

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



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

Berfin EROĞLU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ



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

Berfin EROĞLU

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BİYOLOJİ

ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZİRAN 2023

ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

Berfin EROĞLU
BİYOLOJİ
ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından FYL-2021-5610 nolu proje ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 121Z656 nolu proje ile desteklenmiştir.

HAZİRAN 2023

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

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

Berfin EROĞLU
BİYOLOJİ
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

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

Berfin EROĞLU

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Haziran 2023; 66 sayfa

Boğmaca, *Bordetella pertussis* bakterisinin neden olduğu, yüksek oranda bulaşıcı, özellikle bebeklerde ölüme neden olan akut bir solunum yolu hastalığıdır. Her ne kadar çocukluk çağı hastalığı olarak bilinse de ergen ve yetişkinlerde de sıklıkla görülmektedir. Dünya genelinde boğmacaya karşı yapılan aşılama kampanyaları dâhilinde yaygın aşılama rağmen halen vaka sayılarının yüksek olduğu görülmektedir. Özellikle zaman içinde bakterinin virülans faktörlerine ait genlerinde meydana gelen değişimlerin aşılama etkinliklerinin azalmasına ve vaka sayılarının artmasına önemli derecede katkı sağladığı düşünülmektedir.

Makrolid grubu antibiyotikler boğmaca hastalığı tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin sürekli kullanımında bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiği, hatta düşük dozlarda kullanımlarında söz konusu bakterinin virülans genlerinin ekspresyon seviyelerinde değişikliklere sebep olabildiği bilinmektedir. Ancak *B. pertussis* için antibiyotiklerin sub-minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (sub-MİK) bakterinin virülans özelliklerine ve gen ekspresyon seviyelerine etkisi ile ilgili detaylı çalışma bulunmamaktadır. Yapılan bu çalışmada eritromisin antibiyotiğinin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) belirlenerek antibiyotiğin sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis* bakterisinin büyüme kapasitesi, biyofilm oluşturma kapasitesi, pertussis toksin (*ptxS1*) ve pertaktin (*prn*) genlerinin ekspresyon seviyesine olan etkileri incelenmiştir. Çalışma sonunda eritromisinin 1/2, 1/4 ve 1/8 MİK dozlarının bakteri hücrelerinin büyümesini yüksek oranda engellediği görülmüştür. Antibiyotiğin 1/16, 1/32 ve 1/64 sub-MİK konsantrasyonlarında ise *B. pertussis*'in büyüme kapasitesi kontrole göre anlamlı derecede azalmıştır. Eritromisinin 1/2, 1/4 ve 1/8 MİK dozlarında çok az büyüme olduğu için biyofilm ve ekspresyon analizlerine 1/16, 1/32 ve 1/64 MİK konsantrasyonlarında devam edilmiştir. Eritromisinin sub-MİK konsantrasyonlarında biyofilm oluşturma kapasitesinin antibiyotik miktarına paralel olarak anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Benzer şekilde *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyeleri kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmıştır. İlginç bir şekilde *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyelerinde 1/32 sub-MİK konsantrasyonunun ekspresyon seviyesinin diğer sub-MİK konsantrasyonlarından daha yüksek olduğu görülmüştür. Ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktur.

Bu tez çalışması antibiyotiklerin sub-MİK'lerinin *B. pertussis* hücrelerine olan etkilerinin araştırılması açısından eritromisin özelinde gerçekleştirilen ilk çalışmadır ve elde edilen bu sonuçlar bilimsel açıdan oldukça önemlidir. Ayrıca boğmaca tedavisinde yaygın olarak kullanılan eritromisin antibiyotiğinin sub-MİK dozlarının *B. pertussis*'e olan etkilerinin belirlenmesi açısından bir başlangıç olan bu çalışma antibiyotiğin klinikte kullanımının ilgili bakteriye olan etkilerinin daha detaylı incelenmesi açısından ileride yapılacak çalışmalara yol gösterecektir.

ANAHTAR KELİMELER: Biyofilm, Boğmaca, *Bordetella pertussis*, Eritromisin, Pertaktin, Pertussis toksin

JÜRİ: Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK

Prof. Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ

Doç. Dr. Sümeyra GÜRKÖK

ABSTRACT

IN VITRO ACTIVITY OF SUB-MINIMUM INHIBITOR CONCENTRATIONS OF ERYTHROMYCIN ON *Bordetella pertussis* TOHAMA – I

Berfin EROĞLU

MSc Thesis in Biology

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

June 2023; 66 pages

Whooping cough (pertussis) is an acute respiratory disease caused by *Bordetella pertussis* that leads to death, especially in infants. Although it is known as a childhood disease, it is also common in adolescents and adults. Vaccination campaigns against pertussis have reduced the number of cases over time. However, despite widespread vaccination, the number of cases remains high today. Changes in the genes of the bacterium's virulence factors, in particular, have contributed significantly to the increase in the number of cases over time by reducing the effectiveness of vaccines.

Macrolide group antibiotics are widely used in the treatment of pertussis. It is known that bacteria develop resistance to antibiotics when high doses of antibiotics are used and that the use of low doses can lead to changes in the expression of virulence genes of the bacteria in question. However, there are no detailed studies on the effects of sub-minimum inhibitory concentrations (sub-MIC) of antibiotics on gene expression and virulence of *B. pertussis*. In this study, the minimum inhibitory concentration (MIC) of erythromycin was determined and the effects of sub-MIC concentrations on growth capacity, biofilm-forming capacity, pertussis toxin (*ptxS1*), and pertactin (*prn*) gene expression of *B. pertussis* were investigated. It was found that 1/2, 1/4, and 1/8 MIC doses of erythromycin significantly inhibited the growth of *B. pertussis*. The growth capacity of *B. pertussis* was significantly decreased at 1/16, 1/32, and 1/64 sub-MIC concentrations of erythromycin compared to the control. There was no significant growth at 1/2, 1/4, and 1/8 MIC doses of erythromycin. Therefore, biofilm, and gene expression analyses were continued at 1/16, 1/32, and 1/64 MIC concentrations. The ability of *B. pertussis* to form biofilms in sub-MICs decreased significantly in parallel with the erythromycin dose. Expression levels of *ptxS1* and *prn* genes were also statistically significantly decreased at sub-MIC concentrations compared with controls. Interestingly, the expression levels of *ptxS1* and *prn* were higher at 1/32 sub-MIC than at the other sub-MICs. However, there is no statistically significant difference between them.

This thesis is the first study to investigate the effects of sub-MICs of antibiotics on *B. pertussis* cells, and these results are important from a scientific point of view. Expression levels of *ptxS1* and *prn* genes were also statistically significantly decreased at sub-MIC concentrations compared with controls.

KEYWORDS: Biofilm, *Bordetella pertussis*, Erythromycin, Pertactin, Pertussis, Pertussis toxin

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

Prof. Dr. Meral Dilara ÖĞÜNÇ

Assoc. Prof. Sümeyra GÜRKÖK



ÖNSÖZ

Boğmaca hastalığı 1414'lü yıllardan günümüze kadar gelmiş akut bir solunum yolu hastalığıdır. Çocukluk çağı hastalığı olarak bilinen boğmaca özellikle aşılammamış bebeklerde ölüme sebep olmaktadır. Ancak son yıllarda bu hastalığın yetişkinlerde de oldukça sık görüldüğü ancak semptomlarının grip ve nezle gibi üst solunum yolları hastalıklarına ait semptomlarla karıştırılması nedeniyle vakaların gözden kaçırıldığı düşünülmektedir. Zaman içerisinde yaygınlaşan aşılammalar neticesinde vaka sayılarının özellikle çocukluk çağında önemli derecede azaldığı görülmektedir. Ancak günümüzde yüksek aşılama oranlarına rağmen boğmaca hastalığı görülmeye devam etmektedir. Özellikle son zamanlarda artan vaka sayıları oldukça endişe vericidir.

Boğmaca hastalığının etiyolojik ajanı olan *B. pertussis*'in zaman içerisinde klinikte kullanılan antibiyotiklere direnç kazandığı bilinmektedir. Ayrıca tedavi sırasında kullanılan antibiyotiklerin sub-MİK dozlarının bakterilerin gen ekspresyonunda değişiklik yapabileceği, bakterilerin virölans faktörlerini farklı yollar ile etkileyebileceği bilinmektedir. Dolayısıyla boğmaca hastalığında kullanılan antibiyotiklerin MİK'lerinin belirlenerek sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis* üzerine etkilerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Ancak antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis* üzerindeki etkilerine yönelik yayınlar oldukça azdır ve bu konu ile alakalı olarak güncel çalışmalar bulunmamaktadır.

Bu tez çalışmasında boğmaca hastalığı tedavisinde klinikte yaygın olarak kullanılan eritromisin antibiyotığının sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis* üzerindeki etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışması özellikle sub-MİK konsantrasyonunda antibiyotik varlığında *B. pertussis*'in biyofilm ve virölans gen ekspresyon kapasitesinin incelenmesi açısından alanında bir ilktir.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında bilgi ve deneyimi ile bana her konuda destek ve yol gösterici olan sevgili danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Burcu Emine TEFON ÖZTÜRK'e (Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü), çalışmalarım sırasında laboratuvarını bize açan ve bana her konuda destek olan sayın Doç. Dr. Aysun ÖZÇELİK'e, çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan, tüm öğrenim sürem boyunca desteğini esirgemeyen, bütün sorularıma yılmadan cevap veren canım laboratuvar arkadaşım Uzman Biyolog Eda DELİK'e, yüksek lisans hayatımın bana kazandırdığı değerli moleküler mikrobiyoloji laboratuvarı yüksek lisans öğrencileri Fikriye Mehtap ŞEN ve Yasemin GAYA'ya teşekkür ederim. Her anımda yanımda olan arkadaşlarım Uzman Biyolog Mertcan GÜLBEN ve Ayşe ACAR'a, çalışmalarım sırasında hiçbir sorumu cevapsız bırakmayan değerli hocam Dr. M. Cihan AYDEMİR'e, enerji dönüşüm laboratuvarı çalışanları Dr. Çağdaş KIZIL, Ali İhsan KÖMÜR ve Berkay SUNGUR'a teşekkür ederim. Bu tez çalışmasının gerçekleşmesi için maddi olanak sunan Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: FYL-2021- 5610) ve Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) (Proje No: 121Z656) teşekkür ederim. Ayrıca her konuda destekçim olan, bütün zor anlarımda yanımda kalarak devam etmemi sağlayan annem Zeynep Sosun EROĞLU, babam Hüseyin EROĞLU, canım kardeşim Öykü Ela EROĞLU'na ve teyzem Songül ŞAHİN'e çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
ÖNSÖZ	v
İÇİNDEKİLER	vi
AKADEMİK BEYAN	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK TARAMASI	4
2.1. <i>B. pertussis</i> ve Boğmaca.....	4
2.2. Boğmaca Hastalığının Tedavisi	4
2.3. <i>B. pertussis</i> Virülans Faktörleri	5
2.3. Pertaktin (Prn).....	7
2.4. Filamentöz Hemagglütinin (FHA).....	8
2.5. Fimbriya (Fim).....	8
2.6. Trakeal Kolonizasyon Faktörü (Tcf)	9
2.7. Serum Direnç Proteini (BrkA).....	10
2.8. Pertussis Toksin (PT).....	10
2.9. Adenilat Siklaz Toksin (AST)	12
2.10. Dermonekrotik Toksin (DNT).....	12
2.11. Trakeal Sitotoksin (TCT).....	13
2.12. Lipooligosakkarit (LOS).....	13
2.13. Bakteriyel Biyofilmler	14
2.14. Boğmaca ve Aşı	16
2.14 Boğmacanın Yeniden Yükselişi.....	19
3. MATERYAL VE METOT	23
3.1 Kullanılan Bakteri Suşu ve Büyüme Koşulları.....	23
3.2 Eritromisin Antibiyotiğinin Hazırlanması	23
3.3. Eritromisin Antibiyotiğinin MİK ve sub-MİK Değerlerinin Belirlenmesi.....	23
3.4. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında <i>B. pertussis</i> Hücrelerinin Büyüme Hızının Belirlenmesi.....	24

3.5. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında <i>B. pertussis</i> Hücrelerinin Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi	24
3.6. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında <i>B. pertussis</i> Hücrelerinin Pertussis Toksin ve Pertaktin Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	24
3.6.1. Sub-mik konsantrasyonlarda eritromisin varlığında büyütülen <i>B. pertussis</i> hücrelerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	24
3.6.2. Gerçek zamanlı PZR analizleri ile pertussis toksine ve pertaktine ait genlerin gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi	26
3.7. İstatistiksel Analizler	27
4. BULGULAR.....	28
4.1. Eritromisin Antibiyotiğinin sub-MİK Değerlerinin Belirlenmesi	28
4.2. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında <i>B. pertussis</i> Hücrelerinin Büyüme Hızının Belirlenmesi.....	28
4.3. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında <i>B. pertussis</i> Hücrelerinin Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi	29
4.4 Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında <i>B. pertussis</i> Hücrelerinin Pertussis Toksin ve Pertaktin Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi.....	30
4.4.1 Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında büyütülen <i>B. pertussis</i> hücrelerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi	30
4.4.2. Gerçek zamanlı PZR analizleri ile pertussis toksine ve pertaktine ait genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi.....	31
5. TARTIŞMA	40
6. SONUÇLAR	46
7. KAYNAKLAR	48
8. EKLER.....	65
ÖZGEÇMİŞ	

AKADEMİK BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Eritromisinin Sub-Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının *Bordetella pertussis* Tohama – I Üzerindeki *İn 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

Berfin EROĞLU



SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

µg :Mikrogram

µm :Mikrometre

bç :Baz çifti

dak :Dakika

kDa :Kilo dalton

mg :Miligram

mL :Mililitre

s :Saniye

sa :Saat

°C :Santigrat

Kısaltmalar

aP :Aselüler boğmaca aşısı

B. pertussis : *Bordetella pertussis*

CR3 : Lökosit integrin kompleman reseptörü 3

DTP : Karma difteri, tetanoz ve tam hücreli boğmaca aşısı

DTaP : Karma difteri, tetanoz ve aselüler boğmaca aşısı

prn : Pertaktin geni

PT : Pertussis toksin

ptxS1 : Pertussis toksin S1 alt birimi geni

RGD : Arg-Gly-Asp tripeptit motifi

rpoB : RNA polimeraz B alt birimi geni

wP : Tam hücreli boğmaca aşısı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Boğmaca hastalığı evreleri ve laboratuvar tanı tekniklerinin nispi tanısallı duyarlılıkları (PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu)(Fry vd. 2021).....	2
Şekil 2.1. <i>B. pertussis</i> gram boyama sonucu (100X).....	4
Şekil 2.2. <i>B. pertussis</i> 'de BvgA sistemi (Hoffman 2017)	7
Şekil 2.3. Dış zar üzerinde fimbriya sentezlenmesi (Scheller ve Cotter, 2015)	9
Şekil 2.4. PT'nin yapısal görünüşü (a) ve (b) (Mangmool ve Kurose 2011; Teter 2019)	11
Şekil 2.5. PT'nin konak hücre içerisine girişi ve ADP – riboziltransferaz aktivitesi (Teter 2019).....	11
Şekil 2.6. Bakteriyel biyofilm oluşum aşamaları (Sauer vd. 2022).....	15
Şekil 2.7. <i>B. pertussis</i> 'te biyofilm oluşumu (Mishra vd. 2005).....	16
Şekil 2.8. 1986 ve 2005 yılları arasında Türkiye'de görülen boğmaca vakaları ve aşılama insidansı (Dilli vd. 2008).	18
Şekil 2.9. Çocukluk dönemi aşı takvimi (Anonim 1)	19
Şekil 2.10. Dünya genelinde boğmaca vaka sayıları ve aşılama insidansı (WHO 2023)	20
Şekil 2.11. Türkiye genelinde boğmaca vaka sayıları ve aşılama insidansı (WHO 2023)	20
Şekil 4.1. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisinin <i>B. pertussis</i> Tohama – I suşunun büyüme kapasitesine etkisi (Kontrol: Eritromisin içermeyen ortamda büyütülen <i>B. pertussis</i> hücreleri, E: Eritromisin)	29
Şekil 4.2. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisinin <i>B. pertussis</i> Tohama – I suşunun biyofilm oluşturma kapasitesine etkisi (Kontrol: Eritromisin içermeyen ortamda büyütülen <i>B. pertussis</i> hücreleri, E: Eritromisin, üst simgelerde yer her bir harf istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$))	30
Şekil 4.3. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında büyütülen <i>B. pertussis</i> örneklerinden izole edilen toplam RNA'ların agaroz jel elektroforezi sonucu (M: DNA Merdiveni, E: Eritromisin, K: Antibiyotik içermeyen ortamda büyütülmüş <i>B. pertussis</i> hücrelerinden izole edilen RNA (kontrol))	31
Şekil 4.4. RT – PCR deneylerinde kullanılan <i>B. pertussis</i> 'e ait genlerin standart eğrileri (a: <i>ptxS1</i> , b: <i>rpoB</i> , c: <i>prn</i>).....	32
Şekil 4.5. RT – PCR deneylerinde kullanılan <i>rpoB</i> genine ait primerin standart eğrisinin amplifikasyon eğrisi (a) ve jel elektroforezi sonucu (b) (M: DNA Merdiveni, NTC: Negatif kontrol (kalıp cDNA kullanılmayan)).....	33

Şekil 4.6. RT – PCR deneylerinde kullanılan <i>ptxS1</i> genine ait primerin standart eğrisinin amplifikasyon eğrisi (a) ve jel elektroforezi sonucu (b) (M: DNA Merdiveni, NTC: Negatif kontrol (kalıp cDNA kullanılmayan)).....	34
Şekil 4.7. RT – PCR deneylerinde kullanılan <i>prn</i> genine ait primerin standart eğrisinin amplifikasyon eğrisi (a) ve jel elektroforezi sonucu (b) (M: DNA Merdiveni, NTC: Negatif kontrol (kalıp cDNA kullanılmayan)).....	35
Şekil 4.8. RT – PCR deneylerinde kullanılan <i>B. pertussis</i> 'e ait genlerin eğrime eğrisi analizleri (a: <i>ptxS1</i> , b: <i>rpoB</i> , c: <i>prn</i>).....	36
Şekil 4.9. <i>ptxS1</i> genine ait örneklerin RT – PCR amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi sonucu (b).....	37
Şekil 4.10. <i>prn</i> genine ait örneklerin RT – PCR amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi sonucu (b).....	37
Şekil 4.11. RT – PCR örneklerinin jel elektroforezi sonucu (S1: Kontrol, S2: 1/16 eritromisin, S3: 1/32 eritromisin, S4: 1/64 eritromisin, M: DNA Merdiveni, NTC: Negatif kontrol (kalıp cDNA kullanılmayan)).....	38
Şekil 4.12. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında büyütülen <i>B. pertussis</i> hücrelerinde <i>ptxS1</i> (a) ve <i>prn</i> (a) genlerinin ekspresyon seviyesi (E: Eritromisin, üst simgelerde yer her bir harf istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$)).....	39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Gerçek zamanlı pzt analizleri sırasında kullanılan primerler	26
Çizelge 3.2. Gerçek zamanlı PZR karışımlarının hazırlanması	27
Çizelge 3.3. Gerçek zamanlı PZR koşulları	27
Çizelge 4.1. <i>B. pertussis</i> Tohama – I hücrelerinden izole edilen toplam RNA miktarları	30
Çizelge 4.2. Sub-MİK eritromisin varlığında <i>ptxS1</i> ve <i>prn</i> genlerinin kat değişimlerinin hesaplanması	38

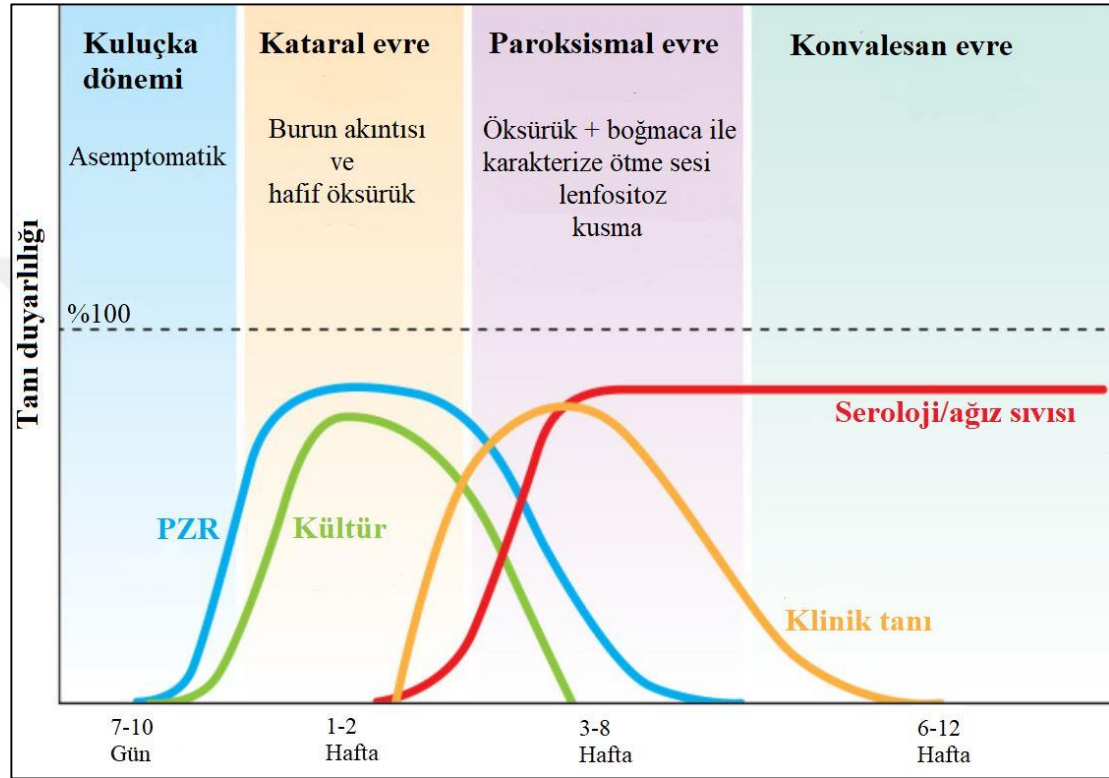


1. GİRİŞ

Boğmaca hastalığı *Bordetella pertussis* isimli bakterinin neden olduğu, ilk defa orta çağlarda kaydedilmiş, tüm yaş gruplarını etkileyebilen, ölüme neden olabilen çok bulaşıcı ve akut bir solunum sistemi hastalığıdır (Souder ve Long 2015; Nieves ve Heininger 2016b). Literatürde bulunan birçok kaynakta hastalığın ilk defa 1414 yıllarında Fransa’da başladığı söylene de yedinci yüzyılda Çin’de Yuanfang Chao tarafından “100 günlük öksürük” adı ile bahsedilmiştir (Guiso 2009; Liang vd. 2016). Ancak o dönemlerde ortak bir tıbbi terminoloji olmadığından ve hastalık farklı bölgelerde farklı isimler aldığından ilk görülmeye başladığı tarih net olarak söylenememektedir, yine de hastalığın ilk defa tanımlanmasının orta çağa kadar uzandığı düşünülmektedir (Kuchar vd. 2016). İlk tanımlandığı zamanlarda tedavisi olmayan ve ölümcül bir hastalık olarak bilinen boğmacanın ancak 18. yy. da bulaşıcı ve daha çok çocukları etkileyen bir hastalık olduğu fark edilmiştir (Kuchar vd. 2016). *B. pertussis* nedenli ilk boğmaca salgını 1578 yılında Fransa’da kaydedilmiştir (Yarmohammadi vd. 2015). Hastalık 1679 yılında Sydenham tarafından şiddetli öksürük anlamına gelen “pertussis (boğmaca)” olarak tanımlanmıştır (Mattoo ve Cherry 2005). Daha sonrasında hastalık sırasında ard arda oluşan öksürükten sonra, hastanın yeterli oksijen almaya çalışırken aldığı derin nefesler sırasında ortaya çıkan whoop sesinden dolayı “whooping cough” olarak adlandırılmıştır (Decker ve Edwards 2021). *B. pertussis*’in ilk olarak görüntülenmesi 1900 yılında Jules Bordet’in boğmaca olan kızının balgamından kokobasilleri görüntülemesi sonucu gerçekleşmiştir, ancak Jules Bordet o dönemde mevcut olan besiyerlerinde görüntülediği bakteri hücrelerini büyütememiştir (Kilgore vd. 2016). Ardından 1906 yılında Bordet ve Gengou ürettikleri besiyeri sayesinde boğmaca hastalığına neden olan *B. pertussis*’i Jules Bordet’in oğlunun balgamından izole ederek, morfolojisini ve virülans özelliklerini tanımlamışlardır (Cherry 1996; Lynfield ve Schaffner 2014). O yıllarda boğmaca hastalığı çocuk ölümlerinin başlıca nedenlerinden biri olarak kabul edilmekteydi ve Amerika Birleşik Devletleri’nin 1910 yılında yayınladıkları istatistiklere göre boğmaca hastalığına yakalanan her 10 çocuktan biri hayatını kaybetmekteydi (Dauer 1943). 1930 yılında Londra’da yapılan başka bir çalışmada ise tüm yaş kategorilerinde gerçekleşen ölümlerin %1,8’ine, 10 yaşın altındaki çocuklarda gerçekleşen ölümlerin ise %13’üne boğmaca hastalığının neden olduğu gösterilmiştir (Stocks ve Kam 1932). Dünya Sağlık Örgütü’ne (DSÖ) göre 2018 yılında dünya çapında 151.000’den fazla boğmaca vakası gerçekleşmiştir (WHO 2023).

Boğmaca klinik olarak 7–14 günlük bir inkübasyon süresini takiben belirti göstermeye başlayan, tekrarlayan (rekürent) şiddetli öksürükle karakteristik, 6 hafta kadar sürebilen bir hastalıktır ve 3 evreden oluşmaktadır (Şekil 1.1) (Özcengiz 2005; Hong 2010). İlk evre olan ve bir iki hafta kadar süren kataral fazda soğuk algınlığına benzeyen burun akıntısı, gözlerde sulanma, hapşırma, kızarıklık gibi bulgular görülmektedir ve ateş genel olarak 38.5 °C’den daha düşüktür (Kline vd. 2013). Hastalığın bulaşı özellikle damlacık yolu ve hasta kişiyle doğrudan temas ile olup, en fazla erken kataral evrede görülmektedir (Özcengiz 2005; Hong 2010). *B. pertussis*, yakın mesafeden kontamine damlacıklara maruz kalmış duyarlı kişilerde %100’e yakın hastalık yaratma potansiyeline sahiptir (Hong 2010; Otari vd. 2014a). Kataral evrede görülen hafif öksürüklerin şiddetlenerek spazmodik hale dönüşmesi sonucunda hastalığın 2. evresi olan paroksizmal evre başlamaktadır (Özcengiz 2005). Paroksizmal evrenin ortalarına doğru boğmaca ile karakterize hale gelmiş olan boğmaca öksürüğü görülmektedir; hasta art arda 5 – 10 kez

boğulur gibi kesik kesik öksürmenin ardından yarı kapalı solunum yoluna aniden hava dolması ile ötmeye benzer boğmaca sesini oluşturmaktadır (Gregory 2006; Scanlon vd. 2015). Bu öksürük özellikle akciğerlerde oluşan mukus sonucunda daha da şiddetlenmektedir, yapılan çalışmalarda boğmaca sonucu ölen bebeklerin akciğerlerinin mukus, bakteri ve inflamatuvar hücre karışımı ile tıkalı olduğu görülmüştür (Smith ve Vyas 2000; Paddock vd. 2008; Scanlon vd. 2015). Paroksizmal evrenin ardından öksürük ve kusmaların sayısının ve şiddetinin azaldığı, hastanın kademeli olarak normale döndüğü konvalesan evre görülmektedir (Fry vd. 2021).



Şekil 1.1. Boğmaca hastalığı evreleri ve laboratuvar tanı tekniklerinin nispi tanılabilirlikleri (PZR: Polimeraz zincir reaksiyonu) (Fry vd. 2021)

B. pertussis'in insanları enfekte etmesine ve konağın akciğerlerine yerleşmesine olanak sağlayan birçok virülans faktörü bulunmaktadır. Biyofilm oluşturma, özellikle enfeksiyonun ilk aşamalarında *B. pertussis* hücrelerinin akciğerde kolonize olmaları açısından oldukça önemlidir (Cattelan vd. 2016). Biyofilmler canlı veya hareketsiz bir yüzeye yapıştırılmış, bakterinin kendi ürettiği polimer bir matriks içerisinde bulunan bakteri hücre topluluklarından oluşmaktadır (Bosch vd. 2000). Biyofilm içerisinde büyümüş ve sıvı ortamda biyofilm oluşturmada büyümüş bakteri hücreleri arasında büyük farklılıklar bulunmaktadır (De Gouw vd. 2014). Zaman içerisinde planktonik hücrelerin neden olduğu bakteriyel enfeksiyonların yerini biyofilm yaşam tarzına sahip bakterilerin neden olduğu kronik bakteriyel enfeksiyonlar almıştır (Fux vd. 2005). Bakterilerin oluşturduğu biyofilm bakterinin konak içerisinde meydana gelen saldırılardan korunması ve canlı kalması açısından pek çok fayda sağlamaktadır (Davey ve O'toole 2000). Bu yapılar, bakterinin çevresel etkilere direnç geliştirmesini, antimikrobiyal ajanlardan ve konağın bağışıklık sisteminden korunmasını sağlayarak enfeksiyonun devam etmesine katkıda bulunmaktadır (Serra vd. 2011). Biyofilm aynı

zamanda bakterilerin, tedavi sırasında uygulanan antibiyotiğe direnç kazanmalarını sağlayacak kadar uzun süre antibiyotiğe maruz kalmalarını sağlayarak antibiyotik direncinin yayılmasını sağlayabilmektedir (Fux vd. 2005). Ayrıca geleneksel yöntemler biyofilm oluşturan bakterilerde antibiyotik dirençlerini tam olarak belirleyemediği için, biyofilm oluşturan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde başarısızlıklara neden olmaktadır (Fux vd. 2005). Dolayısıyla bakterilerin biyofilm oluşturabilme kabiliyetlerinin araştırılması oldukça önemlidir.

