ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KERKÜK ŞEHRİNDE HAFİF-ORTA DERECEDEKİ COVID-19 HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS FAECALİS*'İN VANKOMİSİN DİRENCİNİN PCR İLE ARAŞTIRILMASI

Ali Hussein Ahmed DABBAGH

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Ali Hussein Ahmed DABBAGHtarafından hazırlanan **"Kerkük Şehrinde Hafif-Orta Derecedeki COVID-19 Hastalarından İzole Edilen *Enterococcus faecalis*'in Vankomisin Direncinin PCR ile Araştırılması"** adlı tez çalışması 06/02/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Muhaned Abdulalla Khalaf ALAZAWY

Jüri Üyeleri :

Başkan : Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Farmakoloji ve Toksikoloji
Ankara Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Eldivan SHMYO
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eldivan SHMYO
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Kerkük Şehrinde Hafif-Orta Derecedeki COVID-19 Hastalarından İzole Edilen *Enterococcus faecalis*'in Vankomisin Direncinin PCR ile Araştırılması**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (06/02/2023).

Ali Hussein Ahmed DABBAGH

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KERKÜK ŞEHRİNDE HAFİF-ORTA DERECEDEKİ COVID-19 HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN *ENTEROCOCCUS FAECALİS*'İN VANKOMİSİN DİRENCİNİN PCR İLE ARAŞTIRILMASI

Ali Hussein Ahmed DABBAGH

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Muhaned Abdulalla Khalaf ALAZAWY

Bu çalışmanın amacı, COVID-19 salgını sırasında Irak'ta hastanede yatan hastalardan elde edilen vankomisine dirençli enterokok (VRE) izolatlarında bulunan antibiyotik direnç genleri hakkında veri toplamaktır. Çalışmaya COVID-19 virüsü bulaşmış ve Kerkük'teki Al-Shifaa Epidemiyoloji Hastanesi'nde tedavi gören 104 kişi katılmıştır. Bu kişiler her iki cinsiyetten ve çeşitli yaş gruplarından oluşmaktadır. Hastalardan nazofaringeal sürüntüler alınmıştır. Bu örnekler tıbbi gözetim altında alınmış ve real-time PCR ile *VanA* ve *VanB* genlerinin moleküler tayini yapılmıştır. Çalışma sonuçları, şiddetli COVID-19 enfeksiyonu olan hastaların çoğunun yaşlı (>57 yaş) ve diyabetik hastaların yarısından fazlasının da COVID-19 enfeksiyonundan muzdarip olduğunu göstermiştir. Çalışmada, pozitif kültüre sahip COVID-19 hastalarının çoğundan alınan nazofaringeal sürüntü kültüründe en çok izole edilen bakterinin *E. faecalis* (%39,74) olduğu ve bunu sırasıyla *Klebsiella pneumoniae* (%21,79) ve *Staphylococcus aureus*'un izlediği ortaya çıkmıştır. Ayrıca, *E. faecalis*izolatlarınınçoğu sefalotin, imipenem, ampisilin ve levofloksasine duyarlı iken, karbenisilin, klindamisin ve vankomisine karşı dirençli olarak tespit edilmiştir. Bunlara ek olarak, COVID-19 hastalarından izole edilen vankomisine dirençli *E. faecalis'*in %64'ünün *VanA* geni (vankomisin direncinden sorumlu genlerden biri) ve %28'inin *VanB* geni için pozitif olduğu bulunmuştur.

2023, 63 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: COVID-19, SARS-CoV-2, *E. faecalis*, Vankomisin

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE INVESTIGATION OF VANCOMYCIN RESISTANCE IN *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ISOLATED FROM MILD-MODERATE COVID-19 PATIENTS IN KIRKUK CITY BY PCR

Ali Hussein Ahmed DABBAGH

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Muhaned Abdulalla Khalaf ALAZAWY

The aim of this study is to collect data on antibiotic resistance genes found in vancomycin-resistant enterococci (VRE) isolates obtained from hospitalized patients in Iraq during the COVID-19 outbreak. 104 people who were infected with the COVID-19 virus and were treated at the Al-Shifaa Epidemiology Hospital in Kirkuk participated in the study. These people consist of both sexes and various age groups. Nasopharyngeal swabs were taken from the patients. These samples were taken under medical supervision and molecular determination of *VanA* and *VanB* genes was performed by real-time PCR. Study results showed that most patients with severe COVID-19 infection are elderly (>57 years) and more than half of diabetic patients also suffer from COVID-19 infection. The study revealed that *E. faecalis* (39.74%) was the most isolated bacteria in the nasopharyngeal swab culture taken from most of the positive culture COVID-19 patients, followed by *Klebsiella pneumoniae* (21.79%) and *Staphylococcus aureus*, respectively. In addition, most of the *E. faecalis* isolates were sensitive to Cephalothin, Imipenem, Ampicillin and Levofloxacin, while resistant to Carbenicillin, Clindamycin and Vancomycin. In addition, 64% of Vancomycin-resistant *E. faecalis* isolated from COVID-19 patients were found to be positive for the *VanA* gene (one of the genes responsible for vancomycin resistance) and 28% for the *VanB* gene.

2023, 63 pages

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, *E. faecalis*, Vancomycin

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Çalışmalarımda her türlü yardımdan kaçınmayan, beni her zaman destekleyen, büyük bir anlayış gösteren ve bana yol gösteren değerli hocalarım Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN ve Dr. Öğr. Üyesi Muhaned Abdulalla Khalaf ALAZAWY'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ali Hussein Ahmed DABBAGH
Çankırı, Şubat 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 SARS-CoV-2 ..... **3**
2.1.1 Tarihsel gelişim **3**
2.1.2 COVID-19'un kökeni ve yayılışı **3**
2.1.3 COVID-19'un patogenezi **4**
2.1.4 Klinik özellikler **5**
2.1.5 COVID-19 sırasında bağışıklık sisteminin rolü **5**
2.1.6 Sitokin fırtınası **6**
2.1.7 Teşhis **7**
2.2 Enterokoklar **8**
2.2.1 Enterokokların tanısal morfolojisi **9**
2.2.2 Patogenez ve bağışıklık **10**
2.2.3 Klinik hastalıklar **11**
2.2.4 Laboratuvar tanısı **11**
2.2.5 Tedavi **12**
2.3 SARS-CoV-2 Bulunan Hastalarda Bakteriyel Koenfeksiyon **12**
3. MATERYAL VE METOT **14**
3.1 Çalışma Tasarımı **14**
3.1.1 Hastalar **14**
3.1.2 Kontrol grubu **14**
3.1.3 Dışlama kriterleri **14**

3.1.4 Etik onay **14**
3.1.5 COVID-19 hastaları **15**
3.1.6 Klinik sınıflandırma **15**
3.2 Malzemeler **16**
3.2.1 Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları **16**
3.2.2 Kimyasal malzemeler **16**
3.2.3 Kitler **17**
3.2.4 Reaktiflerin ve solüsyonun hazırlanması **17**
3.2.5 Boyalar **19**
3.2.6 Antibiyotik diskler **20**
3.2.7 Ortamlar **20**
3.3 Yöntemler **21**
3.3.1 Swab kültürü için numune alma **21**
3.3.2 Kültür **21**
3.3.3 Mikroskobik inceleme (gram boyama filmi) **21**
3.3.4 Kültürel teşhis **22**
3.3.5 Mikroskobik inceleme **23**
3.3.6 Biyokimyasal testler **23**
3.3.7 API 20 strep şeridi **24**
3.3.8 Antimikrobiyal ajanlara bakteriyel duyarlılık testi **24**
3.3.9 Moleküler testler (antibiyotik direnç geninin tespiti) **25**
3.4 İstatistiksel Analiz **29**
4. BULGULAR VE TARTIŞMA **30**
4.1 COVID-19 Hastalarının Genel Özellikleri **30**
4.2 COVID-19 Hastalarında Komorbiditeler **30**
4.3 COVID-19 Hastalarının Klinik Özellikleri **32**
4.4 Bakteriyolojik Koenfeksiyon **33**
4.5 Bakteriyel Enfeksiyonun COVID-19 Şiddeti ile İlişkisi **35**
4.6 *E. Faecalis* İzole Edilmiş Vajinitli Kadınlarda Antibiyotik Duyarlılığının Dağılımı **37**
4.7 COVID -19 Hastalarından İzole Edilen *E. Faecalis*'in *VanA* ve *VanB* Genlerinin PCR ile Tespiti **39**

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 41
KAYNAKLAR 42
EKLER 52
ÖZGEÇMİŞ 63

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
≥	Büyük eşit
℃	Santigrat derece
mL	Mililitre
mm	Milimetre
µL	Mikrolitre
µm	Mikrometre

KISALTMALAR DİZİNİ

2019 nCOV	2019 yeni tip koronavirüs
ACE	Anjiyotensin enzim
ADE	Antikora bağlı geliştirme
ANOVA	Varyans analizi
ASSS	Akut solunum sıkıntısı sendromu
COVID-19	Koronavirüs hastalığı 2019
CRP	C-reaktif protein
CT	Döngü eşiği
CXR	Röntgen
DNA	Deoksiribokliek asit
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
ICU	Yoğun bakım ünitesi
IL	İnterlökin
İYE	İdrar yolu enfeksiyonu
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
LDH	Laktat dehidrogenaz
MDR	Çoklu ilaca dirençli
MERS-COV	Orta doğu solunum sendromu koronavirüsü
P. değeri	Olasılık değeri
PCR	Plimeraz zincir reaksiyonu
PYR	Pirolidonil arilamidaz
RAS	Renin-anjiyotensin sistemi
RNA	Ribonükliek asit
SARS-CoV-2	Şiddetli akut solunum sendromu koronavirüsü 2
SPSS	İstatistik paketi
VRE	Vankomisine dirençli enterokoklar

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İlk maruziyetten sonra Covid-19 enfeksiyonunun belirtileri 7
Şekil 3.1 COVID-19'un klinik sunumu 15
Şekil 4.1 Bakteri kültürü sonucu 33
Şekil 4.2 Kanlı agarda *E. faecalis* izolatının gelişimi 34
Şekil 4.3 Azide kanlı agar üzerinde *E. faecalis*'in gelişimi 34
Şekil 4.4 *E. faecalis* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi 37

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Aparat ve ekipmanlar 16
Çizelge 3.2 Kimyasal maddeler 17
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan lekeler 19
Çizelge 3.4 Mevcut çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri 20
Çizelge 3.5 Kullanılan besiyerleri 20
Çizelge 3.6 Bakteri reaksiyonları 23
Çizelge 3.7 Gerçek zamanlı kantitatif PCR ana karışımının hazırlanması 28
Çizelge 3.8 Döngü programı 28
Çizelge 3.9 PCR testinde kullanılan primerler 29
Çizelge 4.1 COVID-19 hastalarının genel özellikleri 30
Çizelge 4.2 COVID-19 hastaları arasında komorbiditeler 31
Çizelge 4.3 COVID-19 hastalarının klinik özellikleri 33
Çizelge 4.4 Kültüre göre izole edilen bakteriler 34
Çizelge 4.5 Bakteriyel enfeksiyonun COVID-19 şiddeti ile ilişkisi 36
Çizelge 4.6 *E. faecalis* izole vajinitli kadınlarda antibiyotik duyarlılıkları 37
Çizelge 4.7 COVID-19 hastalarından izole edilen *E. faecalis*'in *VanA* ve *VanB* genlerinin PCR ile tespiti 39

1. GİRİŞ

Çin'in Hubei Eyaleti, Wuhan Şehri'nde keşfedilmesinden bu yana, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) olarak da bilinen 2019 yeni tip koronavirüs (2019-nCOV), dünyanın geri kalanına hızla yayılmaktadır (Shimizu 2020). Mart 2020 tarihi itibariyle, yaklaşık 96,000 onaylanmış koronavirüs hastalığı vakası (COVID-19) ve 3,300 ölüm kaydedilmiştir (Singh and Singh 2020).

Ortaya çıkan COVID-19 salgınıyla ilişkili olarak; bakteriyel ve fungal enfeksiyonların ortaya çıkması, antimikrobiyal direnç prevalansında artış ve antimikrobiyal yönetim programlarında bir dizi sorun ve endişeyi günyüzüne çıkarmıştır (Yuki *et al.* 2020). Bu oluşan sorun ve endişeleri gidermek için hastanelerin yoğun bakım ünitelerinde Dünya Sağlık Örgütünün (DSÖ) tavsiyeleri doğrultusunda enfeksiyon önleme ve kontrol önlemleri, çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin bulaşmasını önlemeye yönelik önlemler, uluslararası kılavuzlar temelinde yayınlanan yerel protokollere uygun olarak uygulanmıştır (Yang *et al.* 2020).

İnsan gastrointestinal sisteminde kommensal olan bulunan Gram pozitif koklar *Enterococcus* cinsine aittir. Öte yandan, antimikrobiyal direnç genleri (özellikle glikopeptitlere direnç için vanA) edinme yetenekleri nedeniyle *Enterococcus*lar, yaşamı tehdit eden fırsatçı enfeksiyonlara, özellikle hastane enfeksiyonlarına neden olabilmektedir. Bu enfeksiyonlar, hastaneler de dahil olmak üzere vücudun herhangi bir yerinde ortaya çıkabilir (Manson *et al.* 2010). Antimikrobiyal direnç ve yüksek uyarlanabilirliğin bir sonucu olarak tartışmanın merkezinde yer alan *Enterococcus* cinsine ait en önemli türlerden ikisi *Enterococcus faecium* ve *Enterococcus faecalis* türleri son yıllarda ciddi derecede dikkat çekmiştir. *E. gallinarum* ve *E. caseliflavus* gibi glikopeptitlere karşı doğal bir direnç barındıran *Enterococcus* cinsinin diğer türleri ve hatta *E. avium, E. durans, E. raffinosus* ve *E. cecorum* gibi insan enfeksiyonlarına katılımları daha nadir türlere ait çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte, vankomisine dirençli enterokokların (VRE) daha etkili sürveyans planları geliştirmek

için, hali hazırda var olan direnç modellerinin farkında olmak hayati önem taşımaktadır (Toc *et al.* 2022).

Bu çalışmanın amacı, COVID-19 hastalarının solunumsal örneklerinden izole edilen *E. faecalis* suşları arasında ilaca direncin oranını belirlemek ve PCR yöntemi ile vankomisin direnç suşlarda *vanA* ve *vanB* genlerini saptamaktır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 SARS-CoV-2

2.1.1 Tarihsel gelişim

Elektron mikroskobu altında koronavirüsler, yüzeylerini kaplayan sivri uçlu çıkıntılar nedeniyle taç görünümündedir. "Koronavirüs" terimi de buradan gelmektedir. Koronavirüsler, çapları 60 ile 140 nanometre arasında değişen zarf şeklinde, pozitif ribonükleik asit (RNA) virüsleridir (Ciotti *et al.* 2020). HKU1, NL63, 229E ve OC43 koronavirüslerinin insanlarda küçük solunum yolu hastalıklarına neden olduğu tespit edilmiştir. HKU1, diğer virüsler arasında en yaygın olanıdır. Son yıllarda, hayvanlarda bulunan beta koronavirüslerin insanlara bulaşması ve insanlarda ciddi hastalıkların gelişmesine neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bu türün neden olduğu ilk vaka 2002-2003 yıllarında Çin'in Guangdong eyaletinde meydana gelmiştir. O dönemde beta koronavirüs cinsine ait ve kökeni yarasalardan gelen yeni keşfedilen bir koronavirüs, palmiye misk kedilerinin ara konakçısı aracılığıyla yarasalardan insanlara bulaşmıştır. Şiddetliakut solunum sendromu koronavirüsü olarak bilinen virüs, çoğu Çin ve Hong Kong'da bulunan 8422 kişiyi etkileyerek 916 kişinin (%11) ölümüne neden olmuştur (Pokhrel and Chhetri 2021). Bundan yaklaşık on yıl sonra, 2012'de, benzer şekilde kökeni yarasalardan gelen ve tek hörgüçlü develeri ara konakçı olarak kullanan Orta Doğu Solunum Sendromu Koronavirüsü (MERS-COV) Suudi Arabistan'da ortaya çıkmıştır. Bu virüs de 2494 kişiyi etkileyerek 858 kişinin (%34) ölümden sorumlu olmuştur (Shi *et al.* 2019).

2.1.2 COVID-19'un kökeni ve yayılışı

Aralık 2019'da Çin'in Hubei eyaletinin Wuhan şehrinde bulunan yetişkinler, nedeni bilinmeyen ciddi bir pnömoni ile yerel hastanelere başvurmuştur. İlk vakaların çoğu, aynı zamanda canlı hayvan ticareti yapan Huanan toptan deniz ürünleri pazarına giden ve orada bulunan materyaller ile temas eden kişilerden oluşmaktaydı. Ülkede daha önce

yaşanan SARS salgını sonrası oluşturulan sürveyans sistemi devreye konmuş ve hastalardan solunum yolu örnekleri alınarak etiyolojik inceleme için referans laboratuvarlara gönderilmiştir. 31 Aralık 2019'da Çin, salgını Dünya Sağlık Örgütü'ne bildirerek 1 Ocak'ta Huanan deniz ürünleri pazarını kapatmıştır. 7 Ocak'ta virüs, yarasa koronavirüsü ile>%95 homolojiye ve SARS-CoV ile >%70 benzerliğe sahip bir koronavirüs olarak tanımlanmıştır (Zaim *et al.* 2020).

