

HATİCE KÜBRA AKAY

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ SAĞ. BİL. ENST.

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İSTANBUL-2012

**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

(YÜKSEK LİSANS TEZİ)

**ALERJİK DERMATİT VEYA ASTİM TANISI ALMIŞ
ÇOCUKLARLA SAĞLIKLI ÇOCUKLAR ARASINDA
BAĞIRSAK FLORASINDAKİ BIFIDOBACTERIUM
TÜRLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

HATİCE KÜBRA AKAY

**DANIŞMAN
DOÇ. DR. HRİSİ BAHAR**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**

İSTANBUL-2012

TEZ ONAYI

Aşağıda tanıtımı yapılan tez, jüri tarafından başarılı bulunarak Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

/ /

Enstitü Müdürü

Kurum : İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
 Program Adı : Tıbbi Mikrobiyoloji
 Programın seviyesi : Yüksek Lisans ☒ Doktora ☐
 Anabilim Dalı : Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
 Tez Sahibi : Hatice Kübra AKAY
 Tez Başlığı : "Alerjik Dermatit veya Astım Tanısı Almış Çocuklarla Sağlıklı Çocuklar Arasında Bağırsak Florasındaki Bifidobacterium Türlerinin Karşılaştırılması"

Sınav Yeri : Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
 Sınav Tarihi : 28 / 06 / 2012

Tez Sınav Jürisi

Ünvanı Adı Soyadı Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı

1.Prof.Dr.Nuri KIRAZ İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

2.Doç.Dr.Hrisi BAHAR(Danışman) İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

3.Prof.Dr.Müzeyyen MAMAL TORUN İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

4.Prof.Dr.Bekir S.KOCAZEYBEK İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

5.Prof.Dr.Ayhan DEVİREN İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Hatice Kübra AKAY



İTHAF

Beni yetiştiren büyüklerime ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, desteğini benden esirgemeyen, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı, değerli hocam Prof. Dr. Nuri KİRAZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Mikrobiyoloji eğitimine başladığım ilk günden beri, bana anne şefkati ile doğru ve yanlış gösteren, aşıladığı özgüvenle çalışma şevkimi arttıran, bilgi ve tecrübeleriyle her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Doç. Dr. Hrisi BAHAR'a teşekkürlerimi bildiririm.

Tez çalışmam süresince bilgilerini ve desteğini benden esirgemeyen, Anaerob Bakteriyoloji alanında yetişmemde büyük emeği geçen değerli hocam Prof. Dr. Müzeyyen MAMAL TORUN'a teşekkürü bir borç bilirim..

Yetişmemde emeği geçen değerli hocalarım başta Prof. Dr. MUSTAFA SAMASTI'ya, Prof. Dr. Bekir S. KOCAZEYBEK'e, Prof. Dr. Arif KAYGUSUZ'a, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN'e, Prof. Dr. Nevriye GÖNÜLLÜ'ye, Prof. Dr. Ömer KÜÇÜKBASMACI'ya, Prof. Dr. Murat HÖKELEK'e, Doç. Dr. Kenan MİDİLLİ'ye Yrd. Doç. Dr. Erdal POLAT'a, Doç. Dr. Suat SARIBAŞ'a, Doç. Dr. Fatma KÖKSAL ÇAKIRLAR'a, Doç. Dr. Mustafa ASLAN'a, ve Doç. Dr. Sevgi ERGİN'e teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin gerçekleşmesi için numunelerin toplanması aşamasında bana her türlü imkanı sağlayan ve hoşgörüsü ile destek olan Kanuni Sultan Süleyman Halkalı Eğitim-Araştırma Hastanesi Başhekimi Uz. Dr. Rengin ŞİRANECİ, Başhekim Yard. Uz. Dr. Hüsem HATİPOĞLU, Allerji-İnfeksiyon ve Sütçocuğu Klinikleri hekimleri Uz. Dr. Nevin HATİPOĞLU, Uz. Dr. Çiğdem Yılmaz AYDOĞMUŞ, Uz. Dr. Neval MUTLU ve Uz. Dr. Emel ATASOY'a aynı zamanda tüm hastane çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Bana tecrübeleri ile yol gösteren değerli ablam Msc. Biy. Hatice YAŞAR'a ve Dr. Pelin YÜKSEL'e, DNA izolasyonlarımda yardımlarını ve imkanlarını esirgemeyen Dr. Mert KUŞKUCU'ya ve dostum Biy. Esra KOSİF'e, bilgi ve tecrübelerini her zaman benimle paylaşan Dr. Vicdan ŞEMEN'e ve Msc. Biy. Zeynep GÜNGÖRDÜ'ye, laboratuvar çalışmalarımıda yakın ilgilerini ve desteklerini her zaman gördüğüm

Mustafa KIRKAN'a, Orhan YATMAZ'a, Lab. Ayfer KIRATLI'ya, Biy. Erol GÜNDÜZ'e, Lab. Nida KÜÇÜK'e, Msc Biy. Serhat SİREKBASAN'a, Msc. Biy. Achille Aime KANGABA'ya, ve tüm anabilim dalı asistan, öğrenci ve çalışanlarına içten teşekkürlerimi sunuyorum. Ayrıca Üsküdar-Bulgurlu 4-5 No'lu Aile Sağlık Merkezinden Dr. Ayşe Sarıçiçek ÖZKAN'a ve çalışma arkadaşlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Beni, maddi, manevi her konuda destekleyerek yetişmemde sonsuz emek harcayan ve yüksek lisans eğitimim süresince bana nice emekler veren kıymetli anneciğime, babacığım ve tüm aileme canı gönülden şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 13038

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER	Vİİ
TABLolar LİSTESİ.....	X
ŞEKİLLER LİSTESİ	Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ	Xİİİ
ÖZET	XVİİ
ABSTRACT.....	XVİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Bağırsak Mikroflorası	3
2.2. Bağırsak Mikroflorasının İşlevleri	4
2.2.1. Metabolik İşlevler	4
2.2.2. Trofik İşlevler	6
2.2.2.1. Epitelyal Hücre Çoğalması ve Farklılaşmasının Kontrolü.....	6
2.2.2.2. İmmün Sistemin Gelişiminin Kontrolü	6
2.2.3. Koruyucu İşlev	6
2.3. <i>Bifidobacterium</i> Cinsi	7
2.3.1. Tarihçe ve Taksonomi.....	7
2.3.2. Bifidobakterilerin Fenotipik Özelliklerine Göre Tanısı.....	8
2.3.2.1. Morfolojik Özellikleri	9
2.3.2.2. Fizyolojik Özellikleri	9
2.3.2.3. Biyokimyasal Özellikleri	10
2.3.2.4. Hücre Duvarının Bileşimi ve Fosfolipid Kompozisyonu.....	12
2.3.3. Bifidobakterilerin Genotipik Özelliklerine Göre Tanısı	12
2.4. <i>Bifidobacterium</i> Cinsinin Probiyotik Özellikleri	13
2.4.1. Probiyotik ve Prebiyotik Kavramı	13
2.4.2. <i>Bifidobacterium</i> Cinsinin Probiyotik Olarak Önemi	14

Protein metabolizmasının iyileştirilmesi.....	14
Vitamin metabolizmasının iyileştirilmesi:	14
Böbrek rahatsızlıklarını giderme:.....	14
Bağıışıklık sistemini aktifleştirme etkileri:	15
Laktoz kullanımının iyileşmesi:	15
İshal ve kabızlığın önlenmesi:.....	15
Antimikrobiyal etkileri:.....	15
Antikanserojenik (antikanser) aktivite:	15
Serum kolesterol düzeyinin azaltılması:	16
Alerjik hastalıkların belirtilerinin hafifletilmesi:	16
2.5. Alerjik Dermatit ve Astım	16
2.5.1. Alerjik (Atopik) Dermatit	16
Patogenez:	16
Klinik ve laboratuvar tanısı:.....	16
Tedavi:.....	17
2.5.2. Astım.....	18
Allergenler ve astım ilişkisi:	18
Patogenez:	19
Klinik ve laboratuvar tanısı:.....	19
Tedavi:.....	20
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Gereçler.....	21
3.1.1. Kullanılan Besiyerleri	21
3.1.1.1. TPY (Trypticase Phytone Yeast) Sıvı Besi yeri.....	21
3.1.1.2. Modifiye TPYA Besi yeri	22
3.1.1.3. Modifiye WCA (Wilkins-Chalgren Agar) Besi yeri.....	23
3.1.1.4. Modifiye MRSA (de Man Rogosa Sharpe) Besi yeri	23
3.1.1.5. DP Agar (Modifiye Columbia Agar) Besi yeri	24
3.1.1.6. Çikolatamsı Agar Besi yeri	24
3.1.2. Stok Solüsyonlar	25
3.1.2.1. Hemin Stok Solüsyonu (5 mg/ml).....	25
3.1.2.2. Vitamin K1 Stok Solüsyonu (1 mg/ml)	25
3.1.2.3. Kanamisin Stok Solüsyonu (100 mg/ml)	25

3.1.2.4. Dikloksasilin Stok Solusyonu (1 mg/ml)	25
3.1.2.5. PBS(Phosphate Buffered Saline- Sodyum Fosfat Tamponu)(pH=6,8).....	26
3.1.3. API 20-A Tanımlama Kiti ve Reaktifler	26
3.1.4. Bifidobakterilerin PZR İle Tanımlanmasında Kullanılan Malzemeler.....	26
3.1.4.1. Çözelti ve Tamponlar	26
3.1.4.2. Primerler.....	27
3.2. Yöntemler	28
3.2.1. Hastalara Ait Bilgilerin Yer Aldığı Formların Doldurulması	28
3.2.2. Hastalardan Örnek Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi.....	29
3.2.3. Anaerop Ortamın Sağlanması ve İnkübasyon.....	29
3.2.4. Bifidobakterilerin Tanımlanması	29
3.2.4.1. Gram Boyama ve Aerotolerans Testi	29
3.2.4.2. Api 20-A Kiti İle Tanımlama	29
3.2.4.3. PZR ile Tanımlama	30
3.2.5. İstatistikler.....	33
4. BULGULAR.....	34
5. TARTIŞMA	47
6. KAYNAKLAR	52
ETİK KURUL KARARI	63
ÖZGEÇMİŞ	64