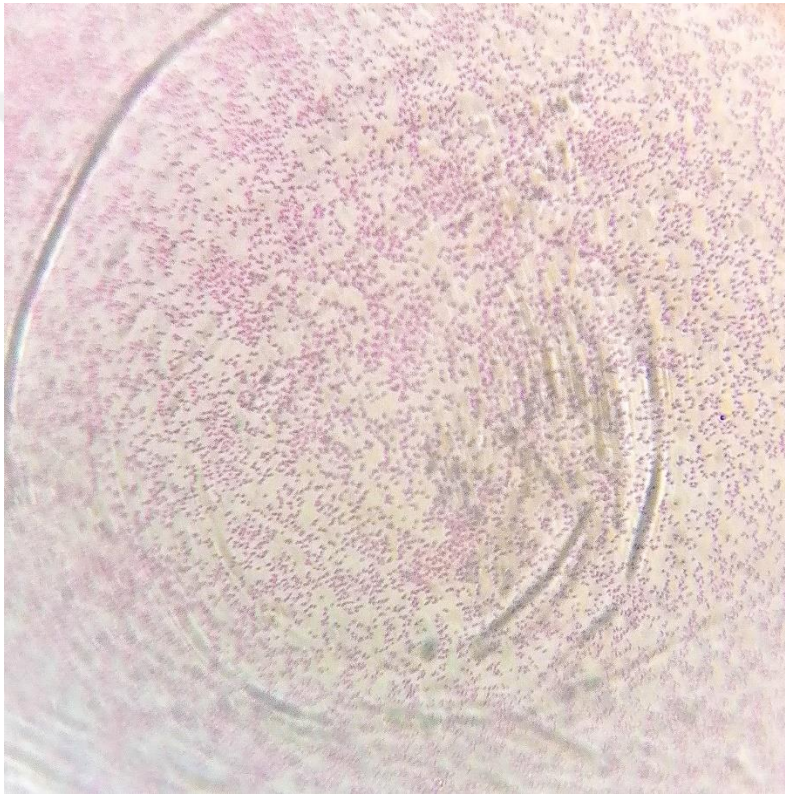
Boğmaca hastalığının tedavisinde makrolid grubu antibiyotikler özellikle de eritromisin yaygın olarak kullanılmaktadır (Kilgore vd. 2016). Hastalığın şiddetini azaltmada ve *B. pertussis*'in büyümesini inhibe etmede etkili olan bu antibiyotik bakteri hücrelerinin nazofarinksten eliminasyonunu sağlayarak hastalığın bulaşıcılığını azaltmaktadır (Karli vd. 2013). Eritromisin, eritromisin A üreten *Streptomyces erythreus*'dan izole edilmektedir ve bakteriyel ribozomun 50S alt birimindeki 23S ribozomal RNA molekülüne bağlanarak protein sentezini inhibe etmektedir (Weber vd. 1985; Farzam vd. 2022). İnsanlarda 50S alt birimin yerine 40S ve 60S ribozomal alt birimlerin bulunması eritromisinin insanlardaki protein sentezini inhibe etmesini engellemektedir (Tenson vd. 2003; Liang ve Han 2013). Bakteriler, 23S rRNA modifikasyonu sayesinde eritromisinin ribozoma bağlanmasını engelleyerek eritromisine karşı direnç kazanabilmektedirler (Valardo vd. 2009). Antibiyotiklerin klinik tedavi sırasında etkili olabilmesi için, hastaya verilen antibiyotik dozlarının tedavisi için kullanıldığı bakteriye karşı olan MİK değerinden daha yüksek olması gerekmektedir. Hastaya uygulanan antibiyotik dozları zamanla azalarak sub-MİK konsantrasyonlara inmektedir (Bal 2022). Özellikle bakterilerin ölmediği bu düşük antibiyotik konsantrasyonlarının bakterilerin morfolojisini, konak hücreye tutunma yeteneklerini, biyofilm oluşturabilme kabiliyetlerini, patojenitelerini ve virülans faktörlerinin gen transkripsiyonunu etkilediği bilinmektedir (Piatti 1994; Sato vd. 2018). Bu nedenle klinikte kullanılan antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının bakteriler üzerindeki etkilerinin araştırılması oldukça önemlidir. Antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis* bakterisinin virülans özelliklerini nasıl etkilediğine dair yeterli çalışma bulunmaması da bu alanda yapılacak olan çalışmaları önemli kılmaktadır.

Gerçekleştirilen bu tez çalışmasında eritromisin antibiyotiğinin sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis* hücrelerinin büyüme kapasitesi, biyofilm oluşturabilme kapasitesi, önemli virülans faktörlerinden olan *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyeleri üzerine etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK TARAMASI

2.1. *B. pertussis* ve Boğmaca

Boğmaca hastalığı, aerobik, Gram negatif bir kokobasil olan *B. pertussis* bakterisinin neden olduğu özellikle bebeklerde ölüme sebep olan ve genel olarak çocukluk çağı hastalığı olarak tanımlanan akut bir solunum yolu hastalığıdır (Şekil 2.1) (Mattoo ve Cherry 2005; Nieves ve Heininger 2016a). Hastalık söz konusu bakterinin insan solunum sistemindeki trake ve bronşların epitel yüzeylerine tutunup hızla çoğalmasıyla meydana gelmektedir (Turan 2004; Mattoo ve Cherry 2005; Öztürk 2020). Özellikle ergen ve yetişkin insanlar *B. pertussis*'in bir numaralı taşıyıcılarıdır ve bakterinin bebeklere ve aşılanmamış çocuklara bulaşmasında çok önemli rol oynamaktadırlar (Otsuka vd. 2012).



Şekil 2.1. *B. pertussis* gram boyama sonucu (100X)

2.2. Boğmaca Hastalığının Tedavisi

Boğmaca hastalığının tedavisi için sınırlı sayıda ilaç mevcuttur ve genel olarak makrolid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır (Kilgore vd. 2016). Ancak antibiyotikler genel olarak tedavi değil hastalığın bulaşmasını önlemek amacıyla verilmektedir (Altunaiji 2007). Boğmaca hastalığının tedavisinde antibiyotiklerin etkinliği, antibiyotiklerin verilmeye başladığı hastalık evresine bağlıdır. Antibiyotiklerin boğmaca semptomlarını tedavi etmesi ve *B. pertussis*'i yok etmesi için en uygun zaman hastalığın ilk 3 haftası olan kataral evredir (Kilgore vd. 2016). Antibiyotikler hastalık evrelerinin

sonlarına doğru kullanıldığında hastalık semptomlarını azaltma olasılığı erken evrelerde kullanılmasına göre daha düşüktür (Tiwari 2005).

Boğmacanın tedavisinde genel olarak makrolid grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Makrolid grubu antibiyotiklerden eritromisin 20. yüzyılın son 30 yılında boğmaca tedavisi için birincil olarak tercih edilen antibiyotik olmuştur (Tiwari 2005). 7 – 10 günlük eritromisin tedavisinin ardından solunum yollarında çok az da olsa bakteri hücreleri saptanabildiğinden dolayı genel olarak *B. pertussis* hücrelerinin solunum yolundan eliminasyonu için 14 günlük eritromisin tedavisi önerilmektedir (Preston ve Kerr 2001). Eritromisin her ne kadar hastalığın şiddetini azaltmada etkili olsa da hastaların yaklaşık %30'unda meydana getirdiği karın krampları, bulantı, kusma gibi gastrointestinal yan etkiler nedeniyle zayıf tolere edilmektedir (Tolman vd. 1974; Langley vd. 2004). Eritromisinin neden olduğu bu yan etkilerden ötürü bilim insanları yeni antibiyotik araştırmalarına yönelmiş, bu çalışmalar sonucunda roksitromisin, diritromisin, spiramisin, klaritromisin ve azitromisin gibi yeni antibiyotiklerin üretilmesine yönelmişlerdir (Jelić ve Antolović 2016). Yeni geliştirilen bu antibiyotiklerden azitromisin ve klaritromisinin eritromisine kıyasla daha az yan etkiye sahip olduğu, boğmacayı önlemede ve tedavi etmede en az eritromisin kadar etkili olduğu gösterilmiştir (von König). Özellikle azitromisin boğmaca vakalarında en yaygın reçete edilen bu makrolid 3 ilaçtan yenidoğanlar (1 aylıktan küçük bebekler) için önerilen tek antibiyotiktir (Tiwari 2005). Makrolid grubu antibiyotiklerin tolere edilemediği veya hastada alerji oluşturduğu durumlarda boğmaca tedavisinde antimetabolit antibiyotik grubundan trimetoprim/sülfametoksazol (TMP/STX) alternatif olarak kullanılmaktadır (Kline vd. 2013). Klinikte kullanılan diğer antibiyotikler arasında sefalosporin, ampicilin, tetrasiklin, florokinolonların ve kloramfenikolün boğmacaya karşı yeterli derecede etkili olmadığı, ek olarak kloramfenikol, tetrasiklin ve florokinolonların çocuklar üzerinde yan etkilerinin olduğu bilinmektedir (Kilgore vd. 2016).

2.3.B. *pertussis* Virülans Faktörleri

Bakteriler hastalığa sebep olabilmek ve immün sistemden kaçmak için çeşitli virülans faktörleri üretmektedirler. Boğmaca hastalığına neden olan *B. pertussis* de konakçı hücrelere tutunabilmek, konak savunmasından kaçmak ve konakçının solunum yollarına zarar verebilmek için kendi virülans faktörlerini üretmektedir. Bu virülans faktörleri adezinler ve toksinler olarak 2 gruba ayrılmaktadır. Bu virülans faktörlerinin çoğu düzenleyici BvgA ve sensör protein BvgS'den oluşan iki bileşenli bir sinyal iletim sistemi tarafından kontrol edilmektedir (Lacey 1960; Loch 1999; Guiso 2009).

B. pertussis bulunduğu ortamdaki değişiklikleri algılamak ve değişikliklere hücresel yanıt vermek için Bvg sistemi olarak da adlandırılan iki bileşenli bir sinyal iletim sistemini kullanmaktadır (Uhl ve Miller 1996). Bvg sistemi, uzun bir süre boyunca iki fazlı (Bvg (+) ve Bvg (-)) olarak bilinmesine rağmen yapılan araştırmalar sonucunda sistemin doğrudan veya dolaylı yoldan yüzlerce geni düzenlediği, Bvg (+), Bvg (-) ve

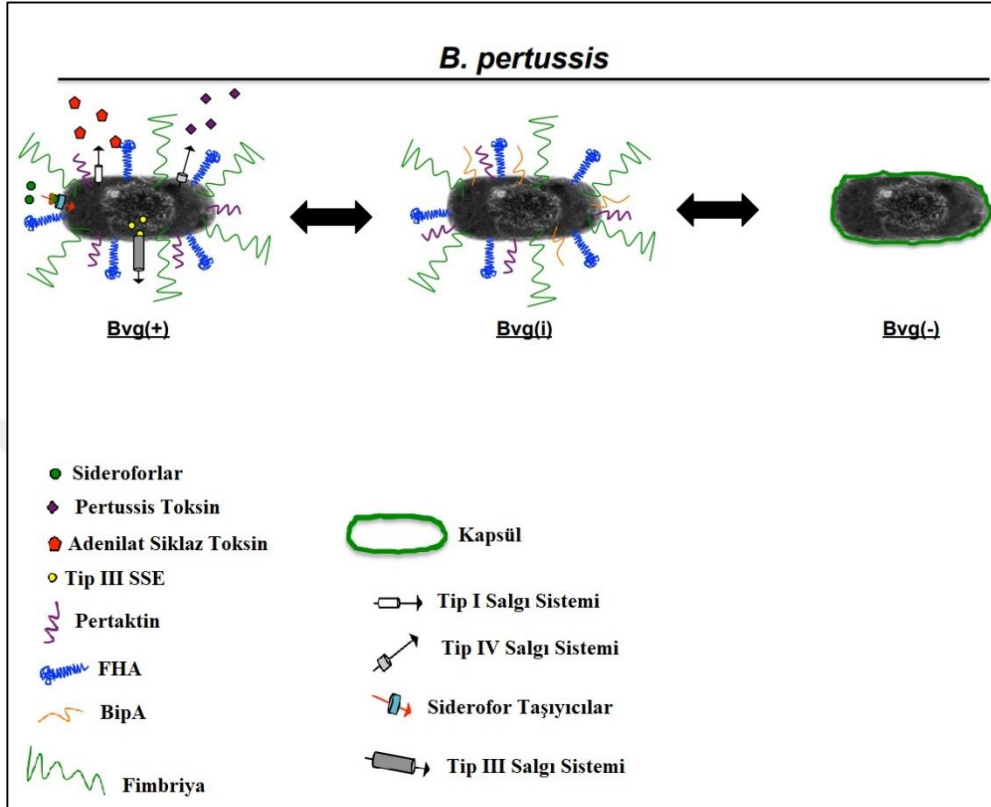
Bvg (i) olmak üzere en az üç farklı fenotipik faza neden olduğunu anlaşılmıştır (Cotter ve Jones 2003; Cummings vd. 2006; Bone vd. 2017).

BvgA, DNA'ya bağlanan bir yanıt düzenleyicidir. BvgS ise stoplazmik alana bağlı büyük bir periplazmik alan içeren 135 kDa'lık ortamdaki değişiklikleri algılayabilen bir iç zar proteinidir (Locht vd. 2001; Mattoo ve Cherry 2005). 37 °C'de ve standart büyüme koşulları altında BvgS otofosforilasyona uğramakta ve fosfat grubu BvgA'nın amino – terminal alanına transfer edilmektedir (Locht vd. 2001; Moon vd. 2021). Fosforile edilmiş BvgA (BvgA~P) virülans gen promotörlerine bağlanarak virülansla aktive olan genleri (*vags*) aktifleştirmektedir (Decker vd. 2012; Moon vd. 2021). *B. pertussis*'in modülasyonsuz ortamda verdiği bu tepki Bvg (+) olarak da adlandırılmaktadır (Chen vd. 2020). Hücre Bvg (+) moduna geçtiğinde ilk olarak erken *vag*'lar olarak da bilinen filamentöz hemaglutinin ve fimbriya gibi adezin genleri, BvgA~P düzeyi artmaya devam ettikçe geç *vag*'lar olarak da bilinen adenilat siklaz toksin ve pertussis toksin gibi toksin genleri aktifleşmektedir (Scarlato vd. 1991; Moon vd. 2017). BvgA~P dimerleri aynı zamanda hücre içi yanıt sisteminin yanıt düzenleyicisi (RisA) ile birlikte c-di-GMP'nin GMP'ye dönüştürülmesini sağlayarak virülans baskılanmış genlerinin (*vrg*) aktivasyonunda rol oynayan 32 kDa'lık sitoplazmik baskılayıcı bir protein olan BvgR'nin promotör bölgesini aktive etmektedir. BvgR promotör bölgesinin aktivasyonu sonucunda c-di-GMP GMP'ye dönüştüğü için ortamdaki c-di-GMP miktarı önemli ölçüde düşer, dolayısıyla RisA aktivasyonu azalır ve *vrg*'ler sentezlenemez. Sonuç olarak *vrg*'ler Bvg (+) modunda bastırılmıştır (Locht vd. 2001; Mattoo ve Cherry 2005).

Düşük sıcaklık, yüksek konsantrasyonlarda magnezyum sülfat veya nikotinik asit varlığı gibi durumlarda BvgS otofosforilasyona uğramamakta ve BvgA~P dimerleri oluşmamaktadır (Mattoo ve Cherry 2005). Oluşan bu faz Bvg (-) modu veya fenotipik modülasyon olarak da adlandırılmaktadır (Chen vd. 2020). Bvg (-) modunda BvgA fosforillenmediği için *vag*'ler sessizdir, öte yandan BvgR aktive edilemediği için *vrg*'ler sentezlenmektedir (Scarlato vd. 1991; Moon ve vd. 2017) (Şekil 2.2). Bvg (-) modu özellikle besin miktarının yeterli olmadığı ortamlarda bakterilerin hayatta kalmasını sağlamaktadır. Son yapılan çalışmalar Bvg (-) modunda piruvat dehidrogenaz, şeker ve amino asit taşıyıcıları, yağ asidi ve lipid metabolizması, glikolat/glioksilat kullanım yolu ve fenilasetik asit bozunması gibi çeşitli metabolik yollarda görev alan birçok genin önemli derecede espreye edildiğini ve 200'den fazla yeni *vrg* tanımlanabileceğini göstermiştir (Moon ve vd. 2017).

BVG sisteminin yeterince indüklenemediği ve yeterince BvgA~P dimerlerinin oluşmadığı ara faz Bvg (i) olarak adlandırılmaktadır (Decker vd. 2012). Hücre Bvg (i) moduna geçtiği zaman filamentöz hemaglutinin gibi erken *vag*'lar ve *B. pertussis*'te tanımlanan ilk Bvg(i) faz proteinlerinden biri olan Bvg ara faz proteini A (BipA) sentezlenmektedir (Şekil 2.2) (Mattoo ve Cherry 2005; Ramkissoon 2021). Pertussis toksin gibi geç *vag*'lar ve *vrg*'ler Bvg (i) modunda sessizdir. Bu ara faz, bakteriler düşük konsantrasyonlarda modülasyonlara maruz kaldığında veya Bvg (-) modundan Bvg (+)

moduna geçiş sırasında meydana gelmektedir (Mattoo ve Cherry 2005; Ramkissoon 2021). Enfeksiyonun ilk aşamalarında veya bakterilerin aerosol yoluyla bulaşması aşamasında görülmektedir.



Şekil 2.2. *B. pertussis*'de BvgA sistemi (Hoffman 2017)

2.3. Pertaktin (Prn)

Pertaktin (Prn), tutunmada ve kolonizasyonda rol alarak akciğer epitel hücrelerine bağlanmaya aracılık eden, ototransporter ailesinden, 69 - kDa'lık fimbriyal olmayan bir dış zar proteinidir (Otsuka vd. 2012; Turan 2004; Tefon 2012). X – ışını yapısına bakıldığında zaman zaman protein kıvrımının V şeklinde bir kesite sahip 16 iplikli paralel bir beta sarmalından oluştuğu görülmektedir ve bu sarmal yapısı bugüne kadar bilinen en büyük beta sarmalıdır (Emsley vd. 1996). Sadece *B. pertussis*'e özgü bir virülans faktörü değildir, aynı zamanda *B. bronchiseptica* (68 – kDa) ve *B. parapertussis* (70 – kDa) bulunmaktadır ve bu üç bakteride bulunan Prn esas olarak içerdikleri prolin bakımından zengin bölgelerin sayısından dolayı farklılık göstermektedir (Mattoo ve Cherry 2005).

Prn yapısında bulunan, ökaryotlarda ligand – reseptör etkileşimlerinde yer alan Arg-Gly-Asp (RGD) tripeptit motifi sayesinde hem bakterinin insan solunum yolundaki epitel hücrelerine bağlanabilmesini sağlayan bir adezin olarak, hem de toplanma, biyofilm oluşumu, toksisite, yapışma ve istila gibi virülans fonksiyonlarında işlev görmektedir (Mattoo ve Cherry 2005; Inatsuka vd. 2010; De Gouw vd. 2011; Otsuka vd.

2012).

2.4. Filamentöz Hemagglütinin (FHA)

Filamentöz hemagglütinin (FHA), *B. pertussis* ve *B. bronchiseptica*'daki *fhaB* geni tarafından kodlanan 220 kDa'lık yüzey ve sekresyon proteindir (Asgarian-Omran vd. 2015; Dorji vd. 2018). Bakteri hücresi içerisinde ilk olarak yaklaşık 375 kDa'lık öncü FhaB olarak sentezlenir (Kajava vd. 2001). FhaB'nin N terminalinde yer alan genişletilmiş sinyal peptit bölgesi, FhaB'nin dış membran üzerinde yer değiştirmesini sağlamaktadır (Chevalier vd. 2004). Dış membran üzerinde yer alan FhaB, N ve C terminal uçlarında gerçekleşen değişimler sonunda serin proteaz (SphB1) aracılığı ile olgun FHA olarak hücre dışına sentezlenir (Nash ve Cotter 2019).

FHA, lökosit integrin kompleman reseptörü 3 (CR3) ile etkileşime giren RGD dizisi, N terminal glikozaminoglikan bağlanma bölgesi ve karbonhidrat bağlanma bölgesi olmak üzere konak hücreleri ile etkileşime girmesini sağlayan en az 3 farklı bağlanma bölgesi içermektedir (Melvin vd. 2014; Scheller ve Cotter 2015; Jurnecka vd. 2018). Olgun bir FHA bakterilerin konağın solunum mukozal hücrelerine bağlanmasında ve bakteriyel kolonizasyonda rol oynayan en etkili virülans faktörlerinden biridir ve hücresiz boğmaca aşısının birincil bileşenidir (Romero vd. 2016; Jurnecka vd. 2018). Aynı zamanda sahip olduğu C – terminal tip I ve N – terminal tip II alanları iki ana immün baskın bölge sayesinde yüksek oranda immünojeniktir (Dorji vd. 2018).

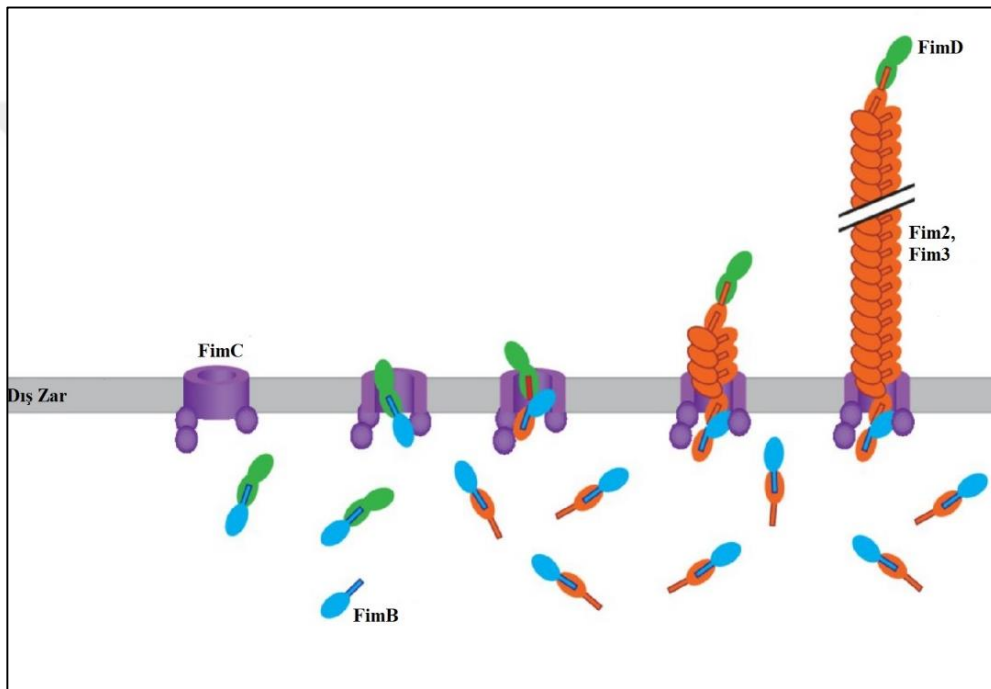
2.5. Fimbriya (Fim)

Fimbriya (Fim) tip 1 pili ailesine ait, *B. pertussis*'in konak solunum yolu hücrelerine ilk bağlanmasında ve bakteri kolonizasyonunda etkili, bakterinin dış zarından uzanan uzun ve ince iplikli yapılardır (De Gouw vd. 2011; Scheller ve Cotter 2015; Dorji vd. 2018). Fim2 veya Fim3 adı verilen iki ana alt birimden ve FimD adı verilen küçük bir alt birimden oluşmaktadır (Alexander vd. 2012; Scheller ve Cotter 2015). *B. pertussis* suşlarında bulunan fimbriyalar sadece Fim2, sadece Fim3 veya her iki fimbriyal alt serotipi içerebilmektedir (Gorringe ve Vaughan 2014). Yapılan çalışmalar sadece Fim3 içeren *B. pertussis* suşlarında sadece Fim2 içeren *B. pertussis* suşlarından daha az miktarda fimbriya bulunduğunu, her iki serotipi içeren *B. pertussis* suşlarında ise sadece Fim2 veya Fim3 içeren suşlardan daha fazla miktarda fimbriya bulunduğunu göstermiştir (Ashworth vd. 1982).

Genel olarak fimbriyal alt birimler solunum yollarında bulunan heparin sülfat, dekstran sülfat ve kondroitin sülfatı tanımaktadır (Hazenbos vd. 1995). Fim2 solunum yolunda bulunan epitel hücrelere bağlanmada rol oynayan H1 ve H2 olarak adlandırılan, heparin gibi sülfatlanmış şekerlere bağlanma aktivitesine sahip 2 bölge içermektedir (Geuijen vd. 1998). Aynı zamanda Fim3'de de antijenik olarak farklı benzer bölgeler olduğu bilinmektedir (Geuijen vd. 1998). FimD ise solunum yolunda bulunan heparin sülfat ve integrin çok geç antijen – 5 (VLA – 5) olmak üzere iki liganda bağlanmaktadır

(Hazenbos vd. 1995). FimD'nin VLA – 5 ligandına bağlanması aynı zamanda FHA için bir ligand olan CR3'ü aktive ederek bakterilerin solunum yolunda tutunmasını arttırmaktadır (Hazenbos vd. 1995; Dorji vd. 2018).

Fim aynı zamanda FimD ile birlikte çalışarak fimbriyanın dış membran üzerine sentezlenmesini sağlayan, FimB ve FimC olarak adlandırılan 2 ek fimbriyal şaperon proteinine sahiptir (Guiso, 2015; Scheller ve Cotter, 2015). FimC dış membran üzerinde yer alan ayrılmaz bir dış zar proteinidir (Smith vd. 2001). FimB ise FimD, Fim2 ve Fim3'ü FimC'ye yönlendirmede ve aynı zamanda FimC içerisinde fimbriyal alt birimlerin sentezlenen zincire aktarılmasını sağlayarak fimbriya sentezlenmesi sırasında işlev görmektedir (Şekil 2.3) (Melvin vd. 2014; Scheller ve Cotter, 2015).



Şekil 2.3. Dış zar üzerinde fimbriya sentezlenmesi (Scheller ve Cotter 2015)

2.6. Trakeal Kolonizasyon Faktörü (Tcf)

Trakeal kolonizasyon faktörü (Tcf) *tcfA* geni tarafından kodlanan, *Bordetella* türleri arasında yalnızca *B. pertussis* tarafından üretilen hem hücre ile ilişkili hem de salgılanmış formlarda kodlanabilen 60 kDa'lık bir proteindir (Kerr ve Matthews 2000; Dorji vd. 2018). Tcf'de Prn, FHA, ve serum direnç proteini gibi bir adezyon molekülü olarak işlev görmektedir (Dorji vd. 2018). N terminal kısmında yüksek oranda (%16,5) prolin içeriğine sahip ve diğer adezyon moleküllerine benzer RGD dizileri yer almaktadır (Finn ve Stevens 1995; Loch 1999). Tcf'nin C terminal alanı ise, *B. pertussis*'ler tarafından sentezlenen öncü pertaktinlerin C terminal alanına %50 benzerlik göstermektedir (Kerr ve Matthews 2000; Smith vd. 2001). Tcf üretmeyen *B. pertussis* suşu ile yapılan bir çalışmada, Tcf üretmeyen *B. pertussis*'lerin fare trakeasında

gerçekleştirdikleri bakteriyel kolonizasyonun kontrole göre 10 kat daha az olduğunu göstermişlerdir (Finn ve Stevens 1995).

2.7. Serum Direnç Proteini (BrkA)

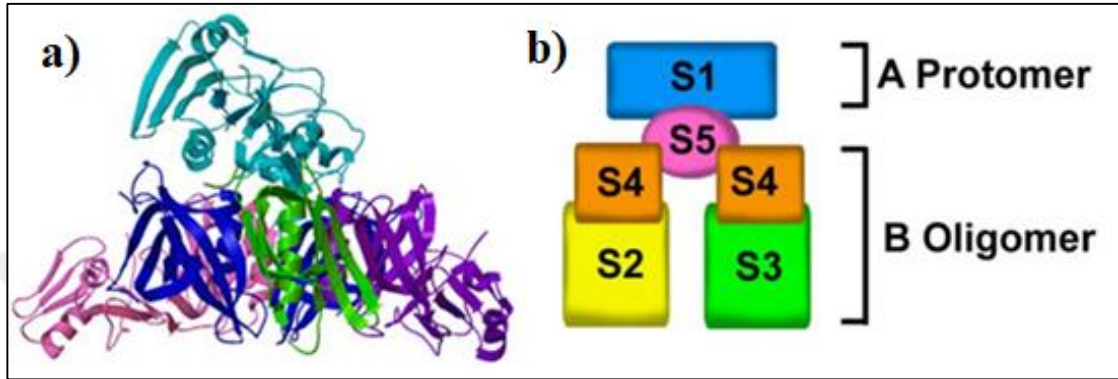
Serum direnç proteini (BrkA), *brk* lokusu tarafından kodlanan, *B. pertussis*'in insan serumu tarafından öldürülmesine karşı direnç geliştirmesini sağlayan bir proteindir (Smith 2001; Dorji vd. 2018). *B. pertussis* dışında *B. paraptussis* ve *B. bronchiseptica*'da olduğu bilimektedir, ancak *B. avium*'da BrkA bulunmamaktadır (Linz vd. 2016). BrkA, klasik kompleman yolu yardımıyla *B. pertussis* hücrelerini doğuştan gelen bağışıklık, kazanılmış bağışıklık ve bazı antimikrobiyal ajanlar tarafından parçalanmaktan korumaktadır (Persson vd. 1991; Fernandez ve Weiss 1994; Fernandez ve Weiss 1996; Fernandez ve Weiss 1998). Aynı zamanda konağın solunum yolu hücrelerine yapışmayı sağlayan BrkA'nın içerdiği bazı diziler Prn ve Tcf ile benzerlik göstermektedir (Fernandez ve Weiss 1994; Fernandez ve Weiss 1996). BrkA henüz hiçbir hücresiz boğmaca aşısına dâhil edilmemiştir (Dorji vd. 2018). Ancak yapılan çalışmalar pertussis toksin, FHA ve BrkA içeren üç bileşenli aşılardan fareleri *B. pertussis* Tohama – I suşuna karşı korumada ticari aşılardan kadar etkili olduğunu, ancak tek başına BrkA ile bağışıklamanın bakteri kolonizasyonuna karşı herhangi bir etkisi olmadığını göstermiştir (Marr vd. 2008).

2.8. Pertussis Toksin (PT)

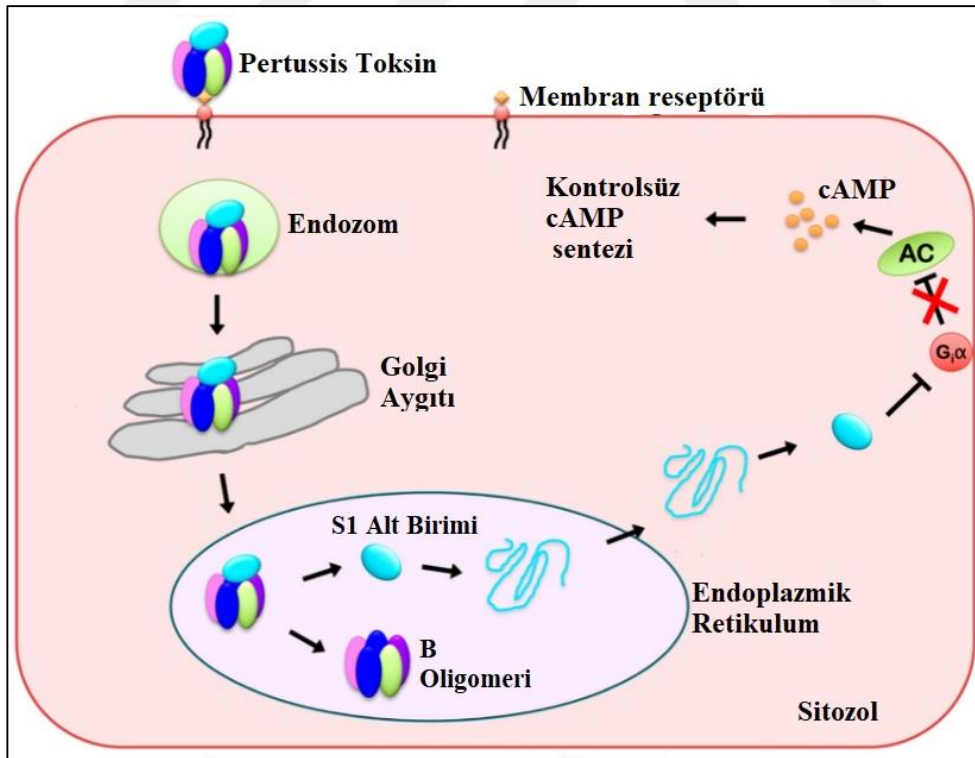
Pertussis toksin (PT), *Bordetella* türlerinden sadece *B. pertussis*'de bulunan, *ptxA* ve *ptxE* genleri tarafından kodlanan 117 kDa'lık bir A – B toksindir (Mattoo ve Cherry 2005; Lochte ve Antoine 2021). Bu toksin, enzimatik aktiviteye sahip S1 alt biriminin oluşturduğu A protomeri ile S2, S3, S4 ve S5 alt birimlerinin oluşturduğu ve toksinin hedef hücrelere girişini sağlayan B oligomerinin birleşmesi ile oluşmaktadır (Şekil 2.4)(Lochte ve vd. 2011). B oligomeri, PT'nin hedef hücre membranı üzerinde yer alan reseptörlere bağlanmasını sağlar ve reseptör aracılı endositoz ile toksin hücre içine alınır (Teter 2019). Hücre içine alınan toksin ilk olarak golgi aygıtına ardından endoplazmik retikulumla taşınır (Şekil 2.5) (Ernst vd. 2018). Endoplazmik retikulumla gelene kadar bozulmadan taşınan toksin endoplazmik retikulumla geldiğinde, S1 alt birimi B oligomerinden ayrılarak düzensiz hale geçer ve sitozole salınır (Teter 2019; Hoonakker 2021). S1 alt birimi sitozole geçtikten sonra tekrardan katlanarak ADP – ribozilasyonu yoluyla GTP bağlayıcı bir protein olan G_i proteinini inaktif hale getirir (Ernst vd. 2018; Hoonakker 2021). G_i proteinleri inaktif hale geldikleri için hedef enzimleri olan adenilat siklazı (AC) inhibe edemezler ve ATP'nin cAMP'ye dönüşümü durdurulamaz (Mangmool ve Kurose 2011; Hoonakker 2021). Sonuç olarak hücre içerisinde aşırı miktarda cAMP birikmiş olur (Lochte ve vd. 2011).