2.1.3 COVID-19'un patogenezi

Her yaştan insan enfeksiyona karşı savunmasızdır. Enfeksiyon, semptomatik hastalarda öksürme ve hapşırma sırasında üretilen büyük damlacıklar tarafından yayılmaktadır. Ancak enfeksiyon asemptomatik kişilerde de ortaya çıkabilmektedir (Becker 2020). Çalışmalar, burun boşluğunun boğazdan daha fazla viral yüke sahip olduğunu ortaya koymuştur, ancak semptomatik olan kişiler ile asemptomatik olanlar arasında viral yük miktarı açısından bir fark tespit edilmemiştir (Ciotti *et al.* 2019). Bulaşıcı damlacıklar 1-2 metre arasında hareket etme ve kendilerini yüzeylere yerleştirme potansiyeline sahiptir. Virüs uygun atmosfer koşullarında yüzeylerde günlerce canlı kalabilmesine rağmen, sodyum hipoklorit, hidrojen peroksit vb. dezenfektanlar tarafından bir dakikadan daha kısa sürede yok edebilir. Enfeksiyon iki şekilde yayılım göstermektedir. Bunlardan ilki damlacıkların direkt solunması; ikincisi ise, damlacıklarla kontamine olmuş yüzeylere ve ardından kişinin burnuna, ağzına veya gözlerine dokunmasıdır. Ayrıca virüsün dışkıda tespit edilmesi; su kaynaklarının kontaminasyonunu ve ardından aerosolizasyon veya feko-oral yolla bulaşmanın meydana gelmiş olabileceğini düşündürmektedir (Gallo Marin *et al.* 2021). Mevcut bilgilere göre, hamile annelerden doğmamış çocuklarına transplasental transfer henüz tanımlanmasada, doğum sonrası bulaşmanın neden olduğu dair kanıtlar bulunmaktadır. Kuluçka aşaması 2 ile 14 gün arasında sürmekte ve ortalama 5 gün yayılım göstermektedir. Çeşitli çalışmaların bulgularına göre, virüs solunum mukozasına nüfuz etmek için anjiyotensin reseptörü 2 (ACE2)'yi kullanmaktadır (Jeyanathan *et al.* 2020).

2.1.4 Klinik özellikler

Asemptomatik durumlar, akut solunum sıkıntısı sendromu ve çoklu organ yetmezliği gibi COVID-19 ile ilişkili birçok klinik belirti belirlenmiştir. Yaygın klinik belirtiler ateş, öksürük, boğaz ağrısı, baş ağrısı, yorgunluk, kas ağrısı ve nefes darlığıdır. Ancak ateş asıl semptomlardan biri olarak sayılmasa da konjonktivit hastalığın belirtileri arasında yer almaktadır. Bu nedenle diğer solunum yolu hastalıklarından ayırt edilememektedir. İlk haftanın sonunda, durum bazı kişilerde zatürreye, solunum yetmezliğine ve ölüme kadar gidebilmektedir. Bu eğilim, Interlökin (IL)-2 ve IL-7 gibi inflamatuar sitokin seviyelerinde önemli bir artışla bağlantılıdır (Tufan *et al.* 2020). Semptomların başlaması ile nefes darlığı gelişmesi arasında geçen ortalama süre 5 gün iken, hastaneye yatış ile akut solunum sistemi sendromu (ASSS) arasında geçen süre 8 gün olarak tespit edilmiştir. Yayınlanan çalışmalarda, enfeksiyondanetkilenen hastaların %25 ile %30'unun yoğun bakıma alınmak zorunda olduğu ve bu kişilerdeakut akciğer hasarı, akut solunum sıkıntısı sendromu, şok ve akut böbrek hasarı gibi komplikasyonlardan bazılarının görüldüğü bildirilmiştir. Genellikle hastalarda iyileşme ikinci veya üçüncü haftada meydana gelmiştir. Tam olarak iyileşen hastaların hastanede geçirdiği ortalama gün sayısı 10 gündür. Hastaneye kaldırılan yetişkin hastalar için ölüm oranı %4 ile %11 arasında değişmektedir. Genel vakalarda görülen ölüm oranının ise % 2-3 arasında olduğu tahmin edilmektedir (Chen *et al.* 2020). Hubei eyaleti dışındaki bölgelerden gelen hastaların, Wuhan'dan gelenlere göre daha az şiddetli bir hastalık vakasına sahip olduklarının yapılan araştırmalar ile belirlenmiştir. Buna bağlı olarak, Çin dışında yaşayan hastalarda hastalık şiddetinin ve vaka ölüm oranının daha düşük tespit edilmiştir. Bu durumun Wuhan'dan bildirilen vakalara yalnızca en şiddetli vakaların dahil edilmesinden veya Asya popülasyonunun (solunum mukozasında ACE2 reseptörlerinin daha yüksek ekspresyonu nedeniyle) virüse yatkınlığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Pum *et al.* 2021).

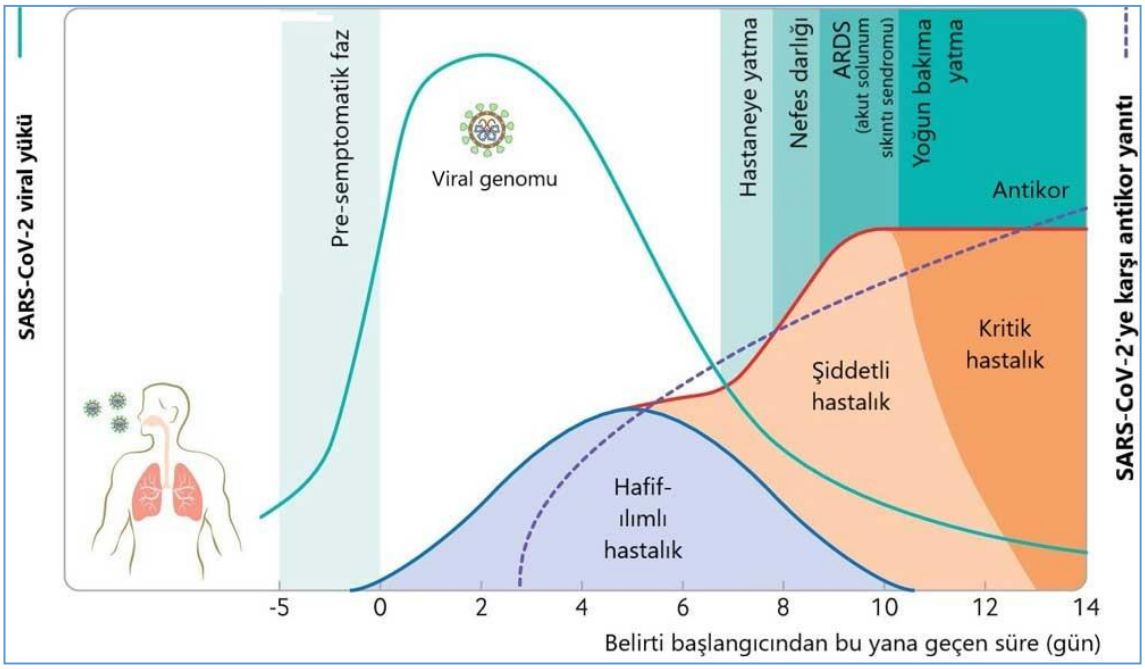
2.1.5 COVID-19 sırasında bağışıklık sisteminin rolü

COVID-19'un solunum sistemi üzerindeki etkileri tespit edilmiştir; bununla birlikte, COVID-19'un gastrointestinal sistem, merkezi sinir sistemi ve kardiyovasküler sistem

dahil olmak üzere diğer sistemler üzerinde etkisi olması da mümkündür. Bu durum; fekal-oral bulaşma, hava yoluyla bulaşma ve doğrudan insan teması dahil olmak üzere pulmoner ve sistemik immün yanıtlar yoluyla da vücuda girebilmesinden kaynaklanabilir. Doğuştan gelen bağışıklık bozuklukları, yaşlı yetişkinlerden ve diğer komorbid durumları olan kişilerden oluşan yüksek riskli popülasyon COVID-19'a karşı savunmasızdır. Araştırmalar, COVID-19 sırasında aşırı aktive olmuş bir bağışıklık sisteminin meydana geldiğini ve hastalığın sonucunun belirlenmesinde rol oynadığını göstermiştir. Sonuç olarak, COVID-19'un bulaştırma faktörüne bağlı olarak, bağışıklık sistemi tarafından vücuda bir saldırı başlatılmış gibi görünmektedir (Chen *et al.* 2020, Pum *et al.* 2021).

2.1.6 Sitokin fırtınası

Klinik veriler, SARS-CoV-2 enfeksiyonu sırasında, vakaların ölüm oranında birincil faktör olduğu düşünülen kontrolsüz pulmoner inflamasyona yol açan aşırı inflamatuar yanıtlar göstermiştir. Son zamnalarda yapılan çalışmalarda, hızlı viral replikasyon ve hücresel hasar, virüs kaynaklı ACE2'nin aşağı regülasyonu ve saçılması SARS-CoV-2'nin neden olduğu şiddetli inflamasyonun sebepleri olarak sayılmaktadır. SARS-CoV-2, enfeksiyon için aynı giriş reseptörü olan ACE2'yi kullandığından, aynı hücre grubunun virüs tarafından hedeflenmesi ve enfekte olması muhtemeldir (Coperchini *et al.* 2021, Guo *et al.* 2021). Hızlı viral replikasyonun başlangıç aşamalarının, çok sayıda epitelyal ve endotelyal hücrenin ölümüyle ve vasküler sızıntıyla sonuçlanması mümkün olabilmektedir. Bu durum da aşırı miktarda proinflamatuar sitokin ve kemokin oluşumuna neden olmaktadır. ACE2 aşağı regülasyonu ve dökülmesi, inflamasyonu daha da artırabilen ve vasküler geçirgenliğe neden olabilen renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) işlev bozukluğuna yol açabileceğinden, pulmoner ACE2 işlevi kaybının akut akciğer hasarı ile ilişkili olduğu öne sürülmüektedir. Bunun nedeni, ACE2 aşağı regülasyonunun ve saçılmasının RAS işlev bozukluğuna yol açması olarak açıklanabilir. Son araştırmalar, antikora bağlı enfeksiyon artması (ADE) durumunun arkasında potansiyel bir mekanizmanın varlığını göstermiştir. Aynı zamanda Şekil 2.1'de verildiği gibi ADE, birkaç viral enfeksiyon vakasında görülmüştür (Hui *et al.* 2021, Tamayo-Velasco *et al.* 2021).



Şekil 2.1 İlk maruziyetten sonra Covid-19 enfeksiyonunun belirtileri

2.1.7 Teşhis

Ateşi, boğaz ağrısı ve öksürüğü olan, Çin'e veya diğer kronik lokal bulaşma yerlerine seyahat öyküsü olan veya benzer şekilde seyahat etmiş veya COVID-19 enfeksiyonunu kanıtlamış hastalarla temas halinde olan bir kişi şüpheli bir vaka olarak kabul edilir. Ancak bazı hastalarda herhangi bir semptom görülmeyebilir ve hatta ateş bile olmayabilir. Moleküler testi pozitif çıkan şüpheli bir hasta, doğrulanmış bir vaka olarak kabul edilmektedir (Coperchini *et al.* 2021). Solunum numuneleri (balgam, endotrakeal aspiratlar, boğaz sürüntüleri ve nazofaringeal sürüntüler dahil) üzerinde moleküler testler ve ayrıca bronkoalveolar lavaj kesin tanı sağlamak için kullanılmaktadır. Aşırı durumlarda virüs, enfekte bir kişinin kanında ve dışkısında da bulunabilmektedir. Hindistan'da herhangi bir hastalıktan şüphelenildiğinde, söz konusu numune ülkedeki referans laboratuvarlardan birine veya Pune'deki Ulusal Viroloji Enstitüsü'ne gönderilmektedir. Hastalık yayılmaya devam ettikçe, giderek daha fazla ticari test erişilebilir hale gelecektir (Guo *et al.* 2021). Diğer laboratuvarlarda gerçekleştirilen araştırmalar tipik olarak çok spesifik değildir. Hastalardan alınan örneklerde çoğu zaman, beyaz hücre sayısı düşük veya normal olarak tespit edilmiştir. Aynı zamanda lenfopeninin mevcut olması mümkündür; 1000'den az bir lenfosit sayısı ciddi hastalık

belirtisi olarak kabul edilmektedir. Çoğu durumda, trombosit sayısı ya normaldir ya da çok düşük olmaktadır. Prokalsitonin seviyeleri neredeyse her zaman normal olmasına rağmen, C-reaktif protein (CRP) okumaları her zaman normalden daha yüksek çıkmaktadır. Yüksek bir prokalsitonin seviyesi, aynı zamanda mevcut olan bir bakteriyel enfeksiyonun göstergesi olabilir. Protrombin zamanı, kreatinin, D-dimer ve laktat dehidrojenazda (LDH) yükselme olabilmektedir. Bu belirteçlerin yüksek seviyeleri COVID-19 sırasında oluşabilecek ciddi komplikasyonlarla bağlantılı kabul edilmektedir (Tamayo-Velasco *et al.* 2021).

Göğüs röntgeni (CXR) genellikle iki taraflı sızıntıları ortaya çıkartmaktadır. Ancak hastalığın erken evrelerinde bu normal olabilir. Bilgisayarlı tomografi (BT) daha yüksek bir duyarlılığa ve daha yüksek bir özgüllüğe sahiptir. Sızıntılar, buzlu cam opasiteleri ve alt segmental konsolidasyon, BT görüntülemede tipik olarak görülen üç önemli bulgudur. Asemptomatik bireyler ve klinik olarak alt solunum yolu tutulumu belirtisi olmayan kişilerde de bu parametrede anormallik olduğu kabul edilmektedir. Aslında, daha önce negatif moleküler tanı konan şüpheli durumlarda COVID-19'u tanımlamak için anormal BT taramaları kullanılmıştır; bu bireylerin birçoğunun tekrarlanan moleküler testlerinde pozitif sonuçlar elde edilmiştir (Hui *et al.* 2021).

2.2 Enterokoklar

Enterokoklar geleneksel olarak D grubu streptokoklar olarak kategorize edilirler çünkü bir gliserol teikoik asit olan D grubu hücre duvarı antijenini diğer streptokoklarla paylaşırlar. Ancak bu sınıflandırma daha sonra yenilenmiştir (Yim *et al.* 2017). 1984 yılında *Enterococcus* cinsi yeniden sınıflandırılmıştır. Şu anda bu cinse ait 40 tür bulunmaktadır; bununla birlikte, bu türlerin yalnızca küçük bir yüzdesi önemli insan patojenlerini oluşturmaktadır (Jahansepas *et al.* 2018). Hem *E. faecalis* hem de *E. faecium*, insan bağırsak yolunun yaygın kolonize edicileridir. Bu türlerin her ikisinin de vankomisine doğal olarak dirençlidir. *E. faecalis* ve *E. faecium* en sık izole edilen ve klinik olarak önemli türlerdir (Monticelli *et al.* 2018).

2.2.1 Enterokokların tanısal morfolojisi

Enterokoklar, sıvı ortamda oval çiftler, kısa zincirler veya tek tek görülebilen Gram pozitif koklardır. Agar büyümesinde kültürlendiğinde ve Gram boyama yapıldığında, enterokoklar kokobasiller şeklini alabilir. Enterokoklar hareketli değildir, spor oluşturmazlar, kapsülleri yoktur, fakültatif olarak anaerobiktirler veya katalazdan yoksundurlar ya da katalaz aktivitesi zayıftır. Enterokoklar, çok küçük (0,5 ile 1 mm) iğne ucu büyüklüğünde ve macenta renginde koloniler oluştururlar ve MacConkey agarda kolayca büyürler (Gorrie *et al.* 2019).

Enterokoklar, kanlı agar üzerinde büyütüldüklerinde, pürüzsüz, küresel ve kremsi beyaz renkli koloniler oluşturur. Bu koloniler alfa, beta veya gama hemoliz ile çevrili olabilir. Çoğu bakteriyi inhibe eden veya öldüren safra tuzlarının %40'ı ve sodyum azid varlığında enterokoklar tarafından tolere edilir ve agar bazlı besiyerinde seçici ajanlar olarak kullanılır. Enterokoklar, %6,5 sodyum klorür içeren yüksek konsantrasyonlu bir tuzlu suda gelişir (Coombs *et al.* 2014).

Hem *E. faecalis* hem de *E. faecium*, 4,6 ile 9,9 (ideal 7,5) arasında değişen geniş bir pH aralığında gelişebilir. Ek olarak, yüzde 0,1 metilen mavisi süt ile 10 ila 45 santigrat derece arasında değişen sıcaklıklarda gelişebilirler ve 30 dakika boyunca 60 santigrat derecede ısınmaya dayanabilirler (Bender *et al.* 2016). Genel olarak enterokoklar, Kreb döngüsüne veya solunum zincirine sahip olmadıkları için katı fermenterler olarak düşünülür. Bununla birlikte, *E. faecalis*, d, b ve o tipi sitokromlar oluşturmak için eksojen hemin kullanabilir. Kan agarında, farklı Enterokok türleri alfa, gama veya beta hemoliz gösterebilir. Hem hayvan hem de insan enfeksiyonlarında hemolizin üreten enterokok suşlarının daha tehlikeli olduğu belirtilmiştir (Ahmed and Baptiste 2018).

Enterokoklar gram pozitif koklardır ve normal dizilişleri çiftler veya kısa zincirler halindedir. Bu izolatlar, *S. pneumoniae* ile aynı olduğundan, mikroskobik görünümlerine dayalı olarak *S. pneumoniae* 'den kolayca ayırt edilemezler. Koklar hem aerobik hem de anaerobik olarak oldukça geniş bir sıcaklık aralığında (10 °C'den 45 °C'ye kadar), bir pH aralığında ve yüksek miktarda sodyum klorür (NaCl) ve safra

varlığında gelişir (Olearo *et al.* 2021). Bu nedenle, enterokok gelişimini engelleyebilecek az da olsa klinik durumlar vardır. Glikozun fermantasyonu, birincil son ürün olarak L-laktik asit ile sonuçlandığında enterekoklar tespit edilebilir (enterokoklar, laktik asit bakterileri olarak sınıflandırıldığı bilinen en yaygın bakteri türüdür). Bu temel özelliklerin kullanılmasıyla enterokokları diğer gram pozitif, katalaz negatif kokların büyük çoğunluğundan ayırmak mümkündür. Zenginleştirilmiş koyun kanlı agar üzerindeki koloniler 24 saatlik inkübasyondan sonra çok büyüktür ve hemolitik-hemolitik olmayan veya çok nadiren -hemolitik görünebilir (Torres *et al.* 2018).

2.2.2 Patogenez ve bağışıklık

Enterokokların stafilokok veya streptokoklarda görülen çok çeşitli virülans faktörlerine sahip olmamasına rağmen, antibiyotiğe dirençli suşların neden olduğu hayatı tehdit eden hastalıklar, hastanede yatan bireylerde önemli bir sorun haline gelmiştir (Bender *et al.* 2018).

Bir yanda dokulara tutunma ve biyofilm oluşturma kapasitesi, diğer yanda antibiyotiklere direnç, virülansa katkıda bulunan iki genel özelliktir (Coombs *et al.* 2014).