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 2-1: Bağırsak mikroflorasını etkileyen faktörler –Turan (5)’ dan.....	4
Tablo 2-2: <i>Bifidobacterium</i> türlerinin değişik karbonhidratlara etkisi*-Biavati (54)’den değiştirilerek.	11
Tablo 3-1: Multipleks PZR çalışmasında kullanılan 7 farklı primerin özellikleri-Matsuki (112)’den.....	28
Tablo 3-2: API 20 A kitinde Bifidobakterilere ait biyokimyasal özellikler*	30
Tablo 3-3: PZR karışımı hazırlanmasında kullanılan maddelere ait miktarlar.....	32
Tablo 3-4: Multipleks PZR programı	33
Tablo 4-1: Astım veya Alerjik dermatit tanısı almış hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımı.....	31
Tablo 4-2: Sağlıklı çocukların yaş ve cinsiyet dağılımı	31
Tablo 4-3: Astım /Alerjik dermatit /Hem astım hem de alerjik dermatit tanısı almış hastaların cinsiyete göre dağılımı	36
Tablo 4-4: Anaerop kültürde üretilen ancak multipleks PZR için kullandığımız primerler ile tür düzeyinde tanımlanma yapılamayan numune ve köken sayısı.....	38
Tablo 4-5: Anerop kültürde katı besi yerinde üretilmeyen ancak PZR tekniği ile <i>Bifidobacterium spp</i> saptanan numune ve köken sayısı*	38
Tablo 4-6: Anerop kültürde katı besi yerinde üretilmeyen ve PZR tekniği ile <i>Bifidobacterium spp</i> saptanamayan numune sayısı	38
Tablo 4-7: PZR ile izole edilen <i>Bifidobacterium</i> türlerine ait kökenlerin hasta gruplarına göre dağılım oranı (%).	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Gastrointestinal sistem florasında mikroorganizmaların dağılımı	5
Şekil 2-2: Bağırsak ilişkili lenfoid doku (GALT) ve elemanları (44).	7
Şekil 2-3: <i>Bifidobacterium</i> cinsinin filogenisi – Biavati (54)’den	8
Şekil 2-4: Gram yöntemi ile boyanmış preparasyonda <i>Bifidobacterium longum</i> (58)...	10
Şekil 4-1: Astım veya alerjik dermatit tanısı almış hastaların yaş ve cinsiyetlere göre dağılım grafiği.....	35
Şekil 4-2: Sağlıklı çocukların yaş ve cinsiyet dağılım grafiği	35
Şekil 4-3: Astım /Alerjik dermatit / Hem astım hem de alerjik dermatit tanısı almış hastaların cinsiyete göre dağılım grafiği.....	36
Şekil 4-4: Anaerop kültürde üretilen toplam 306 Bifidobakteri kökeninin kullanılan besiyerlerinde üreme oranı.....	37
Şekil 4-5: mWCA besi yerinde üreyen farklı morfolojide Bifidobakteri kolonileri.....	39
Şekil 4-6: mWCA besi yerinde üreyen besi yeri zemini kaplamış halde kahverenkli Bifidobakteri kolonileri.....	39
Şekil 4-7: Bir hasta çocuğun gaita numunesinden, anaerop şartlarda ürettiğimiz farklı morfolojideki <i>Bifidobacterium</i> türlerinin Gram preparasyondaki görünümü.....	40
Şekil 4-8: Bir hasta çocuktan izole ettiğimiz Bifidobakteri suşu ile yapılan Apı 20-A testi sonuçları.	40
Şekil 4-9: Astımlı hasta çocuklardan izole edilen <i>Bifidobacterium</i> kökenlerinin sağlıklı çocuklardakine göre dağılım oranları (%).	41
Şekil 4-10: Alerjik dermatitli hasta çocuklardan izole edilen <i>Bifidobacterium</i> kökenlerinin, sağlıklı çocuklardakine göre dağılım oranları (%).	43
Şekil 4-11: Hem alerjik dermatit hem de astım tanısı almış hasta çocuklardan izole edilen <i>Bifidobacterium</i> kökenlerinin, sağlıklı çocuklardakilere göre dağılım oranları (%).	43
Şekil 4-12: Multipleks PZR tekniği ile saptanan <i>Bifidobacterium catenulatum</i> grubuna ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü..	44
Şekil 4-13: Multipleks PZR tekniği ile saptanan <i>B. pseudocatenulatum</i> ’a ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü.....	44
Şekil 4-14: Multipleks PZR tekniği ile saptanan <i>B. bifidum</i> ’a ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü..	44

Şekil 4-15: Multipleks PZR tekniği ile saptanan <i>B. longum</i> 'a ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü	45
Şekil 4-16: Multipleks PZR tekniği ile saptanan <i>B. adolescentis</i> 'e ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü.....	45
Şekil 4-17: Multipleks PZR tekniği ile saptanan <i>B. infantis</i> 'e ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü	45

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

µm: Mikrometre

16S- rRNA: 16 Swedberg birimi büyüklüğünde prokaryot ribozomal RNAsı

AD: Alerjik (Atopik) Dermatit

ARDRA: (Amplifiye olmuş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi)

B. adolescentis: *Bifidobacterium adolescentis*

B. bifidum: *Bifidobacterium bifidum*

B. breve: *Bifidobacterium breve*

B. catenulatum: *Bifidobacterium catenulatum*

B. infantis: *Bifidobacterium infantis*

B. pseudocatenulatum: *Bifidobacterium pseudocatenulatum*

B. longum : *Bifidobacterium longum*

BCP: Brom cresol purple(Brom kresol mavidi)

CaCl₂: Kalsiyum klorür

CD₄ +: (Cluster of differantion 4) Yardımcı T lenfositler.

cfu: colony forming unit,

CO₂: Karbondioksit

dATP: Deoksiadenozin trifosfat

dCTP: Deoksi Sitidin trifosfat

dGTP: Deoksi Guanozin trifosfat

dk: Dakika

DNA: Deoksiribonükleik Asit

dNTP : Deoksiribonükleotit trifosfat

DP: Modifiye Columbia Agar

dTTP: Deoksi Timidin trifosfat

E. coli: *Escherichia coli*

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

Eh: Oksidasyon- redüksiyon potansiyeli

EHR: Ehrlich ayracı

F-6-PPK: Fruktoz-6-Fosfat Fosfoketolaz

FeCl₃: Ferrik klorit

FISH: Floresan in situ Hibridizasyon

G+C: Guanin ve Sitozin bazları toplamı

GALT: Gut Associated Lymphoid Tissue(Bağırsak ilişkili lenfoid doku)

GIS: Gastrointestinal sistem

gr: gram

IgE: Immunoglobulin E

IgE: İmmunoglobulin E

IL -10: İnterlökin -10

IQ: 2-amino-3-metil-imidazol quinoline

ITS: (Transkripsiyonu Yapılamayan Bölgeler)

K₂HPO₄ : Dipotasyum mono hidrojen fosfat

KCl: Potasyum klorür

L (+) Laktik asit: Laktik asidin üç optik izomerinden ışığı sağa çeviren izomer

L: litre

m²: metre kare

Mg: miligram

MgCl 6H₂O: Magnezyum klorit anhidroz hekzahidrat

MgCl₂: Magnezyum klorür

ml: miliitre

Mm: milimetre

mMRS: Modifiye Man-Rogosa Sharpe

MRS: Man-Rogosa Sharpe

MRSA: Man Rogosa Sharpe Agar

N: Normalite

Na₂HPO₄ .12H₂O: Sodyum hidrojenfosfat

NADH: Nikotinamid Adenin Dinükleotit

NaH₂PO₄ .2H₂O: Sodyum dihidrojenfosfat

NaOH: Sodyum Hidroksit

°C: Santigrat derece

PBS: Phosphate Buffered saline(sodyum fosfat tamponu)

PEF metre: Peak Expiratory Flow(Tepe Akım Hızı Ölçer)

PFGE: Pulsed Field Gel Electrophoresis(Değişken Alanlı Jel Elektroforezi)

pH: asitlik –bazlık birimi [H⁺] iyonlarının - logaritması

PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RAPD: (Rastgele Amplifiye olmuş Polimorfik DNA)

RCA: Reinforced Clostridial Agar

Rec A: Çoğu bakteride bulunan yüksek oranda korunmuş bölge

RFLP: (Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi)

RNA: Ribonükleik asit

rpm: Round per minute(Dakikadaki dönüş sayısı birimi)

sn: Saniye

TAE: Tris bazı, asetik asit ve EDTA içeren tampon solusyon.

TBE: Tris, borik asit ve EDTA içeren tampon solusyon

TGF- β: Transforming Growth Factor(Değişiklik yapan beta büyüme faktörü)

TLR: Toll-Like Receptor

TPY: Trypticase Phytone Yeast (Triptikaz-Soya peptonu-Maya) besi yeri

T_{reg}: Regulator T hücreleri

Tris-HCl: Tris(hidroksimetil) aminometan hidroklorit

Tween 80: Polioksietilen 20 sorbitan monooleate

U: Ünite

UV: Ultraviyole(Morötesi Işık)

WCA: Wilkins Chalgren Agar

XYL: Ksilol

ZnSO₄7H₂: Çinko sülfat heptahidrat

α -kazein: Alfa kazein

ÖZET

Akay HK. Alerjik Dermatit Veya Astım Tanısı Almış Çocuklarla Sağlıklı Çocuklar Arasında Bağırsak Florasındaki *Bifidobacterium* Türlerinin Karşılaştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul. 2012.