PT'nin ADP – riboziltransferaz aktivitesi sonucunda hücrelerde aşırı miktarda cAMP birikmesi birçok hücresel yolağın bozulması, lipoliz, lökositöz, lenfosit ve nötrofil göçünün engellenmesi, ekzokrin bezlerin aşırı salgı yapması, histamin duyarlılığı ve

pankreas adacık hücrelerinin uyarılması gibi birçok biyolojik etkiye neden olmaktadır (De Gouw vd. 2011; Carbonetti 2015). Yapılan hayvan çalışmaları, PT'nin fagositlerin, nötrofil, lenfosit ve makrofajların enfeksiyon bölgesine göçünü engelleyerek erken inflamasyonu önlediğini, *B. pertussis* patogenezinin oluşumuna katkı sağladığını göstermiştir (Carbonetti vd. 2003). Dolayısıyla PT boğmaca hastalığının gelişmesinde önemli bir role sahiptir ve günümüzde mevcut olan tüm hücresiz (aselüler) boğmaca aşılara dâhil edilmiştir (Ausar vd. 2020).



Şekil 2.4. PT'nin yapısal görünüşü (a) ve (b) (Mangmool ve Kurose 2011; Teter 2019)



Şekil 2.5. PT'nin konak hücre içersine girişi ve ADP – riboziltransferaz aktivitesi (Teter 2019)

2.9. Adenilat Siklaz Toksin (AST)

Adenilat siklaz toksin (AST), *cyaA* tarafından ifade edilen, RTX (toksin içinde tekrar eden) ailesinin bir üyesi olan, *B. pertussis*'in yanı sıra *B. paraptussis* ve *B. bronchiseptica* gibi memelileri enfekte eden tüm *Bordetella* alt türleri tarafından üretilen immünomodülatör bir toksindir (Carbonetti 2010; Eby vd. 2013). RTX ailesinin bir göstergesi olan glisin ve aspartik asit bakımından zengin bölgelerin 41 tekrarını içeren ve 1300 amino asitten oluşan C terminal alanı ve adenilat siklaz aktivitesine sahip 400 amino asit kalıntısından oluşan bir N terminal alanından oluşmaktadır (Smith vd. 2001; Vojtova vd. 2006; Eby vd. 2013). Diğer RTX ailesi üyeleri ile benzerlik gösteren C terminal alanı, toksinin hedef hücrelerde yer alan CR3 reseptörlerine bağlanarak toksinin hedef hücrelere tutunmasını ve konak hücrelerinin hücre zarı üzerinde katyon seçici gözenekler oluşturarak toksinin sitozole geçmesine aracılık etmektedir (Ladant ve Ullmann 1999; El-Azami-El-Idrissi vd. 2003). AST sitozole girdikten sonra toksinin N terminal alanı Ca^{2+} bağlayıcı bir protein olan kalmodulin (CaM) tarafından aktive edilir ve hücre içerisinde yer alan ATP cAMP'ye dönüştürülür (Vojtova vd. 2006; Fiser vd. 2012). AST, meydana getirdiği ani cAMP artışı ile bakterilerin makrofajlar ve nötrofiller tarafından oksidatif patlatılmasını ve miyeloid fagositlerin bakterisidal aktivitelerini engellemektedir (Fiser vd. 2012; Hasan vd. 2018). Sonuç olarak, konağın hücresel zar geçirgenliğini bozması ile iyon dengesine müdahale etmesi ve hedef hücre içerisindeki cAMP seviyesini yükselterek hücresel sinyal yollarını bozması olmak üzere 2 farklı bakteriyel toksin stratejisini birleştirerek konağın hücre fizyolojisine zarar vermektedir (Vojtova vd. 2006).

2.10. Dermonekrotik Toksin (DNT)

Dermonekrotik toksin (DNT), *Bordetella* türleri tarafından sentezlenen, 1464 amino asitten oluşan ve *bvg* lokusu tarafından düzenlenen 160 kDa'lık bir toksindir (Pullinger vd. 1996; Smith vd. 2001). Öldürücü toksin olarak da bilinen DNT, hedef hücre reseptörlerine bağlanmada görev alan N – terminal alanı ve enzimatik aktiviteye sahip bir C terminal tek zincirli polipeptitten oluşan bir proteindir (Matsuzawa vd. 2004). İlk olarak 56 °C'de inaktif hale geldiği için ısıya dayanıksız toksin olarak adlandırılan bu toksin daha sonrasında farelerin deri altına enjekte edildiğinde karakteristik bir yara bıraktığı için DNT olarak adlandırılmıştır (Dorji vd. 2018). Bu toksin hücre dışına salgılanması için gerekli olan sinyal dizilerinden yoksundur, dolayısıyla bakterilerin sitoplazmasında bulunmaktadır ve bu nedenle saflaştırılması oldukça zordur (Cowell vd. 1979; Melvin vd. 2014). DNT'nin bakteri stoplazmasında bulunması aynı zamanda enfeksiyon sırasında bakterilerin hayatta kalmasını kolaylaştırarak dolaylı olarak patogeneze katılır (Melvin vd. 2014). DNT birçok toksinden farklı olarak hücre farklılaşması, aktin iskeletinin düzenlenmesi, belirli temel genlerin transkripsiyonu gibi olaylardan sorumlu Rho ailesi GTPaz enzimlerini aktive etmektedir (Masuda vd. 2000; Horiguchi 2001). GTPaz aktivasyonu hücre farklılaşmasının bozulmasına ve sitokinez inhibisyonu gibi etkilere yol açmaktadır (Horiguchi 2001). DNT aynı zamanda osteoblastik farklılaşmayı, DNA ve protein sentezini inhibe edebilmektedir (Horiguchi 2001). *B. bronchiseptica*'nin ürettiği DNT'nin domuzlarda bronkopnömoni ve konka atrofisi gibi hastalıklara katkıda bulunduğu bilinse de farelerde yapılan deneylerde

DNT bulundurmeyen mutant *B. pertussis*'in ve DNT bulunduran *B. pertussis*'in virülans yeteneği açısından herhangi bir farklılık göstermediği görülmüştür (Weiss ve Goodwin 1989; Brockmeier vd. 2002).

2.11. Trakeal Sitotoksin (TCT)

Trakeal sitotoksin (TCT), bakteri hücre duvarına yapısal sertlik sağlayan muramil peptit ailesinden gelen ve bakteri hücre duvarı peptidoglikanının bir bileşeni olan 921 kDa'lık bir disakarit – tetrapeptiddir ve *B. pertussis*'te BvgAS'den bağımsız bilinen tek virülans faktörüdür (Luker vd. 1993; Smith vd. 2001). Bütün Gram negatif bakteriler peptidoglikan tabakaya sahiptir ancak çoğu Gram negatif bakteri bu molekülü geri dönüştürse de *Bordetella* ve *Neisseria* TCT'yi muramil peptitleri şeklinde hücre dışına salmaktadır (Humann ve Lenz 2009; Smith vd. 2001). TCT konakçı hücrelerinde interlökin – 1 üretimini indüklemektedir (Heiss vd. 1993). İnterlökin – 1 konakçı hücre nitrik oksit sentazı aktive ederek ve konak hücrelerinde aşırı miktarda nitrik oksit birikimine neden olur (Heiss vd. 1994). Nitrik oksit, demire bağımlı enzimleri yok ederek, konak hücrelerde DNA sentezinin ve mitokondriyal fonksiyonların inhibe edilmesine neden olur (Heiss vd. 1993). TCT aynı zamanda akciğerlerde bulunan siliyer epitel hücrelerini yok ederek konağın akciğerlerde oluşan mukusu atmasını engeller ve boğmaca hastalığının karakterize öksürüğünün oluşmasına katkıda bulunur (Luker vd. 1995).

2.12. Lipooligosakkarit (LOS)

Lipopolisakkarit tabakası (LPS), bütün Gram negatif bakterilerde bulunan bir çekirdek oligosakkarit, bir lipit A parçası ve O – antijen olarak bilinen uzun bir polisakaritten oluşan bir tabakadır (Peppler 1984; Smith vd. 2001; Raetz ve Whitfield 2002). *B. pertussis*'de bulunan lipopolisakkaritler, diğer Gram negatif bakterilerde bulunan LPS'den daha küçük olması ve O – antijen içermemesi nedeniyle lipooligosakkarit (LOS) olarak da adlandırılmaktadır (Allen vd. 1998; Fedele vd. 2008). LOS tabakası genel olarak güçlü bir endotoksin işlevine sahiptir (Caroff vd. 2000; Caroff vd. 2001). LOS, trakeal sitotoksine benzer şekilde nitrik oksit üretimini indükleyerek konağın solunum yollarında bulunan siliyer hücrelerini yok edebilmektedir (Flak ve Goldman 1999). Aynı zamanda yapılan çalışmalar *B. pertussis*'te bulunan LOS'un yüksek oranda korunduğunu, aşı öncesi ve aşı sonrası dönemde izole edilen klinik izolatlarda LOS yapısında değişiklik olmadığını göstermiştir (AlBitar-Nehme vd. 2013; Wang vd. 2020). LOS hem yüksek oranda korunması hem de güçlü bir adjuvan aktiviteye sahip olması dolayısıyla ileride yapılacak geniş spektrumlu boğmaca aşıları için oldukça önemlidir (Geurtsen vd. 2006; Wang vd. 2020).

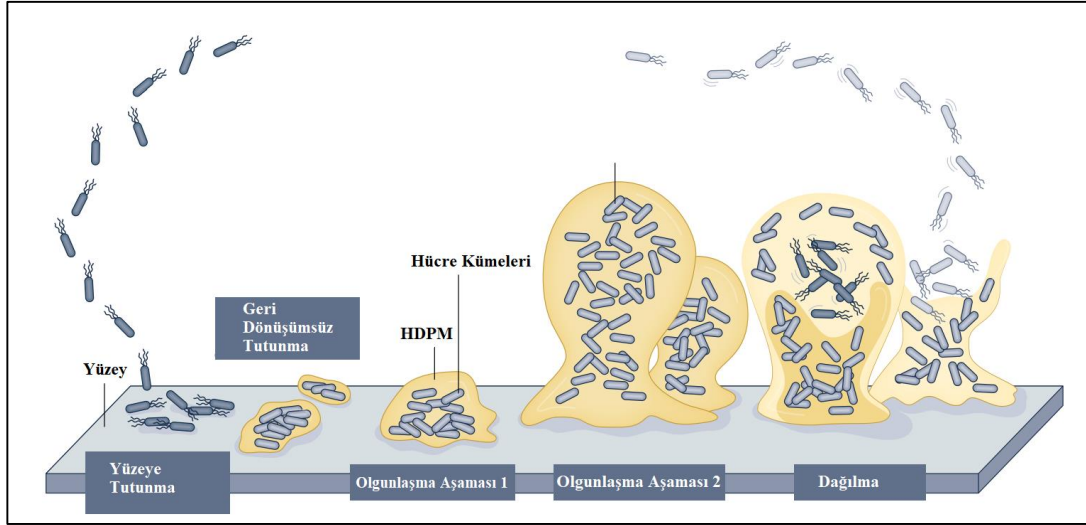
Bordetella cinsinde farklı lipopolisakkarit yapıları bulunmaktadır. *B. pertussis* türünün aksine *B. paraptussis* ve bazı *B. bronchiseptica* suşlarında O – antijeni bulunmaktadır (Geurtsen vd. 2006; Goebel vd. 2008). *B. paraptussis*'in sahip olduğu O – antijeninin konak antikorlarının bakteri yüzeyine bağlanmasını engellediği bilinmektedir (Wolfe vd. 2007). İlginç bir şekilde yapılan çalışmalar *B. paraptussis* suşlarında insanlardan ve koyunlardan izole edilen suşların farklı LPS yapılarına sahip olduğunu göstermiştir (van den Akker 1998). Bu durum *Bordetella* türlerinde tür özgüllüğünün yüksek

olduğunu ve enfekte edecekleri konağa uygun LOS tabakaya sahip olabileceklerini göstermektedir (van den Akker 1998; Novikov vd. 2019).

2.13. Bakteriyel Biyofilmler

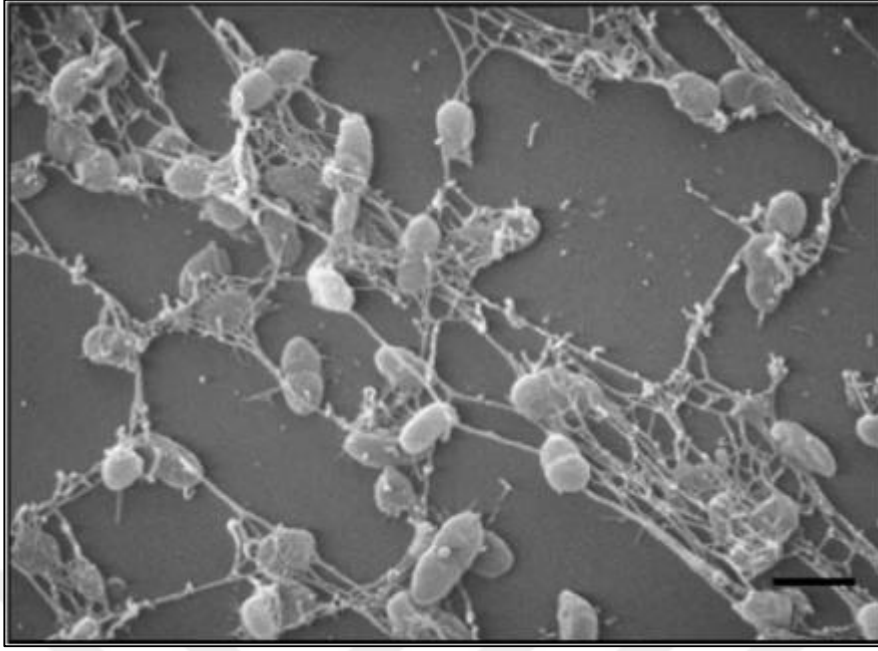
Bakteriler doğada planktonik hücreler ve mikrobiyal kümeler oluşturan (biyofilmler) hücreler olmak üzere 2 farklı yaşam tarzı sergilemektedirler. Biyofilm kelimesi asıl olarak biyomateryal anlamına gelmektedir ve herhangi bir yüzeye bağlı olmayan kümelenmiş bakteriler de biyofilmler olarak kabul edilmektedir (Costerton ve Geesey 1978; McCoy vd. 1981; Flemming vd. 2021). Biyofilmler içerisinde tek bir bakteri türü bulunabildiği gibi birden fazla türde bulunabilmektedir. Biyofilm içerisinde birden fazla tür bulunması topluluk üyelerinin gelişmiş metabolik aktivitesi, biyofilm yapısında değişiklikler, artan hücre sayısı, biyofilm kütlesi ve antimikrobiyal tolerans ile ilişkilendirilmiştir (Sadiq vd. 2021).

Bakteriyel biyofilmlerin oluşumu tür çeşitliliği nedeniyle değişiklik gösterse de genellikle birbirine benzeyen çok adımlı bir süreçtir (Şekil 2.6). Genel olarak 5 adımlı ilerleyen bu süreçte ilk olarak bakterilerin geri dönüşümlü bir şekilde yüzeye tutunması ile başlamaktadır. Bu adımda Brownian hareketi, sedimantasyon, kemotaksis veya koveksiyon ile taşınan bakteri hücreleri yüzeye tutunur ve ardından geri dönüşümsüz bağlanma adımı gelmektedir (Palmer vd. 2007). İkinci adım olan geri dönüşümsüz bağlanma bakteriyel hücre yüzeyinin hidrofobikliği, kovalent bağ, hidrojen bağı, iyonik bağ ve dipol-dipol etkileşimleri yoluyla gerçekleşmektedir (Zhao vd. 2023). Bu aşamada bakterilerde kamçı sentezinde dolayısıyla kamçı yapılarında azalma, devam eden süreçte biyofilm matriks bileşenlerinin üretimi gerçekleşmektedir (Sauer vd. 2022). Bu aşama aynı zamanda biyofilmdeki bakterilerin ilaç direnci göstermesi ile ilişkilendirilmiştir (Gupta vd. 2013). Hücre dışı polimerik maddelerin (HDPM) salgılanması ile birlikte biyofilm oluşumunun 3. adımı olan olgunlaşma adımı başlamaktadır. HDPM, biyofilmin içyapısını ve biyofilm oluşumunu, yüzey tutunmasını, hücreler arasındaki karşılıklı tanımayı, sinyal iletim sistemini ve genetik bilgi alış verişini etkileyebilmektedir (Costa vd. 2018). Dördüncü adımda matriks içerisinde bulunan bakteri sayısı artarak küçük mikrobiyal koloniler ve üç boyutlu yapılar oluşmaktadır. Bu aşamada oluşturulan matriks ile yabancı maddelerin biyofilm içerisine girişi engellenmektedir (Zhao vd. 2023). Matriks bileşenlerinin azalması ve bozunması ile birlikte biyofilm yapısının dağıldığı 4. adım gerçekleşmektedir (Sauer vd. 2022). Bu aşamadan sonra serbest kalan bakteri hücreleri başka yüzeylere tutunarak tekrardan biyofilm oluşturabilmektedir (Zhao vd. 2023).



Şekil 2.6. Bakteriyel biyofilm oluşum aşamaları (Sauer vd. 2022)

Tüm bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık %65'inin bakteriyel biyofilmlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir (Lewis 2001). Bakteriyel biyofilmler, dezenfektanlara, antibiyotiklere ve konağın immün sistemine karşı dirençli olduğu bilinmektedir (Høiby vd. 2011). *B. pertussis* hücrelerinde biyofilm yaşam tarzına sahip olduğu bilinmektedir (Şekil 2.7). Biyofilm oluşumu, *B. pertussis*'in konağın akciğerlerinde kolonizasyonunu, kalıcılığını ve virülans özelliklerinin artmasını sağlamaktadır. Bu durum özellikle yeni doğan aşılanmamış bebeklerde boğmacanın bulaşını arttırmaktadır (Serra vd. 2011; Cattelan vd. 2016; Cattelan vd. 2017). Ayrıca günümüzde dolaşımda olan *B. pertussis* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin aşı çalışmalarında kullanılan standart suş Tohama – I'den daha iyi olduğu bilinmektedir (Arnal vd. 2015; Dorji vd. 2016; Cattelan vd. 2017). Gerçekleştirilen fare çalışmalarında *B. pertussis*'in hem burun hem de akciğerde epitelinde kümeler ve makrokoloniler şeklinde biyofilm oluşturduğu gösterilmiştir (Cattelan vd. 2016). Ayrıca *B. pertussis*'te artan biyofilm oluşumunun farelerin burnunda ve akciğerlerinde daha yüksek bakteriyel kolonizasyona neden olduğu gösterilmiştir (Cattelan vd. 2017). Son yapılan çalışmalar BipA ile aşılanmış farelerin akciğerlerindeki *B. pertussis* kolonizasyonunun aşılanmamış farelere göre önemli derecede azaldığını göstermiştir. Bu durum biyofilm proteinlerinin ve özellikle BipA'nın gelecekteki boğmaca aşıları için bir alternatif olabileceğini göstermiştir (De Gouw vd. 2014).



Şekil 2.7. *B. pertussis*'te biyofilm oluşumu (Mishra vd. 2005)

2.14. Boğmaca ve Aşı

İlk boğmaca aşısı, 1914 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ruhsatlanmış, öldürülmüş *B. pertussis* hücrelerinden oluşan bir tam hücre aşısıdır (wP) (Klein 2014). O dönemde boğmaca aşıları korunmadan ziyade tedavi amaçlı kullanıldığı için ilk boğmaca aşısının etkileri hakkında tam olarak bir şey söylemek mümkün değildir (Kuchar vd. 2016). Ardından 1932'de Pearl Kendrick ve Grace Elderlin, Jules Bordet ve Octave Gengou tarafından bulunan *B. pertussis* besiyerini geliştirerek bakterinin daha hızlı kültürlenmesini, dolayısıyla boğmaca tanısının daha kolay anlaşılması sağlanmıştır (Kuchar vd. 2016). Kendrick ve Eldering 1934 – 1935 yılları arasında wP 'nin etkinliğini anlamak için yaptıkları çalışmalarında boğmaca aşısının etkinlik oranını %89 olarak belirtmişlerdir (Kendrick ve Eldering 1936). 1943'te Amerikan Pediatri Akademisi'nin wP'nin rutin kullanım için onaylamasının ardından tarihte ilk kez 1948 yılında ABD'de boğmaca vaka sayısı 100.000'in altına düşmüştür (Clark 2014). Çoğu wP boğmacadan korunmada oldukça etkilidir ancak üretilen her tam hücreli boğmaca aşısı beklenen güçlü korumayı sağlayamamıştır. 1985 ve 1998 yılları arasında yalnızca Kanada'da kullanılan ABD lisanslı Connaught Laboratories tarafından üretilen bir difteri, tam hücre boğmaca ve tetanoz toksoid aşısı (DTP) yalnızca %49 – 61 arasında etkinlik sağlayabilmiş, bu durum 1990'lı yıllarda Kanada'da boğmaca hastalığının önemli derecede yeniden artmasına neden olmuştur (De Serres vd. 1996; Bentsi-Enchill vd. 1997; Ntezayabo vd. 2003). Benzer şekilde 1993'lü yıllarda ABD'de büyük oranda DTP ile aşılanmış bir popülasyonda boğmaca salgını meydana gelmiş ve meydana gelen salgında DTP aşılarına doğrudan bir suçlama yapılmamış olmasına rağmen aşıların %72'sinin Connaught Laboratories tarafından üretildiği belirtilmiştir (Christie vd. 1994). DTP aşılarının çoğunun oldukça etkili olmasına rağmen, bazı lisanslı aşıların bu şekilde

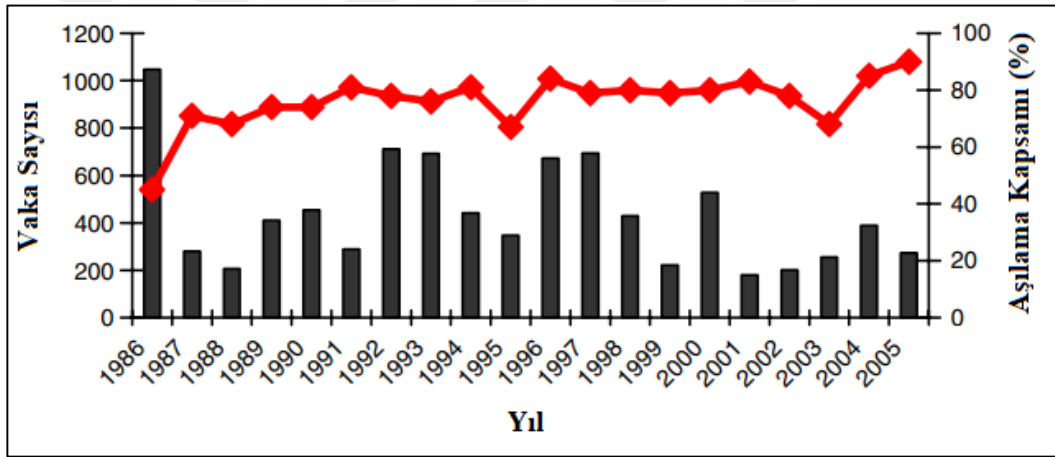
zayıf koruma ile ilişkilendirilmesi tüm DTP aşılarının koruma kapasitesi ile ilgili kamuoyunda endişe yaratmıştır (Klein 2014).

wP'nin yaygın olarak kullanılmasının ardından vaka sayılarının önemli derecede azalması ile birlikte wP'nin yan etkileri ile ilgili korkular oluşmaya başlamıştır (Klein 2014; Kuchar vd. 2016). wP, aşılanmanın ardından ateş, mide bulantısı, aşı yerinde şişme, ağrı ve hiperirritasyon gibi yaygın yan etkiler göstermekteydi (CDC 1996). wP olmuş çocuklarda seyrek olarak sürekli ağlama, konvülsiyon ve tüm uzuv şişmesi gibi şiddetli sistemik yan etkiler, nadiren de akut ensefalopati görülebilmekteydi (Guris vd. 1997; Klein 2014). Bu durum wP'nin güvenilirliğine karşı bir endişe oluşturmıştır. Oluşan bu endişe sonucunda Japonya ve İsveç'te boğmaca aşılama programları askıya alınmış, İtalya, Birleşik Krallık, Avustralya, İrlanda, Batı Almanya ve Rusya gibi ülkelerde ise boğmaca aşısının kabulü önemli derecede azalmıştır (Sato vd. 1984; Romanus vd. 1987; Cherry vd. 1988; Gangarosa vd. 1998). Sonuç olarak wP'ye karşı oluşan bu yaygın endişe yeni boğmaca aşılarının geliştirilmesi amacıyla çalışmalar yapılmasına neden olmuştur.

İlk aselüler boğmaca aşısı (aP) 1981 yılında Sato ve meslektaşları tarafından Japonya'da geliştirilen, formaldehitte işlenmiş *B. pertussis*'in önemli virülans faktörleri olan FHA ve PT'yi içeren bir aşıydı (Sato vd. 1984). Bunu takip eden yıllarda İsveç, İtalya, Almanya ve Senegal gibi ülkelerde de aP denemeleri yapılmış, yapılan bu denemelerde aP'lerde yer alan PT daha zararsız formu ile değiştirilmiş, PT ve FHA'ya ek olarak aşılar Prn, tip 2 ve tip 3 Fim antijenleri eklenmiştir (Guiso vd. 2020; Çolak ve Tefon Öztürk 2022). 1990'lı yılların ortalarında İsveç'te iki bileşenli (PT ve FHA), İtalyan üç bileşenli (PT, FHA, Prn) (Acelluvax) ve beş bileşenli (PT, FHA, Prn, Fim 2 ve 3) aşıların karşılaştırıldığı bir çalışmada, beş bileşenli aP'lerin üç bileşenli aP'lerden önemli ölçüde daha iyi koruma sağladığını ve aP'lerin etkinliğinin bileşen sayısına bağlı olduğunu göstermiştir (Olin vd. 1997). Ayrıca yapılan çalışmalar sonucunda geliştirilen tüm difteri, tetanoz ve aselüler boğmaca aşıları (DTaP) yapılarında LOS içermedikleri için tam hücreleri boğmaca aşılarında görülen ciddi yan etkiler bu aşılarla görülmemektedir (Cherry 2013). Dolayısıyla bu aşılar, 3000'den fazla antijen içeren DTP aşılarına kıyasla çok daha az antijen (PT, FHA, Prn, Fim 2 ve 3 olmak üzere en fazla 5 antijen) içermelerine rağmen dünya çapında yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır (Cherry 2013).

Genel olarak ülkemizde gerçekleşen aşılanma uygulamalarının kökeni Osmanlı Dönemine dayanmaktadır (Akdeniz ve Kavukcu, 2016). Zaman içerisinde bulaşıcı hastalıklar ile mücadele amacıyla hıfzıssıhhaların kurulması ile birlikte aşı çalışmaları hızlanmıştır. Türkiye'de kullanılan ilk boğmaca aşısı Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü'nde 1937 yılında üretilmiştir (Tüzün ve Erkmen, 2022). 1968 yılından itibaren difteri/tam hücreli boğmaca/tetanoz (DBT) karma aşısı uygulanmaya başlanmış ve uzun yıllar boyunca aşı ve aşılanma dozlarıyla ilgili olarak bir değişiklik yapılmamıştır (Özmert 2008; Kurugöl 2011). 1974 yılında başlatılan Genişletilmiş Bağışıklama Programı (GBP) ve Ulusal Aşı Kampanyası (1985) ile birlikte aşılanma oranı hızla artarak 2005 yılında ülke

genelinde %90'a kadar ulaşmıştır (Dilli vd. 2008). Yüksek aşılama oranları ile birlikte 1970'de 100.000'de 21 vaka olan boğmaca insidansı 2001 yılında 100.000'de 0.27 vakaya kadar indirilmiştir (Cöplü vd. 2005). Ancak yüksek oranda aşılamaya ve boğmaca insidansındaki düşüşe rağmen 1997, 2000 ve 2004 yıllarında boğmaca vakalarında ani artışlar ve boğmaca salgınları meydana geldiği kaydedilmiştir (Şekil 2.8)(Kurugöl 2011). Tam hücreleri boğmaca aşısı genel olarak boğmaca vaka sayısında azalma sağlamış olmasına rağmen diğer ülkelerde de olduğu gibi yan etkileri sebebi ile 2009 yılından itibaren difteri, boğmaca, tetanoz, inaktif polio, *Hemofilus influenza* tip b'den oluşan 5'li karma aP aşısı (DaBT – İPA – Hib) uygulanmaya başlanmıştır (Otar vd. 2014b). Ülkemizde kullanılan bu aşı 2011 yılına kadar 2, 4 ve 6. aylarda ilk aşılama, 18. ayda ise pekiştirme dozu olmak üzere 4 doz halinde uygulanmıştır (Kurugöl 2011; Tezer 2016). Ancak yüksek aşılama oranlarına rağmen boğmaca hastalığının görülmeye devam etmesi ve vaka sayılarında meydana gelen artış sonucunda Sağlık Bakanlığı 2010 yılında ilköğretim 1. Sınıflara uygulanmak üzere 1 doz daha aselüler boğmaca aşısı (DaBT – İPA) eklemiştir (Şekil 2.9)(Kurugöl 2011).



