5] adj. $p=.004$) *Bacteroides*, *Prevotella* ve *Faecalibacterium* cinsleri ise COVID-19 hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre düşük bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=.725$, $p=.186$, $p=.363$). Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde değerlendirme verileri Çizelge 3.9’ da verilmiştir.

Çizelge 3.11. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde değerlendirilmesi

	Çalışma Grupları		p-değeri
	Sağlıklı (n=16)	COVID-19 (n=32)	
<i>Bacteroides</i>			.725 ⁴
Ortalama ± SD	18.25 ± 18.38	17.87 ± 19.53	
Medyan (IQR)	13 (3.75- 31.5)	8.5 (1-37.75)	
<i>Prevotella</i>			.186 ⁴
Ortalama ± SD	20.50 ± 21.59	10.09 ± 15.74	
Medyan (IQR)	17(0-38)	1.5 (0-14)	
<i>Faecalibacterium</i>			.363 ⁴
Ortalama ± SD	7.50 ± 3.59	6.31 ± 4.51	
Medyan (IQR)	8.5 (4.75-9.5)	6 (2.75-10)	
<i>Gemmiger</i>			.004 ⁴
Ortalama ± SD	0.81 ± 1.79	4.46 ± 6.44	
Medyan (IQR)	0 (0-0)	3 (0-4.5)	



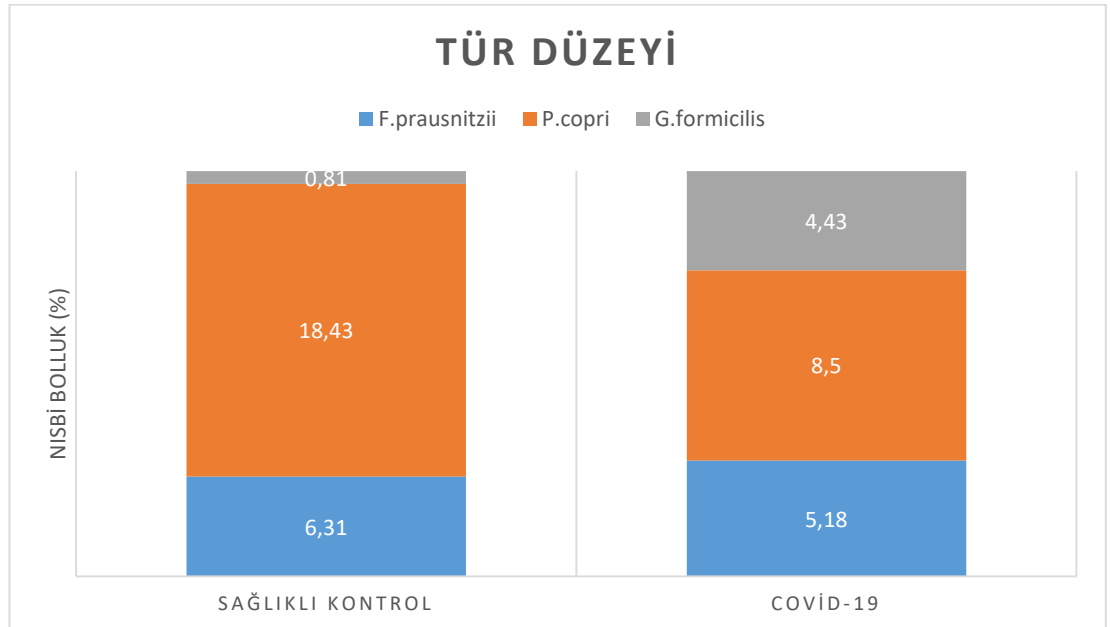
Şekil 3.9. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun cins düzeyinde dağılımı

Hasta ve kontrol gruplarının bağırsak mikrobiyotalarında tür düzeyinde *Faecalibacterium prausnitzii*, *Prevotella copri* ve *Gemmiger formicilis* türleri incelendi. *G.formicilis*' in COVID-19 hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre

istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edildi (0 [IQR, 0– 0] vs.2.5 [IQR, 0 – 4.5] adj. $p=.004$). Ayrıca *F.prausnitzii* ve *P.copri* türleri COVID-19 hasta grubunda sağlıklı kontrollere göre azalmış bulundu ancak istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamadı (sırasıyla $p=.339$ $p=.168$). Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde değerlendirme verileri Çizelge 3.12’ de verilmiştir.

Çizelge 3.12. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde değerlendirilmesi

	Çalışma Grupları		<i>p</i> -değeri
	Sağlıklı (n=16)	COVID-19 (n=32)	
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>			.339 ⁴
Ortalama ± SD	6.31 ± 3.97	5.18 ± 3.84	
Medyan (IQR)	7(3.5-8.5)	4 (2.75- 8)	
<i>Prevotella copri</i>			.168 ⁴
Ortalama ± SD	18.43 ± 9.77	8.50 ± 14.52	
Medyan (IQR)	13 (0-34)	1 (0-11.25)	
<i>Gemmiger formicilis</i>			.004 ⁴
Ortalama ± SD	0.81 ± 1.79	4.43 ± 6.45	
Medyan (IQR)	0 (0-0)	2.5(0-4.5)	



Şekil 3.10. Kontrol ve hasta gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun tür düzeyinde dağılımı

¹ Tek yönlü varyans analizi devamında post-hoc için Tukey HSD test

² Pearson ki-kare testi

³ Welch F testi devamında post-hoc için Games-Howell testi

⁴ Kruskal-Wallis H testi devamında post-hoc için Dwass-Steel-Critchlow-Fligner (DSCF) testi



4. TARTIŞMA

29 Aralık 2019' da Çin' in Hubei Eyaleti, Wuhan' da ortaya çıkan tanımlanamayan pnömoni vakası etkeni SARS-CoV-2 olarak adlandırılmış ve sonrasında Çin ve diğer ülkelerde vakalar hızla artmıştır. DSÖ 11 Mart 2020' de tüm Dünya' da pandemi ilan etmiştir ve günümüze kadar COVID-19' un 540 milyondan fazla insana bulaştığı, altı milyondan fazla ölüme neden olduğu bilinmektedir (WHO 2022). SARS-CoV-2 enfeksiyonunun neden olduğu COVID-19, asemptomatik, hafif veya kendi kendini sınırlayan solunum yolu hastalığından şiddetli pnömoni, akut solunum sıkıntısı sendromu ve ölüme kadar değişen bir yelpazede klinik olarak çeşitlilik gösterir (Moreira-Rosário ve ark 2021).

SARS-CoV-2' nin ana bulaş şekli hava yolu olsa da bulaşabileceği tek yer solunum yolu değildir. Enterositler, SARS-CoV-2 enfeksiyonuna aracılık eden iki ana hücre yüzey molekülü olarak tanımlanan ACE2 ve TMPRSS2' yi yüksek düzeyde eksprese ettiğinden, bağırsak da önemli bir enfeksiyon bölgesi olabilir. Virüsün bağırsakta çoğalabildiği yapılan çalışmalar ile kanıtlanmıştır. Ayrıca ateş, yorgunluk ve kuru öksürük gibi solunum yolu semptomlarına ek olarak ishal, mide bulantısı, kusma ve karın ağrısı gibi gastrointestinal semptomlarda COVID-19 hastalarında sıklıkla gözlenmektedir (Li ve ark 2022). COVID-19 hastalarının yaklaşık %50' sinde anal sürüntülerde ve dışkı örneklerinde SARS-CoV-2 virüsü tespit edilmiştir ki bu da sindirim sisteminin virüs replikasyonu ve aktivitesi için akciğer dışı bir bölge olabileceğini göstermektedir (Zuo ve ark 2020). Bağışıklık sisteminin en büyük bileşeni olan mukozal yüzey, SARS-CoV-2 viral enfeksiyonunda mukozal yanıtın endüktif ve efektör fazlarında kilit rol oynar. SARS-CoV-2' nin enfeksiyona neden olan epitel hücreleri üzerinde viral spike protein aracılığıyla bağlandığı ACE2 reseptörleri akciğerler, bağırsaklar ve böbrekler dahil olmak üzere birden fazla organda bulunur ve ACE2' nin aminoasit taşıma işlevinin gastrointestinal sistemde ki bağırsak mikrobiyal ekolojisine bağlı olduğuna dayanan bulgular, COVID-19 ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki bağlantıyı ortaya koymaktadır. COVID-19 hastalarının dışkı örneklerinde SARS-CoV-2 viral RNA' sının tespiti de bunu desteklemektedir (Khan ve ark 2021).