Doğumda steril olan insan barsağı, çeşitli etkenlere bağlı olarak zengin bir mikrofloraya sahip olur. Bu flora Bağırsak İlişkili Lenfoid Doku sebebiyle immun sistemimizin gelişiminde de oldukça önemlidir. Bifidobakteri türleri yetişkin bağırsağındaki mikrofloranın %25'ini, yeni doğmuş bebeklerde ise % 95'ini oluşturan anaerop bakterilerdendir. Aynı zamanda bu bakteriler, bağırsakta, çeşitli vitaminlerin sentezinde ve bazı zararlı bağırsak metabolitlerini azaltmada rol alarak bağırsak florasını olumlu yönde etkilemektedirler. Son yıllarda kaynaklarda alerjik dermatit ve astım ile bağırsak florasında bulunan bifidobakteri türleri arasında ilişki olduğunu gösteren araştırmalara yer verilmiştir. Çalışmamızda astım veya alerjik dermatit tanısı almış çocuklara ait 100 gaita numunesi ile sağlıklı çocuklara ait 100 gaita numunesi, içerdiği bifidobakteri türleri yönünden incelenmiştir. Araştırmamızda sıvı transport (TPY) besi yeri ve dört farklı katı besi yeri kullanılmıştır. Kökenlerin en yüksek oranda (%83,3) ürettiği besi yeri mWCA olmuştur. Anaerop kültürde katı besiyerlerinden izole edilen kökenler API -20 A ile cins düzeyinde tanımlanmıştır. Bu kökenler ve ayrıca içinde numune bulunan sıvı (TPY) besi yerinden DNA'ları izole edilenler Multiplex PCR yöntemi ile tür spesifik primerler kullanılarak tür düzeyinde tanımlanmıştır. Elde edilen sonuçlara göre sağlıklı çocuklardan en fazla izole edilen tür *B. pseudocatenulatum* (%52) olurken en az izole edilen tür *B. infantis* (%5) olmuştur. Astımlı çocuklarda ise en fazla izole edilen tür *B. breve* (%41,79) olurken en az izole edilen tür *B. adolescentis* (%1,49) olmuştur. Alerjik dermatitli çocuklardan da en fazla izole edilen tür *B. breve* (%29,16) olurken *B. infantis* (%5) hiç izole edilememiştir. Sağlıklı çocuklarla karşılaştırıldığında *B. longum* her iki hasta grubunda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalırken aynı zamanda tüm bifidobakteri türlerinde de genel bir azalma görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Bağırsak florası, alerjik dermatit, astım, *bifidobacterium*, anaerop bakteriler

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 13038

ABSTRACT

Akay HK. Comparison of Bifidobacterium species in gut flora of healthy children and children with allergic dermatitis or asthma. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Medical Microbiology. Thesis of Master of science. Istanbul. 2012.

The human gut being sterile at first, gets a rich microflora after birth, depending to the various factors. This flora is also, due to Gut Associated Lymphoid Tissue, very important for the development of the immune system. Bifidobacterium species, are anaerobic bacteria that comprise 95% of the newborn's gut flora and 25% of the adult's. Additionally these bacteria can affect gut flora positively by synthesis of different vitamins and reduction of the harmful gut metabolites. Recently, researches showing the relationship among asthma, allergic dermatitis and Bifidobacteria of the gut flora were demonstrated. In our study 100 fecal samples collected from children diagnosed with asthma or allergic dermatitis and 100 ones from healthy children were studied regarding to their Bifidobacterium species content. We used a transport liquid medium and four types of agar plate. The best media that our strains grew was mWCA with a rate of %83.3. The strains isolated from agar plates under anaerobic conditions were identified with API-20 A on genus level. The same strains and the DNA isolated from liquid medium (TPY) containing the sample were identified on species level by using species-specific primers with Multiplex PCR. *B. pseudocatenulatum* and *B. infantis* have respectively the highest (%52) and fewest (%5) rates, on the healthy children's gut flora isolated species. *B. breve* was the highest isolated species (%41.79) in asthmatic children and the fewest one was *B. adolescentis* (%1.49). In atopic children, the highest isolated species was *B. breve* (%29.16). Compared to the healthy children's fecal flora, in patient ones *B. longum* decreased with a statistically significant difference. Additionally a general decrease was seen in all bifidobacteria species.

Key Words: Gut flora, atopic dermatitis, asthma, bifidobacterium, anaerobic bacteria

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 13038

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğumda steril olan bağırsaklarda, birinci haftadan sonra, doğum şekli, genetik özellikler, çevresel temas, beslenme şekli gibi faktörlere bağlı olarak her bireye özgü yaklaşık 500 den fazla tür ve 10^{14} bakteriyi içeren gastrointestinal mikroflora gelişir (1-4). Bu haliyle insan bağırsak florası doğadaki en kompleks ekosistemlerden biridir ve bağırsak lümenindeki bakteri sayısı insan vücudundaki ökaryotik hücre sayısının yaklaşık 10 katı kadardır. Özellikle terminal ileum ve kalın bağırsakta lümeninde sayıca artan bu mikroflora "Unutulmuş organ" olarak adlandırılacak kadar çok önemli biyolojik aktiviteye sahiptir (1-4, 5-7).

Bu mikroflora içinde laktik asit üretmeleriyle bilinen, yenidoğanda yaklaşık %95, yetişkinde ise %25 oranda bulunan anaerob bakteriler olan bifidobakteriler önemli yer tutarlar (8,9). Bifidobakteriler süt proteinlerinin absorpsiyonuna katkıda bulunarak protein, B₁, B₂, B₆, B₁₂ vitaminleri ayrıca nikotinik asit ve folik asit üreterek de vitamin metabolizmasının iyileştirilmesine yardımcı olurlar (10-13).

Ayrıca nitrojen kaynağı olarak amonyak kullanan bifidobakteriler, amonyak ve amin üreten mikroorganizmaların gelişimine engel oldukları için ve oluşturdukları organik asitler sayesinde bağırsak pH'sının düşmesine sebebiyet verdiklerinden kan amonyak düzeyini azaltmada ve böbrek rahatsızlıklarını gidermede etkilidirler (10,14). Bundan başka yapılan çeşitli deneylerde bağışıklık sistemini aktifleştirmede, laktoz sindiriminin iyileştirilmesinde, ishal ve kabızlığı önlemede, serum kolesterol düzeyinin azaltılmasında etkili oldukları saptanan bifidobakterilerin antimikrobiyal ve antikanserojen özellikleri de onların günlük diyetle ve tedavide kullanımlarındaki önemi vurgulamaktadır (10,11, 13-19).

Alerjik (Atopik) dermatit (AD), çoğunlukla yeni doğan ve 0-6 yaş arası erken çocukluk çağında başlayan, genetik faktörlerin eşlik ettiği, çeşitli allerjenlerle tetiklenebilen, tekrarlayan, kronik, inflamatuvar bir deri hastalığıdır (20-23). Astım ise vücuttaki birçok hücre ve hücre ürününün rol oynadığı, havayollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Kronik havayolu inflamasyonu ve ilişkili bronş aşırı duyarlılığı özellikle geceyarısı veya sabaha karşı hışıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkışıklık ve öksürük nöbetlerine yol açar (24).

Son yıllarda alerjik rahatsızlıklardan, özellikle alerjik astım ve alerjik dermatit ile bağırsak florasında yer alan *Bifidobacterium* türleri arasındaki ilişkinin anlaşılmasına yönelik araştırmalara ağırlık verilmiştir (25). Šmehilova. M ve ark. (26) 2007 yılında yaptıkları bir araştırmada alerjik bebeklerin barsağında *Bifidobacterium* türlerinin sayısında azalma olduğunu ve bunların yerine *Clostridium* türlerinin sayıca arttığını göstermişlerdir. Aynı çalışmada, sağlıklı bebeklerin gaitalarından yapılan anaerob kültürlerde *Bifidobacterium longum* en fazla bulunan tür iken (%54.5) bunu *B. adolescentis*, *B. breve* ve *B. bifidum* gibi diğer türler izlemiştir. Sarah L. Young ve ark. (27) 2004 yılında yaptıkları bir çalışmaya göre, alerji insidansının düşük olduğu Gana gibi ülkelerde 25-35 günlük bebeklerden alınan gaita örneklerinin hepsinde *Bifidobacterium infantis*'e rastlanırken alerji insidansının yüksek olduğu diğer ülkelerde 25-35 günlük bebeklerde, bağırsak florasında bu türün belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir.

Benzer şekilde Björkstén ve ark. (28) 1999 yılında yaptıkları çalışmada alerjik bebeklerin bağırsaklarında alerjik olmayanlara göre laktobasil ve bifidobakterlerin daha az kolonize olduklarını saptamışlardır.

Çalışmamızda, alerjik dermatit veya astım tanısı almış çocuklarla sağlıklı çocuklar arasında bağırsak florasındaki *Bifidobacterium* türlerinin karşılaştırılması, elde edilen sonuçlarla çocuklarda alerjik dermatit ve/veya astım ile *Bifidobacterium* türleri arasındaki ilişkinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bağırsak Mikroflorası

Gastrointestinal sistem (GİS) doğum sırasında steril iken saatler içerisinde mikroorganizmalar ile kolonize olur. Gastrointestinal sistemin kolonizasyonu, çeşitli etmenlerin dinamik bir etkileşimiyle oluşan karmaşık bir olaydır (29). GİS içinde bağırsak kolonizasyonu ise GALT (Bağırsak ilişkili lenfoid doku) sebebiyle önem arz eder ve yaşam boyu devam eden bu süreç evrelere bölünecek olursa şöyle özetelenebilir (30, 31):

Evre 1: Doğum sırası . Bu evrede başlıca aerobik bakterilerin (*Escherichia coli*, *Enterococcus* vb..) anneden alınmasıyla oluşan başlangıç kolonizasyonudur.

Evre 2: Doğum sonrası 2. haftadan itibaren ilk floranın oluşmasıdır. Bağırsak, kompleks karbonhidratları parçalayan aerobik ve anaerobik (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) bakteriler tarafından kolonize olur. Emzirme ve deriden temas aracılığıyla yenidoğan anneden aldığı bakterilerle kolonize olur.

Evre 3: Normal beslenme dönemi. Sütten başka gıda maddelerinin alınmasını takiben bağırsağın, başta anaeroplara (*Eubacterium*, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Clostridium* vb...) olmak üzere, pek çok mikroorganizma ile kolonizasyondur. Bu safha yetişkinlerdeki durumdur ve mikroorganizmalar arasında denge mevcuttur.

Evre 4: Yaşlılık dönemi. Mikrobiyal denge bozulur; özellikle anaeroplardan *Clostridium* türlerinde artma ve *Bifidobacterium* sayısında azalma görülür.