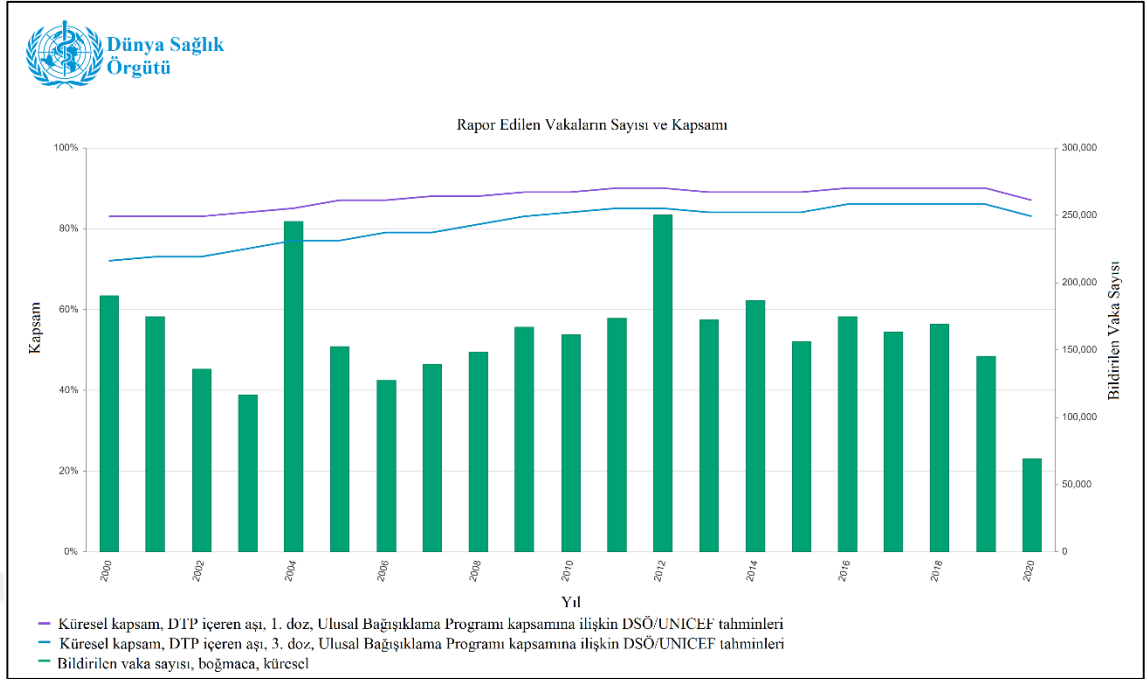
Şekil 2.8. 1986 ve 2005 yılları arasında Türkiye’de görülen boğmaca vakaları ve aşılama insidansı (Dilli vd. 2008)

T.C. Sağlık Bakanlığı Çocukluk Dönemi Aşı Takvimi, 2020												
Aşılar	Doğumda	1. ayın sonu	2. ayın sonu	4. ayın sonu	6. ayın sonu	9. ayın sonu	12. ayın sonu	18. ayın sonu	24. ayın sonu	48. ayın sonu***	13 yaş	
Hepatit B	I	II			III							
BCG (Verem)			I									
DaBT-İPA-Hib			I	II	III			R				
KPA*			I	II			R					
KKK						ID**	I			II		
DaBT-İPA										R		
OPA					I			II				
Td											R	
Hepatit A								I	II			
Suçiçeği							I					
*01.01.2019 tarihinden itibaren doğan bebeklere 2., 4. ve 12. aylarda uygulanacaktır.												
**25.09.2019 tarihli BDK kararıyla salgın riski olan bölgelerde 9. - 11. ayda ilave bir doz Kızamık içeren aşı (K veya KKK) uygulanacaktır.												
***11 Temmuz 2016 tarihinde doğanlardan başlamak üzere, 48. ayına girmiş olan tüm çocuklara uygulanacaktır. 1 Temmuz 2016 tarihinden önce doğmuş ve halen ilköğretime başlamamış olan çocukların KKK ikinci dozu ve DaBT-İPA aşısı ise 2020-2021, 2021-2022 ve 2022-2023 eğitim ve öğretim dönemlerinde, ilköğretim 1. sınıfta, okul aşılamaları şeklinde uygulanacaktır.												
DaBT-İPA-Hib: Difteri, Aselüler Boğmaca, Tetanoz, İnaktif Polio, Hemofilus Influenza Tip b Aşısı (Beşli Karma Aşı)												
KPA: Konjüge Pnömonokok Aşısı												
KKK: Kızamık, Kızamıkçık, Kabakulak Aşısı												
DaBT-İPA: Difteri, Aselüler Boğmaca, Tetanoz, İnaktif Polio Aşısı (Dörtlü Karma Aşı)												
OPA: Oral Polio Aşısı (Çocuk Felci Aşısı)												
Td: Erişkin Tipi Difteri-Tetanoz Aşısı												
R: Rapel (Pekiştirme) ID: İlave Doz												
Aşı takvimindeki tüm aşılar ücretsizdir.												

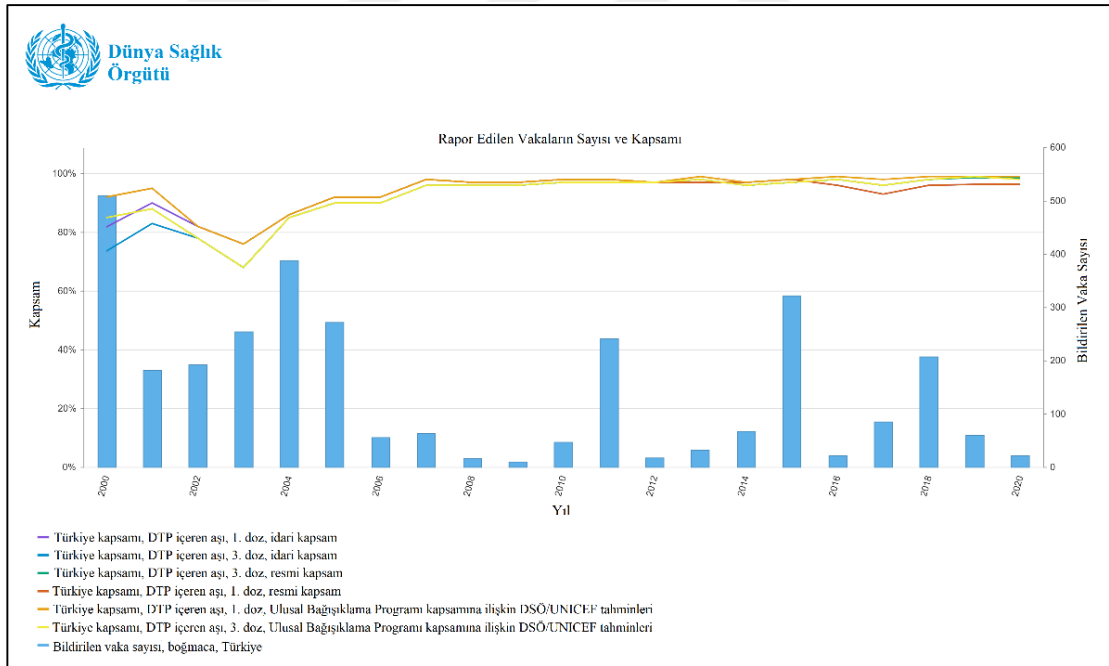
Şekil 2.9. Çocukluk dönemi aşı takvimi (Anonim 1)

2.14 Boğmacanın Yeniden Yükselişi

Son yıllarda boğmaca karşı aşılama dünya çapında yaygın bir şekilde devam etmektedir. DSÖ'ye göre 2018 yılında küresel hedef popülasyonun %86'sı DTP ile aşılanmıştır (WHO 2023). Ancak yüksek aşılama oranlarına rağmen boğmaca hastalığı dünya çapında sıklıkla görülmeye devam etmektedir (Şekil 2.10) (Tan vd. 2005; Bento vd. 2018; Yasui vd. 2018; Çolak ve Tefon Öztürk 2022). 2018 yılında 30 Avrupa Ülkesi tarafından toplamda 35.627 boğmaca vakası olduğu bildirilmiştir (ECDC 2020). Dünyada olduğu gibi ülkemizde de yüksek aşılamaya rağmen boğmaca vakaları görülmeye devam etmekte ve 3 – 4 yıl aralıklarla boğmaca salgınları meydana getirmektedir (Şekil 2.11) (Yiğit vd. 2020).



Şekil 2.10. Dünya genelinde boğmaca vaka sayıları ve aşılama insidansı (WHO 2023)



Şekil 2.11. Türkiye genelinde boğmaca vaka sayıları ve aşılama insidansı (WHO 2023)

Boğmaca hastalığının yeniden artışının nedenleri arasında; son yıllarda artan çalışmalar ile boğmacanın daha tanınır hale gelmesi ve farkındalığın artması, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi yeni laboratuvar teşhis yöntemlerinin geliştirilmesi, aP aşılarının koruyuculuk sağlamada wP aşıları kadar başarılı olamaması, dolayısıyla popülasyonda boğmacaya karşı bağışıklığın yeterli derecede gelişmemesi ve B.

pertussis'te gerçekleşen genetik değişiklikler gibi nedenler yer almaktadır (Cherry 2013). Hem DTaP hem de DTP ile aşılanan çocuklarda aşının üçüncü ve dördüncü dozundan sonra oluşan antikor sayısı hızla azalmaktadır (Guerra vd. 2009). Ayrıca DTP ile aşılanan çocuklarda, hastalıktan korunmaya ek olarak bakteri kolonizasyonunu ve bulaşmasını engelleyen T helper (Th) 1 ve Th17 hücrel yanıt uyarılırken, DTaP ile aşılanan çocuklarda Th2'nin baskın olduğu hücrel yanıt uyarılmaktadır (Kapil ve Merkel 2019). Bebek babunlar ile yapılan bir çalışmada *B. pertussis* ile enfekte olmuş ve wP ile aşılanmış babunlarda güçlü Th1 ve Th17 üretiminin olduğu, aP ile aşılanmış babunlarda ise bunun aksine Th1/Th2 üretiminin yüksek olduğu gösterilmiştir (Warfel vd. 2014). Araştırmacılar doğal enfeksiyondan farklı gelişen bu immün yanıtın *B. pertussis* kolonizasyonunu veya bulaşmasını önlemede başarısız olduğundan aP aşılarının boğmaca vakalarının yeniden artmasına neden olmuş olabileceğini belirtmişlerdir (Warfel vd. 2014).

aP aşılarının etkinliğini etkileyen bir başka sebep ise *B. pertussis*'in genomunda meydana gelen değişikliklerdir. Evrimsel süreçte başta Prn olmak üzere aşıda bulunan antijenleri genomunda bulundurmeyen *B. pertussis* suşlarının olduğu görülmüştür (Barkoff ve He 2019). Amerika Birleşik Devletleri'nde 2010 yılında %14 olan Prn içermeyen *B. pertussis* suşları 2012'de %85'e kadar yükselmiştir (Breakwell vd. 2016). Benzer şekilde dünyanın pek çok yerinde Prn bulundurmeyen *B. pertussis* suşlarının neden olduğu boğmaca salgınları meydana gelmiştir (Lam vd. 2014; Pawloski vd. 2014; Theofiles vd. 2014; Safarchi vd. 2016). Yapılan çalışmalar *B. pertussis*'in dinamik bir bakteri olduğunu ve genomik olarak değişmeye devam ettiğini göstermiştir (King vd. 2010).

Günümüzde yüksek aşılama oranlarına rağmen meydana gelen yüksek boğmaca vakalarını önlemek amacıyla farklı stratejiler geliştirilmektedir. Bu çalışmalardan bir tanesi günümüzde kullanılan aP aşılarının geliştirilmesidir (Dewan vd. 2020). Günümüzde kullanılan aP aşılarının farklı adjuvanlar ile geliştirilmesi, aşılar var olan antijenlere yenilerinin eklenmesi, canlı zayıflatılmış aşılarda geliştirilmesi ve dış zar vezikül aşılarının geliştirilmesi olmak üzere 4 ana strateji üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (Dewan vd. 2020). Yeni boğmaca aşılarının geliştirilmesine ek olarak ergenlerin ve yetişkinlerin aşılanması, annelerin aşılanması ve yeni doğan bebekler ile etkileşimde olan herkesin (hane halkının) aşılanmasına (koza stratejisi) yönelik çalışmalar yapılmaktadır (Van Rie ve Hethcote 2004; Zasztowt-Sternicka vd. 2021).

Boğmaca vakalarındaki artışın bir diğer sebebi ise antibiyotik dirençli *B. pertussis* suşlarının zaman içerisinde artış göstermesidir. Yapılan çalışmalar eritromisin gibi klinikte yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin *B. pertussis*'e karşı etkinliğinin önemli derecede düştüğünü, eritromisin dirençli suşların salgınlara neden olduğunu göstermiştir (Yang vd. 2015; Lönnqvist vd. 2018; Li vd. 2019; Yao vd. 2020; Feng vd. 2021). Antibiyotiklerin etkinliği başlıca hedef patojen (uygulanan antibiyotiğe karşı duyarlı olup olmaması, biyofilm oluşturması vb.), hastanın vücut sistemi ve uygulanan antibiyotik

konsantrasyonu olmak üzere birçok faktörden etkilenmektedir (Li vd. 2017). Özellikle antibiyotiklerin yeterli dozlarda kullanılmaması veya dozlar arasındaki sürenin doğru ayarlanmaması sonucunda bakterilerin antibiyotiklerin öldürücü olmayan sub-MİK konsantrasyonlarına maruz kalması antibiyotiklere karşı direnç geliştirmelerine neden olabilmektedir (Gullberg vd. 2011; Goneau vd. 2020). Antibiyotiklere karşı gelişen bu direncin bir kez ortaya çıktıktan sonra hızlı bir şekilde yayılabildiği, hastane gibi antibiyotiklerin yaygın kullanıldığı ortamlarda antibiyotik dirençli bakterilerin salgınlara sebep olabildiği bilinmektedir (Dewan vd. 2018). Ayrıca sub-MİK antibiyotikler rekombinasyon, mutasyon ve yatay gen transferi oranlarını artırarak bakterilerde genetik değişikliğe de sebep olabilmektedir (Andersson ve Hughes 2014). Bu nedenle antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının bakteriler üzerindeki etkisinin anlaşılması için çalışmalar yapılması oldukça önemlidir. Bu tür çalışmalara ek olarak antibiyotik kullanımının yalnızca tedavi amaçlı değil aynı zamanda antibiyotik direnç gelişimini en aza indirecek şekilde optimize edilmesi, yeni antibiyotik kullanım stratejilerinin geliştirilmesi gerekmektedir (Li vd. 2017). Ayrıca geniş spektrumlu antibiyotiklerin aksine hedef bakteriye etki edecek dolayısıyla geniş spektrumlu antibiyotiklere göre daha düşük direnç gelişimine neden olan dar spektrumlu yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi gerekmektedir (Cantón vd. 2013).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Kullanılan Bakteri Suşu ve Büyüme Koşulları

Deneyler sırasında *Bordetella pertussis* Tohama – I suşu kullanılmıştır. *B. pertussis* hücreleri Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü hocalarından Prof. Dr. Meral Dilara Ögünç tarafından Akdeniz Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Mikrobiyoloji Laboratuvarına temin edilmiştir ve alt kültürler oluşturulmuştur. Oluşturulan alt kültürlerden daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere -80 stokları alınmıştır. Bakteri hücreleri kendilerine özgü besiyerleri olan Morse Bray sıvı besiyerinde (Morse ve Bray 1969) ve modifiye edilmiş Cohen – Wheeler agar (Sato ve Arai 1972) besiyerinde 37 °C’de büyütülmüşlerdir (EK – 1 ve EK – 2).

3.2 Eritromisin Antibiyotiğinin Hazırlanması

Eritromisin antibiyotiğinin ana stoğu Bannatyne ve Cheung (1982)’un çalışmalarında belirtildiği şekilde hazırlanmıştır. İlk olarak 2 mg/mL eritromisin %30’luk etanol içerisinde çözündürülerek bir ana stok hazırlanmıştır. Ara stoklar, hazırlanan ana stoğun steril distile su ile seyreltilmesiyle hazırlanmıştır.

3.3. Eritromisin Antibiyotiğinin MİK ve sub-MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Eritromisin antibiyotiğinin MİK değerinin belirlenebilmesi için sıvı dilüsyon yöntemi kullanılmıştır (Hoppe ve ark. 1989). İlk aşamada geniş eritromisin konsantrasyonu aralığında bakteri kültürleri oluşturulmuştur. Antibiyotik içeren bakteri kültürleri oluşturulurken ilk olarak yeni büyütülmüş *B. pertussis* Tohama – I hücreleri salin (%0.85’lik NaCl çözeltisi) içerisinde 0.5 McFarland’a ayarlanmıştır. Ardından içerisinde belirli oranlarda (0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 5 µg/mL) eritromisin bulunan 18 mL MB besiyerine hazırlanan bakteri solüsyonundan 2 mL eklenerek son hacim 20 mL’ye tamamlanmıştır. Pozitif kontrol olarak eritromisin içermeyen *B. pertussis* kültürü, negatif kontrol olarak bakteri içermeyen MB besiyeri kullanılmıştır. Oluşturulan bakteri kültürleri 37 °C’de 150 rpm’de 96 sa inkübe edilmiştir. Dört günlük inkübasyon süresinin ardından tüm kültürlerin 600 nm’de (OD 600) spektrofotometrik ölçümleri yapılmıştır.

Deneylerin 2. aşamasında, 96 sa inkübe edilmiş kültürlerde bakteri büyümesi görülen en büyük antibiyotik konsantrasyonu (0.1 µg/mL) ile büyüme görülmeyen en küçük antibiyotik konsantrasyonu (0.5 µg/mL) belirlenmiştir. Ardından belirlenen eritromisin değerlerine göre eritromisin konsantrasyon aralığı daraltılarak yeni antibiyotik konsantrasyonları (0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 µg/mL) ile sıvı dilüsyon deneyi tekrarlanmıştır. Hazırlanan yeni kültürler 37 °C’de 150 rpm’de 96 sa inkübe edilmiştir. Deney sonunda bakteri büyümesi görülmeyen en düşük eritromisin konsantrasyonu MİK olarak belirlenmiştir. Belirlenen MİK değerinin 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 konsantrasyonları büyüme eğrisi deneylerinde sub-MİK olarak kullanılmıştır. Tüm deneyler 3 tekrarlı yapılmıştır.

3.4. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında *B. pertussis* Hücrelerinin Büyüme Hızının Belirlenmesi

B. pertussis Tohama – I hücrelerinin büyüme eğrileri spektrofotometrik yöntem kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Nikbin vd. 2018). Deneyler sırasında ilk olarak yeni büyütülmüş *B. pertussis* hücreleri MB besiyeri içerisinde OD600’de 0.05’e ayarlanmıştır. OD600’de 0.05’e ayarlanmış bakteri kültürleri içerisinde son konsantrasyon 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 MİK olacak şekilde eritromisin eklenmiştir. Pozitif kontrol olarak eritromisin içermeyen besiyerinde büyütülmüş bakteri hücreleri kullanılmıştır. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin içeren bakteri kültürleri 150 rpm ve 37 °C’de inkübe edilmiştir. Her 12 sa’de bir kültürlerin OD600’de absorbans değerleri alınarak büyüme eğrileri oluşturulmuştur. Deneyler tüm kültürlerden 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.5. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında *B. pertussis* Hücrelerinin Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi

B. pertussis hücrelerinin biyofilm oluşturma kapasiteleri belirlenirken 96 kuyulu hücre kültürü plağı yöntemi kullanılmıştır (Conover vd. 2010). Deneyler sırasında ilk olarak *B. pertussis* hücreleri MB besiyeri içerisinde OD600’de 0.1’e ayarlanmıştır. Hazırlanan bakteri solüsyonu üzerine son konsantrasyon 1/16, 1/32 ve 1/64 MİK olacak şekilde eritromisin eklenmiş ve örnekler 96 kuyulu hücre kültürü plağına kuyucuk başına 200 µL olacak şekilde yerleştirilmiştir. Hazırlanan hücre kültürü plağı statik koşullarda 37 °C’de 96 sa inkübe edilmiştir. Deneyler sırasında eritromisin içermeyen *B. pertussis* örneği pozitif kontrol, bakteri içermeyen MB besiyeri ise negatif kontrol olarak kullanılmıştır. İnkübasyon sonunda plakalar içerisinde yer alan örnekler dökülerek distile su ile iyice yıkanmıştır ve 37 °C’de 25 dak kurumaya bırakılmıştır. Plakaların kurumasının ardından her bir kuyucuğa 200 µL %0.1’lik kristal viyole çözeltisi eklenmiş ve oluşan biyofilmler 30 dak boyunca boyanmıştır. Boyama işleminin sonunda fazla boyanın gitmesi amacıyla plakalar distile su ile iyice yıkanmıştır. Ardından kuyucuklara 200 µL %95’lik etil alkol eklenerek boyanan biyofilmler çözdürülmüş ve 590 nm’de absorbans değerleri alınmıştır. Deneyler 3 tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.6. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında *B. pertussis* Hücrelerinin Pertussis Toksin ve Pertaktin Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

3.6.1. Sub-mik konsantrasyonlarda eritromisin varlığında büyütülen *B. pertussis* hücrelerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

B. pertussis hücrelerinden toplam RNA izole edilmesi için ilk olarak sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin içeren *B. pertussis* kültürleri MB besiyeri içerisinde 37 °C’de büyütülmüştür. Ardından toplam RNA ticari olarak satın alınan RNA izolasyon kitindeki (Zymo Research, ABD) üretici talimatlarına uygun olarak izole edilmiştir. Bu bağlamda ilk olarak *B. pertussis* için belirlenen sub-MİK eritromisin miktarlarına göre

antibiyotikli MB sıvı besiyerleri hazırlanmıştır. Ardından OD600'de bakteri konsantrasyonları 0.05'e ayarlanarak antibiyotikli besiyerlerine eklenmiş ve 37 °C'de 48 – 60 sa inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından örnekler bakteri hücrelerinin çöktürülmesi amacıyla 4000 rpm'de 10 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonucunda elde edilen pelletler üzerine 600 µL trizol (TRI reaktifi) eklenmiş ve pellet pipetaj ile reaktif içerisinde çözdürülmüştür. Ardından örnekler 14.500 rpm'de 1 dak santrifüjlenmiştir. Santrifüj sonucunda oluşan süpernatantlar ayrı bir yere alınarak üzerlerine hacimleri kadar (600 µL) etanol eklenmiştir ve yavaşça alt – üst yapılarak karıştırılmıştır. Etanol ile karıştırılan örnekler spin kolonlara alınmış ve 14.500 rpm'de 30 s santrifüjlenmiştir. Santrifüj ardından kolonun altında kalan kısım atılmıştır. Santrifüj aşamasının ardından gDNA kirliliğini önlemek amacıyla DNaz aşaması uygulanmıştır. DNaz aşaması uygulanırken ilk olarak kolonlar üzerine 400 µL etanol eklenmiş RNA yıkama tamponu (wash buffer) eklenerek 14.500 rpm'de 30 s santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda kolonların altında kalan kısımlar atılmıştır. Ardından kolonlar üzerine 80 µL DNaz – 1 (5 µL) ve DNA özümseme tamponu (75 µL) (DNA Digestion Buffer) karışımı eklenmiştir ve örnekler 15 dak inkübe edilmiştir. On beş dak'lık inkübasyonun ardından örnekler üzerine etanol eklenmiş 400 µL Direct – zolTM ön yıkama tamponu eklenerek 14.500 rpm'de 30 s santrifüj edilmiştir, bu aşama 2 kere tekrarlanmıştır. Santrifüj sonunda kolonların altında kalan kısımlar atılmıştır, kolonlar üzerine 700 µL RNA yıkama tamponu eklenerek örnekler 14.500 rpm'de 2 dak santrifüj edilmiştir. Santrifüj aşamasından sonra kolonlar isimlendirilmesi yapılmış steril DNaz – RNaz içermeyen eppendorflar üzerine alınmıştır. Son olarak RNA'ları kolonlardan almak amacıyla örneklerin bulunduğu kolonlar üzerine 100 µL RNaz – DNaz içermeyen su eklenmiş, 1 dak bekletilmiş ve 14.500 rpm'de 1 dak santrifüj edilmiştir.

İzole edilen toplam RNA'ların miktar tayinleri ve saflık analizleri spektrofotometrik analizler (NanoDrop ölçümleri) ve %1'lik jel elektroforezi ile gerçekleştirilmiştir.

İzole edilen toplam RNA'lar ticari olarak satın alınmış cDNA sentez kiti (Jena Biosciences, Germany) kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Örneklerin cDNA'ya çevrilmesi amacıyla TÜP – 1 ve TÜP – 2 olmak üzere 2 farklı reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. İlk olarak izole edilen RNA, DNaz – RNaz içermeyen su ve 0.5 µL primer TÜP – 1 içerisinde karıştırılmıştır. Hazırlanan karışım 65 °C'de 5 dak ardından 4 °C'de 1 dak olacak şekilde PZR cihazında inkübe edilmiştir. İnkübsayon sırasında 2. karışım hazırlanmıştır. İkinci karışım (TÜP – 2) hazırlanırken 4 µL SCRIPT RT tamamlama tamponu, 1 µL dNTP karışımı, 1 µL DTT stok solüsyonu, 0.5 µL RNaz inhibitörü, 0.5 µL SCRIPT reverse transkriptaz karıştırılmıştır ve üzeri 10 µL olacak şekilde RNaz içermeyen su ile tamamlanmıştır. İlk hazırlanan TÜP – 1 PZR cihazından çıktıktan sonra TÜP – 1 ve TÜP – 2 karıştırılarak 42 °C'de 10 dak, 50 °C'de 60 dak ve 70 °C'de 10 dak olacak şekilde yeniden PZR cihazına konulmuştur. PZR cihazından çıkan cDNA'lar -20 °C'de saklanmıştır.

3.6.2. Gerçek zamanlı PZR analizleri ile pertussis toksine ve pertaktine ait genlerin gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

Gerçek zamanlı PZR analizleri (RT – PCR) QuantiNova SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) RT – PCR kiti kullanılarak, RotorGene Q 5plex HRM (Qiagen, Hilden, Almanya) cihazında kitte yer alan talimatlara uygun şekilde gerçekleştirilmiştir.

Deneyler sırasında kullanılan pertussis toksin (*ptxS1*) ve pertaktin (*prn*) genlerine ait primerler Çizelge 3.1’de gösterilmiştir. Referans gen olarak RNA polimeraz B altbirim (*rpoB*) kullanılmıştır (Çizelge 3.1). Deneyler sırasında kullanılan PZR karışımları Çizelge 3.2’ye göre hazırlanmıştır ve Çizelge 3.3’de yer alan koşullara uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Ayrıca PZR analizleri sırasında PZR sonucunda hedef gen bölgesinin çoğaltığının doğrulanması, kullanılan primerlerin nonspesifik bağlanma yapmadığının gözlemlenebilmesi için her reaksiyon sonucunda erime eğrisi analizleri gerçekleştirilmiştir. Erime eğrisi analizleri, RT – PCR kiti protokolüne uygun olarak sıcaklık 60 °C’den 95 °C’ye her 5 s’de 1 °C arttırılarak gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 3.1. RT – PCR analizleri sırasında kullanılan primerler

Primer ve Primere Ait Gen Bölgesinin Adı	Primerlere Ait Oligonükleotid Sekanslar	PZR Ürün Büyüklüğü	Kaynak
RNA polimeraz B altbirim (<i>rpoB</i>)	Forward (ileri) primer:	93 bp	Bibova vd. 2013
	5’-GCTGGGACCCGAGGAAATCA-3’		(Modifiye edilmiştir)
	Revers (geri) primer:		
	5’-GCGCCAATGTAGACGATGC-3’		
Pertussis toksin (<i>ptxS1</i>)	Forward (ileri) primer:	112 bp	Bibova vd. 2013
	5’-TTCCAGAACGGATTACGGC-3’		(Modifiye edilmiştir)
	Reverse (geri) primer:		
	5’-TGCTGCTGGTGGAGACGAA-3’		
Pertaktin (<i>prn</i>)	Forward (ileri) primer:	73 bp	Hasan vd. 2014
	5’-TGCCGACTGGAACAACCA-3’		
	Revers (geri) primer:		
	5’-GTCGGAGCCCTGGATATGG-3’		

Çizelge 3.2. RT – PCR karışımlarının hazırlanması

Reaksiyon Bileşenleri	Miktar
2X SYBR Green PZR Master Mix	10 µL
İleri Primer	1 µL
Geri Primer	1 µL
Hedef cDNA	1 µL
RNaz – DNaz İçermeyen Su	7 µL
Toplam	20 µl

Çizelge 3.3. RT – PCR koşulları

	Sıcaklık	Süre	Döngü
PZR başlangıç aktivasyon adımı	95 °C	2 dak	1
Denatürasyon	95 °C	5 s	40 döngü
Bağlanma ve Uzama	60 °C	10 s	

3.7. İstatistiksel Analizler

Bütün deneyler birbirinden bağımsız 3 tekrar olacak şekilde gerçekleştirilmiştir ve tüm veriler bu 3 tekrarın ortalama $\pm$ standart sapması şeklinde ifade edilmiştir. Örneklerin istatistiksel olarak karşılaştırılmaları için tek yönlü varyans analizi kullanılmıştır (IBM SPSS yazılım programı versiyon 22) (SPSS, ABD). Ayrıca çoklu karşılaştırmalarda farklılıkların hangi gruplar arasında olduğunu belirlemek amacıyla tamamlayıcı Post – Hoc analizi olarak Tukey testi kullanılmıştır. P değeri < 0.05 olanlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

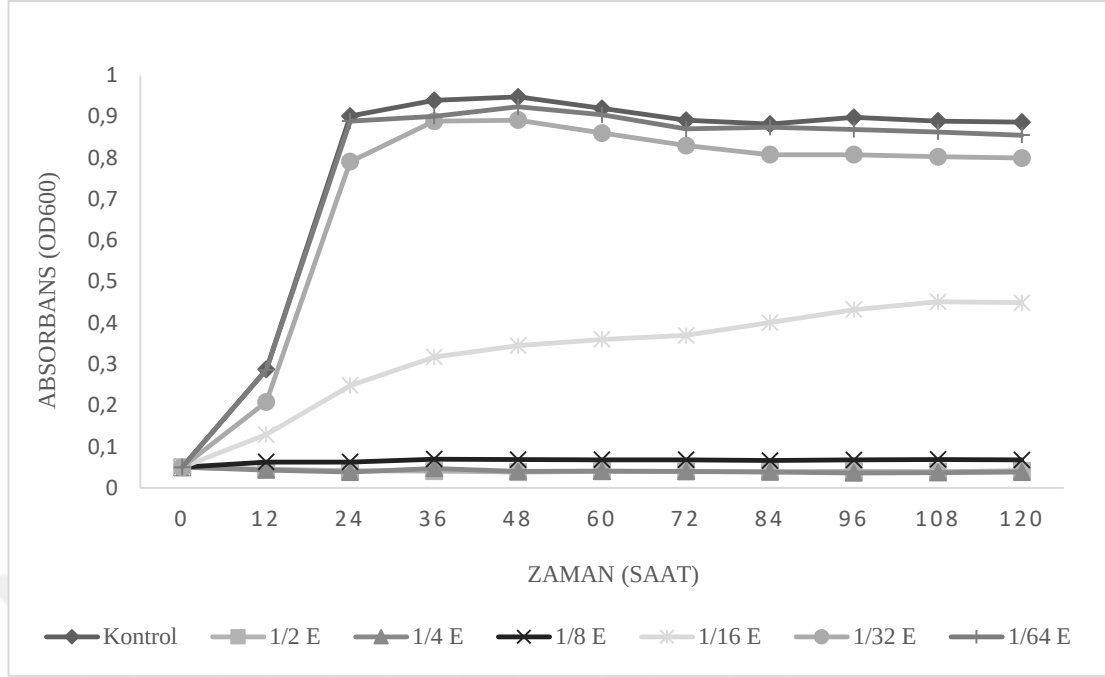
4. BULGULAR

4.1. Eritromisin Antibiyotiğinin sub-MİK Değerlerinin Belirlenmesi

Eritromisin antibiyotiğinin *B. pertussis*'e karşı MİK değeri belirlenirken ilk olarak geniş aralıklı antibiyotik konsantrasyonları oluşturulmuştur. Bu amaçla ilk aşamada son konsantrasyon 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1 ve 5 µg/mL'lik eritromisin içeren *B. pertussis* kültürleri oluşturulmuştur. Deneylerin ilk aşaması sonucunda bakteri büyümesi görülen en yüksek eritromisin konsantrasyonu 0.1 µg/mL, bakteri büyümesi görülmeyen en düşük eritromisin konsantrasyonu ise 0.5 µg/mL bulunmuştur ve MİK aralığı 0.1. – 0.5 µg/mL olarak belirlenmiştir. Deneylerin ikinci aşamasında bulunan MİK aralığı genişletilerek 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 ve 0.5 µg/mL'lik eritromisin içeren kültürler oluşturulmuştur. Gerçekleştirilen inkübasyonun ardından bakteri büyümesi görülen en yüksek eritromisin konsantrasyonu 0.1 µg/mL, bakteri büyümesi görülmeyen en düşük eritromisin konsantrasyonu ise 0.2 µg/mL bulunmuştur. Sonuç olarak *B. pertussis* Tohama – I suşunda eritromisin antibiyotiğinin MİK değeri 0.2 µg/mL olarak belirlenmiştir.