İnsan vücudunun her yüzeyi, mikrobiyota adı verilen çeşitli mikrobiyal topluluklar tarafından kolonize edilmiştir ve mikrobiyotanın çoğunluğu

gastrointestinal sistemde bulunur. Bağırsaktaki bakteriler, altı baskın filuma ait 1000' den fazla türle temsil edilir: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Fusobacteria* ve *Verrucomicrobia*. Bunlar arasında *Firmicutes* ve *Bacteroidetes* filumlarından gelen bakteriler en yaygın olanlarıdır ve bağırsak mikrobiyotasının %90' ını temsil eder. Sağlıklı bir bireyin bağırsak mikrobiyotası, gastrointestinal sistemin farklı bölümlerinde farklılık gösterir ve yaşlanma, alışkanlıklar, yaşam tarzı ve antibiyotik tüketimi gibi çevresel faktörler nedeniyle zamanla değişir. Bu tür varyasyonlar fizyolojik olarak kabul edilir ve sağlıklı mikrobiyota ile tutarlıdır. Bununla birlikte, mikrobiyota bileşimindeki değişiklikler genellikle disbiyozlar olarak da adlandırılan hastalıklarla ilişkilidir ancak değişmiş mikrobiyota ile çeşitli hastalıklar arasındaki nedensellik genellikle belirsizdir (Stojanov ve ark 2020). Mikrobiyota, kolonizasyon alanları ve kaynakları için patojenlerle devamlı rekabet halindedir. Ayrıca mikrobiyota, bağışıklığın hazırlanması için önemli sinyaller sağlar ve bu nedenle bağışıklık sisteminin gelişmesine yardımcı olur. Mikrobiyota, bazı virüslerin enfeksiyonunu engellerken bazı virüslerin enfeksiyonunu teşvik edebilir. Bu etkiler, konakçı ve/veya virüs üzerinde doğrudan ve/veya dolaylı etkiler yoluyla ortaya çıkabilir. Önceki çalışmalar, bağırsak florasının solunum yolu virüs enfeksiyonları ile yakından ilişkili olduğunu ve bağırsak-akciğer eksenini yoluyla hastalıkların oluşumunu ve gelişimini etkileyebileceğini göstermiştir (Robinson ve Pfeiffer 2014). Öte yandan, viral enfeksiyonlar genellikle kommensal mikrobiyotada önemli bozulmalarla sonuçlanır ve konakta disbiyozu neden olur, bu da viral enfektiviteyi daha fazla artıran bir unsur olabilir (Li ve ark 2019). Ayrıca karmaşık bağırsak mikrobiyota ekosistemleri, patojenik bakterilerin istilasını önlediği gibi tersine, antibiyotik tedavisi ile bağırsak mikrobiyotası zarar gördüğünde, rekabetçi patojenlerin dışlanması zayıflar ve antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarının potansiyel olarak tehlikeli çoğalmaları meydana gelebilir. Bağırsak disbiyozu ile COVID-19' un şiddeti arasındaki ilişki farklı klinik ortamlarda gözlemlenmiş olsa da bağırsak mikrobiyotasının COVID-19' un şiddeti üzerindeki nedensel etkisi tam olarak açıklığa kavuşturulmamıştır. Yapılan çalışmalarda COVID-19' un neden olduğu bağırsak disbiyozunun mikroorganizmaların bağırsaktan kana translokasyonuna yol açabileceğine dair veriler elde edilmiştir ve bu da bağırsak disbiyozunun COVID-19 sırasında ikincil kan dolaşımı enfeksiyonlarını etkinleştirmede doğrudan bir rol oynadığını göstermiştir. COVID-19' un ikincil kan dolaşımı enfeksiyonu oluşumuna katkısını araştıran bir

çalışmada, 101 COVID-19 hastasının dışkı örneklerine mikrobiyota analizi yapılmış ve hayvan modelindeki sonuçlara da paralel olarak bağırsak mikrobiyomundaki disbiyozis ortaya konmuştur. Ayrıca hastanede yatan COVID-19 hastalarında antimikrobiyal dirençli türler içerdiği bilinen fırsatçı patojenik bakteri türlerinin arttığını bulmuşlardır. Bu hastalardan elde edilen eşleştirilmiş mikrobiyom verileriyle ikincil mikrobiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarını test eden kan kültürü sonuçlarının analizi, COVID-19 hastalarında bakterilerin bağırsaktan sistemik dolaşıma yer değiştirdiğini göstermektedir. Elde edilen bu sonuçlar, COVID-19 sırasında tehlikeli ikincil enfeksiyonlara olanak sağlamada bağırsak mikrobiyom disbiyozunun doğrudan rolünü göstermektedir (Venzon ve ark). Bugüne kadar yapılan birçok çalışmada, solunum yolu enfeksiyonlarının bağırsak mikrobiyotasının bileşiminde değişikliklere sebep olduğunu gösterilmiştir. COVID-19' un ciddi klinik belirtilerinden biri özellikle yaşlı, bağışıklığı baskılanmış hastalarda pnömoni ve akut solunum sıkıntısı sendromuna (ARDS) ilerlemesidir. Çok sayıda deneysel ve klinik araştırmada, bağırsak mikrobiyotasının sepsis ve ARDS patogeneğinde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir. İlerleyen yaş ile birlikte bağırsak mikrobiyotasında çeşitliliğinin azaldığı göz önüne alındığında COVID-19' un yaşlı ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda daha ciddi klinik sonuçlara ilerlemesi, akciğer ve bağırsak mikrobiyotası arasında karşılıklı bir iletişimin olduğunu düşündürmektedir (Dhar ve Mohanty 2020).

Gastrointestinal komplikasyonları olan COVID-19 hastalarının, gastrointestinal tutulumu olmayan hastalara kıyasla daha fazla solunum sıkıntısı yaşadıkları tespit edilmiştir (Chhibber-Goel ve ark 2021). Bununla birlikte, gastrointestinal kanalda SARS-CoV-2' nin varlığı her zaman gastrointestinal semptomlara yol açmayabilir. Örneğin, Singapur' da yapılan bir çalışmada, incelenen COVID-19 hastalarının %50' sinin dışkılarında saptanabilir düzeyde virüs bulunmuştur, ancak bunların yalnızca yarısının ishal gibi gastrointestinal semptomlar gösterdiği bildirilmiştir. Buradan yola çıkarak SARS-CoV-2, gastrointestinal semptomların varlığından bağımsız olarak gastrointestinal kanalda yaygın olarak bulunabileceğinden, enfeksiyon anında mevcut bağırsak mikrobiyota kompozisyonu semptomların gelişimi için kritik öneme sahip olabilir (Kim 2021).

Proteobakteriler, insan bağırsak mikrobiyotasında en bol bulunan filumlardan biridir ve dahası bakteri alanında ki en büyük filumdur. *Proteobacteria* filumunda birçok yaygın insan patojeni bulunur: *Brucella*, *Rickettsia*, *Bordetella*, *Neisseria*,

Escherichia, *Shigella*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Helicobacter* en çok bilinen patojenlerdendir. Yapılan çalışmalarda *Proteobacteria* artışı Tip 2 diyabet, obezite, kardiyovasküler hastalıklar, inflamatuvar bağırsak hastalıkları, astım ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi birçok hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Hastalık sırasında ve özellikle inflamasyon sırasında *Proteobacteria* artışına yol açan kesin mekanizmalar tam olarak bilinmemekle birlikte, bağırsak iltihabı sırasında zorunlu anaeroblarda bir azalma ve *Proteobacteria* filumundan *Enterobacteriaceae* gibi fakültatif anaeroblarda artış olması "oksijen hipotezi" nin ortaya atılmasına sebep olmuştur. Bu hipoteze göre, fizyolojik koşullar altında, kolon epitel hücrelerinin, beta-oksidasyon süreçleri yoluyla lümendeki oksijeni tükettiği ve böylece anaerobik bir ortam oluşturduğu, ancak bağırsak enflamasyonu durumunda, epitel hücreleri, disbiyozu teşvik ettiği düşünülen ve Proteobakterilerin çoğalmasıyla ilişkili olduğu düşünülen artan oksijen mevcudiyetinin bir sonucu olarak beta-oksidasyona maruz kalma kapasitelerini azaltır. Bu da fakültatif anaerob bakterilerde artış ile sonuçlanır. Disbiyozun gelişmesinde *Proteobacteria*' nın çoğalmasında rol oynayabilecek bir diğer önemli faktör ise nitrattır. Aslında, enflamatuvar koşullar sırasında konakçı savunması olarak üretilen nitratin, bu bakteriler tarafından kullanılarak baskın hale gelmelerine katkı sağlamış olabileceği belirtilmiştir (Rizzatti ve ark 2017). COVID-19 ve bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkiyi inceleyen Mazzarelli ve ark. 6' sını COVID-19' lu yoğun bakım hastası, 9' u COVID-19' lu servis hastası ve 8' i sağlıklı kontrol olmak üzere toplam 23 örnekte bağırsak mikrobiyotası için 16s rRNA gen analizi yapmışlardır. Örnekler arasında ki alfa çeşitliliği değerlendirmek için Shannon ve Chao1 indekslerini kullanmışlardır. Chao1 indeksine göre çeşitliliğin yoğun bakımda yatan COVID-19 hastalarında, serviste yatan hasta grubu ve sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığını bulmuşlardır. Benzer şekilde, istatistiksel anlamlılığa ulaşmamış olsa da Shannon endeksi için de azalma gözlemlenmiştir. Bizim çalışmamızda da alfa çeşitliliği değerlendirmek için Shannon, Simpson ve Chao1 indeksleri kullanıldı. Shannon ve Simpson indekslerinde gruplar arasında fark görülmezken, Chao1 indeksi kullanılarak yapılan analizde, alfa çeşitliliğin kontrol grubundan severe hasta grubuna doğru azalma eğiliminde olduğu bulundu ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşmadı. Mazzarelli ve ark. yaptıkları çalışmada filum düzeyinde, servis hastalarında kontrol grubuna kıyasla *Proteobacteria*' nın önemli ölçüde artarken *Spirochaetes* ve *Fusobacteria*' nın azaldığını tespit etmişlerdir. Yoğun bakım hastaları ve servis hastalarının bağırsak