Normal beslenme dönemindeki bir insanın intestinal florası yaklaşık 10^{12} hücre/gr kuru ağırlık oranında ve 400-500 türden bakteri içermektedir (32, 33). Bunun vücut ağırlığına yaklaşık 700 gr kattığı ve insanın sahip olduğu kadar hatta daha fazla hücre içerdiği göz önüne alınırsa kalın bağırsakların oldukça özelleşmiş ve aktif bir organ olduğu anlaşılmaktadır (5-7, 29-31).

Gastro-intestinal floradaki mikro-organizma çeşitliliği ve sayısı, iç (örneğin; gastro-intestinal sekresyonlar) ve dış faktörlere (örneğin; diyet, stres, ilaç) bağlıdır (Tablo 2-1). Ağız florasında daha yüksek veya düşük pH değerleri, midenin asidik pH'sı, ince bağırsakta peristaltizm ve kolonda anaerob ortam(düşük oksidasyon- redüksiyon

potansiyeli) gibi faktörler gastro-intestinal kanalın farklı kısımlarındaki flora içeriğini etkilemektedir (Şekil 2-1) (5).

Tablo 2-1: Bağırsak mikroflorasını etkileyen faktörler –Turan (5)’ dan.

Faktör	Etkilenen populasyon(lar)
Eh*	Zorunlu anaeroplara
Ph	Tüm bakteriler
Kısa zincirli yağ asitleri	<i>Enterobacteriaceae</i>
Safra asitleri	Birçok tür, özellikle <i>Clostridium</i> türleri
Besinler	Tüm bakteriler
Bağlanma bölgesi için yarışma	?
Besinler için yarışma	?
Konakçı immun faktörleri	?

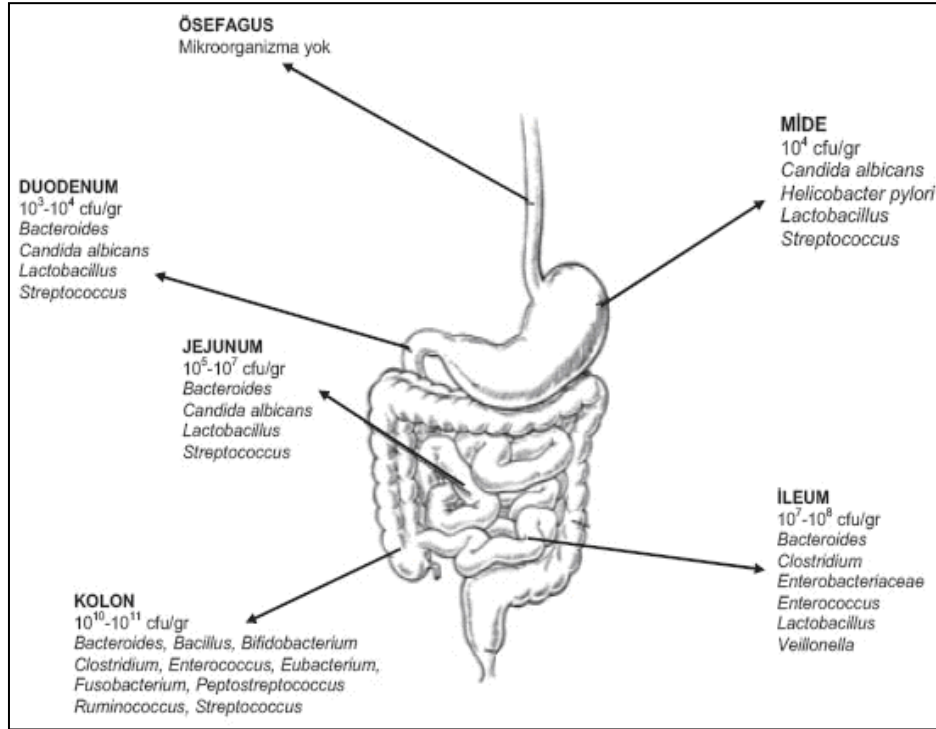
* Eh: oksidasyon –redüksiyon potansiyeli

2.2. Bağırsak Mikroflorasının İşlevleri

Normal bağırsağın yapısı ve fonksiyonları içinde yer alan motilite, sekresyon, absorpsiyon, hücre kompozisyonu, mitotik aktivite, villöz yapının uzunluğu, kriptlerin derinliği gibi özelliklerin, konakçı ile bağırsakta kolonize olan mikro-organizmaların karmaşık bir etkileşiminin son noktası olduğunu destekleyen çok sayıda kanıt vardır (34-35). Bağırsak florasının işlevleri üç başlık altında toplanmaktadır. Bunlar: Metabolik işlevler, trofik işlevler ve koruyucu işlevlerdir.

2.2.1. Metabolik İşlevler

Bu işlevler, sindirilemeyen diyetel kalıntıların ve endojen mukusun fermentasyonu, enerjinin kısa zincirli yağ asitleri aracılığıyla korunması, vitamin K yapımı, iyonların absorpsiyonu gibi görevleri kapsamaktadır.



Şekil 2-1: Gastrointestinal sistem florasında mikroorganizmaların dağılımı

(33).

Kalın bağırsaktaki bakteriyel floranın yaşamını devam ettirebilmesi için gerekli maddeler, üst GİS'te digesyona ve absorbsiyona uğrayamadığı için kolona gelen özellikle lifli yiyecek artıkları, lümene salgılanan mukus, lümene dökülen epitel hücreleri, parçalanmış bakteri ve mayalardır. Bunlardan karbonhidrat yapıda olanların (polisakkarit yapıdaki selüloz, hemiselüloz, pektin, zamklar, nişasta, oligosakkarit, tatlandırıcılar, absorbe olmayan şekerler) fermentasyonu sonucu ortaya çıkan kısa zincirli yağ asitleri (laktik, asetik, bütirik asit) kolon epiteli için önemli enerji kaynağıdır. Kolonda bulunan protektif mikropların metabolizması sonucu artık materyalden ortaya çıkan kısa zincirli yağ asitleri, aminoasitler, polyaminler, büyüme faktörleri, vitaminler, antioksidanlar absorbe olarak kalın bağırsak hücrelerinin gereksinimini karşılarlar (36). Protein ve peptidlerin mikroflora tarafından metabolizması (Pütrefikasyon) sonucu ise kısa zincirli yağ asitleri oluşumunun yanı sıra toksik maddeler (Amonia, aminler, phenol, tiol, indoller gibi) meydana gelmektedir. (36). Oluşan bu toksik maddeler karaciğer bozukluğu olan kişilerde detoksifiye edilemez. Fakat bağırsak florasındaki laktik asit bakterilerinin ürettikleri organik asitler sayesinde bağırsak pH'sı düşer (13, 37) ve bu sayede amonyak yada

potansiyel olarak toksik diğ er azotlu bileşiklerin üretimi ve absorpsiyonu inhibe edilmiş olur (38-39).

2.2.2. Trofik  şlevler

Bu  şlevler; a. Epitelyal hücre çoğalması ve farklılaşmasının kontrolü, b.  mm n sistemin gelişiminin kontrolünü kapsamaktadır.

2.2.2.1. Epitelyal Hücre çoğalması ve Farklılaşmasının Kontrolü

Kolonda oluşan kısa zincirli yağ asitlerinin kolon fizyolojisi içindeki en önemli etkisi, intestinal epitel üzerindeki trofik etkisidir. Mikropsuz ortamda yetişen sıçanların kolonlarında kript hücrelerinin yapım oranı azalmıştır ve kriptler daha az hücre içerirler. Bu da intraluminal bakterilerin kolonda hücre proliferasyonu üzerine önemli etkilerinin olduğunu düşündürmektedir (5, 40).

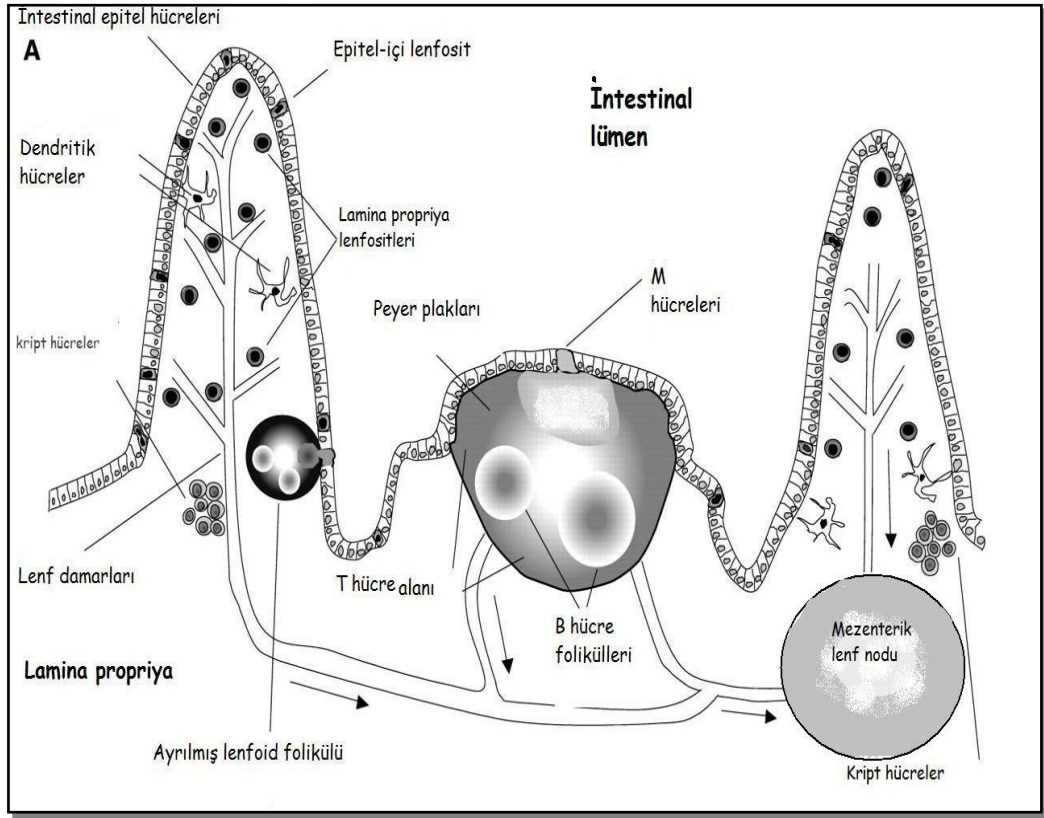
2.2.2.2.  mm n Sistemin Gelişiminin Kontrolü