Yüzey proteinleri, membran glikolipidleri, jelatinaz ve pili gibi çeşitli bileşenler, yapışma ve biyofilm gelişiminin aracıları olarak tanımlanmıştır (Kumar Bajaj *et al.* 2015). Ek olarak, enterokoklar ya çeşitli antibiyotiklere (oksasilin ve sefalosporinler gibi) doğal olarak dayanmalarına izin veren genler içerirler ya da ilaçlara karşı (örneğin aminoglikozitler, vankomisine) direnç göstermelerine izin veren genlere sahiptirler. Bağışıklığı baskılanmış hastalar enterokok enfeksiyonlarına daha duyarlıdır çünkü enterokokların kandan ve dokulardan uzaklaştırılmasına hızlı nötrofil girişi ve bakterilerin opsonizasyonu aracılık etmektedir (Ayobami *et al.* 2020).

2.2.3 Klinik hastalıklar

Enterokoklar, özellikle hastanede yatan bireylerde görülen önemli patojenlerdir; aslında enterokoklar, hastanede edinilen enfeksiyonların (nazokomiyal enfeksiyon) en yaygın nedenlerinden biridir. Üriner sistem, enterokok enfeksiyonları için en yaygın yerdir ve üriner kateterizasyon veya enstrümantasyon genellikle enterokok enfeksiyonlarının yayılması ile ilişkilidir (Rawson *et al.* 2020). Asemptomatik sistit, basit sistit veya piyelonefritle sistit, bu hastalıkların olası belirtileridir. Periton enfeksiyonları genellikle polimikrobiktir, yani hem aerobik hem de anaerobik bakterilerle ilişkilidirler. Ayrıca travma veya bağırsak astarını zayıflatan bir hastalıktan kaynaklanabilen bağırsak mikroplarının sızmasıyla da bağlantılıdırlar (Rawson *et al.* 2020). Kanda enterokok varlığının iki olası açıklaması vardır: ya idrar yolu, periton veya bir yaradaki lokalize bir enfeksiyondan yayılmıştır ya da endokardiyumda (endokardit) bulunan birincil enfeksiyondur. Birçok enterokok şu anda kullanılan antibiyotiklerin çoğuna dirençli olduğu için endokardit özellikle tehlikeli bir hastalık olarak karşımıza çıkmaktadır (Giacobbe *et al.* 2021).

2.2.4 Laboratuvar tanısı

Kanlı agar ve çikolata agar gibi seçici olmayan besiyerlerinde enterokoklar oldukça kolay büyür. Enterokokların Gram boyalı örnekleri *S. pneumoniae* örneklerine benzer görünse de iki organizma nispeten basit biyokimyasal tepkilere dayanarak birbirinden kolaylıkla ayırt edilebilir (Raza *et al.* 2018). Örneğin enterokoklar, antibiyotik optokine dirençlidir, ancak *S. pneumoniae* buna duyarlıdır; ayrıca safraya maruz kaldıklarında çözünmezler, oysa *S. pneumoniae* çözülür ve L-pirolidonil arilamidaz (PYR) adı verilen bir enzim üretirler (PYR pozitif olan *S. pyogenes*'dir). PYR testi, sıklıkla uygulanan "5 dakikalık nokta" testinin bir örneğidir. Enterokoklar, katalaz enzimi yoksa pozitif bir PYR genine sahiplerse ve kendilerini çiftler ve kısa zincirler halinde örgütlerlerse rahatça tanınabilirler. Fenotipik özellikler, örneğin pigment üretimi ve hareketlilik gibi özellikleri içerir (Miller *et al.* 2020).

2.2.5 Tedavi

Antibiyotiklerin çoğu klinik olarak anlamlı dozlarda bakterisit olmadığından enterokok enfeksiyonları için antimikrobiyal tedavi uygulamak zor bir süreç olabilir (Mahon *et al.* 2018). Ciddi enfeksiyonlara yönelik tedavi, geleneksel olarak bir aminoglikozid ile hücre duvarı-aktif bir antibiyotiğin (ampisilin, vankomisin gibi) sinerjistik kombinasyonundan oluşur; ancak bazı hücre duvarı antibiyotiklerinin enterokoklara (nafsilin, oksasilin, sefalosporinler gibi) karşı hiçbir etkinliği yoktur. Ampisilin ve penisilin genellikle *E. faecium*'a ve *E. faecalis'*te vankomisin direncine karşı etkisizdir. Bunlara ek olarak, enterokokların %25'ten fazlası aminoglikozitlere direnç geliştirmiştir. Aminoglikositlere ve vankomisine direnç, özellikle plazmitlerin aracılık etmesi ve diğer bakterilere geçebilmesi nedeniyle endişe vericidir (Mirzaei *et al.* 2015).

2.3 SARS-CoV-2 Bulunan Hastalarda Bakteriyel Koenfeksiyon

Viral enfeksiyonların tipik bir sonucu, morbidite ve mortalitedeki artışın yanı sıra sağlık hizmetlerinde mevcut kaynaklar üzerinde daha fazla baskı ile ilişkili bakteriyel bir koenfeksiyonun varlığından söz edilebilir. Herkesin dikkati COVID-19'a odaklandığında, ciddi bakteriyel enfeksiyonların gözden kaçması mümkündür. Sonuç olarak, COVID-19'lu hastalarda bir koenfeksiyon varlığının tanınması yüksek öneme sahiptir. Antimikrobiyal tedavini etkin yönetimi, bize antibiyotik kullanımının doğru ve kontrollü uygulanması konusunda fayda sağlamaktadır (Papagiannitsis *et al.* 2017, Laverde Gomez *et al.* 2011). COVID-19 ile bakteriyel koenfeksiyonun insidansı hakkında çeşitli bulgular bulunmaktadır. Bu araştırmaların çoğu, şiddetli akut solunum sendromu koronavirüs 2 (SARS-CoV-2) ile influenza ve diğer viral enfeksiyonlara göre daha az bakteriyel birlikte enfeksiyon yükü olduğunu varsaymaktadır (Manson *et al.* 2010). Öte yandan, 2003'te şiddetli akut solunum sendromu (SARS) salgını ve 2012'de Orta Doğu Solunum Sendromu salgını (MERS-CoV) ile ilgili çalışmalara dayanan bazı görüşlerde COVID-19'daki bakteriyel koenfeksiyonların hafife alındığını belirtmektedir. SARS salgınının 2003 yılında meydana gelmesi ve MERS salgınının ortaya çıkması, pandemi sırasında ayrımcı olmayan antibiyotik kullanımı veya sağlık sistemlerinde aşırı klinik muayenelerin sınırlandırılması görüşlerini desteklemektedir. Bakteriler, viryon

stabilitesini artırma, ökaryotik hücrelerin viral enfeksiyonunu uyarma ve koenfeksiyon oranlarını artırma potansiyeline sahiptir ve bunların tümü viral yüktevbir artışa neden olur. Aynı şekilde, virüslerin bakterilere bağlanması, bakterilerin ökaryotik hücrelere yapışma yeteneği de dahil olmak üzere bakteri biyolojisi üzerinde bir etkiye sahip olabilir (Dos Santos Oliveira *et al.* 2021). COVID-19'lu hastalar, invaziv mekanik ventilatör yardımı da dahil olmak üzere yoğun bakıma ihtiyaç duyduğunda, bakteriyel koenfeksiyonlara hükmetmek son derece önemlidir. Örneğin, bronşiolit için invaziv ventilasyona ihtiyaç duyan çocukların üçte birinden fazlasında bakteriyel koenfeksiyonlar bulunmuştur. Bu enfeksiyonlar, pediatrik kritik bakım ünitelerinde daha uzun süre kalma ve mekanik ventilasyonun daha sık kullanılmasıyla bağlantılıdır (Molechan *et al.* 2019). Bunlara ilaveten, uzun süreli hastalık veya entübasyon ile yoğun bakım ünitesine (YBÜ) kabul edilen hastalarda, büyük olasılıkla hastane kaynaklı enfeksiyonu yansıtan çoklu ilaca dirençli gram negatif bakterilerin saptanma sıklığı daha yüksektir. Bu sebeple, bu hastaları değerlendirirken bakteriyel koenfeksiyon olasılığını hesaba katmak (ampirik temelde muayene etmek ve tedavi etmek) önemlidir (Cusumano *et al.* 2022). Ne yazık ki COVID-19 hastalığı olan bireylerin tedavisi konusunda fikir birliği yoktur. Tedavi sadece bir ortamdan diğerine değil, aynı zamanda bir ülkeden diğerine de değişir. Bu nedenle tıp uzmanları, özellikle erken evrede veya entübe olmayan hastalarda profilaktik antibiyotiklerin rutin kullanımına karşı tavsiyelerde bulunmaktadır. Diğer taraftan, özellikle yoğun bakım ünitesine 48 saatten fazla yatırılan kritik hastalarda, herhangi bir ikincil enfeksiyon belirtisine karşı dikkatli olunması gerekmektedir (Yam 2020).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Çalışma Tasarımı

Bu çalışma 10 Mart-1 Eylül 2022 tarihleri arasında Kerkük şehrinde gerçekleştirilmiştir.

3.1.1 Hastalar

Çalışmaya COVID-19 virüsü bulaşmış ve Kerkük'teki Al-Shifaa Epidemiyoloji Hastanesi'nde tedavi gören. 104 COVID-19 hastası (40 hafif, 32 orta ve 32 ağır enfeksiyon) ve 34 sağlıklı kontrol grubu dahil edildi.

3.1.2 Kontrol grubu

Ayrıca kontrol grubu olarak 30 sağlıklı birey çalışmaya dahil edildi. Bu bireylerin hasta bireyler ile aynı yaş ve her iki cinsiyette olmasına dikkat edildi.

3.1.3 Dışlama kriterleri

Bu çalışmaya, akciğer kanseri, lober pnömoni, tüberküloz ve akut pulmoner ödem hastalıkları mevcut olan kişiler dahil edilmedi.

3.1.4 Etik onay

Etik onay belgesi çalışmaya başlamadan önce Kerkük Sağlık Müdürlüğü ve Al-Shifaa Epidemiyoloji Hastanesi müdürlüğünden alınmıştır. Daha sonra her hasta çalışma hakkında detaylı bir şekilde bilgilendirilmiş EK 1'de belirtilen formu doldurarak çalışmaya dahil edildi.

3.1.5 COVID-19 hastaları

COVID-19 enfeksiyonu teşhisi, WHO kriterlerine göre yapıldı. Alınan nazofaringeal örneklerin doğrulaması ise üretici firma talimatlarına göre RT-PCR ile gerçekleştirildi. Ayrıca alınan örneklerin bir kısmı, Kerkük'te Halk Sağlığı Laboratuvarı'nda görevli laboratuvar personeller tarafından PCR cihazında bakılarak doğrulaması da Sağlık Bakanlığı'nın takip ettiği protokollerle ile yapıldı.

3.1.6 Klinik sınıflandırma

Bu çalışmada belirlenen COVID-19 enfeksiyonunun asemptomatik olmaktan şiddetli akut solunum sıkıntısına kadar olan gruplandırması Şekil 3.1'de verildiği gibi, Çin Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi tarafından yayınlanan sınıflandırma esas alınarak yapıldı.

Semptom	Tüm olgular	Hafif Olgu	Kritik Olgu
Ateş	%43.8-98.6	%43-98	%48-100
Öksürük	%59-79	%59-8-82	%58.3-85
Balgam	%23-33.7	%21-33.4	%22.2-38
Boğaz Ağrısı	%7-17.4	%14-28.4	%13.3-33.3
Nefes Darlığı	%7-55	%15.1-37	%37.6-92
Hemoptizi	%0.9-5	%0.6-4	%0.3-8
Baş ağrısı	%6.5-13.6	%5.9-13.4	%0-15
Halsizlik	%7-69.6	%21-65.7	%28-80.6
İştahsızlık	%39.9	%30.4	%66.7
Diyare	%3.8-10.1	%3.5-7.8	%0-16.7
Bulantı-Kusma	%5-4-10.1	%3-7.8	%6-16.7
Döküntü	%11.5	%10.8	%15
Miyalji / Artralji	%14.9-44	%14.5-39	%15-54
Konjunktival konjesyon	%0.8	%0.5	%2.3

Şekil 3.1 COVID-19'un klinik sunumu

3.2 Malzemeler

3.2.1 Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları

Çalışmada kullanılan laboratuvar ekipmanları Çizelge 3.1'de listelenmiştir.

Çizelge 3.1 Aparat ve ekipmanlar

Makine-teçhizat	**Şirket ve menşei**
Otoklav	Marubeni (Japonya)
Santrifüj	Janetzki (Almanya
Biyogüvenlik kabini	Marubeni (Japonya)
Bunsen brülörü	Shama bilim tüccarları (Hindistan)
Damıtıcı	GFL (Almanya)
Eppendorf tüpleri	Grenier (Almanya)
Inkübatör	Yamato (Japonya)
Işık mikroskobu	Olimpos (Japonya)
PH ölçer	Martini (ABD)
Fırın	Memert (Almanya)
Buzdolabı	Concord (Lübnan)
Hassas terazi	Sartorius (Almanya)
Standart tel döngü (1µ)	Himedia (Hindistan)
Vorteks	Camgöbeği (Belçika)
Su banyosu	Marubeni (Japonya)
Mikrolitre pipetler	Salmed (Almanya)
Milipor filtre ünitesi	MiliporeGrop (ABD)
Mikrotitre plakası	AFMA (Ürdün)
Tek kullanımlık petri kapları	Güneş (Çin)
Test tüpü	Süperstar (Hindistan)
Sterilize pamuklu çubuklar	Afco (Ürdün)
Zybio-nuciec asit izolasyon sistemi	EXM3000, (Çin)
Gerçek zamanlı PCR termal döngü	LongGene Q2000B, (Çin)

3.2.2 Kimyasal malzemeler

Bu çalışma sırasında Çizelge 3.2'de gösterilen kimyasallar kullanıldı.

Çizelge 3.2 Kimyasal maddeler

Malzemeler	**Şirket ve Menşei**
Alfa-naftol	BDH (İngiltere)
Agar	BDH (İngiltere)
Sakaroz	BDH (İngiltere)
Etil alkol	BDH (İngiltere)
KH_2PO_4	BDH (İngiltere)
Na_2HPO_4	BDH (İngiltere)
NaCl	BDH (İngiltere)
Gliserol($C_3H_3O_3$)	BDH (İngiltere
Tween20	BDH (İngiltere)
KOH	GCC (İngiltere)
Jelatin	GCC (İngiltere)
Yağsız süt tozu	Oksoid (İngiltere)
Kristal tozu	Fluka (İsviçre)
NaN_3	Ajax (Avustralya)
H_2O_2	Fluka (İsviçre)
Glikoz	Merck (Almanya)
Asetik asit	BDH (İngiltere)
Metil alkol	BDH (İngiltere)
Pepton	Fluka (İsviçre)
Tetra-Metil-P-Fenilen Diamin DihidroKlorür	Himedia (Hindistan)
NaOH	BDH (İngiltere)
Macfarland çözümü	Biomerieux (Fransa)

3.2.3 Kitler

Mevcut çalışmada, EK5'te gösterildiği gibi API 20-strep (Bio-merieux, Fransa) kullanılan kültür ortamının alt kültüründen sonra ve *E. faecalis*'in tanımlanması için kullanıldı.

3.2.4 Reaktiflerin ve solüsyonun hazırlanması

3.2.4.1 Katalaz reaktifi

Reaktif, %3'lük konsantrasyonda 5 mL hidrojen peroksitin (H_2O_2) ile %6'lık konsantrasyonda 5mililitre damıtılmış suyun birleştirilmesiyle yapıldı. Karışım daha sonra kullanılıncaya 4 ^oC sıcaklıkta saklandı (Tille 2015).

3.2.4.2 Oksidaz reaktifi

Reaktif %1'lik konsantrasyonda olacak şekilde, 0,05 mg tetra metil-p-fenilen diamin dihidroklorürün 5 mL damıtılmış su içinde çözülmesi ve opak bir şişe içinde saklanmasıyla oluşturuldu. Bu işlem, reaktif istenen konsantrasyona ulaşana kadar tekrarlandı (Mahon *et al.* 2018).

3.2.4.3 Voges-proskauer reaktifi

Bu reaktif iki aşamada hazırlandı.

Alfa-naftol reaktifi, 5 gr naftolün 100 mL %100'lük etil alkol içinde çözülmesi ve toplam hacminin 100 mL'ye getirilmesiyle hazırlandı (Procop *et al.* 2020).

Potasyum hidroksit reaktifi ise 40 gr potasyum hidroksitin 100 mL damıtılmış suda çözülmesiyle elde edildi.

Elde edilen çözeltilerin her ikisi de 4 °C'de saklandı. Bu reaktifler şekerlerin kısmi çözünmesinde oluşan asetilmetilkarbinol oluşumunu araştırmak için kullanıldı (Procop *et al.* 2020).

3.2.4.4 Fosfat tamponlu serum

0,144 gr KH_2PO_4, 0,7995 gr Na_2HPO_4 ve 9 gr NaCl; 800 mL damıtılmış suda çözünerek hazırlandı. Daha sonra hazırlanan çözeltinin pH'sının 7,4'e ve hacminin bir litre olması sağlandı. Son olarak, hazırlanan çözelti bir otoklav kullanarak sterilize edilip ve kullanılana kadar 4 °C sıcaklıkta saklandı (Procop *et al.* 2020).

3.2.4.5 Kristal viyoleboya çözeltisi %0,1

0,10 gr kristal viyole 90 mL distile suda çözüldükten ve ilave distile su ile toplam hacim 100 mL'ye getirildikten sonra, karışım 0,22 μm çapında delikli bir membran filtreden süzüldü. Daha sonra sterilize edilerek, steril bir şişede kullanılıncaya kadar 4°C'de saklandı (Procop *et al.* 2020).

3.2.4.6 Metilen mavisi çözeltisi

Bu çözelti, bir metilen mavisi süt suyu ortamı hazırlamak için kullanıldı. 1 gr metilen mavisi 10 mL distile suda eritilip, 0,22 μm çapında delikli ince filtre kullanılarak sterilize edildi. Kullanılıncaya kadar EK 4'teki gibi 4 °C sıcaklıkta steril bir flakonda saklandı (Tille 2015).