4.2. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında *B. pertussis* Hücrelerinin Büyüme Hızının Belirlenmesi

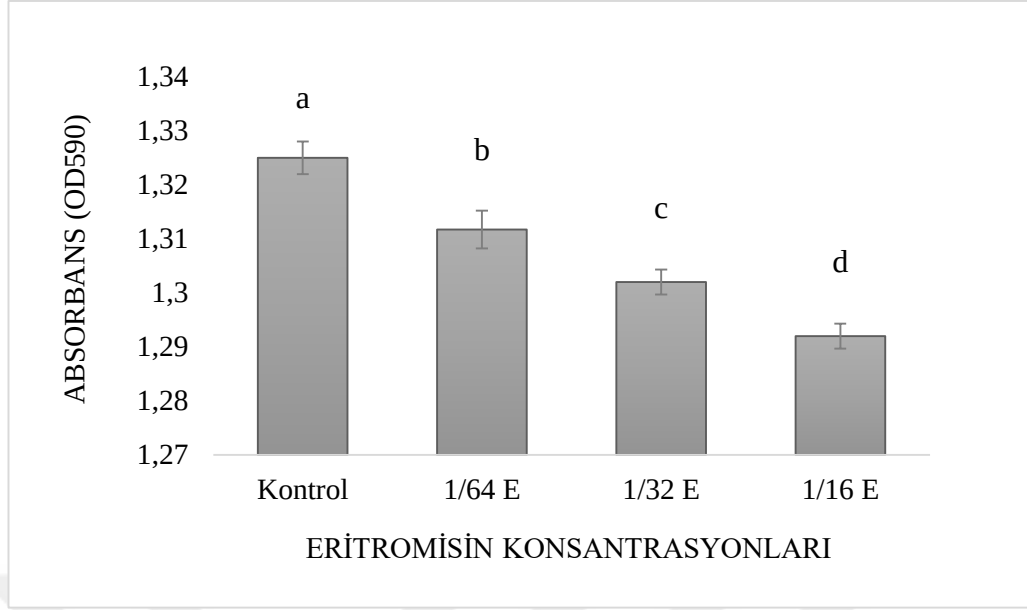
Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında büyütülen *B. pertussis* Tohama – I suşunun büyüme eğrisi Şekil 4.1 'de gösterilmiştir. Kültürlerdeki eritromisin konsantrasyonlarının artışına paralel olarak bakteri büyümesinin yavaşladığı gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). Kültürler arasında en fazla üreme eritromisin içermeyen ortamda büyütülen kontrolde, ardından sırasıyla 1/64, 1/32 ve 1/16 MİK eritromisin konsantrasyonlarında görülmüştür ve istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p < 0.05$). Sub-MİK konsantrasyonlarından 1/64 değeri kontrole çok yakın absorbans değerleri vermiştir ancak 12. sa'de alınan ölçüm dışında kontrolden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ($p < 0.05$). 1/2, 1/4 ve 1/8 MİK konsantrasyonlarında eritromisin içeren *B. pertussis* hücrelerinde deneylere devam edebilmek için yeterli büyüme görülmediğinden bu tez kapsamında diğer deneylerde kullanılmak üzere *B. pertussis* Tohama – I suşu için eritromisinin sub-MİK değerleri 1/64, 1/32 ve 1/16 MİK olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisinin *B. pertussis* Tohama – I suşunun büyüme kapasitesine etkisi (Kontrol: Eritromisin içermeyen ortamda büyütülen *B. pertussis* hücreleri, E: Eritromisin)

4.3. Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında *B. pertussis* Hücrelerinin Biyofilm Oluşturma Kapasitesinin Belirlenmesi

Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında *B. pertussis* hücrelerinin biyofilm oluşturma kapasitesi Şekil 4.2’de gösterilmiştir. En yüksek miktarda biyofilm oluşumu kontrolde görülmüştür ve eritromisin içeren diğer tüm örneklerden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklıdır ($p < 0.05$). Sub-MİK oranlarda eritromisin içeren örnekler kendi aralarında karşılaştırıldığı zaman eritromisin miktarı arttıkça biyofilm miktarında azalma olduğu görülmüştür ve istatistiksel olarak birbirinden farklıdır ($p < 0.05$).



Şekil 4.2. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin'in *B. pertussis* Tohama – I suşunun biyofilm oluşturma kapasitesine etkisi (Kontrol: Eritromisin içermeyen ortamda büyütülen *B. pertussis* hücreleri, E: Eritromisin, üst simgelerde yer her bir harf istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$))

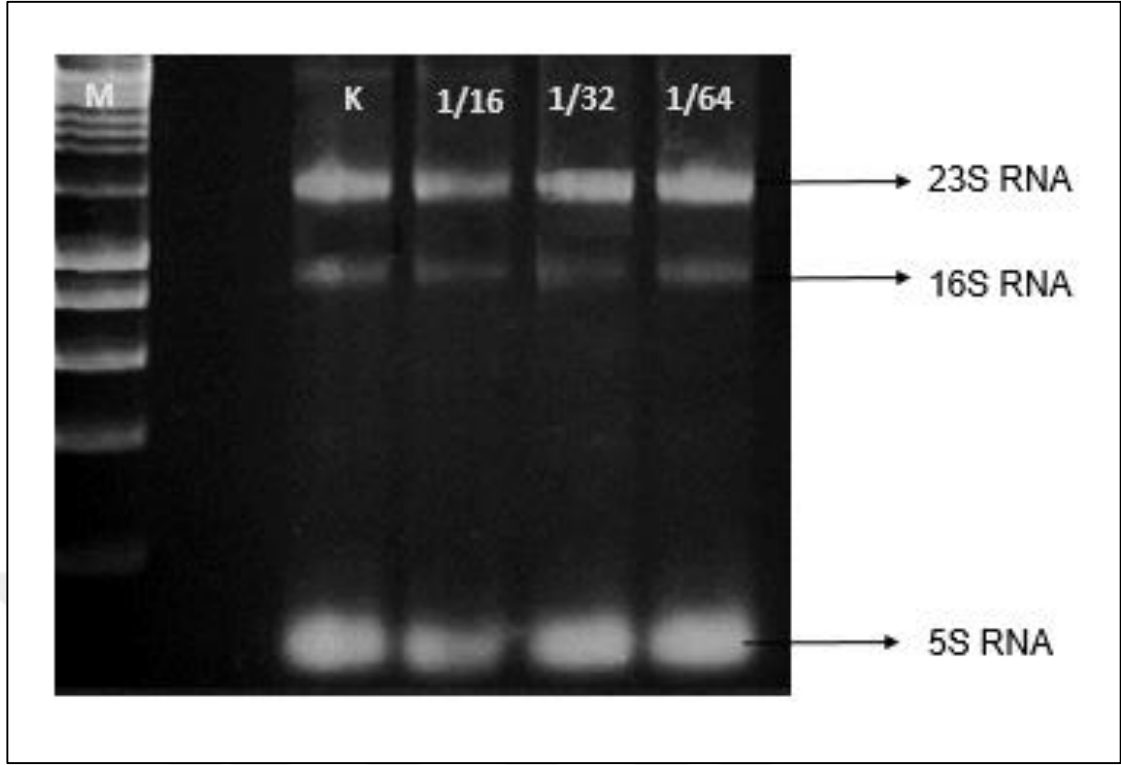
4.4 Sub – MİK Konsantrasyonlarda Eritromisin Varlığında *B. pertussis* Hücrelerinin Pertussis Toksin ve Pertaktin Gen Ekspresyon Seviyelerinin Belirlenmesi

4.4.1 Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında büyütülen *B. pertussis* hücrelerinden toplam RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin içeren *B. pertussis* örneklerinden izole edilen toplam RNA'ların miktar tayinleri ve saflık analizleri Çizelge 4.1'de, agaroz jel elektroforezi sonuçları ise Şekil 4.3'te gösterilmiştir. İzole edilen RNA'ların saflık değerlerinin istenilen aralıkta olduğu görülmüştür. Saflık değerleri analiz edilen RNA örnekleri cDNA'ya çevrilmiştir.

Çizelge 4.1. *B. pertussis* Tohama – I hücrelerinden izole edilen toplam RNA miktarları

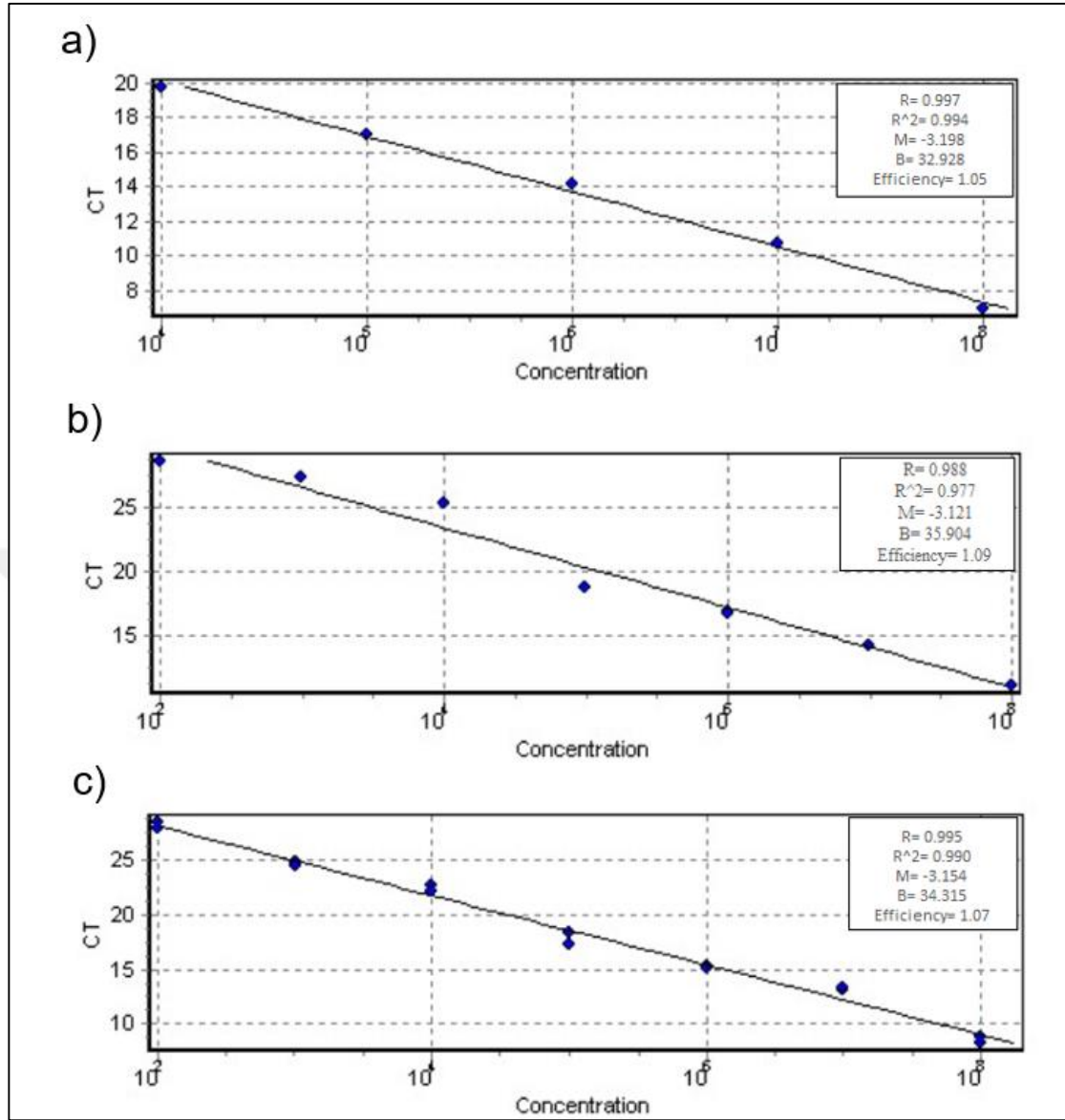
	RNA Miktarı (ng/μL)	OD260/280	OD260/230
Kontrol	145.20	1.73	2.08
1/16 Eritromisin	279.86	1.78	2.13
1/32 Eritromisin	214.79	1.82	2.14
1/64 Eritromisin	151.34	1.69	1.97



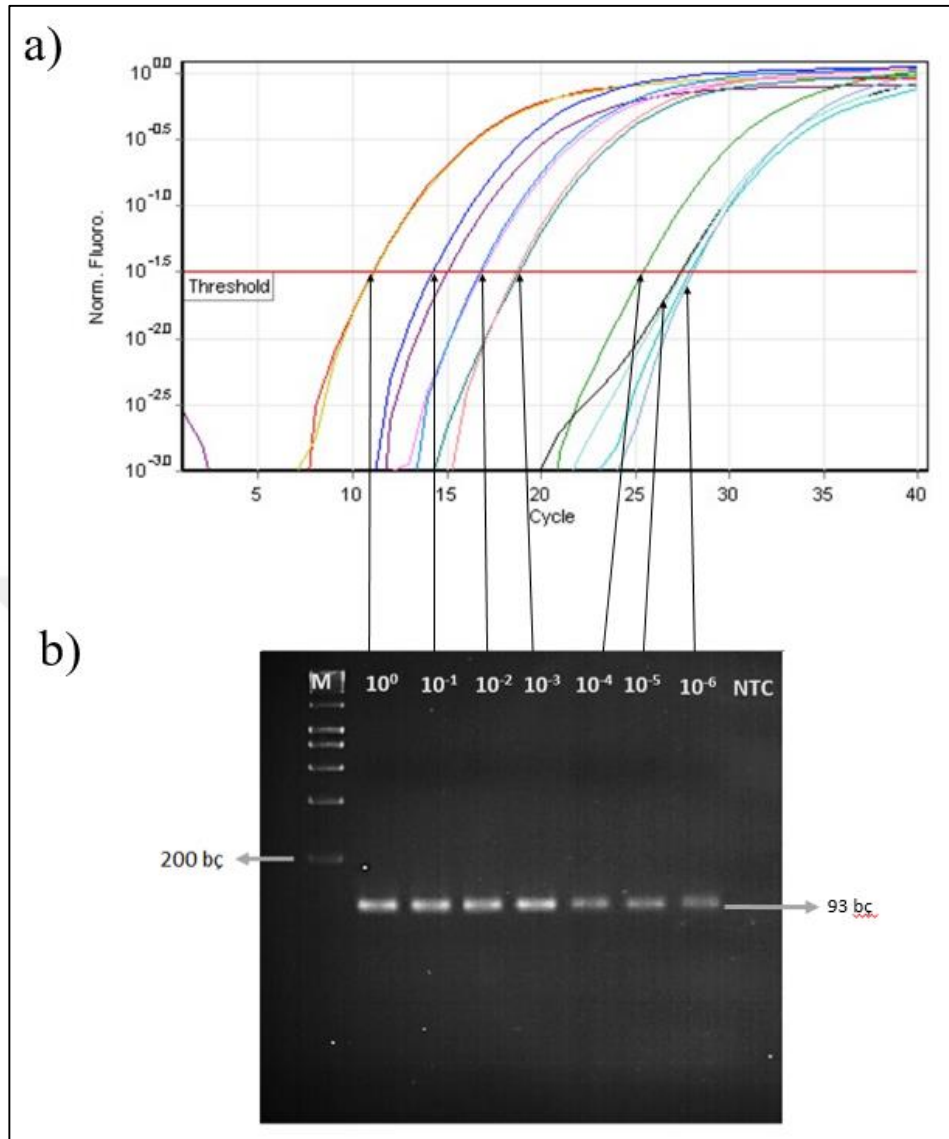
Şekil 4.3. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında büyütülen *B. pertussis* örneklerinden izole edilen toplam RNA'ların agaroz jel elektroforezi sonucu (M: DNA Merdiveni, E: Eritromisin, K: Antibiyotik içermeyen ortamda büyütülmüş *B. pertussis* hücrelerinden izole edilen RNA (kontrol))

4.4.2. Gerçek zamanlı PZR analizleri ile pertussis toksine ve pertaktine ait genlerin ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi

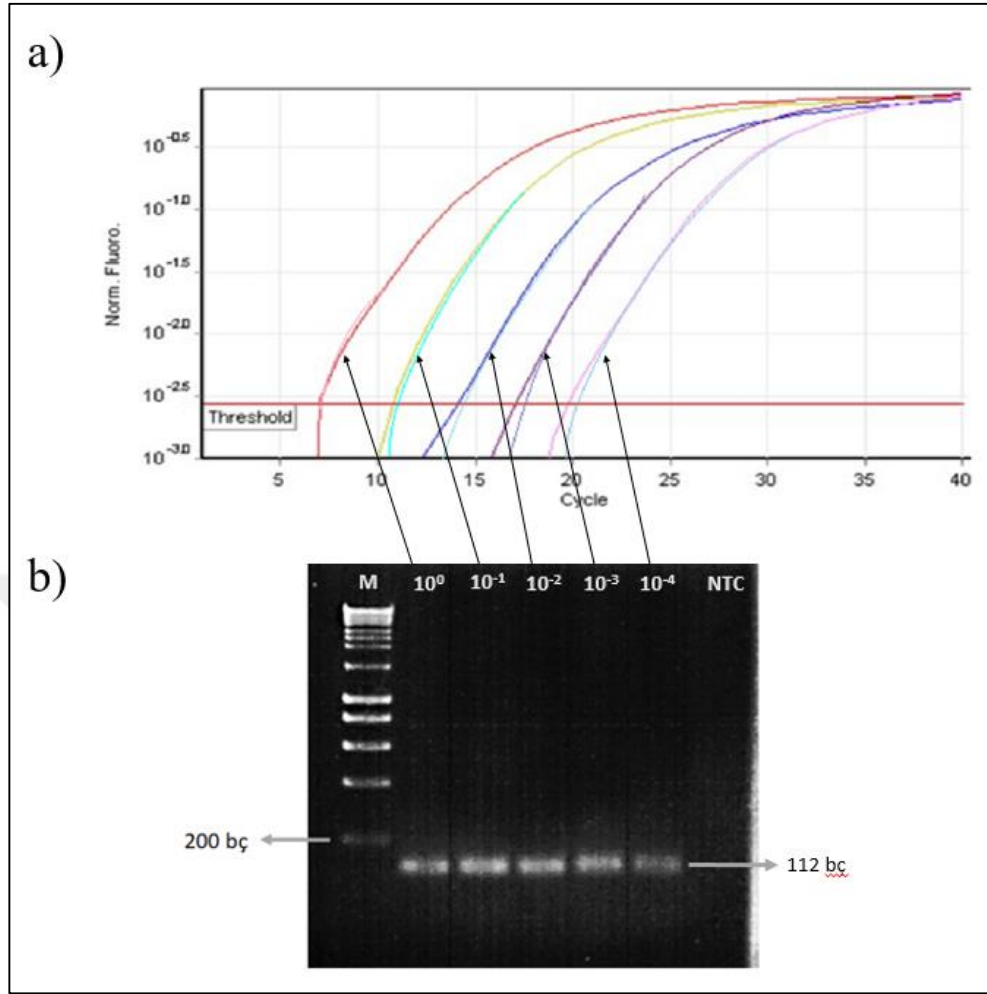
RT – PCR analizleri sırasında kullanılan genlere ait primerlerin standart eğrileri Şekil 4.4'te, ısıma ve jel elektroforezi görüntüleri ise Şekil 4.5, 4.6 ve 4.7'de gösterilmiştir. Standart eğriler *B. pertussis* hücrelerinden elde edilen cDNA'ların seri seyreltmesi ile oluşturulmuştur. Oluşturulan standart eğriler yardımı ile deneyler sırasında kullanılan primerlerin reaksiyon verimliliği ve duyarlılığı hesaplanmıştır. Reaksiyon verimliliği hesaplanırken $E = (10^{-1/\text{eğim}} - 1) \times 100$ denklemi kullanılmıştır (Türkanoglu Özçelik vd. 2019). Deneyler sırasında kullanılan tüm primerlerin eğri eğiminin -3.6 - -3.1 arasında olduğu, reaksiyon verimliliklerinin %90 - %110 arasında olduğu ve eğrilerin R^2 değerlerinin 0.98'den büyük olduğu gösterilmiştir ve bu primerler ile RT – PCR deneylerine devam edilmiştir. Ayrıca PZR analizleri sırasında örnekler hazırlanırken standart eğrilerde orta noktaya denk gelen cDNA konsantrasyonu kullanılmıştır (Türkanoglu Özçelik vd. 2019).



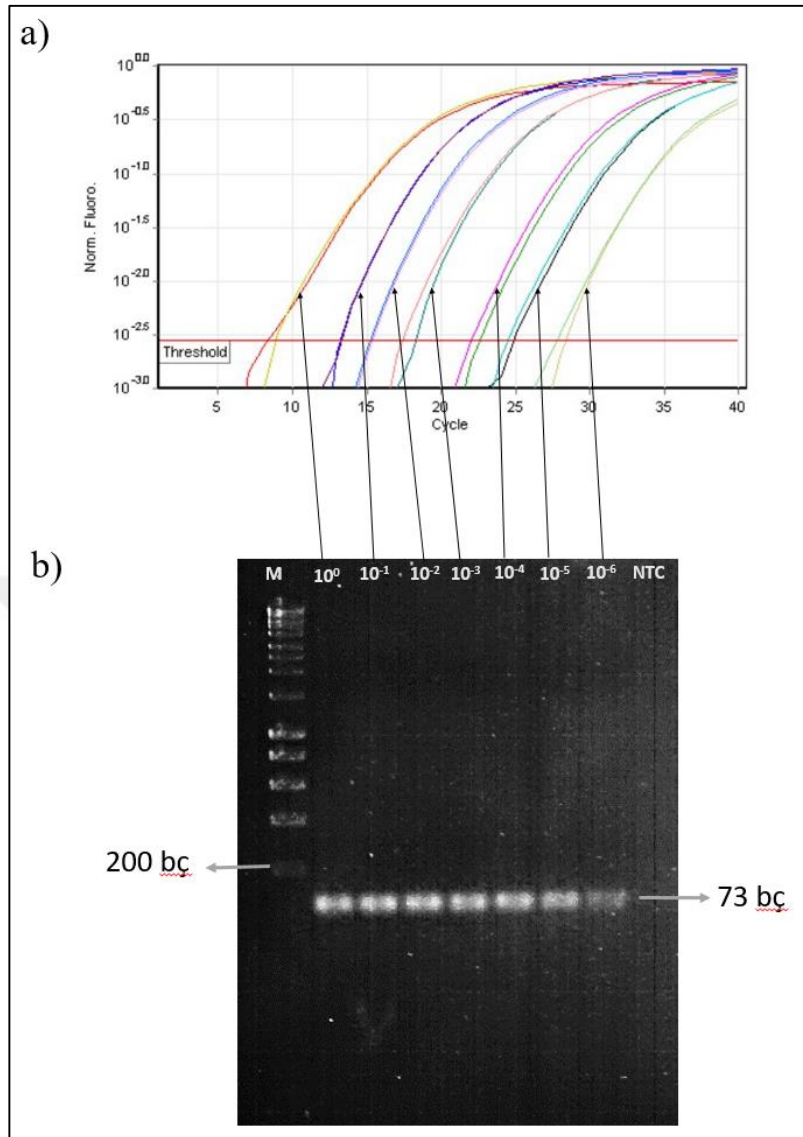
Şekil 4.4. RT – PCR deneylerinde kullanılan *B. pertussis*'e ait genlerin standart eğrileri (a: *ptxS1*, b: *rpoB*, c: *prn*)



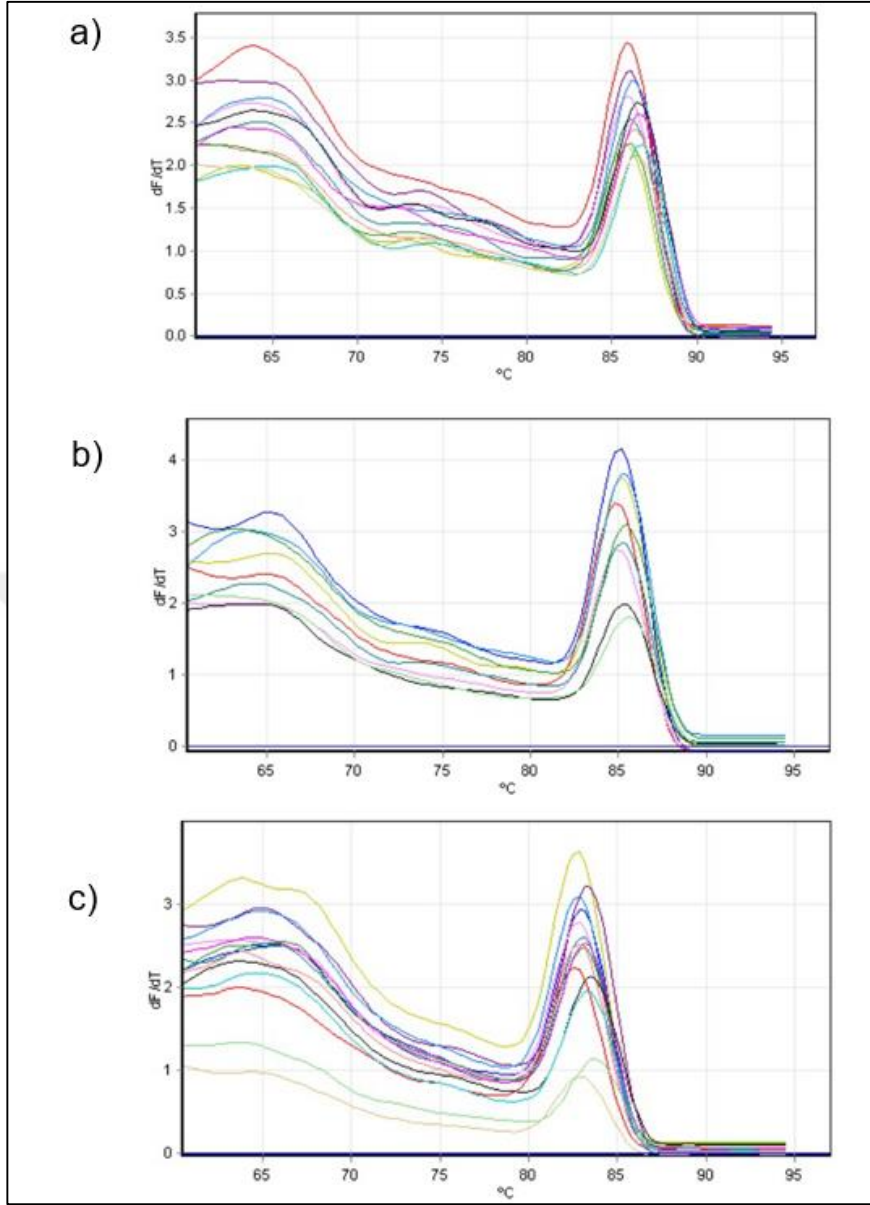
Şekil 4.5. RT – PCR deneylerinde kullanılan *rpoB* genine ait primerin standart eğrisinin amplifikasyon eğrisi (a) ve jel elektroforezi sonucu (b) (M: DNA Merdiveni, NTC: Negatif kontrol (kalıp cDNA kullanılmayan))



Şekil 4.6. RT – PCR deneylerinde kullanılan *ptxS1* genine ait primerin standart eğrisinin amplifikasyon eğrisi (a) ve jel elektroforezi sonucu (b) (M: DNA Merdiveni, NTC: Negatif kontrol (kalıp cDNA kullanılmayan))

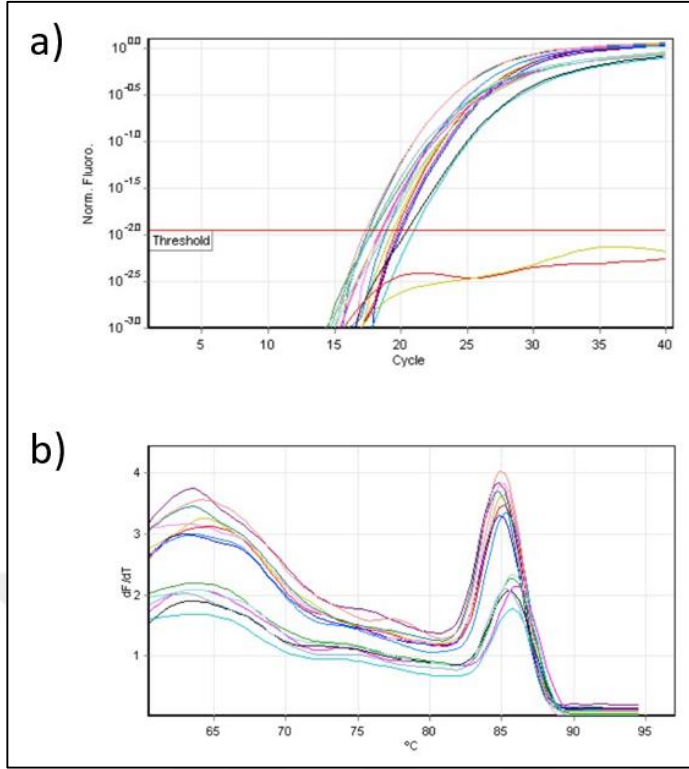


Şekil 4.7. RT – PCR deneylerinde kullanılan *prn* genine ait primerin standart eğrisinin amplifikasyon eğrisi (a) ve jel elektroforezi sonucu (b) (M: DNA Merdiveni, NTC: Negatif kontrol (kalıp cDNA kullanılmayan))

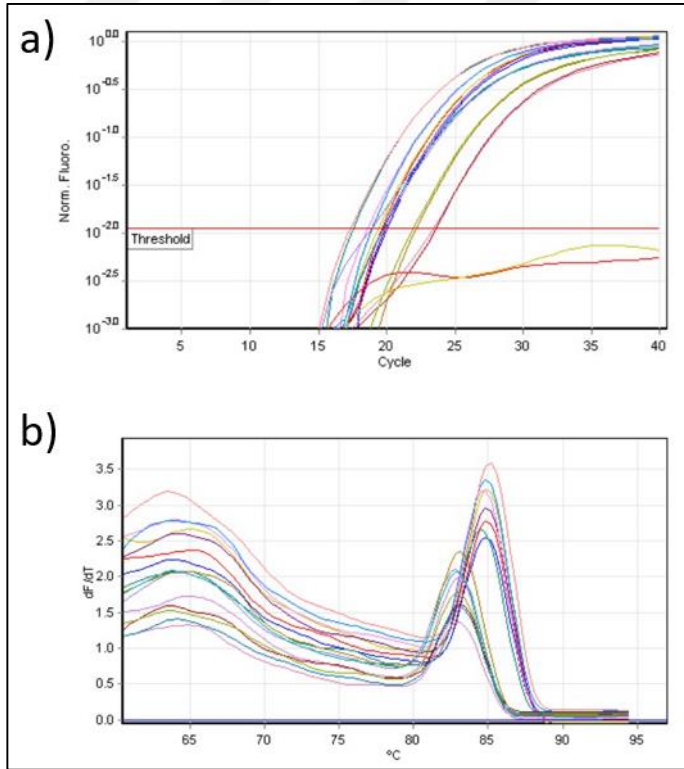


Şekil 4.8. RT – PCR deneylerinde kullanılan *B. pertussis*'e ait genlerin erime eğrisi analizleri (a: *ptxS1*, b: *rpoB*, c: *prn*)

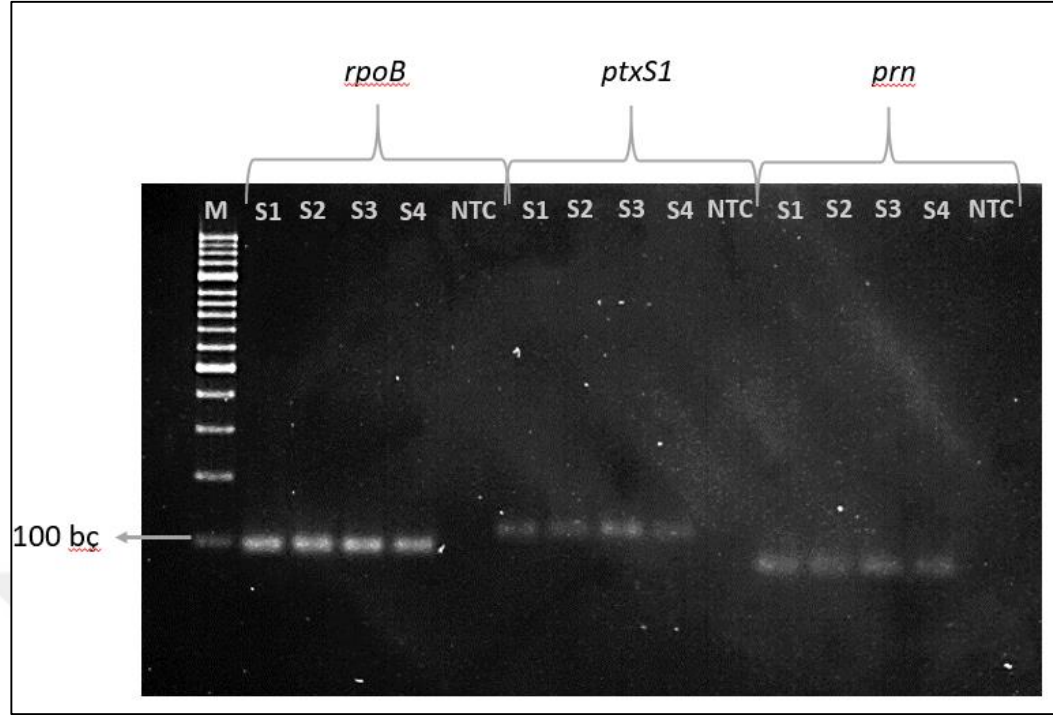
Primerlerin standart eğrileri oluşturulurken aynı zamanda her reaksiyonun sonunda primerlere ait erime eğrisi analizleri gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.8). Gerçekleştirilen erime eğrisi analizleri sonucunda primerlere ait erime eğrilerinde tek bir tepe noktası görülmesi, primerlerin tek bir gen bölgesini çoğalttığını ve cDNA üzerinde hedef gen bölgesi dışında başka bir bölgeyi çoğaltmadığını göstermiştir.