Gastrointestinal sistem 300-400 m² yi bulan geniş mukozal yüzey alanı ile besinsel antijenler, patojen mikroorganizmalar ve çevresel ajanlarla karşı karşıya kalmaktadır (1, 2). Karşılaşılan bu ajanlara karşı intestinal epitel bariyeri, mukozal immün sistem ve intestinal mikroflora yardımı ile gelişmiş bir savunma sistemi kurulmuştur (1, 3, 4, 41). Epitel yüzeyindeki mukus bariyeri ve epitel hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar yardımı ile bakteri ve antijenlerin bağırsak lümeninden dolaşıma geçmeleri engellenir. Bariyer fonksiyonunun önemli bir komponenti de mukozal immün sistemdir. Peyer plaklarında yerleşen lenfositlerden oluşan GALT vücuttaki immün hücrelerin %70-80'ini oluşturur ve en büyük immün organdır. Peyer plaklarının üzerlerinde bulunan özel epitel hücreleri (M hücreleri) ile bağırsak lümenindeki antijenler alınır ve lokal dendritik hücrelerde işlenip CD₄⁺ regülatör T hücre popülasyonlarının (T_{reg}) sonraki eğitimleri için sunulur (şekil 2-2). Normal floraya ait canlı ya da cansız antijen örnekleri sürekli lümenden örneklenip tanınarak, efektör lenfositleri suprese edecek olan IL -10, TGF-   gibi sitokinlerin salınımı ile antijene tolerans sağlanır. GALT potansiyel patojenlere karşı da hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık açısından en önemli savunma organıdır (1).

2.2.3. Koruyucu  şlev

Barsağın patojenlere karşı koruma görevini kapsar. Flora bakterileri, dış kaynaklı mikropların kolonizasyonuna karşı önemli bir direnç hattı sağlayıp patojenlerin

doku invazyonunu önlerken normalde bağırsakta bulunan fırsatçı patojenlerin de aşırı çoğalmasını kontrol altında tutarlar (5, 42, 43).



Şekil 2-2: Bağırsak ilişkili lenfoid doku (GALT) ve elemanları (44).

Özelleşmiş M hücreleri tarafından alınan intestinal lümendeki antijenler burada bulunan dendritik hücrelerde işlenir ve CD4+ regülatör T hücre popülasyonlarının sonraki eğitimleri için sunulur.

2.3. *Bifidobacterium* Cinsi

2.3.1. Tarihçe ve Taksonomi

Bifidobacterium ilk kez 1899 yılında Pastör Enstitüsü'nde Freshman Tissier tarafından anne sütüyle beslenen sağlıklı bebeklerin dışkılarından izole edilmiş ve *Bacillus bifidus comminus* olarak adlandırılmıştır (45, 46). Başlangıçta bu bakterilerin bebeklerin bağırsak florasının baskın elemanı olduğu düşünülmüşse de sonraki çalışmalar bifidobakterilerin erişkin insanlarda ve sıcakkanlı hayvanlarda da bulunduğunu göstermiştir (47-49).

1920 yılında Castellani ve Chalmers tarafından yapılan araştırmalarda bu bakteri *Bacterium bifidus* olarak adlandırılırken daha sonraki çalışmalarda ismi *Lactobacillus bifidus* olarak belirlenmiştir (50). 1967 yılında De Vries ve arkadaşları fruktoz-6- fosfat fosfoketolaz enzimini bifidobakterilerde belirlerken, aldolaz ve glikoz-6-fosfat dehidrojenaz enzimlerinin bifidobakterilerde bulunmadığını, ancak bu enzimleri laktobasillerin içerdiğini bildirmişlerdir (51). Bu bilgiye dayanarak 1974 yılında “*Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology*” nin 8. baskısında Orla-Jensen tarafından bakteri, *Bifidobacterium* adını alarak 11 tür içeren bir cins olarak gösterilmiştir (52, 53). En son 2000 yılı itibariyle 32 türü olduğu tespit edilen *Bifidobacterium*, *Actinobacteridae* alt sınıfından *Bifidobacteriales* takımına bağlı *Bifidobacteriaceae* ailesinin bilinen iki cinsinden biridir (Şekil 2-2).

Domain(Grup):	Bacteria
Şube:	<i>Firmucetes</i>
Sınıf:	<i>Actinobacteria</i>
Alt sınıf:	<i>Actinobacteridae</i>
Takım:	<i>Bifidobacteriales</i>
Familya:	<i>Bifidobacteriaceae</i>
Genus:	<i>Bifidobacterium</i>(32 tür)

Şekil 2-3: *Bifidobacterium* cinsinin filogenisi – Biavati (54)’den .

Bifidobakterilerin tanımlanması için fenotipik ve genotipik özellikler kullanılmaktadır.

2.3.2. Bifidobakterilerin Fenotipik Özelliklerine Göre Tanısı

Bifidobacterium’un fenotipik özelliklerine göre tanımlanmasını dört başlık altında toplayabiliriz:

Morfolojik özellikler

Fizyolojik özellikler

Biyokimyasal özellikler

Hücre duvarının bileşimi ve fosfolipit kompozisyonu (55).

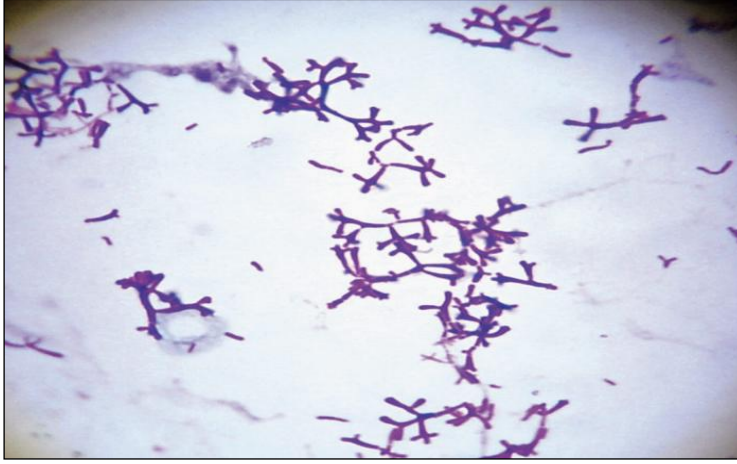
2.3.2.1. Morfolojik Özellikleri

Bifidobakteriler karakteristik bir morfolojiye sahiptirler. Gram pozitif, hareketsiz, spor oluşturmayan, genellikle eğri çubuklar şeklinde ve sıklıkla dallanmış olarak bulunan anaerobik mikroorganizmalardır. Taze izole edilen suşlar mikroskopta düzensiz dallanan, Y ve V şeklinde çomaklar halinde görünürler (Şekil 2-4). Bununla birlikte, normal habitatlarında sıklıkla çomaklar halinde olmalarına karşın, besi yeri şartları morfoloji değişikliğine sebep olmaktadır (55, 56). Plak yüzeyinde ise koloniler mukoid krem, bakır veya menekşe rengine görünümüne sahiptirler (56).

2.3.2.2. Fizyolojik Özellikleri

Bifidobakteriler anaerobik mikroorganizmalar olmakla birlikte oksijen duyarlılığı türlere ve her türün suşlarına göre farklılık gösterir. Bifidobakterilerin çoğu katalaz negatiftir; ancak oksijeni tolere edebilen *B. asteroides* ve *B. indicum* gibi türler oksijenli ortamda gelişirlerse katalaz aktivitesi pozitif olur (54). Süperoksit dismutaz ve katalaz gibi enzimler, süperoksit ve hidrojen peroksidin toksik etkilerine karşı organizmaların korunmasına yardımcı olur. NADH oksidaz ve NADH peroksidaz oksijen kullanımında gereken önemli enzimlerdir (56, 57). Çoğunlukla bifidobakterilerin insanlarda en uygun gelişim sıcaklığı 36–38 °C iken hayvanlarda oldukça yüksek olup 41-43°C arasındadır (56). Gelişim için optimum pH aralığı 6,5–7 arasında olup, pH 4’ten az ve 8’den yüksek pH’ da gelişim görülmez (57).

Bifidobakteriler karbon kaynağı olarak karbonat veya bikarbonata ihtiyaç duyarlar. Organik asitler, yağ asitleri ve amino asitler etkin karbon kaynağı değildir. Yalnızca sistein ve sistin zorunlu azot kaynaklarıdır (59). Bunun yanında bifidobakteriler “bifidojenik faktörler” olarak bilinen belirli büyüme faktörlerine ihtiyaç duyarlar. Bu maddeler, genelde N-asetil glukozamin gibi amino şekerler veya fruktooligosakkaritler ve laktuloz gibi karbonhidratlardır (13, 60). Aynı zamanda son yıllarda yayınlanan kaynaklar tripsin, pankreatik veya papain sindirimiyle hidrolize olmuş kazein gibi proteinlerin hidrolizi ile oluşan maddeleri de bifidojenik faktörlerin içinde değerlendirmiştir (54, 61).



Şekil 2-4: Gram yöntemi ile boyanmış preparasyonda *Bifidobacterium longum* (58).

Bakterinin bütün bu gereksinimleri göz önüne alınarak bifidobakteriler için çok sayıda seçici ve seçici olmayan besiyerleri tarif edilmiştir (54, 62). TPY (Trypticase Phytone Yeast) besi yeri, modifiye WCA (Wilkins Chalgren Agar), modifiye Columbia Agar, modifiye MRS (Man Rogosa Sharpe) agar ve RCA (Reinforced Clostridial Agar) besi yerleri bunların en çok bilinenleridir (62, 63).

2.3.2.3. Biyokimyasal Özellikleri

Bifidobakteriler metabolik aktivitelerinde kullandıkları karbonhidratlardan dolayı laktobasillerden farklılık göstermektedirler. Bifidobakteriler heksoz metabolizmasında fruktoz-6-fosfat yolunu kullanırken, laktobasiller glikoz-6-fosfat yolunu kullanmaktadırlar. Fruktoz-6-fosfat yolu sonunda oluşan önemli metabolik ürünleri; asetik asit ve L (+) laktik asittir (3/2) ancak bunlar düşük düzeydedir. Glikozdan CO₂ meydana getirmezler, katalaz, nitrat redüksiyonu, indol oluşumu ve jelatin hidrolizi negatiftir, üreaz aktivitesi olan az sayıda tür bulunmaktadır (54, 55).