3.2.5 Boyalar

Çalışmada kullanılan boyalar Çizelge 3.3'de listelenmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan lekeler

Boya	**Şirket ve Menşei**
Gram boyama kiti	
Kristal Menekşe - İyot	APCO (Ürdün)
Renk giderici safran	
Çini mürekkebi	BDH (İngiltere)
Metilen mavisi	APCO (Ürdün)
Kongo kırmızısı boya	BDH (İngiltere)

Gram Boyama, Gram pozitif ve gram negatif bakterileri ayırt etmek için kullanıldı. İşlem EK 2'de gösterilmiştir. Modifiye (%1) Kongo Kırmızısı Boya, biyofilm oluşumunu göstermek için kullanıldı. Metilen mavisi ise EK 7'de gösterildiği gibi izolatların metilen mavisi içeren ortamda üreme yeteneğini test etmek için kullanıldı.

3.2.6 Antibiyotik diskler

Çalışmada, antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılan tüm antibiyotikler Çizelge 3.4'te verilmiştir. Örnek gösterim EK 6'da verilmiştir.

Çizelge 3.4 Mevcut çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri

Antibiyotikler	**Sembol**	**Potansiyel µg /disk**	**İnhibisyon bölgesinin çapı (mm)**		
			Dayanıklı	**Orta düzey**	**Duyarlı**
Ampisilin (Biyoanaliz)	AMP	10	≤13	14-16	≥17
Karbenisilin (Biyoanaliz)	ARABA	100	≤14	15-16	≥17
Sefalotin (Biyoanaliz)	KF	30	≤14	15-17	≥18
Streptomisin (Himedia)	S	10	≤12	13-14	≥15
İmipenem (Biyoanaliz)	IMI	10	≤19	20-22	≥23
Vankomisin (Liofilchem)	VA	30	≤14	15-16	≥17
Rifampsin (Biyoanaliz)	RA	5	≤11	12-18	≥19
klindamisin (Biyoanaliz)	DA	2	≤14	15-16	≥17
Nalidiksik asit (Bioanaliz)	NA	30	≤13	14-18	≥19
Co_Trimoxazole (Biyoanaliz)	TS	25	≤14	15-20	≥21
Kloramfenikol (Biyoanaliz)	C	30	<12	13-17	>18
Sefotaksim (Biyoanaliz)	CTX	30	≤14	15-18	≥19
Gentamisin (Himedia)	GM	10	≤12	13-14	≥15
Nitrofurantoin (Biyoanaliz)	IN	300	≤14	15-16	≥17
Siprofloksasin (Biyoanaliz)	CIP	5	≤15	16-20	≥21
Amikasin (Himedia)	AK	30	≤14	15-16	≥17

3.2.7 Ortamlar

Çalışmada kullanılan ortamların listesi Çizelge 3.5'da listelenmiştir.

Çizelge 3.5 Kullanılan besiyerleri

Kültür Ortamı	**Şirket (Ülke)**
Kanlı agar	Himedia (Hindistan)
Beyin-Kalp infüzyon suyu	Cndalab (İspanya)
Beyin-Kalp infüzyon agar	Oksoid (İngiltere)
Kligler Demir agarı	Himedia (Hindistan)
MacConky'nin agarı No.2	Mast Group Ltd. (İngiltere)
Müller-Hinton agarı	Oksoid (İngiltere)
Besin agar ve et suyu	Biolif (İtalya)
Mannitol tuzlu agar	Himedia (Hindistan)
Kromojenik agar (UTIC)	Cndalab (İspanya)

Tüm bu besiyerleri, üretici firmanın talimatlarına uygun olarak hazırlandı. Daha sonra 121 ℃'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edildi. Ortamlar steril petri kaplarına veya tüplerine dökülerek kullanılıncaya kadar 4 ℃'de saklandı (Tille 2015).

3.3 Yöntemler

3.3.1 Swab kültürü için numune alma

Çalışamada analiz etmek için alınan nazofaringeal sürüntü (solunum numunesi) örnekleri eğitimli doktorlar tarafından, toplamda 104 hastadan alındı (Procop *et al.* 2020).

3.3.2 Kültür

Tüm izolatlar aerobik olarak 35 ℃'de 24 saat inkübe edildi ve daha sonra kesin mikroskobik inceleme, kültür özellikleri ve biyokimyasal testler için şüpheli koloniler seçildi. Şüpheli alt kültürler, doğrudan çikolata agar, %5 koyun kanlı agar, MacConkey agar üzerinde kültürlenmiş swaplardır. İşlem EK 9 ve EK 10'da gösterilmiştir (Tille 2015).

3.3.3 Mikroskobik inceleme (gram boyama filmi)

İzole edilen koloniden smear hazırlandı ve temiz lamlar üzerinde sabitlendi, ardından smear Gram boyama ile boyandı. Gram boyama reaksiyonu ve bakteri hücrelerinin dizilimi, ışık mikroskobu altında, 100X gücünde yağlı daldırma objektif lensi kullanılarak incelendi. Daha sonra izole edilen kolonilerin morfolojik özellikleri, 10X lens yardımıyla dikkatlice incelendi (Procop *et al.* 2020).

3.3.4 Kültürel teşhis

Besiyerinde büyüyen bakterileri teşhis etmek için; kolonilerin rengi, şekli, boyutu, kenarı ve yüksekliği gibi morfolojik özellikler kullanıldı (Procop *et al.* 2020).

Tek saf kültürler elde etmek için koloniler EK 3'te gösterildiği gibi birçok kez yeniden büyütülmüştür. Büyüyen kolonilerin yetiştirme özellikleri aşağıdaki kültür ortamlarında belirlendi. Katı kan baz besiyerinde hemolizin enziminin bakteriyel sentezi test edildi veoluşan kolonilerin morfolojik özellikleri ve renkleri belirlendi (Procop *et al.* 2020).

Katı MacConkey ortamı kolonilerin morfolojik özelliklerini incelemek ve fermente edilmiş laktoz kolonilerini diğerlerinden ayırmak için kullanıldı. Fermente edilmiş laktoz kolonileri besiyerinin yüzeyinde kırmızı veya pembe renklerde, fermente edilmemiş organizma kolonilerinin ise şeffaf renkte görüntülendi (Procop *et al.* 2020).

Azid kanlı agar katı kan azit baz bileşimi nedeniyle enterokokal bakterilerin büyümesi için seçici olarak kabul edilir. Sodyum azid içeren bu besiyerinde koloniler grimsi bir renk tonunda görülmüştür (Tille 2015).

Mannitol tuzlu agar enterokokların mannitol şekerini fermente etme kapasitesini test etmek için kullanıldı ve deney ilerledikçe ortamın rengi EK8'de görüldüğü gibi pembeden sarıya doğru dönmüştür (Tille 2015).

Katı krom besiyeri üzerinde büyüyen koloniler kendilerine özel bir renk oluşturmaktadır. Oluşan renklere göre üreyen bakterilerin türleri veya cinsleri teşhis edilebilmektedir. Buna göre renkler açık mavi, pembe, koyu mavi ve krem beyazı olarak değişmektedir (Tille 2015). Bu besiyerine yapılan pasajlamalar sonrası oluşan bakteri kolonileri ve bunların renkleri Çizelge 3.6'da verilmiştir.

Çizelge 3.6 Bakteri reaksiyonları

Karakteristik Reaksiyon	Mikroorganizmalar
Açık mavi koloni	*E. faecalis*
Pembe koloni	*E. coli*
Koyu mavi koloni	*K. pnömoni*
Beyaz krem kolonisi	*S. aureus*

3.3.5 Mikroskobik inceleme

Gram boyama reaksiyonu, lamın halkalı alanına bir damla damıtılmış su damlatılarak gerçekleştirildi. Daha sonra az miktarda bakteri suya karıştırılarak yayıldı. Ardından lamel üç kez brülör alevlerinden hızla geçirilerek ısıyla sabitlendi. Daha sonra smear gram boyama ile boyandı ve smear yağlı daldırma altında incelendi (Tille 2015).

3.3.6 Biyokimyasal testler

Katalaz testine steril tahta çubuk kullanılarak temiz bir cam lam üzerine yirmi dört saatlik bir bakteri kolonisi yerleştirildi ve üzerine bir damla %3 H_2O_2 solüsyonu eklendi. Oksijen kabarcıklarının hemen serbest kalması, sonucun pozitif olduğunun göstergesi olarak kabul edildi (Tille 2015).

Oksidaz testinde oksidaz reaktifi (%1 dimetil-p-fenilen-diamin-dihidroklorür) ile doyurulmuş filtre kağıdı bir petri kabına yerleştirildi; test edilen organizmadan bir koloni, filtre kağıdına aktarıldı ve tek kullanımlık bir tahta çubukla reaktifin üzerine yayıldı. Daha sonra 10 saniyede oluşan renk gelişimi reaksiyonun pozitif göstergesi olarak kabul edildi (Mahon *et al.* 2018).

Diğer test olan Voges-Proskauer Testinde pepton broth besiyeri test edilen bakteri ile aşılandı. 48 saat 37,5 °C'de inkübe edildikten sonra sırasıyla 3mL %5'lik α-naftol ve 1 mL %40 KOH et suyu kültürüne ilave edildi. 30 dakika sonra incelendi, pembe-kırmızı renk oluşumu pozitif sonucun göstergesi olarak kabul edildi (Procop *et al.* 2020).

Kliglers Demir Agar Testinde bakteriler, aşılama iğnesi kullanılarak kligler besiyerine aktarıldı ve besiyerinin yüzeyine yayıldı. Daha sonra 24 saat boyunca 35 °C'de inkübe edildi. Biyokimyasal test sonuçları EK 7'de verilmiştir (Procop *et al.* 2020).

3.3.7 API 20 strep şeridi

API 20 Strep şeridi, bir mikroorganizmanın enzimatik aktivitesini veya şekerlerin fermantasyonunu göstermek amacıyla her biri suyu alınmış substratlar içeren 20 mikrotüpten oluşur. Enzimatik substratları yeniden oluşturmak için, enzimatik testler, saf bir kültürden elde edilen yoğun bir organizma süspansiyonu ile aşılanır. Bu süspansiyon daha sonra enzimatik testleri yapmak için kullanılır. İnkübasyon işlemi sırasında, metabolik reaksiyonlar, doğal olarak meydana gelebilecek veya kimyasalların eklenmesiyle ortaya çıkabilecek renk değişimlerine neden olabilir. Fermentasyon deneylerinde şeker substratlarını yeniden sulandıran geliştirilmiş bir ortam kullanılır ve bu ortam bakterilerle enfekte edilir. Karbonhidratların fermente edilip edilmediğini belirlemek için pH göstergesinde olaşacak bir değişiklik olumlu sonuç olarak kabul edilebilir (Procop *et al.* 2020). Elde edilen sonuçlar okuma tablosuna tanımlanıp Analitik Profil İndeksine göre belirlendi.

3.3.8 Antimikrobiyal ajanlara bakteriyel duyarlılık testi

Bu çalışmada antibiyotik duyarlılığını belirlemek için bir disk difüzyon testi kullanılarak Kirby-Bauer metodolojisinde belirtilen yönteme göre uygulama yapıldı. Bir agar plakasından saf koloniler seçildikten sona et suyunda süspanse edilen kolonilerden saf inokulum elde edildi. Bu durum, gözlemlenebilir bir bulanıklığın olması ile doğrulandı. Enfekte çorba üç ila beş saat kuluçkaya bırakıldıktan sonra bulanıklık seviyeleri McFarland yöntemi kullanılarak ölçüldü. Bakteri süspansiyonunun başlangıçta standartla karşılaştırılabilir bir bulanıklığa sahip olmaması durumunda, süspansiyon ya normal salin ile seyreltildi ya da gerektiği gibi ek organizmalar eklendi. Tek kullanımlık koloniyi plaktan almak için steril bir öze kullanıldı ve daha sonra McFarland tüpüyle hemen hemen aynı çapa sahip steril bir test tüpüne aktarıldı (Leber *et al.* 2016).

Mueller-Hinton besiyeri, üretici tarafından sağlanan talimatlara uygun olarak hazırlandı ve kullanıldı. Otoklavda sterilizasyonun ardından, ortam 45 ℃'de soğumaya bırakıldı ve ardından yaklaşık 4 mm kalınlığa sahip petri kaplarına döküldü. Sertleşen plaklar üzerindeki fazla nemin buharlaşması için 37 ℃'de 15-30 dakika inkübe edildi.

Plakları aşılamak için önce steril bir swab inokuluma daldırıldı, daha sonra swabı sıvı seviyesinin üzerinde tüpün yan duvarına sıkıca bastırarak ve döndürerek fazla inokulum çıkarıldı, sonra swab her yere yayıldı. Ortamın yüzeyi, her uygulamadan sonra plaka altmış derecelik bir açıya sahip olacak şekilde üç kez döndürdü ve son olarak swabın kenarlarından geçirildi. Kapak kapalıyken oda sıcaklığında birkaç dakika plakanın kuruması beklendi. İnokülasyon 15 dakika sürdü ve ardından inkübasyon işlemi için ters çevrilmeden önce antibiyotik diskleri plakların üzerine nem birikmesini önlemek için yerleştirildi (Procop *et al.* 2020).

3.3.9 Moleküler testler (antibiyotik direnç geninin tespiti)

Genlerin analizi birkaç aşamada gerçekleştirildi.

3.3.9.1 Bakteriyel RNA ekstraksiyonu

Bakteri izolatlarının hazırlanması sırasında vankomisin direncine dirençten sorumlu *VanA* ve *VanB* genlerine sahip olabilecek COVID-19 hastalarından izole edilen *E. faecalis* bakterisinin genlerinin görüntülenmesi ve belirlenmesi amaçlanmıştır. İzole edilen *E. faecalis* bakterileri, Muller-Öncelikle Hinton agara pasajlandı (Mahon *et al.* 2018).

ZR Bakteriyel RNA MiniPrep™, parçalanması zor olan peletlenmiş Gram-pozitif bakteri, maya veya mantar hücrelerinden DNA'nın hızlı bir şekilde ayrılmasını sağlar. ZR Bakteriyel DNA MiniPrep™, numune homojenizasyonu için ultra yüksek yoğunluklu ZR Bashing Beads™ ve tam RNA saflaştırması (küçük RNA'lar dahil) sağlamak için güçlü bir tampon sistemi kullanır. Ayrıca ZR Bakteriyel DNA

MiniPrep™ Amerika Birleşik Devletleri'nde üretilmektedir. Hem yüksek kapasiteli DNA çıkarılmasını sağlayan Zymo-Spin™ IIIC Sütunu hem de toplam RNA'yı etkili bir şekilde bağlayan Zymo-SpinTM IIC Sütunu bu sistemin temel bileşenleridir. DNase-Free ve RNase-Free Water kullanılarak ekstrakte edilen RNA, RT-PCR için kullanıma hazır hale geldi. RT-PCR aşağıdaki prosedürlere uygun olarak hazırlandı (Barbosa *et al.* 2016).

800 mikrolitre RNA Lizis Tamponu içeren bir karışım önce süspanse edildi ve ardından karışımın tümü ZR BashingBead™ liziz tüpüne aktarıldı. Numune 2 mL'lik bir tüp tutucu tertibatı ile donatılmış çırpıcıya yerleştirilirerek işleme devam edildi (örneğin, maksimum hızda 1-2 dakika bakteri veya maya hücreleri için bir Disruptor Genie™ kullanılması). ZR BashingBead™ Lysis Tüp'ü 12,000 xg'den daha düşük bir hızda bir dakika boyunca santrifüjlendi. Daha sonra Bir Zymo-Spin™ IIIC Sütunu Toplama Tüpüne yerleştirildi ve ardından 400 mikrolitre süpernatantı sütuna aktarıldı. Tüp 8,000 x g'de 30 saniye santrifüjlendi. %95-100 saflıkta olan 0,8 hacim etanol eklendi ve toplama tüpünde bulunan akışa iyice karıştırıldı (Eğer küçük RNA elde edilmek isteniyorsa %95-100 saflıkta olan etanolden iki kattan fazla kullanıldı). Toplama Tüpünün içindeki karışım bir Zymo-Spin™ IIC Sütunu4'e yerleştirildi ve 30 sn boyunca 12,000 xg hızında santrifüjlendi. Sütuna 400 mikrolitre RNA Prep Buffer döküldü. 1 dakika boyunca ≥12,000 xg'de santrifüjlendi. Akış atıldı ve Zymo-Spin™ IIC Sütunu toplama tüpüne yeniden yerleştirildi. Sütunda, toplam 800 mikrolitre RNA Yıkama Tamponu hacmi eklendi. 12,000 x g hızında 30 sn bir santrifüj gerçekleştirildi. Akış atıldı ve Zymo-Spin™ IIC Sütunu toplama tüpüne yeniden yerleştirildi. 400 µL RNA Yıkama Tamponu ile yıkama aşamasının tekrarlandı. Zymo-Spin™ IIC Sütununda bulunan boş Toplama Tüpü içindeyken 12,000 x g hızında 2 dk boyunca santrifüjlendi. Böylece, tüm yıkama tamponunun çıkarıldığından emin olundu. Zymo-Spin™ IIC Sütununu Toplama Tüpünden çok dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve DNase ve RNase içermeyen bir tüpe yerleştirildi. Sütun matrisine doğrudan 25 mikrolitre DNase/RNase-Free Water eklenerek 1 dk beklendi. RNA, 10,000 x g hızında 30 sn boyunca santrifüjlenerek kolondan ayrıştırıldı. Bu işlemlerin ardından RNA hemen kullanılabilir veya -70 ℃ sıcaklıkta saklanabilir (Vanek *et al.* 2011).

3.3.9.2 RT-PCR analizi

Kapa Syber Fast One-Step qPCR kiti ile standart döngü koşulları altında verimli bir şekilde tamamlanan mevcut tek adımlı qPCR testi, hızlı tek adımlı qPCR testine dönüştürülebilir. Bu, herhangi bir mevcut tek adımlı qPCR testi için mümkündür. Çoğu durumda, parametrelerin minimum düzeyde tekrar optimizasyonunun yapılması gerekir.

RNA kullanan gerçek zamanlı PCR için, hassas ve kolay bir seçenek olan Kapa Sybr Fast tek adımlı qRT-PCR kiti-Canada, Kapa Biosystems'den temin edildi. Bu paket, Kapa Sybr Fast ana karışımı ve Kapa Rt karışımından (50 X) oluşmaktadır. Kapa Rt karışımı, M-MuLV ters transkriptazın yanı sıra bir RNase inhibitörü içerir ve yalnızca tek bir tüpte RNA'nın hızlı ölçümünü kolaylaştırmak için tasarlanmıştır (Pestana *et al.* 2015).