Şekil 4.9. *ptxS1* genine ait örneklerin RT – PCR amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi sonucu (b)



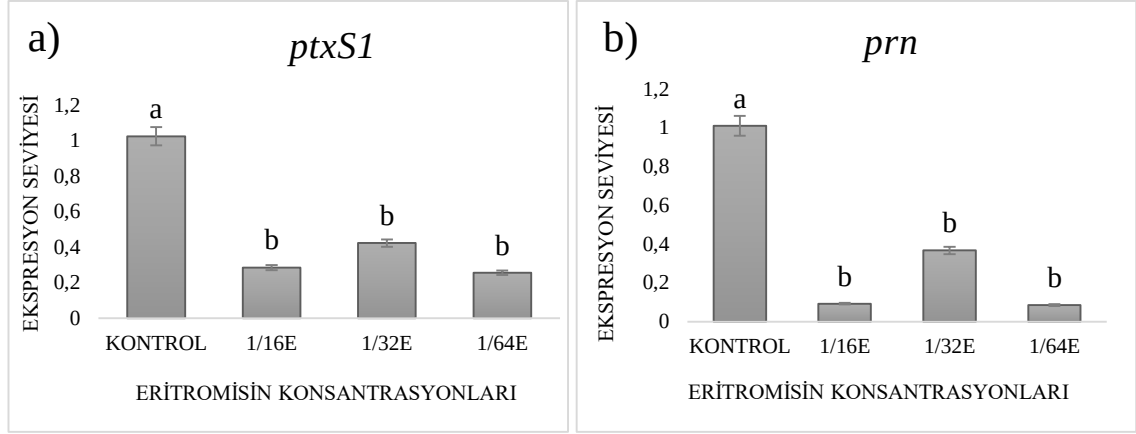
Şekil 4.10. *prn* genine ait örneklerin RT – PCR amplifikasyon eğrisi (a) ve erime eğrisi sonucu (b)



Şekil 4.11. RT – PCR örneklerinin jel elektroforezi sonucu (S1: Kontrol, S2: 1/16 eritromisin, S3: 1/32 eritromisin, S4: 1/64 eritromisin, M: DNA Merdiveni, NTC: Negatif kontrol (kalıp cDNA kullanılmayan))

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

<i>ptxS1</i>					
	<i>ptxS1</i> Ortalama C_T	<i>rpoB</i> Ortalama C_T	ΔC_T (<i>ptxS1</i> C_T – <i>rpoB</i> C_T)	$\Delta \Delta C_T$ (<i>ptxS1</i> ΔC_T – Ortalama Kontrol ΔC_T)	Kat Değişimi ($2^{-\Delta \Delta C_T}$)
Kontrol	19.6±0.51	17.6±0.59	2.0±1.08	0±0.15	1±0.10
1/16 Eritromisin	21.6±1.50	20.4±0.73	1.3±0.82	1.9±0.57	0.3±0.11
1/32 Eritromisin	19.2±0.69	18.5±0.41	0.6±1.05	1.3±0.18	0.4±0.06
1/64 Eritromisin	19.1±2.25	17.8±0.55	1.4±1.72	2.0±0.49	0.3±0.08
<i>prn</i>					
	<i>prn</i> Ortalama C_T	<i>rpoB</i> Ortalama C_T	ΔC_T (<i>prn</i> C_T – <i>rpoB</i> C_T)	$\Delta \Delta C_T$ (<i>prn</i> ΔC_T – Ortalama Kontrol ΔC_T)	Kat Değişimi ($2^{-\Delta \Delta C_T}$)
Kontrol	20.8±2.02	18.2±1.92	2.6±0.13	0±0.08	1±0.06
1/16 Eritromisin	24.0±0.21	19.7±0.09	4.2±0.13	3.5±0.33	0.1±0.02
1/32 Eritromisin	19.4±1.44	17.1±0.66	2.3±0.86	1.5±1.03	0.4±0.21
1/64 Eritromisin	21.6±0.99	17.2±0.87	4.4±0.35	3.6±0.44	0.1±0.03



Şekil 4.12. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında büyütülen *B. pertussis* hücrelerinde *ptxS1* (a) ve *prn* (a) genlerinin ekspresyon seviyesi (E: Eritromisin, üst simgelerde yer her bir harf istatistiksel olarak anlamlı farklılığı ifade etmektedir ($p < 0.05$))

Eritromisinin sub-MİK konsantrasyonlarında büyütülmüş *B. pertussis* hücrelerinin RT – PCR amplifikasyon eğrileri Şekil 4.9 ve 4.10’da, RT – PCR örneklerinin jel elektroforezleri Şekil 4.11’de, *ptxS1* ve *prn* genlerinin kat değişimlerinin hesaplanması Çizelge 4.2’de ve *ptxS1* ve *prn* ekspresyon seviyeleri Şekil 4.12’de gösterilmiştir. Sub-MİK eritromisin konsantrasyonlarında büyümüş *B. pertussis* hücrelerinde *ptxS1* geninde bütün sub-MİK konsantrasyonlarının ekspresyon seviyesini kontrole göre önemli derecede düşürdüğü gözlemlenmiştir ($p < 0.05$). İlginç bir şekilde sub-MİK konsantrasyonlar arasında *ptxS1* geninin ekspresyon seviyesinin 1/32 MİK konsantrasyonunun diğer sub-MİK konsantrasyonlara göre daha yüksek olduğu ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında *prn* geninin ekspresyon seviyesinde ise benzer şekilde eritromisin bulunan örneklerde ekspresyon seviyesinin azaldığı gösterilmiştir. *ptxS1* geninin ekspresyon seviyesi ile benzer olarak 1/32 MİK konsantrasyonunda eritromisin varlığında pertaktin geninin ekspresyon seviyesinin diğer sub-MİK değerlerden daha yüksek olduğu, ancak diğer sub-MİK değerleri ile aralarında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür ($p > 0.05$).

5. TARTIŞMA

Antibiyotikler bakteri kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Eritromisin, uzun zamandır boğmaca hastalığı tedavisinde yaygın olarak kullanılan bir antibiyotiktir (Lin vd. 2021). Ancak eritromisinin *B. pertussis*'in biyofilm oluşumu ve gen ekspresyonu üzerine etkileri ile ilgili yeterli çalışma bulunmamaktadır. Brett vd. 1998 yılında yaptıkları çalışmada 88 *B. pertussis* suşunda eritromisin için MİK aralığının 0.12–0.5 mg/L, minimal bakterisidal konsantrasyonunun (MBK) ise 0.5 mg/L olduğunu bildirmiştir. Wu vd. (2022) 2017'den 2019'a kadar Çinli çocuklardan izole edilen 311 *B. pertussis* izolatu arasında, izole ettikleri 265 *B. pertussis* izolatının eritromisine karşı dirençli olduğunu (MİK > 256 mg/L), geriye kalan 46 izolatın ise MİK değerlerinin 0.094 ile 0.25 mg/L arasında olduğunu göstermiştir. Bu çalışmada kullanılan *B. pertussis* suşunun her ne kadar *B. pertussis* için belirli bir CLSI standardı olmasa da literatürde bulunan diğer çalışmalara kıyasla eritromisine karşı dirençli olmadığı, MİK değerinin 0.2 µg/mL olduğu görülmüştür. Benzer şekilde Lönnqvist vd. (2018) izole ettikleri *B. pertussis* suşlarında eritromisin antibiyotiğinin MİK aralığının 0.016 – 0.25 µg/mL olduğunu, ayrıca izole ettikleri hiçbir *B. pertussis* suşunda antibiyotik direnci görmediklerini belirtmiştir. Bu çalışmadan farklı olarak Yamaguchi vd. (2020) *B. pertussis* Tohama – I suşunda eritromisinin MİK değerinin 0.064 µg/mL olduğunu belirtmiştir. Ayrıca izole ettikleri klinik suşun Japonya'daki makrolid direncine (Eritromisin MİK: >256 µg/mL, Klaritromisin: >256 µg/mL) sahip ilk *B. pertussis* suşu olduğunu rapor etmiştir. Dorji vd. (2016) ise hem referans suş olarak kullandıkları *B. pertussis* Tohama – I'in hem de Avustralya'dan izole edilen 21 klinik *B. pertussis* izolatının 5 µg eritromisine duyarlı olduğunu göstermiştir.

Günümüzde antibiyotiklerin aşırı ve bilinçsiz kullanımı bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmalarına neden olmuştur. 1994 yılından itibaren dünyanın pek çok bölgesinde makrolidlere karşı dirençli *B. pertussis* suşları tanımlanmıştır (Lönnqvist vd. 2018). Yang vd. (2015) 1970'lerden 2014'e kadar toplanan *B. pertussis* izolatları ile yaptıkları çalışmalarında 1970'li yıllarda eritromisin antibiyotiğinin MİK aralığının 0.064 – 0.25 µg/mL olduğunu, disk difüzyon yönteminde ise bakteriler %100 duyarlı iken 2013 – 2014 yılları arasında MİK aralığının 0.064 – >256 µg/mL olduğunu ve disk difüzyon yönteminde bakterilerin eritromisine olan duyarlılıklarının %8.1'e düştüğünü göstermiştir. Ayrıca 1970'li yıllarda sırasıyla 0.094 ve 0.25 µg/mL olan MİK₅₀ ve MİK₉₀ değerlerinin ikisinin de 2013 – 2014 yılları arasında >256 µg/mL değerine yükseldiğini belirtmişlerdir. Son yapılan çalışmalar eritromisine direnç kazanmış *B. pertussis* bakterilerinin salgınlara neden olduğunu göstermiştir (Li vd. 2019; Yao vd. 2020; Feng vd. 2021). Li vd. (2019) izole edilen *B. pertussis* suşlarında en yaygın görülen genotipin *ptxA1/ptxC1/ptxP1/prn1/fim2–1/fim3A/tcfA2* olduğunu ve bu genotipe sahip bakterilerin eritromisine oldukça dirençli (MİK > 256 mg/L) olduğunu belirtmiştir. Yao vd. (2020) Çin'de eritromisine dirençli genomik varyasyona sahip *B. pertussis* suşlarının 11 – 12 yıl önce ortaya çıktığını ve antibiyotiklerin yanlış kullanılmasının bu suşların yayılmasını kolaylaştırdığını

belirtmiştir. Feng vd. (2021) Çin’de 2008 yılından önce çok az miktarda makrolide dirençli *B. pertussis* suşları izole edilirken 2008 yılından itibaren bu miktarın keskin bir şekilde arttığını ve izole edilen suşlardan %50’den fazlasının makrolidlere dirençli olduğunu belirtmiştir. Ayrıca *B. pertussis* suşlarında görülen bu dirence eritromisin direnci sağlayan iki mekanizmadan (bakterinin metilaz (*erm*) genlerine sahip olması veya eritromisinin bağlanmasını önleyen yapısal değişikliklere yol açan 23S rRNA genindeki mutasyonlar) ikincisi olan 23S rRNA genindeki mutasyonların neden olduğunu belirtmişlerdir.

Wu vd. (2022) Çin’de eritromisine dirençli *B. pertussis ptxP1* suşunun baskın olduğunu, çoğu *ptxP3* suşunun eritromisine duyarlılığı koruduğunu ancak iki *ptxP3* suşunun 23S rRNA geninin V alanındaki A2047G mutasyonu sonucunda eritromisine direnç kazanarak Çin’de doğrulanmış ilk eritromisin dirençli *ptxP3* izolatu olduğunu belirtmişlerdir.

Antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının bakterilerin büyüme kapasitelerine etkisinin anlaşılması oldukça önemlidir. Ancak literatürde eritromisin antibiyotiğinin sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis*’in büyüme kapasitesini nasıl etkilediğine dair çalışma bulunmamaktadır. *B. pertussis* bakterisi üzerinde diğer antibiyotikler ile yapılan çalışmalara bakıldığında Hewlett vd. (1983) klorpromazinin *B. pertussis* üzerine etkilerini inceledikleri çalışmalarında 8 µg/mL klorpromazinin (MİK) *B. pertussis* hücrelerinin büyümesini tamamen engellediğini, 4 µg/mL klorpromazinin (MİK/2) bakteri hücrelerinin büyümesini azalttığını ve 2 µg/mL klorpromazinin (MİK/4) bakteri büyümesi üzerine belirgin bir etkisinin olmadığını göstermiştir. Ayrıca logaritmik büyüme aşamasında olan bakteri hücrelerinin antibiyotik etkilerine daha dirençli olduğunu, bakteriler logaritmik büyüme aşamasındayken kültürle eklenen 6.4 µg/mL klorpromazinin bakteri büyümesini etkilemediğini belirtmiştir. Literatürde bulunan diğer çalışmalara bakıldığı zaman Sun vd. (2020) sub-MİK konsantrasyonlarında seftazidimin (CAZ) *Escherichia coli* üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmada 1/2 sub-MİK konsantrasyonunda CAZ’ın bakteriyel büyümeyi engelleyebileceğini, 1/4 ve 1/8 sub-MİK konsantrasyonlarında CAZ’ın ise bakteri büyümesi üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını belirtmiştir. Gümüş vd. (2018) sub-MİK konsantrasyonlarda siprofloksasin (CIP), nitrofurantoin (NIT) ve trimetoprim – sülfametoksazolün (SXT) üropatojenik bir *E. coli* suşundaki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında 1/2 sub-MİK konsantrasyonunda SXT ve CIP içeren ortamlarda bakteri büyümesinin kontrole göre anlamlı derecede azaldığını ancak 1/2 sub-MİK konsantrasyonunda NIT içeren ortamdaki bakteri büyümesinin kontrol ile anlamlı olarak farklı olmadığını belirtmiştir. İlginç bir şekilde Zhou vd. (2017) tobramisin sub-MİK konsantrasyonlarını araştırdıkları çalışmalarında 1/6 (0.05 mg/mL) sub-MİK konsantrasyonunda tobramisin *Geobacter sulfurreducens* PCA suşunun büyümesini kontrole göre önemli ölçüde arttırdığını bildirmiştir. 0.3 mg/L (MİK) tobramisin ise bakteri büyümesini inhibe ettiğini belirtmişlerdir. Reeks vd. (2005) klortetrasiklin (CTC) ve klortetrasiklin – sülfametazin (CTC + SMZ) antibiyotiklerinin sub-MİK konsantrasyonlarını araştırdıkları çalışmada *Mannheimia*

haemolytica bakterisinde CTC'nin D80 klinik suşunda 1/2 ve 1/4, D152 klinik suşunda ise 1/2, 1/4 ve 1/8 sub-MİK konsantrasyonlarının bakteri büyümesini inhibe ettiğini bildirmiştir. *Haemophilus somnus* bakterisinde ise kullanılan 3 suşta da (ATCC 700025, klinik suşlar Hs – 91 and 2336) CTC ve CTC + SMZ'nin 1/8 ve 1/16 sub-MİK konsantrasyonlarında büyümenin inhibe edildiğini belirtmişlerdir. Shun-Mei vd. (2018) *Pseudomonas aeruginosa* ve *E. coli* ile yaptıkları çalışmalarında levofloksasin ve siprofloksasin antibiyotiklerinin 1/2 ve 1/4 sub-MİK konsantrasyonlarında *E. coli* SM10λpir(pUCP24T) suşunun büyümesinin önemli derecede bozulduğunu, 1/8, 1/16 ve 1/32 gibi sub-MİK konsantrasyonlarda ise bakteri büyümesinin çok az değiştiğini belirtmiştir. Bu nedenle çalışmalarında bakteri büyümesinin çok etkilenmediği 1/8, 1/16 ve 1/32 sub-MİK konsantrasyonlarını sub-MİK olarak kullanmışlardır. Bu çalışmada da 1/2, 1/4 ve 1/8 sub-MİK konsantrasyonlarında *B. pertussis* hücrelerinde yeterli bakteri büyümesi görülmediği için diğer deneylerde kullanılmak üzere 1/16, 1/32 ve 1/64 eritromisin konsantrasyonları sub-MİK olarak belirlenmiştir.

Bakteriyel biyofilmler bakterilerin konağın immün sisteminden kaçması ve direnç kazanması açısından geliştirdikleri stratejilerden biridir (Rather vd. 2021). Özellikle bakterilerde antibiyotik direncinin gelişmesine katkı sağlaması sebebiyle mikrobiyal enfeksiyonların tedavi edilmesini güçleştirmektedirler (Fux vd. 2005; Serra vd. 2011). Bu nedenle bakterilerin antibiyotiklerin sub-MİK dozlarında biyofilm oluşturabilme kapasitelerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Ancak literatürde antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis* hücrelerinin biyofilm oluşturma kapasitesini nasıl etkilediğine dair çalışma bulunmamaktadır. Dorji vd. (2016) *B. pertussis* klinik izolatlarının biyofilm oluşturma potansiyellerini karşılaştırdıkları çalışmalarında suşların üretmiş olduğu biyofilm miktarlarını biyofilmlerin absorban değerlerine göre biyofilm üretimi yok, zayıf biyofilm, orta ve güçlü biyofilm olmak üzere 4 farklı şekilde sınıflandırmıştır. Yapılan bu çalışmada ise eritromisin miktarı arttıkça biyofilm miktarlarının anlamlı derecede azalmasına rağmen Dorji vd. (2016) sınıflandırılmasına göre eritromisinin bütün sub-MİK konsantrasyonlarında güçlü biyofilm üretimi gerçekleşmiştir (Absorbans > 1.204). Benzer şekilde birçok çalışma antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarında bakterilerde biyofilm üretiminin devam ettiğini göstermiştir. Örneğin Zhao vd. (2015) eritromisinin sub-MİK konsantrasyonlarında *Streptococcus suis*'in biyofilm oluşturabilme kapasitesini inceledikleri çalışmalarında *S. suis*'in bütün sub-MİK konsantrasyonlarında biyofilm oluşturduğunu, 1/2 ve 1/4 MİK konsantrasyonlarında oluşturulan biyofilm miktarında kontrole göre anlamlı derecede azalma olurken 1/8 ve 1/16 MİK dozlarında kontrole göre anlamlı derecede bir azalma olmadığını göstermiştir. Sun vd. (2020) sub-MİK konsantrasyonlarda seftazidim (CAZ) ile yaptıkları çalışmada *E. coli* bakterisinin biyofilm oluşturma kapasitesinin CAZ miktarı arttıkça azaldığını göstermiştir, ancak 1/32 sub-MİK konsantrasyonunda CAZ varlığında üretilen biyofilm ile kontrol arasında anlamlı olarak fark olmadığını belirtmiştir. Ayrıca sub-MİK konsantrasyonlarda biyofilm miktarının azalmasının, sub-MİK konsantrasyonlarda CAZ'ın stres proteinleri olarak da bilinen *E. coli* ısı şok proteini

genini (*ibpA*) aşağı yönde ekspresyonuna sebep olması ve hücre dışı indol konsantrasyonunun artması sonucunda gerçekleşmiş olabileceğini belirtmiştir.

Sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotik varlığında bakterilerde biyofilm oluşturma kapasitesi her zaman azalma göstermeyebilir. Örneğin Nagasawa vd. (2020) basitrasinin sub-MİK konsantrasyonlarının *S. mutans* üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında UA159 WT suşunda biyofilm oluşturma kapasitesinin basitrasinin 1/2 ile 1/32 sub-MİK konsantrasyonları arasında önemli derecede arttığını, 1/8 sub-MİK konsantrasyonunda ise en yüksek seviyeye ulaştığını bildirmiştir. Benzer şekilde Rfaque vd. (2020) siprofloksasinin sub-MİK konsantrasyonları altında üropatojenik *E. coli* suşlarının biyofilm oluşturma kapasitelerini inceledikleri çalışmalarında sub-MİK konsantrasyonlarda siprofloksasinin biyofilm oluşturma kapasitesini önemli ölçüde arttırdığını belirtmiştir. Tezel vd. (2016) sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotik varlığında *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis'in (*Salmonella* Infantis) biyofilm üretimini inceledikleri çalışmalarında gentamisin, kanamisin ve streptomisin antibiyotiklerinin sub-MİK konsantrasyonlarının DMC 12 suşunun biyofilm üretimini önemli ölçüde azaltırken nalidiksik asit, neomisin, spektinomisin ve tetrasiklin antibiyotiklerinin sub-MİK konsantrasyonlarının ise biyofilm üretimini indüklediğini bildirmiştir. Ayrıca biyofilm üretiminin antibiyotik miktarı ile paralel olarak azalmadığını, streptomisin antibiyotiği kullanıldığında 1/4 sub-MİK konsantrasyonunda üretilen biyofilm miktarının 1/128 sub-MİK konsantrasyonundan düşük iken, nalidiksik asit kullanıldığında 1/8 sub-MİK konsantrasyonunda üretilen biyofilm miktarının 1/128'den daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Liu vd. (2020) norfloksasinin sub-MİK konsantrasyonlarının *S. suis* üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında sub-MİK konsantrasyonlarda norfloksasinin biyofilm oluşumunu desteklediğini, özellikle 1/4 sub-MİK konsantrasyonlarda norfloksasinin bütün suşlarda biyofilm oluşumunu kontrole göre anlamlı derecede arttırdığını göstermiştir. Yapılan çalışmalar sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotik varlığında bakterilerde gerçekleşen bu biyofilm oluşumunun direnç – nodülasyon – hücre bölünmesi (Resistance – nodulation – cell division (RND)) süper ailesinden AdeABC, AdeFGH ve AdeIJK gibi sinyal yolları, tip VI salgılama sistemi, CpxRA sistemi ve hücre içi sinyal iletiminde görev alan AI – 2 (LuxS) sistemi gibi sistemlere dayandığını bildirmiştir (Ahmed vd. 2009; Jones vd. 2013; Hathroubi vd. 2015; Sato vd. 2018).

Bakterilerin antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarına maruz kalmaları enfeksiyon açısından oldukça önemli virülans genlerinin ekspresyon seviyelerini farklı şekilde etkileyebilmektedir. Dolayısıyla antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının virülans genlerin ekspresyon seviyelerine olan etkilerinin incelenmesi oldukça önemlidir. Ancak literatürde sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotik varlığında *B. pertussis* hücrelerinin virülans gen ekspresyon seviyelerinin nasıl etkilendiğine dair bir çalışma bulunmamaktadır. Literatürde bulunan eritromisin ile yapılan diğer çalışmalara bakıldığında zaman Wu vd. (2019) *Staphylococcus epidermidis* ile yaptıkları çalışmalarında eritromisinin sub-MİK konsantrasyonlarının biyofilm oluşumunun 6. ve 24. sa'lerinde

icaA'nın ekspresyon seviyesinin kontrole göre anlamlı derecede azaldığını göstermiştir. Yapılan bu tez çalışmasında da sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında *B. pertussis* hücrelerinde *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrole göre anlamlı derecede azaldığı görülmüştür. Ancak bakteri hücrelerine sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotik uygulanması gen ekspresyon seviyelerinde her zaman azalma meydana getirmemektedir. Örneğin Liu vd. (2020) norfloksasin ile yaptıkları çalışmalarında norfloksasinin 1/4 sub-MİK konsantrasyonunda *S. suis*'in kapsüler polisakkarit (*cps*), hücre dışı faktör (*ef*), suilis (sly), fibrinojen bağlayıcı protein (*fbps*), glutamat dehidrojenaz (*gdh*) ve gliserol fosfat deoksijenaz (*gapdh*) virülans genlerinin ekspresyon seviyelerinde azalma olurken muramidaz salınan proteinin (*mrp*) ekspresyon seviyesinde artış olduğunu göstermiştir. Ayrıca *mrp* geninin ekspresyon seviyesinde meydana gelen bu artışın biyofilm miktarında ve kalıcı enfeksiyon miktarında artışa sebep olabileceğini belirtmişlerdir. Navidifar vd. (2019) *Acinetobacter baumannii* ile yaptıkları çalışmalarında sub-MİK konsantrasyonlarda tigesiklin varlığında ATCC 19606 ve AB13 suşlarında çekirdek algılama (quorum sensing) genlerinden biri olan *abaI*'nin ekspresyon seviyesinin antibiyotik miktarı arttıkça azaldığını, AB32 suşunda ise antibiyotik miktarı arttıkça ekspresyon seviyesinin arttığını bildirmiştir. Ayrıca meropenem antibiyotiğinin sub-MİK konsantrasyonlarında AB10, AB32, AB55 ve ATCC 19606 suşlarında ekspresyon seviyesine bakılan bütün genlerde kontrole göre önemli derecede artış olduğunu belirtmişlerdir. Sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotiğe maruz kalan bakterilerde gen ekspresyon seviyeleri her zaman antibiyotik miktarı ile orantılı olarak azalmayabilir. Örneğin Yang vd. (2017) antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının *S. aureus* üzerine etkilerini araştırdıkları çalışmalarında berberin, enrofloksasin ve kolistin sülfat antibiyotiklerinin sub-MİK konsantrasyonlarında çalışılan bütün *S. aureus*'ta biyofilm ile ilgili genlerin ekspresyon seviyesinin antibiyotik miktarı arttıkça azaldığını en yüksek ekspresyon seviyelerinin ise 1/16 ve 1/32 sub-MİK konsantrasyonlarda olduğunu göstermiştir. Ancak asetil izovaleril tilosin tartaratın sub-MİK konsantrasyonlarında tüm genlerin ekspresyon seviyesinin antibiyotik miktarı ile orantılı şekilde arttığını ve en yüksek ekspresyon seviyesinin 1/2 sub-MİK konsantrasyonlarında olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca kanamisin antibiyotiğinin sub-MİK konsantrasyonlarında virülans genlerin ekspresyon seviyelerinde doza bağlı olarak bir artış veya azalış olmadığını, en yüksek ekspresyon seviyelerinin *fnbA* geninde 1/8, *rbf* ve *cidA* geninde 1/4, *eno* geninde ise 1/16 sub-MİK konsantrasyonunda olduğunu belirtmişlerdir.

Bakterilerin farklı sürelerde sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotiklere maruz kalması gen ekspresyon miktarlarını farklı şekilde etkileyebilmektedir. Örneğin Zarandi vd. (2017) seftazidim, vankomisin ve klindamisin 1/2 sub-MİK konsantrasyonlarının *Clostridium difficile* bakterisi üzerindeki etkilerini araştırdıkları çalışmalarında bakteri hücrelerinin antibiyotikli ortamda inkübe edilmelerinin 24. sa'de çalışılan 3 antibiyotiğinde sub-MİK konsantrasyonlarının ATCC 9689 ve klinik izolatta *slpA* geninin ekspresyon seviyesini azalttığını ancak inkübasyonun 48. sa'de ekspresyon

seviyelerinin 24. sa'ten farklı olduğunu ve seftazidimin 1/2 sub-MİK konsantrasyonunda ekspresyon seviyesinin her iki suşta da 24. sa'e gĐre Đnemli derecede arttığını gĐstermiřtir. Shi vd. (2019) *P. aeruginosa* ile yaptıkları çalışmalarında siprofloksasinin 1/2 sub-MİK konsantrasyonunda çalışılan tĐm quorum sensing genlerinde sırasıyla 1, 3 ve 5 gĐnlĐk inkĐbasyonun ardından gen ekspresyon seviyelerinde artış olduğunu ancak istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığını gĐstermiřtir. Gerber vd. (2008) *Clostridium difficile* ile yaptıkları çalışmalarında bakteri hĐcrelerinin sub-MİK konsantrasyonlarda vankomisin, metronidazol ve linezolidin varlığında toksin genleri *tcdA* ve *tcdB*'nin ekspresyon seviyelerinin bakteriyel bĐyĐmenin Đstsel fazında iken kontrole gĐre anlamlı derecede arttığını, bakteriyel bĐyĐmenin durağan fazında ise ekspresyon miktarının azalarak antibiyotik içermeyen kontrol ile aynı seviyeye ulaştığını ve bu seviyede sabit kaldığını gĐstermiřtir. Ayrıca klindamisin antibiyotiğinin sub-MİK konsantrasyonunun ise diğer antibiyotiklerden farklı olarak toksin genlerinin ekspresyon seviyelerinde artışa yol amadığını bildirmişlerdir. Sonuç olarak antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının toksin artışına veya daha erken salınmasına neden olmasının tamamen spesifik olduğunu bakteri hĐcresinin dengesiz bir hale gelmesinden kaynaklanan stres durumu ile açıklanamayacağını belirtmişlerdir.

6. SONUÇLAR

B. pertussis Gram negatif, aerobik ve yavaş büyüyen bir bakteridir. Özellikle diğer *Bordetella* türlerinde bulunmayan PT içermesi ve boğmaca hastalığına neden olması ile tanınmaktadır. *B. pertussis*'in neden olduğu boğmaca, özellikle yeni doğmuş bebeklerde ölüme neden olabilen akut bir solunum yolu hastalığıdır. Geliştirilen aşılama programları sayesinde aşılamanın yaygınlaşması ve aşılanan birey sayısının artması sonucunda vaka sayısı ciddi oranlarda azalmıştır. Ancak boğmaca yüksek aşılama rağmen 3 – 4 yılda bir epidemiler meydana getirerek ciddi bir halk sağlığı sorunu olmaya devam etmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar boğmacanın çocuk ölümlerinin ilk 10 nedeni arasında yer aldığını göstermiştir.