Bifidobacterium cinsinin tanımlanmasında bakterinin bulundurduğu enzimler oldukça önemlidir. Yukarda bahsedildiği gibi fruktoz-6-fosfat fosfoketolaz (F-6-PPK) enzimi sadece *Bifidobacteriaceae* ailesinde mevcut olduğundan bu enzimin varlığı bağırsak florasında cins tespiti için yeterlidir. Aynı zamanda 6-fosfoglukonat dehidrogenaz ve transaldolaz gibi enzimlerin elektroforetik paternleri de bazı türlerin tanımlanması için uygundur (54). Süt ürünlerinden izole edilen bifidobakteriler için ise

alfa galaktozidaz enzim testi laktobasillerde bulunmadığından cins düzeyinde tanımlama için uygulanabilir (54).

Bifidobakterilerin fermentatif karakterlerine göre tanımlanması ise 1957’de ilk defa yapılmış olmakla birlikte hala kullanılmaktadır (Tablo 2-2). Ancak kesin bir tanımlama için DNA-DNA hibridizasyonuna ya da hücrel proteinlerin elektroforezine ihtiyaç duyulmaktadır (54). Cins düzeyinde tanımlama için bir diğer teknik de fermentasyon ürünlerinin gaz-likit kromatografisinin yapılmasıdır (54).

Yukarda saydığımız farklı fermentatif karakterler ve enzimlerin varlığından faydalanarak hazırlanan ticari sistemler de bakterinin izole edildiği yere göre kullanılabilir . API-ZYM, API- 32A, API 50 CHL ve API 20-A ve Vitek 2 ANC (bio Merieux, Marcy L’Etoile) bunlara örnek olarak verilebilir.

Tablo 2-2: *Bifidobacterium* türlerinin değişik karbonhidratlara etkisi*-Biavati (54)’den değiştirilerek.

Türler	Ksiloz	D-mannoz	D-fruktoz	D-galaktoz	Sukroz	Maltoz	Trihaloz	Melibivoz	Mannitol	Salisin	Sorbitol	L-Arabinoz	Raffinoz	D-Riboz	Nisasta	Laktoz	İnülin	Sellobivoz	Melezitoz	Glukonat
<i>B. bifidum</i>	-	-	+	+	d	-	-	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>B. longum</i>	d	d	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-
<i>B. infantis</i>	d	d	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	d	d	d	-
<i>B. breve</i>	-	+	+	+	+	+	d	+	d	+	d	-	+	+	-	+	d	-	-	-
<i>B. adolescentis</i>	+	d	+	+	+	+	d	+	d	+	d	+	+	+	+	+	d	+	+	+
<i>B. angulatum</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	d	+	+	+	+	+	+	-	-	d
<i>B. catenulatum</i>	+	-	+	+	+	+	d	+	d	+	+	+	+	+	-	+	d	+	-	d
<i>B. pseudocatenulatum</i>	+	+	+	+	+	+	d	+	-	+	d	+	+	+	+	+	-	d	-	d
<i>B. gallicum</i>	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>B. dentium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
<i>B. pseudolongum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	d	-	d	d	-
<i>subs.pseudolongum</i>	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	d	-	d	d	-
<i>B. animalis</i>	+	d	+	+	+	+	d	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	d	d	-
<i>B. lactis</i>	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>B. thermophilum</i>	-	-	+	+	+	+	d	+	-	d	-	-	+	-	+	d	d	d	d	-
<i>B. magnum</i>	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
<i>B. pullorum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>B. asteroides</i>	+	-	+	d	+	d	-	+	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>B. subtile</i>	-	-	+	+	+	+	d	+	-	d	+	-	+	+	+	-	d	-	+	+
<i>B. gallinarum</i>	+	d	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	d	d	y

Semboller: +, %90 veya daha fazla suş için olumlu sonuç; -, %90 veya daha fazla suş için olumsuz sonuç; d, %11-89 oranında suş için olumlu sonuç; y, belirlenemeyen.

* Bütün suşlar glikozu fermente etmiş fakat gliserol, laktat ve ramnozu fermente etmemiştir.

2.3.2.4. Hücre Duvarının Bileşimi ve Fosfolipid Kompozisyonu

Bifidobakterilerin hücre duvarı muramik asit, alanin, glikozamin, glutamik asit ve ornitin veya lisin ile birlikte treonin, aspartik asit, serin, glisin aminoasitlerinden biri veya ikisinden oluşan peptidoglikandan meydana gelir ve türlerin belirlenmesinde bu murein yapılı duvar önemlidir. Hücre duvarındaki polisakkaritlerin bileşiminde glikoz, galaktoz ve ramnoz bulunmaktadır. Türler arasında peptidoglikanların aminoasit dizilimi farklılık göstermektedir (17, 55). Bifidobakterilerde palmitik asit, palmitoleik asit, stearik asit, oleik asit ve miristik asit gibi yağ asitleri bulunmaktadır. Ayrıca, difosfotidilgliserol ve fosfotidilgliserol içeren laktobasil ve bifidobakteri türleri olmasına rağmen yalnızca bifidobakteriler poligliserolfosfolipitleri ve onların lizotürevlerini üretirler (17).

2.3.3. Bifidobakterilerin Genotipik Özelliklerine Göre Tanısı

Bifidobakterilerin genotipik özelliklerine göre tanımlanmasında filogenetik yaklaşım ve klasik yaklaşımdan söz edilmektedir (54).

Filogenetik yaklaşımda kullanılan iki temel teknik Rec A Analizi ve 16S rRNA Dizi Analizidir.

Rec A Analizi: Bu teknik, çoğu bakteride bulunan ve yüksek oranda korunmuş olan Rec A gen fragmentinin PZR ile çoğaltılması ve dizi analizi yapılması esasına dayanır. Elde edilen filogenetik ilişki bütün rRNA geni ile uyumludur. Hızlı ve kolay olması açısından insan bağırsağından izole edilen suşların tanımlanmasında kullanışlıdır. (54).

16S rRNA Dizi Analizi: 16S rRNA geninin uç bölgelerindeki korunmuş bölgeler için hazırlanan primerler kullanılarak bakterilerden alınan örnekler PZR ile çoğaltılır. Dizi analizi yapılan ampliconlardaki veriler veritabanları ile karşılaştırılır ve bu sayede hem cins düzeyinde hem tür düzeyinde tanımlama yapılabilir (54).

Klasik yaklaşımda ise G+C içeriğinin saptanması ve DNA-DNA homolojisi teknikleri kullanılır.

G+C İçeriğinin Saptanması: Bifidobakterilerin DNA'sında guanin+sitozin yüzdesi yüksek ve türler arasında farklılık gösterdiği için tanımlamada kullanılmaktadır.

DNA-DNA Homolojisi: Tür içi ve türler arası ilişkileri saptamak için altın standarttır. İki türün DNA'sının hibritleşmesi ne kadar fazla ise, türler arası o derece yakınlık olduğu düşünülür (54).

Son dönemde moleküler biyolojide kullanılan çok sayıda teknik de bifidobakterilerin tanımlamasında kullanılmaktadır. ITS (Transkripsiyonu Yapılamayan Bölgeler) analizi, PFGE (Değişken Alanlı Jel Elektrofrezisi), ribotipleme, RFLP (Restriksiyon Fragmentlerinin Uzunluk Polimorfizmi), ARDRA (Amplifiye olmuş Ribozomal DNA Restriksiyon Analizi), RAPD (Rastgele Amplifiye olmuş Polimorfik DNA) ve FISH (Floresan in situ Hibridizasyon) bunlar arasında sayılabilir (54).

2.4. *Bifidobacterium* Cinsinin Probiyotik Özellikleri

2.4.1. Probiyotik ve Prebiyotik Kavramı

Probiyotik ve prebiyotik günlük hayatta sıklıkla birbirine karıştırılan, birbirinden farklı ama birbirleriyle kuvvetli ilişkisi olan iki kavramdır. Probiyotik kelimesi Yunanca kökenli olup “yaşam için” anlamına gelen ve uzun yıllardan beri çeşitli şekillerde kullanılan bir kelimedir (64). Günümüzde ise 1998 yılında Salminen ve ark. (65) tarafından ‘insan ve hayvanların sağlığını geliştirmek için tasarlanan gıda, yem ya da besinsel katkılardaki canlı mikrobiyal preparatlar’ şeklindeki ifade edilen tanım kabul görmüştür ve kullanılmaktadır.

Bir mikroorganizmanın probiyotik olabilmesi için belirli kriterlere sahip olması gerekmektedir (29, 36, 65). Bunlar:

1. Mikroorganizma insan kökenli olmalı, konak için patojen ve karsinojenik olmamalı normal florayı bozmadan patojen bakterilere etki etmelidir.

2. Ağız yoluyla alındığında etkili olabilmeli ve bunun için asit pH ve safra tuzlarına dirençli olmalıdır. İstendiğinde konakçıdan izole edilebilmeli.

3. Patojenlerle yarışmalı rekabet sonucunda probiyotik suşları bağırsak epiteline patojenlerden önce tutunabilmeli veya agregasyon oluşturabilmesi gerekmektedir.

4. Kullanılan suş ürün içerisinde uzun süre canlılığını koruyabilmeli, üründe istenmeyen oluşumlara neden olacak maddeler üretmemelidir. Bunun yanı sıra ürettiği bazı metabolitlerle ortamdaki patojen veya kontaminant bakterileri inhibe edebilmelidir.

5. Büyük ölçekte üretime uygun, istenmeyen aroma bileşikleri üretmeyen, fajlara karşı dirençli suşlar probiyotik üretiminde başarılı bir şekilde kullanılabilir.