mikrobiyotaları karşılaştırıldıklarında ise filum düzeyinde anlamlı bir değişiklik bulamamışlardır (Mazzarelli ve ark 2021). Çok merkezli bir çalışmada Venzon ve ark. COVID-19' lu 138 örneğin fekal bakteriyel mikrobiyom profilini çıkarmışlardır. Yapılan analizlerde COVID-19 hastalarında filum düzeyinde *Firmicutes* ve *Bacteroidetes*' in en bol bulunan filumlar olduğu ve bunu *Proteobacteria*' nın izlediğini tespit etmişlerdir (Venzon ve ark). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde severe ve non-severe COVID-19 hasta grubunda filum düzeyinde en bol *Firmicutes* bulunmuş ve bunu *Bacteroidetes* ve *Proteobacteria* filumlarının takip ettiği görülmüştür. Ayrıca hastalık şiddetinin artışıyla uyumlu *Proteobacteria* filumunda artış dikkat çekmiştir. Daha önce yapılan diğer çalışmalarda da *Firmicutes* filumunun COVID-19 hastalık şiddetiyle anlamlı şekilde ilişkili olduğu bulunmuştur. Yayınlanan bir raporda farklı *Firmicutes* bakterilerinin murin bağırsağında ACE2 ekspresyonunun yukarı veya aşağı doğru düzenlenmesinde çeşitli rollere sahip olduğunun gösterilmesi ile *Firmicutes* filumunun COVID-19 hastalığı seyrine olan etkisi açıklığa kavuşturulmuştur (Zuo ve ark 2020). COVID-19' un yanısıra diğer viral enfeksiyonlarda da bağırsak mikrobiyotasında benzer değişiklikler gözlemlenmiştir. Qin ve ark. 26 H7N9 hastasının bağırsak mikrobiyotasının bileşimini analiz etmişler ve filum düzeyinde, tüm gruplarda *Bacteroidetes*, *Firmicutes* ve *Proteobacteria*' yı baskın olarak bulmuşlardır. Ayrıca filum seviyesinde hastalarda *Proteobacteria* sayısının arttığını, *Bacteroidetes* sayısının azaldığını bulmuşlardır. Cins düzeyinde ise tüm hastalarda *Bacteroides*' i baskın cins olarak tespit etmişlerdir (Qin ve ark 2015). Filum düzeyinde Xu ve ark.' nın çocuk hastalarda yaptıkları çalışmada ise daha farklı sonuçlar elde edilmiştir. Çalışmaya 9 COVID-19 lu çocuk ve aynı yaşlarda 14 sağlıklı çocuğu kontrol grubu olarak dahil etmişlerdir. COVID-19' lu çocuklardan boğaz sürüntüsü, burun sürüntüsü ve dışkı örneği dahil olmak üzere toplam 103 örnek toplamışlardır. COVID-19' lu çocukların boğaz ve burun mikrobiyomunu sağlıklı kontrollerden önemli ölçüde daha az çeşitlilikte, COVID-19' lu çocukların bağırsak mikrobiyomunu ise sağlıklı kontrollerinkinden daha yüksek zenginlikte tespit etmişlerdir. COVID-19' lu çocukların bağırsaklarında filum düzeyinde *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* önemli ölçüde zenginleşirken, sağlıklı kontrollerin bağırsaklarında *Proteobacteria* artışı tespit etmişlerdir. Bağırsaktan farklı olarak, üst solunum yollarında *Bacteroidetes* ve *Firmicutes* sağlıklı kontrollerde önemli ölçüde zenginleşirken, COVID-19' lu çocukların üst solunum yollarında *Proteobakterilerin* zenginleştiğini görmüşlerdir. Yerleşik kommensallerin büyük çoğunluğunun, sağlıklı

kontrollerin üst solunum yollarında ve bağırsaklarında COVID-19' lu çocuklara göre önemli ölçüde daha fazla bolluk gösterdiği ve COVID-19' lu grupta fırsatçı patojenik ve çevresel bakteri bolluğunun arttığı gözlemlenmiştir (Xu ve ark 2021).

Literatürde *Firmicutes/Bacteroidetes* oranı, bağırsak mikrobiyota disbiyozunu değerlendirmek için kullanılmıştır; bu oranın artması veya azalması, disbiyozun ayırt edici özelliğidir. Artması genellikle obezite ile, azalması ise inflamatuvar bağırsak hastalığıyla ilişkilendirilmiştir. *Firmicutes* bakterileri gram pozitifdir ve SCFA sentezi yoluyla konağın beslenmesinde ve metabolizmasında anahtar rol oynar. *Firmicutes* bakterileri, metabolik ürünleri aracılığıyla diğer doku ve organlarla dolaylı olarak bağlantılıdır ve açlık ile tokluğu düzenler. Aksine, *Bacteroidetes* bakterileri gram negatifdir ve immünomodülasyon ile ilişkilidir. Bileşenleri, lipopolisakkaritler ve flagellin, hücre reseptörleri ile etkileşime girer ve sitokin sentezi yoluyla bağışıklık reaksiyonlarını artırır (Stojanov ve ark 2020). Bizim çalışmamızda da *Firmicutes/Bacteroidetes* oranı değerlendirilmiş ve sağlıklı kontrol grubundan, severe ve non-severe hasta grubuna doğru giderek azaldığı görülmüştür. Moreira-Rosário ve ark.'nın yaptığı çalışmada ise klinik durumlarına göre hafif, orta ve şiddetli olmak üzere 3 gruba ayrılmış 111 COVID-19 hastasının bağırsak mikrobiyota analizi yapılmıştır. Alfa çeşitliliğin Shannon indeksine göre değerlendirmesinde hafif gruptan şiddetli gruba doğru giderek azaldığı görülmüştür. Bu azalma eğilimi hafiften orta ila şiddetliye doğru *Bifidobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae* ve *Lachnospiraceae* familyalarında istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ters yönde, *Proteobacteria* filumuna ait bazı türlerin ise, COVID-19 şiddet skoru ile arttığı görülmüştür. Aynı hastaların takip edildiği yere göre ayaktan, serviste ve yoğun bakımda olmak üzere yeniden gruplandırılıp karşılaştırmaları yapıldığında ise, *Proteobacteria*'nın nispi bolluğunda ayaktan tedavi edilen hastalarda % 3, servis ve YBÜ hastalarında sırasıyla % 12 ve % 14'e çıkan tutarlı bir artış eğilimini ortaya çıkarmışlardır. Ayrıca *Firmicutes/Bacteroidetes* oranının sırayla ayaktan, servis ve yoğun bakımda takip edilen COVID-19 hastalarında azaldığı gösterilmiştir. Shannon indeksi verilerine göre yoğun bakımda yatan COVID-19 hastalarının, ayaktan ve serviste yatan COVID-19 hastalarına kıyasla daha düşük alfa çeşitliliğine sahip olma eğiliminde olduğu da bildirmişlerdir (Moreira-Rosário ve ark 2021).

Lachnospiraceae, *Firmicutes* filumuna ait bir familyadır. *Lachnospiraceae* familyasının bakteri üyelerinin gastrointestinal sistem mikrobiyotasının baskın

bileşenleri oldukları bilinmektedir ve bütirik asit üretiminde rol oynarlar. Bütirat, konakçı epitel hücreleri için mükemmel bir enerji kaynağıdır. Ayrıca bütirat, periferik düzenleyici T hücrelerinin oluşumundan kaynaklanan ve patojen kaynaklı Nükleer Faktör κB 'nin aktivasyonunu bloke edebilen anti-enflamatuvar bir etki gösterir. Ek olarak, bütirat kanserli kolonik hücrelerin büyümesini inhibe eder. Yapılan çalışmalarda inflamatuvar bağırsak hastalıklarından ülseratif kolitte de *Lachnospiraceae* familyasının azalmış olduğu bulunmuştur (Sasaki ve ark 2019). Ayrıca Chao ve ark. yaptıkları çalışmada COVID-19 hastalarında antibiyotik kullanımı süresince de *Lachnospiraceae* familyasının giderek azaldığını göstermişlerdir (Cao ve ark 2021). Gu ve ark.'nın yaptığı çalışmada 30 COVID-19 hastası, 24 H1N1 hastası ve 30 sağlıklı kontrolün bağırsak mikrobiyota analizleri yapılmıştır. Alfa çeşitlilik Shannon ve Chao1 indeksleri ile değerlendirilmiş ve COVID-19 hastalarında ile H1N1 hastalarında sağlıklı kontrollere göre alfa çeşitlilik düşük olarak değerlendirilmiştir. Familya düzeyinde sağlıklı kontroller ile karşılaştırıldığında COVID-19 hastalarında, *Ruminococcaceae* bolluğunu ve *Lachnospiraceae* familyasından birkaç cinsi önemli ölçüde azalmış olarak bulmuşlardır (Gu ve ark 2020). Gaibani ve ark. hastaneye yatan 69 COVID-19 hastasının bağırsak mikrobiyotasını analiz etmişler ve sağlıklı kontrollere kıyasla COVID-19 hastalarında alfa çeşitliliğin önemli ölçüde azaldığını gözlemlemişlerdir. Familya düzeyinde, COVID-19 hastalarında *Enterococcaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Lactobacillaceae*, *Veillonellaceae*, *Porphyromonadaceae* ve *Staphylococcaceae* taksonlarında zenginleşme, *Bacteroidaceae*, *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae*'nin yanı sıra *Prevotellaceae* ve *Clostridiaceae*'de azalma ile karakterize edilmiştir. Aynı çalışmada yoğun bakıma yatan 16 hasta ile serviste takip edilen COVID-19 hastalarının bağırsak mikrobiyota analizleri karşılaştırılmış ve alfa çeşitliliğin yoğun bakım hastalarında daha fazla azaldığı *Streptococcus*, *Oscillospira*, *Blautia*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* ve *Clostridiales* taksonlarının yoğun bakım ünitesine girmemiş hastalarda daha fazla olduğu bulunmuştur (Gaibani ve ark 2021). Mazzarelli ve ark. nin yaptığı çalışmada familya düzeyinde, servis COVID-19 hastalarında kontrol grubuna kıyasla *Peptostreptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcaceae*, *Vibrionaceae*, *Aerococcaceae*, *Dermabacteraceae*, *Actinobacteria* artarken *Nitrospiraceae*, *Propionibacteriaceae*, *Aeroaxmonadaceae*, *Morcoplasmaaceae*, *Morcoplasmaaceae* azalmış olarak tespit edilmiştir. Yoğun bakım hastalarında kontrol ile karşılaştırıldığında servis hastalarında artan bakterilere

ek olarak *Erysipelotrichaceae*, *Microbacteriaceae*, *Mycobacteriaceae*, *Pseudonocardiaceae*, *Brevibacteriaceae* önemli ölçüde artarken *Carnobacteriaceae*, *Coriobacteriaceae* ve *Mycoplasmataceae*'nin önemli ölçüde azaldığını tespit etmişlerdir (Mazzarelli ve ark 2021). Bizim çalışmamızda da familya düzeyinde tüm gruplarda *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* familyaları en bol bulunan familyalar oldu. *Enterobacteriaceae* familyası, severe COVID-19 hasta grubunda, non-severe hasta grubu ve kontrol grubuna göre yüksek oranda tespit edildi. Buna karşın *Prevotellaceae* familyasının ise sağlıklı grupta, severe ve non-severe hasta gruplarına göre yüksek oranda olduğu görüldü. Severe COVID-19 hasta grubunda *Lachnospiraceae* familyasının sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edildi. Bizim çalışmamızla benzer şekilde Khan ve ark.'da yaptıkları çalışmada *Lachnospiraceae* ve *Ruminococcaceae* familyalarını, COVID-19 hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre azalmış olarak bulmuşlardır. *Lachnospiraceae* bolluğundaki azalmayı asemptomatik COVID-19 hasta grubunda % 16, hafif derecede enfekte grupta % 28 ve ciddi şekilde enfekte grupta % 43 olarak belirtmişlerdir (Khan ve ark 2021).