Kapa Sybr Fast qPCR ana karışımı, özellikle yüksek performanslı gerçek zamanlı PCR'de kullanım için geliştirilmiştir. Bu kit, yeni geliştirilmiş bir DNA polimeraz türü ile birlikte geldi. Bu ürün, yalnızca Sybr Green I boya kimyasını kullanan kantitatif PCR için geliştirilmiş, türünün tek örneği bir enzimdir. İkili ana karışım, kullanıma hazır olup ve primerler ve şablonlar dışında cDNA'nın tespiti ve amplifikasyonu için gerekli tüm bileşenleri içermektedir (Pestana *et al.* 2015).

Kapa Sybr Fast tek adımlı qRT-PCR kitleri kullanılarak, konvansiyonel döngü koşulları altında başarıyla çalıştırılan tek adımlı qRT-PCR testi, hızlı tek adımlı qRT-PCR testine dönüştürülebilmektedir. Bu durum, herhangi bir tek adımlı qRT-PCR testleri için de mümkündür.

qPCR ana karışımının hazırlanması için erken cDNA sentezini önlemek için Kapa RT karışımı, kullanıldığı süre boyunca her zaman buz üzerinde saklandı. Ayrıca birleştirilmiş reaksiyonlar da buz üzerinde hazırlandı. Yürütülecek tüm reaksiyonlarda veya bu reaksiyonların bir alt kümesinde ortak olan tüm reaksiyon bileşenlerini için doğru miktarda bir PCR ana karışımı hazırlanır. Gerekli olan her yerde bir "şablonsuz

kontrol" (NTC) ve "RT'siz kontrol" (NRT) entegre edildi. NTC, sürecin bileşenlerindeki kontaminasyonu tanımlarken, NRT kontamine genomik DNA'yı tespit eder. Her bir bileşenin gerekli miktarı Çizelge 3.7'de gösterilmiştir (Pestana *et al.* 2015).

Çizelge 3.7 Gerçek zamanlı kantitatif PCR ana karışımının hazırlanması

Bileşen	Hacim (µL)	Son Konsantrasyon
Sybr Green Kappamastermix	10	
Ön Primer	0,4	0,2 µm _
Ters Primer	0,4	0,2 µm_
50X Kapa Rtm Karıştırma	0,4	1X
Nükleaz-serbest su	4,2	
RNAÖrnek Hacmi	5	1pg-1,00 ng
Toplam	20	

Döngü programı Çizelge 3.8'de paylaşılmıştır.

Çizelge 3.8 Döngü programı

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü
Ters transkripsiyon	42	10 dakika	bekleme
Enzim aktivasyonu	95	3 dakika	bekleme
Denatürasyon	95	15 saniye	40
Bağlanma	53	15 saniye	
Ekstansiyon	72	15 saniye	

RT-PCR'dan elde edilen veriler CT değerlerine (eşik döngüsü) göre tespit edildi. CT değerleri, başlangıç şablonunun miktarı ile ters orantılıdır yani yüksek bir CT değerinin düşük gen ekspresyonu veya amplifikasyon geni seviyelerine karşılık geldiği anlamına gelir (Ruijter *et al.* 2019).

Numuneden gelen floresan sinyali döngü numarasına karşı çizildiğinde, amplifikasyon grafikleri ortaya çıkar; ancak, amplifikasyon grafikleri, qPCR deneyinin süresi boyunca ürün oluşumunu içerir. Genin ekspresyonu, gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu veya RT-PCR olarak bilinen yeni bir moleküler teknik kullanılarak etkili bir şekilde

tanımlandı. Genler için kullanılan spesifik primerler Çizelge 3.9'da belirtilmiştir (Ruijter *et al.* 2019).

Çizelge 3.9 PCR testinde kullanılan primerler

Geni	Primer	Dizinim 5'-3'	Ürün Boyutu (bp)
***VanA* geni**	F	CGTTAACGGCACGATGAC	732
	R	CGATATCGTTGGTGGTCCA	
***VANB* geni**	F	CTACTCCCGCCTTTTGGGTT	635
	R	TTCACACCGAAGGATGAGCC	

Çoğaltılan üç reaksiyonun her biri için belirlenen döngü eşiği (CT) değeri, gen ürününün ne kadar doğru amplifiye edildiğinin belirlenmesini sağlar. Döngülerden hesaplanan ve amplifikasyon için kullanılan başlangıç hedef kopya sayısı (logaritmik skala) ile orantılı olan CT değerleri (floresan sinyalinin taban çizgisinin üzerine çıktığı nokta, eşik döngüsüdür), gerçek hayattan elde edilen verileri saptamak için kullanıldı. CT değerleri, başlangıç şablonunun miktarı ile ters orantılı olduğundan, yüksek bir CT değeri, düşük seviyelerde gen ekspresyonu veya amplifikasyon geni anlamına gelirken, düşük bir CT değeri, yüksek gen seviyeleri anlamına gelir. Numuneden gelen floresan sinyali döngü numarasına karşı çizildiğinde, amplifikasyon grafikleri ortaya çıktı. Amplifikasyon grafikleri, qPCR deneyinin süresi boyunca ürün oluşumunu içermektedir (Adams 2020).

3.4 İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen verilerin P. değerinin heasplanması için, Bilgisayarlı istatistiksel analiz, Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) ver. 23.1 istatistik programı, Karşılaştırma ki-kare testi (x^2), T-Testi, varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. P. değeri >0,05 anlamlı değil, ≤0,01 ise yüksek derecede anlamlı olarak ifade edilmiştir.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 COVID-19 Hastalarının Genel Özellikleri

Çalışmada, daha şiddetli COVID-19 enfeksiyonu olan hastaların çoğunun yaşlı (>57 yıl) olduğunu ve hafif enfeksiyonlu hastaların çoğunun ise genç olduğu ortaya çıkdı. Ayrıca, şiddet ile yaşlılık arasında anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir. Erkekler virüsten kadınlardan daha fazla etkilenmesine rağmen, çalışmadakadın ve erkek arasında COVID-19 enfeksiyonu açısından önemli bir fark bulunamadı. Şiddetli COVID-19 enfeksiyonu olan hastaların çoğunun BMI seviyesinin arttığı, hafif enfeksiyonu olan hastaların çoğunluğunun ise normal veya düşük BMI seviyesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu karşılaştırma Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1 COVID-19 hastalarının genel özellikleri

Epidemiyolojik parametreler	Hafif enfeksiyon n (%)	Orta enfeksiyon n (%)	Şiddetlienfeksiyon n (%)	Toplam n (%)	P. değeri
Yaş grupları (yıl)					
18-27	16 (88,89)	2 (11,11)	0 (0)	18 (100)	<0,001
28-37	6 (66,67)	3 (33,33)	0(0)	9(100)	
38-47	11 (64,71)	4 (23,53)	2(11,76)	17(100)	
48-57	6(40)	5 (33,33)	4 (26,67)	15(100)	
58-67	0(0)	5 (29,41)	12(70,59)	17(100)	
>67	1 (3,57)	13(46,43)	14(50)	28(100)	
Toplam	40 (38,46)	32 (30,77)	32 (30,77)	104 (100)	
Cinsiyet					
Kadın	17 (38,64)	13 (29,55)	14 (31,82)	44(100)	0,96
Erkek	23 (38,33)	19 (31,67)	18(30)	60(100)	
Obezite					
Zayıf	4 (66,67)	1 (16,67)	1(16,67)	6(100)	0,045
Normal	24 (48,98)	11 (22,45)	14(28,57)	49(100)	
Kilolu	10 (32,26)	11 (35,48)	10(32,26)	31(100)	
Obez	2 (11,11)	9(50)	7(38,89)	18(100)	

4.2 COVID-19 Hastalarında Komorbiditeler

Çalışmada, COVID-19 enfeksiyonundan muzdarip diyabetik hastaların yarısından fazlasının ciddi enfeksiyona sahip olduğu ve Tip 2 diyabet varlığı ile ciddi COVID-19

enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki tespit edilirken, hamilelik ile şiddetli COVID-19 enfeksiyonu arasında bir ilişki tespit edilememiştir. Ayrıca, COVID-19 enfeksiyonunun büyük çoğunluğu ciddi enfeksiyon ve solunum problemi yarattığı için, solunum problemine sahip olan kişilerde şiddetli COVID-19 enfeksiyonu arasında anlamlı bir ilişki ortaya çıkdı. Bunlara ilaveten, kronik böbrek hastalığı ile şiddetli COVID-19 enfeksiyonu arasında da önemli bir ilişki olduğu görülmüştür. Bu hastalığa sahip olan kişiler şiddetli COVID-19 enfeksiyonuna karşı duyarlı olarak belirlenmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4.2 COVID-19 hastaları arasında komorbiditeler

Komorbiditeler	Hafif enfeksiyon n (%)	Orta enfeksiyon n (%)	Şiddetli enfeksiyon n (%)	Toplam n (%)	P. değeri
Diyabet	3(12)	8(32)	14(56)	25(100)	<0,001
Hamile	1 (33,33)	2 (66,67)	0(0)	3(100)	0,32
Solunum Problemi	0(0)	2 (16,67)	10 (83,33)	12(100)	<0,001
Kronik Böbrek Hastalıkları	0(0)	2 (13,33)	13 (86,67)	15(100)	<0,001
Serebrovasküler Hastalıklar	0(0)	1 (16,67)	5 (83,33)	6(100)	0,013
Otoimmün Hastalıklar	0(0)	1(100)	0(0)	1(100)	0,32
Kanser	0(0)	2 (66,67)	1 (33,33)	3(100)	0,28
Tiroid Hastalıkları	0(0)	1(50)	1(50)	2(100)	0,52
Zihinsel Hastalık	0(0)	1(50)	1(50)	2(100)	0,54
Romatizmal Eklem İltihabı	0 (0)	0(0)	1(100)	1(100)	0,32
Karaciğer Hastalıkları	0 (0)	0(0)	1(100)	1(100)	0,32

Birkaç komorbiditenin varlığı ile COVID-19 hastalığı gelişiminin şiddeti arasında bir korelasyon vardır. Kardiyovasküler komorbid hastalıkların varlığı, COVID-19'un daha az olumlu sonuçlarının çoğuyla ilişkilendirilmiştir (Guan *et al.* 2020). Bu durum, doğrudan kardiyovasküler problemin kendisinin bir sonucu olabilir veya kardiyovasküler hastalığa ek olarak mevcut olan komorbiditelerin var olmasından kaynaklanabilir (Guan *et al.* 2020). Tip 2 diyabeti olan hastalarda COVID-19 şiddetinin yüksek olması olağan bir durumdur (Zhu *et al.* 2020). Tip 2 diyabeti olan ve olmayan 7337 COVID-19 hastasının kohort analizinde, tip 2 diyabetli bireylerin, diyabeti

olmayanlara kıyasla hastanede kaldıkları süre boyunca daha fazla müdahaleye ihtiyaç duydukları belirlenmiştir (Zhu *et al.* 2020).

Kan şekeri kontrolü daha düşük olanların, daha iyi glikoz kontrolü olanlara kıyasla genel olarak daha yüksek ölüm riskine sahip olduğu tespit edilmiştir (Guan *et al.* 2020). Kronik obstrüktif akciğer hastalığı (yaygın olarak KOAH olarak bilinir), diğer komorbiditelerle bağlantılı olmasının yanı sıra daha yavaş bir hastalık seyri ile ilişkilendirilmiştir. Çin'de yürütülen çeşitli çalışmaların bulgularını içeren bir meta-analizin bulgularına göre, KOAH hastası olan ve COVID-19 teşhisi konan hastalarda ölüm riskinin dört kat daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. Ayrıca bu çalışmada hastaların sigara içme öyküleri ve COVID-19 semptomlarının şiddeti araştırılmıştır. Sigara içmek ile şiddetli bir COVID-19 seyri arasında bir bağlantı olduğunu gösteren sadece bir araştırma tespit edilmiştir. Bu araştırma gözardı edildiğinde, sigara içme ile şiddetli COVID-19 hastalığı arasında anlamlı bir ilişki kalmamıştır (Wang *et al.* 2020). Protrombotik koagülopati, yeni koronavirüsün neden olduğu akut solunum sıkıntısı sendromu ve solunum yetmezliği olan hastalarla ilişkili olabilir. COVID-19 nedeniyle ölen bireylerin otopsilerinde pulmoner damarlarda dağınık mikrotrombinin bulunmasıyla solunum yetmezliğinin tıkayıcı bir etiyolojisinin olduğu belirlenmiştir. İntravenöz (IV) antitrombotik alteplaz tedavisini takiben, COVID-19 ile ilişkili akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) ve solunum yetmezliği olan üç kişide %38 ile %100 iyileşme gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler dikkat çekici olsa da, üç vakadan ikisinde tedavi tamamlandıktan sonra hastaların iyileşmelerinde gerileme olmuştur. Bu faydaların şansa olmayıp, tedavi ile kazanıldığının belirlenmesi için anti-trombolitik tedavi üzerinde daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir (Zhao *et al.* 2020).

4.3 COVID-19 Hastalarının Klinik Özellikleri

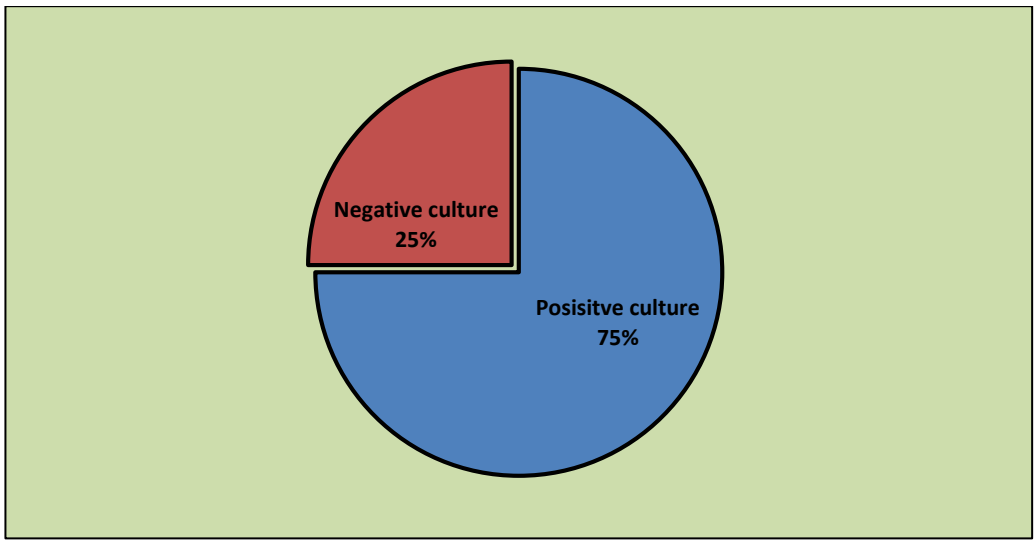
Çalışmada, özellikle baş ağrısı, nefes darlığı, şikayeti olan kişilerde gözlemlenen klinik özelliklerin COVID-19 enfeksiyonu ile anlamlı bir ilişkisi olduğunu tespit edilmiştir. Sonuçlar Çizelge 4.3’te verilmiştir.

Çizelge 4.3 COVID-19 hastalarının klinik özellikleri

Belirti ve Bulgular	Hafif enfeksiyon n (%)	Orta enfeksiyon n (%)	Şiddetli enfeksiyon n (%)	Toplam n (%)	P. değeri
Öksürük	27 (34,62)	26(33,33)	25(32,05)	78(100)	0,36
Baş ağrısı	36 (52,17)	19 (27,54)	14 (20,29)	69(100)	<0,001
Vücut ağrısı	24 (39,34)	15 (24,59)	22 (36,07)	61(100)	0,21
Ateş	20 (35,71)	18 (32,14)	18 (32,14)	56(100)	0,82
Hapşırma	13(61,90)	5 (23,81)	3 (14,29)	21(100)	0,03
Karın ağrısı	1(100)	0(0)	0(0)	1(100)	0,44
İshal	6(37,5)	4(25)	6(37,5)	16(100)	0,78
Kusma	1 (11,11)	4 (44,44)	4 (44,44)	9(100)	0,21
Nefes darlığı	0(0)	29(47,54)	32 (52,46)	61(100)	<0,001

4.4 Bakteriyolojik Koenfeksiyon

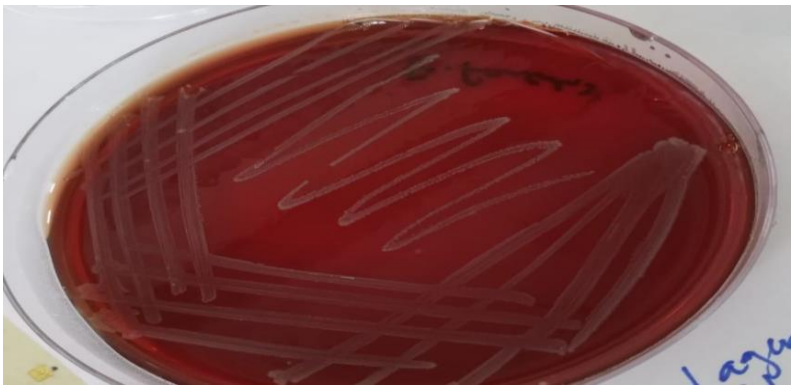
Çalışmada, bakteriyolojik koenfeksiyon bakımından COVID-19 hastalarının %75 (26/104)'inin kültür sonucu Şekil 4.1'de verildiği gibi pozitif bulunmuştur. İzole edilen bakterilerin dağılımı Çizelge 4.4'te verilmiştir. *E. faecalis* (%39,74),COVID-19 hastalarının nazofaringeal kültüründen en çok izole edilen bakteridir. Bunu sırasıyla; *K. pneumoniae* (%21,79), *S. aureus* (%14,10), *E. coli* (%10,26), *Pseudomonas aeruginosa* (%5,13), *Staphylococcus epidermidis* (%5,13) ve *Proteus mirabilis* (%3,85) takip etmiştir. Bakteri gelişimi Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterilmiştir.