Boğmacanın tedavisinde eritromisin gibi makrolid grubu antibiyotikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalar bakteri hücrelerinin uygulanması gereken doz yerine sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotiğe maruz kalmalarının virülans özelliklerini farklı şekilde etkileyebileceğini göstermiştir. Dolayısıyla antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının bakteriler üzerine etkileri yaygın olarak araştırılmıştır. Ancak klinikte yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis* üzerindeki etkilerine ilişkin yeterli çalışma bulunmamaktadır. *B. pertussis* bakterisinin tek konağının insan olması bu çalışmaların önemini arttırmaktadır. Bu tez çalışmasında boğmaca hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılan eritromisinin sub-MİK konsantrasyonlarının *B. pertussis* hücrelerinin büyüme kapasitesine, biyofilm oluşturabilme kapasitesine, *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyelerine etkileri araştırılmıştır. Özellikle bu tez çalışması sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotiklerin *B. pertussis* hücrelerinin biyofilm oluşturabilme kapasitesine ve virülans genlerinin ekspresyon seviyelerine etkilerinin incelendiği ilk çalışma olması sebebiyle bilimsel açıdan oldukça kıymetlidir.

Bu tez çalışması sonucunda eritromisinin *B. pertussis* hücrelerindeki MİK değeri 0.2 µg/mL bulunmuştur. Sub-MİK konsantrasyonların *B. pertussis*'in büyüme kapasitesi üzerine etkileri araştırılırken 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 ve 1/64 sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin kullanılmıştır. 1/2, 1/4 ve 1/8 sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisinin bakteri hücrelerinin büyümesini ciddi derecede inhibe ettiği görülmüştür. 1/16, 1/32 ve 1/64 sub-MİK konsantrasyonlarının ise bakteriyel büyümeyi antibiyotik içermeyen kontrole göre anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir. Bu nedenle biyofilm oluşturma kapasitesi ve virülans genlerinin ekspresyon seviyeleri deneylerinde yeterli miktarda bakteriyel büyümenin görüldüğü 1/16, 1/32 ve 1/64 sub-MİK eritromisin konsantrasyonları kullanılmıştır.

Biyofilm oluşturma kapasitesi deneyi sonucunda sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığının biyofilm miktarının kontrole göre anlamlı derecede azaldığı ve antibiyotik miktarı arttıkça biyofilm miktarında azalma olduğu gösterilmiştir. Ancak sub-MİK konsantrasyonlarda antibiyotik varlığında biyofilm miktarının kontrole göre anlamlı

derecede azalmasına rağmen üretilen biyofilm miktarının yüksek seviyelerde olması dikkat çekicidir (Absorbans > 1.204). Biyofilm deneyi ile benzer şekilde sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisin varlığında *B. pertussis*'in virülans genleri *ptxS1* ve *prn*'nin ekspresyon seviyeleri kontrole göre anlamlı derecede azalmıştır.

Sonuç olarak gerçekleştirilen bu tez çalışması sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisinin *B. pertussis*'in büyüme, biyofilm oluşturma yeteneğini, *ptxS1* ve *prn* genlerinin ekspresyon seviyelerini azalttığı göstermiştir. Bulunan bu sonuçlar ileride gerçekleştirilecek yeni antibiyotik kullanım stratejilerinin geliştirilmesi açısından bir öncü niteliğindedir. Gerçekleştirilen bu çalışma sub-MİK konsantrasyonlarda eritromisinin *B. pertussis*'in diğer virülans genlerinin ekspresyon seviyelerini nasıl etkilediği, hangi moleküler mekanizmalar ile etki ettiği araştırılarak daha kapsamlı hale getirilebilir. Ayrıca daha fazla suş ve daha fazla antibiyotik dahil edilerek boğmacanın klinik tedavisinin daha etkili hale getirilmesi açısından daha detaylı bilgiler elde edilebilir.

7. KAYNAKLAR

- Ahmed, N.A., Petersen, F.C., and Scheie, A.A. 2009. AI-2/LuxS is involved in increased biofilm formation by *Streptococcus intermedius* in the presence of antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 (10): 4258-4263.
- Akdeniz, M., ve Kavukcu, E. 2016. Aşılama ve aşılarda tarihçesi. *Klinik Tıp Aile Hekimliği*, 8 (2): 11-28.
- AlBitar-Nehme, S., Basheer, S.M., Njamkepo, E., Brisson, J.R., Guiso, N., and Caroff, M. 2013. Comparison of lipopolysaccharide structures of *Bordetella pertussis* clinical isolates from pre-and post-vaccine era. *Carbohydr. Res.*, 378: 56-62.
- Alexander, F., Matheson, M., Fry, N.K., Labram, B., and Gorringe, A.R. 2012. Antibody responses to individual *Bordetella pertussis* fimbrial antigen Fim2 or Fim3 following immunization with the five-component acellular pertussis vaccine or to pertussis disease. *Clin. Vaccine Immunol.*, 19(11): 1776-1783.
- Allen, A.G., Thomas, R.M., Cadisch, J.T., and Maskell, D.J. 1998. Molecular and functional analysis of the lipopolysaccharide biosynthesis locus *wlb* from *Bordetella pertussis*, *Bordetella parapertussis* and *Bordetella bronchiseptica*. *Mol. Microbiol.*, 29 (1): 27-38.
- Altunaiji, S., Kukuruzovic, R., Curtis, N. and Massie, J. 2007. Antibiotics for whooping cough (pertussis). *Cochrane Database Syst Rev.* 3: CD004404.
- Andersson, D.I., and Hughes, D. 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12 (7): 465-478.
- Anonim 1: <https://asi.saglik.gov.tr/asi-takvimi2> [Son erişim tarihi: 01.06.2023]
- Arnal, L., Grunert, T., Cattelan, N., De Gouw, D., Villalba, M.I., Serra, D.O., Mooi, F.R., Ehling-Schulz, M. and Yantorno, O.M. 2015. *Bordetella pertussis* isolates from argentinean whooping cough patients display enhanced biofilm formation capacity compared to Tohama I reference strain. *Front. Microbiol.*, 6: 1352.
- Asgarian-Omran, H., Amirzargar, A.A., Zeerleder, S., Mahdavi, M., van Mierlo, G., Solati, S., Jeddi-Tehrani, M., Rabbani, H., Aarden, L. and Shokri, F. 2015. Interaction of *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin with human TLR 2: Identification of the TLR 2-binding domain. *Apmis*, 123 (2): 156-162.
- Ashworth, L.A.E., Irons, L.I., and Dowsett, A.B. 1982. Antigenic relationship between serotype-specific agglutinin and fimbriae of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 37 (3): 1278-1281.
- Ausar, S.F., Zhu, S., Duprez, J., Cohen, M., Bertrand, T., Steier, V., Wilson, D.J., Li, S., Sheung, A., Brookes, R.H., Pedyczak, A., Rak, A. and Andrew James, D. 2020. Genetically detoxified pertussis toxin displays near identical structure to its wild-type and exhibits robust immunogenicity. *Commun. Biol.*, 3 (1): 1-12.
- Bal, H. 2022. Çeşitli kaynaklardan izole edilen metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* suşlarının virülans faktörleri üzerine daptomisin ve linezolidin sub minimal inhibitör konsantrasyonlarının etkisi. Doktora tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara, 82 s.

- Bannatyne, R.M. and Cheung, R. 1982. Antimicrobial susceptibility of *Bordetella pertussis* strains isolated from 1960 to 1981. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 21 (4): 666-667.
- Barkoff, A.M. and He, Q. 2019. Molecular epidemiology of *Bordetella pertussis*. In: Fedele, G. and Ausiello C.M. (Eds.), *Pertussis Infection and Vaccines: Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health Volume 12*, Springer Cham, pp. 19-33.
- Bento, A.I., Riolo, M.A., Choi, Y.H., King, A.A. and Rohani, P. 2018. Core pertussis transmission groups in England and Wales: A tale of two eras. *Vaccine*, 36(9): 1160-1166.
- Bentsi-Enchill, A.D., Halperin, S.A., Scott, J., MacIsaac, K. and Duclos, P. 1997. Estimates of the effectiveness of a whole-cell pertussis vaccine from an outbreak in an immunized population. *Vaccine*, 15 (3): 301-306.
- 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*. *Infect. Immun.*, 81(11): 4081-4090.
- Bone, M.A., Wilk, A.J., Perault, A.I., Marlatt, S.A., Scheller, E.V., Anthouard, R., . Chen, Q., Stibitz, S., Cotter, P.A. and Julio, S.M. 2017. *Bordetella* PlrSR regulatory system controls BvgAS activity and virulence in the lower respiratory tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (PNAS)*, 114 (8): E1519-E1527.
- Bosch, A., Massa, N.E., Donolo, A. and Yantorno, O. 2000. Molecular characterisation by infrared spectroscopy of *Bordetella pertussis* grown as biofilm. *Phys. Status Solidi (b)*, 220 (1): 635-640.
- Breakwell, L., Kelso, P., Finley, C., Schoenfeld, S., Goode, B., Misegades, L.K., Martin, S.W. and Acosta, A.M. 2016. Pertussis vaccine effectiveness in the setting of pertactin-deficient pertussis. *Pediatrics*, 137 (5): e20153973.
- Brett, M., Short, P. and Beatson, S. 1998. The comparative in-vitro activity of roxithromycin and other antibiotics against *Bordetella pertussis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 41 (suppl_2): 23-27.
- Brockmeier, S.L., Register, K.B., Magyar, T., Lax, A.J., Pullinger, G.D. and Kunkle, R.A. 2002. Role of the dermonecrotic toxin of *Bordetella bronchiseptica* in the pathogenesis of respiratory disease in swine. *Infect. Immun.*, 70(2), 481-490.
- Cantón, R., Horcajada, J. P., Oliver, A., Garbajosa, P. R., & Vila, J. (2013). Inappropriate use of antibiotics in hospitals: the complex relationship between antibiotic use and antimicrobial resistance. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 31, 3-11.
- Carbonetti, N. H., Artamonova, G. V., Mays, R. M., & Worthington, Z. E. (2003). Pertussis toxin plays an early role in respiratory tract colonization by *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 71 (11): 6358-6366.
- Carbonetti, N.H. 2015. Contribution of pertussis toxin to the pathogenesis of pertussis disease. *Pathog. Dis.*, 73 (8): ftv073.
- Carbonetti, N.H. 2010. Pertussis toxin and adenylate cyclase toxin: Key virulence factors of *Bordetella pertussis* and cell biology tools. *Future Microbiol.*, 5 (3): 455-469.

- Caroff, M., Aussel, L., Zarrouk, H., Martin, A., Richards, J.C., Th  risod, H., Perry, M.B. nad Karibian, D. 2001. Structural variability and originality of the *Bordetella* endotoxins. *J. Endotoxin Res.*, 7 (1): 63-68.
- Caroff, M., Brisson, J.R., Martin, A. and Karibian, D. 2000. Structure of the *Bordetella pertussis* 1414 endotoxin. *FEBS letters*, 477 (1-2): 8-14.
- Cattelan, N., Dubey, P., Arnal, L., Yantorno, O.M. and Deora, R. 2016. *Bordetella* biofilms: a lifestyle leading to persistent infections. *FEMS Pathog. Dis.*, 74 (1): ftv108.
- Cattelan, N., Jennings-Gee, J., Dubey, P., Yantorno, O.M. and Deora, R. 2017. Hyperbiofilm formation by *Bordetella pertussis* strains correlates with enhanced virulence traits. *Infect. Immun.*, 85 (12): e00373-17.
- CDC, A. 1996. Update: vaccine side effects, adverse reactions, contraindications, and precautions. Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep*, 45 (RR-12): 1-35.
- Chen, Q., Boucher, P.E. and 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.
- Cherry, J.D. 1996. Historical review of pertussis and the classical vaccine. *J. Infect. Dis.*, 174 (Supplement_3): S259-S263.
- Cherry, J.D. 2013. Pertussis: challenges today and for the future. *PLoS pathogens*, 9 (7): e1003418.
- Cherry, J.D., Brunell, P.A., Golden, G.S. and Karzon, D.T. 1988. Report of the task force on pertussis and pertussis immunization—1988. *Pediatrics*, 81 (6): 933-984.
- Chevalier, N., Moser, M., Koch, H.G., Schimz, K.L., Willery, E., Locht, C., Jacob-Dubuisson, F. and M  ller, M. 2004. Membrane targeting of a bacterial virulence factor harbouring an extended signal peptide. *Microb. Physiol.*, 8 (1): 7-18.
- Christie, C., Marx, M.L., Marchant, C.D. and Reising, S.F. 1994. The 1993 epidemic of pertussis in Cincinnati--resurgence of disease in a highly immunized population of children. *N. Engl. J. Med.*, 331 (1): 16-21.
- Clark, T.A. 2014. Changing pertussis epidemiology: everything old is new again. *The J. Infect. Dis.*, 209 (7): 978-981.
- Conover, M.S., Sloan, G.P., Love, C.F., Sukumar, N. and Deora, R. 2010. The Bps polysaccharide of *Bordetella pertussis* promotes colonization and biofilm formation in the nose by functioning as an adhesin. *Mol. Microbiol.*, 77 (6): 1439-1455.
- Cornia, P.B., Hersh, A.L., Lipsky, B.A., Newman, T.B. and Gonzales, R. 2010. Does this coughing adolescent or adult patient have pertussis?, *JAMA*, 304 (8): 890-896.
- Costa, O.Y., Raaijmakers, J. M. and Kuramae, E.E. 2018. Microbial extracellular polymeric substances: ecological function and impact on soil aggregation. *Front. Microbiol.*, 9: 1636.
- Costerton, J.W., Geesey, G.G. and Cheng, K.J. 1978. How bacteria stick. *Sci. Am.*, 238 (1): 86-95.

- Cotter, P.A. and Jones, A.M. 2003. Phosphorelay control of virulence gene expression in *Bordetella*. *Trends Microbiol.*, 11 (8): 367-373.
- Cowell, J.L., Hewlett, E.L. and Manclark, C.R. 1979. Intracellular localization of the dermonecrotic toxin of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 25 (3): 896-901.
- Cöplü, N., Sönmez, C., Kurtoglu, D. and Esen, B. 2005. Seroprevalance of *Bordetella pertussis* antibodies among healthy adolescent girls in Edirne. *Swiss Med. Wkly.*, 135 (3536): 531-536.
- Cummings, C.A., Bootsma, H.J., Relman, D.A. and Miller, J.F. 2006. Species-and strain-specific control of a complex, flexible regulon by *Bordetella* BvgAS. *J. Bacteriol.*, 188 (5): 1775-1785.
- Çolak, Ç.Y. and Tefon Öztürk, B.E. 2022. *Bordetella pertussis* and outer membrane vesicles. *Pathogens and Global Health*, 2022: 1-14.
- Dauer, C.C. 1943. Reported whooping cough morbidity and mortality in the United States. *Public Health Rep.*, 58: 661-676.
- Davey, M.E. and O'toole, G.A. 2000. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64 (4): 847-867.
- Decker, K.B., James, T.D., Stibitz, S. and Hinton, D.M. 2012. The *Bordetella pertussis* model of exquisite gene control by the global transcription factor BvgA. *Microbiology*, 158 (Pt 7): 1665.
- Decker, M.D. and Edwards, K.M. 2021. Pertussis (Whooping Cough). *The J. Infect. Dis.*, 224 (Supplement_4): S310-S320.
- De Gouw, D., Diavatopoulos, D.A., Bootsma, H.J., Hermans, P.W. and Mooi, F.R. 2011. Pertussis: a matter of immune modulation. *FEMS Microbiol. Rev.*, 35 (3): 441-474.
- De Gouw, D., Serra, D.O., De Jonge, M.I., Hermans, P.W., Wessels, H.J., Zomer, A., Yantorno, O.M., Diavatopoulos, D.A. and Mooi, F.R. 2014. The vaccine potential of *Bordetella pertussis* biofilm-derived membrane proteins. *Emerg. Microbes Infect.*, 3 (1): 1-9.
- De Serres, G., Boulianne, N., Duval, B., Dery, P., Rodriguez, A. M., Masse, R. and Halperin, S. 1996. Effectiveness of a whole cell pertussis vaccine in child-care centers and schools. *Pediatr Infect. Dis. J.*, 15 (6): 519-524.
- Dewan, K.K., Skarlupka, A.L., Rivera, I., Cuff, L.E., Gestal, M.C., Taylor-Mulneix, D. L., Wagner, S., Ryman, V.E., Rodriguez, C., Soumana, I.H., Levin, B.R. and Harvill, E.T. 2018. Development of macrolide resistance in *Bordetella bronchiseptica* is associated with the loss of virulence. *J. Antimicrob. Chemother.*, 73 (10): 2797-2805.
- Dewan, K.K., Linz, B., DeRocco, S.E. and Harvill, E.T. 2020. Acellular pertussis vaccine components: Today and tomorrow. *Vaccines*, 8 (2): 217.
- Dilli, D., Bostanci, I., Dallar, Y., Buzgan, T., Irmak, H. and Torunoğlu, M.A. 2008. Recent findings on pertussis epidemiology in Turkey. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 27 (5): 335-341.

- Dorji, D., Graham, R.M., Richmond, P., Keil, A. and Mukkur, T.K. 2016. Biofilm forming potential and antimicrobial susceptibility of newly emerged Western Australian *Bordetella pertussis* clinical isolates. *Biofouling*, 32 (9): 1141-1152.
- Dorji, D., Mooi, F., Yantorno, O., Deora, R., Graham, R.M. and Mukkur, T.K. 2018. *Bordetella pertussis* virulence factors in the continuing evolution of whooping cough vaccines for improved performance. *Med. Microbiol. Immunol.*, 207 (1): 3-26.
- Eby, J.C., Gray, M.C., Warfel, J.M., Paddock, C.D., Jones, T.F., Day, S.R., Bowden, J., Poulter, M.D., Donato, G.M., Merkel, T.J. and Hewlett, E.L. 2013. Quantification of the adenylate cyclase toxin of *Bordetella pertussis* in vitro and during respiratory infection. *Infect. Immun.*, 81 (5): 1390-1398.
- El-Azami-El-Idrissi, M., Bauche, C., Loucka, J., Osicka, R., Sebo, P., Ladant, D. and Leclerc, C. 2003. Interaction of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase with CD11b/CD18: role of toxin acylation and identification of the main integrin interaction domain. *J. Biol. Chem.*, 278 (40): 38514-38521.
- Emsley, P., Charles, I.G., Fairweather, N.F. and Isaacs, N.W. 1996. Structure of *Bordetella pertussis* virulence factor P. 69 pertactin. *Nature*, 381 (6577): 90-92.
- Ernst, K., Eberhardt, N., Mittler, A.K., Son nabend, M., Anastasia, A., Freisinger, S., Schiene-Fischer, C., Malešević, M. and Barth, H. 2018. Pharmacological cyclophilin inhibitors prevent intoxication of mammalian cells with *Bordetella pertussis* toxin. *Toxins*, 10 (5): 181.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). 2020. Pertussis - Annual epidemiological report for 2018. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/pertussis-annual-epidemiological-report-2018> [Son erişim tarihi: 24.03.2023]
- Farzam, K., Nessel, T.A. and Quick, J. 2022. Erythromycin. In *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- Fedele, G., Nasso, M., Spensieri, F., Palazzo, R., Frasca, L., Watanabe, M. and Ausiello, C.M. 2008. Lipopolysaccharides from *Bordetella pertussis* and *Bordetella parapertussis* differently modulate human dendritic cell functions resulting in divergent prevalence of Th17-polarized responses. *J. Immunol.*, 181 (1): 208-216.
- Feng, Y., Chiu, C.H., Heining, U., Hozbor, D.F., Tan, T.Q. and von König, C.H.W. 2021. Emerging macrolide resistance in *Bordetella pertussis* in mainland China: Findings and warning from the global pertussis initiative. *Lancet Reg. Health West. Pac.*, 8: 100098.
- Fernandez, R.C. and Weiss, A.A. 1994. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect. Immun.*, 62 (11): 4727-4738.
- Fernandez, R.C. and Weiss, A.A. 1998. Serum resistance in bvg-regulated mutants of *Bordetella pertussis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 163 (1): 57-63.
- Fernandez, R.C. and Weiss, A.A. 1996. Susceptibilities of *Bordetella pertussis* strains to antimicrobial peptides. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40 (4): 1041-1043.
- Finn, T.M. and Stevens, L.A. 1995. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol. Microbiol.*, 16 (4): 625-634.

- Fiser, R., Masin, J., Bumba, L., Pospisilova, E., Fayolle, C., Basler, M., Sadilkova, L., Adakins, I., Kamanova, J., Cerny, J., Konopasek, I., Osicka, R., Leclerc, C. and Sebo, P. 2012. Calcium influx rescues adenylate cyclase-hemolysin from rapid cell membrane removal and enables phagocyte permeabilization by toxin pores. *PLoS pathogens*, 8 (4): e1002580.
- Flak, T.A. and Goldman, W.E. 1999. Signalling and cellular specificity of airway nitric oxide production in pertussis. *Cell. Microbiol.*, 1 (1): 51-60.
- Flemming, H.C., Baveye, P., Neu, T.R., Stoodley, P., Szewzyk, U., Wingender, J. and Wuertz, S. 2021. Who put the film in biofilm? The migration of a term from wastewater engineering to medicine and beyond. *npj Biofilms and Microbiomes*, 7 (1): 10.
- Fux, C.A., Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Stoodley, P. 2005. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol.*, 13 (1): 34-40.
- Fry, N.K., Campbell, H. and Amirhalingam, G. 2021. JMM Profile: *Bordetella pertussis* and whooping cough (pertussis): Still a significant cause of infant morbidity and mortality, but vaccine-preventable. *J. Med. Microbiol.*, 70 (10): 001442.
- Gangarosa, E.J., Galazka, A.M., Wolfe, C.R., Phillips, L.M., Miller, E., Chen, R.T. and Gangarosa, R.E. 1998. Impact of anti-vaccine movements on pertussis control: The untold story. *The Lancet*, 351 (9099): 356-361.
- Gerber, M., Walch, C., Löffler, B., Tischendorf, K., Reischl, U. and Ackermann, G. 2008. Effect of sub-MIC concentrations of metronidazole, vancomycin, clindamycin and linezolid on toxin gene transcription and production in *Clostridium difficile*. *J. Med. Microbiol.*, 57 (6): 776-783.
- Geuijen, C.A., Willems, R.J., Hoogerhout, P., Puijk, W.C., Meloen, R.H. and Mooi, F.R. 1998. Identification and characterization of heparin binding regions of the Fim2 subunit of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 66 (5): 2256-2263.
- Geurtsen, J., Steeghs, L., Hamstra, H.J., Ten Hove, J., de Haan, A., Kuipers, B., Tommassen, J. and van der Ley, P. 2006. Expression of the lipopolysaccharide-modifying enzymes PagP and PagL modulates the endotoxic activity of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 74 (10): 5574-5585.
- Goebel, E.M., Wolfe, D.N., Elder, K., Stibitz, S. and Harvill, E.T. 2008. O antigen protects *Bordetella parapertussis* from complement. *Infect. Immun.*, 76 (4): 1774-1780.
- Goneau, L.W., Delport, J., Langlois, L., Poutanen, S.M., Razvi, H., Reid, G. and Burton, J.P. 2020. Issues beyond resistance: Inadequate antibiotic therapy and bacterial hypervirulence. *FEMS Microbes*, 1 (1): xtaa004.
- Gorringe, A.R. and Vaughan, T.E. 2014. *Bordetella pertussis* fimbriae (Fim): Relevance for vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 13 (10): 1205-1214.
- Gregory, D.S. 2006. Pertussis: A disease affecting all ages. *Am. Fam. Physician*, 74 (3): 420-426.
- Guerra, F.A., Blatter, M.M., Greenberg, D.P., Pichichero, M., Noriega, F.R. and Pentacel Study Group. 2009. Safety and immunogenicity of a pentavalent vaccine compared with separate administration of licensed equivalent vaccines in US

- infants and toddlers and persistence of antibodies before a preschool booster dose: A randomized, clinical trial. *Pediatrics*, 123 (1): 301-312.
- Guiso, N. 2009. *Bordetella pertussis* and pertussis vaccines. *Clin. Infect. Dis.*, 49 (10): 1565-1569.
- Guiso, N. 2015. Chapter 85 - *Bordetella pertussis*. In: Tang, Y.W., Liu, D., Schwartzman, J., Sussman, M. and Poxton, I. (Eds.), *Molecular Medical Microbiology*. Academic Press, pp. 1507-1527.
- Guiso, N., Meade, B.D. and von König, C.H.W. 2020. Pertussis vaccines: The first hundred years. *Vaccine*, 38 (5): 1271-1276.
- Gullberg, E., Cao, S., Berg, O.G., Ilbäck, C., Sandegren, L., Hughes, D. and Andersson, D.I. 2011. Selection of resistant bacteria at very low antibiotic concentrations. *PLoS pathogens*, 7 (7): e1002158.
- Gupta, K., Marques, C.N., Petrova, O.E. and Sauer, K. 2013. Antimicrobial tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms is activated during an early developmental stage and requires the two-component hybrid SagS. *J. Bacteriol.*, 195 (21): 4975-4987.
- Guris, D., Strebel, P.M., Jafari, H., Wharton, M. and Hadler, S.C. 1997. Pertussis vaccination: Use of acellular pertussis vaccines among infants and young children: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, 46 (RR-7): 1-25.
- Gülçin, O., Kılıç, A., Yıldız, İ., Varkal, M.A. ve Devecioğlu, E. 2014. Boğmaca enfeksiyonunun tanı ve tedavisi. *Çocuk Dergisi*, 14 (3): 100-107.
- Gümüş, D., Kalaycı-Yüksek, F., Yörük, E., Uz, G., Çelik, E., Arslan, C., Aydın, E.M., Canlı, C. ve Anđ-Küçüker, M. 2018. Alterations of growth rate and gene expression levels of UPEC by antibiotics at sub-MIC. *Folia Microbiol.*, 63: 451-457.
- 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. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.*, 25(4): 217-221.
- Hasan, S., Kulkarni, N.N., Asbjarnarson, A., Linhartova, I., Osicka, R., Sebo, P. and Gudmundsson, G.H. 2018. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin disrupts functional integrity of bronchial epithelial layers. *Infect. Immun.*, 86 (3): e00445-17.
- Hathroubi, S., Fontaine-Gosselin, S.È., Tremblay, Y.D.N., Labrie, J. and Jacques, M. 2015. Sub-inhibitory concentrations of penicillin G induce biofilm formation by field isolates of *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Vet. Microbiol.*, 179 (3-4): 277-286.
- Hazenbos, W.L., Van Den Berg, B.M., Geuijen, C.W., Mooi, F.R. and Van Furth, R. 1995. Binding of FimD on *Bordetella pertussis* to very late antigen-5 on monocytes activates complement receptor type 3 via protein tyrosine kinases. *J. Immunol.*, 155 (8): 3972-3978.

- Heiss, L.N., Moser, S.A., Unanue, E.R. and Goldman, W.E. 1993. Interleukin-1 is linked to the respiratory epithelial cytopathology of pertussis. *Infect. Immun.*, 61 (8): 3123-3128.
- Heiss, L.N., Lancaster Jr, J.R., Corbett, J.A. and Goldman, W.E. 1994. Epithelial autotoxicity of nitric oxide: Role in the respiratory cytopathology of pertussis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91 (1): 267-270.
- Hewlett, E.L., Myers, G.A. and Pearson, R.D. 1983. Susceptibility of *Bordetella* species to growth inhibition and killing by chlorpromazine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 23 (2): 201-206.
- Hoffman, C. 2017. The "Mystery Phases": *Bordetella* adenylate cyclase toxin and biofilm in the Bvg-Intermediate phase & *Bordetella pertussis* motility and flagella in the Bvg-Minus phase. PhD (Doctor of Philosophy) thesis, University of Virginia, 213 p.
- Høiby, N., Ciofu, O., Johansen, H.K., Song, Z.J., Moser, C., Jensen, P.Ø., Molin, S., Givskov, M., Tolker-Nielsen, T. and Bjarnsholt, T. 2011. The clinical impact of bacterial biofilms. *Int. J. Oral Sci.*, 3 (2): 55-65.
- Hong, J.Y. 2010. Update on pertussis and pertussis immunization. *Korean J. Pediatr.*, 53 (5): 629.
- Hoonakker, M.E. 2021. In Vivo models and In Vitro assays for the assessment of pertussis toxin activity. *Toxins*, 13 (8): 565.
- Hoppe, J.E., Halm, U., Hagedorn, H.J. and Kraminer-Hagedorn, A. 1989. Comparison of erythromycin ethylsuccinate and co-trimoxazole for treatment of pertussis. *Infection*, 17 (4): 227-231.
- Horiguchi, Y. 2001. *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factors and *Bordetella* dermonecrotic toxin: the dermonecrosis-inducing toxins activating Rho small GTPases. *Toxicon*, 39 (11): 1619-1627.
- Humann, J. and Lenz, L.L. 2009. Bacterial peptidoglycan-degrading enzymes and their impact on host muropeptide detection. *J. Innate Immun.*, 1 (2): 88-97.
- Inatsuka, C.S., Xu, Q., Vujkovic-Cvijin, I., Wong, S., Stibitz, S., Miller, J.F. and Cotter, P.A. 2010. Pertactin is required for *Bordetella* species to resist neutrophil-mediated clearance. *Infect. Immun.*, 78 (7): 2901-2909.
- Jelić, D. and Antolović, R. 2016. From erythromycin to azithromycin and new potential ribosome-binding antimicrobials. *Antibiotics*, 5 (3): 29.
- Jones, C., Allsopp, L., Horlick, J., Kulasekara, H. and Filloux, A. 2013. Subinhibitory concentration of kanamycin induces the *Pseudomonas aeruginosa* type VI secretion system. *PloS one*, 8 (11): e81132.
- Jurnecka, D., Man, P., Sebo, P. and Bumba, L. 2018. *Bordetella pertussis* and *Bordetella bronchiseptica* filamentous hemagglutinins are processed at different sites. *FEBS Open bio*, 8 (8): 1256-1266.
- Kajava, A.V., Cheng, N., Cleaver, R., Kessel, M., Simon, M.N., Willery, E., Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. and Steven, A.C. 2001. Beta-helix model for the

- filamentous haemagglutinin adhesin of *Bordetella pertussis* and related bacterial secretory proteins. *Mol. Microbiol.*, 42 (2): 279-292.
- Kapil, P. and Merkel, T.J. 2019. Pertussis vaccines and protective immunity. *Curr. Opin. Immunol.*, 59: 72-78.
- Karli, A., Sensoy, G., Belet, N., Yener, N., Akgün, M. and Paksu, M.S. 2013. Clinical features and prognosis of infants hospitalized with pertussis/Bogmaca nedeni ile hastaneye yatan süt çocuklarında klinik tablo ve prognoz. *Çocuk Enfeksiyon Dergisi*, 7 (2): 47.
- Kendrick, P. and Eldering, G. 1936. Progress report on pertussis immunization. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 26 (1): 8-12.
- Kerr, J.R. and Matthews, R.C. 2000. *Bordetella pertussis* infection: pathogenesis, diagnosis, management, and the role of protective immunity. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 19 (2): 77-88.
- Kilgore, P.E., Salim, A.M., Zervos, M.J. and Schmitt, H.J. 2016. Pertussis: microbiology, disease, treatment, and prevention. *Clin. Microbiol. Rev.*, 29 (3): 449-486.
- King, A.J., van Gorkom, T., van der Heide, H.G., Advani, A. and van der Lee, S. 2010. Changes in the genomic content of circulating *Bordetella pertussis* strains isolated from the Netherlands, Sweden, Japan and Australia: adaptive evolution or drift?. *BMC genomics*, 11: 1-15.
- Klein, N.P. 2014. Licensed pertussis vaccines in the United States: history and current state. *Hum. Vaccines Immunother.*, 10 (9): 2684-2690.
- Kline, J.M., Lewis, W.D., Smith, E.A., Tracy, L.R. and Moerschel, S.K. 2013. Pertussis: a reemerging infection. *Am. Fam. Physician*, 88 (8): 507-514.
- Kuchar, E., Karlikowska-Skwarnik, M., Han, S. and Nitsch-Osuch, A. 2016. Pertussis: history of the disease and current prevention failure. In: Pokorski, M. (Ed.), Pulmonary dysfunction and disease. Springer Cham, pp. 77-82.
- Kurugöl, Z. 2011. Boğmaca aşısı ve sorunlar. *ANKEM Derg.*, 25: 212-217.
- Lacey, B.W. 1960. Antigenic modulation of *Bordetella pertussis*. *Epidemiol Infect.*, 58 (1): 57-93.
- Ladant, D. and Ullmann, A. 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: A toxin with multiple talents. *Trends Microbiol.*, 7 (4): 172-176.
- Lam, C., Octavia, S., Ricafort, L., Sintchenko, V., Gilbert, G.L., Wood, N., McIntyre, P., Marshall, H., Guiso, N., Keil, A.D., Lawrence, A., Robson, J., Hogg, G. and Lan, R. 2014. Rapid increase in pertactin-deficient *Bordetella pertussis* isolates, Australia. *Emerg. Infect. Dis.*, 20 (4): 626.
- Langley, J.M., Halperin, S.A., Boucher, F.D., Smith, B. and Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC). 2004. Azithromycin is as effective as and better tolerated than erythromycin estolate for the treatment of pertussis. *Pediatrics*, 114 (1): e96-e101.
- Lewis, K. 2001. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45 (4): 999-1007.