Cins düzeyinde değerlendirme yapıldığında ise İtalya'da yapılan bir çalışmada yoğun bakımda yatan COVID-19 hastalarında *Bacteroides* ve *Prevotella* cinsinin çok azaldığı görülmüştür (Gaibani ve ark 2021). Bizim çalışmamızda da *Bacteroides* ve *Prevotella* cinsleri sağlıklı grupta, severe ve non-severe hasta gruplarına göre yüksek oranda bulundu. Zuo ve ark.'nın yaptığı çalışmada dışkı SARS-CoV-2 virüs yükü ve bağırsak bakteriyel bolluğu arasındaki ilişki değerlendirilmiş ve birçok *Bacteroides* cinsinin SARS-CoV-2 yükü ile ters korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Ayrıca bu *Bacteroides* türlerinin murin kolonunda ACE2 ekspresyonunun aşağı regülasyonu ile ilişkili olduğunu belirtmişlerdir. Birlikte ele alındığında bu veriler, *Bacteroides* türlerinin ACE2 yoluyla konakçı girişini engelleyerek SARS-CoV-2 enfeksiyonu ile mücadelede potansiyel bir koruyucu role sahip olabileceğini düşündürmektedir (Zuo ve ark 2020). *Prevotella* insanlarda ağız boşluğu, solunum yolu, vajina, deri ve bağırsak gibi birçok farklı bölgeden izole edilmiş kommensal olduğu düşünülen bir türdür. SARS-CoV-2 enfeksiyonu sadece konakçı hücrede çok fazla enerji tüketmekle kalmaz, aynı zamanda ACE2 ekspresyonunu azaltarak bağırsak epitel hücrelerine zararlar bağırsak bariyerinin bozar ve amino asit açlığına sebep olarak bağışık yanıtta dengesizlikler ve inflamatuvar ortamı artırıcı etkilerde bulunur. Dolayısıyla COVID-19,

bağırsak mikrobiyotası bileşimi üzerinde patojenlerin zenginleşmesi ve *Prevotella* gibi kommensallerin tükenmesi gibi sonuçlara da sebebiyet verebilir.

Çin’ de yapılan benzer bir çalışmada ise COVID-19 hasta grubunda cins düzeyinde *Bacteroides*, *Faecalibacterium* ve *Blautia* önemli ölçüde azalırken, *Escherichia*, *Gemmiger* cinslerinde ise yukarı regülasyon izlenmiştir (Zhou ve ark 2021). Bizim çalışmamızda da severe COVID-19 hasta grubunda *Gemmiger* cinsinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve non severe hasta grubunda da *Gemmiger* cinsinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi.

Tür düzeyinde yaptığımız araştırmada ise Zhou ve ark.’ nin yaptığı çalışmada sağlıklı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, COVID-19 hasta grubunda *Bacteroides vulgatus*, *Prevotella copri*, *Clostridium leptum* ve *Alistipes putredinis*’ in bolluğu azalırken *Escherichia coli*, *Akkermansia muciniphila* ve *Gemmiger formicilis*’ in bolluğunun arttığı görülmüştür (Zhou ve ark 2021). Bizim çalışmamızda da benzer şekilde *Gemmiger formicilis*’ in hasta gruplarında hastalık şiddetiyle orantılı olarak artma eğilimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Ayrıca *Prevotella copri* türünün sağlıklı kontrollerden, severe hasta grubuna doğru azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. *Faecalibacterium prausnitzii* türü ise sağlıklı grupta az bir farkla yüksek çıkmıştır. *F. prausnitzii*’ nin, anti-enflamatuar sitokin IL-10’ u salgılayan insan kolonik düzenleyici T hücrelerinin hazırlanmasını indüklediği gösterilmiştir (Yeoh ve ark 2021). *F.Prausnitzii* azalmasının gastrointestinal sistem enflamasyonunun mikrobiyolojik bir belirteci olarak kabul edilebileceği belirtilmiştir (Martín ve ark 2017). Çin’ de Zuo ve ark. yaptıkları çalışmada 15 COVID-19 hastasının, 6 toplum kökenli pnömoni hastasının ve 15 sağlıklı kontrol grubunun bağırsak mikrobiyota profillerini karşılaştırmışlardır. Antibiyotik kullanmış COVID-19 hastalarında, antibiyotik kullanmamış COVID-19 hastalarına kıyasla *Lachnospiraceae* ailesi, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus obeum* ve *Dorea formicigenerans* dahil olmak üzere konak bağışıklığına faydalı simbiyontlar olan çoklu bakteri türlerinin daha fazla tükendiğini göstermişlerdir. Antibiyotik kullanımına bakılmaksızın, COVID-19 hastalarında hastalık seyri sırasında yetersiz temsil edilen bakteri türlerini, SARS-CoV-2 virüsü negatifleştikten sonra dahi tükenmiş veya çok düşük miktarlarda bulmuşlardır. Aynı çalışmada COVID-19 hastalarını kliniklerine göre hafif, orta, şiddetli olmak üzere üç gruba

ayırarak bağırsak mikrobiyomunun COVID-19' un şiddetine etkilerini değerlendirmişlerdir. En fazla farklılığı *Firmicutes* filumunda bulmuşlardır. *Firmicutes* filumundan üç bakteri üyesi *Coprobacillus* cinsi, *Clostridium ramosum* ve *C. hathewayi* türleri, COVID-19 hastalığının ciddiyeti ile pozitif olarak en ilişkili bakteriler olarak bulunmuştur. Buna karşılık, iki faydalı tür olan *Alistipes onderdonkii* ve *Faecalibacterium prausnitzii*' nin, COVID-19' un ciddiyeti ile negatif korelasyon gösterdiğini ortaya koymuşlardır (Zuo ve ark 2020). Yeoh ve ark. yaptıkları çalışmada 87 COVID-19 hastası ile 78 sağlıklı kontrol grubunun dışkı mikrobiyota analizlerini karşılaştırmışlardır. Alfa çeşitlilikte Shannon indeksine göre anlamlı farklılık bulunamamıştır. Filum düzeyinde, *Bacteroidetes* üyelerini COVID-19 hastalarında, COVID-19 olmayan bireylere kıyasla daha fazla, *Actinobacteria* filumunu ise COVID-19 olmayan kişilerde daha fazla olarak bulmuşlardır. Tür düzeyinde ise COVID-19 hastalarında *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torki* ve *Bacteroides dorei* türlerinin zenginleştiği ve *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii* ve *Eubacterium rectale*' nin tükendiğini ortaya koymuşlardır. Ayrıca COVID-19 hastalarında *Faecalibacterium prausnitzii* ve *Bifidobacterium bifidum* türlerinin hastalık şiddeti ile negatif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir. COVID-19' dan iyileşmenin ardından bağırsak mikrobiyota kompozisyonunu değerlendirmek için 27 hastadan RT-qPCR ile SARS-CoV-2 negatif olarak test edildikten sonra dışkı örnekleri toplanmış ve COVID-19 olmayan deneklerle karşılaştırıldığında, iyileşen 27 hastanın bağırsak mikrobiyota kompozisyonunun, antibiyotik alıp almadıklarına bakılmaksızın önemli ölçüde farklı kaldığı belirlenmiştir. İyileşen hastaların bağırsak mikrobiyotası *Bifidobacterium dentium* ve *Lactobacillus ruminis* gibi türler açısından zenginleşmiş ve *E.rectale*, *R.bromii*, *F.prausnitzii* ve *Bifidobacterium longum* açısından ise tükenmiş olarak bulunmuştur (Yeoh ve ark 2021).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi' ne 1 Kasım 2020 – 1 Şubat 2021 tarihleri arasında başvuran COVID-19 hastalarından ayaktan tedavi alan 16 hastanın, hastanede yatarak tedavi alan 16 hastanın ve 16 sağlıklı kontrol grubunun gaita örneklerine sekans analizi yapılarak, bağırsak mikrobiyota profilleri ortaya çıkarılmıştır. Çalışmamızda Shannon, Simpson ve Chao1 indeksleri kullanılarak değerlendirilen alfa çeşitlilik için gruplar arasında anlamlı fark saptanmamıştır. Örneklerin bağırsak mikrobiyota profilleri filum, familya, cins ve tür düzeyinde incelenmiştir. Filum düzeyinde severe ve non-severe COVID-19 hasta gruplarında en fazla oranda *Firmicutes* tespit edilmişken, kontrol grubunda *Bacteroidetes* filumunun en fazla olduğu tespit edilmiştir. *Firmicutes* / *Bacteriodes* oranının ise hastalık şiddeti arttıkça azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonları familya düzeyinde incelendiğinde *Bacteroidaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Prevotellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Lachnospiraceae* familyaları en bol bulunan familyalar olmuştur. *Lachnospiraceae* familyasının nispi bollukları arasında çalışma gruplarına göre anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Yapılan çoklu karşılaştırma sonucu severe COVID-19 hasta grubunda, *Lachnospiraceae* familyasının sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edilmiştir. COVID-19 hasta gruplarında *Enterobacteriaceae* familyası daha yüksek, kontrol grubunda ise *Prevotellaceae* familyası daha yüksek oranda görülmüş ancak istatistiksel anlamlılığa ulaşamamıştır. Cins düzeyinde ise *Bacteroides*, *Prevotella*, *Faecalibacterium* ve *Gemmiger* taksonları incelenmiştir. *Bacteriodes* ve *Prevotella* cinsleri sağlıklı grupta, severe ve non-severe hasta gruplarına göre daha yüksek oranda bulundu ancak istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. *Gemmiger* cinsinin nispi bollukları arasında çalışma grupları arasında anlamlı farklılık saptanmıştır. Yapılan çoklu karşılaştırma sonucunda severe COVID-19 hasta grubunda *Gemmiger* cinsinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve non-severe hasta grubunda da *Gemmiger* cinsinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tür düzeyinde *F.prausnitzii*, *P.copri* ve *G.formicilis* türleri incelenmiştir. *G.formicilis*' in hasta gruplarında hastalık şiddetiyle orantılı olarak artma eğilimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Yapılan çoklu karşılaştırma sonucunda severe COVID-19 hasta grubunda *G.formicilis* türünün sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu ve non severe hasta grubunda da *G.formicilis*