Şekil 4.1 Bakteri kültürü sonucu

Çizelge 4.4 Kültüre göre izole edilen bakteriler

Bakteriyel izolatlar	Sayı	Yüzde (%)
E. faecalis	31	39,74
K. pneumoniae	17	21,79
S. aureus	11	14,10
E. coli	8	10,26
P. aeruginosa	4	5,13
S. epidermidis	4	5,13
P. mirabilis	3	3,85
Toplam	78	100



Şekil 4.2 Kanlı agarda *E. faecalis* izolatının gelişimi

E. faecalis, enterokok bakterileri için seçici bir besiyeri olarak kabul edilen katı baz kan azid besiyerinde gri koloniler gösterdi.



Şekil 4.3 Azide kanlı agar üzerinde *E. faecalis*'in gelişimi

Çalışmamızda, SARS-CoV-2 enfeksiyonunun, hastalığın farklı evrelerine göre nazofaringeal mikrobiyotanın bir modifikasyonu ile ilişkili olduğunu belirlenmiştir. Böylece mikrobiyotanın, hastalığın klinik evrimi sırasında belirleyici bir faktör olarak ele alınması gerekliliği ortaya çıkmıştır. Bu durum, nazofarenkste bulunan bakterileri analiz ederek gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, COVID-19 enfeksiyonun klinik görünümünden bağımsız olarak hastalarda anaerobların sayısında bir azalma olduğunu belirlenmiştir. Bu bulgular burun mukozasından alınan örneklerle yürütülen bir diğer çalışmanın sonuçları ile uyumludur (Dubourg *et al.* 2022).

COVID-19 negatif kişilerle karşılaştırıldığında, COVID-19 hastalarında *K. pneumoniae* prevalansı önemli ölçüde daha yüksek olarak belirlenmiştir. Elde edilen bu sonuç De Maio *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışmanın sonuçları ile tutarlıdır. COVID-19 pozitif hastaları ile negatif hastaların karşılaştırılmasında, COVID-19 pozitif hastaların nazofaringeal mikrobiyotasında 8 taksonun geliştiği tespit edilmiştir. Bu taksonlar; *C. propinquum, C. pseudodiphtericum, S. aureus, K. pneumoniae* ve *E. faecalis* olarak sıralanabilir.

Yakın zamanda yapılan bir çalışmada bu patojenlerin farklı virüsleri içeren solunum yolu enfeksiyonu olan hastalarda oluştuğu belirtilmiştir (DeMuri *et al.* 2018, Edouard *et al.* 2018). Bu bulgu, tespit edilen bakteri türlerinin sadece COVID-19'a özel olmayabileceğini düşündürmektedir. Bununla birlikte, COVID-19 hastası üzerinde yapılan bir çalışmada, COVID-19 hastalarının üst solunum yolu mikrobiyomunun *Corynebacterium* ve *Staphylococcus* cinslerine ait türlerden oluştuğu kanıtlanmıştır (Lloréns-Rico *et al.* 2021).

4.5 Bakteriyel Enfeksiyonun COVID-19 Şiddeti ile İlişkisi

Çalışmamız, bakteri izolatlarının koenfeksiyonunun şiddetli COVID-19 enfeksiyonu olan hastalarda var olduğunu göstermiştir. Bu ilişki Çizelge 4.5'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.5 Bakteriyel enfeksiyonun COVID-19 şiddeti ile ilişkisi

Bakteriyel izolatlar	Pozitif örnek sayısı	Hafif enfeksiyon		Orta enfeksiyon		Şiddetli enfeksiyon	
		Sayı	%	Sayı	%	Sayı	%
E. faecalis	31	3	9,68	8	25,81	20	64,52
K. pneumoniae	17	31	39,74	9	29,03	10	32,26
S. aureus	11	17	21,79	5	29,41	6	35,29
E. coli	8	11	14,1	2	18,18	5	45,45
P. aeruginosa	4	8	10,26	4	50	1	12,5
Staphylococcus	4	4	5,13	0	0	2	50
P. mirabilis	3	4	5,13	3	75	1	25
Toplam	78	3	385	2	66,67	1	33,33

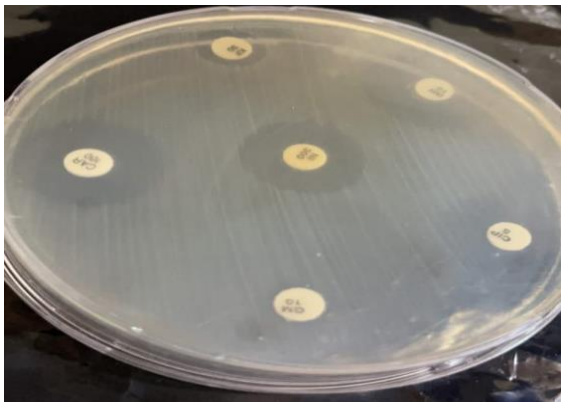
Virolojik, immünolojik ve hemostatik bir bakış açısından, hastalığın seyri ile ilişkili birçok farklı görüş vardır (Gautret *et al.* 2020). SARS-CoV-2 virüsü, nazofaringeal ve bağırsak mikrobiyotası ile iletişim kurmak için, konak hücreye girdikten sonra, öncelikle akciğerin alveolar epitel hücrelerinde ve bağırsak enterositlerinde eksprese edilen anjiyotensin dönüştürücü enzim 2 (ACE2) reseptörlerine bağlanır (Hoffmann *et al.* 2020, Lundström *et al.* 2021). Aynı zamanda, nazofaringeal mikrobiyotanın, her biri durumun seyri üzerinde etkisi olabilen birçok solunum yolu enfeksiyonunun bulaşmasını teşvik etmekten sorumlu olabileceği kabul edilmektedir (Edouard *et al.* 2018). Yüksek verimli sıralama yaklaşımlarının geliştirilmesinden bu yana bu alanda yürütülen araştırmaların miktarında üstel bir artış olmuştur (Bogaert *et al.* 2011, Brugger *et al.* 2012, Edouard *et al.* 2018, Man *et al.* 2019). Bu yaklaşımlar, geniş bir birey popülasyonunda nazofaringeal mikrobiyotanın derinlemesine araştırılmasını mümkün kılar. Gerçekten de nazofaringeal mikrobiyotadaki değişiklikler ile bronşiolit, influenza virüsü veya insan rinovirüsü arasında bağlantı olduğuna dair insanlar üzerinde yapılmış çalışmalar bulunmaktadır (Allen *et al.* 2014, Hasegawa *et al.* 2016, Wen *et al.* 2018). Şu anda COVID-19 hastalarının nazofaringeal mikrobiyotası üzerinde çelişkili kanıtlar sunmayı amaçlayan araştırmalar yapılmaktadır. Ancak COVID-19 hastalarında, 16S ribozomal RNA dizilimi kullanan az sayıda nazofaringeal mikrobiyota araştırması bulunmaktadır (De Maio *et al.* 2020). Hastalığın şiddeti ile farklı hastalık evrelerinde nazofaringeal mikrobiyotadaki değişiklikler arasındaki ilişki bundan önce hiçbir araştırmada ele alınmamıştır.

4.6 *E. Faecalis* İzole Edilmiş Vajinitli Kadınlarda Antibiyotik Duyarlılığının Dağılımı

Çalışmada tüm *E. faecalis* izolatlarının; sefalotin ve imipeneme (%100), ampisiline %93,55, levofloksasine %64,52 ve seftriaksona % 51,61 duyarlı olduğu, tüm *E. faecalis* izolatlarının karbenisilin ve klindamisine %100, vankomisine ise %80,65 dirençli olduğu tespit edilmiştir. Antibiyotik duyarlılıkları Çizelge 4.6'da, örnek antibiyogram testi Şekil 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.6 *E. faecalis* izole vajinitli kadınlarda antibiyotik duyarlılıkları

Antibiyotikler	Duyarlı		Direnç	
	Sayı	%	Sayı	%
Sefalotin	31	100	0	0
İmipenem	31	100	0	0
Ampisilin	29	93,55	2	6,45
Levofloksasin	20	64,52	11	35,48
Seftriakson	16	51,61	15	48,39
Kloramfenikol	12	38,71	19	61,29
Sefotaksim	8	25,81	23	74,19
Co-Trimoksazol	8	25,81	23	74,19
Vankomisin	6	19,35	25	80,65
Rifampisin	5	16,13	26	83,87
Gentamisin	5	16,13	26	83,87
Siprofloksasin	4	12,90	27	87,10
Amikasin	3	9,68	28	90,32
Streptomisin	1	3,23	30	96,77
Karbenisilin	0	0	31	100
Klindamisin	0	0	31	100



Şekil 4.4 *E. faecalis* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi

2016 yılında, Ghasemi *et al.* (2016) yapmış oldukları çalışmaya göre, tüm *E. faecalis* izolatlarının ampisiline duyarlıdı. Bu bulgu, bizim elde ettiğimiz sonuçlar ile uyumluluk göstermiştir. Muratani and Matsumoto (2004) tarafından Japonya'da üriner enterokoklar üzerinde yapılan bir çalışmada, *E. faecalis* suşlarının %84,8'i gentamisin'e karşı direnç göstermiştir.

Beta-laktamlar ve aminoglikozitlerin antibiyotiklere karşı doğal dirençleri nedeniyle enterokokların tedavisinin zor olduğu düşünülmektedir. Bu ilaçlar, en yaygın bakteriyel enfeksiyon türü olan Gram pozitif kokların neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Gaca *et al.* 2012). Ayrıca bunların trimetoprim, gentamisin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiği çalışmalarda bulunmaktadır (Muratani and Matsumoto 2004, Cheng *et al.* 2013).

Yapılan çalışmalarda, *E. faecalis* izolatlarının çoğunluğunun beta-laktamlara duyarlılık sergilediği belirlenmiştir (Huys *et al.* 2004, Hummel *et al.* 2007, Fernández-Fuentes *et al.* 2014, Kürekci *et al.* 2016, Chajęcka-Wierzchowska *et al.* 2019). Cusumano *et al.* (2022) ise enterokokların vankomisine duyarlı olduğunu ancak klindamisine, kinipristin-dalfopristin, sefalosporinler ve aminoglikozitler'e karşı doğuştan gelen bir dirence sahip olduklarını belirtmiştir. Elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda mevcut enterokok suşlarının gentamisine oldukça dirençli olduğu bulunmuştur.

Mobil genetik elementleri elde etme yeteneklerinin artması nedeniyle enterokok enfeksiyonlarının tedavisi giderek daha zor hale gelmektedir. Bu, vankomisin gibi en son savunma hattı olarak kabul edilen antibiyotikler de dahil olmak üzere, bakterilerin antibiyotiklere karşı artan direncinin doğrudan bir sonucudur. Son zamanlarda, bağışıklığı baskılanmış hastaları ciddi kronik enterokok enfeksiyonlarına karşı yakalanma riskini arttıran vankomisine dirençli enterokokların piyasaya sürülmesinde bir artış olmuştur (Hamzah and Kadim 2018).

Shridhar and Dhanashree (2019) tarafından yapılan bir araştırmada, idrardan izole edilen *E. faecalis* bakterilerinin çoğunluğu sefalotin ve nalidiksik aside dirençli, imipenem, benicillin ve nitrofurantoine %80'den fazla duyarlı olarak tespit edilmiştir.

Bununla birlikte Ejaz (2019) tarafından Hindistan'da üriner *Enterococcus* izolatları üzerinde yapılan çalışmada, örneklerin %70'inde klindamisin ve örneklerin %100'ünde nitrofurantoin direnci bulunmuştur. Rudy *et al.* (2004) test ettikleri *E. faecalis* suşlarının %96'sının penisiline, %100'ünün nitrofurantoine duyarlı olduğunu bulmuşlardır.

E. faecalis izolatlarının çoğunluğu sefalotin ve nalidiksik aside dirençlidir ancak Kateete *et al.* (2019) tarafından yapılan araştırmada *E. faecalis'in* neredeyse tamamı ampisilin, imipenem ve karbenisiline duyarlı olarak bulunmuştur. Bu üç antibiyotik enfeksiyonun tedavisinde kullanılmaktadır. Bu, enterokokların genel olarak ampisilin tedavisine uygun olduğu gerçeğini desteklemektedir (Kiruthiga and Padmavathy 2020). Çalışmamızda görülen antibiyotik direncindeki farklılıkların, ilaç duyarlılığını belirlemek için kullanılan test prosedürlerindeki değişikliklerden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. İzolatların enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilen ilaç olan ampisiline yüksek duyarlılığı, bu düşük maliyetli antibiyotiğin dünya çapında enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde başarılı olduğunu göstermektedir (Otokunefor *et al.* 2020).

4.7 COVID -19 Hastalarından İzole Edilen *E. Faecalis*'in *VanA* ve *VanB* Genlerinin PCR ile Tespiti

Çalışmada, COVID-19 hastalarından izole edilen Vankomisine dirençli *E. faecalis*'in %64'ünün *VanA* geni (vankomisin direncinden sorumlu genlerden biri) için pozitif olduğu, %28'inin *VanB* geni ile ve %8'inin *VanA* ve *VanB* genine sahip olmadığı ortaya çıkmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.7 'de verilmiştir.

Çizelge 4.7 COVID-19 hastalarından izole edilen *E. faecalis*'in *VanA* ve *VanB* genlerinin PCR ile tespiti

Real time PCR ile tespit edilen gen	**Vankomisine direnç durumu**	
	Sayı	**%**
***VanA* geni (+)**	16	64
***VanB* geni (+)**	7	28
***VanA* ve *VanB* geni ()**	2	8
Toplam	25	100

Yapılan çalışmalarda, bakteriyel enfeksiyonun tespiti için spesifik primerlerle PCR (bir dizi standart suş ve klinik izolatı tespit etmek için altı primer çifti) kullanılmıştır (Honarm *et al.* 2012, Heidari *et al.* 2017). *E. faecalis* enterokokların %85-90'ının nedenidir ve hastane enfeksiyonlarının, özellikle bakteriyemi, çocuklarda sepsis, endokardit, idrar yolu enfeksiyonu (İYE) ve yara enfeksiyonlarının üçüncü ana nedeni olarak bilinmektedir (Yim *et al.* 2017). Antimikrobiyal ajanlara karşı bakteriyel direnç bilgisi, hastalığın tedavisinde ve yönetiminde önemli bir rol oynamaktadır (Gorrie *et al.* 2019, Toc *et al.* 2022). Hastane izolatlarının çoğu, vankomisin dahil olmak üzere çoğu olağan antibiyotiğe dirençlidir. Vankomisine dirençli enterokok suşlarında (VRE), glikopeptid antibiyotiklere dirençten sorumlu olan beş direnç geni vardır. Bu tür genlerden ikisi (*VanA* ve *VanB*), özellikle *E. faecalis*'te diğerlerinden daha yaygındır. *VanA* genine sahip suşlar vankomisine ve tykoplanin'e dirençlidir. *VanB* genine sahip suşlar ise vankomisine dirençli ancak tycoplanine duyarlıdır (Heidari *et al.* 2017). Bulgularımızla uyumlu olarak, Shaker and Ali (2019) vankomisine dirençli *E. faecalis'*in çoğunun *VanA* geni için pozitif olduğunu ve düşük oranda *VanB* geni içerdiğini bulmuştur. *VanA* geni, hastaneye yatış sırasındahastaların kaptığı en ciddi enfeksiyonların bazılarından sorumlu olan vankomisine dirençli enterokoklarıyla en sık ilişkili olan antimikrobiyal direnç genidir. Vankomisin direnç genleri tanımlanmış olsa da *VanA* en yaygın olarak eksprese edilen direnç belirtecidir, bunu vankomisin direnci ve teikoplanin olarak diğer glikopeptitlere duyarlılık veren *VanB* geni izlemektedir (Miller *et al.* 2020).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Elde ettiğimiz veriler doğrultusunda, en çok etkilenen COVID-19 enfeksiyonundan en çok erkek, obez ve yaşlı bireylerin etkilendiği ve bu faktörlerin enfeksiyon şiddeti için büyük risk oluşturduğu sonucuna varılmıştır. Diyabet ve kronik böbrek hastalıkları, şiddetli COVID-19 enfeksiyonuna eşlik eden diğer hastalıklardır.

Ayrıca, COVID-19 hastalarının çoğunun nazofaringeal sürüntü için pozitif kültüre sahip olduğu ve *E. faecalis*'inen çok izole edilen bakteri türü olduğu tespit edilmiştir. Bunu sırasıyla *K. pneumoniae* ve *S. aureus* takip etmiştir. Bunlara ek olarak *E. faecalis* izolatlarının çoğunun sefalotin ve imipenem, ampisilin ve levofloksasin'e duyarlı olduğu ve çoğunun vankomisine dirençli olduğunu bulunmuştur. Diğer taraftan COVID-19 hastalarından izole edilen vankomisine dirençli *E. faecalis*'in %64'ünün *VanA* geni, %28'inin ise *VanB* geni ile pozitif olduğu belirlenmiştir.

Tüm bu bilgiler dikkate alındığında, doğru kültüre bağlı olarak uygun bir tedavi ve özellikle COVID-19 hastalarında bakteri direncini önlemek için duyarlılık testinin yapılması, COVID-19 enfeksiyonunun şiddetini azaltmak için tüm standart yöntemlerin kullanılması, COVID-19 hastalarının diyabet ve diğer kronik hastalıkların varlığı açısından izlenmesi ve tedavi ile kritik bir önem gösterilmesi önerilmektedir. Ayrıca çeşitli klinik örneklerde antibiyotiğe dirençli genlerin moleküler tespiti için daha ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

Adams, G. 2020. A beginner's guide to RT-PCR, qPCR and RT-qPCR. The Biochemist, 42(3): 48-53.

Ahmed, M. O. and Baptiste, K. E. 2018. Vancomycin-resistant enterococci: a review of antimicrobial resistance mechanisms and perspectives of human and animal health. Microbial Drug Resistance, 24(5): 590-606.

Allen, E. K., Koeppel, A. F., Hendley, J. O., Turner, S. D., Winther, B. and Sale, M. M. 2014. Characterization of the nasopharyngeal microbiota in health and during rhinovirus challenge. Microbiome, 2(1): 1-11.

Ayobami, O., Willrich, N., Reuss, A., Eckmanns, T. and Markwart, R. 2020. The ongoing challenge of vancomycin-resistant Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis in Europe: an epidemiological analysis of bloodstream infections. Emerging Microbes & Infections, 9(1): 1180-1193.

