

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



AZİTROMİSİNİN SUB-MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ
Bordetella pertussis TOHAMA-I ÜZERİNDEKİ *İN VİTRO* ETKİLERİ

Eda DELİK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



AZİTROMİSİNİN SUB-MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ
Bordetella pertussis TOHAMA-I ÜZERİNDEKİ *İN VİTRO* ETKİLERİ

Eda DELİK

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2023

ANTALYA

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**AZİTROMİSİNİN SUB-MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ
Bordetella pertussis TOHAMA-I ÜZERİNDEKİ *İN VİTRO* ETKİLERİ**

**Eda DELİK
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2021-5606 nolu proje ve TÜBİTAK-KBAG tarafından 121Z656 nolu proje ile kısmen desteklenmiştir.

HAZİRAN 2023

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AZİTROMİSİNİN SUB-MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ
Bordetella pertussis TOHAMA-I ÜZERİNDEKİ *İN VİTRO* ETKİLERİ

Eda DELİK
BIYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez 16/06/2023 tarihinde jüri tarafından Oybirliği ile kabul edilmiştir.

Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK (Danışman)



Prof. Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ



Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK



ÖZET

AZİTROMİSİNİN SUB-MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONLARININ *Bordetella pertussis* TOHAMA-I ÜZERİNDEKİ *İN VİTRO* ETKİLERİ

Eda DELİK

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

HAZİRAN 2023; 66 sayfa

Bordetella pertussis boğmaca hastalığının ana etkenidir ve bilindiği kadarıyla insandan başka konağı yoktur. Bu bakteri enfekte ettiği konağın akciğerleri ve hava yollarına yerleşir ve yüksek bulaşıcılığa sahiptir. Hastalığın neden olduğu oksijen eksikliği beyinde hasara yol açabilir ve özellikle bir yaşın altındaki bebeklerde bu durum ölümcül olabilmektedir. Genel olarak çocukluk çağı hastalığı olarak tanımlanır ancak ergen ve yetişkinlerde de hafif semptomlarla sürekli olan öksürük belirtileriyle yaygın olarak ortaya çıkabilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (DSÖ) verilerine göre 2018 yılında dünya çapında 151,000'den fazla boğmaca vakası olduğu kaydedilmiştir. 1974 yılında başlatılan Genişletilmiş Bağışıklama Programı (GBP) ve 1980'li yıllarda başlayan Ulusal Aşı Kampanyası ile hastalığın sıklığı önemli ölçüde azaltılmıştır. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalar yaygın aşılama rağmen boğmaca vakalarının yeniden arttığını göstermektedir.

Boğmacayla mücadelede antibiyotikler yaygın olarak kullanılır ve klinikte makrolid tipi antibiyotikler en çok tercih edilen antibiyotik grubu olmaktadır. Bu tez çalışmasında da makrolid grubu antibiyotiklerden olan azitromisinin *B. pertussis* Tohama-I suşuna karşı sub-MİK dozları belirlenmiştir ve bu dozların bakterinin büyüme hızına, biyofilm oluşturma kabiliyetine ve iki önemli virülans faktörlerinden olan *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyonuna olan etkisi araştırılmıştır. Azitromisinin MİK değeri sıvı dilüsyon yöntemiyle 0.08 µg/ml olarak belirlenmiştir ve MİK'in 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 oranlarının bakterinin büyüme hızına olan etkisi araştırılmıştır. Bakteri hücreleri antibiyotiğin 1/2, 1/4 ve 1/8 sub-MİK dozlarını tolere edemediğinden hücre büyümesi deneyler için yetersiz kalmıştır. Bu nedenle Tohama-I için azitromisinin sub-MİK dozları 1/16, 1/32 ve 1/64 olarak belirlenmiştir. Bu dozların bakterinin biyofilm oluşturabilme yeteneğine olan etkisi 96'lı hücre kültürü plağı kullanılarak belirlenmiştir. Gen ekspresyonlarına olan etkisi ise gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile analiz edilmiştir. Bakterilerin antibiyotik dozunun artmasına paralel olarak biyofilm oluşturabilme yetenekleri azalmıştır. Ancak *ptxS1* ve *prn* ekspresyon seviyelerinin artışı veya azalışı antibiyotik dozunun artışıyla paralellik göstermemiştir. MİK/32 azitromisin konsantrasyonunda her iki genin de ekspresyon seviyelerinin kontrole göre arttığı görülmüştür. MİK/16 ve MİK/64 ise *ptxS1* ekspresyonunu kontrole göre azaltırken *prn* ekspresyonunu arttırmıştır. Fakat antibiyotik dozlarının genlerin ekspresyonu üzerindeki

etkilerinin kontrolle kıyaslandığında istatistiksel olarak önemli olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Literatürde sub-MİK antibiyotik dozlarının *B. pertussis* hücrelerine olan etkileriyle ilgili yeterli ve yaygın çalışmalar mevcut değildir. Bu çalışma sub-MİK antibiyotik dozlarının *B. pertussis*'e karşı etkilerinin belirlenmesi açısından azitromisin özelinde gerçekleştirilen ilk çalışmadır. Ayrıca azitromisinin boğmaca tedavisinde yaygın olarak kullanılması göz önüne alındığında, bu çalışmadan elde edilen sonuçlar antibiyotiğin bakteri hücresine olan etkilerinin belirlenmesi ve bakteri-konak hücre ilişkisindeki rolünün anlaşılabilmesi açısından daha sonra yapılacak olan çalışmalar için önem arz etmektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Azitromisin, Biyofilm, Boğmaca, *Bordetella pertussis*, Büyüme eğrisi, Gen ekspresyonu, Pertaktin, Pertussis toksin.

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Prof. Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ

Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

ABSTRACT

IN VITRO EFFECTS OF SUB-MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATIONS OF AZITHROMYCIN ON *Bordetella pertussis* TOHAMA-I

Eda DELİK

MSc Thesis in Biology

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

JUNE 2023; 66 pages

Bordetella pertussis is the primary causative agent of whooping cough (pertussis) and is known to infect only humans. This bacterium colonizes the lungs and respiratory tract of the infected host and exhibits high contagiousness. The lack of oxygen caused by the disease can lead to brain damage that can be fatal, especially in infants under one year of age. Although whooping cough is primarily known as a childhood disease, it can also occur in adolescents and adults with mild symptoms such as a persistent cough. According to the World Health Organization (WHO), there were over 151,000 reported cases of pertussis worldwide in 2018. Despite widespread vaccination efforts, recent studies indicate a resurgence in pertussis cases.

Antibiotics, particularly macrolide antibiotics, are commonly used in the clinic to control pertussis. This thesis study focused on azithromycin, a macrolide antibiotic, and aimed to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) dose against the *B. pertussis* Tohama-I strain. Additionally, the study investigated the effects of the sub-MIC doses on bacterial growth rate, biofilm formation capacity, and expression of two critical virulence factors: *ptxS1* and *prn* genes. The minimum inhibitory concentration (MIC) of azithromycin was determined to be 0.08 µg/ml using the broth dilution method. Subsequently, the effects of MIC ratios of 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, and 1/64 on bacterial growth rate were investigated. However, due to insufficient cell growth, the experiments could not be performed for sub-MIC doses of 1/2, 1/4, and 1/8. Therefore, the sub-MIC doses of azithromycin against the Tohama-I strain were set at 1/16, 1/32, and 1/64. To evaluate the effects of these doses on bacterial biofilm formation, a 96-well cell culture plate was used. In addition, gene expression was analyzed using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The ability of bacteria to form biofilms decreased proportionally with increasing antibiotic dose. However, the expression levels of *ptxS1* and *prn* genes did not exhibit a direct correlation with the escalating antibiotic dose. Specifically, it was observed that the expression levels of both genes increased at azithromycin concentration of MIC/32 compared with control. Conversely, at MIC/16 and MIC/64, the expression of *ptxS1* decreased, whereas the expression of *prn* increased compared with the control. Nevertheless, the effects of antibiotic doses on gene expression were statistically insignificant compared to control ($p > 0.05$).

There are not adequate and widespread studies on the effects of sub-MIC antibiotic doses on *B. pertussis* in the literature. The present study is the first to specifically address the effects of sub-MIC antibiotic doses using azithromycin against *B. pertussis*. Considering the widespread use of azithromycin for pertussis treatment, the results of this study will provide valuable insight into the effects of the antibiotic on bacterial cells and improve our understanding of the relationship between bacteria and host cells.

KEYWORDS: Azithromycin, Biofilm, *Bordetella pertussis*, Gene expression, Growth curve, Pertactin, Pertussis toxin, Whooping cough.

COMMITTEE: Asst. Prof. Dr. Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Prof. Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ

Assoc. Prof. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

ÖNSÖZ

Çocukluk çağı dönemi, insanların bulaşıcı hastalıklara en sık yakalandıkları dönemdir. Bu hastalıklar genellikle ağız, burun, göz salgıları, solunum yolu damlacıklarıyla bulaşabilmektedir. Boğmaca, çocukluk çağı dönemlerinde görülen bulaşıcı hastalıklardan biridir. Bu hastalık, insandan insana hava yoluyla bulaşan, genellikle bir yaşın altındaki bebeklerde daha sık görülen, birçok komplikasyonlara (zatürre, havale gibi) sebebiyet veren ve özellikle bebeklerde hayati tehlike yaratan sadece insan patojeni olan *B. pertussis*'in neden olduğu bakteriyel akut solunum yolu hastalığıdır. Hastalığın tedavisinde antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak *B. pertussis*'in antibiyotik duyarlılığı için yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır ve bu bakterinin antibiyotik duyarlılığı için kabul edilmiş standartlar yoktur. Ayrıca antibiyotiklerin *B. pertussis*'e karşı etkilerine ilişkin raporlar farklılık göstermektedir ve boğmaca tedavisinde yaygın olarak kullanılan azitromisin antibiyotiğinin sub-minimum inhibitör konsantrasyonlarının (sub-MİK) *B. pertussis* hücrelerine olan etkilerine ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Antibiyotiklerin sub-MİK dozları bakteri hücrelerinin üremesini, morfolojisini, virülansını, gen ekspresyonlarını ve dolayısıyla ilgili antibiyotiğe karşı direnç geliştirebilmesini etkileyen dozlardır. Antimikrobiyal ajanların sub-MİK değerlerinin bakteri hücrelerine olan etkilerinin belirlenmesi tedavide en uygun dozun saptanmasını sağlayan yeni terapötik stratejilerin geliştirilebilmesi açısından oldukça önem arz etmektedir.

Bu tez çalışmasında klinikte boğmaca hastalığına karşı yaygın olarak kullanılan azitromisin antibiyotiğinin sub-MİK dozlarının hastalığın ana etkeni olan *B. pertussis* hücrelerine olan etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Bu bağlamda sub-MİK dozlardaki azitromisinin *B. pertussis*'in büyüme hızına, biyofilm oluşturabilme kapasitesine ve enfekte ettiği konakta boğmacanın oluşmasında etkili rol alan virülans faktörlerinden pertussis toksin ile pertaktin genlerinin ekspresyonlarına olan etkisi belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki azitromisinin sub-MİK dozları *B. pertussis*'in büyüme ve biyofilm oluşturabilme kapasitesinde anlamlı derecede yavaşlama sağlayabilmektedir. *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyelerine olan etkisi incelendiğinde ise; her iki genin de MİK/32 antibiyotik dozunda kontrole göre daha fazla ifade edilmesi, MİK/16 ve MİK/64 dozlarda ise *ptxS1*'in kontrole göre daha az ifade edilirken *prn*'nin daha fazla ifade edilmesi azitromisinin sub-MİK dozlarının *B. pertussis* hücreleri üzerinde farklı etkilerinin olduğunu göstermektedir.

Azitromisin antibiyotiği özelinde gerçekleştirilen bu tez çalışması, sub-MİK dozların *B. pertussis*'e olan etkilerinin incelenmesi açısından ilk çalışma niteliğindedir. *B. pertussis*, laboratuvar koşulları altında çalışılması oldukça zahmetli, büyük sabır gerektiren hassas bakteri hücreleridir. Bu son derece küçük hücrelerin nazı ile geçen tez çalışmamın büyük bir aşaması Akdeniz Üniversitesi Biyoloji Bölümü Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda, RT-PCR analizleri ise Akdeniz Üniversitesi Gıda ve Tarımsal Araştırmalar Merkezi Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarını büyük bir zevkle, ilgiyle, merakla ve yeni tecrübeler edinerek tamamladığım tez için çalışma olanağı sağlayan, tez konumun belirlenmesinde ve çalışmalarımın her aşamasında ilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi birikimi ve tecrübeleriyle beni yönlendiren, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum değerli Akademik Danışman Hocam Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK'e (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü) sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim. Ayrıca

değerli hocam Sayın Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK'e (Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü) özellikle gen ekspresyonları analizleri sırasındaki ilgi ve desteklerinden ötürü sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bana sadece bu tez çalışmamda değil tüm öğrenim sürem boyunca destek olan, her zorluğun üstesinden birlikte geldiğimiz, kardeşim olarak da nitelendirebileceğim değerli arkadaşım Uzman Biyolog Berfin EROĞLU'na, tezim süresince bana olan destekleri ve dostluklarından ötürü Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarı yüksek lisans öğrencileri Fikriye Mehtap ŞEN ve Yasemin GAYA'ya, bana bu çalışmanın dostluğunu kazandırdığı Ayşe ACAR'a, sohbetiyle farklı fikir ve bakış açılarıyla bana katkılarından dolayı Uzman Biyolog Mertcan GÜLBEN'e, sadece tez çalışmam için olmamakla beraber genel olarak benden yardımlarını esirgemeyen güler yüzlü, yardımsever ve iyi niyetli kişiliğiyle tecrübelerini benle her zaman paylaşan Dr. M. Cihan AYDEMİR'e teşekkür ederim. Ayrıca paha biçilmez desteklerinden ötürü Biyomühendis Ahmet Buğra ÖZDEMİR'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (Proje kodu: FYL-2021-5606) ve kısmen destekleyen TÜBİTAK-KBAG'a (proje kodu: 121Z656), ayrıca bursiyer olarak desteğini gördüğüm TÜBİTAK 2210-A program kodlu Genel Yurt İçi Yüksek Lisans Burs Programına teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, bu günlere gelebilmemdeki en büyük destekçilerim olan, benden sevgi ve desteklerini hiçbir zaman eksik etmeyen, hayattaki en büyük şansım olan ailem, annem Nimet DELİK, babam Ahmet DELİK, abim Onur DELİK ve kardeşim Ela DELİK'e teşekkür etmeyi bir borç bilirim. İyi ki varsınız ve iyi ki benimlesiniz. Bu yüksek lisans tez çalışmamı size ve sevdiklerimize ithaf ediyorum.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iii |
| ÖNSÖZ | v |
| AKADEMİK BEYAN | x |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xi |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | xiv |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | xvii |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. KAYNAK TARAMASI..... | 5 |
| 2.1 <i>Bordetella</i> | 5 |
| 2.2 <i>Bordetella pertussis</i> | 7 |
| 2.3 <i>B. pertussis</i> 'in Virülans Faktörleri | 9 |
| 2.3.1 Adezinler | 10 |
| 2.3.1.1 Filamentöz hemaglutinin (Fha) | 10 |
| 2.3.1.2 Fimbriya (Fim) | 11 |
| 2.3.1.3 Pertaktin (Prn) | 11 |
| 2.3.1.4 Serum direnç proteini (BrkA) | 12 |
| 2.3.1.5 Trakeal kolonizasyon faktörü (Tcf)..... | 12 |
| 2.3.2 Toksinler..... | 12 |
| 2.3.2.1 Pertussis toksini (Pt) | 12 |
| 2.3.2.2 Adenilat siklaz toksin (CyaA) | 13 |
| 2.3.2.3 Trakeal sitotoksin (Tct)..... | 14 |
| 2.3.2.4 Dermonekrotik toksin (DNT)..... | 14 |
| 2.3.2.5 Lipooligosakkarit tabaka (LOS)..... | 15 |
| 2.4 <i>Bordetella</i> virülans gen (Bvg) Sistemi | 15 |
| 2.5 <i>B. pertussis</i> ve Biyofilm..... | 16 |
| 2.6 Boğmaca | 17 |
| 2.7 Boğmaca Tedavisi | 20 |
| 2.8 Boğmacaya Karşı Aşılama ve Bağışıklık | 21 |
| 2.9 Boğmacaya Karşı Yeni Aşı Stratejileri..... | 23 |
| 2.10 Türkiye'de Boğmaca | 24 |

| | |
|--|----|
| 3. MATERYAL VE METOT..... | 27 |
| 3.1. Kullanılan Bakteri Suşu | 27 |
| 3.2. Azitromisinin MİK Değerinin Belirlenmesi | 27 |
| 3.3. Azitromisinin Sub-MİK Dozlarının <i>B. pertussis</i> 'in Büyüme Hızına Etkisinin Belirlenmesi | 27 |
| 3.4. Azitromisinin Sub-MİK Dozlarının <i>B. pertussis</i> 'in Biyofilm Oluşturma Kapasitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi | 28 |
| 3.5. Azitromisinin Sub-MİK Dozlarının <i>B. pertussis</i> 'in Gen Ekspresyonlarına Etkisinin Belirlenmesi | 28 |
| 3.5.1. <i>B. pertussis</i> hücrelerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi | 28 |
| 3.5.2. Spesifik primerlerin özgüllük testi için geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri | 29 |
| 3.5.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri (RT-PCR) | 31 |
| 3.6. İstatistiksel Analizler | 32 |
| 4. BULGULAR | 33 |
| 4.1 Azitromisinin MİK Değerinin Belirlenmesi | 33 |
| 4.2 Azitromisinin Sub-MİK Dozlarının <i>B. pertussis</i> 'in Büyüme Hızına Etkisinin Belirlenmesi | 33 |
| 4.3 Azitromisinin Sub-MİK Dozlarının <i>B. pertussis</i> 'in Biyofilm Oluşturma Kapasitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi | 34 |
| 4.4 Azitromisinin Sub-MİK Dozlarının <i>B. pertussis</i> 'in Gen Ekspresyonlarına Etkisinin Belirlenmesi | 35 |
| 4.4.1. <i>B. pertussis</i> hücrelerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi | 35 |
| 4.4.2. Spesifik primerlerin özgüllük testi için geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri | 36 |
| 4.4.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri (RT-PCR) | 36 |
| 4.4.3.1. <i>rpoB</i> gen ifadesi bulguları..... | 36 |
| 4.4.3.2. <i>ptxS1</i> gen ifadesi bulguları..... | 37 |
| 4.4.3.3. <i>prn</i> gen ifadesi bulguları | 38 |
| 4.4.3.4. Azitromisinin sub-MİK dozlarının <i>ptxS1</i> ve <i>prn</i> ekspresyonlarına etkisinin belirlenmesi | 40 |
| 5. TARTIŞMA..... | 43 |


| | |
|-------------------|----|
| 6. SONUÇLAR..... | 48 |
| 7. KAYNAKLAR..... | 49 |
| 8. EKLER..... | 65 |
| ÖZGEÇMİŞ | |

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Azitromisinin sub-minimum inhibitör-konsantrasyonlarının *Bordetella pertussis* Tohama-I üzerindeki *in vitro* etkileri” adlı bu çalışmanın, akademik kurallar ve etik değerlere uygun olarak yazıldığını belirtir, bu tez çalışmasında bana ait olmayan tüm bilgilerin kaynağını gösterdiğimi beyan ederim.

16/06/2023

Eda DELİK



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

| | |
|--------------------|---|
| μg | : Mikrogram |
| ml | : Mililitre |
| $\mu\text{g/ml}$ | : Bir ml solüsyonda μg cinsinden bulunan madde miktarı |
| mg | : Miligram |
| l | : Litre |
| mg/l | : Bir litre solüsyonda mg cinsinden bulunan madde miktarı |
| μm | : Mikrometre |
| μl | : Mikrolitre |
| nm | : Nanometre |
| ml | : Mililitre |
| mm | : Milimetre |
| mM | : Milimolar |
| M | : Molar |
| . | : Ondalık ayracı (nokta) |
| $^{\circ}\text{C}$ | : Santigrat derece |
| \pm | : Standart sapma |
| % | : Yüzde |
| / | : Bölme |
| <, > | : Küçüktür, Büyüktür |

Kısaltmalar

| | |
|------------|--------------------------|
| 16S rRNA | : 16S ribozomal RNA |
| 23S rRNA | : 23S ribozomal RNA |
| AST / CyaA | : Adenilat siklaz toksin |

| | |
|---------------------|--|
| ABD | : Amerika Birleşik Devleti |
| ADP | : Adenozin difosfat |
| aP | : Aselüler boğmaca aşısı |
| ATP | : Adenozin trifosfat |
| bç | : Baz çifti |
| <i>B. pertussis</i> | : <i>Bordetella pertussis</i> |
| BPZE1 | : Canlı, zayıflatılmış <i>Bordetella pertussis</i> suşu |
| BrkA | : Serum direnç proteini |
| Bvg | : <i>Bordetella virülans</i> gen sistemi |
| cAmp | : Siklik adenozin monofosfat |
| cDNA | : Komplementer DNA |
| CLSI | : Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CR3 | : Kompleman reseptör 3 |
| CRD | : C-tipi karbonhidrat tanıma alanı |
| Ct | : Döngü eşiği (Treshold Cycle) |
| DB | : Difteri, Boğmaca Aşısı |
| dH ₂ O | : Distile su |
| DMV | : Dış membran vezikül |
| DNaz | : Deoksiribonükleaz |
| DNT | : Dermonekrotik toksin |
| DSÖ | : Dünya Sağlık Örgütü |
| DTaP | : Difteri, tetanoz ve aselüler boğmaca aşısı |
| DTaP-IPV-Hib | : Difteri, tetanoz, aselüler boğmaca - İnaktive poliovirüs - Haemophilus b kombinasyon aşısı |
| DTP3 | : Difteri, Tetanos, Tam Hücreli Boğmaca Aşısı ile 3 kez Aşılama |
| DTwP | : Difteri, Tetanos, Tam Hücreli Boğmaca Aşısı |
| eDNA | : Çevresel DNA (environmental DNA) |

| | |
|-------------------|--|
| FHA | : Filamentöz hemagglütinin |
| Fim | : Fimbriya |
| GTP | : Guanozin trifosfat |
| gDNA | : genomik DNA (Deoksiribo nükleik asit) |
| kDa | : Kilodalton |
| LPS | : Lipopolisakkarit |
| MgSO ₄ | : Magnezyum sülfat |
| NaCl | : Sodyum klorür |
| NCBI | : Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (National Center for Biotechnology Information) |
| PtxS1 | : Pertussis toksin S1 alt birimi |
| Prn | : Pertaktin |
| Pt | : Pertussis toksin |
| PCR | : Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RT-PCR | : Gerçek zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| RGD | : Arjinin-Glisin-Aspartat motifi |
| Rho | : Ras homoloji |
| RNA | : Ribonükleik asit |
| RpoB | : RNA polimeraz B altbirim |
| SPSS | : Statistical Program in Social Sciences |
| Sub-MİK | : Sub-Minimal İnhibitör Konsantrasyonu |
| TcfA | : Trakeal kolonizasyon faktörü |
| Tm | : Erime derecesi |
| UNICEF | : Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu (United Nations Children's Fund) |
| wP | : Tam hücreli boğmaca aşısı |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. Antibiyotiklerin klinik, tarım, ilaç endüstrisi, su kaynakları ve ürünleri arasındaki döngüsü bakterilerin sürekli sub-MİK dozlardaki antibiyotiklere maruz kalmasına neden olmaktadır (Andersson ve Hughes 2014)..... | 2 |
| Şekil 1.2. Azitromisin antibiyotiğinin kimyasal yapısı (Mutak 2007) | 3 |
| Şekil 2.1. <i>Bordetella</i> türlerinin 16S rRNA gen dizilerine dayalı filogenetik ilişkileri (Ivanov vd. 2016)..... | 5 |
| Şekil 2.2. <i>B. bronchiseptica</i> 'dan <i>B. pertussis</i> 'in evrimi (Guiso 2015) | 7 |
| Şekil 2.3. Bakterilerin çevresel mikroorganizmalardan insana spesifik patojenlere evrimi a) amiplerin besin kaynağı olarak kullandıkları çevresel bakteriler; b) bakterilerin zamanla sindirilmeye direnç ve yeni ökaryotik konakçı ile etkileşime girme yeteneği geliştirmesi; c) hayvan patojenlerine evrimleşen ve amiplerle etkileşime girip bunları kullanabilen bakterilerin gelişimi; d) belirli bir konağa adapte olan bakteriyel patojenler predasyona direnme ve daha düşük ökaryotlarla etkileşime girme yeteneklerini kaybederler (Taylor-Mulneix vd. 2017)..... | 7 |
| Şekil 2.4. <i>B. pertussis</i> 'in gram boyama görüntüsü | 8 |
| Şekil 2.5. <i>B. pertussis</i> hücrelerinin a) Borget Gengou ve b) Cohen-Wheeler katı besiyerlerindeki morfolojisi (Mughal vd. 2011) | 8 |
| Şekil 2.6. <i>B. pertussis</i> 'in virülans faktörleri (Anonim) | 10 |
| Şekil 2.7. <i>Bordetella</i> biyofilm oluşumunun çeşitli aşamalarında farklı faktörlerin rolleri (Cattelan vd. 2016) | 17 |
| Şekil 2.8. <i>B. pertussis</i> ile enfekte olan konakta boğmaca hastalığının oluşma aşamaları (Guiso 2015)..... | 18 |
| Şekil 2.9. Boğmacanın farklı evreleri, bu evrelere göre kullanılacak biyolojik tanımlar ve hastalığın klinik seyrine karşı günlük öksürük nöbetlerinin sıklığının şematik gösterimi (Guiso 2015)..... | 19 |
| Şekil 2.10. ABD'de 1990'dan 2019'a kadar yaş gruplarına göre bildirilen boğmaca oranları. 1 yaşın altındaki bebekler bildirilen en yüksek boğmaca oranına sahip yaş grubu olmaya devam etmektedir (CDC) | 20 |
| Şekil 2.11. 1980–2018 yılları arasında boğmacanın küresel yıllık bildirilen vakaları ve aşı kapsamı. Sütunlar, küresel olarak rapor edilen boğmaca vakalarının sayısını | |

| | |
|--|----|
| göstermektedir. Aşılama kapsamı için, mavi çizgi resmi kapsamını, kırmızı çizgi DSÖ-UNICEF tahminlerini göstermektedir (Jog vd. 2022) | 22 |
| Şekil 2.13. DSÖ verilerine göre 1980- 2019 yılları arasında Türkiye’de bildirilen boğmaca vaka sayıları (WHO)..... | 25 |
| Şekil 2.14. DSÖ verilerine göre 2000- 2019 yılları arasında Türkiye’de boğmacaya karşı gerçekleştirilen aşılama oranları (WHO)..... | 26 |
| Şekil 4.1. Sub-MİK değerlerde azitromisin Tohama-I suşunun büyüme hızına olan etkisi. Veriler üç tekrarın ortalama absorbans \pm standart sapması olarak ifade edilmiştir (Kontrol: Antibiyotiksiz bakteri kültürü, A: Azitromisin)..... | 33 |
| Şekil 4.2. Azitromisinin sub-MİK’lerinin Tohama-I’in biyofilm oluşturabilme kapasitesine olan etkisi. Veriler üç tekrarın ortalama absorbans \pm standart sapması olarak ifade edilmiştir (Kontrol: Antibiyotiksiz bakteri hücreleri, A: Azitromisin, üst simgelerde yer alan harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı temsil etmektedir (p <0.05))..... | 34 |
| Şekil 4.3. Azitromisin varlığında ve yokluğunda büyütülen <i>B. pertussis</i> Tohama-I suşundan izole edilen RNA’ların agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, K: Antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücreleri, A: Azitromisin)..... | 35 |
| Şekil 4.4. Spesifik primerler için cDNA’larla gerçekleştirilen PCR’ye ait agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, K: Antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücreleri, A: Azitromisin, <i>ptxS1</i> : pertussis toksin S1 alt birimi, <i>rpoB</i> : RNA polimeraz B altbirim, <i>prn</i> : pertaktin)..... | 36 |
| Şekil 4.5. <i>rpoB</i> geni için oluşturulan standartlara ait RT-PCR verileri; a) standartların gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; b) standartların erime eğrileri; c) standart eğri | 37 |
| Şekil 4.6. <i>rpoB</i> geni RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, S: Standart) | 37 |
| Şekil 4.7. <i>ptxS1</i> geni için oluşturulan standartlara ait RT-PCR verileri; a) standartların gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; b) standartların erime eğrileri; c) standart eğri | 38 |
| Şekil 4.8. <i>ptxS1</i> geni RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, S: Standart) | 38 |
| Şekil 4.9. <i>prn</i> geni için oluşturulan standartlara ait RT-PCR verileri; a) standartların gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; b) standartların erime eğrileri; c) standart eğri | 39 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.10. <i>prn</i> geni RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, S: Standart) | 39 |
| Şekil 4.11. Antibiyotikli/antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücrelerinin <i>ptxS1</i> ve <i>prn</i> gen ekspresyonlarının RT-PCR analizleri; a) <i>ptxS1</i> ve <i>rpoB</i> 'ye ait gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; b) <i>ptxS1</i> ve <i>rpoB</i> 'ye ait erime eğrileri; c) <i>prn</i> ve <i>rpoB</i> 'ye ait gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; d) <i>prn</i> ve <i>rpoB</i> 'ye ait erime eğrileri | 40 |
| Şekil 4.12. Antibiyotikli/antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücrelerinin <i>rpoB</i> , <i>ptxS1</i> ve <i>prn</i> genlerine ait RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M: DNA Merdiveni, K: Antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücreleri, A: Azitromisin, NT: şablonsuz kontrol, <i>rpoB</i> : RNA polimeraz B altbirim, <i>ptxS1</i> : pertussis toksin S1 alt birimi, <i>prn</i> : pertaktin)..... | 41 |
| Şekil 4.13. Azitromisinin sub-MİK dozlarının <i>B. pertussis</i> Tohama-I'in gen ekspresyonlarına olan etkisi. Veriler gen ekspresyonunun ortalama \pm standart sapması olarak ifade edilmiştir (Kontrol: Antibiyotiksiz bakteri hücreleri, A: Azitromisin, üst simgelerde yer alan farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı temsil etmektedir ($p < 0.05$))..... | 42 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Çizelge 2.1. <i>Bordetella</i> türlerinin ilişkili oldukları konakçı organizmalar ve neden oldukları hastalıklar (Rivera vd. 2020) | 6 |
| Çizelge 3.1. Hedef gen bölgeleri için sentezlenen primerler ve amplikon boyutları | 30 |
| Çizelge 3.2. Geleneksel PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı | 30 |
| Çizelge 3.3. Hedef gen bölgelerinin çoğaltılabilmesi için ayarlanan geleneksel PCR koşulları..... | 30 |
| Çizelge 3.4. RT-PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı | 31 |
| Çizelge 3.5. Hedef gen bölgelerinin çoğaltılabilmesi için ayarlanan RT-PCR koşulları | 31 |
| Çizelge 4.1. İzole edilen RNA örneklerinin absorbans değerleri ve konsantrasyonları . | 35 |
| Çizelge 4.2. Sub-MİK azitromisin varlığında <i>ptxS1</i> ve <i>prn</i> genlerinin ekspresyonlarındaki kat değişimlerinin hesaplanması..... | 41 |

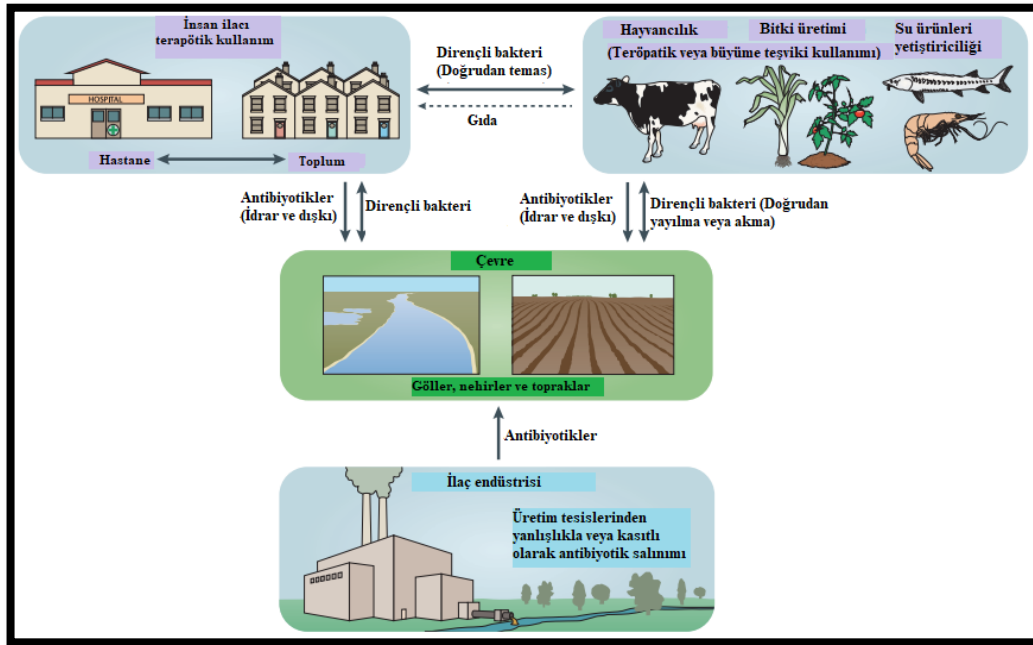
1. GİRİŞ

Bordetella pertussis, aerobik, spor oluşturmamayan, Gram negatif, insan patojeni bir kokobasildir (Wood ve McIntyre 2008). İnsan solunum sisteminde trake ve bronşların epitel yüzeylerine tutunarak hızla çoğalmaktadır ve bir akut solunum yolu hastalığı olan boğmaca hastalığına (pertussis) neden olmaktadır (Turan 2004; Mattoo ve Cherry 2005; Öztürk 2020). Bu hastalık herhangi bir yaşta ortaya çıksa da dünya çapında özellikle yeni doğanlar olmak üzere bir yaşın altındaki çocuklarda ölüme neden olan ilk on enfeksiyon hastalığı arasında yer almaktadır (Öksüz vd. 2017; Abu-Raya 2020).