türünün sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca COVID-19 enfeksiyonunun hastalık şiddetinden bağımsız olarak bağırsak mikrobiyotasını nasıl etkilediğini değerlendirmek amacıyla katılımcılar, sağlıklı kontroller ve COVID-19 hastaları olmak üzere iki grup olarak da değerlendirilmiştir. Bu değerlendirmede de iki grup arasında alfa çeşitlilik açısından anlamlı fark bulunmamıştır. Filum düzeyinde incelendiğinde COVID-19 hastalarında *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* filumlarının nispi bolluğu kontrol grubuna göre azalmış olarak, *Proteobacteria* filumu ise COVID-19 hastalarında kontrol grubuna göre artmış olarak bulunmuştur, ancak istatistiksel olarak anlamlı düzeye ulaşmamıştır. Familya düzeyinde COVID-19 hastalarında *Lachnospiraceae*'nin nispi bolluğu sağlıklı kontrollere göre anlamlı şekilde düşük bulunmuştur. Cins düzeyinde *Gemmiger* cinsinin COVID-19 hastalarında kontrol grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Tür düzeyinde ise *G.formicilis*'in COVID-19 hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı tespit edilmiştir.

COVID-19, bulaşıcı hastalık anlayışımız üzerinde etkileri olan SARS-CoV-2'nin neden olduğu bugün dünyanın karşı karşıya olduğu büyük bir pandemidir. SARS-Cov-2, öncelikle alveolar epitel hücrelerinde bulunan ACE2 reseptörlerinin bağlanması yoluyla akciğer enfeksiyonuna neden olmasına rağmen, yakın zamanda enfekte hastaların dışkıında SARS-CoV-2 RNA'sinin bulunduğu bildirildi. Bağırsak mikrobiyotasının akciğer hastalıklarını etkilemedeki rolü iyi ifade edilmiştir. Ayrıca solunum yolu virüsü enfeksiyonunun bağırsak mikrobiyotasında bozulmalara neden olduğu bilinmektedir. Yaşlılıkta bağırsak mikrobiyota çeşitliliği azalır ve COVID-19'un esas olarak yaşlı hastalarda ölümcül olması, bağırsak mikrobiyotasının bu hastalıkta oynayabileceği role işaret eder. Bağışıklığı iyileştirdiği bilinen kişiselleştirilmiş beslenme ve takviye ile bağırsak mikrobiyota profilinin iyileştirilmesi, yaşlı insanlarda ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda bu hastalığın etkisinin en aza indirilebileceği profilaktik yollardan biri olabilir. Mevcut tedavilerle birlikte prebiyotikler/probiyotikler de dahil olmak üzere kişiselleştirilmiş fonksiyonel gıdanın birlikte takviyesinin etkisini görmek için daha fazla çalışma yapılabilir. Ayrıca tipik olarak semptomatik COVID-19 geliştirme olasılığı daha düşük olan daha genç bireyler arasında bile, obezite veya diyabetli hastalar daha şiddetli semptomlar gösterme eğilimindedir, bu da kronik durumların varlığının, genç yaştan daha güçlü bir etkiye

sahip olduğunu düşündürür. Dolayısıyla güçlendirilmiş sağlıklı bir barsak mikrobiyotası bu hastalarda koruyucu olacaktır. COVID-19 için tedaviler ve aşılar geliştirmek birincil öneme sahip olsa da, bağırsak mikrobiyotasını hastalık önleme ve yönetimi için kullanmak da akıllıca olacaktır.

Bağırsak mikrobiyota bileşimi, insan popülasyonları arasında oldukça heterojendir ve çalışmamızda bildirilen değişiklikler, diğer biyocoğrafyalardan COVID-19 hastalarına mutlaka uyum sağlamayabilir. Ancak farklı popülasyonlarda mikrobiyota ve metabolik ürünlerinin bileşimini COVID-19 bağlamında ortaya çıkarmak, hastalığın yeni biyobelirteçlerinin belirlenmesine ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olacaktır. Mikrobiyomdaki değişiklikleri COVID-19 için güvenilir biyobelirteçler olarak açıklamak, hastalık yapbozunun gözden kaçan bir parçasını temsil eder ve daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- ACARKAN T, ERDOĞAN D, KACAR M, 2020. Covid-19 ile mücadelede akciğer ve bağırsak mikrobiyotalarının rolü. *Anatolian Clinic the Journal of Medical Sciences*, 25, Special Issue on COVID 19, 284-93.
- Arabacı Ç, Tutak GA, Kesim BE, Ertürk B, Ak K, Ağaç E, 2020. The Characteristics of SARS-CoV-2 Virus and Microbiological Diagnosis. *Eur Arc Med Res*, 36, 1, 10-20.
- Arabacı Ç, Tutak GA, Kesim BE, Ertürk B, Ak K, Ağaç E, Arabacı TÇ, 2020. SARS Cov-2 Virüsünün Özellikleri ve Mikrobiyolojik Tanısı The characteristics of SARS CoV-2 virus and microbiological diagnosis.
- Ardissone AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC, Murgas-Torrazza R, Sharma R, Hudak ML, Triplett EW, 2014. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One*, 9, 3, e90784.
- Arrieta M-C, Stiemsma LT, Amenogbe N, Brown EM, Finlay B, 2014. The intestinal microbiome in early life: health and disease. *Frontiers in immunology*, 5, 427.
- Artika IM, Dewantari AK, Wiyatno A, 2020. Molecular biology of coronaviruses: current knowledge. *Heliyon*, 6, 8, e04743.
- Benjamin JL, Hedin CR, Koutsoumpas A, Ng SC, McCarthy NE, Prescott NJ, Pessoa-Lopes P, Mathew CG, Sanderson J, Hart AL, 2012. Smokers with active Crohn' s disease have a clinically relevant dysbiosis of the gastrointestinal microbiota. *Inflammatory bowel diseases*, 18, 6, 1092-100.
- Berry M, Gamielien J, Fielding BC, 2015. Identification of new respiratory viruses in the new millennium. *Viruses*, 7, 3, 996-1019.
- Bodakikahe R, Balakrishnan B, Taneja V, 2019. The role of microbiome in rheumatoid arthritis treatment. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 11, 1759720X19844632.
- Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas M-E, 2016. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome medicine*, 8, 1, 1-12.
- Cao J, Wang C, Zhang Y, Lei G, Xu K, Zhao N, Lu J, Meng F, Yu L, Yan J, 2021. Integrated gut virome and bacteriome dynamics in COVID-19 patients. *Gut microbes*, 13, 1, 1887722.
- Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ, 2015. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microbial ecology in health and disease*, 26, 1, 26191.
- CDC, 2022. SARS-CoV-2 Variant Classifications and Definitions. Erişim tarihi 15 Haziran 2022. Erişim adresi, <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html>
- Chhibber-Goel J, Gopinathan S, Sharma A, 2021. Interplay between severities of COVID-19 and the gut microbiome: implications of bacterial co-infections? *Gut Pathogens*, 13, 1, 1-6.
- Ciotti M, Ciccozzi M, Terrinoni A, Jiang W-C, Wang C-B, Bernardini S, 2020. The COVID-19 pandemic. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*, 57, 6, 365-88.
- Clarke SF, Murphy EF, O' Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, Hayes P, O' Reilly M, Jeffery IB, Wood-Martin R, 2014. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut*, 63, 12, 1913-20.