6. Gastro-intestinal immun sistemi stimüle etmeli, kolon kanseri gelişimini önleyebilmeli.

7. Sindirimi kolaylaştırmalı, laktaz malabsorbsiyonuna ait semptomları ortadan kaldıracaktır.

Prebiyotikler ise intestinal florada bulunan bir tür veya sınırlı sayıdaki birkaç tür mikroorganizmanın çoğalmasını ve/veya aktivitesini seçici olarak aktive ederek konağın sağlığını olumlu yönde etkileyebilen sindirilemeyen besin bileşenleri olarak tanımlanmaktadır (66). Prebiyotikler kolondaki yararlı mikroflora (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium* gibi) tarafından selektif olarak kullanılır iken toksin üreten *Clostridium*'lar, proteolitik *Bacteriodes*'ler ve toksijenik *E. coli* gibi potansiyel patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engellemektedir (11, 66-69). Yani diğer bir deyişle prebiyotikler, probiyotiklerin yiyecekleridir.

2.4.2. *Bifidobacterium* Cinsinin Probiyotik Olarak Önemi

Yukarda bahsi geçen probiyotiklerin sahip olması gereken özellikler göz önüne alındığında bifidobakterilerin probiyotik önemi şu şekilde özetlenebilir:

Protein metabolizmasının iyileştirilmesi: Bifidobakteriler fosfoprotein fosfataz aktivitesine sahip olduklarından insan sütünde bulunan α -kazeini parçalayabilmekte ve böylece süt proteinlerinin absorpsiyonuna katkıda bulunmaktadır (11).

Vitamin metabolizmasının iyileştirilmesi: Yaşa bağlı olarak sağlıklı insanların bağırsak sisteminde baskın olarak bulunan bifidobakteriler, B₁, B₂, B₆, B₁₂, K₂ vitaminleri ve ayrıca nikotinik asit ve folik asit üretmektedirler (12, 13, 70).

Böbrek rahatsızlıklarını giderme: Bifidobakteriler tarafından amonyakın bir nitrojen kaynağı olarak kullanılması, amonyak ve amin üreten bakterilerin gelişiminin önlenmesi, bifidobakteriler tarafından üretilen organik asitlerle bağırsak pH'sının düşmesiyle iyonik koşulların oluşması ve amonyak düzeyinin azalması, bifidobakterilerin alifatik aminler, hidrojen sülfid veya nitritler oluşturamaması gibi

özelliklerine bağlı olarak, böbrek rahatsızlıklarını iyileştirme ve kan amonyak düzeyini azaltmada önemli etkileri vardır (14).

Bağıışıklık sistemini aktifleştirme etkileri: Bifidobakterilerin mitojenik etki, makrofaj ve antikor üretimini teşvik etme ve antitümör etkisi gibi değişik immunolojik fonksiyonlarının bulunduğu bildirilmiştir (16).

Laktoz kullanımının iyileşmesi: İnce bağırsakta β -galaktozidaz veya laktaz enzimi yeterli miktarda bulunmadığında laktoz, kalın bağırsak mikrobiyotası tarafından fermente edilmekte ve oluşan hidrojen, metan ve CO₂ gazları sebebiyle karın ağrısı, kramp ve ishale neden olmaktadır. Bifidobakteriler ise β -galaktozidaz enzimini salgıladıklarından laktozun sindirilmesinde iyileştirici rol oynarlar (17, 71,72).

İshal ve kabızlığın önlenmesi: Bifidobakteriler tarafından üretilen organik asitlerin bağırsağın peristaltik hareketini teşvik ettiği ve normal bağırsak hareketine yardımcı olduğu sanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada, kabızlık çeken hastaların, bifidobakteri içeren süt ve ürünlerini tüketmeleri durumunda bağırsak hareketinde bir iyileşme olduğu ve dışkıda su miktarının arttığı tespit edilmiştir (11). Bunun yanında, antibiyotik kullanımı ile veya viral etkenle oluşan ishallerin iyileştirilmesinde bifidobakterilerin kullanılabileceği tespit edilmiştir (14).

Antimikrobiyal etkileri: Bifidobakteriler doğrudan veya dolaylı olarak antimikrobiyal etki gösterirler. Bakteriyosinler bifidobakteriler tarafından üretilen antimikrobiyal maddeler arasındadır ve doğrudan antimikrobiyal etki gösterirler. Anand (15) tarafından yapılan çalışmada, *B. bifidum* 1452 NCDO ve *B. bifidum* 1454 NCFB suşları tarafından üretilen bifidin ve bifidosin olarak adlandırılan bakteriyosinlerin, bazı bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterdikleri belirlenmiştir. Bifidobakterilerin dolaylı olarak gösterdikleri antimikrobiyal etkileri için, ortamdaki demiri etkin bir biçimde bağlayarak patojenler için kullanılmaz duruma getirmelerini ve oluşturdıkları asitler sebebiyle bağırsak pH'sını düşürmelerini söyleyebiliriz (73).

Antikanserojenik (antikanser) aktivite: Birçok in vitro ve hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalarla bifidobakterilerin antitümör ve antikanserojenik etkiye sahip oldukları ortaya konmuştur. *B. longum* kolon, böbrek ve göğüs kanserini teşvik eden “2-amino-3-metil-imidazol quinoline” (IQ)’ yu inhibe etmekte veya azaltmaktadır (18). Ayrıca bifidobakterilerin azoreduktaz, β -glukuronidaz, ve nitroreduktaz gibi pro-

kanserojenleri kanserojen maddelere dönüştüren enzimlerin aktivitelerini engellediği gösterilmiştir (13, 74, 75).

Serum kolesterol düzeyinin azaltılması: Bifidobakterilerin, kan lipidlerinin düşürülmesi ve kalp hastalığı riskinin azaltılmasında rol oynadıkları düşünülmektedir. Laktobasiller ve bifidobakteriler ile yapılan çeşitli deneyler, bu bakterilerin belirli suşlarının, safra tuzları varlığında, kolesterolü asimile edebilme yeteneğine sahip olduğunu kanıtlamıştır (19).

Alerjik hastalıkların belirtilerinin hafifletilmesi: Kirjavainen ve ark. (76) tarafından yapılan bir çalışmada *Bifidobacterium lactis* Bb12 suşunun bağırsak florasını düzenleyerek başlangıç aşamasındaki atopik ekzemayı hafiflettiği gösterilmiştir.

2.5. Alerjik Dermatit ve Astım

2.5.1. Alerjik (Atopik) Dermatit

Alerjik (Atopik) dermatit (AD), çoğunlukla infant ve erken çocukluk çağında başlayan, genetik faktörlerin eşlik ettiği, çeşitli allerjenlerle tetiklenebilen, tekrarlayan, kronik, inflamatuvar bir deri hastalığıdır (20-23). Hastalarda genellikle serum IgE düzeylerinde yükselme, ailesel veya kişisel astım ve/veya alerjik rinit öyküsü bulunmaktadır (21, 23, 77, 78). Hastalığın etyolojisi tam olarak bilinmemekle beraber genetik, çevresel ve infeksiyöz faktörlerin katılımıyla kompleks çok etkenli bir etiyolojinin rol oynadığı düşünülmektedir (20-23, 77, 78).

AD insidansı giderek artmakta olup son 40-50 yıl boyunca her on yılda bir iki kat artış göstermiştir (21, 23, 79). Hastalığın özellikle sanayi ülkeleri ve kentlerde yüksek sosyoekonomik sınıfta arttığı gözlenmiştir (20, 80).

Patogenezi: AD patogenezi halen yeterince aydınlatılamamış olmakla birlikte immunoglobulin IgE ile oluşan tip I reaksiyonların ve T hücreleri ile oluşan tip IV reaksiyonların patogenetik rol oynadığı ileri sürülmektedir (20, 21).

Klinik ve laboratuvar tanısı: Alerjik dermatit bebeklerde, çocuklarda ve yetişkinlerde farklı klinik tablo göstermektedir. Bebeklerde en sık tutulan bölge yüzdür. Burun ve ağız çevresinin korunduğu yüzde, özellikle yanaklar olmak üzere alın ve çenede sınırları belirgin olmayan eritem gözlenmektedir (20-23, 81, 82). Yanaklar

dışında saçlı deri ve boyun, emekleme başladıktan sonra ekstremitelerin ekstensör yüzleri ve gövdede lezyonlar oluşabilir (81, 83). AD'li infantların birçoğunda, deri belirtileri iki yaşına kadar gerilerken bazılarında, çocukluk dönemi AD'ine geçiş olabilmektedir (20, 81, 83).

AD tanısında kullanılan spesifik ve rutin bir laboratuvar yönteminin olmaması nedeniyle tanı, öykü ve klinik özelliklere dayanarak konulmaktadır. Bugün tüm dünyada yaygın olarak kullanılan AD tanı kriterleri, "Hanifin-Rajka tarafından belirlenen major ve minör kriterlerden oluşmaktadır. Kaşıntı, kişide veya ailede alerji öyküsü, kronik ve yineleyen dermatit, iki yaşına kadar bebeklerde ve çocuklarda yüz ve ekstensör bölge tutulumu, erişkinlerde dirsek bölgesinde kalınlaşma ve sertleşme gibi majör ölçütler ile serum IgE düzeylerinde yükselme, deri testlerine pozitif erken tip alerji yanıtı ve el ve ayaklarda nonspesifik dermatit gibi bulguların içinde bulunduğu çok sayıda minör ölçütler bunlardan bazılarıdır (20).

Son yıllarda özellikle serum total IgE düzeyleri yüksek olan AD'li hastalarda çeşitli antijen ve allerjenlere karşı duyarlılığı belirlemek amacıyla deri testleri uygulanmakta ve serum spesifik IgE düzeyleri değerlendirilmektedir (21, 78, 79, 82, 84).

Tedavi: AD tedavisinde ilk adım, geniş bir sorguya dayanmaktadır; başlangıç yaşı, aile öyküsü, tetikleyen faktörler, enfeksiyonlar, banyo ve nemlendirme hataları, uyartılara maruz kalma, ateş, terleme, duygusal stres, alerjiler, geçmişte kullanılan tedaviler dikkatle incelenmelidir (20, 85). Genellikle topikal ilaçların kullanımı, oral antihistaminikler ve bireysel uyarıcı faktörlerin eliminasyonu yeterli olmaktadır (20, 86). AD'de kullanılan spesifik tedavi yaklaşımları dört grupta sınıflandırılmaktadır (87). Bunlar; derideki yağ ve nem dengesini korumaya yönelik maddeler ile antiinflamatuvar etkisi olan kortikosteroidler gibi maddelerin kullanılmasını öneren topikal tedaviler, antihistaminikler, antimikrobiyaller ve immün sistem üzerindeki farklı hücreleri etkileyen çeşitli ajanların kullanıldığı sistemik tedaviler, ultraviyole ışınların kullanıldığı fototerapi ve antijen- antikor kompleksi ile yapılan immunoterapidir (20).