Dünya genelinde uygulanan aşılama programlarıyla özellikle bebek ve infantlarda görülme sıklığında önemli ölçüde bir azalma sağlansa da hastalık yüksek aşılama oranına sahip ülkelerde bile halen görülmektedir (Öksüz vd. 2017; Macina ve Evans 2021). Boğmacaya karşı ilk aşılama genellikle yeni doğanlarda ikinci ayın sonunda başlamakta ve birçok ülkede yaşamın ilk yılında üç doz difteri-tetanoz-boğmaca (DTP3) aşısının %85 oranında uygulanması tamamlanmaktadır. Ayrıca çoğu ülkenin ulusal bağışıklama programlarında okul öncesinde ve ergenlikte olmak üzere birer tane güçlendirici doz uygulanmaktadır (Macina ve Evans 2021). Ancak yapılan yaygın aşılamalara rağmen boğmaca vakalarının 3-4 yılda bir artış göstererek küresel olarak devam ettiği görülmektedir (Kurugöl 2011; Yasui vd. 2018; Bento vd. 2019). Bu hastalığın ergen ve yetişkinlerde teşhisi hafif semptomlu solunum yolu hastalığı ile karıştırıldığı için yeterince tanınmamaktadır. Toplum yüksek aşılanma oranına sahip de olsa zamanla aşı bağışıklığı azaldığından eğer ergen ve erişkinlerde aşılanma yapılmazsa bu durum boğmacaya karşı korunmasız yetişkinlerden oluşan bir popülasyona yol açarak enfeksiyon için rezervuar oluşturmaktadır (Cagney vd. 2005). Ayrıca aşılanma oranının yüksek olduğu birçok ülkede bile bildirilen boğmaca vakalarının sıklığı, bebek ve okul öncesi çocuklardan ergenlerle yetişkinlere doğru kaymıştır (Esposito ve Principi 2016; Macina ve Evans 2021). Ergen ve yetişkinler arasında boğmaca kaynaklı hafif enfeksiyon riskinin artması, hastalığın bebeklerde ortaya çıkmasının başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir (Esposito ve Principi 2016). Hastalığın epidemiler şeklinde ve erişkinlerde de yaygın olarak görülmeye başlanmasıyla, boğmaca bağışıklığı, aşılarla kullanılan *B. pertussis* suşlarının antijenik özellikleriyle genetik ve yapısal komponentlerinin polimorfizm yönünden araştırılmasıyla ilgili çalışmalar hız kazanmıştır.

Boğmaca gibi birçok bakteriyel enfeksiyon kaynaklı hastalıkların tedavisinde ve salgınların önlenmesinde antibiyotikler kullanılmaktadır. Ancak bilindiği üzere antibiyotiklerin yaygın kullanımı bakteri hücrelerinin antibiyotiklere karşı direnç gelişimini arttırabilmektedir. Artan bu antibiyotik direnci günümüzde halk sağlığını tehdit eden en büyük sorunlardan biri olarak kabul edilmektedir. Bilindiği üzere bakterilerin çevresel alanlarda maruz kaldıkları antibiyotik dozları daha düşükken klinikte karşılaştıkları antibiyotik dozları çok daha yüksektir (Sandegren 2019). Antimikrobialların hem tıbbi hem de tarımsal amaçlarla fazla miktarlarda kullanılması bakterilerin minimum inhibitör konsantrasyonundan (MİK) daha düşük dozlardaki antibiyotiklere (sub-MİK) sürekli ve sıklıkla maruz kalmasına neden olmaktadır (Liu vd. 2021) (Şekil 1.1). MİK, bakteri büyümesini engelleyen en düşük antibiyotik konsantrasyonudur (Kowalska-Krochmal ve Dudek-Wicher 2021). Sub-MİK dozlar ise bakteri üremesinin durdurulması üzerine etkileri olmayan ancak halen bakterilerin çeşitli biyokimyasal ve yüzey yapıları üzerine etkilerinin olduğu konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır (Demir vd. 2007). Antibiyotiklerin sub-MİK değerlerinin belirlenmesi

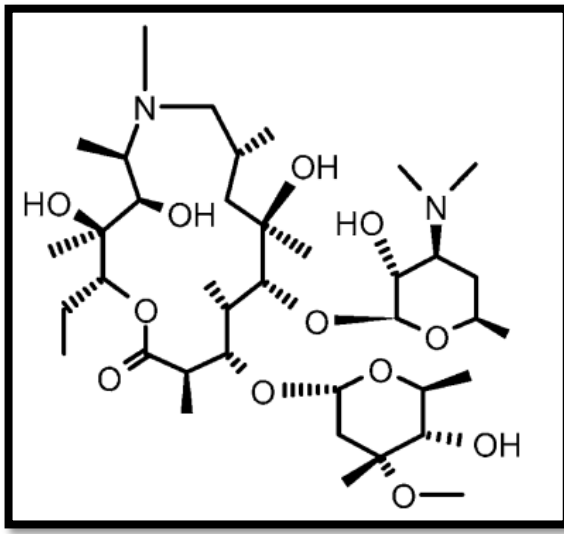
bakteri ile konağı arasındaki etkileşimleri netleştirilmek için önemlidir (Gümüş vd. 2018). Çünkü sub-MİK dozlar bakterinin konak hücre ile temasını etkileyebilmekte ve bakterinin virülans faktörlerine (fagositoz ve patojenite ile ilgili enzimlerin üretimi gibi) müdahale edebilmektedir (Soto vd. 2006). Antibiyotiklerin sub-MİK dozları doğada dirençli bakterilerin seçilmesinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. Bu dozlar fenotipik ve genotipik değişimlere özellikle bakteriyel virülans, biyofilm oluşumunda, gen ekspresyonunda, quorum algılama ve gen transferlerinde değişikliklere neden olabilmektedir. Ayrıca sinyal molekülleri olarak oto-indüktörlerin rollerini taklit ederek antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarının ortaya çıkışını hızlandırabilmektedir (Andersson ve Hughes 2014; Liu vd. 2021). Sub-MİK dozların bakteri virülans genleri üzerindeki etkileriyle ilgili gerçekleştirilen birçok çalışma vardır ve bu genlerin ifadelerindeki değişimleriyle ilgili raporlar bildirilmiştir (Subrt vd. 2011; Otto vd. 2013; Dhabaan vd. 2016). Bu nedenle sub-MİK'lerin bakteri virülansına olan etkilerinin belirlenmesi, ilgili patojene karşı yeni tedavi stratejilerinin geliştirilebilecek olması açısından önemlidir. Bu bağlamda hedef bakteriye karşı daha etkili alternatif ürünler geliştirilebilir, ayrıca antibiyotikleri daha etkili ve doğru kullanma yöntemleri belirlenerek belki de antimikrobiyal direncin azaltılması sağlanabilir (Liu vd. 2021).



Şekil 1.1. Antibiyotiklerin klinik, tarım, ilaç endüstrisi, su kaynakları ve ürünleri arasındaki döngüsü bakterilerin sürekli sub-MİK dozlardaki antibiyotiklere maruz kalmasına neden olmaktadır (Andersson ve Hughes 2014)

Boğmaca hastalığının görüldüğü tüm yaş grupları için yaygın olarak makrolid grubu antibiyotiklerden olan eritromisin kullanılmaktadır. Ancak hipertrofik pilor stenozu, kardiyak aritmisi ve ishal gibi yan etkilerinin olması kullanımıyla ilgili soru işaretleri oluştururken, uyumu ve etkinliğinin sınırlı olduğu ile ilgili bildirimler de mevcuttur (Langley vd. 2004; Patole vd. 2005; von König 2005; Munoz 2006). Bu nedenle azitromisin ve klaritromisin gibi diğer makrolid grubu antibiyotiklerin de boğmaca tedavisinde sıklıkla kullanıldığı bilinmektedir (Aoyama vd. 1996; Langley vd.

2004; von König 2005; Tapisiz ve Karli 2013). Bu tez çalışmasında kullanılan azitromisin, bakterinin protein sentezini engelleyen, biyofilm oluşumunu azaltan önemli antimikrobiyal etkilere sahip bir antibiyotiktir (Parnham vd. 2014). Eritromisinin intolerans, farmakokinetik ve sınırlı antimikrobiyal spektrumu gibi bazı eksiklerinin üstesinden gelebilmek için bir amino grubunun eritromisin halkasına eklenmesiyle türetilen yarı sentetik 15 üyeli lakton halkalı bir antibiyotiktir (Şekil 1.2). Bu antibiyotiğin lakton halkasına eklenen nitrojen doğrudan ribozoma bağlanmayı etkilemez, antibiyotiğin yeni temaslarını indükler, lakton halkasının konformasyonunu değiştirerek çift bağlı ribozom inhibisyonunu sağlamaktadır. Azitromisinin ribozoma birinci bağlanma bölgesi 23S rRNA'nın 4. ve 5. alanlarıyla etkileşmektedir. İkinci bağlanma bölgesi 23S rRNA'nın 2. alanı ve makrolid direncinde rol oynayan 2 ribozomal protein (L4 ve L22) ile etkileşime girmektedir (Schlünzen vd. 2003; Jelić ve Antolović 2016).



Şekil 1.2. Azitromisin antibiyotiğinin kimyasal yapısı (Mutak 2007)

Boğmaca her ne kadar antibiyotikle tedavi edilebilen bir hastalık olsa da *B. pertussis*'in hayatta kalabilmesi için geliştirdiği birtakım stratejiler bu antibiyotiklerin etkinliğini azaltabilmektedir. Konak hücredeki varlığını devam ettirebilmek için ürettiği biyofilm bu stratejilerden biridir. Bakterinin enfekte ettiği konakta hayatta kalabilmek ve başarılı bir enfeksiyon oluşturabilmek için biyofilm oluşturması gerekmektedir. Oluşturulan bu biyofilmin *B. pertussis*'in konağın bağışıklık sisteminde hayatta kalabilmesinde ve nazofarenkste kalıcı olmasında oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Fullen vd. 2020). Bakteriyel biyofilmler bir yüzeye veya birbirine bağlı olan bir matrikse gömülü bakteri topluluklarıdır. Protein (fibrin vb.), polisakarit (aljinat vb.) ve nükleik asit (eDNA vb.) gibi maddelerden oluşmaktadır (Vestby vd. 2020). Biyofilm içine gömülü olan bakteriler değişmiş gen ifadesi ve protein üretimi gibi çeşitli metabolik stratejiler ile olumsuz çevre koşullarına ve besin sınırlamalarına uyum sağlayabilmektedir (Donlan ve Costerton 2002; Hall-Stoodley ve Stoodley 2009). Bu adaptasyonlar, antibiyotiklerin hücre içindeki hedeflerinin etkisiz hale getirilmesi, antimikrobisallerin bozduğu hücre fonksiyonların azaltılması ya da gerçekleştirilememesiyle sağlanabilmekte ve bakteriler antimikrobiyal tedaviye karşı daha dirençli hale gelebilmektedir (Vestby vd. 2020). Bakterinin konakta oluşturduğu biyofilm enfeksiyonu sırasında doğal ve edinilmiş konakçı bağışıklıkları eş zamanlı olarak aktive edilebilir ancak bu tepkiler patojenin

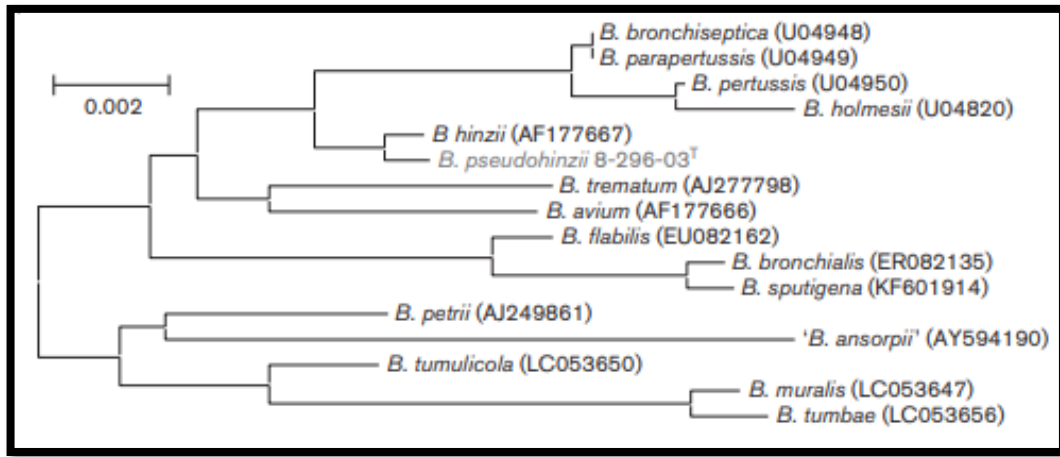
ortadan tamamen kaldırılmasında etkili olamayıp doku hasarına neden olabilmektedir (Moser vd. 2017). Biyofilm matriksine gömülü bakteri hücrelerinin antimikrobiyallere olan toleransı biyofilm oluşturmeyen bakterilerle kıyaslandığında 100-1000 kat oranında daha fazla olmaktadır ve bu yüksek tolerans antimikrobiyal tedaviyi engelleyebilmektedir (Dieljens vd. 2020; Yousefpour vd. 2021). Bu nedenle biyofilmlerin etkili rol aldığı hastalıklar genellikle yavaş gelişen, bağışıklık sistemi tarafından etkin şekilde engellenemeyen ve antibiyotik tedavilerine olumlu yanıtlar veremeyen kalıcı enfeksiyonlar olmaktadır (Vestby vd. 2020).

Boğmaca aşılamayla önlenebilen ve çeşitli antimikrobiyal ajanlarla tedavi edilebilen bir hastalıktır. Ancak hala çocukluk çağında en yaygın ölüm nedenlerinden biridir. (Hon vd. 2022). Ayrıca bu hastalığın nedeni olan *B. pertussis*'in antibiyotiklere olan direnci ve dolaşımında olan suşlarıyla aşı suşlarındaki varyasyonlar veya spesifik varyantların yayılmasıyla ilgili çalışmalar yeterli değildir. Aynı zamanda antibiyotiklerin sub-MİK değerlerinin *B. pertussis*'e olan etkisiyle ilgili şu anda mevcut çalışma bulunmamaktadır. Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında, boğmaca tedavisinde yaygın olarak kullanılan azitromisin antibiyotiğinin *B. pertussis*'in standart suşu Tohama-I'e karşı MİK değeri araştırılmıştır. Daha sonra antibiyotiğin sub-MİK dozları belirlenmiştir ve bu dozların bakterinin büyüme hızına, biyofilm oluşturabilme kapasitesine olan etkisiyle bakteriye önemli virülans özellikler kazandıran *ptxS1* ve *prn* gen ekspresyonları üzerindeki etkisinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1 *Bordetella*

Betaproteobakteri sınıfına ait olan *Bordetella* cinsleri Gram negatif, 0.2 ila 0.7 µm boyutlarında zorunlu aerobik olan küçük kokobasillerdir (Weiss 2006; Rivera vd. 2020). Solunum yollarında kolonizasyon yetenekleriyle bronşiyal ve pulmoner enfeksiyonlara neden olabildiklerinden insan ve hayvan sağlığında birincil öneme sahip mikroorganizmalardandır (Hamidou Soumana vd. 2017). Günümüzde son tanımlanan *B. atropi* (Tran vd. 2022) türü ile beraber toplam on yedi türü mevcuttur (Şekil 2.1.); *B. ansorpii*, *B. avium*, *B. bronchialis*, *B. bronchiseptica*, *B. flabilis*, *B. hinzii*, *B. holmesii*, *B. muralis*, *B. parapertussis*, *B. pertussis*, *B. petrii*, *B. pseudohinzii*, *B. sputigena*, *B. trematumu*, *B. tumbae*, *B. tumulicola* (NCBI).



Şekil 2.1. *Bordetella* türlerinin 16S rRNA gen dizilerine dayalı filogenetik ilişkileri (Ivanov vd. 2016)

Bu türlerden *B. pertussis*, *B. parapertussis*, *B. bronchiseptica* insan ve hayvanlarda solunum yolu enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilen ve en çok incelenen türler olarak bilinmektedir (Mattoo vd. 2001; Hamidou Soumana vd. 2017; Belcher vd. 2021). Bu türlerin en iyi büyüme sıcaklıkları 35-37 °C ve DNA'larındaki GC mol içerikleri % 65-68 arasındadır (Gerlach vd. 2001). Cinsine ait diğer türlerden farklı olarak bu üç türün genetik çeşitliliği sınırlıdır ve birbirleriyle yakından ilişkilidirler. Kan içermeyen peptonlu agarda büyüme, nitratı indirgeme, üreaz aktivitesi gibi fenotipik farklılıklarla da birbirlerinden ayırt edilebilmektedirler (Gerlach vd. 2001).

Filogenetik analizler, insan ve hayvan patojeni olan *Bordetella* türlerinin toprak ve sudaki atalarından evrimleştiğini ileri sürmektedir (Taylor-Mulneix vd. 2017). Hemen hemen her yerde bulunabilen *B. bronchiseptica*, köpek, domuz, at, tavşan gibi birçok memeliyi ve insanları enfekte edebilmektedir (Woolfrey ve Moody 1991; Belcher vd. 2021) (Çizelge 2.1). Son zamanlarda yapılan çalışmalar *Dictyostelium discoideum* türüne ait amip hücrelerini enfekte ettiği ve bu hücrelerin içinde kalarak yaşam döngüsünden yararlandığını ve amip sporlarıyla çevreye yayıldığını bildirmiştir (Taylor-Mulneix vd. 2017). Amiplerin sindirim mekanizmaları özellikle memeli fagositik hücrelerinin bakterisidal mekanizmalarıyla benzerlik göstermektedir (Belcher vd. 2021). *B.*

bronchiseptica'nın amip ile olan etkileşiminin *Bordetella* türlerinin ökaryotik hücrelere adaptasyonun başlangıcı olabileceği tahmin edilmektedir. Amip hücrelerine adaptasyon ve bu hücreleri çevresel niş olarak kullanabilme yeteneğinin geliştirilebilmesiyle *Bordetella*'nın su ve topraktan solunum yolu patojeni olmaya doğru evrimleşebildiği varsayılmaktadır (Taylor-Mulneix vd. 2017).

Çizelge 2.1. *Bordetella* türlerinin ilişkili oldukları konakçı organizmalar ve neden oldukları hastalıklar (Rivera vd. 2020)

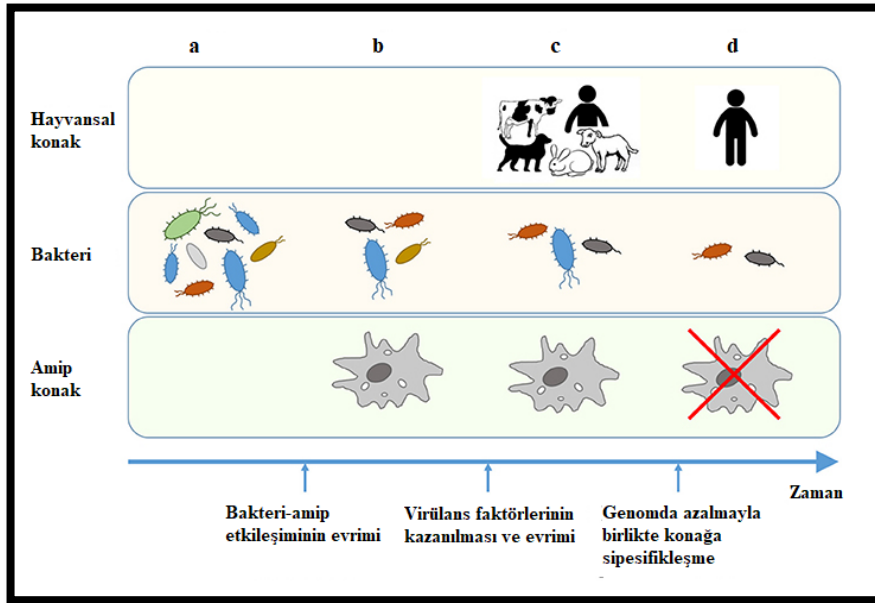
| <i>Bordetella</i> türleri | Konaklar | Hastalıklar |
|---------------------------|---|--|
| <i>B. pertussis</i> | Sadece insan | Boğmaca |
| <i>B. parapertussis</i> | İnsana özgü soy, koyuna özgü soy | İnsanlarda boğmaca benzeri hastalık, koyunlarda pnömoni |
| <i>B. bronchiseptica</i> | Çeşitli memeliler, fare, at, koyun, domuz, kedi, köpek, tavşan, insan | Çeşitli solunum yolu hastalıkları, klinik olarak asemptomatik ila akut pnömoni, köpeklerde öksürük, domuzlarda rinit |
| <i>B. avium</i> | Kümes hayvanları ve yabani kuşlar | Solunum yolları rahatsızlığı |
| <i>B. hinzii</i> | Kümes hayvanları; baskılanmış insanlar | Kanatlı hayvanlarda solunum yolu hastalığı, insanlarda septisemi |
| <i>B. pseudohinzii</i> | İnsan | Orta kulak iltihabı |
| <i>B. holmesii</i> | İnsan | Boğmaca benzeri enfeksiyon, bakteriyemi |
| <i>B. trematumu</i> | Bağışıklığı baskılanmış insanlar | Yara enfeksiyonu, cilt hastalığı |
| <i>B. petrii</i> | Bağışıklığı baskılanmış insanlar | Yara ve kulak enfeksiyonu |

Bakteri hücreleri zamanla yeni konakçılara uyum sağlayarak özelleşebilir ve o konağa özgü olarak sınırlanabilmektedir. *B. pertussis* türleri de tek bir konakla sınırlanan ve sadece insanlarda kolonize olabilen bakterilerdir. Bu türe ait bilinen hayvan veya çevre rezervuarı bulunmadığından bulaş yolunun solunum damlacıkları aracılığıyla gerçekleştiği bilinmektedir (Mattoo ve Cherry 2005). Ayrıca *B. parapertussis* ile *B. bronchiseptica*'ya benzer bir türden evrimleştiği tahmin edilmektedir (Taylor-Mulneix vd. 2017; Belcher vd. 2021; Chen vd. 2021) (Şekil 2.2). Evrimleştikleri tür çevrede hayatta kalabilir ve birçok memeli türünü enfekte edebilirken, *B. pertussis* ve *B. parapertussis* genomlarındaki büyük değişiklik nedeniyle konakçılarının dışında hayatta kalma yeteneklerini ve amip içinde de hayatta kalma yeteneklerini kaybetmiştir (Şekil 2.3). Ancak konağın solunum epitelinde ve fagositik hücrelerinde kısıtlı zamanda hayatta

kalabilme yeteneklerinin evrimsel bir kalıntı olabileceği belirtilmektedir (Belcher vd. 2021).



Şekil 2.2. *B. bronchiseptica*'dan *B. pertussis*'in evrimi (Guiso 2015)

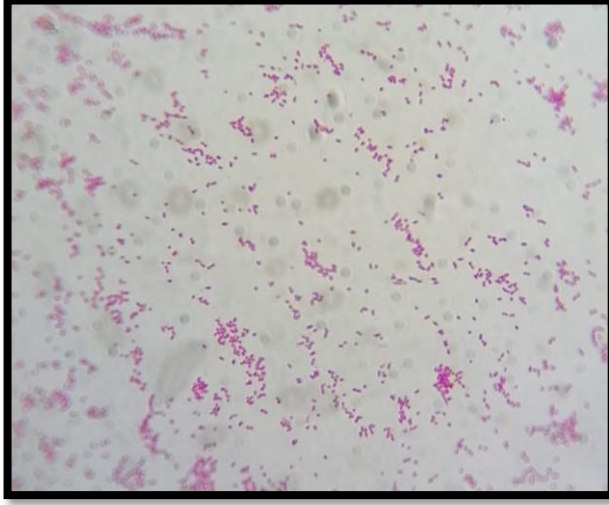


Şekil 2.3. Bakterilerin çevresel mikroorganizmalardan insana spesifik patojenlere evrimi a) amiplerin besin kaynağı olarak kullandıkları çevresel bakteriler; b) bakterilerin zamanla sindirilmeye direnç ve yeni ökaryotik konakçı ile etkileşime girme yeteneği geliştirmesi; c) hayvan patojenlerine evrimleşen ve amiplerle etkileşime girip bunları kullanabilen bakterilerin gelişimi; d) belirli bir konağa adapte olan bakteriyel patojenler predasyona direnme ve daha düşük ökaryotlarla etkileşime girme yeteneklerini kaybederler (Taylor-Mulneix vd. 2017)

2.2 *Bordetella pertussis*

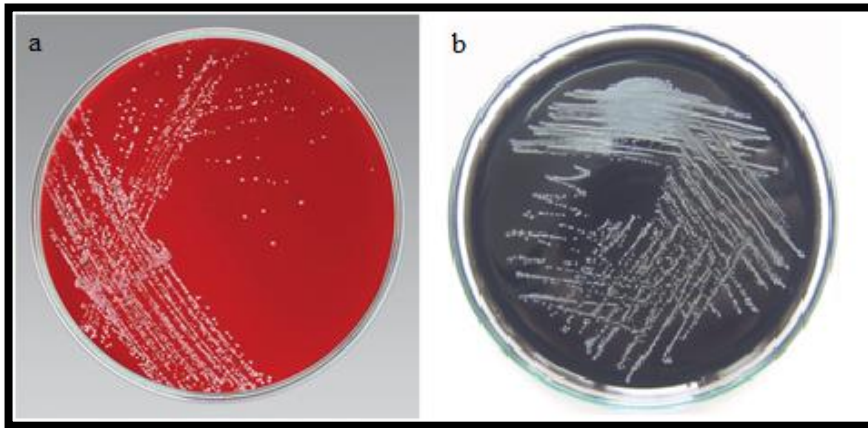
Borget ve Gengou 1906 yılında boğmaca olan çocukların balgamlarından izole ettikleri bakteri hücrelerini *Bordetella pertussis* olarak isimlendirmiştir (Cherry 1996).

Yalnızca insanlar için patojenik olan bu bakteri, küçük, zor üreyen, Gram negatif ve spor oluşturamayan bir aerobik kokobasildir (Fry vd. 2021) (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. *B. pertussis*'in gram boyama görüntüsü

B. pertussis laboratuvar koşullarında oldukça zor üremektedir ve nişasta, kan veya aktif karbonun bulunduğu özel zengin besiyeri ortamlarına ihtiyaç duyan bir bakteridir (Rowatt 1957; Holt 1962; Guiso 2015). Genellikle %33 oranında kan bulunduran Borget Gengou özel katı besiyerlerinde çoğaltılan bu hücreler 3-5 gün inkübasyondan sonra şeffaf, düz, küçük koloniler oluşturmaktadır (Şekil 2.5a). Metabolik aktivitelerinde özellikle nikotinik asit, sistein, glutamik asit, ve prolin gibi aminoasitlerle, magnezyum sülfat, glutatyon demir tuzu gibi üreme faktörlerine ihtiyaç duymaktadır. Bu amaçla hazırlanan Modifiye Cohen-Wheeler katı besiyerinin yanısıra (Şekil 2.5b) üreme faktörlerini içeren Modifiye Morse Bray veya Stainer Scholte sıvı besiyerleri gibi özel olarak hazırlanmış sentetik besiyerleriyle de üremeleri sağlanabilmektedir (Lane 1970; Turan 2004; Weiss 2006).



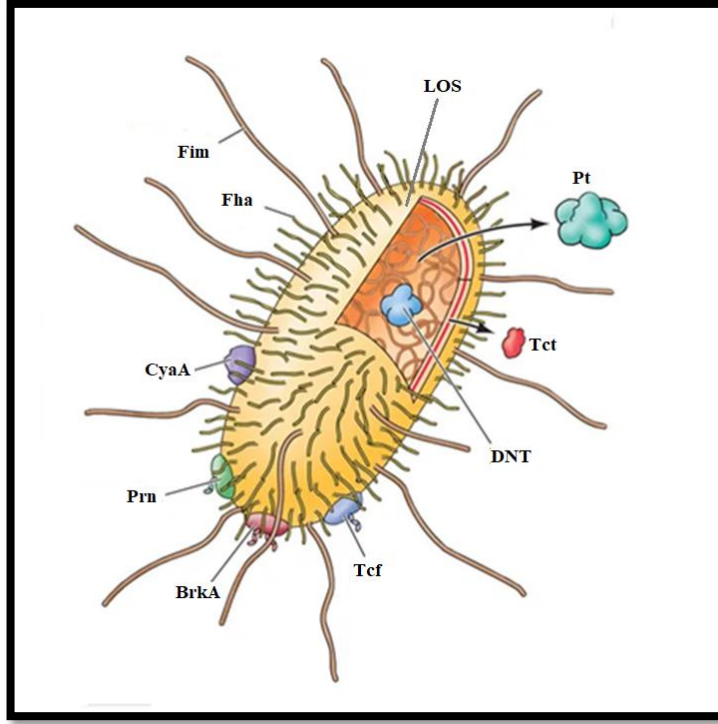
Şekil 2.5. *B. pertussis* hücrelerinin a) Borget Gengou ve b) Cohen-Wheeler katı besiyerlerindeki morfolojisi (Mughal vd. 2011)

B. pertussis oldukça yavaş büyüyen, optimum koşullar sağlandığında ikiye katlanma süresi 4 saat olan bir mikroorganizmadır. Yalnızca insan solunum yolundan izole edilebilir ve boğmacanın ilk zamanlarında tek veya çift olarak hücre dışında balgamda da bulunur (Dindar Kafes 2011). Ayrıca hastadan ilk izole edildiğinde kapsüllüdür. Laboratuvar koşullarında, sentetik besiyerlerinde üretilirken kapsülünü kaybederek 4 ayrı fazda karakterize edilen çeşitli değişimlere uğrayıp antijenik yönden fakirleşebilmektedir (Tarhan 1994; Guiso 2015). Faz-1 suşları kapsüllü ve virülanttır, konaktan yeni izole edilmiş ve patojenik özelliktedir. Standart nutrient agarda üreyemez ve çeşitli virülans faktörlerini eksprese etmektedir (Guiso 2015). Hücrelerin uzun süre pasajlanmasıyla yüzey antijenleri kaybolmaya başlar, II, III ve IV. fazlarda yeni suşlar oluşmaktadır. Faz-II ve III suşları ara şekillerdir ancak Faz-IV antijenik yönden oldukça fakirleşmiş suş özelliğini taşımaktadır (Tarhan 1994; Dindar Kafes 2011). Bordet Gengou besiyeri üzerinde koloni rengi gridir, hemoliz göstermez ve nutrient agarda büyüme yeteneği kazanabilmektedir (Guiso 2015)

B. pertussis hücreleri, konak savunmasına karşı çeşitli virülans faktörleri üretebilen bakteri türleridir. Virülans faktörlerinin çoğu proteindir (Barkoff vd. 2021; Fry vd. 2021). Çevresel etkilere bağlı olarak, bu proteinlerin yapısal genleri transkripsiyonel seviyede kontrol edilmektedir. Virülans genler düşük ısıda, nikotik asit ve MgSO₄ varlığında ifade edilmezken, 37 °C’de, nikotik asit ve MgSO₄ bulunmayan ortamda ifade edilebilmektedir. Bu geriye dönebilen fizyolojik adaptasyon, “fenotipik modülasyon” olarak adlandırılmaktadır (Lacey 1960; Villalba vd. 2022). Fenotipik modülasyon sıcaklık veya ortamda bazı uyarıcı ajanların varlığı ya da yokluğu gibi çevresel koşullara bağlıdır. Ayrıca bakterinin enfekte ettiği konağın bağışıklık sisteminden kaçma ve konaktaki kalıcılığında etkili olan stratejilerden biridir (Villalba vd. 2022). Ancak bazı durumlarda, koşullar optimum seviyede olmasına rağmen *Bordetella* hücrelerinin virülans faktörlerini kaybettiği görülür, bu durum ise “faz varyasyonu” olarak isimlendirilmektedir (Locht 1999). Hastalık sırasında filamentöz hemagglütinin (Fha), fimbriya (Fim) bakterinin trakedeki silli epitelyum hücrelerine tutunmasını sağlarken, pertaktin (Prn), serum direnç proteini (BrkA) ve trakeal kolonizasyon faktörü (Tcf) ototransporterler olarak görev almaktadır. Silli epitelyum hücrelerinin ve alveolar makrofajların zarar görmesinden ve böylece lenfositöze sebep olan toksinler, pertussis toksini (Pt), adenilat siklaz (CyaA), trakeal sitotoksin (Tct) ve lipooligosakkarit tabakadır (LOS). Kısacası *B. pertussis* hücreye tutunmak, konağın korunma mekanizmasından kaçmak ve konağın solunum yoluna zarar vermek için gerekli donanıma sahip bir mikroorganizmadır (Guiso 2009).

2.3 *B. pertussis*’in Virülans Faktörleri

Çok yönlü biyolojik etkinliği olan *B. pertussis*, konak savunmasından kaçmak, solunum sistemine bağlanmak ve konağın zarar görmesine neden olabilecek önemli birçok virülans faktörlerini içermektedir (Şekil 2.6). Bakterinin virülans faktörlerinin çoğu proteindir, temelde adezinler ve toksinler olarak iki grupta sınıflandırılabilir (Barkoff vd. 2021; Fry vd. 2021). Adezinlerden bazıları günümüzde üretilen hücresiz boğmaca aşılarının bileşenlerindedir (Fha, Prn, Fim). Toksinlerin çoğu boğmaca toksini, adenilat siklaz toksini ve dermonekrotik toksin gibi proteinlerdir. Protein olmayan toksinler, peptidoglikanın bir parçası olan trakeal sitotoksin ve lipooligosakkarit endotoksinidir (Barkoff vd. 2021).



Şekil 2.6. *B. pertussis*'in virülans faktörleri (Anonim)

2.3.1 Adezinler

2.3.1.1 Filamentöz hemaglütinin (Fha)

Filamentöz (ipliksi) yapıdaki bu protein 2x50 nm boyutunda ve yaklaşık 220 kDa molekül ağırlığında bir yüzey proteindir (Turan 2004; De Gouw vd. 2011). Toksik özelliği yoktur ancak konağın bronşiyal epitel hücrelerine tutunmada rol oynar ve tüm solunum yolunun kolonizasyonunda görev alan ana faktörlerden olduğu bilinmektedir (Saedi vd. 2021). Fha, FhaB olarak isimlendirilen 367 kDa molekül ağırlığında oldukça uzun öncü bir proteinden türetilir ve hücre dışına salınması FhaC olarak isimlendirilen dış zar proteinine bağlıdır (Lambert-Buisine vd. 1998; Clantin vd. 2007). FhaB'nin işlenebilmesi için bulundurmış olduğu sinyal dizisi (Cys₂₄ ve Cys₃₁) çıkarılır ve bir salgı sistemi (TPS) ile dış bakteri zarından salınmaktadır. TPS'nin dış membran bileşeni olan FhaC yardımcı proteinin periplazmik polipeptit taşımayla ilişkili alanı (POTRA) ile FhaB'nin N-terminal bölgesi etkileşime girerek hücre zarından dışa salınım başlatılmaktadır (Clantin vd. 2007). Daha sonra FhaB, serin proteaz alanı barındıran bir ototransporter protein olan SphB1 tarafından 230 kDa'lık olgun Fha proteinine işlenmektedir (Coutte vd. 2001). Olgun Fha, konakçı hücreler üzerinde bulunan reseptörlerin tanınmasından sorumlu üç farklı bağlanma alanı içermektedir. İlk bölge N-terminal glikozaminoglikan bağlanma alanıdır ve epitel hücrelerini salgılayan mukus üzerindeki sülfatlanmış şekerlere bağlanabilmeyi sağlamaktadır. İkinci alan, arjinin-glisin-aspartat (RGD) motifidir ve makrofajlarla siliyer hücreler üzerindeki fagositozu uyaran kompleman reseptör 3 (CR3) integrinlerine bağlanmaktadır. Üçüncü alan ise karbonhidrat tanıma alanıdır (CRD) ve solunum epitel hücreleriyle makrofajlara yapışmada rol oynamaktadır (Ishibashi vd. 1994).