Barbosa, C., Nogueira, S., Gadanho, M. and Chaves, S. 2016. DNA extraction: finding the most suitable method. In Molecular microbial diagnostic methods. Academic Press, 135-154.

Becker, R. C. 2020. COVID-19 update: Covid-19-associated coagulopathy. Journal of Thrombosis and Thrombolysis, 50(1): 54-67.

Bender, J. K., Cattoir, V., Hegstad, K., Sadowy, E., Coque, T. M., Westh, H. and Werner, G. 2018. Update on prevalence and mechanisms of resistance to linezolid, tigecycline and daptomycin in enterococci in Europe: Towards a common nomenclature. Drug Resistance Updates, 40: 25-39.

Bender, J. K., Fleige, C., Klare, I., Fiedler, S., Mischnik, A., Mutters, N. T. and Werner, G. 2016. Detection of a cfr (B) Variant in German Enterococcus faecium Clinical Isolates and the Impact on Linezolid Resistance in Enterococcus spp. PLoS One, 11(11): e0167042.

Bogaert, D., Keijser, B., Huse, S., Rossen, J., Veenhoven, R., Van Gils, E. and Sanders, E. 2011. Variability and diversity of nasopharyngeal microbiota in children: A metagenomic analysis. PloS One, 6(2): e17035.

Brugger, S. D., Frei, L., Frey, P. M., Aebi, S., Mühlemann, K. and Hilty, M. 2012. 16S rRNA terminal restriction fragment length polymorphism for the characterization of the nasopharyngeal microbiota. PLoS One, 7(12): e52241.

Chajęcka-Wierzchowska, W., Zadernowska, A., Zarzecka, U., Zakrzewski, A. and Gajewska, J. 2019. Enterococci from ready-to-eat food–horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes and genotypic characterization by PCR melting profile. Journal of the Science of Food and Agriculture, 99(3): 1172-1179.

Chen, T., Wu, D. I., Chen, H., Yan, W., Yang, D., Chen, G. and Ning, Q. 2020. Clinical characteristics of 113 deceased patients with coronavirus disease 2019: Retrospective study. BMJ, 368.

Chen, Y., Wang, J., Liu, C., Su, L., Zhang, D., Fan, J. and Zhang, S. 2020. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. Molecular Medicine, 26(1): 1-12.

Cheng, V. C. C., Chan, J. F. W., Wong, S. C. Y., Chen, J. H. K., Tai, J. W. M., Yan, M. K. and Kwan, G. S. W. 2013. Proactive infection control measures to prevent nosocomial transmission of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a non-endemic area. Chinese Medical Journal, 126(23): 4504-4509.

Ciotti, M., Angeletti, S., Minieri, M., Giovannetti, M., Benvenuto, D., Pascarella, S. and Ciccozzi, M. 2019. COVID-19 outbreak: an overview. Chemotherapy, 64(5-6): 215-223.

Ciotti, M., Ciccozzi, M., Terrinoni, A., Jiang, W. C., Wang, C. B. and Bernardini, S. 2020. The COVID-19 pandemic. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences, 57(6): 365-388.

Coombs, G. W., Pearson, J. C., Daley, D. A., Le, T., Robinson, O. J., Gottlieb, T. and Turnidge, J. D. 2014. Molecular epidemiology of enterococcal bacteremia in Australia. Journal of Clinical Microbiology, 52(3): 897-905.

Coperchini, F., Chiovato, L., Ricci, G., Croce, L., Magri, F. and Rotondi, M. 2021. The cytokine storm in COVID-19: Further advances in our understanding the role of specific chemokines involved. Cytokine & Growth Factor Reviews, 58: 82-91.

Cusumano, J. A., Daffinee, K. E., Piehl, E. C., García-Solache, M., Desbonnet, C., Rice, L. B., and LaPlante, K. L. 2022. Meropenem plus Ceftaroline Is Active against Enterococcus faecalis in an In Vitro Pharmacodynamic Model Using Humanized

Dosing Simulations. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 66(10): e00426-22.

De Maio, F., Posteraro, B., Ponziani, F. R., Cattani, P., Gasbarrini, A. and Sanguinetti, M. 2020. Nasopharyngeal microbiota profiling of SARS-CoV-2 infected patients. Biological Procedures Online, 22(1): 1-4.

DeMuri, G. P., Gern, J. E., Eickhoff, J. C., Lynch, S. V. and Wald, E. R. 2018. Dynamics of bacterial colonization with Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis during symptomatic and asymptomatic viral upper respiratory tract infection. Clinical Infectious Diseases, 66(7): 1045-1053.

Dos Santos Oliveira, J., Lavell, A. A., Essus, V. A., Souza, G., Nunes, G. H. P., Benício, E. and Cortines, J. R. 2021. Structure and physiology of giant DNA viruses. Current Opinion in Virology, 49: 58-67.

Dubourg, G., Yacouba, A., Bossi, V., Raoult, D. and Lagier, J. C. 2022. Profile of the Nasopharyngeal microbiota affecting the clinical course in COVID-19 patients. Frontiers in Microbiology, 13.

Edouard, S., Million, M., Bachar, D., Dubourg, G., Michelle, C., Ninove, L. and Raoult, D. 2018. The nasopharyngeal microbiota in patients with viral respiratory tract infections is enriched in bacterial pathogens. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 37(9): 1725-1733.

Ejaz, H. 2019. Emerging resistance of van genotype in enterococci: A potential menace for therapeutic failure. Pakistan Journal of Medical Sciences, 35(6): 1659.

Fernández-Fuentes, M. A., Abriouel, H., Morente, E. O., Pulido, R. P. and Gálvez, A. 2014. Genetic determinants of antimicrobial resistance in Gram positive bacteria from organic foods. International Journal of Food Microbiology, 172: 49-56.

Gaca, A. O., Abranches, J., Kajfasz, J. K. and Lemos, J. A. 2012. Global transcriptional analysis of the stringent response in Enterococcus faecalis. Microbiology, 158 (Pt 8): 1994.

Gallo Marin, B., Aghagoli, G., Lavine, K., Yang, L., Siff, E. J., Chiang, S. S. and Michelow, I. C. 2021. Predictors of COVID-19 severity: A literature review. Reviews in Medical Virology, 31(1): 1-10.

García-Solache, M. and Rice, L. B. 2019. The Enterococcus: a model of adaptability to its environment. Clinical Microbiology Reviews, 32(2): e00058-18.

Gautret, P., Million, M., Jarrot, P. A., Camoin-Jau, L., Colson, P., Fenollar, F. and Raoult, D. 2020. Natural history of COVID-19 and therapeutic options. Expert Review of Clinical Immunology, 16(12): 1159-1184.

Ghasemi, E., Mansouri, S. and Shahabinejad, N. 2016. Vaginal colonization and susceptibility to antibiotics of enterococci during late pregnancy in Kerman City, Iran. Archives of Clinical Infectious Diseases, 11(4).

Giacobbe, D. R., Labate, L., Tutino, S., Baldi, F., Russo, C., Robba, C., and Bassetti, M. 2021. Enterococcal bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19: a case series. Annals of Medicine, 53(1): 1779-1786.

Gorrie, C., Higgs, C., Carter, G., Stinear, T. P. and Howden, B. 2019. Genomics of vancomycin-resistant Enterococcus faecium. Microbial Genomics, 5(7).

Guan, W. J., Liang, W. H., He, J. X. and Zhong, N. S. 2020. Cardiovascular comorbidity and its impact on patients with COVID-19. European Respiratory Journal, 55(6).

Guo, J., Wang, S., Xia, H., Shi, D., Chen, Y., Zheng, S. and Li, L. 2021. Cytokine signature associated with disease severity in COVID-19. Frontiers in Immunology, 3276.

Hamzah, A. M. and Kadim, H. K. 2018. Isolation and identification of Enterococcus faecalis from cow milk samples and vaginal swab from human. Entomology and Zoology Science, 6: 218-222.

Hasegawa, K., Mansbach, J. M., Ajami, N. J., Espinola, J. A., Henke, D. M., Petrosino, J. F. and Camargo, C. A. 2016. Association of nasopharyngeal microbiota profiles with bronchiolitis severity in infants hospitalised for bronchiolitis. European Respiratory Journal, 48(5): 1329-1339.

Heidari, H., Hasanpour, S., Ebrahim-Saraie, H. S. and Motamedifar, M. 2017. High incidence of virulence factors among clinical Enterococcus faecalis isolates in Southwestern Iran. Infection & Chemotherapy, 49(1): 51-56.

Hoffmann, M., Kleine-Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S. and Pöhlmann, S. 2020. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. Cell, 181(2): 271-280.

Honarm, H., Ghavidel, M. F., Nikokar, I. and Taromsari, M. R. 2012. Evaluation of a PCR assay to detect enterococcus faecalis in blood and determine glycopeptides resistance genes: van A and van B. Iranian Journal of Medical Sciences, 37(3): 194.

Hui, K. P. Y., Cheung, M. C., Lai, K. L., Ng, K. C., Ho, J. C. W., Peiris, M. and Chan, M. C. W. 2021. Role of epithelial-endothelial cell interaction in the pathogenesis of SARS-CoV-2 infection. Clinical Infectious Diseases, 2021(1): 10-43.

Hummel, A. S., Hertel, C., Holzapfel, W. H. and Franz, C. M. 2007. Antibiotic resistances of starter and probiotic strains of lactic acid bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 73(3): 730-739.

Huys, G., D'Haene, K., Collard, J. M. and Swings, J. 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in Enterococcus isolates from food. Applied and Environmental Microbiology, 70(3): 1555-1562.

Jahansepas, A., Aghazadeh, M., Rezaee, M. A., Hasani, A., Sharifi, Y., Aghazadeh, T. and Mardaneh, J. 2018. Occurrence of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium in various clinical infections: detection of their drug resistance and virulence determinants. Microbial Drug Resistance, 24(1): 76-82.

Jeyanathan, M., Afkhami, S., Smaill, F., Miller, M. S., Lichty, B. D. and Xing, Z. 2020. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies. Nature Reviews Immunology, 20(10): 615-632.

Kateete, D. P., Edolu, M., Kigozi, E., Kisukye, J., Baluku, H., Mwiine, F. N. and Najjuka, C. F. 2019. Species, antibiotic susceptibility profiles and van gene frequencies among enterococci isolated from patients at Mulago National Referral Hospital in Kampala, Uganda. BMC Infectious Diseases, 19(1): 1-9.

Kiruthiga, A. and Padmavathy, K. 2020. Mechanisms of intrinsic antibiotic resistance in enterococci. Drug Invention Today, 13(6).

Kumar Bajaj, B., Razdan, K., Claes, I. and Lebeer, S. 2015. Physico-chemical characterization of exopolysaccharides of potential probiotic Enterococcus faecium isolates from infants' gut. Current Biochemical Engineering, 2(1): 90-100.

Kürekci, C., Önen, S. P., Yipel, M., Aslantaş, Ö. and Gündoğdu, A. 2016. Characterisation of phenotypic and genotypic antibiotic resistance profile of

enterococci from cheeses in Turkey. Korean Journal for Food Science of Animal Resources, 36(3): 352.

Laverde Gomez, J. A., Hendrickx, A. P., Willems, R. J., Top, J., Sava, I., Huebner, J. and Werner, G. 2011. Intra-and interspecies genomic transfer of the Enterococcus faecalis pathogenicity island. PLoS One, 6(4): e16720.

Leber, A. L., Everhart, K., Balada-Llasat, J. M., Cullison, J., Daly, J., Holt, S. and Bourzac, K. M. 2016. Multicenter evaluation of BioFire FilmArray meningitis/encephalitis panel for detection of bacteria, viruses, and yeast in cerebrospinal fluid specimens. Journal of Clinical Microbiology, 54(9): 2251-2261.

Lloréns-Rico, V., Gregory, A. C., Van Weyenbergh, J., Jansen, S., Van Buyten, T., Qian, J. and Raes, J. 2021. Clinical practices underlie COVID-19 patient respiratory microbiome composition and its interactions with the host. Nature Communications, 12(1): 1-12.

Lundström, A., Ziegler, L., Havervall, S., Rudberg, A. S., Von Meijenfeldt, F., Lisman, T. and Thålin, C. 2021. ACE2, ace and thromboinflammation in COVID-19. Research and Practice in Thrombosis and Haemostasis. 2021(1): 3-7.

Mahon, A. R., Horton, D. J., Learman, D. R., Nathan, L. R. and Jerde, C. L. 2018. Investigating diversity of pathogenic microbes in commercial bait trade water. PeerJ, 6: e5468.

Man, W. H., Clerc, M., de Steenhuijsen Piters, W. A., Van Houten, M. A., Chu, M. L. J., Kool, J. and Bogaert, D. 2019. Loss of microbial topography between oral and nasopharyngeal microbiota and development of respiratory infections early in life. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 200(6): 760-770.

Manson, J. M., Hancock, L. E. and Gilmore, M. S. 2010. Mechanism of chromosomal transfer of Enterococcus faecalis pathogenicity island, capsule, antimicrobial resistance, and other traits. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(27): 12269-12274.

Miller, W. R., Murray, B. E., Rice, L. B. and Arias, C. A. 2020. Resistance in vancomycin-resistant enterococci. Infectious Disease Clinics, 34(4): 751-771.

Mirzaei, B., Babaei, R., Asiabar, A. P. D. and Bameri, Z. 2015. Detection of both vanA & vanB genes in vanA phenotypes of Enterococci by Taq Man RT-PCR. Brazilian Journal of Microbiology, 46: 161-165.

Molechan, C., Amoako, D. G., Abia, A. L. K., Somboro, A. M., Bester, L. A. and Essack, S. Y. 2019. Molecular epidemiology of antibiotic-resistant Enterococcus spp. from the farm-to-fork continuum in intensive poultry production in KwaZulu-Natal, South Africa. Science of The Total Environment, 692: 868-878.

Monticelli, J., Knezevich, A., Luzzati, R. and Di Bella, S. 2018. Clinical management of non-faecium non-faecalis vancomycin-resistant enterococci infection. Focus on Enterococcus gallinarum and Enterococcus casseliflavus/flavescens. Journal of Infection and Chemotherapy, 24(4): 237-246.

Mu, A., Carter, G. P., Li, L., Isles, N. S., Vrbanac, A. F., Morton, J. T. and Stinear, T. P. 2020. Microbe-metabolite associations linked to the rebounding murine gut microbiome postcolonization with Vancomycin-resistant Enterococcus faecium. Msystems, 5(4): e00452-20.

Muratani, T. and Matsumoto, T. 2004. Bacterial resistance to antimicrobials in urinary isolates. International Journal of Antimicrobial Agents, 24: 28-31.

Olearo, F., Both, A., Campos, C. B., Hilgarth, H., Klupp, E. M., Hansen, J. L. and Rohde, H. 2021. Emergence of linezolid-resistance in vancomycin-resistant Enterococcus faecium ST117 associated with increased linezolid-consumption. International Journal of Medical Microbiology, 311(2): 151477.

Otokunefor, K., Famakin, B. O. and Douglas, D. O. 2020. Assessment of door handles as potential reservoirs of drug-resistant enterococci. Bulletin of the National Research Centre, 44(1): 1-7.

Papagiannitsis, C. C., Medvecky, M., Chudejova, K., Skalova, A., Rotova, V., Spanelova, P. and Hrabak, J. 2017. Molecular characterization of carbapenemase-producing Pseudomonas aeruginosa of Czech origin and evidence for clonal spread of extensively resistant sequence type 357 expressing IMP-7 metallo-β-lactamase. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(12): e01811-17.

Pestana, E., Belak, S., Diallo, A., Crowther, J. R. and Viljoen, G. J. 2010. Early, rapid and sensitive veterinary molecular diagnostics-real time PCR applications. Springer Science & Business Media, 10(2).

Pokhrel, S. and Chhetri, R. 2021. A literature review on impact of COVID-19 pandemic on teaching and learning. Higher Education for the Future, 8(1): 133-141.

Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S. and Janda, W. M. 2020. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Jones & Bartlett Publishers, 1830 page, Massachusetts.

Pum, A., Ennemoser, M., Adage, T. and Kungl, A. J. 2021. Cytokines and chemokines in SARS-CoV-2 infections therapeutic strategies targeting cytokine storm. Biomolecules, 11(1): 91.

Rawson, T. M., Moore, L. S., Zhu, N., Ranganathan, N., Skolimowska, K., Gilchrist, M. and Holmes, A. 2020. Bacterial and fungal coinfection in individuals with coronavirus: a rapid review to support COVID-19 antimicrobial prescribing. Clinical Infectious Diseases, 71(9): 2459-2468.

Raza, T., Ullah, S. R., Mehmood, K. and Andleeb, S. 2018. Vancomycin resistant Enterococci: A brief review. Journal of Pakistan Medical Association, 68(5): 768-772.

Rudy, M., Nowakowska, M., Wiechuła, B., Zientara, M. and Radosz-Komoniewska, H. 2004. Antibiotic susceptibility analysis of Enterococcus spp. isolated from urine. Przeglad Lekarski, 61(5): 473-476.

Ruijter, J. M., Ruiz-Villalba, A., van den Hoff, A. J., Gunst, Q. D., Wittwer, C. T. and Van Den Hoff, M. J. 2019. Removal of artifact bias from qPCR results using DNA melting curve analysis. The FASEB Journal, 33(12): 14542-14555.

Shaker, N. B. and Ali, K. O. M. 2019. Role of IL-6 and IL-10 as biomarkers in diagnosis of bacteremia in hemodialysis patients. Al-Kufa University Journal for Biology, 11(2).

Shi, Y., Wang, G., Cai, X. P., Deng, J. W., Zheng, L., Zhu, H. H. and Chen, Z. 2020. An overview of COVID-19. Journal of Zhejiang University-Science B, 21(5): 343-360.

Shimizu, K. 2020. 2019-nCoV, fake news, and racism. The Lancet, 395(10225): 685-686.

Shridhar, S. and Dhanashree, B. 2019. Antibiotic susceptibility pattern and biofilm formation in clinical isolates of enterococcus spp. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases, 2019(4): 2-7.

Singh, J. and Singh, J. 2020. COVID-19 and its impact on society. Electronic Research Journal of Social Sciences and Humanities, 2.