- Li, J., Xie, S., Ahmed, S., Wang, F., Gu, Y., Zhang, C., Chai, X., Wu, Y., Cai, J. and Cheng, G. 2017. Antimicrobial activity and resistance: influencing factors. *Front. Pharmacol.*, 8: 364.
- Li, L., Deng, J., Ma, X., Zhou, K., Meng, Q., Yuan, L., Shi, W., Wang, Q., Li, Y. and Yao, K. 2019. High prevalence of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* and ptxP1 genotype, Mainland China, 2014–2016. *Emerg. Infect. Dis.*, 25 (12): 2205.
- Liang, J. H. and Han, X. 2013. Structure-activity relationships and mechanism of action of macrolides derived from erythromycin as antibacterial agents. *Curr. Top. Med. Chem.*, 13 (24): 3131-3164.
- Liang, Y., Salim, A.M., Wu, W. and Kilgore, P.E. 2016. Chao Yuanfang: imperial physician of the Sui Dynasty and an early pertussis observer?. *Open Forum Infect. Dis.*, 3 (1): 1-3.
- 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.
- Linz, B., Ivanov, Y.V., Preston, A., Brinkac, L., Parkhill, J., Kim, M., Harris, S.R., Goodfield, L.L., Fry, N.K., Gorringer, A.R., Nicholson, T.L., Register, K.B., Losada, L. and Harvill, E.T. 2016. Acquisition and loss of virulence-associated factors during genome evolution and speciation in three clades of *Bordetella* species. *BMC genomics*, 17 (1): 1-17.
- Liu, B., Yi, L., Li, J., Gong, S., Dong, X., Wang, C. and Wang, Y. 2020. Norfloxacin sub-inhibitory concentration affects *Streptococcus suis* biofilm formation and virulence gene expression. *Indian J. Anim. Res.*, 54 (3): 342-348.
- Locht, C. 1999. Molecular aspects of *Bordetella pertussis* pathogenesis. *Int. Microbiol.*, 2 (3): 137-144.
- Locht, C., Antoine, R. and Jacob-Dubuisson, F. 2001. *Bordetella pertussis*, molecular pathogenesis under multiple aspects. *Curr. Opin. Microbiol.*, 4 (1): 82-89.
- Locht, C. and Antoine, R. 2021. The History of Pertussis Toxin. *Toxins*, 13 (9): 623.
- Locht, C., Coutte, L. and Mielcarek, N. 2011. The ins and outs of pertussis toxin. *The FEBS journal*, 278 (23): 4668-4682.
- Lönnqvist, E., Barkoff, A.M., Mertsola, J. and He, Q. 2018. Antimicrobial susceptibility testing of Finnish *Bordetella pertussis* isolates collected during 2006–2017. *J. Glob. Antimicrob. Resist.*, 14: 12-16.
- Luker, K.E., Collier, J.L., Kolodziej, E.W., Marshall, G.R. and Goldman, W.E. 1993. *Bordetella pertussis* tracheal cytotoxin and other muramyl peptides: Distinct structure-activity relationships for respiratory epithelial cytopathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90 (6): 2365-2369.
- Luker, K.E., Tyler, A.N., Marshall, G.R. and Goldman, W.E. 1995. Tracheal cytotoxin structural requirements for respiratory epithelial damage in pertussis. *Mol. Microbiol.*, 16 (4): 733-743.
- Lynfield, R. and Schaffner, W. 2014. Can we conquer coqueluche?. *The J. Infect. Dis.*, 209 (suppl_1): S1-S3.

- Mangmool, S. and Kurose, H. 2011. Gi/o protein-dependent and-independent actions of pertussis toxin (PTX). *Toxins*, 3 (7): 884-899.
- Marr, N., Oliver, D.C., Laurent, V., Poolman, J., Denoël, P. and Fernandez, R.C. 2008. Protective activity of the *Bordetella pertussis* BrkA autotransporter in the murine lung colonization model. *Vaccine*, 26 (34): 4306-4311.
- Masuda, M., Betancourt, L., Matsuzawa, T., Kashimoto, T., Takao, T., Shimonishi, Y. and Horiguchi, Y. 2000. Activation of Rho through a cross-link with polyamines catalyzed by *Bordetella* dermonecrotizing toxin. *The EMBO Journal*, 19 (4): 521-530.
- Matsuzawa, T., Fukui, A., Kashimoto, T., Nagao, K., Oka, K., Miyake, M. and 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. *J. Biol. Chem.*, 279 (4): 2866-2872.
- Mattoo, S. and Cherry, J.D. 2005. Molecular pathogenesis, epidemiology, and clinical manifestations of respiratory infections due to *Bordetella pertussis* and other *Bordetella* subspecies. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18 (2): 326-382.
- McCoy, W.F., Bryers, J.D., Robbins, J. and Costerton, J.W. 1981. Observations of fouling biofilm formation. *Can. J. Microbiol.*, 27 (9): 910-917.
- Melvin, J.A., Scheller, E.V., Miller, J.F. and Cotter, P.A. 2014. *Bordetella pertussis* pathogenesis: current and future challenges. *Nat. Rev. Microbiol.*, 12 (4): 274-288.
- Mishra, M., Parise, G., Jackson, K.D., Wozniak, D.J. and Deora, R. 2005. The BvgAS signal transduction system regulates biofilm development in *Bordetella*. *J. Bacteriol.*, 187 (4): 1474-1484.
- Moon, K., Bonocora, R.P., Kim, D.D., Chen, Q., Wade, J.T., Stibitz, S. and Hinton, D.M. 2017. The BvgAS regulon of *Bordetella pertussis*. *MBio*, 8 (5): e01526-17.
- Moon, K., Sim, M., Tai, C.H., Yoo, K., Merzbacher, C., Yu, S.H., Kim, D.D., Lee, J., Förstner, K.U., Chen, Q., Stibitz, S., Knipling, L.G. and Hinton, D.M. 2021. Identification of BvgA-Dependent and BvgA-Independent small RNAs (sRNAs) in *Bordetella pertussis* using the prokaryotic sRNA prediction toolkit ANNOgesic. *Microbiol. Spectr.*, 9 (2): e00044-21.
- Morse, S.I. and Bray, K.K. 1969. The occurrence and properties of leukocytosis and lymphocytosis-stimulating material in the supernatant fluids of *Bordetella pertussis* cultures. *J. Exp. Med.*, 129 (3): 523.
- Nagasawa, R., Sato, T., Nomura, N., Nakamura, T. and Senpuku, H. 2020. Potential risk of spreading resistance genes within extracellular-DNA-dependent biofilms of *Streptococcus mutans* in response to cell envelope stress induced by sub-MICs of bacitracin. *Appl. Environ. Microbiol.*, 86 (16): e00770-20.
- Nash, Z.M. and Cotter, P.A. 2019. *Bordetella* filamentous hemagglutinin, a model for the two-partner secretion pathway. *Microbiol. Spectr.*, 7 (2): 7-2.
- Navidifar, T., Amin, M. and Rashno, M. 2019. Effects of sub-inhibitory concentrations of meropenem and tigecycline on the expression of genes regulating pili, efflux pumps and virulence factors involved in biofilm formation by *Acinetobacter baumannii*. *Infect. Drug Resist.*, 2019 (12): 1099-1111.

- Nieves, D.J. and Heininger, U. 2016a. *Bordetella pertussis*. In: Scheld, W.M., Hughes, J.M. and Whitley, RJ (Eds.), *Emerging Infections* 10. American Society for Microbiology Press, Washington, pp. 311-339.
- Nieves, D.J. and Heininger, U. 2016b. *Bordetella pertussis*. *Microbiol. Spectr.*, 4 (3): 4-3.
- Nikbin, V.S., Keramati, M., Noofeli, M., Bolourchi, N., Nosrati, S. and Shahcheraghi, F. 2018. Characterization of a predominant *Bordetella pertussis* strain isolated from Iranian patients. *Vaccine Research*, 5 (2): 52-56.
- Novikov, A., Marr, N. and Caroff, M. 2019. A comparative study of the complete lipopolysaccharide structures and biosynthesis loci of *Bordetella avium*, *B. hinzii*, and *B. átremaum*. *Biochimie*, 159: 81-92.
- Ntezayabo, B., De Serres, G. and Duval, B. 2003. Pertussis resurgence in Canada largely caused by a cohort effect. *Pediatr Infect. Dis. J.*, 22 (1): 22-27.
- Olin, P., Rasmussen, F., Gustafsson, L., Hallander, H. O. and Heijbel, H. 1997. Randomised controlled trial of two-component, three-component, and five-component acellular pertussis vaccines compared with whole-cell pertussis vaccine. *The Lancet*, 350 (9091): 1569-1577.
- Otar, G., Kılıç, A., Yıldız, İ., VarKal, M.A. and Devecioğlu, E. 2014a. Boğmaca enfeksiyonunun epidemiyolojisi. *Çocuk Dergisi*, 14 (2): 43-51.
- Otar, G., Yıldız, İ., Kılıç, A., Varkal, M.A. and Devecioğlu, E. 2014b. Boğmacada korunma prensipleri. *Çocuk Dergisi*, 14 (2): 52-59.
- Otsuka, N., Han, H.J., Toyozumi-Ajisaka, H., Nakamura, Y., Arakawa, Y., Shibayama, K. and Kamachi, K. 2012. Prevalence and genetic characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in Japan. *PloS one*, 7 (2): e31985.de.
- Özcengiz, E. 2005. Boğmaca: Her zaman gündemde. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 35 (3): 215-231.
- Özmert, E. N. 2008. Dünya’da ve Türkiye’de aşılama takvimindeki gelişmeler. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi*, 51 (3): 168-175.
- Paddock, C.D., Sanden, G.N., Cherry, J.D., Gal, A.A., Langston, C., Tatti, K.M., Wu, K.H., Goldsmith, C.S., Greer, P.W., Montague, J.L., Eliason, M.T., Holman, R.C., Guarner, J., Shieh, W.J. and Zaki, S.R. 2008. Pathology and pathogenesis of fatal *Bordetella pertussis* infection in infants. *Clin. Infect. Dis.*, 47 (3): 328-338.
- Palmer, J., Flint, S. and Brooks, J. 2007. Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 34 (9): 577-588.
- Pawloski, L.C., Queenan, A.M., Cassiday, P.K., Lynch, A.S., Harrison, M.J., Shang, W., Williams, M.M., Bowden, K.E., Burgos-Rivera, B., Qin, X., Messonnier, N. and Tondella, M.L. 2014. Prevalence and molecular characterization of pertactin-deficient *Bordetella pertussis* in the United States. *Clin. Vaccine Immunol.*, 21 (2): 119-125.
- Peppler, M.S. 1984. Two physically and serologically distinct lipopolysaccharide profiles in strains of *Bordetella pertussis* and their phenotype variants. *Infect. Immun.*, 43 (1): 224-232.

- Persson, C.G.A., Erjefält, I., Alkner, U., Baumgarten, C., Greiff, L., Gustafsson, B., Luts, A., Pipkorn, U., Sundler, F., Svensson, C. and Wollmer, P. 1991. Plasma exudation as a first line respiratory mucosal defence. *Clin. Exp. Allergy*, 21 (1): 17-24.
- Piatti, G. 1994. Bacterial adhesion to respiratory mucosa and its modulation by antibiotics at sub-inhibitory concentrations. *Pharmacol. Res.*, 30 (4): 289-299.
- Preston, N.W. and Kerr, J.R. 2001. Current pharmacotherapy of pertussis. *Expert Opin. Pharmacother.*, 2 (8): 1275-1282.
- Pullinger, G.D., Adams, T.E., Mullan, P.B., Garrod, T.I. and Lax, A.J. 1996. Cloning, expression, and molecular characterization of the dermonecrotic toxin gene of *Bordetella* spp. *Infect. Immun.*, 64 (10): 4163-4171.
- Raetz, C.R. and Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*, 71 (1): 635-700.
- Rafaque, Z., Abid, N., Liaqat, N., Afridi, P., Siddique, S., Masood, S., Kanwal, S. and Dasti, J.I. 2020. In-vitro investigation of antibiotics efficacy against uropathogenic *Escherichia coli* biofilms and antibiotic induced biofilm formation at sub-minimum inhibitory concentration of ciprofloxacin. *Infect. Drug Resist.*, 13: 2801-2810.
- Ramkissoon, S. 2021. Investigating the variability of *Bordetella pertussis* growth. PhD (Doctor of Philosophy) thesis, University of Bath, Claverton Down, 306 p.
- Rather, M.A., Gupta, K. and Mandal, M. 2021. Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Braz. J. Microbiol.*, 52: 1701-1718.
- Reeks, B.Y., Champlin, F.R., Paulsen, D.B., Scruggs, D.W. and 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*. *Can. J. Vet. Res.*, 69 (1): 1-10.
- Romanus, V., Jonsell, R. and Bergquist, S.O. 1987. Pertussis in Sweden after the cessation of general immunization in 1979. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 6 (4): 364-371.
- Romero, R.V., Hasan, S., Faé, K., Holubova, J., Geurtsen, J., Schwarzer, M., Wiertsema, S., Osicka, R., Poolman, J. and Sebo, P. 2016. *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin itself does not trigger anti-inflammatory interleukin-10 production by human dendritic cells. *International J. Med. Microbiol.*, 306 (1): 38-47.
- Sadiq, F.A., Burmølle, M., Heyndrickx, M., Flint, S., Lu, W., Chen, W., Zhao, J. and Zhang, H. 2021. Community-wide changes reflecting bacterial interspecific interactions in multispecies biofilms. *Crit. Rev. Microbiol.*, 47 (3): 338-358.
- Safarchi, A., Octavia, S., Wu, S. Z., Kaur, S., Sintchenko, V., Gilbert, G.L., Wood, N., McIntyre, P., Marshall, H., Keil, A.D. and Lan, R. 2016. Genomic dissection of Australian *Bordetella pertussis* isolates from the 2008-2012 epidemic. *J. Infect.*, 72 (4): 468-477.
- Sato, Y., Arai, H. 1972. Leucocytosis promoting factor of *Bordetella pertussis*. *Infect. Immun.*, 6: 899-904.

- Sato, Y., Kimura, M. and Fukumi, H. 1984. Development of a pertussis component vaccine in Japan. *The Lancet*, 323 (8369): 122-126.
- Sato, Y., Unno, Y., Ubagai, T. and Ono, Y. 2018. Sub-minimum inhibitory concentrations of colistin and polymyxin B promote *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *PLoS One*, 13 (3): e0194556.
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D.M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P.S. and Bjarnsholt, T. 2022. The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nat. Rev. Microbiol.*, 20 (10): 608-620.
- Scanlon, K.M., Skerry, C. and Carbonetti, N.H. 2015. Novel therapies for the treatment of pertussis disease. *FEMS Pathog. Dis.*, 73 (8): ftv074.
- Scarlato, V., Arico, B., Prugnola, A. and Rappuoli, R. 1991. Sequential activation and environmental regulation of virulence genes in *Bordetella pertussis*. *The EMBO Journal*, 10 (12): 3971-3975.
- Scheller, E.V. and Cotter, P.A. 2015. *Bordetella* filamentous hemagglutinin and fimbriae: critical adhesins with unrealized vaccine potential. *Pathog. Dis.*, 73 (8): 1-9.
- Serra, D.O., Conover, M.S., Arnal, L., Sloan, G.P., Rodriguez, M.E., Yantorno, O.M. and 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.
- Shi, N., Gao, Y., Yin, D., Song, Y., Kang, J., Li, X., Zhang, Z., Feng, X. and Duan, J. 2019. The effect of the sub-minimal inhibitory concentration and the concentrations within resistant mutation window of ciprofloxacin on MIC, swimming motility and biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb. Pathog.*, 137: 103765.
- Shun-Mei, E., Zeng, J.M., Yuan, H., Lu, Y., Cai, R.X. and Chen, C. 2018. Sub-inhibitory concentrations of fluoroquinolones increase conjugation frequency. *Microb. Pathog.*, 114: 57-62.
- Smith, A.M., Guzmán, C.A. and Walker, M.J. 2001. The virulence factors of *Bordetella pertussis*: A matter of control. *FEMS Microbiol. Rev.*, 25 (3): 309-333.
- Smith, C. and Vyas, H. 2000. Early infantile pertussis; increasingly prevalent and potentially fatal. *Eur. J. Pediatr.*, 159: 898-900.
- Souder, E. and Long, S.S. 2015. Pertussis in the era of new strains of *Bordetella pertussis*. *Infectious Disease Clinics*, 29 (4): 699-713.
- Stocks, P. and Kam, M.N. 1932. On the epidemiology of pertussis cough in London. *J. Hygiene*, 32: 582-619.
- Sun, F., Yuan, Q., Wang, Y., Cheng, L., Li, X., Feng, W. and Xia, P. 2020. Sub-minimum inhibitory concentration ceftazidime inhibits *Escherichia coli* biofilm formation by influencing the levels of the *ibpA* gene and extracellular indole. *J. Chemother.*, 32 (1): 7-14.
- Tan, T., Trindade, E. and Skowronski, D. 2005. Epidemiology of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 24 (5): S10-S18.

- Tefon, B.E. 2012. Towards whole cell immunoproteome and subproteomes of *Bordetella pertussis*. PhD (Doctor of Philosophy) thesis, Middle East Technical University, Ankara, 164 p.
- Tenson, T., Lovmar, M. and Ehrenberg, M. 2003. The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J. Mol. Biol.*, 330 (5): 1005-1014.
- Teter, K. 2019. Intracellular trafficking and translocation of pertussis toxin. *Toxins*, 11 (8): 437.
- Tezel, B.U., Akçelik, N., Yüksel, F.N., Karatug, N.T. and Akçelik, M. 2016. Effects of sub-MIC antibiotic concentrations on biofilm production of *Salmonella infantis*. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, 30 (6): 1184-1191.
- Tezer, H. 2016. Difteri, Tetanoz & Boğmaca Aşılıarı. *Klinik Tıp Pediatri Dergisi*, 8 (4): 27-32.
- Theofiles, A.G., Cunningham, S.A., Chia, N., Jeraldo, P.R., Quest, D.J., Mandrekar, J. N. and Patel, R. 2014. Pertussis outbreak, southeastern Minnesota, 2012. 53rd Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, pp. 1378-1388, 10-13 September, Denver, Colorado.
- Tiwari, T. 2005. National Immunization Program, CDC. Recommended antimicrobial agents for the treatment and postexposure prophylaxis of pertussis: 2005 CDC Guidelines. *MMWR Recomm. Rep.*, 54: 1-16.
- Tolman, K.G., Sannella, J.J. and Freston, J.W. 1974. Chemical structure of erythromycin and hepatotoxicity. *Ann. Intern. Med.*, 81 (1): 58-60.
- Türkanoğlu Özçelik, A., Yılmaz, S., Gökboro, S. and İnan, M. 2019. A quantitative polymerase chain reaction assay for the detection of equine (horse and donkey)-originated meat in processed bovine meat products. *Food Sci. Technol. Int.*, 25 (1): 38-46.
- Tüzün, N. ve Erkmen, A. 2022. Arşiv belgeleri ışığında Osmanlı Devleti'nde boğmaca hastalığı üzerine bir inceleme (XIX. yüzyıl sonlarından XX. yüzyıl başlarına). *Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Lokman Hekim Tıp Tarihi ve Folklorik Tıp Dergisi*, 12 (3): 507-517.
- Uhl, M.A. and Miller, J.F. 1996. Integration of multiple domains in a two-component sensor protein: The *Bordetella pertussis* BvgAS phosphorelay. *EMBO J.*, 15 (5): 1028-36.
- van den Akker, W.M. 1998. Lipopolysaccharide expression within the genus *Bordetella*: Influence of temperature and phase variation. *Microbiology*, 144 (6): 1527-1535.
- Van Rie, A. and Hethcote, H.W. 2004. Adolescent and adult pertussis vaccination: Computer simulations of five new strategies. *Vaccine*, 22 (23-24): 3154-3165.
- Varaldo, P.E., Montanari, M.P. and Giovanetti, E. 2009. Genetic elements responsible for erythromycin resistance in streptococci. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53 (2): 343-353.
- Vojtova, J., Kamanova, J. and Sebo, P. 2006. *Bordetella* adenylate cyclase toxin: A swift saboteur of host defense. *Curr. Opin. Microbiol.*, 9 (1): 69-75.

- von König, C.H.W. 2005. Use of antibiotics in the prevention and treatment of pertussis. *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 24 (5): S66-S68.
- Wang, P., Huo, C.X., Lang, S., Caution, K., Nick, S. T., Dubey, P., Deora, R. and Huang, X. 2020. Chemical synthesis and immunological evaluation of a pentasaccharide bearing multiple rare sugars as a potential anti-pertussis vaccine. *Angew. Chem.*, 132 (16): 6513-6520.
- Warfel, J.M., Zimmerman, L.I. and Merkel, T.J. 2014. Acellular pertussis vaccines protect against disease but fail to prevent infection and transmission in a nonhuman primate model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 111 (2): 787-792.
- Weber, J.M., Wierman, C.K. and Hutchinson, C.R. 1985. Genetic analysis of erythromycin production in *Streptomyces erythreus*. *J. Bacteriol.*, 164 (1): 425-433.
- Weiss, A.A. and Goodwin, M.S. 1989. Lethal infection by *Bordetella pertussis* mutants in the infant mouse model. *Infect. Immun.*, 57 (12): 3757-3764.
- World Health Organization. 2023. Pertussis. https://www.who.int/health-topics/pertussis#tab=tab_1 [Son erişim tarihi: 20.03.2023]
- Wolfe, D.N., Goebel, E.M., Bjornstad, O.N., Restif, O. and Harvill, E.T. 2007. The O antigen enables *Bordetella parapertussis* to avoid *Bordetella pertussis*-induced immunity. *Infect. Immun.*, 75 (10): 4972-4979.
- Wu, D., Duan, Q., Xu, G. and Guan, Y. 2019. Sub-inhibitory concentrations of sodium houttuynfonate in combination with erythromycin inhibit biofilm formation and expression of *icaA* in *Staphylococcus epidermidis*. *Jundishapur J. Microbiol.*, 12 (10): e98009.
- Wu, X., Du, Q., Li, D., Yuan, L., Meng, Q., Fu, Z., Xu, H., Yao, K. and Zhao, R. 2022. A cross-sectional study revealing the emergence of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* carrying *ptxP3* alleles in China. *Front. Microbiol.*, 13: 901617.
- Yang, Y., Yao, K., Ma, X., Shi, W., Yuan, L. and Yang, Y. 2015. Variation in *Bordetella pertussis* susceptibility to erythromycin and virulence-related genotype changes in China (1970-2014). *PLoS One*, 10 (9): e0138941.
- Yang, B., Lei, Z., Zhao, Y., Ahmed, S., Wang, C., Zhang, S., Fu, S., Cao, J. and Qiu, Y. 2017. Combination susceptibility testing of common antimicrobials *in Vitro* and the effects of sub-MIC of antimicrobials on *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Front. Microbiol.*, 8: 2125.
- Yamaguchi, T., Kawasaki, Y., Katsukawa, C., Kawahara, R. and Kawatsu, K. 2020. The first report of isolation of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* in Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases JJID-2019*, 73(5): 361-362.
- Yao, K., Deng, J., Ma, X., Dai, W., Chen, Q., Zhou, K., Ye, J., Shi, W., Wang, H., Li, D., Wang, H., Wang, J., Zhang, J., Wu, D., Xie, G., Shen, K., Zheng, Y. and Yang, Y. 2020. The epidemic of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* with limited genome variation associated with pertussis resurgence in China. *Expert Rev. Vaccines*, 19 (11): 1093-1099.

- Yarmohammadi, H., Kazeruni, M.H.B., Soofi, A. and Zargarani, A. 2015. The first report of epidemic pertussis by Bahaodowle Razi from the 15th century anno domini. *Iran. Red Crescent Med. J.*, 17 (7): e13454.
- Yasui, Y., Mitsui, T., Nishimura, T., Uchida, K., Inokuchi, M., Mori, M., Tokumura, M. and Nakayama, T. 2018. School-age children and adolescents suspected of having been to be infected with pertussis in Japan. *Vaccine*, 36 (20): 2910-2915.
- Yiğit, T., Oktay, B.Ö., Özdemir, C.N. and Moustafa Paşa, S. 2020. Aşı karışıklığı ve fikri gelişimi. *Uluslararası Sosyal ve Beşeri Bilimler Araştırma Dergisi*, 7 (53): 1244-1261.
- Zarandi, E.R., Mansouri, S., Nakhaee, N., Sarafzadeh, F. and Moradi, M. 2017. Effect of sub-MIC of vancomycin and clindamycin alone and in combination with ceftazidime on *Clostridium difficile* surface layer protein A (slpA) gene expression. *Microb. Pathog.*, 111: 163-167.
- Zasztowt-Sternicka, M., Jagielska, A.M. and Nitsch-Osuch, A.S. 2021. Pertussis vaccination in pregnancy—current data on safety and effectiveness. *Ginekol. Pol.*, 92 (8): 591-594.
- Zhao, A., Sun, J. and Liu, Y. 2023. Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies. *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 13: 1 – 23.
- Zhao, Y.L., Zhou, Y.H., Chen, J.Q., Huang, Q.Y., Han, Q., Liu, B., Cheng, G.D. and Li, Y.H. 2015. Quantitative proteomic analysis of sub-MIC erythromycin inhibiting biofilm formation of *S. suis* in vitro. *J. Proteomics*, 116: 1-14.
- Zhou, L., Li, T., An, J., Liao, C., Li, N. and Wang, X. 2017. Subminimal inhibitory concentration (sub-MIC) of antibiotic induces electroactive biofilm formation in bioelectrochemical systems. *Water Res.*, 125: 280-287.

8. EKLER

EK – 1 *B. pertussis* için Morse Bray sıvı besiyerinin hazırlanması (Morse ve Bray 1969)

Solüsyon A

Kimyasallar	Miktar
Kasamino asit	10 g/L
Tris	6 g/L
Glutamik asit	0.2 g/L
NaCl	2.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
Nişasta	1.5 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.4 g/L
CaCl ₂	0.013 g/L

Solüsyon A için tartılan kimyasallar 600 mL distile su içerisinde çözülmüştür. Hazırlanan karışımın pH'sı HCl ile 7.4'e ayarlanmış, ardından besiyerinin hacmi distile su ile 975 mL'ye tamamlanmış ve karışım otoklavlanmıştır.

Solüsyon B

Kimyasallar	Miktar
L-Prolin	120 mg/mL
Glutatyon	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

Solüsyon B için tartılan kimyasallar 10 mL distile su içerisinde çözündürülmüştür, ardından distile su ile hacim 25 mL'ye tamamlanmıştır. Hazırlanan karışım 0.22 µm'lik şırınga ucu filtreden geçirilerek steril edilmiştir ve otoklavlanmış solüsyon A ile karıştırılmıştır.

EK – 2 *B. pertussis* için Modifiye Cohen Wheeler katı besiyerinin hazırlanması (Sato ve Arai 1972)

Kimyasallar	Miktar
Bakteriyolojik Agar	25 g/L
NaCl	2.5 g/L
KH ₂ PO ₄	0.5 g/L
MgCl ₂ .6H ₂ O	0.4 g/L
Maya Özütü	2 g/L
Kasamino asit	10 g/L
CaCl ₂ (%1)	1 mL/L
FeSO ₄ .7H ₂ O (%0.5)	2 mL/L
L-Sistein (%1)	2.5 mL/L
CuSO ₄ .5H ₂ O (%0.5)	1 mL/L
Aktif Kömür	4 g/L

Tartılan kimyasallar distile su içerisinde çözündürülmüştür, ardından pH NaOH ile 7.3'e ayarlanmıştır. Hazırlanan karışım otoklavlanarak steril edilmiş ve petri kaplarına dökülmüştür.

ÖZGEÇMİŞ

BERFİN EROĞLU

ÖĞRENİM BİLGİLERİ

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

ESERLER

Uluslararası hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

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

2- Öztürk, B.E.T., Eroğlu, B., Delik, E., Çiçek, M., Çiçek, E. (2023). Comprehensive evaluation of three important herbs for kombucha fermentation. Food Technol. Biotechnol., 61 (1), 127-137. Doi: <https://doi.org/10.17113/ftb.61.01.23.7811>

Ulusal hakemli dergilerde yayımlanan makaleler

1- Eroğlu, B., Delik, E., Öztürk, B.E.T. (2021). Investigation of Biochemical and Microbiological Effects of *Prunus mahaleb* in Fermented Tea Beverage.

2- Delik, E., Eroğlu, B., Ünal, O., Öztürk, B.E.T. (2021). *Origanum bilgeri*'nin kombucha çayının biyoaktivitesi ve mikrobiyolojik profili üzerindeki etkilerinin incelenmesi. Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Ve Mühendislik Bilimleri Dergisi, (2), 236-249. Doi: <https://doi.org/10.35414/akufemubid.867841>

Ulusal/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. (Özet Bildiri)
- 2- Delik, E., Eroğlu, B., Yılmaz Çolak, Ç., Tefon Öztürk, B.E. (2022). Effects of Sub-Minimum Inhibitory Concentrations of Antibiotics on *Bordetella pertussis*. Cukurova 8th International Scientific Researches Conference. (Tam Metin Bildiri)
- 3- Eroğlu, B., Delik, E., Tefon Öztürk, B.E. (2021). Investigation of Biological Activities and Sensory Properties of Chasteberry Flavoured Kombucha. The 12th International Scientific Research Congress. (Tam Metin Bildiri)

Proje Deneyimi

- 1- Antibiyotiklerin Sub-Minimum İnhibitör Konsantrasyonunda *Bordetella pertussis* Üzerine Etkisi, 121Z656, TÜBİTAK 1002, Proje Çalışanı (2021-2022).
- 2- Sub-Minimal İnhibitör Konsantrasyonunda Eritromisinin *Bordetella pertussis* Hücrelerinin Büyüme Hızına, Biyofilm Oluşturma Kapasitesine, Pertussis Toksin ve Pertaktin Genlerinin Ekspresyonuna Etkisi, FYL-2021-5610, Akdeniz Üniversitesi BAP Koordinatörlüğü, Araştırmacı (2021).
- 3- Çeşitli Bitkilerin Kombü Çayı Fermantasyonunda Selüloz Üretimine Etkisinin ve Antioksidan - Antibakteriyel Aktivitelerinin Değerlendirilmesi, TÜBİTAK 2209/A, Proje Yürütücüsü (2019).