B. pertussis enfeksiyonuna karşı korumada Fha'ya karşı oluşturulan antikorlar önemli rol oynamaktadır. Bu proteinin yapısal genlerinde meydana gelen mutasyonlar bakterinin kolonizasyon yeteneğini azaltabilmektedir. Günümüzde *fha* geni *Escherichia coli* hücrelerinde klonlanıp eksprese edilebilmektedir ve aselüler (hücretsiz) boğmaca aşılarında saf Fha proteinleri yer almaktadır (Turan 2004; Dewan vd. 2020; Saedi vd. 2021). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda hücretsiz boğmaca aşılarının önemli bileşeni olan Fha'nın ifade edilmediği *B. pertussis* izolatları tanımlanmıştır (Saedi vd. 2021; Safarchi vd. 2021).

2.3.1.2 Fimbriya (Fim)

Fimbriyalar ipliksi, polimerik yapıdaki yapışkan yüzey proteinleridir ve çoğu patojenik bakteriler gibi *B. pertussis* hücreleri tarafından da üretilmektedir. Bu protein minör ve majör alt birimler içermektedir (Mattoo vd. 2001). Majör alt birimler *fim2* ve *fim3* kromozom lokuslarında ifade edilen sırasıyla 22.5 kDa molekül ağırlığında Fim2 ile 22 kDa molekül ağırlığındaki Fim3 proteinleridir. Minör alt birim FimD ise 40 kDa molekül ağırlığındadır (Mattoo vd. 2001). Majör alt birimler 13 nm uzunluğunda ve iki sarmal dönüşlü tekrar birimleri şeklinde gruplaşıp fimbriyanın uzun ve filamentli yapısını oluşturmaktadır (Smith vd. 2001). Ayrıca patojen organizmanın konak epitel hücrelerinin dış matriksine bağlanmasında etkili iki heparin bağlanma bölgesi içermektedir (De Gouw vd. 2011). Minör alt birim FimD ise uç tarafta konumlanmaktadır (Steven vd. 1986; Smith vd. 2001) ve bu alt birimde heparine bağlanmada aracılık edebilmektedir (Gorringe ve Vaughan 2014). Ayrıca FimB ve FimC proteinleriyle beraber şaperon protein görevi görüp fimbriyanın oluşumu ile hücre dışına salınımında etkili olmaktadır (Willems vd. 1992).

Fimbriya, humoral immun yanıtın sağlanmasında ve patojenin trakeal kolonizasyonunu artırarak ilgili bölgede kalıcı kolonizasyonunun sağlanmasında önemlidir (Mattoo vd. 2000; Dewan vd. 2020) ve bu nedenle önemli antijenlerdendir. Günümüzde boğmaca aşılarının bir bileşeni olarak kullanılmaktadır ve mevcut aselüler aşılarda içeriğine dahil edilmiştir (Dewan vd. 2020; Saedi vd. 2021).

2.3.1.3 Pertaktin (Prn)

Mikroorganizmanın akciğer epitel hücrelerine tutunmasında görev alan bir dış membran proteindir (Turan 2004; Dewan vd. 2020; Çolak ve Tefon Öztürk 2022). P.93 adı verilen 93.478 kDa molekül ağırlığına sahip iki proteolitik bölünme geçiren bir öncü olarak sentezlenmektedir (Emsley vd. 1996). Proteolitik bölünme P.30 olarak adlandırılan 30 kDa molekül ağırlığına sahip C-terminal alanıyla 34 amino asit sinyal peptidinin bölünmesi süreçlerini kapsamaktadır. Pertaktin, sinyal peptidi tarafından periplazmaya taşınır ve P.30 ise hücre dış membranında konumlanarak pertaktinin hücre yüzeyine doğru konumlanmasında etkili olmaktadır (Emsley vd. 1996; Loch 1999; Junker vd. 2006). *B. bronchiseptica*'da 68 kDa, *B. pertussis*'te 69 kDa ve *B. parapertussis*_{hu} hücrelerinde 70 kDa molekül ağırlığında üretilen bu protein bakterinin konağa bağlanabilmesi için RGD motiflerini bulundurmaktadır (Boursaux-Eude ve Guiso 2000; Mattoo ve Cherry 2005; Otsuka vd. 2012). RGD motifi sayesinde bakterinin insan solunum yolundaki epitel hücrelere bağlanabilmesini sağlayan adezin olarak işlev görmektedir.

Prn, *B. pertussis* enfeksiyonlarına karşı koruyucu bağışıklık kazanmada önemli olan proteinlerdendir ve *B. pertussis* genomunda oldukça fazla çeşide sahiptir. Çeşitliliğinin fazla olması tam hücre aşılardaki etkinliğin azalmasına neden olmaktadır, ancak Prn çeşitliliği dikkate alınarak aselüler pertussis aşılı üretilmektedir (Dindar Kafes 2011; Dewan vd. 2020; Saedi vd. 2021). Prn eksikliği olan birçok *B. pertussis* izolatları tanımlanmıştır (Leite vd. 2021; Ma vd. 2021). Bu geninin ifade edilemediği suşların aşıya karşı evrimi salgın artışına neden olan faktörlerdendir ve Avustralya’da Prn ifade edemeyen suş oranının 2008-2012 yılları arasında %10’dan %80’e çıktığı belirtilmiştir (Lam vd. 2014). *B. pertussis* izolatlarındaki Prn eksikliğinin boğmacanın yeniden dirilişinde etkili olduğu belirtilmektedir (Jayasundara vd. 2020; Ma vd. 2021).

2.3.1.4 Serum direnç proteini (BrkA)

Serum direnç proteinleri *B. pertussis* hücrelerinin doğuştan kazanılmış mukozal yüzeylerdeki savunma sistemlerine ve adaptif bağışıklık savunmalarına karşı direnç gösterebilmesini sağlayan, ayrıca trakeal hücrelere yapışmasında da rol alan önemli virülans faktörlerindendir (Fernandez ve Weiss 1996; Oliver ve Fernandez 2001). Bakteri genomundaki *brk* lokusunda kodlanmaktadır. Öncelikle 103 kDa molekül ağırlığında öncü protein olarak sentezlenir ve 73-kDa N-terminal alanıyla 30-kDa C-terminal alanına proteolitik olarak işlenmektedir. Ayrıca Prn ile benzer homolojiyi taşıyan bu proteinde iki RGD dizisi bulundurmaktadır (Shannon ve Fernandez 1999; Marr vd. 2008). BrkA, günümüzde boğmacaya karşı üretilen aşılarda bulunmaz, ancak geliştirilen aşılarda için önerilen yeni aşı antijenleri arasındadır (Marr vd. 2008; Luu vd. 2020).

2.3.1.5 Trakeal kolonizasyon faktörü (Tcf)

Bu protein sadece *B. pertussis* hücrelerinde ifade edilebilmektedir, *B. parapertussis* ve *B. bronchiseptica*’da ifade edilebilen bir protein değildir. (Finn ve Stevens 1995; Belcher vd. 2021). *B. pertussis* hücrelerinin özellikle trake kolonizasyonunda etkili rol almaktadır. Proteolitik bölünmeler geçirebilen bir öncü olarak sentezlendikten sonra 60 kDa molekül ağırlığında bir protein olarak salgılanmaktadır. Tcf de Prn, Fha ve BrkA ile benzer şekilde prolin açısından zengin birkaç bölge bulundurur ve bir RGD dizisi içermektedir (Locht 1999). C-terminal bölgesinin 30 kDa’lık alanı Prn öncüsünün C-terminal 30 kDa’lık alanı ile %50 homoloji göstermektedir. Ayrıca BrkA da Tcf’ninkiyle homolog olan önemli bir C-terminal alanı içermektedir (Kerr ve Matthews 2000; Smith vd. 2001).

Boğmaca hastalığı ile mücadelede primer enfeksiyon sonrasında antikor gelişimi Tcf proteinine karşı yavaştır. Ancak vücudun söz konusu patojenle ikinci karşılaşmasında antikor gelişimi hızlıca artmaktadır. Günümüzde boğmacaya karşı geliştirilen aselüler boğmaca aşılı içinde Tcf bulunmamaktadır. Ancak *B. pertussis*’in hızlı ve spesifik tespiti için bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (Burnham-Marusch vd. 2020).

2.3.2 Toksinler

2.3.2.1 Pertussis toksini (Pt)

Pertussis toksin sadece *B. pertussis* hücreleri tarafından üretilip salgılanmaktadır.

B. bronchiseptica genomunda bu toksine ait operon bölgesi bulunmasına rağmen *B. pertussis* operonuna göre tek nükleotid polimorfizmi içeren aktif olmayan bir *pt* promotörü nedeniyle ifade edilememektedir (Chen vd. 2021). *B. pertussis*'in, *B. bronchiseptica* benzeri bir atadan evrimleştiği düşünüldüğünde *Bordetella* türleri arasında sadece bu türün boğmaca toksini üretmesinin insan patojeni olarak evrimleşmiş olması ve bu konak hücrede hayatta kalabilmek için geliştirdiği bir strateji olabileceği bildirilmiştir (Chen vd. 2021). *B. pertussis* *B. bronchiseptica*'nın aksine konak hücrenin fagositozuna karşı hayatta kalmak için gerekli olan genlerin çoğunu kaybetmiştir. Bu nedenle bakterinin fagositik hücrelerin alımını ve aktivasyonunu sınırlayabilmek amacıyla bu toksini ürettiği belirtilmektedir (Belcher vd. 2021).

Pt, hem ekstraselüler sıvıya salgılanabilen hemde bakteri hücrelerine bağlanabilen protein yapıdaki bir toksindir (Locht 1999; Turan 2004). Konakta immün yanıt oluşmasına, lenfositöze ve pankreasın özelleşmiş adacık hücrelerinin aktivasyonuna neden olmaktadır (Dallar 2020). Bu toksin katalitik aktiviteden sorumlu A alt birimi (S1) ve hücre yüzeyine bağlanabilmeyi sağlayan B oligomeri olarak iki farklı alan içeren bir A-B toksindir. B oligomeri S2, S3, S4 ve S5 olmak üzere 4 alt birim içermektedir (Burns 2021). Bu toksin bakterinin patogenezeninden sorumlu virülans özelliklerinin başında gelmektedir (Burns 2021). Konak hücrede birçok hücre fonksiyonunun işlemlerini engellemektedir. Ayrıca adenilat siklazın inaktivasyonunu sağlayan GTP bağlayan düzenleyici proteinlerin (G proteinlerinin) işlevini engelleyerek inaktif hale getirmektedir (Gregg ve Merkel 2019). Böylece adenilat siklaz geri dönüşümsüz olarak aktif hale gelmektedir. Hücre içerisinde ATP'nin cAMP'ye dönüşümü durdurulmadığından hücre içerisinde aşırı düzeyde cAMP birikmesine neden olmaktadır (Gregg ve Merkel 2019).

Boğmaca hastalığının sistemik semptomlarının ana nedenlerinden olan Pt solunum yolu enfeksiyonlarına sebebiyet veren epitel hasarlar yaratmaktadır. *B. pertussis*'in solunum sistemindeki silli epitel hücrelerine tutunmasını kolaylaştırarak mukozayı zedelemektedir. Bu toksin günümüzde boğmacaya karşı üretilen aşılarda ana antijenidir (Locht ve Antoine 2021). Hastalık ile mücadelede geliştirilen aşılarda etkinlik göstergesi olarak kullanılmaktadır. Hastalığı geçiren bireylerde ve aşılananlarda antikor gelişimini artırmaktadır (Dindar Kafes 2011).

2.3.2.2 Adenilat siklaz toksin (CyaA)

Bakterinin konak hücrelerinde kolonize olmasında kritik rol alan bu toksin, *cyaA* geni tarafından sentezlenen 220 kDa molekül ağırlığında hücre yüzeyinde bulunan bir proteindir (Leusch vd. 1990; Mattoo ve Cherry 2005). Konak hücre tarafından bakterinin fagositozu sırasında salgılanarak fagositik etkinliğin azaltılması ve enfeksiyonun başlamasına yardımcı olmaktadır (Vojtova vd. 2006). Uzun ve birden fazla fonksiyona sahip bu toksin, katalitik ve hemolitik işlevleri gerçekleştirebileceği iki kısımdan oluşmaktadır. Katalitik kısmı hedef hücrenin kalmodulini (kalsiyum bağlayıcı haberci protein) ile aktive olur ve hücre içinde cAMP üretimini indüklemektedir (Ladant 2021; Belcher vd. 2021). Hemolitik kısım ise hedef hücreye bağlanabilmeyi ve toksin endositozunun gerçekleşmesini sağlamaktadır (Ladant ve Ullman 1999; Kerr ve Matthews 2000).

CyaA patojenin solunum yolundaki kolonizasyonunu kolaylaştırmak için öncelikle doğuştan gelen bağışıklığı hedefleyerek bakterinin makrofaj ve nötrofillere

karşı daha da dirençli olmasını sağlamaktadır (Ladant 2021). Bronş salgılarının artmasına ve silli epitel hücre yıkımına eşlik etmektedir. Ayrıca Pt ile birlikte konağa ait nötrofillerin ve monositlerin patojen hücreyle mücadele etmesini baskılamaktadır (Dindar Kafes 2011). CyaA immünojenik özellikli bir proteindir ve boğmacaya karşı koruyucu bir bağışıklık tepkisi oluşturabilir. Ancak günümüzde üretilen aselüler boğmaca aşuların içeriğinde bulunmamaktadır (De Gouw vd. 2011; Knuutila vd. 2021).

2.3.2.3 Trakeal sitotoksin (Tct)

B. pertussis hücrelerinin çoğaldığı bölgede ekstrasellüler sıvıda bulunan, 921 Da molekül ağırlığında disakkarid-tetrapeptid yapısındaki bu molekül, bakterinin hücre duvarından salınan bir ekzotoksindir (Kessie vd. 2021). Bakterinin peptidoglikan tabakasını yeniden şekillendirmesi sırasında üretilmektedir (Belcher vd. 2021). Konak savunmasına karşı bakterinin daha dirençli olmasında önemli etkileri vardır. Özellikle solunum yolu epitel hücreleri için toksiktir. Konağın siliyer epitelinin tahrip edilmesiyle ilişkilendirilmiştir ve bu nedenle mukosiliyer temizleme mekanizmasını engellemede etkili olmaktadır (Kessie vd. 2021). Trakedeki kirpikli hücrelerin zarar görmesinden sorumlu bu toksinin boğmacaya özgü öksürüğe neden olan etmenler arasında olduğu belirtilmektedir (Mielcarek vd. 2006). Konakta nitrik oksit ve monositlerden salgılanan interkolin-1 (IL-1) üretimini arttırıp trakeal silli epitel hücrelerinde lezyonlara neden olarak ateşlenmeyi arttırmaktadır (Cundell vd. 1994; Magalhaes vd. 2005). Gram negatif bakteri türlerinin çoğu bu toksini hücre içerisinde geri dönüştürmektedir. Ancak *B. pertussis* bu toksini tekrardan sitoplazmaya aktarmayarak serbest bırakmaktadır. Böylece konak hücrenin üst solunum yollarındaki silli hücreler için nitrik oksit sentazın aşırı ekspresyonunu indükleyerek hücre hasarına neden olmaktadır. (Belcher vd. 2021; Kessie vd. 2021).

Tct immünojenik etki yaratmayan oldukça küçük bir moleküldür (Dindar Kafes 2011) ve günümüzde üretilen aselüler boğmaca aşuların içeriğinde bulunmamaktadır. Canlı zayıflatılmış *Bordetella* hücreleri kullanılarak geliştirilen boğmaca aşularında genetik olarak hedeflenen virülans faktörlerindedir (Mielcarek vd. 2006; Fedele vd. 2011).

2.3.2.4 Dermonekrotik toksin (DNT)

Bazı hayvanlar için öldürücü etkiye sahip olduğundan ölümcül toksin olarak da adlandırılan DNT, 160 kDa molekül ağırlığında, ısıya dayanıksız, 1.464 amino asitten oluşan tek zincirli bir polipeptittir (Iida ve Okonogi 1971; Cowell vd. 1979; Teruya vd. 2020). Bu toksinin N-terminalindeki 30-amino asit bölgesi henüz bilinmeyen bir reseptörle hedef hücreye bağlanmadan sorumludur. C terminalindeki 300 amino asitlik bölge ise protein polimerizasyonunda etkili olan ve farklı proteinler arasında kovalent çapraz bağ oluşumunu sağlayan transglutaminaz aktivitesine sahip enzimatik olarak aktif bir alan taşımaktadır. Bu bölge poliaminasyon ya da deamidasyonla hücre içi sinyal iletim yollarında görevli olan Rho (Ras homoloji) ailesinin küçük GTPazlarını aktive etmektedir (Teruya vd. 2020; Belcher vd. 2021). Rho GTPazlar hücre içi sinyal iletimi, hücrelerdeki çoğalma, hareket, farklılaşma ve hücre ölümü fonksiyonlarını düzenlemekte görevlidir. GTPazın sürekli olarak aktif kalması konak hücredeki Rho bağımlı gerçekleşen olayların sürekli ifade edilmesine neden olmaktadır. Ayrıca Ras genlerinde sürekli aktivasyona neden olan mutasyonların insanlardaki kanserlerin %30'unda

görüldüğü belirtilmektedir (Matsuzawa vd. 2004; Telkoparan ve Tazebay 2011).

Saf DNT farelere damar yoluyla enjekte edildiğinde ölüme neden olmaktadır (Locht vd. 2001), ancak boğmaca patogenizindeki rolü henüz net olarak bilinmemektedir (Stanek vd. 2020). Yapılan çalışmalarda boğmacanın neden olduğu komplikasyonlardan biri olan ensefalopatiye DNT'nin neden olabileceği belirtilmektedir (Teruya vd. 2020). Günümüzde üretilen aselüler boğmaca aşılarında DNT bulunmamaktadır ve yeni geliştirilen bazı canlı zayıflatılmış boğmaca aşılarında DNT geni silinmiş hücreler kullanılmaktadır (Locht 2021).

2.3.2.5 Lipooligosakkarit tabaka (LOS)

Tüm Gram negatif bakteriler gibi *Bordetella* türleri de dış membranlarında lipopolisakkarit tabaka bulundurmaktadır. Ancak *B. pertussis* hücrelerinin LPS tabakası lipooligosakkarit (LOS) olarak değişmiştir (Belcher vd. 2021) ve diğer Gram negatif bakterilerinkine göre farklı yapı ve işleve sahiptir. LPS'lerinde O- zinciri (O- antijeni) bulundurmadığından yapısal olarak LOS tabakası oluşturmaktadır (Ucieklak vd. 2021). Bu tabaka yapısal olarak Tip-1 ile Tip-2 olmak üzere iki farklı polisakkarit, Lipid-A ve Lipid-X olarak da iki farklı lipid bölgesi bulundurmaktadır (Weiss ve Hewlett 1986). İşlevsel açıdan değerlendirildiğinde minör lipid olan Lipid-X, endotoksin aktivitesi göstermektedir. Lipid-A, patojenite ve toksisite açısından düşük aktiviteye sahiptir. Polisakkarit bölge ise IL-1 salgılanmasını uyarmaktadır (Weiss ve Hewlett 1986; De Gouw vd. 2011).

LOS, Tct ile birlikte insan solunum yolu epitelinin bakteri hücresi tarafından kolonizasyonunda etkili rol oynamaktadır (Kessie vd. 2021). Konak hücrede makrofaj aktivasyonu ile tümör nekroz faktörü üretimini uyarmaktadır (Watanabe vd. 1990). Günümüzde üretilen aselüler boğmaca aşılarında LOS bulunmaz ancak tam hücre aşılarında bulunmaktadır ve aşılama sonrası oluşabilen ateşlenme iltihap gibi olumsuz reaksiyonların nedeni olduğu ileri sürülmektedir (Cherry vd. 1988; Dindar Kafes 2011). Ayrıca LOS yapısı çeşitli *B. pertussis* izolatlarında yüksek oranda korunmaktadır. Aşılama öncesiyle sonrası dönemlerde izolatlarda LOS yapısının değişmediğini ve bu nedenle geniş spektrumlu boğmaca önleyici aselüler aşı geliştirebilmek için ideal bir antijen olabileceği belirtilmektedir (Wang vd. 2020).

2.4 *Bordetella* virülans gen (Bvg) Sistemi

B. pertussis virülans proteinlerinin ekspresyonu çevresel uyaranlara tepki olarak düzenlenmektedir ve bu tepkiden *bvgAS* lokusu tarafından kodlanan iki düzenleyici protein olan BvgA ile BvgS sorumludur (Moon vd. 2017; Ifill vd. 2021). BvgS büyük (134 kDa) iç zar sensör proteindir ve çevresel değişikliklerin algılanmasında etkilidir. BvgA ise DNA'ya bağlanan tipik bir yanıt düzenleyici proteindir (Çolak ve Tefon Öztürk 2022). *bvgAS* lokusu olumlu veya olumsuz çevresel değişikliklere göre bu iki proteinin ifadesini düzenlemektedir. Hücrenin çevresel değişikliklere karşı oluşturduğu bu tepkiler Bvg sistemi tarafından kontrol edilen farklı üç fenotipik faza neden olmaktadır (Bvg⁺, Bvg⁻ ve Bvg¹) (Fry vd. 2021). Ayrıca bu sistemler, sensör proteinlerindeki histidinlerle tepki düzenleyici proteinler üzerindeki aspartik asit kalıntıları arasında fosforil gruplarını transfer ederek gerekli tepkilerin oluşmasını sağlamaktadır (Cotter ve Jones 2003; Belcher vd. 2020).

BvgAS'ın fosfor yayılımı MgSO₄ veya nikotinic asitin yeterli konsantrasyonlarda bulunmadığı 37 °C'deki büyüme koşulları altında aktive edilmektedir (Ifill vd. 2021). Bu koşullarda büyütülen *B. pertussis* hücreleri faza özgü bakteriler olarak Bvg⁺ şeklinde nitelendirilmektedir. Bvg⁺ faz durumunda transkripsiyonel aktivasyonu tetikleyen BvgA, BvgS tarafından fosforile edilmektedir (Chen ve Stibitz 2019). BvgA *B. pertussis*'in virülansla aktifleşen genlerinin (*vag*) promotör bölgelerine bağlanarak birçok virülans faktörün transkripsiyonunu arttırmaktadır (Moon vd. 2017; Belcher vd. 2020). *vag*'ların aktifleşmesiyle Fha, Fim, Prn, Tcf ve BrkA gibi adezinlerle CyaA, DNT ve Pt gibi toksinlerin üretimi artmaktadır (Chen ve Stibitz 2019). Virülansla baskılanmış genlerin (*vrg*) transkripsiyonu ise bastırılmaktadır (Cotter ve Jones 2003; Chen vd. 2020). Ancak gerçekleşen bu değişiklikler sırasında tüm promotörler aynı anda aktif olmayıp, *fha* gibi bazı genler erken ifade edilirken, *pt* ve *cyaA* gibi diğer genler daha sonra aktive edilmektedir (Veal-Carr ve Stibitz 2005). Nikotinic asit ya da MgSO₄ konsantrasyonunun yüksek olduğu durumlarda, BvgA'nın fosforilasyonu durdurularak *vag*'ların transkripsiyonu engellenmektedir. Bu durum Bvg⁻ faz durumu olarak nitelendirilmektedir. Bvg⁻ fazında fosforile edilmiş BvgA seviyeleri ve dolayısıyla onun transkripsiyonel aktive edici aktivitesi düşüktür. Bu nedenle, Bvg⁻ faz durumunda *vag*'lar BvgAS tarafından etkinleştirilemeyip *vrg*'ler ifade edilmektedir. *vrg*'lerin BvgA düzenlemesi BvgR baskılayıcı protein tarafından kontrol edilmektedir (Chen ve Stibitz 2019). Ayrıca Bvg⁻ fazında metabolik yollarda rol oynayan bazı genlerin ekspresyon seviyeleri artmaktadır ve bu fazın bakterinin konakta hayatta kalması, kalıcılığı ve bulaşmasında olası bir rolünün olabileceği düşünülmektedir (Moon vd. 2017). Bvgⁱ fazında ise BvgAS sistemi kısmen aktiftir ve bu sistem tarafından bastırılmış fenotipler yoktur. *fhaB* ve *fim* gibi bvg ile aktive olan virülans genlerinin bazıları eksprese edilmektedir. Bu aşamanın, konaklar arasında hastalığın bulaşmasında rol oynadığı düşünülmektedir (Vergara-Irigaray vd. 2004; Wong vd. 2019).

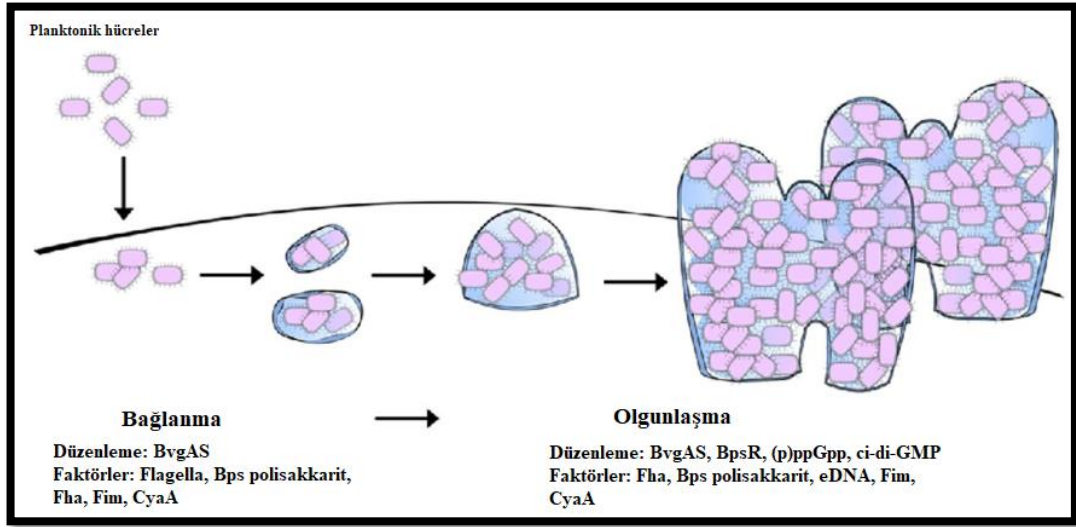
2.5 *B. pertussis* ve Biyofilm

Bakteriyel biyofilmler bir yüzeye veya birbirine bağlı olan bir matrikse gömülü polimerik yapıdaki mikrobiyal topluluklardır (Flemming ve Wingender 2010). Hücreleri birbirine bağlayan polisakkarit, protein ve nükleik asitler ile mikrobiyal üreme için gerekli besinleri içermektedir (Vestby vd. 2020). Pek çok bakteri enfekte ettiği konakta biyofilm oluşturarak antimikrobiyal ajanlara ve konağın bağışıklık sistemine karşı daha dirençli olmaktadır (Vestby vd. 2020; Yousefpour vd. 2021). Bakterilerin biyofilm oluşturma süreci genel kapsamda fenotipik olarak çeşitli aşamaları içeren sıralı ve oldukça düzenlenmiş bir süreçtir (Rumbaugh ve Sauer 2020).

Biyofilm oluşumu bakterilerin hücre-substrat ve hücre-hücre etkileşimlerini kurma yeteneklerine bağlıdır. Bu etkileşimlerin sağlanabilmesi için bakterilerin çoğu fimbria, Tip IV pili, dış zar proteinleri veya ekzopolimerler gibi yüzeye ilişkili yapılarını kullanmaktadır (Serra vd. 2011). *B. pertussis* enfekte ettiği konağın solunum yolundaki epitel hücreler ile etkileşimlerin sağlanabilmesi ve dolayısıyla bakteriyel bağlanmanın gerçekleşebilmesi için Fha, Prn ve Fim gibi adezinler üretmektedir.

Biyofilm oluşumu genel olarak planktonik hücrelerin bir yüzeye bağlanmasıyla başlamaktadır. Mishra vd. (2005)'ye göre *B. pertussis* hücrelerinde ilk bağlanma Bvg'den bağımsızdır ancak Bosch vd. (2006) bu adımın Bvg'ye bağlı olduğunu bildirmiştir. Bu nedenle BvgAS'nin biyofilm gelişiminin hem bağlanma hem de olgunlaşma aşamalarında

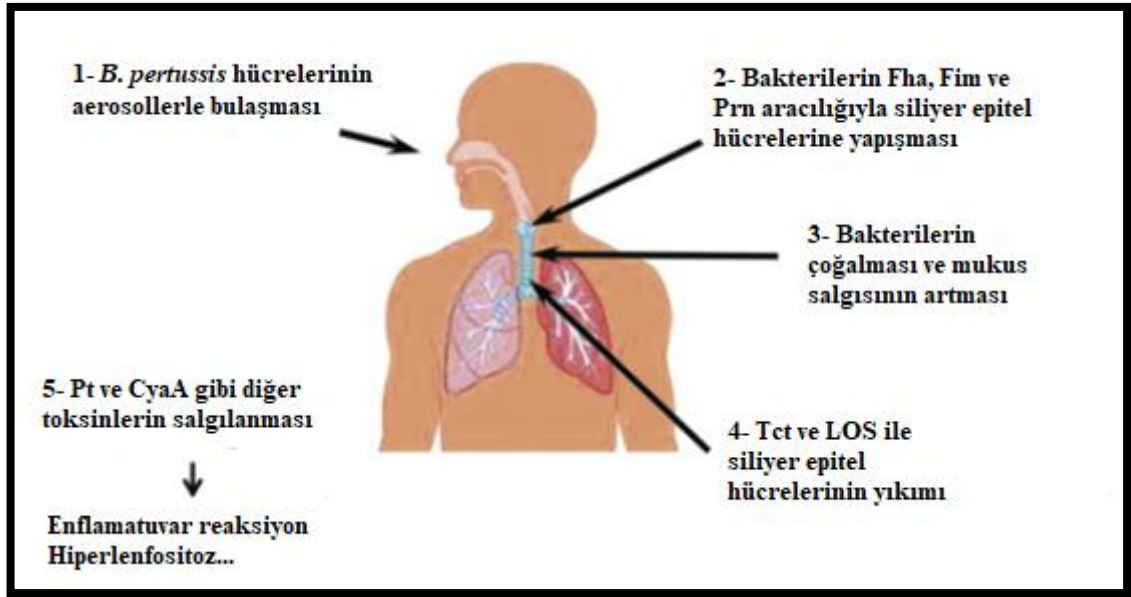
rol oynadığı belirtilmektedir. Ayrıca biyofilm oluşumunu destekleyen farklı düzenleyici mekanizmalarında ((p)ppGpp, c-di-GMP veya BpsR gibi) olduğu bildirilmiştir (Cattelan vd. 2016). *B. pertussis*'te Fha ilk yüzey bağlanmasında önemlidir ve *Bordetella* polisakkarit (Bps), eDNA ve Fha makrokolonilerin ve üç boyutlu yapıların oluşumunu ve kararlılığını desteklemektedir. Fim ve CyaA da *B. pertussis* biyofilm gelişimine katkıda bulunmaktadır ancak kesin mekanizması henüz bilinmemektedir (Şekil 2.7) (Cattelan vd. 2016).



Şekil 2.7. *Bordetella* biyofilm oluşumunun çeşitli aşamalarında farklı faktörlerin rolleri (Cattelan vd. 2016)

2.6 Boğmaca

Boğmaca, insan patojeni *B. pertussis*'in neden olduğu hava yoluyla bulaşan, son derece bulaşıcı akut solunum yolu hastalığıdır (Warfel vd. 2012). Genel olarak çocukluk çağı hastalığı olarak tanımlanan bu hastalığın son zamanlarda yetişkin bireylerde de görülmeye başlandığı bildirilmiştir. Hastalık hasta kişiyle doğrudan temas sonucu ve özellikle damlacık yolu ile bulaşmaktadır (Fry vd. 2021; Yeshanew vd. 2022) (Şekil 2.8).

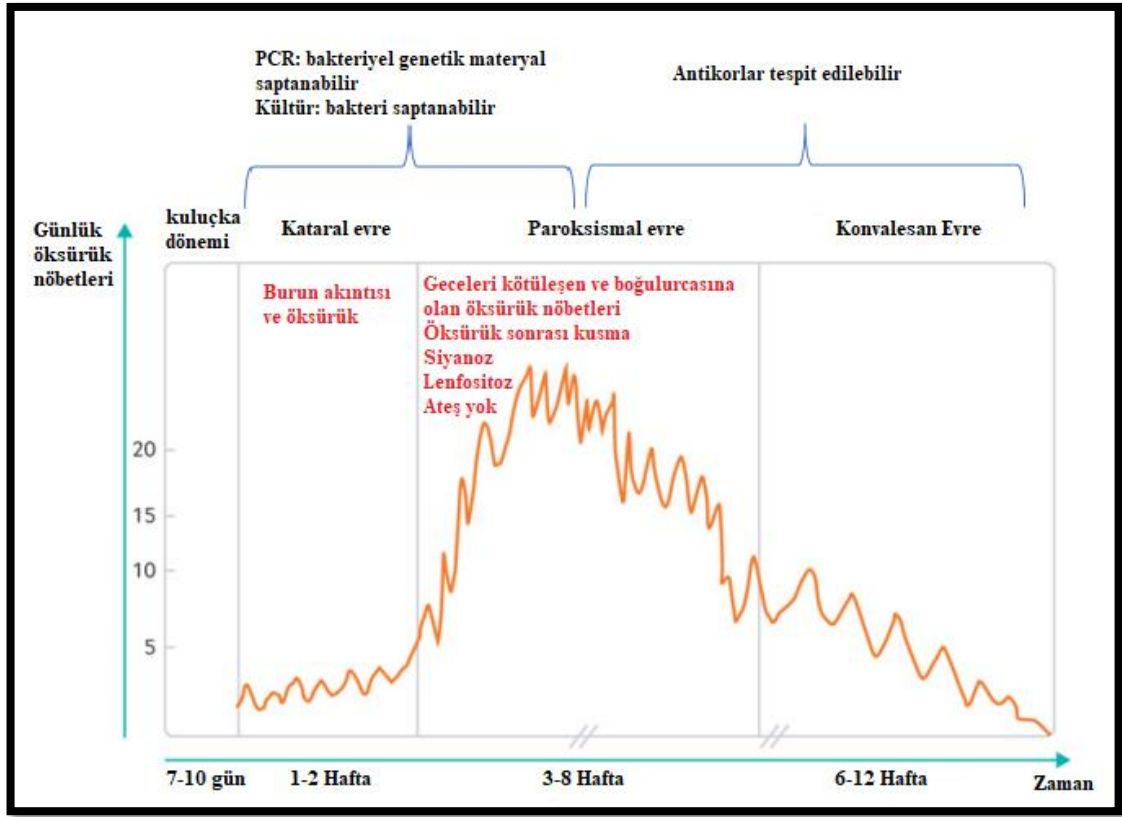


Şekil 2.8. *B. pertussis* ile enfekte olan konakta boğmaca hastalığının oluşma aşamaları (Guiso 2015)

Hastalığın enfeksiyonu kataral, paroksizmal ve konvalesan olarak her biri yaklaşık en az iki hafta süren üç evreden oluşmaktadır (Hon vd. 2022) (Şekil 2.9). Bakterinin enfekte ettiği konakta ortalama yedi-on günlük kuluçka süresinden sonra kataral evre başlamaktadır. Bu dönem ve paroksizmal evrenin erken dönemleri hastalığın bulaşma olasılığının en yüksek olduğu zamanlardır (Tazehkand 2020; Hon vd. 2022) ve ateş genellikle hafif veya normaldir. Ayrıca üst solunum yolu enfeksiyonuna benzer şekilde nezle, gözlerde sulanma, kızarıklık ve hapşırma gibi belirtilerde görülmeye başlamaktadır (Yeshanew vd. 2022).