- Comert SS, Kiral N, 2020. Radiological Findings of COVID-19 Pneumonia/COVID-19 Pnomonisinin Radyolojik Bulgulari. Southern Clinics of Istanbul Eurasia (SCIE), 31, SI, 16-23.
- Conlon MA, Bird AR, 2014. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*, 7, 1, 17-44.
- D' Amelio P, Sassi F, 2018. Gut microbiota, immune system, and bone. *Calcified tissue international*, 102, 4, 415-25.
- Dayan S, 2021. COVID-19 ve Aşı. *Dicle Tıp Dergisi*, 48, 98-113.
- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P, 2010. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 33, 14691-6.
- Demirci M, Ünlü Ö, Yiğın A, Zeyrek FY, 2020. SARS-CoV-2 Patogenezi ve Covid-19' da İmmun Yanıt. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*, 50, 4, 183-91.
- Dhar D, Mohanty A, 2020. Gut microbiota and Covid-19-possible link and implications. *Virus research*, 285, 198018.
- DİNÇ F, APPAK Ö, SAYINER A, COVID-19 mikrobiyolojik tanı testleri.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R, 2010. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107, 26, 11971-5.
- Donati Zeppa S, Agostini D, Piccoli G, Stocchi V, Sestili P, 2020. Gut microbiota status in COVID-19: an unrecognized player? *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 576551.
- Edouard S, Million M, Bachar D, Dubourg G, Michelle C, Ninove L, Charrel R, Raoult D, 2018. The nasopharyngeal microbiota in patients with viral respiratory tract infections is enriched in bacterial pathogens. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 37, 9, 1725-33.
- Fabricant J, 1998. The early history of infectious bronchitis. *Avian diseases*, 42, 4, 648-50.
- Fava F, Danese S, 2011. Intestinal microbiota in inflammatory bowel disease: friend of foe? *World journal of gastroenterology: WJG*, 17, 5, 557.
- Forchielli ML, Walker WA, 2005. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *British Journal of Nutrition*, 93, S1, S41-S8.
- Fraher MH, O' toole PW, Quigley EM, 2012. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9, 6, 312-22.
- Francino M, 2016. Antibiotics and the human gut microbiome: dysbioses and accumulation of resistances. *Frontiers in microbiology*, 1543.
- Gaibani P, D' Amico F, Bartoletti M, Lombardo D, Rampelli S, Fornaro G, Coladonato S, Siniscalchi A, Re MC, Viale P, 2021. The gut microbiota of critically ill patients with COVID-19. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11.
- Gevers D, Knight R, Petrosino JF, Huang K, McGuire AL, Birren BW, Nelson KE, White O, Methé BA, Huttenhower C, 2012. The Human Microbiome Project: a community resource for the healthy human microbiome.

- Goldsmith KTED, Emery SZTPS, Comer STCUJ, Lim W, 2003. A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 348, 195366.
- Gu S, Chen Y, Wu Z, Chen Y, Gao H, 2020. Alterations of the Gut Microbiota in Patients with COVID-19 or H1N1 Influenza [published online ahead of print, 2020 Jun 4]. *Clin Infect Dis*.
- Gu S, Chen Y, Wu Z, Chen Y, Gao H, Lv L, Guo F, Zhang X, Luo R, Huang C, 2020. Alterations of the gut microbiota in patients with coronavirus disease 2019 or H1N1 influenza. *Clinical Infectious Diseases*, 71, 10, 2669-78.
- Güneyli S, Atceken Z, Doğan H, Altınmakas E, Atasoy KC, 2020. Radiological approach to COVID-19 pneumonia with an emphasis on chest CT. *Diagnostic and Interventional Radiology*, 26, 4, 323.
- Gürsoy NC, Barış O, 2017. Mikrobiyota çalışmalarında moleküler tanı yöntemleri. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 56-67.
- Hamre D, Procknow JJ, 1966. A new virus isolated from the human respiratory tract. *Proceedings of the society for experimental biology and medicine*, 121, 1, 190-3.
- Hartenian E, Nandakumar D, Lari A, Ly M, Tucker JM, Glaunsinger BA, 2020. The molecular virology of coronaviruses. *Journal of Biological Chemistry*, 295, 37, 12910-34.
- Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, Ludden C, Reeve R, Rambaut A, Peacock SJ, 2021. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. *Nature Reviews Microbiology*, 19, 7, 409-24.
- Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, Zhang L, Fan G, Xu J, Gu X, 2020. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The lancet*, 395, 10223, 497-506.
- Iizumi T, Battaglia T, Ruiz V, Perez GIP, 2017. Gut microbiome and antibiotics. *Archives of medical research*, 48, 8, 727-34.
- Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN, 2015. Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology: WJG*, 21, 29, 8787.
- Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK, 2007. Long-term ecological impacts of antibiotic administration on the human intestinal microbiota. *The ISME journal*, 1, 1, 56-66.
- Kaur SP, Gupta V, 2020. COVID-19 Vaccine: A comprehensive status report. *Virus research*, 288, 198114.
- Khan M, Mathew BJ, Gupta P, Garg G, Khadanga S, Vyas AK, Singh AK, 2021. Gut dysbiosis and IL-21 response in patients with severe COVID-19. *Microorganisms*, 9, 6, 1292.
- Kim HS, 2021. Do an altered gut microbiota and an associated leaky gut affect COVID-19 severity? *MBio*, 12, 1, e03022-20.
- KÖROĞLU M, 2017. Mikrobiyota çalışmalarında örnek alımı ve DNA izolasyonu. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 50-5.
- Kumar M, Babaei P, Ji B, Nielsen J, 2016. Human gut microbiota and healthy aging: recent developments and future prospective. *Nutrition and Healthy aging*, 4, 1, 3-16.
- LaTuga MS, Stuebe A, Seed PC. A review of the source and function of microbiota in breast milk. *Seminars in reproductive medicine*, 068-73.
- Levy M, Kolodziejczyk AA, Thaïss CA, Elinav E, 2017. Dysbiosis and the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 17, 4, 219-32.

- Li N, Ma W-T, Pang M, Fan Q-L, Hua J-L, 2019. The commensal microbiota and viral infection: a comprehensive review. *Frontiers in Immunology*, 10, 1551.
- Li S, Zhou Y, Yan D, Wan Y, 2022. An Update on the Mutual Impact between SARS-CoV-2 Infection and Gut Microbiota. *Viruses*, 14, 8, 1774.
- Liang T, 2020. Handbook of COVID-19 prevention and treatment. The First Affiliated Hospital, Zhejiang University School of Medicine. Compiled According to Clinical Experience, 68.
- Libertucci J, Young VB, 2019. The role of the microbiota in infectious diseases. *Nature Microbiology*, 4, 1, 35-45.
- Liu D, Liang J, Fung T, 2020. Human coronavirus-229E,-OC43,-NL63, and-HKU1. Epub ahead of print 7 May 2020. Reference Module in Life Sciences, 1-13.
- Loeffelholz MJ, Tang Y-W, 2020. Laboratory diagnosis of emerging human coronavirus infections—the state of the art. *Emerging microbes & infections*, 9, 1, 747-56.
- Ludwig S, Zarbock A, 2020. Coronaviruses and SARS-CoV-2: a brief overview. *Anesthesia and analgesia*.
- Martín R, Miquel S, Benevides L, Bridonneau C, Robert V, Hudault S, Chain F, Berteau O, Azevedo V, Chatel JM, 2017. Functional characterization of novel *Faecalibacterium prausnitzii* strains isolated from healthy volunteers: a step forward in the use of *F. prausnitzii* as a next-generation probiotic. *Frontiers in microbiology*, 8, 1226.
- Masters PS, 2006. The molecular biology of coronaviruses. *Advances in virus research*, 66, 193-292.
- Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere M-F, 2013. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends in microbiology*, 21, 4, 167-73.
- MAVİ D, İNKAYA AÇ, 2020. COVID-19: İmmün patogenezi. *Flora*, 25, 28.
- Mazzarelli A, Giancola ML, Farina A, Marchioni L, Rueca M, Gruber CEM, Bartolini B, Ascoli Bartoli T, Maffongelli G, Capobianchi MR, 2021. 16S rRNA gene sequencing of rectal swab in patients affected by COVID-19. *PLoS One*, 16, 2, e0247041.
- Memikoğlu O, Genç V, 2020. COVID-19. E-Kitap, Ankara Üniversitesi Basımevi: Ankara, 13.
- Mitrev M, Consortium HMP, 2012. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*, 486, 207-14.
- Moreira-Rosário A, Marques C, Pinheiro H, Araújo JR, Ribeiro P, Rocha R, Mota I, Pestana D, Ribeiro R, Pereira A, 2021. Gut microbiota diversity and C-Reactive Protein are predictors of disease severity in COVID-19 patients. *Frontiers in Microbiology*, 1820.
- Murri M, Leiva I, Gomez-Zumaquero JM, Tinahones FJ, Cardona F, Soriguer F, Queipo-Ortuño MI, 2013. Gut microbiota in children with type 1 diabetes differs from that in healthy children: a case-control study. *BMC medicine*, 11, 1, 1-12.
- Muscogiuri G, Cantone E, Cassarano S, Tuccinardi D, Barrea L, Savastano S, Colao A, 2019. Gut microbiota: a new path to treat obesity. *International journal of obesity supplements*, 9, 1, 10-9.
- Nelson AM, Walk ST, Taube S, Taniuchi M, Houpt ER, Wobus CE, Young VB, 2012. Disruption of the human gut microbiota following Norovirus infection. *PLoS One*, 7, 10, e48224.
- Özdemir A, Demirel ZB, 2017. Beslenme ve mikrobiyota ilişkisi. *Journal of Biotechnology and Strategic Health Research*, 1, 25-33.