Tamayo-Velasco, Á., Peñarrubia-Ponce, M. J., Álvarez, F. J., Gonzalo-Benito, H., De la Fuente, I., Martín-Fernández, M. and Gómez-Sánchez, E. 2021. Evaluation of cytokines as robust diagnostic biomarkers for COVID-19 detection. Journal of Personalized Medicine, 11(7): 681.

Tille, P. 2015. Bailey & Scott's diagnostic microbiology-e-book. Elsevier Health Sciences, 1136 page, Amsterdam.

Toc, D. A., Butiuc-Keul, A. L., Iordache, D., Botan, A., Mihaila, R. M., Costache, C. A. and Junie, L. M. 2022. Descriptive analysis of circulating antimicrobial resistance genes in Vancomycin-resistant Enterococcus (VRE) during the COVID-19 pandemic. Biomedicines, 10(5): 1122.

Torres, C., Alonso, C. A., Ruiz-Ripa, L., León-Sampedro, R., Del Campo, R. and Coque, T. M. 2018. Antimicrobial resistance in Enterococcus spp. of animal origin. Antimicrobial resistance in bacteria from livestock and companion animals. Wiley Online Library, 185-227.

Tufan, A., Güler, A. A. and Matucci-Cerinic, M. 2020. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposingantirheumatic drugs. Turkish Journal of Medical Sciences, 50(9): 620-632.

Vanek, D., Silerova, M., Urbanova, V., Saskova, L., Dubska, J. and Beran, M. 2011. Genomic DNA extraction protocols for bone samples: the comparison of Qiagen and Zymo research spin columns. Forensic Science International: Genetics Supplement Series, 3(1): 397-398.

Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J. and Peng, Z. 2020. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. Jama, 323(11): 1061-1069.

Wen, Z., Xie, G., Zhou, Q., Qiu, C., Li, J., Hu, Q. and Wen, F. 2018. Distinct nasopharyngeal and oropharyngeal microbiota of children with influenza A virus compared with healthy children. BioMed Research International, 2018.

Yam, E. L. Y. 2020. COVID-19 will further exacerbate global antimicrobial resistance. Journal of Travel Medicine, 27(6).

Yang, L., Liu, S., Liu, J., Zhang, Z., Wan, X., Huang, B. and Zhang, Y. 2020. COVID-19: immunopathogenesis and Immunotherapeutics. Signal Transduction and Targeted Therapy, 5(1): 1-8.

Yim, J., Smith, J. R. and Rybak, M. J. 2017. Role of combination antimicrobial therapy for vancomycin-resistant Enterococcus faecium infections: review of the current evidence. Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy, 37(5): 579-592.

Yuki, K., Fujiogi, M. and Koutsogiannaki, S. 2020. COVID-19 pathophysiology: A review. Clinical Immunology, 215: 108427.

Zaim, S., Chong, J. H., Sankaranarayanan, V. and Harky, A. 2020. COVID-19 and multiorgan response. Current Problems in Cardiology, 45(8): 100618.

Zhao, Q., Meng, M., Kumar, R., Wu, Y., Huang, J., Lian, N. and Lin, S. 2020. The impact of COPD and smoking history on the severity of COVID-19: A systemic review and meta-analysis. Journal of Medical Virology, 92(10): 1915-1921.

Zhu, L., She, Z. G., Cheng, X., Qin, J. J., Zhang, X. J., Cai, J. and Li, H. 2020. Association of blood glucose control and outcomes in patients with COVID-19 and pre-existing type 2 diabetes. Cell Öetabolism, 31(6): 1068-1077.

EKLER

EK 1. Anket Formu

EK 2. Gram boyama ile *E. faecalis*'in (100X) mikroskobik görünümü

EK 3. *E. faecalis*'in kan agar'da hemolitik olmayanlarla büyümesi

EK 4. 105°C ve %0,1 metilen mavisi ile büyüme

EK 5. *E. faecalis*'inAPI 20 strep ile tanımlanması

EK 6. *E. faecalis*'inantibiyotik duyarlılık testi

EK 7. Bakterilerin biyokimyasal testle tanımlanması: (A) *E. coli* (B) *K. pneumonia*

EK 8. Mannitol salt agar'da *S. aureus*'un büyümesi

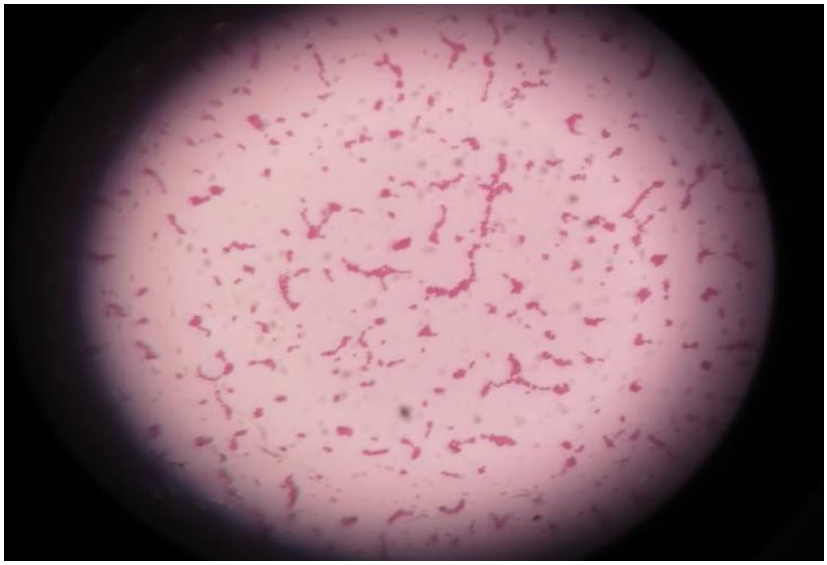
EK 9. MacConkey agar'da *E. coli*'nin büyümesi

EK 10. MacConkey agar'da *K. pneumonia*'nın büyümesi

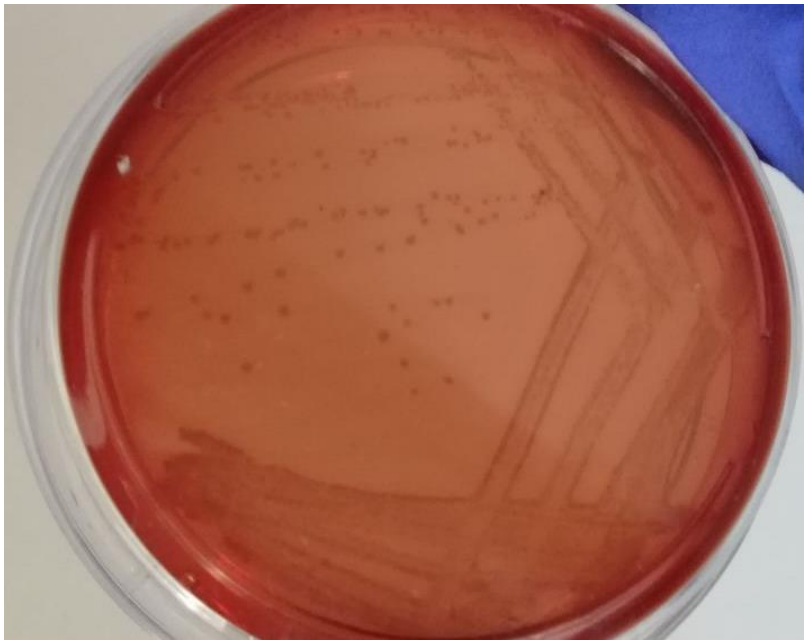
EK1. Anket Formu

Vaka No:							
İsim:							
COVID-19 Kontrolü							
PCR sonucu:		**Pozitif**			**Negatif**		
Sigara kullanımı:	**Evet**				**Hayır**		
Yaş:							
Cinsiyet:			**Kadın**				**Erkek**
Ağırlık:							
Boy:							
BMI:							
PO_2: %			**Akciğer tutulumu: %**				
Hafif		**Orta**			**Şiddetli**		

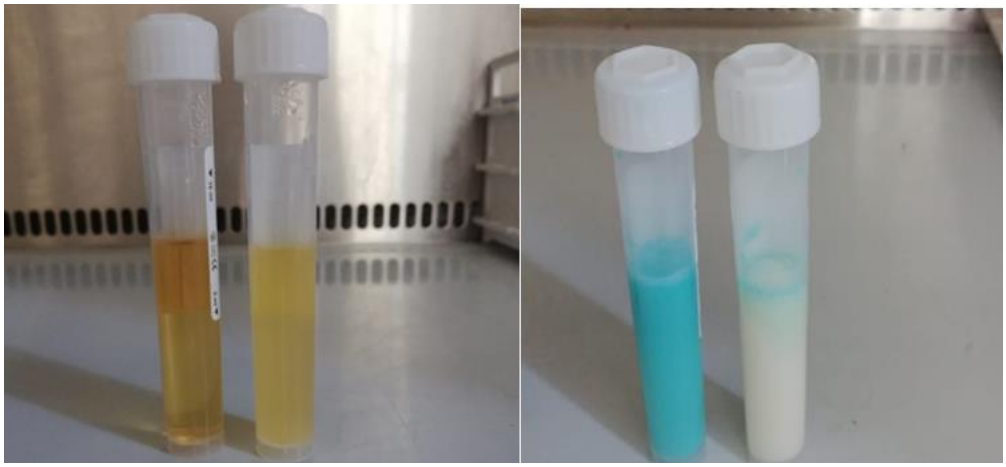
EK 2.Gram boyama ile *E. faecalis*'in (100X) mikroskobik görünümü



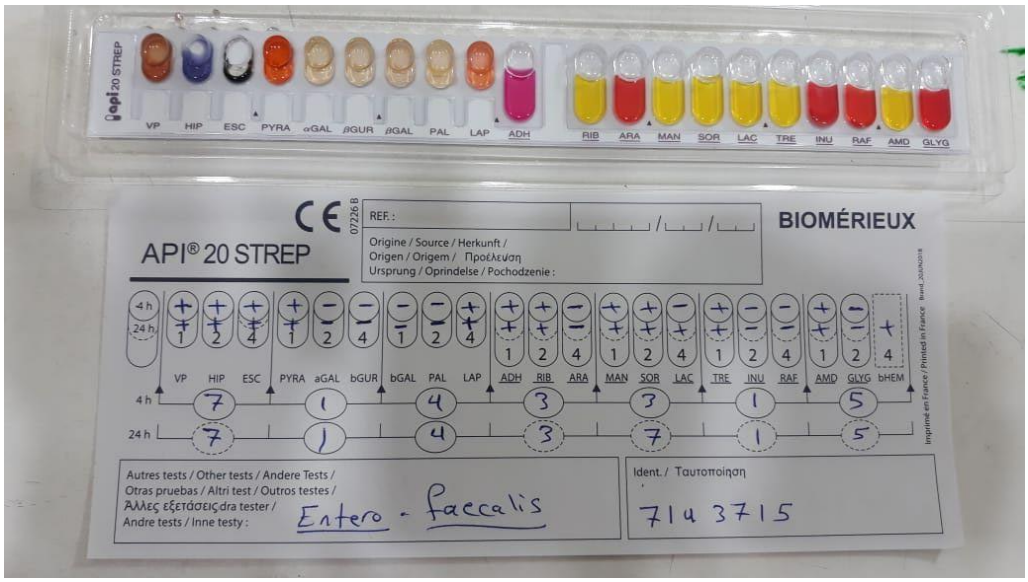
EK 3.*E. faecalis*'in kan agar'da hemolitik olmayanlarla büyümesi



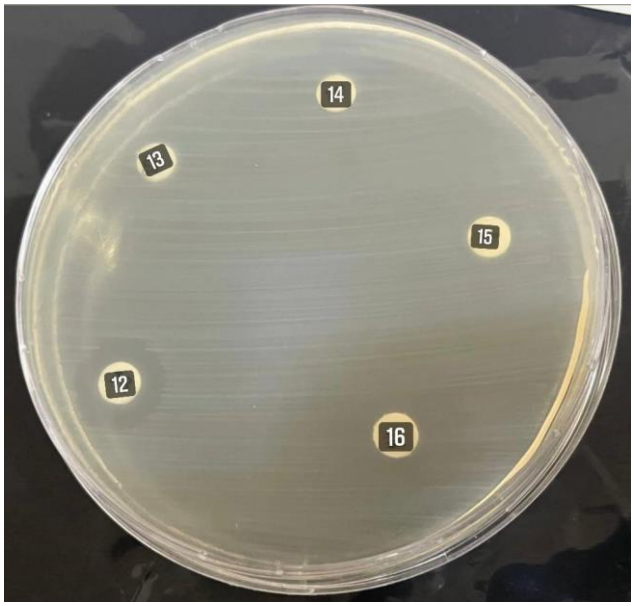
EK 4.105°C ve %0,1 metilen mavisi ile büyüme



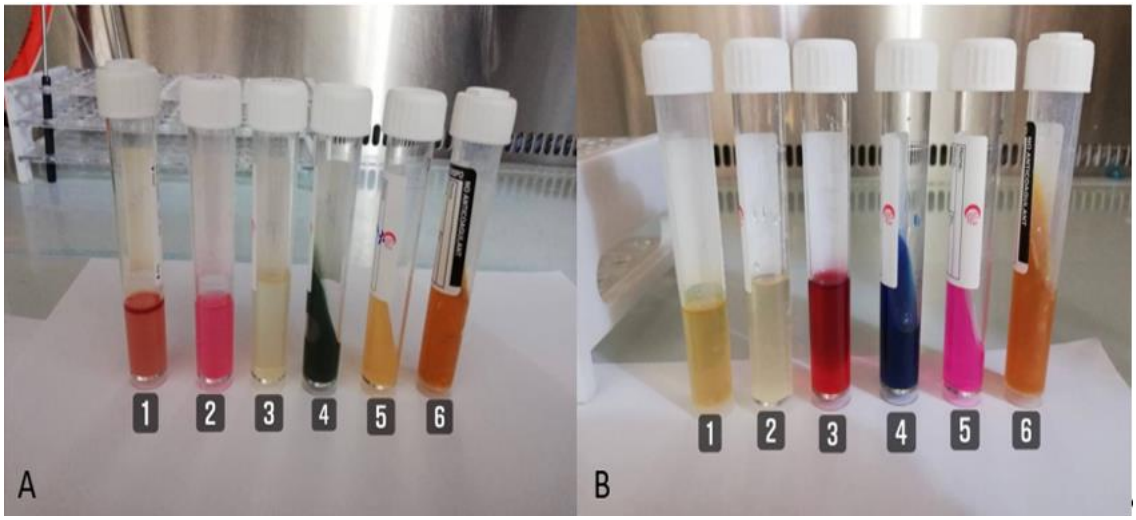
EK 5. *E. faecalis*'inAPI 20 strep ile tanımlanması



EK 6. *E. faecalis*'inantibiyotik duyarlılık testi



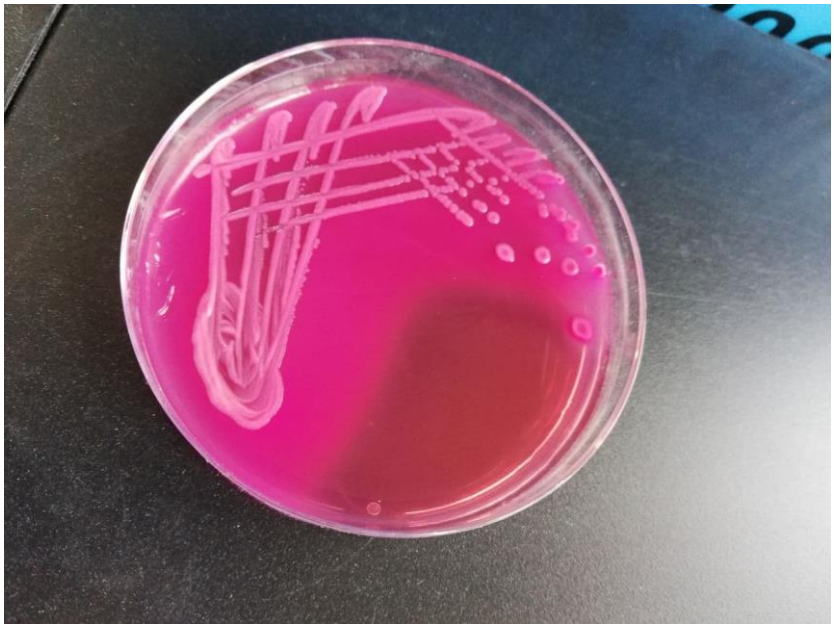
EK 7. Bakterilerin biyokimyasal testle tanımlanması: (A) *E. coli* (B) *K. pneumonia*



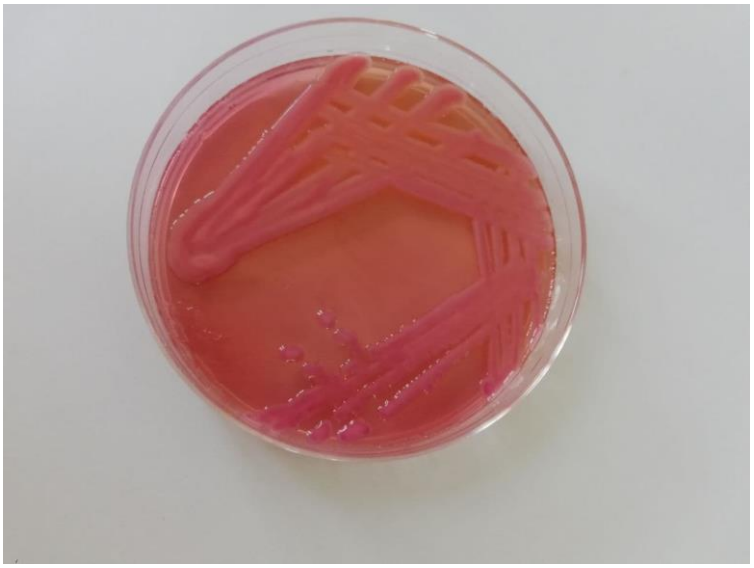
EK 8. Mannitol salt agar'da *S. aureus*'un büyümesi



EK 9. MacConkey agar'da *E. coli*'nin büyümesi



EK 10. MacConkey agar'da *K. pneumonia'*nın büyümesi



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Ali Hussein Ahmed DABBAGH

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020-Halen
Lisans	Kerkük Üniversitesi Bilim Fakültesi Biyoloji Bölümü	2010-2014