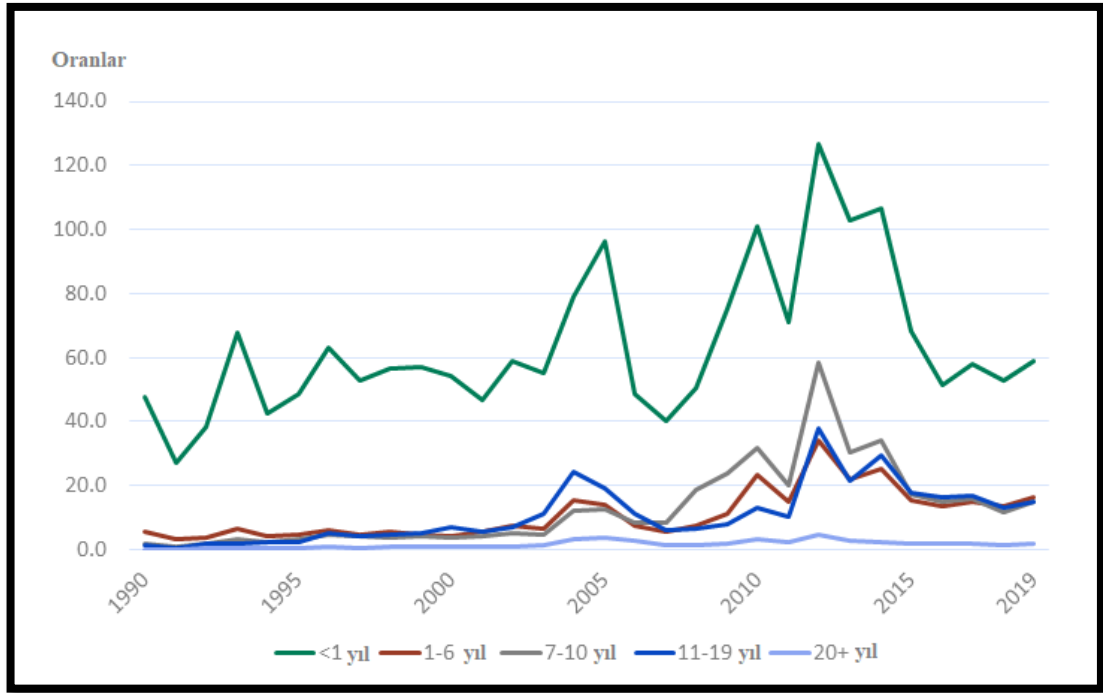
Kataral evreyi paroksizmal evre takip eder. Boğmaca hastalığı için karakteristik bulgular olan genellikle geceleri gerçekleşen şiddetli öksürük nöbetleri bu dönemde olmaktadır. Boğulurcasına şiddetlenen ve artan öksürükle beraber sesli ve derin iç çekme gerçekleşmektedir (Choi vd. 2022). Öksürük nöbetinden sonra yapışkan mukoid balgam çıkarılmasıyla hasta rahatlamaktadır. Ancak öksürük sonrası balgamın farensi uyarmasından dolayı kusma gerçekleşebilmektedir ve bu boğmacanın belirleyicilerindedir (Otar vd. 2014; Yeshanew vd. 2022). Hastalığın bu aşamasında ateş hafiftir veya yoktur. Bu dönem ortalama iki veya altı hafta sürebilmektedir (Fry vd. 2021).

Konvalesan dönem kataral evredeki öksürük nöbetlerinin sıklığının ve şiddetinin azalmasıyla başlayan, hastalığın son evresidir (Yeshanew vd. 2022). Bu dönemde hasta birey normale dönmeye başlamaktadır, kusma ve öksürük giderek azalmakta ve iştah artmaktadır. Ancak bir yaştan altındaki çocuklarda veya bağışıklığı baskılanmış ve aşılanmamış kişilerde kataral evredeki öksürük nöbetleri sık olmayan aralıklarla görülmeye devam edebilmektedir. Ayrıca basit solunum yolu enfeksiyonları öksürük nöbetlerini yenileyebilmektedir (Otar vd. 2014; Hon vd. 2022).



Şekil 2.9. Boğmacanın farklı evreleri, bu evrelere göre kullanılacak biyolojik tanımlar ve hastalığın klinik seyrine karşı günlük öksürük nöbetlerinin sıklığının şematik gösterimi (Guiso 2015)

Dünya genelinde bebekler ve küçük çocuklar boğmacaya bağlı morbidite ve mortaliteye en duyarlı kesim olmaya devam etmektedir (Şekil 2.10) (Yeshanew vd. 2022). Boğmacaya yakalanan her 200 bebekten yaklaşık 1'i, genellikle akciğerlerde beyaz kan hücrelerinin birikmesinden kaynaklanan pulmoner hipertansiyondan ölmektedir (Jog vd. 2022). Boğmacanın bireyde oluşturabileceği ciddi yan etkileri arasında pnömoni, ensefalopati, orta kulak iltihabı ve beyin kanamaları yer almaktadır (Dorji vd. 2016; Choi vd. 2022). Daha önce aşılardan ya da enfekte olan birey veya ergenlerde klinik bulgular asemptomiktir, ana belirti ise inatçı öksürüktür. Yenidoğanlarda ve bebeklerde de tipik olmayan hastalık gelişebilmektedir, genel olarak öğürme, kandaki oksijen eksikliğinden dolayı deride meydana gelen morarma (siyanoz), apne, kalp hızının normalden daha yavaş olmasından kaynaklanan bradikardi atakları genel klinik bulgular olmaktadır (Di Mattia vd. 2019).



Şekil 2.10. ABD'de 1990'dan 2019'a kadar yaş gruplarına göre bildirilen boğmaca oranları. 1 yaşın altındaki bebekler bildirilen en yüksek boğmaca oranına sahip yaş grubu olmaya devam etmektedir (CDC)

2.7 Boğmaca Tedavisi

Boğmaca antibiyotik tedavisi olan bir hastalıktır ve *B. pertussis* genel olarak makrolidler, penisilinler, ketolidler, kinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol ve trimetoprim-sülfametoksazol (TMP-SMX) olmak üzere pek çok antibiyotiğe duyarlı, sefalosporinlerin çoğuna ise dirençlidir (von König 2005). Klinikte ise makrolid grubu antibiyotikler (eritromisin, azitromisin, klaritromisin) ve trimetoprim/sülfametoksazol (TMP-SMX) boğmacanın tedavisinde en sık tercih edilen antimikrobiyallerdendir (Cimolai 2021).

Makrolid antibiyotikler boğmacadan korunmak için kemoprofilaksi ajanları olarak önerilmektedir. 1 aylıktan büyük bebekler, çocuklar ve yetişkinler için eritromisin veya klaritromisin, yenidoğanlarda ise azitromisin tercih edilen makrolidlerdendir (Salim vd. 2015). Bu ajanlar ribozomun 50S alt birimine bağlanarak bakteri protein sentezini inhibe etmektedir ve hastalığın erken döneminde kullanıldığında daha etkili oldukları belirtilmektedir (Wang vd. 2014). Eritromisin *B. pertussis* enfeksiyonuna karşı en yaygın kullanılan makrolid grubu antibiyotiklerdendir. Bu antibiyotiğin 7-10 günlük tedavi sürecinden sonra bakterileri üst solunum yolundan arındırabildiği (von König 2005), hastalığın şiddetini ve bulaşmasını azaltmada etkili olduğu bildirilmiştir (Pichichero vd. 2003).

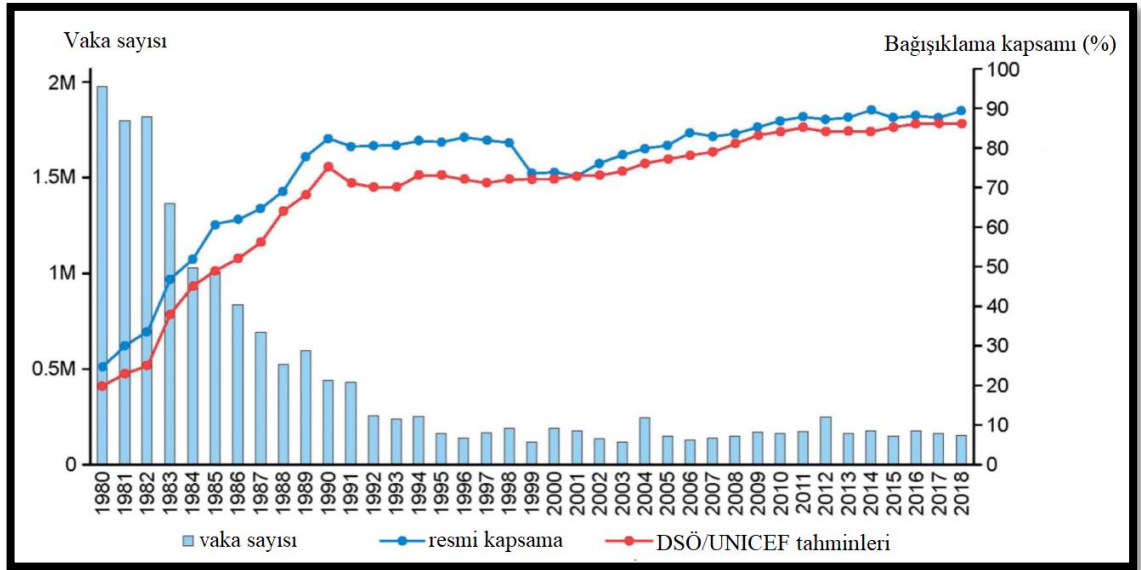
Azitromisin, lakton halkasına bir nitrojen atomu dahil edilerek eritromisinden türetilen yarı sentetik bir makroliddir (Schlünzen vd., 2003; Bakheit vd., 2014). Eritromisine kıyasla hastalarda daha az yan etkiye sahiptir dolayısıyla daha iyi tolere edilebilmektedir. Gastrik asite daha dirençlidir ve daha uzun yarı ömre sahiptir (Peters

vd., 1992; Tiwari vd., 2005). Ayrıca bu antibiyotiğin 3 ila 5 günlük tedavi sürecinin 14 günlük eritromisin tedavisi kadar etkili olduğu bildirilmiştir (Aoyama vd. 1996; Langley vd. 2004; von König 2005). Benzer şekilde klaritromisinde eritromisinden türetilen yarı sentetik bir makroliddir ve bu antibiyotiğin 7 günlük tedavi sürecinin 14 günlük eritromisin tedavisi kadar etkili olduğu bildirilmiştir (Aoyama vd. 1996; Lebel ve Mehra 2001). Bu nedenle boğmaca tedavisinde azitromisin veya klaritromisin gibi daha yeni makrolidlerin eritromisine göre daha etkili olmaları ve hastalarda daha az yan etkiler yaratmalarından ötürü *B. pertussis* enfeksiyonunun tedavisinde standart olarak eritromisinin yerini alabilecekleri bildirilmiştir (von König 2005).

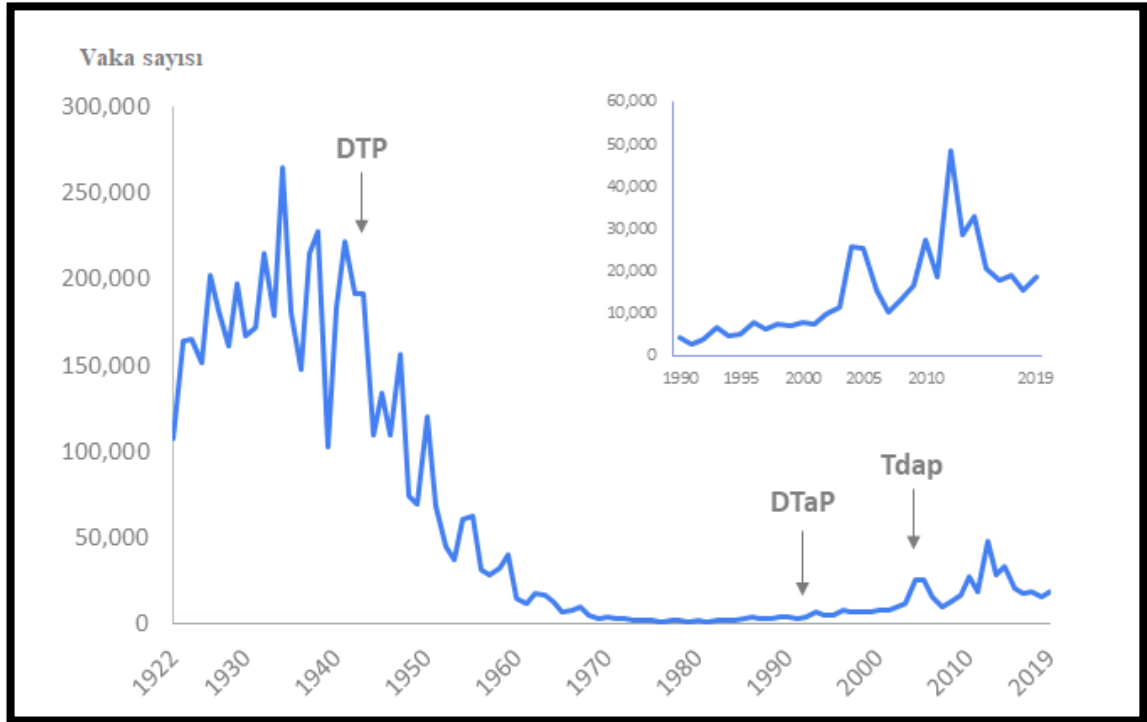
TMP-SMX makrolid ajanların tolere edilemediği hastalar olan genellikle 2 aydan küçük çocuklar için önerilen bir antibiyotiktir (Graham 2006; Otari vd. 2014) ve bu antibiyotiğin etkili bir şekilde *B. pertussis*'i nazofarinksten arındırabildiği bildirilmiştir (Graham 2006). TMP-SMX, bir antimetabolittir, bakterilerin nükleik asit sentezini engeller (Saran ve Karahan 2010). Trimetoprim, folik asit sentezinde görevli dihidrofolat redüktaz enzimini, sülfonamidler ise tetrahidropiteroik asit sentetaz enzimini inhibe etmektedir. Bu iki ajanın bir arada kullanımıyla bakteri için gerekli olan biyokimyasal aktiviteler iki ayrı noktadan engellendiği için, bakteride pürin sentezi iyice bozulduğundan daha güçlü antimikrobiyal etki sağlanabilmektedir (Saran ve Karahan 2010). Bu iki ilacın etkileşmesi potansiyalizasyon şeklindedir. Yani bir arada kullanıldıklarında oluşturdukları toplam etki miktarı, bireysel etkilerinin toplamından daha fazla olmaktadır.

2.8 Boğmacaya Karşı Aşılama ve Bağışıklık

Çeşitli hastalıklara karşı uygulanan aşılama çalışmalarlarıyla günümüzde birçok enfeksiyon hastalık kontrol altına alınabilmiş ve sorun olmaktan çıkmıştır. Ancak uzun zamandır boğmacaya karşı geliştirilen ve uygulanan aşılar olmasına rağmen bu hastalık hala epidemiler oluşturmaktadır. Bu hastalığa karşı yapılan aşılama oranı ile boğmaca vakaları arasında ters ilişki olduğu bildirilmektedir (Şekil 2.11). Yaygın aşılama programları ve yüksek aşı kapsamalarına rağmen 2 ile 5 yılda bir insan sağlığını tehdit edecek vaka sayılarına ulaşabilen bu hastalık dünya genelinde yaygın bir enfeksiyon olmaya devam etmektedir (Dorji vd. 2016; Di Camillo vd. 2021; Jog vd. 2022). Hastalığın yeniden ortaya çıkış nedenleri arasında; yapılan boğmaca aşılarının zamanla koruyuculuğunu yitirmesi, gelişmiş tanı yöntemleri ile birlikte hastalığın farkındalığının artması, *B. pertussis*'de meydana gelen mutasyonlar sonucunda bakterinin genetik varyantlarının ortaya çıkması, spesifik varyantların yayılması, enfekte kişilerin ve temaslılarının etkili olarak tedavi edilememesi ve aşı reddinin yer aldığı düşünülmektedir (Mooi vd. 2009; Nguyen vd 2020; Belcher vd 2021). Ayrıca *B. pertussis*'in dolaşımdaki suşuyla aşı çalışmalarında kullanılan suşlarının virülans faktörlerindeki farklılık ve önceleri hastalığa karşı tam hücre boğmaca aşısı (DTwP) kullanılırken hücresiz boğmaca aşılarının (DTaP) kullanılmaya başlanmasının da vakalarda artışa sebebiyet verebildiği düşünülmektedir (Şekil 2.12) (Della ve Benevides 2015). Dünya Sağlık Örgütü'nün tahminlerine göre 2018 yılında yaklaşık 89.000 boğmaca vakasının ölümle sonuçlandırıldığı bildirilmiştir. Vakaların yaklaşık %95'i gelişmekte olan ülkelerde kaydedilmiştir. Son zamanlarda ABD, Avustralya, Kanada, Avrupa ve Asya ülkelerinde yaygın salgınlar olduğu bildirilmiştir (WHO 2019; Di Camillo vd. 2021; Jog vd. 2022).



Şekil 2.11. 1980–2018 yılları arasında boğmacanın küresel yıllık bildirilen vakaları ve aşı kapsamı. Sütunlar, küresel olarak rapor edilen boğmaca vakalarının sayısını göstermektedir. Aşılama kapsamı için, mavi çizgi resmi kapsamını, kırmızı çizgi DSÖ-UNICEF tahminlerini göstermektedir (Jog vd. 2022)



Şekil 2.12. ABD'de 1922'den 2019'a kadar bildirilen boğmaca vakalarının sayısı. 1980'lerde boğmaca vakaları kademeli olarak artmaya başlamıştır ve 2019'a kadar ülke çapında 18.000'den fazla vaka bildirilmiştir (DTP: Difteri, Tetanos, Tam Hücreli Boğmaca Aşısı, DTaP: Difteri, Tetanos, Aselüler Boğmaca Aşısı, Tdap: Ergenler için Tetanos, Difteri, Aselüler Boğmaca Aşısı) (CDC)

Boğmacaya karşı çocukların bağışıklaması bebeklikte başlamaktadır. *B. pertussis*'in antijenlerinden elde edilen aselüler boğmaca aşısı ile inaktive edilmiş *B. pertussis* hücrelerini içeren tam hücreli (selüler) boğmaca aşısı olarak iki tip aşı bulunmaktadır (Zerbo vd. 2019; Lin vd. 2020). Günümüzde çoğu gelişmiş ülkede aselüler boğmaca aşılarının kullanımı yaygınken bazı az gelişmiş ülkelere tam hücreli boğmaca aşısını kullanmaktadır (Decker ve Edwards 2021).

Tam hücreli boğmaca aşısı (wP) 1914'lü yıllarda geliştirilmeye başlanmıştır ve 1940'lı yıllarda tetanos ve difteri toksoidleriyle kombine edilerek DTwP (difteri, tetanoz ve tam hücreli boğmaca) aşısı şeklinde hastalığı önleyebilmek amacıyla kullanılmaya başlanmıştır (Kuchar vd. 2016; Guiso vd. 2020). wP aşılar genel olarak bakterinin saf kültürünün elde edilip çoğaltılmasının ardından çeşitli kimyasal maddeler (formalin vb.) veya ısıyla inaktive edilip kısmen detoksifiye edilmesiyle oluşturulmaktadır. Bu aşılar boğmacanın kontrol altına alınması ve iyi bir immünizasyon sağlanabilmesi açısından oldukça etkili olmuştur. Kullanıma başlandığı zamandan itibaren boğmaca hastalığı için bildirilen vaka ve ölümlerin sayısı önemli ölçüde azalmıştır (Guiso vd. 2020). Aşılama sonunda *B. pertussis*'in antijenlerine karşı antikör oluşumu etkili bir şekilde artmaktadır. Ancak bakterinin konaktaki kolonizasyonunu ve bulaşmasını önleyebilmede etkili olabilecek mukozal antikörlerin uyarılmasında başarısız olabildiği ile ilgili bildirimler mevcuttur (Solans vd. 2018; Dubois ve Loch 2021). Ayrıca her ne kadar immün sistemi uyarıp boğmacaya karşı uzun süreli koruma sağlayabiliyor olsa da bu aşuların insan sağlığı üzerinde olumsuz yan etkileri olduğu rapor edilmiştir. Aşı içeriğindeki toksik madde miktarının (özellikle endotoksin aktivitesi olan lipooligosakkarit tabaka) fazla olmasından kaynaklı çeşitli lokal (ağrı, kızarıklık, kabarma) ve sistemik (iştahsızlık, ateş, uyuklama, sinir) reaksiyonlar oluşmaktadır. Bunlara ek olarak nadiren de olsa ölüm ve ensefalomiyete de neden olduğu rapor edilmiştir (Crowcroft ve Pebody 2006; Kuchar vd. 2016). Ağır yan etkilerinden ötürü wP aşular birçok gelişmiş ülkede kullanımdan kaldırılmıştır ve 1970 yılından itibaren aselüler boğmaca aşısı çalışmalarına başlanmıştır (Guiso vd. 2020).

Aselüler boğmaca aşısı (aP) 1990'lı yıllarda tetanos ve difteri toksoidleriyle kombine edilerek DTaP (difteri, tetanoz ve aselüler boğmaca) aşısı şeklinde tanıtılmıştır (Kuchar vd. 2016). aP'nin temeli *B. pertussis*'in çeşitli virülans faktörlerinin kombinasyonuna dayanmaktadır. Bakteri hücrelerinin tamamını içermeyen selektif immünojenik proteinlerinin saflaştırılmasıyla hazırlanmaktadır. Şu anda lisanslı çocuk ve yetişkin aP aşılarında Pt, Prn, Fha, Fim2 ve Fim3 olmak üzere en fazla beş virülans faktörün kombinasyonu aP aşuları üretilmektedir (Queenan vd. 2019; Dewan vd. 2020). aP aşular hastalar tarafından wP aşılara göre daha iyi tolere edilebilmektedir ve yan etkileri wP aşular kadar olumsuz sonuçlar doğurmamaktadır. Ancak boğmacaya karşı uzun süreli bir koruma sağlanamamaktadır (Olin vd. 2003; Kuchar vd. 2016; Jog vd. 2022) ve aP aşılardaki uzun süreli koruyuculuk eksikliği günümüzde hala üzerinde çalışılan bir konudur (Decker ve Edwards 2021).

2.9 Boğmacaya Karşı Yeni Aşı Stratejileri

Boğmacaya karşı ilk başlarda wP aşularının kullanılması olası boğmaca salgınlarına karşı korunma sağlayabilmiştir ve dönemin boğmaca salgınlarının da kontrol altına alınabilmesini sağlamıştır (Guiso vd. 2020). Ancak aşılama kaynaklı ölümlerin, çeşitli olumsuz yan etkilerin gözlemlenmesinden dolayı aP aşı çalışmaları yaygınlık

kazanmıştır. aP aşılarda boğmacaya karşı koruyucu olabilmektedir fakat bakterinin konaktaki kolonizasyonu ve bulaşmaya karşı koruyuculuğu wP aşılara oranla daha az olmuştur (Dewan vd. 2020). Bu nedenlerden ötürü boğmacaya karşı kullanılan her iki aşı tipi içinde uzun vadeli daha iyi ve etkili korumayı amaçlayan yeni aşı stratejileri geliştirilmektedir.

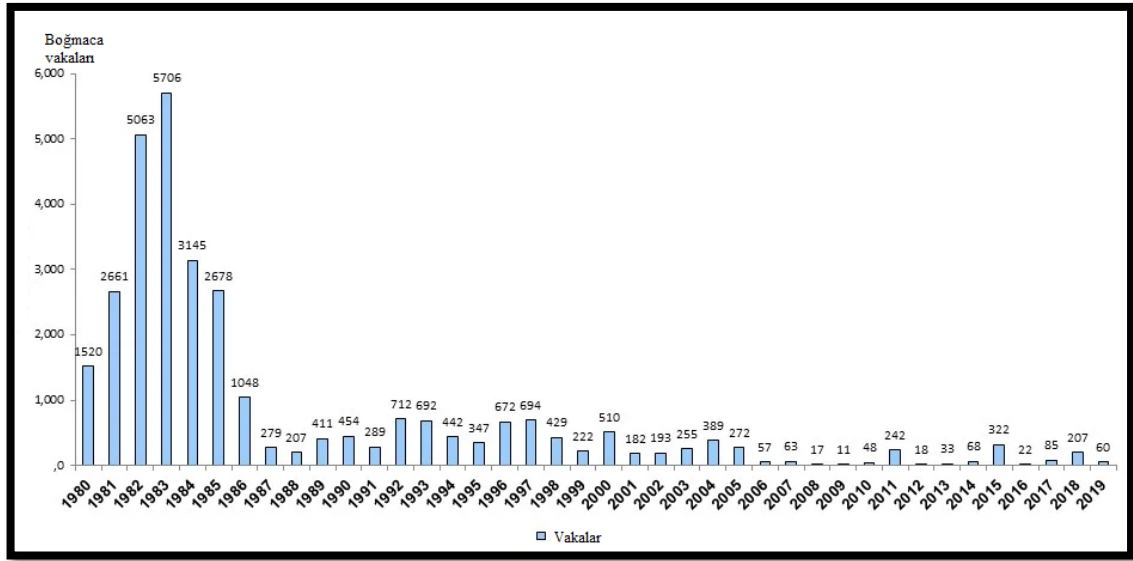
Dış membran vezikül (DMV) aşılarda boğmacayla mücadele kapsamında son zamanların popüler aşı stratejileri arasında yer almaktadır. DMV'ler bakteri zarlarından elde edilen ve yapılarında patojene ait immün sistemi uyarıcı çeşitli proteinler barındıran, replikatif olmayan küresel veziküllerdir (Gerritzen vd. 2017). *B. pertussis*'e ait DMV'ler karakterize edilerek, etkili mukozal adjuvan virülans faktörleri olan Pt, Prn, Fim, Fha ve CyaA dahil 43 proteinin tanımlanması yapılmıştır (Roberts vd. 2008; Dubois ve Locht 2021). Yüksek oranda immünojenik olan DMV aşılarının aP aşılara göre daha güçlü ve daha uzun süreli bağışıklık oluşturabileceği bildirilmiştir (Cecil vd. 2019; Zurita vd. 2019; Dewan vd. 2020).

Boğmaca solunum yoluyla bulaşan bir hastalıktır ve mukozal bağışıklığı uyaran nazal olarak uygulanan aşılarda, sistemik bağışıklığı ortaya çıkaran aşılardan daha etkili olabileceği düşünüldüğünden, burundan uygulanan canlı zayıflatılmış boğmaca aşı çalışmaları sürdürülmektedir. Şu anda klinik deney aşamasında yer alan ve DNT ile Tct aktivitesi olmayan canlı zayıflatılmış boğmaca aşısı (BPZE1) geliştirilmiştir. BPZE1'in farelerde boğmacaya karşı koruma sağlayabildiği, insan olmayan primatlarda da (babunlar) *B. pertussis* enfeksiyonuna karşı güvenli ve koruyucu olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bağışıklığı baskılanan hayvanlarda da iyi bir güvenlik profili gösterebilmiştir (Locht vd. 2017; Debrie vd. 2019; Dubois ve Locht 2021).

2.10 Türkiye'de Boğmaca

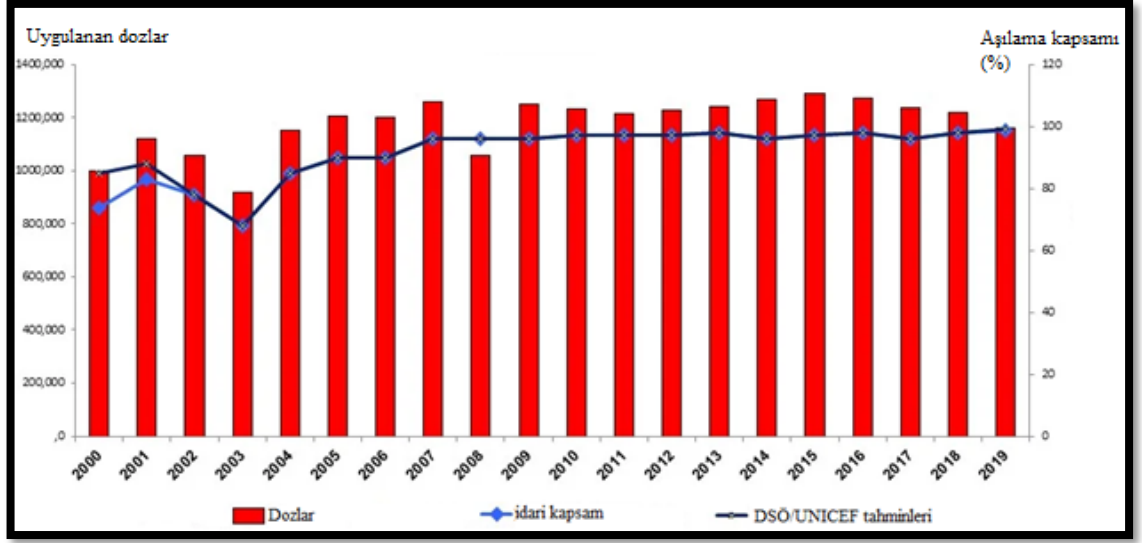
Dünya genelinde olduğu gibi Türkiye'de de aşılama programlarına rağmen boğmaca halen tüm yaş gruplarını etkilemeye devam etmekte ve ölümlerle sonuçlanan vakalara sebebiyet verebilmektedir. Örneğin ülkemizde 2008-2012 tarihleri arasında boğmaca tanısı ile hastaneye yatırılan hastaların genel semptomlarını değerlendirmek için yapılan bir çalışmada, değerlendirilen 40 hastanın %80'ninin aşısız olduğu ve 36 günlük erkek bebek ile 2.5 aylık bir kız bebeğin hayatını kaybettiği bildirilmiştir (Karlı vd. 2013). 2012 yılında ateş, kalp çarpıntısı ve çeşitli solunum semptomları nedeniyle hastaneye yatırılan yeni doğan erkek bebek ve annesinden alınan nazofarinks örnekleri sonucuna göre boğmaca teşhisi koyulmuştur. 19 günlük yeni doğan bebek hastaneye yatışının 4. gününde boğmaca nedeniyle hayatını kaybetmiştir (Akbaş vd. 2012).

1937 yılından itibaren ülkemizde boğmacaya karşı aşılama yapılmaktadır. 1968 yılında DTwP, 2007 yılından itibaren de aselüler aşılarda DTaP şeklinde uygulanmaya devam etmektedir (Özmert 2008; Kurugöl 2009; Kilic vd. 2019). Günümüzde kullanılan bu aşı, DTaP-IPV-Hib kombine aşısı şeklinde temin edilip uygulanmaktadır. Ülkemizde boğmacaya karşı uygulanan primer aşı şeması 2., 4., 6. ve 18.- 24. (rapel) aylarda uygulanmaktadır. İkinci rapel dozların okulda yapılmasından dolayı küçük çocuklar beş doz boğmaca aşısı olmaktadır. Ancak gerçekleştirilen yaygın aşılamalara rağmen bu hastalık için bildirilen vakalar 3-4 yılda bir artış göstermektedir (Şekil 2.13.).



Şekil 2.13. DSÖ verilerine göre 1980- 2019 yılları arasında Türkiye’de bildirilen boğmaca vaka sayıları (WHO)

Gelişmiş ülkelerde boğmacaya yakalanan bebeklerin enfekte olmasının ana sorumlusunun ergen ve yetişkin kesim olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle birçok ülkede ergenler ve yetişkinlerde aşılanmaktadır (Özmert 2008; Kara Elitok vd. 2020). Türkiye’de ise boğmaca aşısı ergen ve yetişkinler için yapılmamaktadır. Ülkemizde sadece erişkin tipi difteri-tetanoz (dT) aşısı Ulusal Bağışıklama Programı’na dahil edilmiştir ve devlet tarafından karşılanmaktadır. Ergenler için boğmaca aşısı (Tdap) ülkemizde ruhsatlıdır, sağlık çalışanları tarafından ergenlere tavsiye edilebilmektedir ve aşı maliyeti aileler tarafından veya sağlık sigortasıyla karşılanmaktadır (Kara Elitok vd. 2020). Ancak gerçekleştirilen bir çalışmada ülkemizdeki aile hekimleri ve çocuk doktorlarının, bu konu ile ilgili bilgi eksikliğinin olduğu, çocukluk çağında yapılan aşının yeterli olduğuna ve boğmacanın ergenlerde görülmediğine inanmasından ötürü Tdap’ı önermediği belirtilmiştir (Kara Elitok vd. 2020). Birçok ülkenin ergen ve yetişkinlerde boğmaca vakalarının artışıyla ilgili sunulan veriler göz önüne alındığında Türkiye’de ergen ve yetişkinlerin boğmacaya karşı aşılanmaması son derece endişe vericidir (Xu vd. 2019; Kara Elitok vd. 2020). Vaka artışlarının bir diğer nedeni olarak da ailelerin aşı reddi en yaygın sebeplerden biri olarak belirtilmektedir (Özceylan vd. 2020). Türkiye’de 2020 yılında hamileler arasında yapılan bir çalışmada aşılanma kabul oranlarının çok düşük olduğu belirtilmiştir (Yakut vd. 2020) ve Türkiye’de hamile kadınlara boğmaca aşısı yapılmamaktadır (Erik vd. 2021). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalar hamilelik sırasında yapılan aşılanmanın hem annenin hem de bebeğin boğmacaya karşı koruyuculuğunun olduğunu ve aşı için küçük olan bebeğin de plasental antikor iletimiyle korunabildiğini belirtmektedir (Healy vd. 2013; Yakut vd. 2020). 2017 yılına ait verilere göre Avrupa’da difteri, tetanoz ve boğmacaya karşı %92, ABD’de de ise %91 oranında aşılanma ile bağışıklama çalışmaları yapılabilmektedir. Ülkemizde ise 2016 yılında %98 oranında olan bağışıklama oranı 2017 yılında %96’ya düşmüştür (Özceylan vd. 2020). Ayrıca DSÖ verilerine göre Türkiye’deki boğmaca aşı oranları 2015 yılından itibaren azalmaktadır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. DSÖ verilerine göre 2000- 2019 yılları arasında Türkiye’de boğmacaya karşı gerçekleştirilen aşılanma oranları (WHO)

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Bakteri Suşu

Bu çalışmada *B. pertussis*'in standart suşu Tohama-I kullanılmıştır. Bakteri hücreleri Prof. Dr. Meral Dilara Öğünç (Akdeniz Üniversitesi, Antalya, Türkiye) tarafından sağlanmıştır. Sato ve Arai, (1972) çalışmalarında belirttiği gibi bakteriler kendilerine özgü bir besiyeri olan modifiye edilmiş Cohen-Wheeler (CW) agar besiyerinde (EK) 4 gün büyütülmüştür. Ardından çalışma boyunca alt kültürleri 10 pasajı aşmayacak şekilde hazırlanmış ve gerekli ise yeni bir stoğa geçilmiştir. Ayrıca bakterinin -80 °C de saklanmak üzere gliserollü stokları yapılmıştır (Thalen vd. 2008).