- Pal M, Berhanu G, Desalegn C, Kandi V, 2020. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2): an update. *Cureus*, 12, 3.
- Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, Adisetiyo H, Zabih S, Lincez PJ, Bittinger K, 2017. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA pediatrics*, 171, 7, 647-54.
- Park M, Thwaites RS, Openshaw PJ, 2020. COVID-19: lessons from SARS and MERS. *European Journal of Immunology*, 50, 3, 308.
- Payne S, 2017. Family coronaviridae. *Viruses*, 149.
- Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, Schloss JA, Bonazzi V, McEwen JE, Wetterstrand KA, Deal C, 2009. The NIH human microbiome project. *Genome research*, 19, 12, 2317-23.
- Pourbagheri-Sigaroodi A, Bashash D, Fateh F, Abolghasemi H, 2020. Laboratory findings in COVID-19 diagnosis and prognosis. *Clinica Chimica Acta*, 510, 475-82.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, 2010. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464, 7285, 59-65.
- Qin N, Zheng B, Yao J, Guo L, Zuo J, Wu L, Zhou J, Liu L, Guo J, Ni S, 2015. Influence of H7N9 virus infection and associated treatment on human gut microbiota. *Sci Rep*, 5, 1, 1-12.
- Rémy V, LARGERON N, Quilici S, Carroll S, 2015. The economic value of vaccination: why prevention is wealth. *Journal of market access & health policy*, 3, 1, 29284.
- Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC, 2019. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. *Microorganisms*, 7, 1, 14.
- Rizzatti G, Lopetuso L, Gibiino G, Binda C, Gasbarrini A, 2017. Proteobacteria: a common factor in human diseases. *BioMed research international*, 2017.
- Robinson CM, Pfeiffer JK, 2014. Viruses and the microbiota. *Annual review of virology*, 1, 55.
- Rogier EW, Frantz AL, Bruno ME, Wedlund L, Cohen DA, Stromberg AJ, Kaetzel CS, 2014. Lessons from mother: long-term impact of antibodies in breast milk on the gut microbiota and intestinal immune system of breastfed offspring. *Gut microbes*, 5, 5, 663-8.
- Romano-Keeler J, Weitkamp J-H, 2015. Maternal influences on fetal microbial colonization and immune development. *Pediatric research*, 77, 1, 189-95.
- Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, Davey M, Leamon JH, Johnson K, Milgrew MJ, Edwards M, 2011. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 475, 7356, 348-52.
- Rowland I, Gibson G, Heinken A, Scott K, Swann J, Thiele I, Tuohy K, 2018. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *European journal of nutrition*, 57, 1, 1-24.
- Rudan I, Adeloye D, Sheikh A, 2022. COVID-19: vaccines, efficacy and effects on variants. *Current opinion in pulmonary medicine*, 28, 3, 180-91.
- Sarangi AN, Goel A, Aggarwal R, 2019. Methods for studying gut microbiota: a primer for physicians. *Journal of clinical and experimental hepatology*, 9, 1, 62-73.

- Sasaki K, Inoue J, Sasaki D, Hoshi N, Shirai T, Fukuda I, Azuma T, Kondo A, Osawa R, 2019. Construction of a model culture system of human colonic microbiota to detect decreased Lachnospiraceae abundance and butyrogenesis in the feces of ulcerative colitis patients. *Biotechnology Journal*, 14, 5, 1800555.
- Schrezenmeir J, de Vrese M, 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American journal of clinical nutrition*, 73, 2, 361s-4s.
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LCM, Finlay BB, 2010. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*.
- Sever Kaya D, Saka B, İnsan bağırsak mikrobiyotası ve kronik hastalıklarla ilişkisi.
- Sevim M, Ağaçfıdan A, 2020. Coronavirus: Genel Özellikler ve Güncel Yaklaşım. *Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi*, 3, S1, 14-23.
- Shi N, Li N, Duan X, Niu H, 2017. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Military Medical Research*, 4, 1, 1-7.
- Sidhu H, Hoppe B, Hesse A, Tenbrock K, Bromme S, Rietschel E, Peck AB, 1998. Absence of *Oxalobacter formigenes* in cystic fibrosis patients: a risk factor for hyperoxaluria. *The Lancet*, 352, 9133, 1026-9.
- Stewardson AJ, Gaia N, Francois P, Malhotra-Kumar S, Delemont C, de Tejada BM, Schrenzel J, Harbarth S, Lazarevic V, WP S, 2015. Collateral damage from oral ciprofloxacin versus nitrofurantoin in outpatients with urinary tract infections: a culture-free analysis of gut microbiota. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, 4, 344. e1-. e11.
- Stojanov S, Berlec A, Štrukelj B, 2020. The influence of probiotics on the firmicutes/bacteroidetes ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease. *Microorganisms*, 8, 11, 1715.
- Su S, Wong G, Shi W, Liu J, Lai AC, Zhou J, Liu W, Bi Y, Gao GF, 2016. Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in microbiology*, 24, 6, 490-502.
- Tang Y-W, Schmitz JE, Persing DH, Stratton CW, 2020. Laboratory diagnosis of COVID-19: current issues and challenges. *Journal of clinical microbiology*, 58, 6, e00512-20.
- Tanrıover MD, Doğanay HL, Akova M, Güner HR, Azap A, Akhan S, Köse Ş, Erdiñ FŞ, Akalın EH, Tabak ÖF, 2021. Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey. *The Lancet*, 398, 10296, 213-22.
- Tanrıverdi ES, Yakupoğulları Y, Otlı B, Arşiv Kaynak Tarama Dergisi.
- Tanrıverdi ES, Yakupoğulları Y, Otlı B, 2020. COVID-19 etkeninin özellikleri. Çiçek C, editör *Mikrobiyoloji ve COVID-19*, 1, 7-14.
- Tao K, Tzou PL, Nouhin J, Gupta RK, de Oliveira T, Kosakovsky Pond SL, Fera D, Shafer RW, 2021. The biological and clinical significance of emerging SARS-CoV-2 variants. *Nature Reviews Genetics*, 22, 12, 757-73.
- Thum C, Cookson AL, Otter DE, McNabb WC, Hodgkinson AJ, Dyer J, Roy NC, 2012. Can nutritional modulation of maternal intestinal microbiota influence the development of the infant gastrointestinal tract? *The Journal of nutrition*, 142, 11, 1921-8.
- Toscano M, De Grandi R, Grossi E, Drago L, 2017. Role of the human breast milk-associated microbiota on the newborns' immune system: a mini review. *Frontiers in microbiology*, 8, 2100.

- Tufan A, Güler AA, Matucci-Cerinic M, 2020. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. Turkish journal of medical sciences, 50, 9, 620-32.
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2020a. COVID-19 (SARS-CoV-2 ENFEKSİYONU) GENEL BİLGİLER, EPİDEMİYOLOJİ VE TANI Bilimsel Danışma Kurulu Çalışması. Erişim tarihi 8 Haziran 2022. Erişim adresi, <https://covid19.saglik.gov.tr/Eklenti/39551/0/covid19rehberigenelbilgileripidemiyojivetani.pdf.pdf>
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, 2020b. COVID-19 (SARS-CoV-2 enfeksiyonu) Laboratuvar Biyogüvenlik Rehberi. Erişim tarihi 10 Haziran 2022. Erişim adresi, <https://shgmtetkikdb.saglik.gov.tr/Eklenti/37137/0/covid-19-sars-cov-2-enfeksiyonu-laboratuvar-biyoguvencuk-rehberipdf.pdf>
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, 2020c. COVID-19 (SARS-CoV-2 ENFEKSİYONU) Erişkin Hasta Tedavisi, Bilimsel Danışma Kurulu Çalışması 2020. Erişim tarihi 10 Mart 2022. Erişim adresi, <https://covid19.saglik.gov.tr/TR-66926/eriskin-hasta-tedavisi.html>
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2020d. COVID-19 Bilgilendirme Platformu. Erişim tarihi 5 Ocak 2022. Erişim adresi, <https://covid19.saglik.gov.tr/TR-66300/covid-19-nedir-.html>
- Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı, 2022. COVID-19 Bilgilendirme Platformu. Erişim tarihi 14 Haziran 2022. Erişim adresi, <https://covid19asi.saglik.gov.tr/>
- Tyrrell D, Bynoe M, Hoorn B, 1968. Cultivation of "difficult" viruses from patients with common colds. British medical journal, 1, 5592, 606.
- Venzon M, Bernard-Raichon L, Klein J, Axelrad JE, Zhang C, Hussey GA, Sullivan AP, Casanovas-Massana A, Noval MG, Valero-Jimenez AM, Gut microbiome dysbiosis during COVID-19 is associated with increased risk for bacteremia and microbial translocation. bioRxiv.
- Villapol S, 2020. Gastrointestinal symptoms associated with COVID-19: impact on the gut microbiome. Translational Research, 226, 57-69.
- Voigt RM, Forsyth CB, Green SJ, Mutlu E, Engen P, Vitaterna MH, Turek FW, Keshavarzian A, 2014. Circadian disorganization alters intestinal microbiota. PLoS One, 9, 5, e97500.
- WHO, 2021. Infection prevention and control during health care when coronavirus disease (COVID-19) is suspected or confirmed. Erişim tarihi 15 Haziran 2022. Erişim adresi, <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-IPC-2021.1>
- WHO, 2022a. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Erişim tarihi 15 Haziran 2022. Erişim adresi, <https://covid19.who.int/>
- WHO, 2022b. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard Erişim tarihi 15 Haziran 2022. Erişim adresi, <https://covid19.who.int/?mapFilter=vaccinations>
- WHO, 2022c. Coronavirus disease (COVID-19): Vaccines. Erişim tarihi 15 Haziran 2022. Erişim adresi, [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-vaccines](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-vaccines)
- Wu G, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y, Keilbaugh S, Bewtra M, Knights D, Walters W, Knight R, OTHERS. (2011). Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. Science, 334, 6052, 105-8.
- Wu W-K, Chen C-C, Panyod S, Chen R-A, Wu M-S, Sheen L-Y, Chang S-C, 2019. Optimization of fecal sample processing for microbiome study—The journey from bathroom to bench. Journal of the Formosan Medical Association, 118, 2, 545-55.