3.2. Azitromisinin MİK Değerinin Belirlenmesi

Azitromisinin MİK değerinin belirlenmesi için sıvı dilüsyon yöntemi kullanılmıştır (Hoppe vd. 1989). Yeni büyütülmüş bakteri hücreleri steril %0.85'lik NaCl solüsyonu (Merck, Almanya) içerisinde Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü standartlarına göre hazırlanan 0.5 McFarland bulanıklığa ayarlanmıştır (CLSI 2006). Bakteri kültürleri 100 ml'lik erlenlerde 20 ml'lik hacimlerde hazırlanmıştır. Öncelikle kültürlerin 20 ml'deki son antibiyotik konsantrasyonunun belirlenen değerlerde olabilmesi için antibiyotik ara stokları hazırlanmıştır. Erlenlere 17.6 ml Morse-Bray (MB) sıvı besiyeri (EK), 400 µl antibiyotik ve 2 ml 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri aktarılmıştır. Kontrol grubu içinse 18 ml MB sıvı besiyeri ve 2 ml 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri aktarılarak Labwit ZWRY 240 Soğutmalı Çalkalamalı İnkübatörde 150 rpm'de 37 °C'de 96 saat inkübe edilmiştir.

Antibiyotiğin MİK değerinin belirlenmesi 2 aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk aşamada geniş antibiyotik konsantrasyon aralığında (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 5 µg/ml) kültürler oluşturulmuştur. Kültürler soğutmalı çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de 37 °C'de 96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından üreme gözlemlenen en yüksek antibiyotik konsantrasyonuyla üreme gözlemlenmeyen en düşük antibiyotik konsantrasyonunun olduğu doz aralığı *B. pertussis* hücreleri için azitromisin MİK aralığı olarak belirlenmiştir. Belirlenen MİK aralığına göre antibiyotik konsantrasyon aralığı daraltılarak (0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 ve 0.1 µg/ml) yeni bakteri kültürleri oluşturulmuştur. Kültürler soğutmalı çalkalamalı inkübatörde 150 rpm'de 37 °C'de 96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda üreme gözlemlenmeyen en düşük antibiyotikli kültürün konsantrasyon değeri MİK olarak belirlenmiştir. Deneyin bu aşaması 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3. Azitromisinin Sub-MİK Dozlarının *B. pertussis*'in Büyüme Hızına Etkisinin Belirlenmesi

Azitromisinin *B. pertussis* hücreleri için belirlenen MİK değerinin 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 oranlarında sub-MİK'lerini içeren bakteri kültürleri hazırlanmıştır ve büyüme eğrileri oluşturulmuştur (Nikbin vd. 2018). İlk olarak yeni büyütülen taze *B. pertussis* hücreleri MB sıvı besiyerine aktarılmıştır. Soif Uv 510 Optical Instruments Spektrofotometre cihazında OD₆₀₀'de bakteri konsantrasyonları 0.05'e (yaklaşık 10⁷ cfu/ml bakteri) ayarlanmıştır. Bakteri kültürleri 25 ml hacimlerde ve 100 ml'lik erlenlerde oluşturulmuştur. Pozitif kontrol olarak antibiyotik eklenmemiş *B. pertussis* kültürleri hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürler 150 rpm'de 37 °C'de 5 gün boyunca inkübe edilerek

12 saatte bir OD₆₀₀ değerleri ölçülmüştür. Deneyin bu aşaması 3 tekrarlı olarak gerçekleştirilmiş ve büyüme eğrileri Microsoft Excel programında oluşturulmuştur.

3.4. Azitromisin Sub-MİK Dozlarının *B. pertussis*'in Biyofilm Oluşturma Kapasitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

B. pertussis'in biyofilm oluşturma kapasitesi belirlenirken 96 kuyulu hücre kültürü plağı yöntemi kullanılmıştır (Conover vd. 2010). Öncelikle taze *B. pertussis* hücrelerinin konsantrasyonu MB besiyerinde OD₆₀₀'de 0.1 hücre konsantrasyonuna ayarlanmıştır. Hücre kültürü plağına (LP SPA, İtalya) MB besiyerinde azitromisinin belirlenen sub-MİK'lerini içeren 200 µl antibiyotikli bakteri solüsyonları eklenmiştir. Negatif kontrol olarak *B. pertussis* içermeyen MB ve pozitif kontrol olarak da MB besiyerinde antibiyotiksiz *B. pertussis* kültürleri hazırlanarak her kuyucuğa 200 µl aktarılmıştır. Ardından 96 kuyulu plaklar 37 °C'de statik koşullarda 96 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından plak içindeki besiyerleri dökülerek steril distile su (dH₂O) ile iyice yıkanmıştır. Daha sonra 37 °C'de 25 dak kurumaya bırakılmıştır. Ardından her bir kuyucuk %0.1'lik taze hazırlanan kristal viyole (Merck, Almanya) ile oda sıcaklığında 30 dak boyanmıştır. Boyamanın ardından plaklar dH₂O ile 4 kere iyice yıkanmıştır ve 200 µl %95'lik etil alkolle tüm kuyucuklar tek tek çözdürülerek 590 nm'de ölçümler yapılmıştır. Deneyin bu aşaması 3 kere tekrar edilmiştir.

3.5. Azitromisin Sub-MİK Dozlarının *B. pertussis*'in Gen Ekspresyonlarına Etkisinin Belirlenmesi

3.5.1. *B. pertussis* hücrelerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Azitromisinin belirlenen sub-MİK dozlarının *B. pertussis*'in *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyonlarına olan etkisinin belirlenmesi için antibiyotik sub-MİK dozlarını içeren sıvı bakteri kültürleri hazırlanmıştır. Öncelikle taze *B. pertussis* hücrelerinin konsantrasyonları MB besiyerinde OD₆₀₀'de 0.05'e ayarlanmıştır. Antibiyotikli bakteri kültürleri için 25 ml'deki son konsantrasyonlarının belirlenen sub-MİK'lerde olması için antibiyotik ara stokları hazırlanmış ve 100'lük erlenlere 500 µl aktarılmıştır. Pozitif kontrol olarak antibiyotik eklenmemiş *B. pertussis* kültürleri hazırlanmıştır. Hazırlanan kültürler 150 rpm'de 37 °C'de 48-60 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresinin ardından her bir bakteri kültürü 15'lik steril santrifüj tüplere (Greiner Bio-One GmbH, Almanya) alınmıştır ve 4000 rpm'de 10 dak Rotorlu MSE Mistral 2000 santrifüj cihazında bakteri hücreleri çöktürülmüştür. Ardından besiyeri dökülerek santrifüj tüplerinin dibinde kalan bakteri hücreleri için toplam RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. RNA izolasyonları ticari olarak satın alınmış RNA izolasyon kitindeki (Zymo Research, ABD) talimatlara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çöktürülen bakteri hücrelerinin üzerine 600 µl trizol (TRI reaktifi) eklenerek bu solüsyonun içinde bakteriler çözdürülmüştür. Ardından 14.500 rpm'de 1 dak santrifüj edilmiştir. Süpernatantlar steril eppendorf tüpe alınarak üzerine 600 µl etanol aktarılmıştır. Tüp yavaşça alt üst yapılarak solüsyonların iyice karıştırılması sağlanmıştır. Karışımlar spin kolonlara alınarak 14.500 rpm'de 30 s santrifüjlenerek RNA'ların kolona tutunması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra kitin talimatlarına uygun olarak DNaz-1 aşaması ortamda bulunabilecek olası gDNA moleküllerinin uzaklaştırılabilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu aşama için 400 µl etanol eklenmiş RNA yıkama tamponu (wash buffer) kolonlara eklenerek 14.500 rpm'de 30 s santrifüjlenmiştir. Ardından ayrı bir tüpte

5 µl DNaz-1 ve 75 µl DNA özümseme tamponu (digestion buffer) karıştırılıp kolona eklenmiştir ve 15 dak bekletilmiştir. Daha sonra 400 µl etanol eklenmiş Direct-zol RNA ön yıkama tamponu (pre-wash buffer) eklenerek 14.500 rpm'de 30 s santrifüjlenmiştir (bu aşama 2 kere tekrar edilmiştir). 700 µl RNA yıkama tamponu (wash-buffer) eklenerek 14.500 rpm'de 2 dak santrifüj edilmiş ve kolonun alt kısmındaki solüsyon atılmıştır. Ardından kolon steril DNaz-RNaz içermeyen yeni bir eppendorfa alınarak kolon içerisine 100 µl DNaz-RNaz içermeyen su eklenmiştir ve 1 dak bekletildikten sonra santrifüj edilerek RNA'nın eppendorfa aktarılması sağlanmıştır.

İzole edilmiş toplam RNA'ların kalitatif ve kantitatif analizi %1'lik agaroz jel elektroforezi ve spektrofotometre ile gerçekleştirilmiştir. Elde edilen toplam RNA'ların NanoDrop (Thermo Scientific, ABD) ölçümleriyle saflık ve miktar tayinleri yapılmıştır. Tris (Sigma Aldrich, ABD), etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) (Sigma Aldrich, ABD) ve glasiyel asetik asit (Merck Millipore, Almanya) ile TAE tamponu hazırlanarak %1'lik agaroz (Sigma Aldrich, ABD) jel elektroforezleri gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrasında jel, etidyum bromür (EtBr) (Sigma Aldrich, ABD) ile boyanmıştır ve DPR Minibis Pro Bio Jel Görüntüleme Sistemi (DNR Bio-Imaging Systems, İsrail) ile görüntülenmiştir.

Jel görüntülemeleri yapılan toplam RNA'lardan cDNA sentezi gerçekleştirilmiştir ve bu işlem ticari olarak satın alınmış cDNA sentez kitindeki (Jena Bioscience, Almanya) talimatlara uygun olarak yapılmıştır. Bu aşama için iki ayrı PCR tüpü hazırlanmıştır. Tüp-1, RNaz içermeyen su, RNA ve primerleri (toplam hacim 10 µL), tüp-2 ise reverse transkriptaz, RNaz inhibitör, DTT stok solüsyonu, dNTP, tampon solüsyon ve RNaz içermeyen suyu (toplam hacim 10 µL) içerecek şekilde hazırlanmıştır. Tüp-1 65 °C'de 5 dak ve 4 °C'de 1 dak olacak şekilde Biorad T100 Thermal Cyclers (Biorad, ABD) PCR cihazında inkübe edilmiştir. Ardından tüp-1 tüp-2 ile karıştırılıp 42 °C'de 10 dak, 50 °C'de 60 dak ve 70 °C'de 10 dak olacak şekilde PCR cihazına yerleştirilmiştir. Ardından sentezlenen cDNA'lar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.2. Spesifik primerlerin özgüllük testi için geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri

B. pertussis'in *ptxS1* ve *prn* gen ekspresyonlarının belirlenmesi için tasarlanan primerler ile referans gen (housekeeping gen) olarak kullanılan RNA polimeraz B altbirim (*rpoB*) geni için tasarlanan primerler (Sentebiolab, Türkiye) Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

pt geni için S1 alt birimine ait *ptxS1* geninin 112 bç'lik bir fragmanını amplifiye etmek için primer tasarımı yapılmıştır. *prn* geni için 1098189-1098261 genom pozisyonuna ait 73 bç'lik bir fragmanını amplifiye etmek için primer tasarımı yapılmıştır. Referans gen *rpoB* genine ait primerler 93 bç'lik bir fragmanı amplifiye etmek için tasarlanmıştır. Primer dizileri hedef genlerin özgünlüğünü sağlamak için NCBI BLAST ([//blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) veri bankasından kontrol edilerek doğrulanmıştır.

Çizelge 3.1. Hedef gen bölgeleri için sentezlenen primerler ve amplicon boyutları

| Gen | Primerler | Amplicon Boyutu (bp) | Referanslar |
|--------------|---|----------------------|----------------------------------|
| <i>ptxS1</i> | İleri primer: 5'-TTCCAGAACGGATTACGGC-3' | 112 | Bibova vd. 2013 (modifiye) |
| | Geri primer: 5'-TGCTGCTGGTGGAGACGAA-3' | | |
| <i>prn</i> | İleri primer: 5'-TGCCGACTGGAACAACCA-3' | 73 | Hasan vd. 2014 |
| | Geri primer: 5'-GTCGGAGCCCTGGATATGG-3' | | |
| <i>rpoB</i> | İleri primer: 5'-GCTGGGACCCGAGGAAATCA-3' | 93 | Bibova vd. 2013 (modifiye) |
| | Geri primer: 5'-GCGCCAATGTAGACGATGC-3' | | |

İlgili gen bölgeleri için sentezlenen primerler geleneksel PCR ile amplifiye edilmiştir. PCR için sentezlenen cDNA'lar kullanılmıştır ve reaksiyon karışımları Çizelge 3.2'de belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Biorad T100 Thermal Cycler (Biorad, ABD) cihazında Çizelge 3.3'te belirtilen PCR koşullarıyla reaksiyonlar gerçekleştirilmiştir. Böylelikle sentezlenen cDNA'larla spesifik primerlerin aktivitesi kontrol edilmiştir.

Çizelge 3.2. Geleneksel PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı

| Karışım Reaktifi | Kullanılan Miktar |
|-------------------------------------|-------------------|
| Nükleaz içermeyen dH ₂ O | 17,5 µl |
| Taq Tampon Solüsyonu (10X) | 2,5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 2,5 µl |
| cDNA | 0,5 µl |
| dNTP karışımı (10 mM) | 0,5 µl |
| İleri Primer (10 µM) | 0,5 µl |
| Geri Primer (10 µM) | 0,5 µl |
| Taq polimeraz enzimi | 0,5 µl |
| Toplam | 25 µl |

Çizelge 3.3. Hedef gen bölgelerinin çoğaltılabilmesi için ayarlanan geleneksel PCR koşulları

| PCR Aşaması | Sıcaklık | Süre |
|------------------|----------|--------|
| İlk denatürasyon | 95 °C | 10 dak |
| Denatürasyon | 95 °C | 1 dak |
| Primer yapışması | 55 °C | 30 s |
| Uzama | 72 °C | 1 dak |
| Son Uzama | 72 °C | 10 dak |

} 30 döngü

PCR'nin tamamlanmasından sonra TAE tamponu hazırlanarak %3'lük agaroz (Sigma Aldrich, ABD) jel elektroforezleri gerçekleştirilmiştir. Elektroforez sonrasında jel EtBr (Sigma Aldrich, ABD) ile boyanmıştır ve DPR Minibis Pro Bio Jel Görüntüleme Sistemi ile görüntülenmiştir.

3.5.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri (RT-PCR)

B. pertussis'e önemli virülans özellikler kazandıran *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyelerinin analizi için RT-PCR gerçekleştirilmiştir. RT-PCR analizleri QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) ile kit protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Referans gen olarak *rpoB* kullanılmıştır ve ilgili gen bölgelerine ait sentezlenen primerler Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

RT-PCR deneylerinde primer ve cDNA'nın optimum konsantrasyonlarını belirleyebilmek için cDNA'nın seri seyreltmeleri yapılarak standart eğriler çizilmiştir. Bunun için cDNA 1/10, 1/100, 1/1000, 1/100000, 1/1000000 oranında seyreltilerek standart eğriler oluşturulmuştur. Ayrıca gerçekleştirilen reaksiyonlar sırasında ortamda olabilecek olası nükleik asit kontaminasyonunun kontrolü için şablonsuz kontrol (NT) olarak cDNA içermeyen reaksiyon tüpleri negatif kontrol hazırlanmıştır. NT kontrolü ile ortamda fazladan nükleik asit kirliliği olup olmadığı ayrıca primer dimer oluşumları kontrol edilmesi amaçlanmıştır. RT-PCR karışımları Çizelge 3.4'te belirtildiği gibi hazırlanmıştır. Çizelge 3.5'te belirtilen RT-PCR koşullarıyla reaksiyonlar RotorGene Q 5plex HRM (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazında gerçekleştirilmiştir. Her bir gen bölgesine ait RT-PCR analizleri üç tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.4. RT-PCR için hazırlanan reaksiyon karışımı

| Karışım Reaktifi | Kullanılan Miktar |
|-------------------------------------|-------------------|
| Nükleaz içermeyen dH ₂ O | 7 µl |
| 2X SYBR Green PCR master mix | 10 µl |
| cDNA | 1 µl |
| İleri Primer (10 µM) | 1 µl |
| Geri Primer (10 µM) | 1 µl |
| Toplam | 20 µl |

Çizelge 3.5. Hedef gen bölgelerinin çoğaltılabilmesi için ayarlanan RT-PCR koşulları

| PCR Aşaması | Sıcaklık | Süre | |
|------------------|----------|-------|------------|
| İlk denatürasyon | 95 °C | 2 dak | } 40 döngü |
| Denatürasyon | 95 °C | 5 s | |
| Bağlanma/Uzama | 60 °C | 10 s | |

Gerçekleştirilen reaksiyonlar sonucunda sadece hedef gen bölgesinin ürün olarak oluştuğunu doğrulamak amacıyla her amplifikasyon reaksiyonunun sonunda erime eğrisi analizleri yapılmıştır. Erime eğrisi analizi için sıcaklık 60 °C'den 95 °C'ye her 5 saniyede

1 °C artacak şekilde ayarlanmıştır. Reaksiyon sonunda cDNA konsantrasyonunun logaritmasına karşılık Ct değerleri kullanılarak bir standart eğri çizilmiştir ve reaksiyon verimliliği katsayısı ($E=(10^{-1/\text{slope}}-1) \times 100$) hesaplanmıştır. Elde edilen veriler RotorGene Q 5plex HRM cihazının yazılımı (versiyon 2.0.3) kullanılarak analiz edilmiştir. Hedef genlerin ekspresyon seviyeleri de referans gen olarak kullanılan *rpoB* ekspresyon seviyelerine göre normalleştirilmiştir. Gen ifadelerindeki kat değişimleri $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi ile aşağıda belirtildiği gibi hesaplanarak antibiyotikli ortamda büyütülen kültürlerin ekspresyon seviyeleri antibiyotiksiz kültürlerle karşılaştırılmıştır.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = [(Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{housekeeping gen}})_{\text{örnek}} - (Ct_{\text{hedef gen}} - Ct_{\text{housekeeping gen}})_{\text{kontrol}}]$$

3.6. İstatistiksel Analizler

Bakterilerin büyüme eğrisi için belirli aralıklarla ölçülen OD₆₀₀ değerleri, RT-PCR değerlendirmelerinde azitromisin sub-MİK dozları olan ve olmayan *ptxS1* ve *prn* genlerinin nispi ekspresyon seviyeleri, ayrıca azitromisin sub-MİK dozlarının biyofilm oluşumuna olan etkileri üç bağımsız değerlendirmelerin ortalama \pm standart sapması olarak sunulmuştur. Çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin istatistiksel analizleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak gerçekleştirilmiştir (IBM SPSS 22 (SPSS, ABD)) ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey'nin post-hoc testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. Yapılan analizler sonucunda $p < 0.05$ farklılıkları olan ikili karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

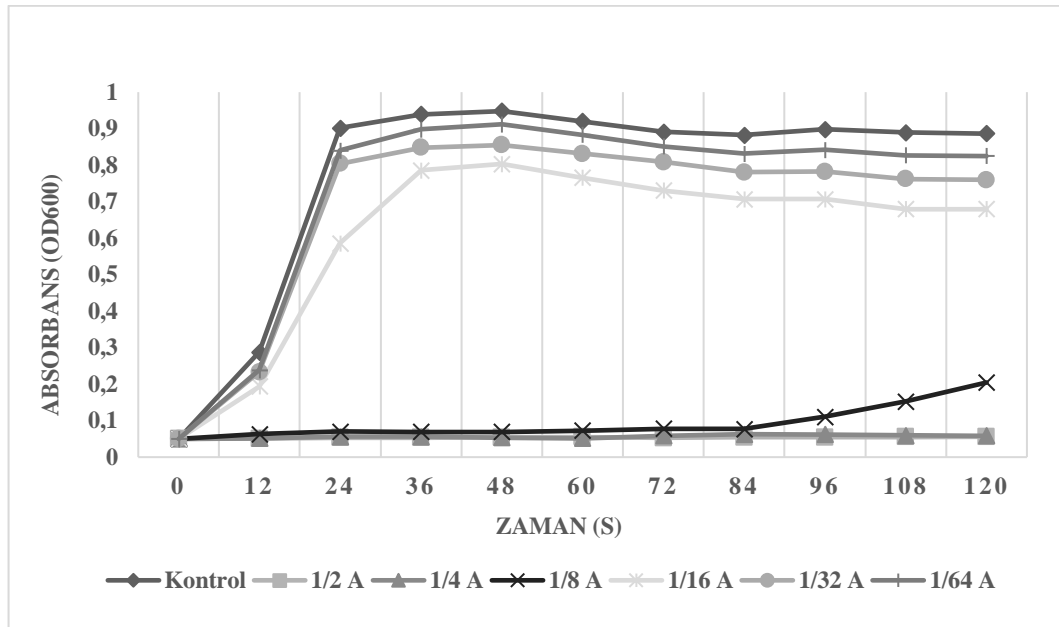
4.1 Azitromisinin MİK Değerinin Belirlenmesi

Çalışmada öncelikle azitromisinin geniş antibiyotik konsantrasyonu aralıklarında MİK değeri belirlenmiştir. İlk aşamada 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 µg/ml'lik dozlarda antibiyotik içeren sıvı bakteri kültürleri hazırlanmış ve 96 saatlik inkübasyon süresinin ardından bakteri üremesinin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu 0.1 µg/ml, bakteri üremesinin görüldüğü en yüksek konsantrasyon ise 0.05 µg/ml olarak belirlenmiştir. Bu nedenle ilk aşamada Tohama-I hücreleri için azitromisinin MİK aralığı 0.05-0.1 µg/ml olarak belirlenmiştir.

İkinci aşamada, belirlenen MİK aralığının genişletilmesiyle 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09 ve 0.1 µg/ml antibiyotik konsantrasyonlarında bakteri kültürleri hazırlanmıştır. İnkübasyon süresinin ardından bakteri üremesinin olmadığı en düşük konsantrasyonunun 0.08 µg/ml olduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, bu tez çalışması kapsamında *B. pertussis*'in standart suşu Tohama-I'in azitromisin antibiyotiği için MİK değeri 0.08 µg/ml olarak belirlenmiştir.

4.2 Azitromisinin Sub-MİK Dozlarının *B. pertussis*'in Büyüme Hızına Etkisinin Belirlenmesi

Azitromisin için belirlenen MİK değerinin 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 oranlarındaki sub-MİK dozlarının bakterinin büyüme hızına olan etkileriyle ilgili olarak elde edilen veriler Şekil 4.1'de gösterilmektedir. Bakterilerin en yüksek hücre konsantrasyonuna 48. saatte ulaştıkları gözlemlenmiştir. Daha sonra hücre konsantrasyonlarında hafif azalma ve durağanlaşma olmuştur.

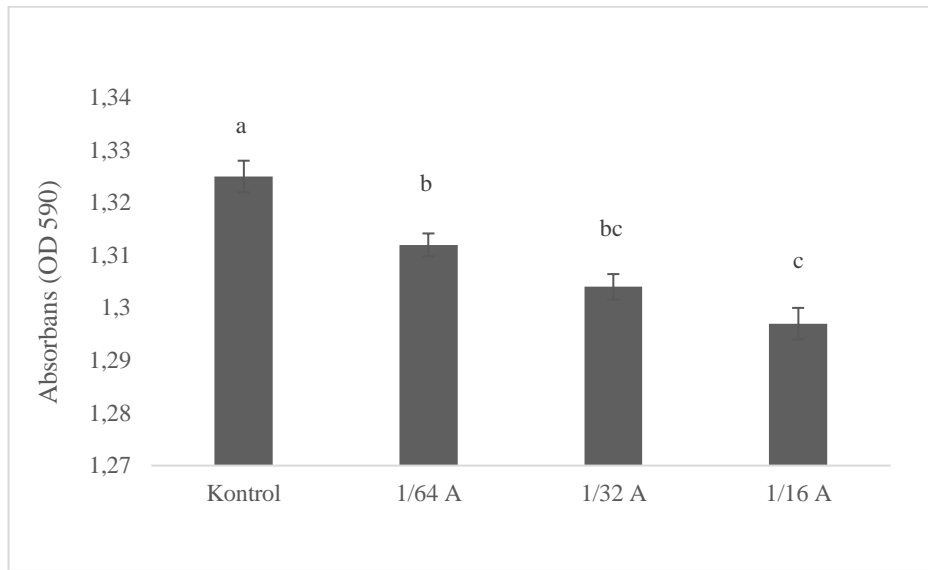


Şekil 4.1. Sub-MİK değerlerde azitromisinin Tohama-I suşunun büyüme hızına olan etkisi. Veriler üç tekrarın ortalama absorbans ± standart sapması olarak ifade edilmiştir (Kontrol: Antibiyotiksiz bakteri kültürü, A: Azitromisin)

Absorbans değerlerine göre en yüksek büyüme oranı antibiyotiksiz bakteri kültüründe gözlemlenmiştir. Antibiyotikli ortamlardaki büyümeler incelendiğinde, sub-MİK değerlerin bakterinin büyümesini belirgin şekilde yavaşlattığı gözlemlenmiştir. Antibiyotiğin 1/2, 1/4 ve 1/8 sub-MİK dozları bakteriler tarafından tolere edilememiştir ve deneysel açıdan yeterli bakteri konsantrasyonlarına ulaşamamıştır ($p < 0.05$). 1/16, 1/32 ve 1/64 sub-MİK’lerde ise devam edecek olan deneyler için de yeterli bakteri konsantrasyonlarına ulaşılmıştır. Ayrıca sub-MİK dozlardaki büyüme oranları istatistiksel açıdan birbirlerinden ve kontrolden anlamlı derecede farklı olmuştur ($p < 0.05$). Bakteriler 1/16, 1/32 ve 1/64 sub-MİK’lerde anlamlı derecede büyüebildiklerinden bu tez çalışması kapsamında Tohama-I için azitromisin sub-MİK’leri olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle antibiyotiğin *B. pertussis*’in biyofilm oluşturabilme yeteneği ile gen ekspresyonlarına olan etkisinin belirlenmesi için bu konsantrasyonlar kullanılmıştır.

4.3 Azitromisin Sub-MİK Dozlarının *B. pertussis*’in Biyofilm Oluşturma Kapasitesi Üzerine Etkisinin Belirlenmesi

Azitromisin belirlenen sub-MİK değerlerinin *B. pertussis* Tohama-I’ın biyofilm oluşturma kapasitesine olan etkileri Şekil 4.2’de gösterilmiştir. En yüksek biyofilm oluşturma yeteneği antibiyotik içermeyen pozitif kültürde görülmüştür ($p < 0.05$).



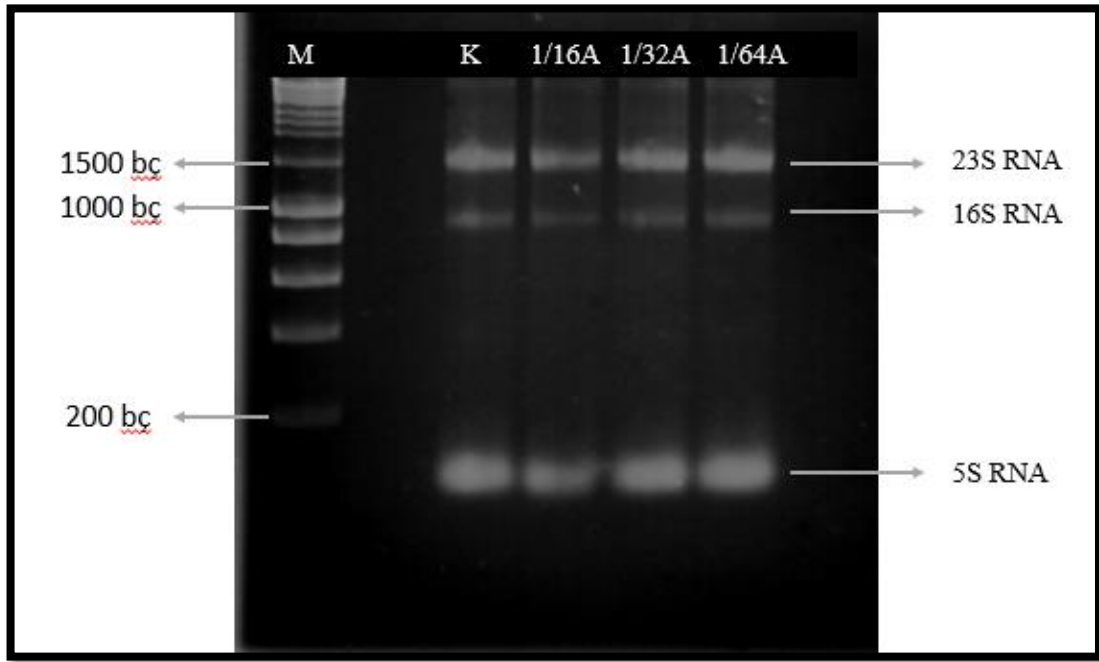
Şekil 4.2. Azitromisin sub-MİK’lerinin Tohama-I’ın biyofilm oluşturma kapasitesine olan etkisi. Veriler üç tekrarın ortalama absorbans \pm standart sapması olarak ifade edilmiştir (Kontrol: Antibiyotiksiz bakteri hücreleri, A: Azitromisin, üst simgelerde yer alan farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı temsil etmektedir ($p < 0.05$))

Sub-MİK’lerin Tohama-I hücrelerinin biyofilm oluşturma kapasitesi üzerine etkileri incelendiğinde antibiyotik konsantrasyonun artışına paralel olarak bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğinde azalma olduğu görülmüştür. Azitromisin 1/16 sub-MİK dozu biyofilm oluşumunu kontrole göre önemli derecede inhibe etmiştir ($p < 0.05$). Ancak 1/16 ile 1/32 sub-MİK’ler ve 1/32 ile 1/64 sub-MİK’lerde bakteri hücrelerinin biyofilm üretebilme yetenekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamıştır ($p > 0.05$).

4.4 Azitromisin Sub-MİK Dozlarının *B. pertussis*'in Gen Ekspresyonlarına Etkisinin Belirlenmesi

4.4.1. *B. pertussis* hücrelerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Sub-MİK dozlardaki azitromisin varlığında *B. pertussis*'in önemli virülans faktörlerine ait *prn* ve *ptxS1* genlerinin nispi ekspresyon seviyelerinin belirlenebilmesi için RNA izolasyonları gerçekleştirilmiştir. İzole edilen RNA örneklerinin agaroz jel görüntüleri Şekil 4.3.'te gösterilmektedir. Ayrıca spektrofotometrik ölçüm değerleri ve konsantrasyonları Çizelge 4.1' de gösterilmektedir.



Şekil 4.3. Azitromisin varlığında ve yokluğunda büyütülen *B. pertussis* Tohama-I suşundan izole edilen RNA'ların agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, K: Antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücreleri, A: Azitromisin)

Çizelge 4.1. İzole edilen RNA örneklerinin absorbens değerleri ve konsantrasyonları

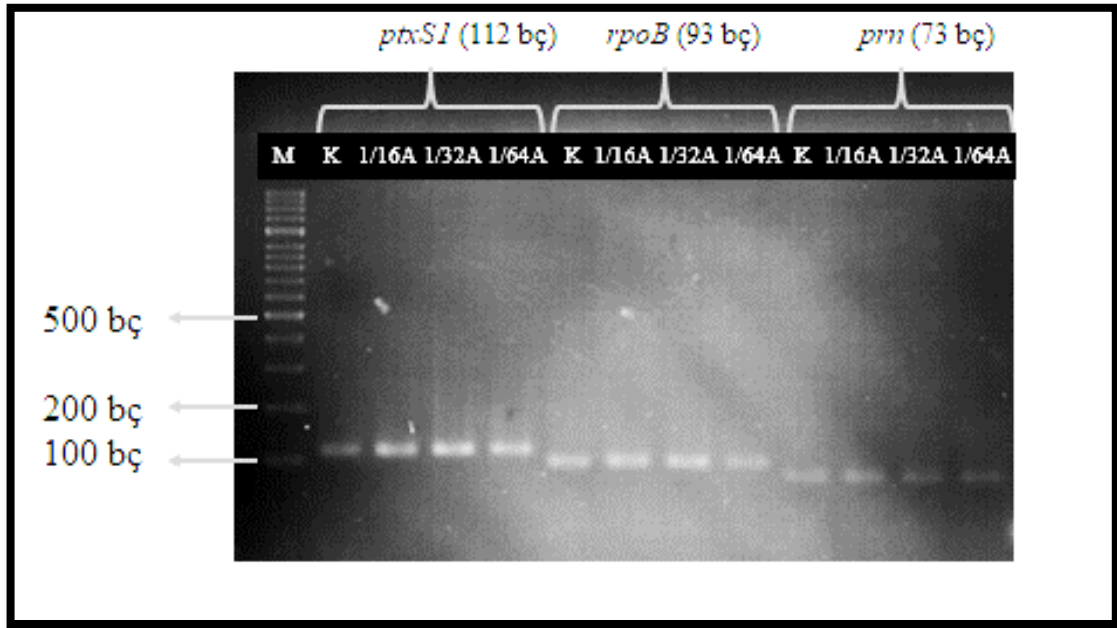
| RNA Örnekleri | Ab260/Ab280 | Ab260/Ab230 | Konsantrasyon (ng/µl) |
|------------------|-------------|-------------|-----------------------|
| Kontrol Tohama-I | 1,73 | 2,08 | 145,20 |
| 1/16 A | 1,75 | 2,10 | 407,60 |
| 1/32 A | 1,78 | 2,14 | 247,56 |
| 1/64 A | 1,78 | 2,06 | 172,31 |

(Kontrol: Antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücreleri, A: Azitromisin, Ab: Absorbans)

İzolasyonu gerçekleştirilen RNA'lardan cDNA sentezi yapılarak RT-PCR çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

4.4.2. Spesifik primerlerin özgülük testi için geleneksel polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleri

RT-PCR analizleri yapılmadan önce sentezlenen cDNA'larla *prn*, *ptxS1* ve *rpoB* genleri için hazırlanan primerlerin özgülük testleri geleneksel PCR analizleriyle kontrol edilmiştir. PCR sonuçlarına ait %3'lük agaroz jel görüntüsü Şekil 4.4.'te gösterilmektedir.



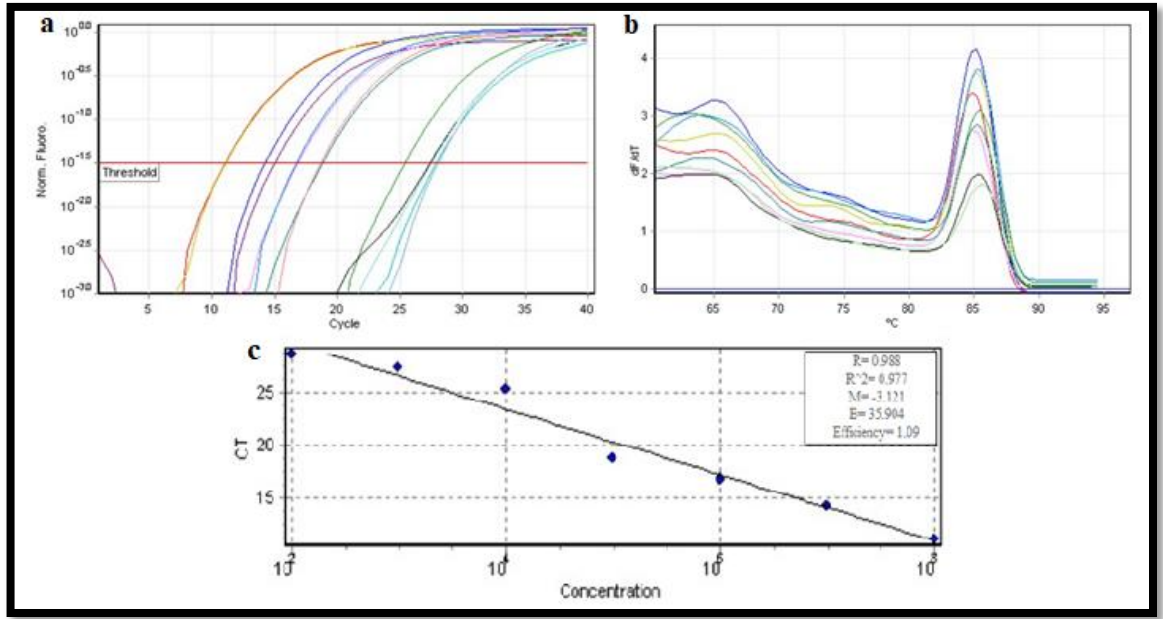
Şekil 4.4. Spesifik primerler için cDNA'larla gerçekleştirilen PCR'ye ait agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, K: Antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücreleri, A: Azitromisin, *ptxS1*: pertussis toksin S1 alt birimi, *rpoB*: RNA polimeraz B altbirim, *prn*: pertaktin)

Sentezlenen primerlerin sadece hedef gen bölgelerini çoğalttıkları görülmüştür. Bu bağlamda RT-PCR analizleri aşamasına geçilmiştir.

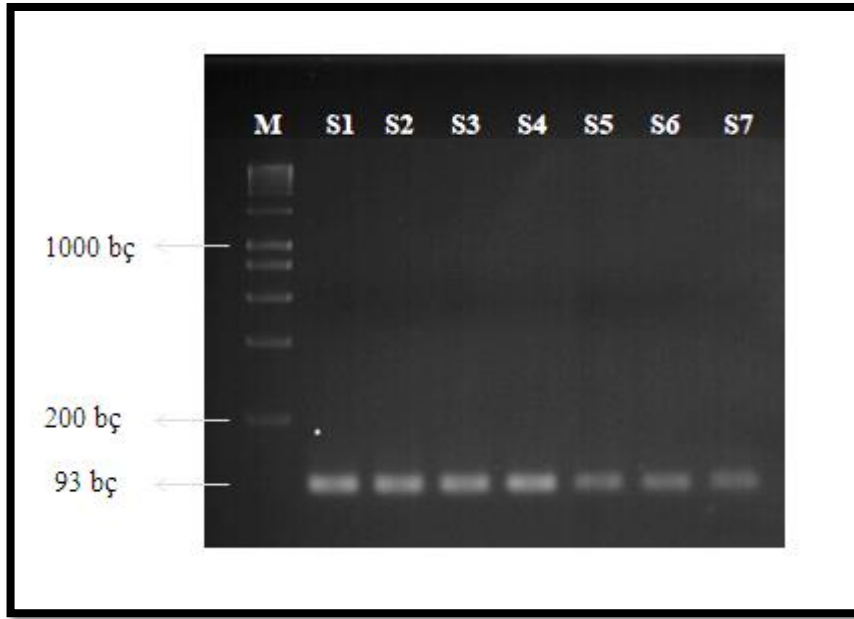
4.4.3. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu analizleri (RT-PCR)

4.4.3.1. *rpoB* gen ifadesi bulguları

RT-PCR sonuçlarına göre, erime eğrisinde standartlar aynı T_m derecesinde tepe noktası vermiştir (Şekil 4.5b). Ayrıca RT-PCR analizlerinde oluşturulan standartların eğiminin $-3.6 \leq \text{eğim} \leq -3.1$ aralığında, R^2 değerinin ise 0.98'den büyük veya eşit olması gereklidir. *rpoB* için oluşturulan standart grafiğinin R^2 değeri 0.97 ve eğimi -3.12'dir (Şekil 4.5c). Elde edilen PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde 93 bp büyüklüğünde beklenen ürünü amplifiye ettiği gözlenmiştir (Şekil 4.6.).



Şekil 4.5. *rpoB* geni için oluşturulan standartlara ait RT-PCR verileri; a) standartların gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; b) standartların erime eğrileri; c) standart eğri

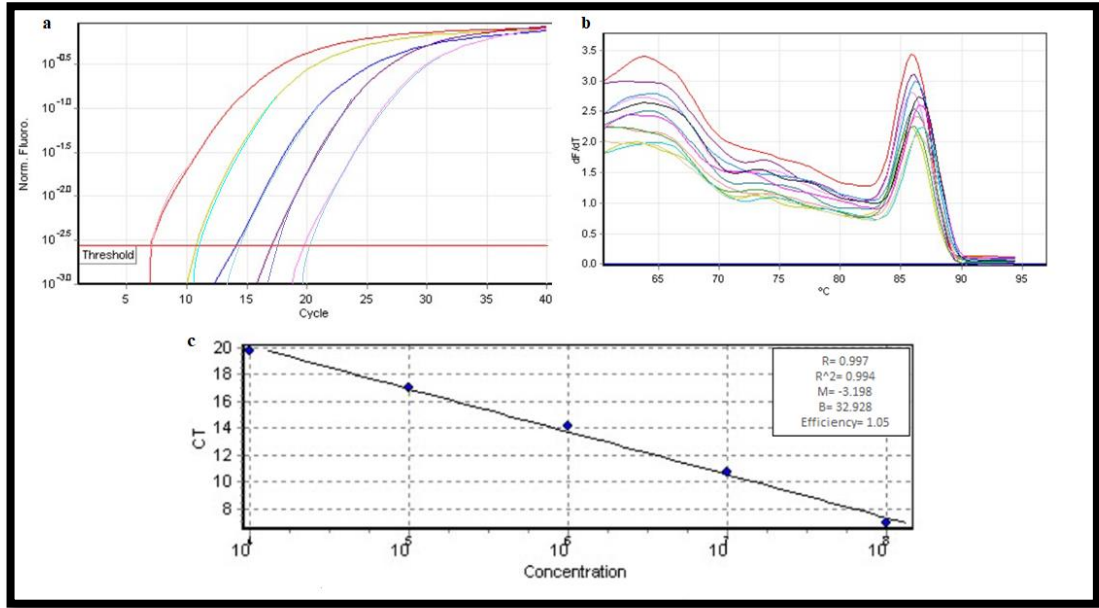


Şekil 4.6. *rpoB* geni RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, S: Standart)

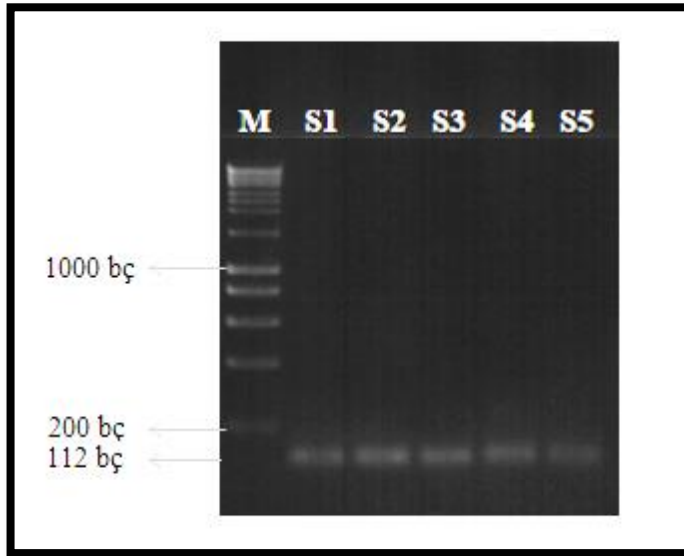
4.4.3.2. *ptxS1* gen ifadesi bulguları

RT-PCR sonuçlarına göre, erime eğrisinde standartlar aynı Tm derecesinde tepe noktası vermiştir (Şekil 4.7b.). Oluşturulan standart grafiğin R^2 değeri 0.98'den büyük (0.99) ve eğimi $-3.6 \leq \text{eğim} \leq -3.1$ aralığındadır (-3.19) (Şekil 4.7c.). Elde edilen PCR

ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde 112 baz çifti uzunluğunda beklenen ürünü amplifiye edilebildiği gözlenmiştir (Şekil 4.8.).



Şekil 4.7. *ptxS1* geni için oluşturulan standartlara ait RT-PCR verileri; a) standartların gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; b) standartların erime eğrileri; c) standart eğri

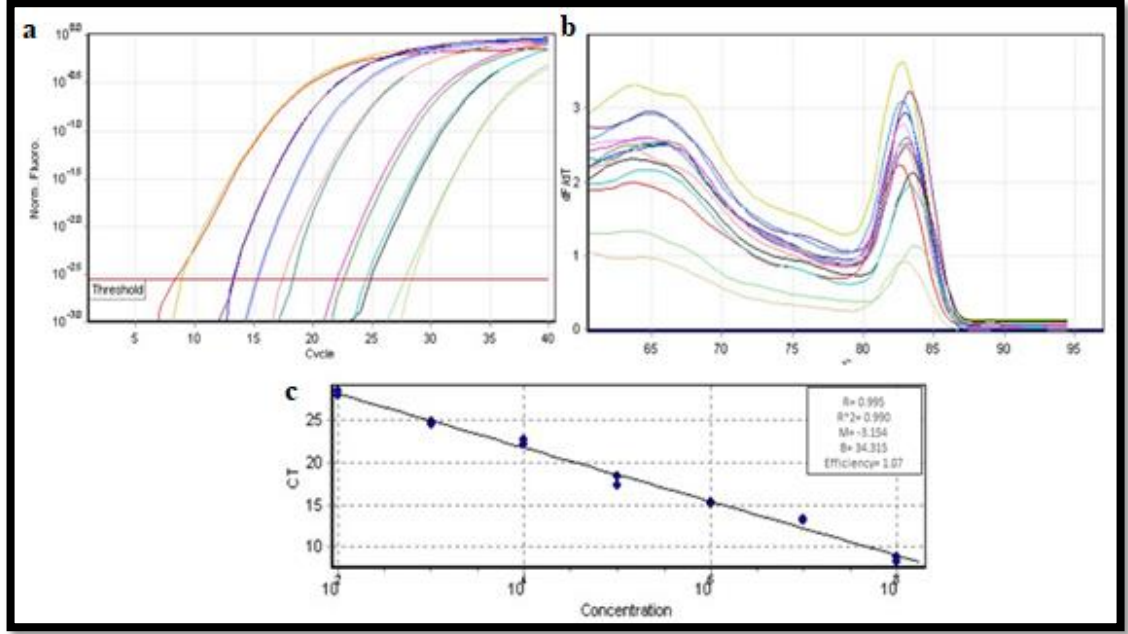


Şekil 4.8. *ptxS1* geni RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, S: Standart)

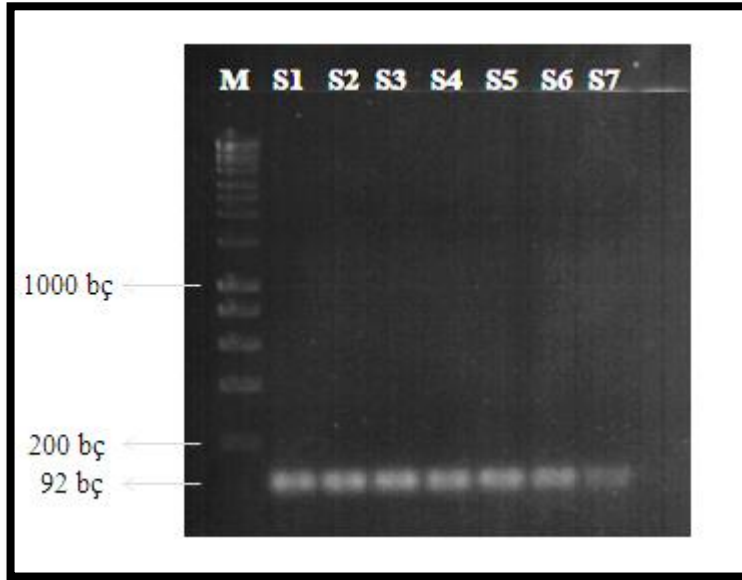
4.4.3.3. *prn* gen ifadesi bulguları

RT-PCR sonuçlarına göre, erime eğrisinde standartlar aynı T_m derecesinde tepe noktası vermiştir (Şekil 4.9b.). Oluşturulan standart grafiğın R^2 değeri 0.98'den büyük (0.99) ve eğimi $-3.6 \leq \text{eğim} \leq -3.1$ aralığındadır (-3.15) (Şekil 4.9c.). Elde edilen PCR

ürünlerinin agaroz jel elektroforezinde 73 baz çifti uzunluğunda beklenen ürünü amplifiye edilebildiği gözlenmiştir (Şekil 4.10.).



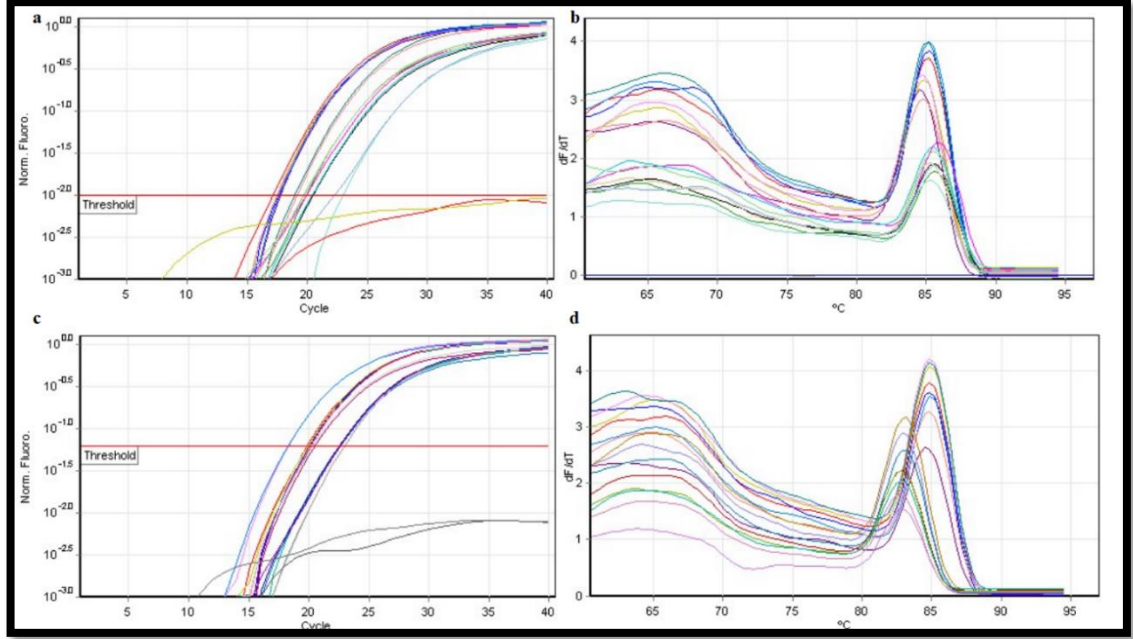
Şekil 4.9. *prn* geni için oluşturulan standartlara ait RT-PCR verileri; a) standartların gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; b) standartların erime eğrileri; c) standart eğri



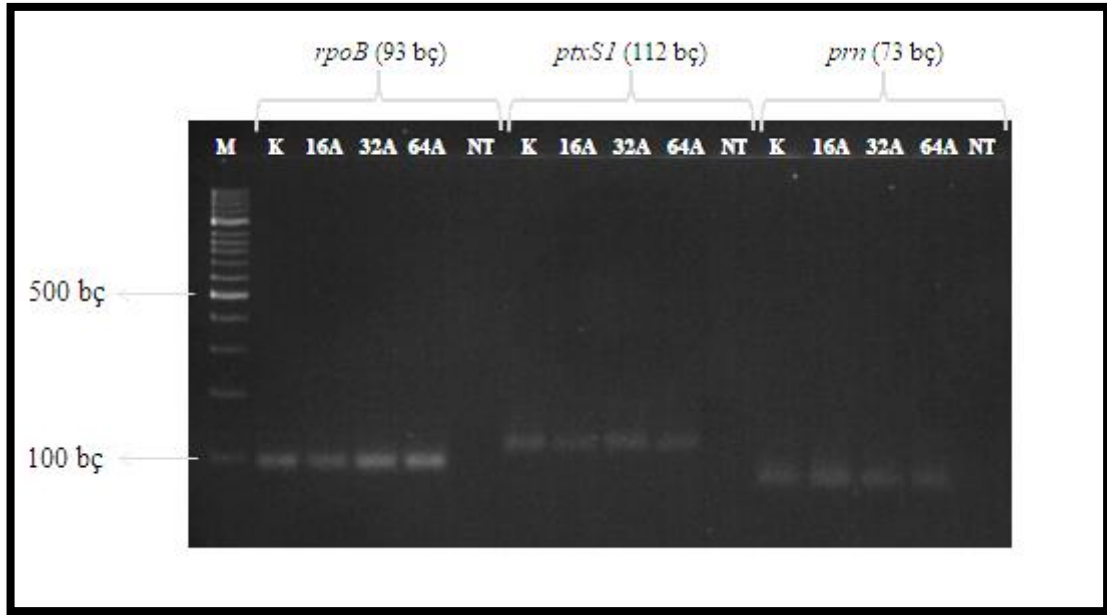
Şekil 4.10. *prn* geni RT-PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü (M: DNA Merdiveni, S: Standart)

4.4.3.4. Azitromisin sub-MİK dozlarının *ptxS1* ve *prn* ekspresyonlarına etkisinin belirlenmesi

Azitromisin antibiyotiğinin sub-MİK dozlarında büyütülen *B. pertussis* hücrelerinin *ptxS1* ve *prn* gen ekspresyonlarının belirlenebilmesi için RT-PCR analizleri yapılmıştır (Şekil 4.11. ve 4.12.).



Şekil 4.11. Antibiyotikli/antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücrelerinin *ptxS1* ve *prn* gen ekspresyonlarının RT-PCR analizleri; **a)** *ptxS1* ve *rpoB*'ye ait gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; **b)** *ptxS1* ve *rpoB*'ye ait erime eğrileri; **c)** *prn* ve *rpoB*'ye ait gerçek zamanlı amplifikasyon eğrileri; **d)** *prn* ve *rpoB*'ye ait erime eğrileri



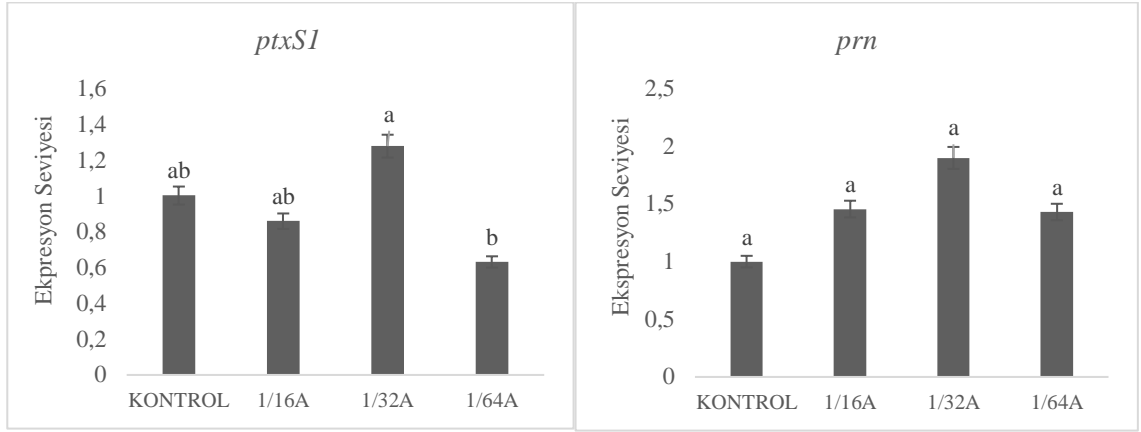
Şekil 4.12. Antibiyotikli/antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücrelerinin *rpoB*, *ptxS1* ve *prn* genlerine ait RT-PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi (M: DNA Merdiveni, K: Antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri hücreleri, A: Azitromisin, NT: şablonsuz kontrol, *rpoB*: RNA polimeraz B altbirim, *ptxS1*: pertussis toksin S1 alt birimi, *prn*: pertaktin)

RT-PCR analizleri sonucu elde edilen Ct değerleriyle yapılan hesaplamalarda (Çizelge 4.2), sub-MİK dozlardaki azitromisinin *ptxS1* ve *prn* gen ekspresyonlarına olan etkisinin değişken olduğu gözlemlenmiştir. Gen ifadeleri antibiyotik dozunun artışına paralel olarak bir artış veya azalış göstermemiştir (Şekil 4.13.).

Çizelge 4.2. Sub-MİK azitromisin varlığında *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyonlarındaki kat değişimlerinin hesaplanması

| | Ct (<i>ptxS1</i> _{OrtCt}) | Ct (<i>rpoB</i> _{OrtCt}) | Δ Ct (<i>ptxS1</i> _{Ct} - <i>rpoB</i> _{Ct}) | $\Delta\Delta$ Ct (<i>A</i> _{Ct} - <i>K</i> _{Ct}) | $2^{-\Delta\Delta$ Ct (Kat değişim) |
|--------|---|--|---|--|--|
| K | 19.6±0.51 | 17.6±0.59 | 2.0±1.08 | 0±0.15 | 1±0.10 |
| 1/16 A | 20.6±0.21 | 18.3±1.19 | 2.2±0.98 | 0.2±0.16 | 0.9±0.10 |
| 1/36 A | 19.5±0.47 | 17.8±0.36 | 1.7±0.83 | -0.3±0.27 | 1.3±0.23 |
| 1/64 A | 22.1±0.99 | 19.3±0.48 | 2.8±1.46 | 0.7±0.55 | 0.6±0.21 |
| | Ct (<i>ptxS1</i> _{OrtCt}) | Ct (<i>rpoB</i> _{OrtCt}) | Δ Ct (<i>ptxS1</i> _{Ct} - <i>rpoB</i> _{Ct}) | $\Delta\Delta$ Ct (<i>A</i> _{Ct} - <i>K</i> _{Ct}) | $2^{-\Delta\Delta$ Ct (Kat değişim) |
| K | 20.8±2.02 | 18.2±1.92 | 2.6±0.13 | 0±0.08 | 1±0.06 |
| 1/16 A | 22.1±0.48 | 20.0±0.06 | 2.1±0.45 | -0.5±0.35 | 1.5±0.36 |
| 1/36 A | 18.7±1.98 | 16.9±1.48 | 1.7±0.51 | -0.9±0.42 | 1.9±0.54 |
| 1/64 A | 21.4±1.71 | 19.3±1.09 | 2.2±0.66 | -0.4±0.57 | 1.4±0.59 |

(K: Kontrol (antibiyotiksiz ortamda büyütülen bakteri), A: Azitromisin)



Şekil 4.13. Azitromisinin sub-MİK dozlarının *B. pertussis* Tohama-I'in gen ekspresyonlarına olan etkisi. Veriler gen ekspresyonunun ortalama \pm standart sapması olarak ifade edilmiştir (Kontrol: Antibiyotiksiz bakteri hücreleri, A: Azitromisin, üst simgelerde yer alan farklı harfler istatistiksel açıdan anlamlı farklılığı temsil etmektedir ($p < 0.05$))

Sub-MİK dozların gen ekspresyonlarına olan etkileri incelendiğinde; *ptxS1* ekspresyonu MİK/32'de artmıştır. Ancak bu artış kontrol ve MİK/16'ya göre istatistiksel açıdan anlamlı bir artış değildir ($p > 0.05$). MİK/16 ile MİK/64 *ptxS1*'in ekspresyonunu azaltmıştır. Fakat bu iki sub-MİK değerlerdeki azalışların kontrolden anlamlı bir farkı olmamıştır ($p > 0.05$). *prn* ekspresyonu ise azitromisinin tüm sub-MİK'lerinde artış göstermiştir. Ancak bu artışlarda istatistiksel olarak anlamlı bir artış değildir ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA

B. pertussis boğmaca olarak bilinen akut solunum yolu hastalığının ana etkeni olan bir patojendir. Diğer bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının tedavilerinde olduğu gibi bu hastalığın tedavisinde de antibiyotik kullanılmaktadır. Bulaşıcı hastalıklar hala dünya genelindeki ölümlerin önde gelen sebeplerindendir ve bu hastalıkların tedavisi için üretilen antibiyotiklerin etkisi zamanla mikroorganizmaların antibiyotiklere geliştirdiği dirençle giderek azalmaktadır. Son zamanlarda çeşitli bakteri türlerinin klinikte kullanılan antibiyotiklere karşı artan direnç sıklığı halk sağlığını tehdit eden bir sorun haline gelmiştir. Ancak *B. pertussis*'in antibiyotik direncine ilişkin literatürde yeterli çalışma bulunmamaktadır ve şu anda *B. pertussis*'in tespit yöntemleri veya çeşitli antibiyotik direnç testlerinin sonuçları için kabul edilmiş uluslararası standartlar yoktur (Lin vd. 2021; Zhang vd. 2022). Ayrıca antibiyotiklerin sub-MİK değerlerinin *B. pertussis* üzerine olan etkisiyle ilgili herhangi bir çalışma mevcut değildir. Bu tez çalışması *B. pertussis* hücrelerinin büyüme hızı, biyofilm oluşturabilme kapasitesi, önemli virülans faktörlerinden olan *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyonlarını sub-MİK dozlarda azitromisin varlığında araştıran ilk çalışmadır.

Çalışmada öncelikle *B. pertussis*'in standart suşu Tohama-I'in azitromisine karşı MİK değeri araştırılmıştır ve bu çalışmada 0.08 µg/ml olarak belirlenmiştir. Yamaguchi vd. (2020) Japonya'da makrolidlere dirençli *B. pertussis* izolasyonuna ilişkin ilk rapor niteliğindeki çalışmalarında referans suş olarak kullandıkları Tohama-I'in azitromisin için MİK değerinin 0.064 µg/ml olduğunu bildirmiştir. Fry vd. (2010) Birleşik Krallık içindeki coğrafi olarak farklı yerlerden temin ettikleri *B. pertussis* izolatlarıyla antimikrobiyal duyarlılık çalışmaları yaparak tüm izolatlar için azitromisin MİK'lerinin 0.064 µg/ml'den düşük olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde Lönnqvist vd. (2018) *B. pertussis* suşlarının Finlandiya'daki yaygınlığını ve antimikrobiyal duyarlılıklarını belirlemek için elli *B. pertussis* izolatı ile antimikrobiyal duyarlılık testi yapmıştır. İzolatların azitromisin için MİK değerinin 0.016-0.19 µg/ml arasında olduğunu belirterek azitromisine dirençli hiçbir izolat tanımlamamışlardır. Ancak Wang vd. (2013) Çin'de boğmaca hastası çocuklardan izole ettikleri dört *B. pertussis* suşunun makrolidlere dirençli olduklarını bildirerek azitromisin, eritromisin ve klaritromisin için MİK değerlerinin 256 mg/l'den yüksek olduğunu bildirmiştir. Guo vd. (2018) Tianjin'deki *B. pertussis* izolatlarının antibiyotiklere duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmalarında azitromisine karşı direnç oranının %94.4 olduğunu bildirmiştir. Li vd. (2019) Çin'de boğmaca hastalarından izole edilen *B. pertussis* izolatlarının antibiyotiklere olan duyarlılıklarını araştırdıkları çalışmalarında 83 izolatın azitromisine dirençli olduğunu bildirmiştir. Wu vd. (2019) boğmacalı çocukların klinik özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında 36 *B. pertussis* izolatından 26'sının azitromisin ve eritromisine dirençli olduğunu (MİK >256 mg/l) bildirmiştir. Mi vd. (2021) makrolidlerin ve β-laktamların *B. pertussis*'e karşı bakterisidal etkisini araştırdıkları çalışmalarında, kullandıkları 125 izolatın 78'inin eritromisin ve azitromisine karşı dirençli olduğunu belirterek MİK değerlerinin 256 mg/l'den yüksek olduğunu bildirmiştir. Zhang vd. (2022) Batı Çin'deki 58 *B. pertussis* klinik izolatının makrolid direncini ve moleküler özelliklerini araştırdıkları çalışmalarında 46 izolatın azitromisine dirençli olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde Hua vd. (2019) antibiyotiklerin *in vitro* aktivitelerini ve klinik etkilerini değerlendirdikleri çalışmada kullandıkları 126 *B. pertussis* suşundan 95'nin eritromisin ve azitromisine karşı dirençli (MİK >256 mg/l) olduğunu, antibiyotik tedavisi görmemiş

dört hastada makrolide dirençli *B. pertussis* izolatu tespit edildiğini bildirmiştir. Eritromisin ve azitromisin gibi makrolidler boğmaca tedavisi için tercih edilen birincil antibiyotiklerdir. Ancak literatür incelemeleri göstermektedir ki bu antibiyotiklere karşı özellikle son zamanlarda dirençli *B. pertussis* suşlarının tanımlanması artış göstermektedir. Bu nedenle boğmaca suşlarında antibiyotik direncinin dikkatle izlenmesi halk sağlığı açısından oldukça önem arz etmektedir.

Antibiyotiklere karşı direnç boğmacanın yeniden ortaya çıkmasında etkili olan nedenlerden biridir (Wang vd. 2021). Bakteri hücrelerinin sub-MİK seviyelerde antibiyotiklere maruz kalması, ilgili antibiyotiğe karşı direnç geliştirmelerinde etkili olmaktadır (Liu vd. 2021). Sub-MİK antibiyotik ortamlarında, normalde antibiyotiğe duyarlı olan bakteri suşları büyümeye devam edebilmektedir. Bakterinin bu konsantrasyonlardaki büyümesi, ilgili antibiyotiğe karşı gelişen antibiyotik direncinin önemli bir yönü olabilmektedir. Bu tez çalışmasında azitromisin antibiyotiğinin 1/16, 1/32 ve 1/64 sub-MİK'lerinde *B. pertussis* hücrelerinin antibiyotik dozlarını tolere ederek büyüebildikleri gözlemlenmiştir. Literatürde sub-MİK antibiyotik dozlarının *B. pertussis* hücrelerinin büyüme hızı üzerindeki etkilerine ilişkin yeterli ve güncel çalışmalar mevcut değildir. 1983 yılında Hewlett vd., klorpromazinin *Bordetella* türleri için MİK değerini araştırmıştır ve antibiyotiğin 1/2 ve 1/4 sub-MİK'lerinin *B. pertussis* büyümesini yavaşlattığını bildirmişlerdir. Literatürde *B. pertussis* ile ilgili çalışmalar daha nadirken antibiyotiklerin sub-MİK dozlarının bakteri üremesi üzerindeki etkilerini araştıran farklı birçok bakteri ile yapılan çalışmalar vardır. Örneğin, Khayyat vd. (2021) *Proteus mirabilis*'in sub-MİK dozlarında metronidazol varlığında anti-virülans aktivitelerini değerlendirmiştir ve 1/2 ve 1/4 sub-MİK'lerin bakteri büyümesi üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını bildirmiştir. Reeks vd. (2005) klortetrasiklin ve klortetrasiklin-sülfametazin'in *Mannheimia haemolytica* ve *Haemophilus somnus* suşlarının büyüme hızına olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, antibiyotiklerin sub-MİK seviyelerinin izolatların büyümesini belirgin şekilde bozduğunu belirtmişlerdir. Chadha (2021) amoksisilinin sub-MİK'lerinin kommensal bir *E. coli* suşunun çeşitli fizyolojik tepkileri ve virülans belirleyicileri üzerindeki etkilerini incelediği çalışmasında 1/2 ve 1/4 sub-MİK seviyelerin bakteri büyüme kinetiğini önemli ölçüde değiştirdiğini, 1/8 sub-MİK seviyelerdeyse büyüme profilinin kontrole benzer olduğunu bildirmiştir. Dong vd. (2019) siprofloksasinin sub-MİK dozlarında *E. coli* klinik izolatlarının biyofilm oluşumu ve virülans faktörleri üzerindeki etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında 3/4 sub-MİK'te bakteri üremesinin olmadığını ve oluşturdukları büyüme eğrisine göre, 1/4 sub-MİK dozun hücreler üzerinde ihmal edilebilir etkilere sahip olduğunu belirterek diğer çalışmaları için bu konsantrasyonu seçtiklerini belirtmişlerdir. Chadha ve Khullar (2021) nalidiksik asidin sub-MİK'lerinin *E. coli*'nin büyüme hızı, bakteriyel hareketlilik, biyofilm oluşumu ve dış zar proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 1/2 sub-MİK'in büyüme kinetiğini önemli derecede etkilediğini 1/4 ve 1/8 sub-MİK'in büyüme kinetiğinde kontrole göre önemli bir değişiklik göstermediğini bildirmiştir. Feng vd. (2021) sub-MİK dozlardaki seftazidimin üropatojenik *E. coli*'nin patojenitesine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 1/2 sub-MİK'in bakteri üremesini etkilediğini, 1/4 ve 1/8 sub-MİK'lerdeyse bakteri büyümesinin kontrol grubuyla hiçbir farklılık göstermediğini, bu nedenle diğer çalışmalarında 1/4 sub-MİK değerle çalıştıklarını belirtmişlerdir. Benzer şekilde bu tez çalışmasında da *B. pertussis* hücreleri 1/2, 1/4 ve 1/8 sub-MİK'leri tolere edememiş ve deneysel açıdan yeterli konsantrasyonlara ulaşamamıştır. Bu nedenle *B. pertussis* hücreleri için azitromisinin

sub-MİK dozları 1/16, 1/32 ve 1/64 olarak belirlenmiştir ve bu dozların bakteri hücrelerinin biyofilm oluşturabilme kapasitesi ile gen ekspresyonlarına olan etkileri araştırılmıştır.