- Xie H, Guo R, Zhong H, Feng Q, Lan Z, Qin B, Ward KJ, Jackson MA, Xia Y, Chen X, 2016. Shotgun metagenomics of 250 adult twins reveals genetic and environmental impacts on the gut microbiome. *Cell systems*, 3, 6, 572-84. e3.
- Xu R, Liu P, Zhang T, Wu Q, Zeng M, Ma Y, Jin X, Xu J, Zhang Z, Zhang C, 2021. Progressive deterioration of the upper respiratory tract and the gut microbiomes in children during the early infection stages of COVID-19. *Journal of Genetics and Genomics*, 48, 9, 803-14.
- Yeoh YK, Zuo T, Lui GC-Y, Zhang F, Liu Q, Li AY, Chung AC, Cheung CP, Tso EY, Fung KS, 2021. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut*, 70, 4, 698-706.
- Yilmaz K, Altındış M, 2017. Gastrointestinal microbiota and fecal transplantation.
- Yılmaz K, Altındış M, 2017. Sindirim sistemi mikrobiyotasi ve fekal transplantasyon. *Nobel Medicus*, 13, 1, 9-15.
- Zhou T, Zeng Y, Wu J, Li J, Yan J, Meng W, Han H, Feng F, He J, Zhao S, 2021. SARS-CoV-2 triggered excessive inflammation and abnormal energy metabolism in gut microbiota. *bioRxiv*.
- Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, Zhao X, Huang B, Shi W, Lu R, 2020. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England journal of medicine*.
- Zoetendal EG, Akkermans AD, Akkermans-van Vliet WM, de Visser JAG, de Vos WM, 2001. The host genotype affects the bacterial community in the human gastrointestinal tract. *Microbial ecology in health and disease*, 13, 3, 129-34.
- Zuo T, Zhang F, Lui GC, Yeoh YK, Li AY, Zhan H, Wan Y, Chung AC, Cheung CP, Chen N, 2020. Alterations in gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization. *Gastroenterology*, 159, 3, 944-55. e8.

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

COVID-19 Hastalarının Bağırsak Mikrobiyota Profillerinin Araştırılması

Hatice ERDEM

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Uzmanlık Tezi / Konya, 2023

İlk defa 2019 Aralık ayında Çin' in Wuhan şehrinde görülen ve kısa sürede bir salgına neden olan COVID-19, 11 Mart 2020' de Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından küresel salgın olarak ilan edilmiştir. Koronavirüsler tek sarmallı pozitif polariteli RNA virüsleridir, COVID-19'da en sık bildirilen semptomlar ateş, öksürük ve nefes darlığıdır. Kusma, ishal ve karın ağrısı gibi gastrointestinal semptomlar, COVID-19 hastalarının %2-10' unda tanımlanmıştır. İnsan vücudunda çeşitli bölgelerde bulunan ve organizmayla simbiyotik ilişki içinde olan bakteri, virüs, mantar gibi mikroorganizmalara mikrobiyota denir. Çok sayıda kanıt, kommensal mikrobiyotanın çeşitli mekanizmalar yoluyla virüsleri istila ederek düzenlediğini ve dolayısıyla viral enfeksiyonlarda uyarıcı veya baskılayıcı rollere sahip olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada COVID-19 hastalığını sahip hastalar ile sağlıklı kontrollerin bağırsak mikrobiyota profilleri analiz edilerek, COVID-19 ile bağırsak mikrobiyotası arasındaki ilişkinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Çalışmaya 1 Kasım 2020–1 Şubat 2021 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi' ne başvuran COVID-19 hastalarından ayaktan tedavi alan 16 hasta ve hastanede yatarak tedavi alan 16 hasta dahil edildi. Ayrıca kontrol grubu olarak COVID-19 hastası olmayan 16 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi. Öncelikle tüm örnekler QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden Germany) kullanılarak DNA ekstraksiyonu yapıldı. Yeni nesil sekanslama cihazı Ion S5 (A27212, Ion Torrent™) sekans cihazı ile dizileme işlemi yapıldı.

Çalışmaya dahil edilen gaita örneklerinde alfa çeşitliliğin değerlendirilmesinde Shannon, Simpson ve Chao1 indeksleri kullanıldı. Her üç indeks için de grupların bağırsak mikrobiyal alfa çeşitlilikleri arasında anlamlı farklılık saptanmadı. Örneklerin bağırsak mikrobiyota profilleri filum, familya, cins ve tür düzeyinde incelenmiştir. Filum düzeyinde severe ve non-severe COVID-19 hasta gruplarında en fazla oranda *Firmicutes* tespit edilmişken, kontrol grubunda *Bacteroidetes* filumunun en fazla olduğu tespit edilmiştir. *Firmicutes* / *Bacteriodes* oranının ise hastalık şiddeti arttıkça azalma eğiliminde olduğu görülmüştür. Çalışma gruplarının bağırsak mikrobiyota kompozisyonları familya düzeyinde incelendiğinde *Lachnospiraceae* familyasının COVID-19 hastalarında sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede azalmış olduğu tespit edilmiştir. COVID-19 hasta grubunda *Gemmiger* cinsinin sağlıklı kontrollere göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tür düzeyinde *G.formicilis*' in hasta gruplarında hastalık şiddetiyle orantılı olarak artma eğilimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Bağırsak mikrobiyota bileşimi, insan popülasyonları arasında oldukça heterojendir ve çalışmamızda bildirilen değişiklikler, diğer biyocoğrafyalardan COVID-19 hastalarına mutlaka uyum sağlamayabilir. Ancak farklı popülasyonlarda mikrobiyota ve metabolik ürünlerinin bileşimini COVID-19 bağlamında ortaya çıkarmak, hastalığın yeni biyobelirteçlerinin belirlenmesine ve yeni terapötik hedeflerin belirlenmesine yardımcı olacaktır. COVID-19 için tedaviler ve aşılar geliştirmek birincil öneme sahip olsa da, bağırsak mikrobiyotasını hastalık önleme ve yönetimi için kullanmak da akıllıca olacaktır.

Anahtar Kelimeler: COVID-19, Mikrobiyota, Sekanslama

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELCUK UNIVERSITY

FACULTY of MEDICINE

Investigation of Gut Microbiota Profiles of COVID-19 Patients

Hatice ERDEM

Department of Medical Microbiology

Thesis in Medicine / KONYA, 2023

COVID-19, which was first seen in Wuhan, China in December 2019 and caused an escrow in a short time, was declared a global file by the World Health Organization (WHO) on March 11, 2020. Coronaviruses are single-stranded positive-sense RNA viruses. The most commonly reported symptoms are fever, cough, and shortness of breath. Gastrointestinal symptoms such as vomiting, diarrhea and abdominal pain have been described in 2-10% of COVID-19 patients. Microorganisms such as bacteria, viruses and fungi, which are found in various parts of the human body and are in symbiotic relationship with the organism, are called microbiota. A large body of evidence indicates that the commensal microbiota is regulated by invading viruses through a variety of mechanisms and thus has stimulatory or suppressive roles in viral infections. In this study, it was aimed to reveal the relationship between COVID-19 and gut microbiota by analyzing the gut microbiota profiles of patients with COVID-19 disease and healthy controls.

The study included 16 patients who received outpatient treatment and 16 patients who received inpatient treatment from COVID-19 patients who applied to Selçuk University Medical Faculty Hospital between 1 November 2020 and 1 February 2021. In addition, as the control group, 16 healthy individuals without COVID-19 disease were included in the study. First, DNA extraction was performed on all samples using the QIAmp® Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden Germany). Sequencing was performed with the next generation sequencing device, Ion S5 (A27212, Ion Torrent™).

Shannon, Simpson and Chao1 indices were used to evaluate alpha diversity in stool samples included in the study. There was no significant difference between the intestinal microbial alpha diversity of the groups for all three indices. The intestinal microbiota profiles of the samples were examined at the level of phylum, family, genus and species. At the phylum level, *Firmicutes* was detected at the highest rate in severe and non-severe COVID-19 patient groups, while *Bacteroidetes* phylum was found to be the highest in the control group. It was observed that the *Firmicutes* / *Bacteriodes* ratio tended to decrease as the severity of the disease increased. When the intestinal microbiota compositions of the study groups were examined at the family level, the *Lachnospiraceae* family is significantly reduced in COVID-19 patients compared to healthy controls. It was determined that the Gemmiger genus was significantly higher in the COVID-19 patient group compared to the healthy controls. At the species level, the tendency of *G.formicilis* to increase in patient groups in proportion to the severity of the disease was found to be statistically significant.

The composition of the gut microbiota is highly heterogeneous among human populations, and the changes reported in our study may not necessarily adapt to COVID-19 patients from other biogeographies. However, revealing the composition of the microbiota and its metabolic products in different populations in the context of COVID-19 will help identify new biomarkers of the disease and identify new therapeutic targets. While developing treatments and vaccines for COVID-19 is of primary importance, it is also wise to use the gut microbiota for disease prevention and management.

Keywords: COVID-19, Microbiota, Sequencing

EKLER

Evrak Tarih ve Sayısı: 27/11/2020-E.96764



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Yerel Etik Kurulu

Sayı : 70632468-050.01.04/
Konu : Kararlar

Sayın Prof. Dr. Uğur ARSLAN

23.11.2020 Tarihli "COVID-19 hastalarının bağırsak mikrobiyota profillerinin araştırılması" başlıklı araştırma projeniz, 25.11.2020 tarihli Yerel Etik Kurul Toplantısı'nda görüşülmüş olup; kurulun konu ile ilgili 2020/535 sayılı kararı ekte sunulmuştur. Bilgilerinizi rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. İnci KARA
Başkan

Ek : Karar sureti





T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2020/23

Toplantı Tarihi : 25.11.2020

Karar Sayısı 2020/535 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı öğretim üyesi Prof.Dr.Uğur ARSLAN'ın "COVID-19 hastalarının bağırsak mikrobiyota profillerinin araştırılması" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 23.11.2020 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Prof.Dr.Uğur ARSLAN'ın "COVID-19 hastalarının bağırsak mikrobiyota profillerinin araştırılması" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.

Yardımcı Araştırmacılar: Hatice ERDEM, Salih MAÇIN, Ecem Narin ÇOPUR, Dilek ERGÜN, Hatice TÜRK DAĞI.

NOT: 3359 sayılı Sağlık Hizmetleri Temel Kanunu Ek 10.madde hükümleri uyarınca; bazı çalışmalar için etik kurul onayı alındıktan sonra, Sağlık Bakanlığı veya bağlı kuruluşlarından (çalışmanın yapılacağı kurum) izin alınması zorunlu olduğundan araştırmacıların bu hususa dikkat etmeleri gerekmektedir.