Antibiyotiklerin sub-MİK dozları bakteri fizyolojisinde ve davranışında değişikliklere neden olarak bakteriyel virülansın düzenlenmesini etkilemektedir (Ranieri vd. 2018). Sub-MİK'lerin bakteriyel virülansı düzenlemesi çeşitli yaşam süreçlerini içermektedir ve biyofilm oluşumunun uyarılması veya inhibe edilmesi bu süreçlerden biridir (Liu vd. 2021). Bu tez çalışmasında azitromisin sub-MİK değerleri *B. pertussis*'in biyofilm oluşturabilme kapasitesini kontrole göre önemli derecede azaltmıştır. Antibiyotiklerin 1/16 ile 1/32 sub-MİK'lerinde ve 1/32 ile 1/64 sub-MİK'lerinde bakterinin biyofilm üretebilme yetenekleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmamıştır ($p>0.05$). Antibiyotiklerin sub-MİK dozlarının *B. pertussis* hücrelerinin biyofilm oluşturabilme kapasitesi üzerine olan etkileriyle ilgili henüz mevcut bir çalışma bulunmamaktadır. Ancak farklı birçok bakteri türleriyle gerçekleştirilen çalışmalar mevcuttur ve antibiyotiklerin sub-MİK dozlarının çeşitli bakteri türlerinin biyofilm oluşturabilme kapasitelerine olan etkileri araştırılmıştır. Örneğin, Bahari vd. (2017) sub-MİK dozlardaki azitromisin, gentamisin ve kurkuminin *Pseudomonas aeruginosa* hücrelerine etkileriyle ilgili yaptıkları çalışmada, 1/4 ve 1/16 sub-MİK'lerin bakterinin biyofilm oluşturma kapasitesini önemli derecede azalttığını ve antibiyotik dozunun miktarındaki artışa paralel olarak biyofilm oluşumunda azalma olduğunu bildirmiştir. Sun vd. (2020) sub-MİK dozlardaki seftazidimin *E. coli*'nin biyofilm oluşturabilme kabiliyetine olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında, 1/2 ve 1/16 sub-MİK dozlar arasındaki seftazidimin doza bağlı bir şekilde *E. coli*'nin biyofilm oluşumunu azalttığını bildirmişlerdir. Khayyat vd. (2021) metronidazolün *P. mirabilis*'in anti-virülans aktiviteleri üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında 1/2 ve 1/4 sub-MİK değerlerin *P. mirabilis*'in büyümesi üzerinde önemli bir etkisinin olmadığını ancak bakterinin biyofilm oluşumunu önemli derecede azalttığını bildirmiştir. Feng vd. (2021) sub-MİK dozlardaki seftazidimin üropatojenik *E. coli*'nin patojenitesine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 1/4 sub-MİK değerinde antibiyotik biyofilm oluşumunu önemli ölçüde engelleyebildiğini bildirmiştir.

Antibiyotiklerin sub-MİK dozları bakterilerin biyofilm oluşturabilme yeteneklerinin azalmasında her zaman etkili değildir. Bazı çalışmalar sub-MİK dozlarının çeşitli bakteri türlerinde biyofilm oluşumunu indüklediğini bildirmiştir. Örneğin, Liu vd. (2020) sub-MİK dozdaki norfloksasinin *Streptococcus suis*'in biyofilm oluşumuna ve virülans gen ekspresyonuna etkisini inceledikleri çalışmada, antibiyotiklerin 1/4 sub-MİK dozunda bakterinin daha fazla biyofilm oluşturduğunu ve bu dozdaki biyofilmlerin daha fazla canlı bakteri içerdiğini bildirmiştir. Yousefpour vd. (2021) *P. aeruginosa* klinik izolatlarının gentamisin sub-MİK dozlarında biyofilm oluşturabilme kapasitesini değerlendirdikleri çalışmada, 1/2 ve 1/4 sub-MİK'te izolatların %31.3'ünün biyofilm oluşturabilme yeteneğinde önemli derecede artış olduğunu bildirmişlerdir. Bernardi vd. (2021) penisilin G, amoksisilin, doksisisiklin, fosfomisin, tetrasiklin ve vankomisin sub-MİK dozlarında *Enterococcus faecalis* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneklerini araştırmıştır ve antibiyotiklerin sub-MİK dozlarında bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin %50'den fazla arttığını bildirmişlerdir. Chadha (2021) amoksisilinin sub-MİK'lerinin kommensal bir *E. coli* suşunun çeşitli fizyolojik tepkileri ve virülans belirleyicileri üzerindeki etkilerini incelediği çalışmasında, bakterinin 1/4 ve 1/8 sub-

MİK'lerde kontrolle benzer veya daha zayıf biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir. Ancak 1/2 sub-MİK'in *E. coli* hücrelerinde güçlü biyofilm oluşumuna neden olduğunu ve bakterinin biyofilm oluşumunu desteklediğini belirtmiştir.

Antimikrobiyal ajanların sub-MİK dozları bakterilerde genetik değişikliklere yol açabilmektedir. Bu dozlar bakteriyel stresle ilgili genlerin ekspresyonunu etkileyerek bakterinin antibiyotik direnci geliştirebilmesine neden olabilmektedir (da Silva Ribeiro vd. 2020). Ayrıca mutasyon, rekombinasyon ve yanal gen transferi dahil olmak üzere direncin kazanılması veya üretilmesi ile ilgili süreçleri etkilemektedirler (Andersson ve Hughes 2012; Chow vd. 2015; Martinez 2009). Bu nedenle sub-MİK dozların bakterilerin gen ekspresyonlarına olan etkilerinin araştırılması önemlidir. Ancak *B. pertussis*'in sub-MİK antibiyotik dozlarında gen ifadelerine yönelik henüz mevcut bir çalışma bulunmamaktadır. Bu tez çalışmasında ise azitromisin sub-MİK dozlarında *B. pertussis*'e önemli virülans özellikler kazandıran Pt ve Prn'e ait *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyeleri araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre bu genlerin ekspresyonları antibiyotik dozundaki artışa paralel olarak artış veya azalış göstermemiştir. MİK/32 azitromisin, MİK/16 ve MİK/64 azitromisine göre her iki genin de ekspresyonunu kontrole göre arttırmıştır. Ancak bu artış istatistiksel olarak kontrolden farklı olmamıştır ($p>0.05$). Ayrıca MİK/16 ve MİK/64 *prn* ekspresyonunda kontrole göre artışa neden olurken *ptxS1* ekspresyonunda ise azalmaya neden olmuştur, fakat bu artış ve azalmalar istatistiksel açıdan anlamlı olmamıştır ($p>0.05$).

Bu tez çalışmasıyla benzer olarak antibiyotiklerin sub-MİK'lerinin birçok bakteri türünün virülans faktörlerine olan etkisiyle ilgili yapılan çalışmalar mevcuttur ve sub-MİK'lerin gen ekspresyonunu arttırabileceği veya azaltabileceği bildirilmiştir. Örneğin Sadredinamin vd. (2022) sub-MİK azitromisin ve siprofloksasin dozlarının *Shigella* serogruplarında çeşitli virülans faktörleri üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmada, serotip 4a'da *icsA* geninin ekspresyon seviyesinin arttığını ve diğer *virF* yolundaki genlerin ise ekspresyonunda azalma olduğunu bildirmiştir. Shamsan vd. (2022), siprofloksasin ve azitromisinin sub-MİK dozlarının *Shigella flexneri* ve *E. coli* üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında siprofloksasinin tüm dozlarında *virF* geninin ortalama ekspresyonunun hem *S. flexneri* hem de *E. coli*'de arttığını, azitromisinin sub-MİK'lerindeyse azaldığını bildirmiştir. Davarzani vd. (2021) *P. aeruginosa*'nın sub-MİK'lerdeki gentamisin varlığında aljinat üretimi ve biyofilm oluşumunda yer alan genlerinin ekspresyonlarını araştırdıkları çalışmalarında, bazı suşlarda sub-MİK'lerde (1/2 ve 1/4) aljinat ve biyofilm kodlayan genlerinin ekspresyon seviyelerinde önemli ölçüde azalma olduğunu bazı suşlarda ise artış olduğunu bildirmiştir. Atshan vd. (2021) daptomisin ve tigesiklin sub-MİK'lerinin *S. aureus*'un biyofilm yapışma faktörleri ve ekzoprotein ifadeleri üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmalarında, spesifik olarak çalıştıkları genlerin ekspresyon seviyelerinde bazı suşlarda artış bazılarında azalma olduğunu bildirmiştir. Dong vd. (2019) siprofloksasinin sub-MİK'lerinin *E. coli* klinik izolatlarının biyofilm oluşumu ve virülans faktörleri üzerindeki etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, 1/4 sub-MİK'te virülans ve biyofilm oluşum genlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. Chadha (2021) amoksisilin sub-MİK'lerinin kommensal bir *E. coli* suşunun çeşitli fizyolojik tepkileri ve virülans belirleyicileri üzerindeki etkilerini incelediği çalışmada, 1/2 sub-MİK'te bakterinin hücre yapışma kabiliyetlerini arttıran ve böylece bağırsak mikroküresi içinde kolonizasyon ve hayatta kalma yeteneğini arttıran bir dış zar proteinin ekspresyon

seviyesinde artış olduğunu bildirmiştir. Chadha ve Khullar (2021) nalidiksik asidin sub-MİK'lerinin *E. coli*'nin büyüme hızı, bakteriyel hareketlilik, biyofilm oluşumu ve dış zar proteinlerinin ekspresyonu üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 1/2 sub-MİK'in dış zar protein ekspresyonunu farklı şekillerde düzenlediğini ve molekül ağırlığı 26.12 kDa (P26) olan bir proteinin kontrole göre aşırı eksprese edildiğini bildirmişlerdir. Feng vd. (2021) sub-MİK dozlardaki seftazidiminin üropatojenik *E. coli*'nin patojenitesine olan etkilerini araştırdıkları çalışmalarında, 1/4 sub-MİK'in bakterinin virülansı ve biyofilm oluşumu için önemli olan adezyon genlerinin, motilite genlerinin, toksin geninin ve sinyal molekülü sentez genlerinin ekspresyon seviyelerinde azalmayı sağladığını bildirmiştir. Ancak indol-sentez geni *tnaA*'nin ekspresyonunda artışa neden olduğunu belirtmişlerdir. Liu vd. (2020) sub-MİK dozdaki norfloksasinin *S. suis*'in biyofilm oluşumuna ve virülans gen ekspresyonuna etkisini inceledikleri çalışmada, 1/4 sub-MİK'te virülans genlerden *cps*, *ef*, *sly*, *gdh* ve *gapdh*'nin ekspresyon seviyesinde artış olurken *mrp* gen ifadesinde azalma olduğunu belirterek antibiyotığın sub-MİK değerlerinin bakterinin virülans gen ekspresyonunu etkilediğini bildirmişlerdir.

Antibiyotikler bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmede önemli tedavi yöntemlerindedir. Ancak son zamanlarda çeşitli antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç oranlarının arttığıyla ilgili çalışmaların yaygınlık kazanması halk sağlığını tehdit etmesi açısından oldukça önemlidir. Bu soruna çözüm yolları bulabilmek için yeni terapötik stratejiler geliştirmek gereklidir ve yeni terapötik stratejilerin önemli özelliklerinden biri de bakterilerin virülans faktörlerini hedeflemektir (Aleanizy vd. 2021).

6. SONUÇLAR

Bu çalışma son yıllarda artan vaka sayılarıyla yeniden yükselişe geçen boğmaca hastalığının etkeni *B. pertussis*'in sub-MİK antibiyotik dozlarındaki büyüme hızı, biyofilm oluşumu, boğmacanın oluşabilmesinde önemli etkileri olan *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyelerine olan etkisinin araştırılması açısından ilk çalışma niteliğindedir ve önemlidir. Azitromisin özelinde gerçekleştirilen bu çalışmada *B. pertussis* hücrelerinin, antibiyotiğin sub-MİK'lerinde büyüme hızının yavaşladığı, biyofilm oluşturabilme kapasitesinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca bu antibiyotiğin MİK/32 dozu *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyelerinde artışa neden olurken MİK/16 ve MİK/64 dozlarında *ptxS1* geninin ekspresyon seviyesini azaltıp *prn*'in ekspresyon seviyesinde artışa neden olduğu gözlemlenmiştir. Daha önceki çalışmalar antibiyotiklerin sub-MİK dozlarının çeşitli enfeksiyonlara karşı konakçı savunmasına yardım edecek antimikrobiyal etkiyi sağlayabildiğini bildirmiştir. Bu konsantrasyonların, bakteri hücre duvarında değişiklik, mikrobiyal yapışmada ve biyofilm oluşturabilme yeteneğinde azalma, fagositik aktivitenin artışı ve bakteriyel toksinlerin salınımının azalmasında etkili olduğu gösterilmiştir. *B. pertussis* enfeksiyonlarına karşı kullanılan antibiyotiklerin sub-MİK dozlarının *B. pertussis*'in biyofilm oluşumu üzerine etkilerinin araştırılmasıyla beraber biyofilm oluşumu ile ilişkili sistemlerinin araştırılarak daha iyi anlaşılması, ayrıca hastalık yapmada etkili olan virülans genlerinin sub-MİK antibiyotik dozlarındaki ekspresyon seviyelerindeki değişiminin daha ayrıntılı araştırılması yeni tedavi yaklaşımlarının bulunmasına olanak sağlayacak ve boğmacayla mücadelede farklı seçenekler sunabilecektir.

Sonuç olarak azitromisin gibi *B. pertussis* enfeksiyonlarına yönelik kullanılan antimikrobiyallerin doz aralıklarının değerlendirilmesi klinik uygulamalarda gerek bakteriyel direncin oluşabilmesi gerekse bakteriye karşı etkili bir strateji oluşturulabilmesi açısından önem arz etmektedir. Bu tez çalışması ise bu amaçla gerçekleştirilmiş öncül bir çalışmadır. Ayrıca daha sonra gerçekleştirilecek bilimsel çalışmalar için klavuz olarak kullanılabilir. Antimikrobiyal ajanların sub-MİK dozlarının boğmacanın tedavi sürecine olan etkileri hakkında yeterli bilgi sağlayabilmek amacıyla bu tez çalışmasında elde edilen sonuçların daha fazla sayıda izolatın dahil edildiği geniş ölçekli çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir. Ayrıca sub-MİK ortamlarda büyüyen *B. pertussis*'in biyofilm üretim sürecinde önemli rol alan sistemlerle virülans faktörlerinin ekspresyon düzenlerinin moleküler yöntemlerle araştırılması tedavide yeni gen hedeflerinin belirlenmesini, tedavi stratejilerini ve başarısını olumlu yönde etkileyebileceğini ve etkin tedavi yaklaşımının planlanması açısından önemli olacağını düşünmekteyiz.

7. KAYNAKLAR

- Abu-Raya, B. 2020. Extending timing of immunization against pertussis during pregnancy and protection of premature infants from whooping cough disease. *Clinical Infectious Diseases*, 73(9): e2509-e2511.
- Akbaş, Ö. T., Aliefendioğlu, D., Şanlı, C., Kurt, G. 2012. Bir Olgu Nedeniyle Yenidoğanda Ölümcül Seyirli Boğmaca Enfeksiyonu. *Kırıkkale Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 14(1): 30-32.
- Aleanizy, F. S., Alqahtani, F. Y., Eltayb, E. K., Alrumikan, N., Almebki, R., Alhossan, A., Almangour, T. A., AlQahtani, H. 2021. Evaluating the effect of antibiotics sub-inhibitory dose on *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing dependent virulence and its phenotypes. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 28(1): 550-559.
- Andersson, D. I. and Hughes, D. 2012. Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug resistance updates*, 15(3): 162-172.
- Andersson, D. I. and Hughes, D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology*, 12(7): 465-478.
- Anonim: <https://www.tipacilar.com/bordetella-pertussis/> [Son erişim tarihi: 18.04.2023].
- Aoyama, T., Sunakawa, K., Iwata, S., Takeuchi, Y., Fujii, R. 1996. Efficacy of shortterm treatment of pertussis with clarithromycin and azithromycin. *The Journal of pediatrics*, 129(5): 761-764.
- Atshan, S. S., Hamat, R. A., Coolen, M. J., Dykes, G., Sekawi, Z., Mullins, B. J., Than Lung, L. T., Abduljaleel, S. A., Kicic, A. 2021. The role of subinhibitory concentrations of daptomycin and tigecycline in modulating virulence in staphylococcus aureus. *Antibiotics*, 10(1): 39.
- Bahari, S., Zeighami, H., Mirshahabi, H., Roudashti, S., Haghi, F. 2017. Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing by subinhibitory concentrations of curcumin with gentamicin and azithromycin. *Journal of global antimicrobial resistance*, 10: 21-28.
- Bakheit, A. H., Al-Hadiya, B. M., Abd-Elgalil, A. A. 2014. Azithromycin. *Profiles of drug substances, excipients and related methodology*, 39: 1-40.
- Barkoff, A. M., Knuutila, A., Mertsola, J., He, Q. 2021. Evaluation of Anti-PT Antibody Response after Pertussis Vaccination and Infection: The Importance of Both Quantity and Quality. *Toxins*, 13(8): 508.
- Belcher, T., MacArthur, I., King, J. D., Langridge, G. C., Mayho, M., Parkhill, J., Preston, A. 2020. Fundamental differences in physiology of *Bordetella pertussis* dependent on the two-component system Bvg revealed by gene essentiality studies. *Microbial Genomics*, 6(12): mgen000496.
- Belcher, T., Dubois, V., Rivera-Millot, A., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F. 2021. Pathogenicity and virulence of *Bordetella pertussis* and its adaptation to its strictly human host. *Virulence*, 12(1): 2608-2632.
- Bento, A. I., Taujale, R., Schot, C., Bosch, T., Mariman, R., King, A. A., Rohani, P. 2019. Phylodynamics of pertussis in the vaccine era: transition to

- reemergence. *medRxiv*, 19012138.
- Bernardi S, Anderson A, Macchiarelli G, Hellwig E, Cieplik F, Vach K, Al-Ahmad A. 2021. Subinhibitory antibiotic concentrations enhance biofilm formation of clinical *Enterococcus faecalis* isolates. *Antibiotics*. 10 (7): 874.
- Bibova, I., Skopova, K., Masin, J., Cerny, O., Hot, D., Sebo, P., Vecerek, B. 2013. The RNA chaperone Hfq is required for virulence of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 81(11): 4081-4090.
- Bosch, A., Serra, D., Prieto, C., Schmitt, J., Naumann, D., Yantorno, O. 2006. Characterization of *Bordetella pertussis* growing as biofilm by chemical analysis and FT-IR spectroscopy. *Applied microbiology and biotechnology*, 71: 736-747.
- Boursaux-Eude, C. and Guiso, N. 2000. Polymorphism of Repeated Regions of Pertactin in *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis*, and *Bordetella bronchiseptica*. *Infection and Immunity*, 68(12): 7214.
- Burnham-Marusich, A. R. et al. 2020. Tracheal colonization factor A (TcfA) is a biomarker for rapid and specific detection of *Bordetella pertussis*. *Scientific reports*, 10(1): 1-11.
- Burns, D. L. 2021. Secretion of Pertussis Toxin from *Bordetella pertussis*. *Toxins*, 13(8): 574.
- Cagney, M., Macintyre, C. R., McIntyre, P., Torvaldsen, S., Melot, V. 2005. Cough symptoms in children aged 5–14 years in Sydney, Australia: non-specific cough or unrecognized pertussis? *Respirology*, 10(3): 359-364.
- Cattelan, N., Dubey, P., Arnal, L., Yantorno, O. M., Deora, R. 2016. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(1): ftv108.
- Center for Disease Control And Prevention (CDC). Reporting pertussis cases. <https://www.cdc.gov/pertussis/surv-reporting.html> [Son erişim tarihi: 11.05.2023].
- Cecil, J. D., Sirisaengtaksin, N., O'Brien-Simpson, N. M., Krachler, A. M. 2019. Outer membrane vesicle-host cell interactions. *Microbiology spectrum*, 7(1): 7-1.
- Chadha, J. 2021. In vitro effects of sub-inhibitory concentrations of amoxicillin on physiological responses and virulence determinants in a commensal strain of *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*, 131(2): 682-694.
- Chadha, J. and Khullar, L. 2021. Subinhibitory concentrations of nalidixic acid alter bacterial physiology and induce anthropogenic resistance in a commensal strain of *Escherichia coli* in vitro. *Letters in Applied Microbiology*, 73(5): 623-633.
- Chen, Q. and Stibitz, S. 2019. The BvgASR virulence regulon of *Bordetella pertussis*. *Current opinion in microbiology*, 47: 74-81.
- Chen, Q., Boucher, P. E., Stibitz, S. 2020. Multiple weak interactions between BvgA~P and ptx promoter DNA strongly activate transcription of pertussis toxin genes in *Bordetella pertussis*. *PLoS pathogens*, 16(5): e1008500.
- Chen, Q., Gray, M. C., Hewlett, E., Stibitz, S. 2021. Four single-basepair mutations in

- the ptx promoter of *Bordetella bronchiseptica* are sufficient to activate the expression of pertussis toxin. *Scientific reports*, 11(1): 1-16.
- Cherry, J. D., Brunell, P. A., Golden, G. S., Karzon, D. T. 1988. Report of the task force on pertussis and pertussis immunization. *Pediatrics*, 81(6): 933-984.
- Cherry, J. D. 1996. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 174(Supplement_3): S259-S263.
- Chetri, S., Singha, M., Bhowmik, D., Nath, K., Chanda, D. D., Chakravarty, A., Bhattacharjee, A. 2019. Transcriptional response of OmpC and OmpF in *Escherichia coli* against differential gradient of carbapenem stress. *BMC research notes*, 12(1): 1-6.
- Choi, J. H. et al. 2022. Improving vaccination rates in older adults and at-risk groups: focus on pertussis. *Aging clinical and experimental research*, 1-8.
- Cimolai, N. 2021. Pharmacotherapy for *Bordetella pertussis* infection. II. A synthesis of clinical sciences. *International journal of antimicrobial agents*, 57(3): 106257.
- Clantin, B., Delattre, A. S., Rucktooa, P., Saint, N., Méli, A. C., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F., Villeret, V. 2007. Structure of the membrane protein FhaC: a member of the Omp85-TpsB transporter superfamily. *Science*, 317(5840): 957-961.
- CLSI. (2006). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards, seventh edition. Clinical and Laboratory Standards Institute document M7-A7 [ISBN 156238-587-9]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Conover, M. S., Sloan, G. P., Love, C. F., Sukumar, N., Deora, R. 2010. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Molecular microbiology*, 77(6): 1439-1455.
- Cotter, P. A. and Jones, A. M. 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends in microbiology*, 11(8): 367-373.
- Coutte, L., Antoine, R., Drobecq, H., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F. 2001. Subtilisin-like autotransporter serves as maturation protease in a bacterial secretion pathway. *The EMBO journal*, 20(18): 5040-5048.
- Cowell, J. L., Hewlett, E. L., Manclark, C. R. 1979. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infection and immunity*, 25(3): 896-901.
- Çolak, Ç. Y. ve Tefon Öztürk, B. E. 2022. *Bordetella pertussis* and outer membrane vesicles. *Pathogens and Global Health*, 1-14.
- Crowcroft, N. S. and Pebody, R. G. 2006. Recent developments in pertussis. *The Lancet*, 367(9526): 1926-1936.
- Cundell, D. R., Kanthakumar, K., Taylor, G. W., Goldman, W. E., Flak, T., Cole, P. J., Wilson, R. 1994. Effect of tracheal cytotoxin from *Bordetella pertussis* on human neutrophil function in vitro. *Infection and immunity*, 62(2): 639-643.

- da Silva Ribeiro, Á. C., da Silva Martins, W. M. B., da Silva, A. A., Gales, A. C., Rando, D. G. G., da Rocha Minarini, L. A. 2020. Exposure to sub-inhibitory ciprofloxacin and nitrofurantoin concentrations increases recA gene expression in uropathogenic *Escherichia coli*: The role of RecA protein as a drug target. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 146: 105268.
- Davarzani, F., Yousefpour, Z., Saidi, N., Owlia, P. 2021. Different effects of sub-minimum inhibitory concentrations of gentamicin on the expression of genes involved in alginate production and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Microbiology*, 13(6): 808-816.
- Dallar, F. 2020. Boğmaca Toksini Bağlamında ADP Ribozilasyonu Mekanizmasının Kuramsal ve Deneysel Metotlarla İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, 51 s.
- De Gouw, D., Diavatopoulos, D. A., Bootsma, H. J., Hermans, P. W. M., Mooi, F. R. 2011. Pertussis: a matter of immune modulation. *Federation of European Microbiological Society Microbiology Reviews*, 35(3): 441–74.
- Debrie, A. S., Mielcarek, N., Lecher, S., Roux, X., Sirard, J. C., Loch, C. 2019. Early protection against pertussis induced by live attenuated *Bordetella pertussis* BPZE1 depends on TLR4. *The Journal of Immunology*, 203(12): 3293-3300.
- Decker, M. D. and Edwards, K. M. 2021. Pertussis (Whooping Cough). *The Journal of infectious diseases*, 224(Supplement_4): S310-S320.
- Della Torre, J. A. G. and Benevides, G. N. 2015. Pertussis: the resurgence of a public health threat. *Autopsy & case reports*, 5(2): 9.
- Demir, M., Cevahir, N., Kaleli, İ. 2007. Siprofloksasinin sub-minimal inhibitör konsantrasyonlarının *Escherichia coli* suşlarının hemaglutinasyon özellikleri üzerine etkisinin araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 37(4): 192-195.
- Dewan, K. K., Linz, B., DeRocco, S. E., Harvill, E. T. 2020. Acellular pertussis vaccine components: today and tomorrow. *Vaccines*, 8(2): 217.
- Dhabaan, G. N., AbuBakar, S., Cerqueira, G., M. Al-Haroni, M., Pang, S. P., Hassan, H. 2016. Imipenem treatment induces expression of important genes and phenotypes in a resistant *Acinetobacter baumannii* isolate. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(3): 1370-1376.
- Di Camillo, C., Vittucci, A. C., Antilici, L., Ciarlito, C., Linardos, G., Concato, C., Lancella, L., Villani, A. 2021. Pertussis in early life: underdiagnosed, severe, and risky disease. A seven-year experience in a pediatric tertiary-care hospital. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(3): 705-713.
- Dieltjens, L., Appermans, K., Lissens, M., Lories, B., Kim, W., Van der Eycken, E. V., Foster, K. R., Steenackers, H. P. 2020. Inhibiting bacterial cooperation is an evolutionarily robust anti-biofilm strategy. *Nature communications*, 11(1): 1-11.
- Di Mattia, G., Nicolai, A., Frassanito, A., Petrarca, L., Nenna, R., Midulla, F. 2019. Pertussis: New preventive strategies for an old disease. *Paediatric respiratory reviews*, 29: 68-73.
- Dindar Kafes, F. 2011. Genç Erişkin Bireylerde *B. Pertussis* Seroprevalansının

- Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 61 s.
- Dong, G., Li, J., Chen, L., Bi, W., Zhang, X., Liu, H., Zhou, T., Cao, J. 2019. Effects of sub-minimum inhibitory concentrations of ciprofloxacin on biofilm formation and virulence factors of *Escherichia coli*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 23(1): 15-21.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2): 167-193.
- Dorji, D., Graham, R. M., Richmond, P., Keil, A., Mukkur, T. K. 2016. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian *Bordetella pertussis* clinical isolates. *Biofouling*, 32(9): 1141-1152.
- Dubois, V. and Loch, C. 2021. Mucosal Immunization Against Pertussis: Lessons From the Past and Perspectives. *Frontiers in Immunology*, 12: 2262.
- Emsley, P., Charles, I. G., Fairweather, N. F., Isaacs, N. W. 1996. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P. 69 pertactin. *Nature*, 381(6577): 90-92.
- Erik, Ece H., Fadıloğlu, E., Haşçelik, G., Akin, L. 2021. Evaluation of pertussis antibody levels and related factors in maternal and cord blood. *European Journal of Public Health*, 31(Supplement_3): ckab165-464.
- Esposito, S. and Principi, N. 2016. Immunization against pertussis in adolescents and adults. *Clinical Microbiology and Infection*, 22: S89-S95.
- Fedele, G., Bianco, M., Debie, A. S., Loch, C., Ausiello, C. M. 2011. Attenuated *Bordetella pertussis* vaccine candidate BPZE1 promotes human dendritic cell CCL21-induced migration and drives a Th1/Th17 response. *The Journal of Immunology*, 186(9): 5388-5396.
- Fernandez, R. C. and Weiss, A. A. 1996. Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 40(4): 1041-1043.
- Feng, W., Zhang, L., Yuan, Q., Wang, Y., Yao, P., Xia, P., Sun, F. 2021. Effect of sub-minimal inhibitory concentration ceftazidime on the pathogenicity of uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*, 151: 104748.
- Flemming, H. C., and Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9): 623-633.
- Fry, N. K., Duncan, J., Vaghji, L., George, R. C., Harrison, T. G. 2010. Antimicrobial susceptibility testing of historical and recent clinical isolates of *Bordetella pertussis* in the United Kingdom using the Etest method. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 29(9): 1183-1185.
- Fry, N. K., Campbell, H., Amirhalingam, G. 2021. JMM Profile: *Bordetella pertussis* and whooping cough (pertussis): still a significant cause of infant morbidity and mortality, but vaccine-preventable. *Journal of medical microbiology*, 70(10): 001442.
- Finn, T. M. and Stevens, L. A. 1995. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Molecular Microbiology*, 16(4): 625-34.
- Fullen, A. R., Yount, K. S., Dubey, P., Deora, R. 2020. Whoop! There it is: The surprising

- resurgence of pertussis. *PLoS Pathogens*, 16(7): e1008625.
- Gerlach, G., von Wintzingerode, F., Middendorf, B., Gross, R. 2001. Evolutionary trends in the genus *Bordetella*. *Microbes and infection*, 3(1): 61-72.
- Gerritzen, M. J., Martens, D. E., Wijffels, R. H., van der Pol, L., Stork, M. 2017. Bioengineering bacterial outer membrane vesicles as vaccine platform. *Biotechnology advances*, 35(5): 565-574.
- Gopal, D. P., Barber, J., Toeg, D. 2019. Pertussis (whooping cough). *bmj*, 364:1-8.
- Gorringe, A. R. and Vaughan, T. E. 2014. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): relevance for vaccines. *Expert review of vaccines*, 13(10): 1205-1214.
- Guiso, N. 2009. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. *Clinical infectious diseases*, 49(10): 1565- 1569.
- Guiso, N. 2015. *Bordetella pertussis*. In *Molecular Medical Microbiology*, Academic Press, (pp. 1507-1527).
- Guo, L., Zhang, W., Su, X., Huang, H., Liu, Y. 2018. Analysis on drug resistance of *Bordetella pertussis* isolated in Tianjin. *疾病监测*, 33(7): 585-589.
- Gümüş, D., Kalaycı-Yüksek, F., Yörük, E., Uz, G., Çelik, E., Arslan, C., Aydın, E. M., Canlı, C., Anđ-Küçüker, M. 2018. Alterations of growth rate and gene expression levels of UPEC by antibiotics at sub-MIC. *Folia microbiologica*, 63(4): 451-457.
- Graham, L. 2006. CDC releases guidelines on antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis. *American Family Physician*, 74(2): 333.
- Gregg, K. A. and Merkel, T. J. 2019. Pertussis Toxin: A Key Component in Pertussis Vaccines? *Toxins*, 11(10): 557.
- Hall-Stoodley, L., Stoodley, P. 2009. Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*, 11(7): 1034-1043.
- Hamidou Soumana, I., Linz, B., Harvill, E. T. 2017. Environmental origin of the genus *Bordetella*. *Frontiers in microbiology*, 8: 28.
- Hasan, M. R., Tan, R., Al-Rawahi, G. N., Thomas, E., Tilley, P. 2014. Evaluation of amplification targets for the specific detection of *Bordetella pertussis* using real-time polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 25(4): 217-221.
- Healy, C. M., Rench, M. A., Baker, C. J. 2013. Importance of timing of maternal combined tetanus, diphtheria, and acellular pertussis (Tdap) immunization and protection of young infants. *Clinical infectious diseases*, 56(4): 539-544.
- Hewlett, E.L., Myers, G.A., Pearson, R.D. 1983. Susceptibility of *Bordetella* species to growth inhibition and killing by chlorpromazine. *Antimicrob Agents Chemother*, 23(2):201-206.
- Holt, L. B. 1962. The culture of *Bordetella pertussis*. *Microbiology*, 27(2): 323-325.
- Hon, K. L., Jennifer, L., AHC, W., KKY, L., Ng, D. K. K. 2022. Childhood pertussis is still here: An Asian city's perspectives. *Pediatric Pulmonology*. 57:796-799.
- Hoppe, J. E., Halm, U., Hagedorn, H. J., Kraminer-Hagedorn, A. (1989). Comparison of

- erythromycin ethylsuccinate and co-trimoxazole for treatment of pertussis. *Infection*, 17(4): 227-231.
- Hua, C. Z., Wang, H. J., Zhang, Z., Tao, X. F., Li, J. P., Mi, Y. M., Tang, L.F., Chen, Z. M. 2019. In vitro activity and clinical efficacy of macrolides, cefoperazone-sulbactam and piperacillin/piperacillin-tazobactam against *Bordetella pertussis* and the clinical manifestations in pertussis patients due to these isolates: a single-Centre study in Zhejiang Province, China. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 18: 47-51.
- Ifill, G., Blimkie, T., Lee, A. H. Y., Mackie, G. A., Chen, Q., Stibitz, S., Hancock, R. EW., Fernandez, R. C. 2021. RNase III and RNase E Influence Posttranscriptional Regulatory Networks Involved in Virulence Factor Production, Metabolism, and Regulatory RNA Processing in *Bordetella pertussis*. *Mosphere*, 6(4): e00650-21.
- Iida, T. and Okonogi, T. 1971. Lientoxicity of *Bordetella pertussis* in mice. *Journal of medical microbiology*, 4(1): 51-61.
- Ishibashi, Y., Claus, S., Relman, D. A. 1994. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin interacts with a leukocyte signal transduction complex and stimulates bacterial adherence to monocyte cr3 (cd11b/cd18). *J. Exp. Med.*, 180: 1225–1233.
- Ivanov, Y. V. et al. 2016. Identification and taxonomic characterization of *Bordetella pseudohinzii* sp. nov. isolated from laboratory-raised mice. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(12): 5452.
- Jayasundara, D., Lee, E., Octavia, S., Lan, R., Tanaka, M. M., Wood, J. G. 2020. Emergence of pertactin-deficient pertussis strains in Australia can be explained by models of vaccine escape. *Epidemics*, 31: 100388.
- Jelić, D. and Antolović, R. 2016. From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials. *Antibiotics*, 5(3): 29.
- Junker, M., Schuster, C.C., McDonnell, A.V., Sorg, K.A., Finn, M.C., Berger, B., Clark, P.L. 2006. Pertactin β -helix folding mechanism suggests common themes for the secretion and folding of autotransporter proteins. *PNAS*, 103(13): 4918-4923.
- Jog, P., Memon, I. A., Thisyakorn, U., Hozbor, D., Heininger, U., von König, C. H. W., Tan, T. 2022. Pertussis in Asia: Recent country-specific data and recommendations. *Vaccine*, 40(8): 1170-1179
- Kara Elitok, G., Bulbul, L., Altuntas, S. B., Altuntas, B., Günindi, G., Haltaş, M., Yuvarlan, A., Toprak, D., Bulbul, A. 2020. Recommending immunizations to adolescents in Turkey: a study of the knowledge, attitude, and practices of physicians. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 16(5): 1132-1138.
- Karlı, A., Şensoy, G., Belet, N., Yener, N., Akgün, M., Paksu, M. Ş. 2013. Boğmaca Nedeni ile Hastaneye Yatan Süt Çocuklarında Klinik Tablo ve Prognoz. *Journal of Pediatric Infection/Cocuk Enfeksiyon Dergisi*, 7(2): 47-57.
- Kerr, J. R. and Matthews, R. C. 2000. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 19(2): 77-88.

- Kessie, D. K., Lodes, N., Oberwinkler, H., Goldman, W. E., Walles, T., Steinke, M., Gross, R. 2021. Activity of tracheal cytotoxin of *Bordetella pertussis* in a human tracheobronchial 3D tissue model. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10: 853.
- Khayyat, A. N. et al. 2021. Not only antimicrobial: Metronidazole Mitigates the virulence of *Proteus mirabilis* isolated from macerated diabetic foot ulcer. *Applied Sciences*, 11(15): 6847.
- Kilic, A. et al. 2019. The Impact of Early Postpartum Maternal Pertussis Vaccination on the Protection of Infants: A Randomized Clinical Trial. *Iranian Journal of Immunology*, 16(3): 225-234.
- Kilgore, P. E., Salim, A. M., Zervos, M. J., Schmitt, H. J. 2016. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews*, 29(3): 449-486.
- Knuutila, A., Barkoff, A. M., Mertsola, J., Osicka, R., Sebo, P., He, Q. 2021. Simultaneous Determination of Antibodies to Pertussis Toxin and Adenylate Cyclase Toxin Improves Serological Diagnosis of Pertussis. *Diagnostics*, 11(2): 180.
- Kowalska-Krochmal, B. and Dudek-Wicher, R. 2021. The minimum inhibitory concentration of antibiotics: Methods, interpretation, clinical relevance. *Pathogens*, 10(2): 165.
- Kuchar, E., Karlikowska-Skwarnik, M., Han, S., Nitsch-Osuch, A. 2016. Pertussis: history of the disease and current prevention failure. *Pulmonary dysfunction and disease*, 77-82.
- Kurugöl, Z. 2009. Türkiye'de Boğmaca Epidemiyolojisi: Pekiştirme Aşı Dozları Gerekli mi? *Journal of Pediatric Infection/Cocuk Enfeksiyon Dergisi*, 3(1).
- Kurugöl, Z. 2011. Boğmaca aşısı ve sorunlar. *ANKEM Dergisi*, 25: 212-217.
- Lacey, B. W. 1960. Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *Epidemiology & Infection*, 58(1): 57-93.
- Ladant, D. and Ullman, A. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. *Trends in Microbiology*, 7(4): 172-176.
- Ladant, D. 2021. Bioengineering of *Bordetella Pertussis* Adenylate Cyclase Toxin for Vaccine Development and Other Biotechnological Purposes. *Toxins*, 13(2): 83.
- Lam, C. et al. 2014. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerging infectious diseases*, 20(4): 626.
- Lambert-Buisine, C., Willery, E., Loch, C., Jacob-Dubuisson, F. 1998. N-terminal characterization of the *Bordetella pertussis* filamentous haemagglutinin. *Molecular microbiology*, 28(6): 1283-1293.
- Lane, A. G. 1970. Use of glutamic acid to supplement fluid medium for cultivation of *Bordetella pertussis*. *Applied microbiology*, 19(3): 512-520.
- Langley, J. M., Halperin, S. A., Boucher, F. D., Smith, B. 2004. Azithromycin is as effective as and better tolerated than erythromycin estolate for the treatment of pertussis. *Pediatrics*, 114(1): e96-e101.

- Lebel, M. H., & Mehra, S. (2001). Efficacy and safety of clarithromycin versus erythromycin for the treatment of pertussis: a prospective, randomized, single blind trial. *The Pediatric infectious disease journal*, 20(12), 1149-1154.
- Leite, D. et al. 2021. Prevalence and characterization of pertactin deficient *Bordetella pertussis* strains in Brazil, a whole-cell vaccine country. *Vaccine*: 10(8): 100103.
- Leusch, M. S., Paulaitis, S., Friedman, R. L. 1990. Adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis*: production, purification, and partial characterization. *Infection and immunity*, 58(11): 3621-3626.
- Li, L. et. al. 2019. High prevalence of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* and *ptxP1* genotype, Mainland China, 2014–2016. *Emerging infectious diseases*, 25(12): 2205.
- Lin, A. et al. 2020. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 induces a broad antibody response in humans. *The Journal of clinical investigation*, 130(5): 2332-2346.
- Lin, X., Zou, J., Yao, K., Li, L., Zhong, L. 2021. Analysis of antibiotic sensitivity and resistance genes of *Bordetella pertussis* in chinese children. *Medicine*, 100(2): e24090.
- Liu, B., Yi, L., Li, J., Gong, S., Dong, X., Wang, C., & Wang, Y. 2020. Norfloxacin sub-inhibitory concentration affects *Streptococcus suis* biofilm formation and virulence gene expression. *Indian Journal of Animal Research*, 54(3): 342-348.
- Liu, B., Zhang, X., Ding, X., Wang, Y., Zhu, G. 2021. Regulatory mechanisms of sub-inhibitory levels antibiotics agent in bacterial virulence. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(9): 3495-3505.
- Locht, C. 1999. Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *International Microbiology*, 2(3): 137-144.
- Locht, C., Antoine, R., Jacob-Dubuisson, F. 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Current opinion in microbiology*, 4(1): 82-89.
- Locht, C., Papin, J. F., Lecher, S., Debrie, A. S., Thalen, M., Solovay, K., Rubin, K., Mielcarek, N. 2017. Live attenuated pertussis vaccine BPZE1 protects baboons against *Bordetella pertussis* disease and infection. *The Journal of infectious diseases*, 216(1): 117-124.
- Locht, C. 2021. The Path to New Pediatric Vaccines against Pertussis. *Vaccines*, 9(3): 228.
- Locht, C. and Antoine, R. 2021. The History of Pertussis Toxin. *Toxins*, 13(9): 623.
- Lönnqvist, E., Barkoff, A. M., Mertsola, J., He, Q. 2018. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006–2017. *Journal of global antimicrobial resistance*, 14: 12-16.
- Luu, L. D. W., Octavia, S., Aitken, C., Zhong, L., Raftery, M. J., Sintchenko, V., Lan, R. 2020. Surfaceome analysis of Australian epidemic *Bordetella pertussis* reveals potential vaccine antigens. *Vaccine*, 38(3): 539-548.
- Ma, L., Caulfield, A., Dewan, K. K., Harvill, E. T. 2021. Pertactin-deficient *Bordetella pertussis*, vaccine-driven evolution, and reemergence of pertussis. *Emerging*

- Infectious Diseases*, 27(6): 1561.
- Macina, D. and Evans, K. E. 2021. *Bordetella pertussis* in School-Age Children, Adolescents, and Adults: A Systematic Review of Epidemiology, Burden, and Mortality in Asia. *Infectious diseases and therapy*, 1-26.
- Magalhaes, J. G. et al. 2005. Murine Nod1 but not its human orthologue mediates innate immune detection of tracheal cytotoxin. *EMBO reports*, 6(12): 1201-12
- Marr, N., Oliver, D.C., Laurent, V., Poolman, J., Denoël, P., Fernandez, R.C. 2008. Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine*, 26: 4306–4311.
- Matsuzawa, T., Fukui, A., Kashimoto, T., Nagao, K., Oka, K., Miyake, M., Horiguchi, Y. 2004. *Bordetella* dermonecrotic toxin undergoes proteolytic processing to be translocated from a dynamin-related endosome into the cytoplasm in an acidification-independent manner. *Journal of Biological Chemistry*, 279(4): 2866-2872.
- Mattoo, S., Miller, J. F., Cotter, P. A. 2000. Role of *Bordetella bronchiseptica* Fimbriae in Tracheal Colonization and Development of a Humoral Immune Response. *Infection and immunity*, 68(4): 2024-2033.
- Mattoo, S., Foreman-Wykert, A. K., Cotter, P. A., Miller, J. F. 2001. Mechanisms of *Bordetella* pathogenesis. *Frontiers in Bioscience*, 6(1): 168-186.
- Mattoo, S. and Cherry, J. D. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clinical microbiology reviews*, 18(2): 326-382.
- Mi, Y. M., Hua, C. Z., Fang, C., Liu, J. J., Xie, Y. P., Lin, L. N., Wang, G. L. 2021. Effect of Macrolides and β -lactams on Clearance of *Bordetella pertussis* in the Nasopharynx in Children With Whooping Cough. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 40(2): 87-90.
- Mielcarek, N. et al. 2006. Live attenuated *B. pertussis* as a single-dose nasal vaccine against whooping cough. *PLoS Pathog*, 2(7): e65.
- Mishra, M., Parise, G., Jackson, K. D., Wozniak, D. J., Deora, R. 2005. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *Journal of bacteriology*, 187(4): 1474-1484.
- Mooi, F. R. et al. 2009. *Bordetella pertussis* strains with increased toxin production associated with pertussis resurgence. *Emerging infectious diseases*, 15(8): 1206.
- Moon, K., Bonocora, R. P., Kim, D. D., Chen, Q., Wade, J. T., Stibitz, S., Hinton, D. M. 2017. The BvgAS regulon of *Bordetella pertussis*. *MBio*, 8(5): e01526-17.
- Moser, C., Pedersen, H. T., Lerche, C. J., Kolpen, M., Line, L., Thomsen, K., Hoiby, N., Jensen, P. Ø. 2017. Biofilms and host response—helpful or harmful. *Apmis*, 125(4): 320-338.
- Mughal, A. A., Kazi, Y. F., Bukhari, S. H. 2011. Diagnosis of pertussis in vaccinated children of Khairpur, Sindh, Pakistan by Cough Plate Method. *Journal of Microbiology and Infectious Diseases*, 1(02): 68-72.
- Munoz, F. M. 2006. Pertussis in Infants, Children, and Adolescents: Diagnosis,

- Treatment, and Prevention. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases*, 17(1): 14–19.
- Mutak, S. 2007. Azalides from azithromycin to new azalide derivatives. *The Journal of Antibiotics*, 60(2): 85-122.
- Nguyen, A. H., Pham, H. T., Nghia, C. H. 2020. Molecular Epidemiology of *Bordetella pertussis* Strains Isolated in Vietnam During 2015–2017. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 41(S1): s319-s320.
- Nikbin, V. S., Keramati, M., Noofeli, M., Bolourchi, N., Nosrati, S., Shahcheraghi, F. 2018. Characterization of a predominant *Bordetella pertussis* strain isolated from Iranian patients. *Vaccine Research*, 5(2), 52-56.
- Olin, P., Gustafsson, L., Barreto, L., Hessel, L., Mast, T. C., Van Rie, A., Bogaerts, H., Storsaeter, J. 2003. Declining pertussis incidence in Sweden following the introduction of acellular pertussis vaccine. *Vaccine*, 21(17-18): 2015-2021.
- Oliver, D. C. and Fernandez, R. C. 2001. Antibodies to BrkA augment killing of *Bordetella pertussis*. *Vaccine*, 20(1-2): 235-241.
- Otar, G., Kılıç, A., Yıldız, İ., Varkal, M. A., Devecioğlu, E. 2014. Boğmaca enfeksiyonunun tanı ve tedavisi. *Çocuk Dergisi*, 14(3): 100-107.
- Otsuka, N., Han, H. J., Toyozumi-Ajisaka, H., Nakamura, Y., Arakawa, Y., Shibayama, K., Kamachi, K. 2012. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PloS one*, 7(2): e31985.
- Otto, M. P., Martin, E., Badiou, C., Lebrun, S., Bes, M., Vandenesch, F., Etienne, J., Lina, G., Dumitrescu, O. 2013. Effects of subinhibitory concentrations of antibiotics on virulence factor expression by community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(7): 1524-1532
- Öksüz, L., Gürler, N., Ağaçfidan, A. 2017. Bir üniversite hastanesinde yetişkinlerde *Bordetella pertussis* seropozitifliğinin araştırılması. *Mikrobiyol Bulten*, 51(1): 62-72.
- Özceylan, G., Toprak, D., Esen, E. S. 2020. Vaccine rejection and hesitation in Turkey. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 16(5): 1034-1039.
- Özmert, E. N. 2008. Dünya’da ve Türkiye’de aşılama takvimindeki gelişmeler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 51(3): 168-175.
- Öztürk, B. E. T. 2020. *Bordetella pertussis*’e ait varsayımsal dış zar proteini d (bopd), varsayımsal dış zar proteini n (bopn), lösin/izolösin/valin bağlanma proteini (livj) ve tip 2 fimbriya (fim2)’nin rekombinant olarak ifade edilmesi. *Afyon kocatepe üniversitesi fen ve mühendislik bilimleri dergisi*, 20 (1): 1-9.
- Parkhill, J. et al. (2003). Comparative analysis of the genome sequences of *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Nature genetics*, 35(1): 32-40.
- Parnham, M. J., Haber, V. E., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Perletti, G., Verleden, G., M., Vos, R. 2014. Azithromycin: mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology & therapeutics*, 143(2): 225-245.

- Patole, S., Rao, S., Doherty, D. 2005. Erythromycin as a prokinetic agent in preterm neonates: a systematic review. *Archives of Disease in Childhood-Fetal and Neonatal Edition*, 90(4): F301-FF306.
- Peters, D. H., Friedel, H. A., McTavish, D. 1992. Azithromycin: a review of its antimicrobial activity, pharmacokinetic properties and clinical efficacy. *Drugs*, 44(5): 750-799.
- Pichichero, M. E., Hoeger, W. J., Casey, J. R. 2003. Azithromycin for the treatment of pertussis. *The Pediatric infectious disease journal*, 22(9): 847-849.
- Queenan, A. M. et al. 2019. Increasing FIM2/3 antigen-content improves efficacy of *Bordetella pertussis* vaccines in mice in vivo without altering vaccine-induced human reactogenicity biomarkers in vitro. *Vaccine*, 37(1): 80-89.
- Ranieri, M. R., Whitchurch, C. B., Burrows, L. L. 2018. Mechanisms of biofilm stimulation by subinhibitory concentrations of antimicrobials. *Current opinion in microbiology*, 45: 164-169.
- Rumbaugh, K. P., and Sauer, K. 2020. Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10): 571-586.
- Reeks, B. Y., Champlin, F. R., Paulsen, D. B., Scruggs, D. W., Lawrence, M. L. 2005. Effects of sub-minimum inhibitory concentration antibiotic levels and temperature on growth kinetics and outer membrane protein expression in *Mannheimia haemolytica* and *Haemophilus somnus*. *Canadian journal of veterinary research*, 69(1): 1-10.
- Rivera, I., Linz, B., Harvill, E. T. 2020. Evolution and conservation of *Bordetella* intracellular survival in eukaryotic host cells. *Frontiers in Microbiology*, 2318.
- Roberts, R., Moreno, G., Bottero, D., Gaillard, M. E., Fingerhann, M., Graieb, A., Rumbo, M., Hozbor, D. 2008. Outer membrane vesicles as acellular vaccine against pertussis. *Vaccine*, 26(36): 4639-4646.
- Rowatt, E. 1957. Some factors affecting the growth of *Bordetella pertussis*. *Microbiology*, 17(2): 279-296.
- Sadredinamin, M., Shabani, M., Karimi, A., Sohrabi, M. R., Karimi-Yazdi, M., Ghalavand, Z., Alebouyeh, M. 2022. Virulence genes expression profiling of different *Shigella flexneri* serotypes in response to sub-inhibitory concentrations of azithromycin and ciprofloxacin. *Gut Pathogens*, 14(1): 1-12.
- Saedi, S., Safarchi, A., Moghadam, F. T., Heidarzadeh, S., Nikbin, V. S., Shahcheraghi, F. 2021. Fha Deficient *Bordetella pertussis* Isolates in Iran with 50 Years Whole Cell Pertussis Vaccination. *Iranian journal of public health*, 50(7): 1454.
- Safarchi, A. et al. 2021. Evolutionary genomics of recent clinical *Bordetella pertussis* isolates from Iran: wide circulation of multiple *ptxP3* lineages and report of the first *ptxP3* filamentous hemagglutinin-negative *B. pertussis*. *Infection, Genetics and Evolution*, 93: 104970.
- Salim, A. M., Liang, Y., Kilgore, P. E. 2015. Protecting newborns against pertussis: treatment and prevention strategies. *Pediatric Drugs*, 17: 425-441.
- Sandegren, L. 2019. Low sub-minimal inhibitory concentrations of antibiotics generate

- new types of resistance. *Sustainable chemistry and pharmacy*, 11: 46-48.
- Saran, B., Karahan, Z. C. 2010. Ürolojide Antibiyotik Kullanımı, Antimikrobiyal ajanlara Genel Bakış. *Türk Üroloji Seminerleri*. 1: 216-220.
- Sato Y. and Arai H., 1972. Leucocytosis promoting factor of *Bordetella pertussis*. *Infection and Immunity*, 6: 899–904.
- Schlünzen, F., Harms, J. M., Franceschi, F., Hansen, H. A., Bartels, H., Zarivach, R., Yonath, A. 2003. Structural basis for the antibiotic activity of ketolides and azalides. *Structure*, 11(3): 329-338.
- Serra, D. O., Conover, M. S., Arnal, L., Sloan, G. P., Rodriguez, M. E., Yantorno, O. M., Deora, R. 2011. FHA-mediated cell-substrate and cell-cell adhesions are critical for *Bordetella pertussis* biofilm formation on abiotic surfaces and in the mouse nose and the trachea. *PloS one*, 6(12): e28811.
- Shannon, J. L. and Fernandez, R. C. 1999. The C-terminal domain of the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA forms a pore in lipid bilayer membranes. *Journal of Bacteriology*, 181(18): 5838–42.
- Shahsavan, M., Firoozeh, F., Bakhtiyari, M., Pourrostami, K., Tavakoli, M., Hatami, S., Mohammadzadeh, M. 2022. The Sub-Inhibitory effect of azithromycin and ciprofloxacin on virF gene expression in Enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella Flexneri*. Available at SSRN 4142367.
- Smith, A. M., Guzmán, C. A., Walker, M. J. 2001. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: a matter of control. *FEMS microbiology reviews*, 25(3): 309-333.
- Solans L, Debie AS, Borkner L, Aguilo N, Thiriard A, Coutte L, et al. 2018. IL-17-dependent SIgA-mediated protection against nasal *Bordetella pertussis* infection by live attenuated BPZE1 vaccine. *Mucosal immunology*, 11(6), 1753-1762.
- Soto, S. M., Jimenez de Anta, M. T., Vila, J. 2006. Quinolones induce partial or total loss of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* by SOS-dependent or -independent pathways, respectively. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(2): 649–653.
- Stanek, O. et al. 2020. Production of Highly Active Recombinant Dermonecrotic Toxin of *Bordetella pertussis*. *Toxins*, 12(9): 596.
- Steven, A. C., Bisher, M. E., Trus, B. L., Thomas, D., Zhang, J. M., Cowell, J. L. 1986. Helical structure of *Bordetella pertussis* fimbriae. *Journal of bacteriology*, 167(3): 968-974.,
- Subrt, N., Mesak, L. R., Davies, J. 2011. Modulation of virulence gene expression by cell wall active antibiotics in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(5): 979-984.
- Sun, F., Yuan, Q., Wang, Y., Cheng, L., Li, X., Feng, W., Xia, P. 2020. Sub-minimum inhibitory concentration ceftazidime inhibits *Escherichia coli* biofilm formation by influencing the levels of the *ibpA* gene and extracellular indole. *Journal of Chemotherapy*, 32(1): 7-14.
- Tapisiz, A. ve Karli, A. 2013. Clinical Features and Prognosis of Infants Hospitalized with Pertussis/Bogmaca Nedeni ile Hastaneye Yatan Süt Çocuklarında Klinik

- Tablo ve Prognoz/Yazarın yaniti. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi*, 7(3): 128.
- Tarhan, G. 1994. Değişik *Bordetella pertussis* Suşlarında Bağışıklama Gücü ve Patojenite Yönünden Yapılan Çalışmalar, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 52 s.
- Taylor-Mulneix, D. L., Hamidou Soumana, I., Linz, B., Harvill, E. T. 2017. Evolution of *Bordetella* from environmental microbes to human respiratory pathogens: amoebae as a missing link. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7: 510.
- Tazehkand, M. N. 2020. Boğmaca hastalığına karşı yeni aşı tasarımı ve analizi. *Celal Bayar Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7(3): 389-394.
- Telkoparan, P. and Tazebay, U. H. 2011. Ras Protein Ailesi: Hücresel İşlevi, Moleküler Kontrolü, Onkogenezdaki Rolü. *Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi*, 36(4): 367–373.
- Tiwari, T., Murphy, T. V., Moran, J. 2005. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis: 2005 CDC Guidelines. *Morbidity and Mortality Weekly Report: Recommendations and Reports*, 54(14): 1-16.
- Teruya, S. et al. 2020. *Bordetella* dermonecrotic toxin is a neurotropic virulence factor that uses CaV3. 1 as the cell surface receptor. *MBio*, 11(2): e03146-19.
- Thalen, M., van der Ark, A., Van den IJssel, J., van Straaten, I., Jansen, D., Beuvery, C., Martens, D., Tramper, J. 2008. Improving the cellular pertussis vaccine: increased potency and consistency. *Vaccine*, 26(5), 653-663.
- Tran, T. D., Ali, M. A., Lee, D., Félix, M. A., Luallen, R. J. 2022. Bacterial filamentation as a mechanism for cell-to-cell spread within an animal host. *Nature Communications*, 13(1), 693.
- Turan, M. 2004. Boğmaca benzeri öksürüğü olan süt çocuklarında *Bordetella pertussis* ve *Mycoplasma pneumoniae* enfeksiyonlarının Araştırılması. Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği, İstanbul, 56 s.
- Ucieklak, K., Koj, S., Niedziela, T. 2021. Conserved structural features of core oligosaccharides among the lipopolysaccharides of respiratory pathogens from the genus *Bordetella* analyzed exclusively by NMR spectroscopy. *International journal of molecular sciences*, 22(3): 1029.
- Veal-Carr, W. L., & Stibitz, S. (2005). Demonstration of differential virulence gene promoter activation in vivo in *Bordetella pertussis* using RIVET. *Molecular microbiology*, 55(3), 788-798.
- Vergara-Irigaray, N., Chávarri-Martínez, A., Rodríguez-Cuesta, J., Miller, J. F., Cotter, P. A., Martínez de Tejada, G. 2005. Evaluation of the role of the Bvg intermediate phase in *Bordetella pertussis* during experimental respiratory infection. *Infection and immunity*, 73(2): 748-760.
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., Nesse, L. L. 2020. Bacterial biofilm and its role in the pathogenesis of disease. *Antibiotics*, 9(2): 59.

- Villalba, M. I., Venturelli, L., Arnal, L., Masson, C., Dietler, G., Vela, M. E., Yantorno, O., Kasas, S. 2022. Effect of antibiotics on mechanical properties of *Bordetella pertussis* examined by atomic force microscopy. *Micron*, 155: 103229.
- Vojtova, J., Kamanova, J., Sebo, P. 2006. *Bordetella adenylate* cyclase toxin: a swift saboteur of host defense. *Current opinion in microbiology*, 9(1): 69-75.
- von König, C. H. W. 2005. Use of antibiotics in the prevention and treatment of pertussis. *The pediatric infectious disease journal*, 24(5): S66-S68.
- Wang, Z., et al. 2013. Appearance of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* strains in China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(10): 5193-5194.
- Wang, K., Bettioli, S., Thompson, M. J., Roberts, N. W., Perera, R., Heneghan, C. J., Harnden, A. 2014. Symptomatic treatment of the cough in whooping cough. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9).
- Wang, P., Huo, C. X., Lang, S., Caution, K., Nick, S. T., Dubey, P., Deora, R., Huang, X. 2020. Chemical Synthesis and Immunological Evaluation of a Pentasaccharide Bearing Multiple Rare Sugars as a Potential Anti-pertussis Vaccine. *Angewandte Chemie*, 132(16): 6513-6520.
- Wang, B., Li, Z., Xu, J. 2021. Research advances in pertussis resurgence and its causes. *Chinese Journal of Applied Clinical Pediatrics*, (24): 311-315.
- Warfel, J. M., Beren, J., Merkel, T. J. 2012. Airborne transmission of *Bordetella pertussis*. *The Journal of infectious diseases*, 206(6): 902-906.
- Watanabe, M., Takimoto, H., Kumazawa, Y., Amano, K. I. 1990. Biological properties of lipopolysaccharides from *Bordetella* species. *Microbiology*, 136(3): 489-493.
- Weiss, A. A. and Hewlett, E. L. 1986. Virulence factors of *Bordetella pertussis*. *Annual Reviews in Microbiology*, 40(1): 661-686.
- Weiss, A. 2006. The Prokaryotes. In: Dworkin, M. Falkow, S. Rosenberg, E. Schleifer, K.-H. Stackebrandt E. (Eds.), Springer New York, pp. 648–674.
- Willems, R. J., van der Heide, H. G., Mooi, F. R. 1992. Characterization of a *Bordetella pertussis* fimbrial gene cluster which is located directly downstream of the filamentous haemagglutinin gene. *Molecular microbiology*, 6(18): 2661-2671.
- Wong, T. Y., Hall, J. M., Nowak, E. S., Boehm, D. T., Gonyar, L. A., Hewlett, E. L., Eby, J. C., Barbier, M., Damron, F. H. 2019. Analysis of the in vivo transcriptome of *Bordetella pertussis* during infection of mice. *MSphere*, 4(2): e00154-19.
- Wood, N. and McIntyre, P. 2008. Pertussis: review of epidemiology, diagnosis, management and prevention. *Paediatric respiratory reviews*, 9(3): 201-212.
- Woolfrey, B. F. and Moody, J. A. 1991. Human infections associated with *Bordetella bronchiseptica*. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(3): 243-255.
- World Health Organization (WHO). https://www.who.int/health-topics/pertussis#tab=tab_2 [Son erişim tarihi: 18.04.2023].
- World Health Organization (WHO). 2015. Pertussis vaccines: WHO position paper—August 2015. *Weekly Epidemiological Record= Relevé épidémiologique hebdomadaire*, 90(35): 433-458.

- World Health Organization (WHO). 2019. https://www.who.int/health-topics/pertussis#tab=tab_2 [Son erişim tarihi: 18.04.2023].
- Wu, D. X., et al. 2019. Pertussis detection in children with cough of any duration. *BMC pediatrics*, 19(1): 1-9.
- Xu, J., Liu, S., Liu, Q., Rong, R., Tang, W., Wang, Q., Kuang, S., Zhou, C. 2019. The effectiveness and safety of pertussis booster vaccination for adolescents and adults: A systematic review and meta-analysis. *Medicine*, 98(16): e15281.
- Yakut, N., Soysal, S., Soysal, A., Bakir, M. 2020. Knowledge and acceptance of influenza and pertussis vaccinations among pregnant women of low socioeconomic status in Turkey. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 16(5): 1101-1108.
- Yamaguchi, T., Kawasaki, Y., Katsukawa, C., Kawahara, R., Kawatsu, K. 2020. The first report of isolation of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 73: 361-362.
- Yasui, Y., Mitsui, T., Nishimura, T., Uchida, K., Inokuchi, M., Mori, M., Takumura, M., Nakayama, T. 2018. School-age children and adolescents suspected of having been to be infected with pertussis in Japan. *Vaccine*, 36 (20): 2910-2915.
- Yeshanew, A. G., Lankir, D., Wondimu, J., Solomon, S. 2022. Pertussis outbreak investigation in Northwest Ethiopia: A community based study. *Plos one*, 17(2): e0263708.
- Yousefpour, Z., Davarzani, F., Owlia, P. 2021. Evaluating of the Effects of Sub-MIC Concentrations of Gentamicin on Biofilm Formation in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iranian Journal of Pathology*. 16 (4): 403-410.
- Zerbo, O., Bartlett, J., Goddard, K., Fireman, B., Lewis, E., Klein, N. P. 2019. Acellular pertussis vaccine effectiveness over time. *Pediatrics*, 144(1): e20183466.
- Zhang, J., Zhang, D., Wang, X., Wei, X., Li, H. 2022. Macrolide susceptibility and molecular characteristics of *Bordetella pertussis*. *Journal of International Medical Research*, 50(2): 1-11.
- Zurita, M. E., Wilk, M. M., Carriquiriborde, F., Bartel, E., Moreno, G., Misiak, A., Mills, K. HG., Hozbor, D. 2019. A pertussis outer membrane vesicle-based vaccine induces lung-resident memory CD4 T cells and protection against *Bordetella pertussis*, including pertactin deficient strains. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9: 125.

8. EKLER

KÜLTÜR MEDYALARININ HAZIRLANMASI

Modifiye Cohen-Wheeler Agar Besiyeri (pH 7,2- 7,5) (1000ml)

| Kimyasallar ve Solüsyonlar | Kullanılan Miktar |
|---|-------------------|
| Bacto- Agar | 25 g |
| NaCl | 2,5 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,4 g |
| Maya Ekstraktı | 2 g |
| Kasamino asit | 10 g |
| (% 1) CaCl ₂ | 0,25 ml |
| (%0,5) FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 ml |
| (%1) L-Sistein | 0,625 ml |
| (%0,5) CuSO ₄ .5H ₂ O | 0,25 ml |
| (%26) NaOH | pH ayarı için |
| Aktif Kömür | 4 g |

Tüm kimyasalları ve solüsyonları karıştırıp pH ayarı yaptıktan sonra 121 °C'de 45 dk otoklavlanmıştır (Sato ve Arai 1972).

Modifiye Morse Bray Sıvı Besiyeri (pH 7,4) (1000 ml)

A Çözeltisi

| Kimyasallar | Kullanılan Miktar |
|--------------------------------------|-------------------|
| Kasamino asit | 10 g/L |
| Trizma Base | 6 g/L |
| Na glutamat | 0,2 g/L |
| NaCl | 2,5 g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 0,5 g/L |
| Çözünür nişasta | 1,5 g/L |
| MgCl ₂ .6H ₂ O | 0,4 g/L |
| CaCl ₂ | 0,013 g/L |

Tüm kimyasallar dH₂O içerisinde karıştırılıp HCl ile pH ayarı yapıldıktan sonra 121 °C'de 20 dk otoklavlanmıştır.

B Çözeltisi

| Kimyasallar | Kullanılan Miktar |
|--------------------------------------|--------------------------|
| L-Prolin | 120 mg/ml |
| Glutasyon | 100 mg/ml |
| L-Sistein | 40 mg/ml |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 10 mg/ml |
| Askorbik asit | 20 mg/ml |
| Nikotinik asit | 4 mg/ml |

Tüm kimyasallar dH₂O içerisinde karıştırılıp şırınga ucu filtre ile steril edilmiştir. Ardından steril edilen A çözeltisiyle B çözeltisi karıştırılmıştır (Morse ve Bray 1969).

ÖZGEÇMİŞ

EDA DELİK

edadelk@gmail.com



ÖĞRENİM BİLGİLERİ

| | |
|---------------|--|
| Yüksek Lisans | Akdeniz Üniversitesi |
| 2019-2023 | Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Antalya |
| Lisans | Akdeniz Üniversitesi |
| 2015-2019 | Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Antalya |

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Delik E., Eroğlu B., Çolak Ç. Y., Özçelik A. T., Öztürk B. E. T. (2023). Alterations of Growth, Biofilm-Forming, and Gene Expression of *Bordetella pertussis* by Antibiotics at Sub-Minimum Inhibitory Concentrations. *Research in Microbiology*, 104058. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2023.104058>

2- Tefon-Öztürk B.E., Eroğlu B., Delik E., Çiçek M., Çiçek E. (2023). Comprehensive Evaluation of Three Important Herbs for Kombucha Fermentation. *Food Technology and Biotechnology*, 61 (1), 127-137. <https://doi.org/10.17113/ftb.61.01.23.7789>

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Eroğlu B., Delik E., Yıldırım V., Türkanoglu Özçelik A.T., Tefon Öztürk B.E. (2023). Investigation of Biochemical and Microbiological Effects of *Prunus mahaleb* in Fermented Tea Beverage. *Journal of the Institute of Science and Technology*.

2- Delik E., Eroğlu B., Ünal O., Tefon Öztürk B.E. (2021). *Origanum bilgeri*'nin Kombu Çayının Biyoaktivitesi ve Mikrobiyolojik Profili Üzerindeki Etkilerinin İncelenmesi. *Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen ve Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 21 (2), 236-249. <https://doi.org/10.35414/akufemubid.867841>.

Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler

- 1- Tagorti G., Delik E., Eroğlu B., Yalçın B., Güneş M., Kurşun A. Y., Tefon-Öztürk B.E., Kaya B. (2022). Black tea kombucha extends the lifespan of *Drosophila melanogaster*. 5th International Eurasian Conference Biological and Chemical Sciences, Ankara, Türkiye, 23-25 November, vol.1, pp.48 (Oral presentation).
- 2- Delik E., Eroğlu B., Yılmaz-Çolak Ç., Tefon-Öztürk B.E. (2022). Effects of Sub-Minimum Inhibitory Concentrations of Antibiotics on *Bordetella pertussis*. Çukurova 8th International Scientific Researches Conference, Adana, Turkey, 15-17 April, vol.2, pp.320-331 (Oral presentation).
- 3- Eroğlu B., Delik E., Tefon-Öztürk B.E. (2021). Investigation of Biological Activities and Sensory Properties of Chasteberry Flavoured Kombucha. 12. International Scientific Research Congress, Ankara, Turkey, 17-18 December 2021, vol.1, pp.2-13 (Oral presentation).

Proje Deneyimi

- 1- Antibiyotiklerin Sub-Minimum İnhibitör Konsantrasyonunda *Bordetella pertussis* Üzerine Etkisi, 121Z656, TÜBİTAK 1002, Proje Çalışanı (2021).
- 2- Sub-Minimal İnhibitör Konsantrasyonunda Azitromisin'in *Bordetella pertussis* Hücrelerinin Büyüme Hızına, Biyofilm Oluşturma Kapasitesine, Pertussis Toksin ve Pertaktin Genlerinin Ekspresyonuna Etkisi, FYL-2021-5606, Akdeniz Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü, Araştırmacı (2021).
- 3- Çeşitli Bitkilerin Kombu Çayı Fermantasyonunda Selüloz Üretimine Etkisinin ve Antioksidan-Antibakteriyel Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, TÜBİTAK 2209/A, Araştırmacı (2019).