Alerjik dermatitin önlenmesinde ve tedavisinde diğer bir yaklaşım da probiyotik kullanımıdır. Probiyotiklerin alerjiye genetik olarak yatkın gebelerde ve doğumdan sonra ilk altı ayda bebeklerinde kullanımı ile alerjik dermatit ve besin alerjisinin %50'ye varan oranlarda önlendiğini ve hasta bebeklerde kullanımı ile de

hastalığın şiddetinin azaldığını destekleyen çok sayıda klinik çalışma bulunmaktadır (88-90).

2.5.2. Astım

Astım oluşumunda genetik ve çevresel faktörlerin birlikte rol aldıkları bilinmesine karşın etyopatogenezi henüz tam açıklığa kavuşmamıştır. Bu nedenle tanımı büyük ölçüde hastalık özelliklerini tarif edici niteliktedir. Havayolu inflamasyonunun yol açtığı fonksiyonel değişikliklere göre yapılan astım tanımı şöyledir: Astım hava yollarının kronik inflamatuvar bir hastalığıdır. Kronik inflamasyon, özellikle gece veya sabahın erken saatlerinde meydana gelen tekrarlayıcı hırıltılı solunum, nefes darlığı, göğüste sıkışma hissi ve öksürük ataklarına neden olan hava yolu aşırı duyarlılığı ile ilişkilidir. Bu ataklar kendiliğinden veya tedavi ile geri dönüşlü, değişken bir hava yolu obstrüksiyonu ile birlikte olabilir.

Çocuk ve erişkinler için nisbeten standardize ve karşılaştırılabilir yöntemlerle yapılan araştırmalarda, astım prevalansının farklı ülkelerde %1-18 arasında değiştiği bulunmuştur. Çocukluk dönemi astım epidemiyolojisi araştırmaları sonuçlarına göre astım prevalansının çocuklarda %2-15 ve erişkinlerde ise %2-5 arasında dağılım gösterdiği görülmektedir. Bazı çocukluk dönemi çalışmalarında elde edilen yüksek prevalans değerleri astım prevalansının yaşla azaldığını düşündürmektedir (24, 91-93).

Risk faktörleri; kişiyi astıma yatkın kılan “kişisel faktörler” (genetik, obezite, cinsiyet) ve genetik olarak astıma yatkın olanlarda astım gelişimine yol açan “çevresel faktörler” (allerjenler, enfeksiyonlar, mesleki duyarlaştırıcılar, sigara, ev içi ve ev dışı hava kirliliği) olmak üzere iki grupta toplanmaktadır. Astım gelişmesine yol açan faktörler yanı sıra astım semptomlarını tetikleyen faktörler de vardır (24, 94). Astımın ortaya çıkmasında etkili risk faktörlerinin başında genetik faktörler gelir (95). Astım alevlenmesine yol açan faktörler ise genellikle çevresel olanlardır. Genlerin hem kendi aralarında, hem de çevresel faktörler ile etkileşerek bireyin astıma eğilimini artırdıkları düşünülmektedir (96).

Allerjenler ve astım ilişkisi: İç ve dış ortamdaki allerjenlerin astım alevlenmelerine yol açtıkları iyi bilinmesine rağmen, astım gelişimindeki rolleri tam aydınlatılamamıştır (94, 97). Yenidoğan döneminden başlayan kohort çalışmaları, ev tozu akar allerjenleri, kedi ve köpek tüyü ile *Aspergillus*'un 3 yaşına kadar astım benzeri semptomlar için risk faktörü olduklarını düşündürmektedir (24, 94). Allerjen

teması ve çocuklardaki duyarlanma arasındaki ilişkinin allerjene, dozuna, maruziyet dönemine, çocuğun yaşına ve muhtemelen genetik faktörlere bağlı olduğu düşünülmektedir (24).

Patogenez: Semptomlar nöbetler halinde olsa da astımdaki hava yolu inflamasyonu sürekli ama astım şiddeti ile inflamasyonun yoğunluğu arasındaki ilişki net olarak gösterilememiştir (98). İnflamasyon bütün hava yollarını etkiler bununla birlikte fizyolojik etkileri orta boy bronşlarda en belirgindir. Hava yollarındaki inflamasyon paterni, astımın bütün klinik formlarında ve bütün yaş gruplarında benzer görülmektedir. Mast hücreleri, eozinofiller, T lenfositler, dendritik hücreler, makrofaj ve nötrofiller inflamasyonda rol alan inflamatuvar hücreler olup ayrıca epitel, düz kas, endotel hücreleri; fibroblastlar, miyofibroblastlar ve hava yolları sinirleri de inflamasyonda rol alan hava yolu yapısal hücreleridir (24, 99-101).

Astımla ilişkili çok sayıda mediatörün (Aracı molekül) olduğu ve bunların hava yollarındaki karmaşık inflamasyonu yönettikleri de bilinmektedir. Hava yollarında oluşan bu inflamatuvar cevaba ek olarak, hava yolu yeniden yapılanması (remodelling) olarak adlandırılan karakteristik yapısal değişiklikler de hastalığın oluşumunda etkilidir (24, 102).

Hava yolu daralması semptom ve fizyolojik değişikliklere yol açan asıl olaydır. Hava yollarındaki düz kas kontraksiyonu, ödem, yeniden yapılanmaya bağlı duvar kalınlaşması, mukus sekresyonu artışı ve bunun oluşturduğu tıkaçlar hava yolu daralmasını ortaya çıkarır (24).

Klinik ve laboratuvar tanısı: Astım tanısında anamnez çok önemlidir. Tanısal testlerin pozitif olması tanıyı destekler ancak negatif olması tanıyı dışlamaz. Tanı, nöbetler halinde gelen nefes darlığı, hışıltı, öksürük ve göğüste baskı hissi gibi semptomların varlığı ile konur (24). Astımlı hastaların çoğunda rinit semptomları da vardır. Semptomların gün içinde veya mevsimsel değişkenlik göstermesi, sis, duman, çeşitli kokular veya egzersiz gibi nedenlerle tetiklenmesi, geceleri artış olması ve uygun astım tedavilerine yanıt vermesi astım tanısını destekler (24). Ailede astım öyküsünün bulunması ve alerjik hastalıkların varlığı tanıyı koymaya yardımcı olan diğer özelliklerdir.

Astım çeşitli klinik fenotiplerle seyredebilir (103). Önceleri ekstresek (alerjik) ve intrensek (alerjik olmayan) astım şeklinde başlayan fenotipik yaklaşıma zamanla

erken- geç başlangıçlı astım, öksürükle seyreden astım, egzersiz astımı, nokturnal astım, aspirine duyarlı astım, premenstrüel astım, steroide dirençli/bağımlı astım, brittle astım, meslek astımı gibi fenotipler eklenmiştir (24).

Anamnezinde alerji düşünülen hastada ilk tercih edilecek yöntem deri prik testidir. Eğer hastanın anamnezi test sonuçları ile uygunluk göstermiyorsa bu değerlendirme anlam taşımaz. Günlük pratikte bu testi yapmanın asıl amacı, alerjik astımlıları ayırmak ve eğer hastanın bulunduğu ortamda kendisini etkileyen bir allerjen varsa ondan uzaklaşmasını sağlamaktır. Alerjik duyarlılığın saptanması için testlerde yer alması önerilen standart allerjenler; pozitif/negatif kontrol, çimen poleni, *Dermatofagoides pteronyssinus*, kedi ve *Alternaria* allerjenleridir (104).

Spesifik IgE ölçümü, pahalı ve duyarlılığı düşük bir yöntemdir. Serum Total IgE ölçümünün atopi tanısında kişisel bazda önemli bir değeri yoktur (104).

Solunum fonksiyon testi, hava akımı kısıtlanmasını ve reverzibilitesini ölçmek için yapılan spirometrik inceleme, PEF metre denilen hastanın evde hava akımı değerlerini günlük takip edebilmesi için kullanılan cihazla yapılan PEF ölçümü, hava yolu duyarlılığını ölçüm testi, total hücre sayıları, eozinofil, nötrofil veya mediyatörler gibi inflamatuvar belirteçlerin takip edildiği laboratuvar testleri astımın tanı ve takibinde kullanılan diğer testlerdir (105-107).

Tedavi: Astım tedavisinde yapılması gereken ilk iş ortamdan tetikleyicileri (sigara dumanı, allerjenler, inhale edildiğinde zarar veren kimyasallar, kirli hava vb.) kaldırmaktır veya maruziyeti azaltmaktır. Kullanılan ilaçlar kontrol edici ve rahatlatıcı (semptom giderici) ilaçlar olarak ikiye ayrılır. Kontrol edici ilaçlar, çoğu zaman antiinflamatuvar etkileri sayesinde astımın kontrol altında tutulmasını sağlayan her gün ve uzun süre kullanılan ilaçlardır. Rahatlatıcı ise hızlı etki ederek bronkokonstriksiyonu geri döndüren, semptomları gideren ve gerektiğinde kullanılan ilaçlardır (24, 108).

Astım tedavisi, inhalasyon yoluyla, oral veya parenteral olarak uygulanabilmektedir. İnhaler tedavinin başlıca avantajı, düşük sistemik yan etki riskiyle, ilaçların doğrudan hava yollarına verilmesini ve bu bölgelerde daha yüksek lokal konsantrasyonlara ulaşabilmesini sağlamasıdır. İnhaler steroidler günümüzde mevcut en etkili kontrol edici ilaçlardır (24).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamız, Eylül 2011- Mart 2012 tarihleri arasında astım veya alerjik dermatit tanısı almış 100 hasta ile kontrol grubu olarak 100 sağlıklı çocuktan alınan gaita numuneleri ile Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarlarında yapıldı.

Numuneler, İstanbul Kanuni Sultan Süleyman Eğitim ve Araştırma Hastanesi Alerji Polikliniği'ne, Enfeksiyon servisi ve Süt çocuğu servisi'ne başvuran ve çalışma kriterlerimize uyan hasta ve sağlıklı çocuklardan alındı.

Çalışmaya dahil olacak hastalar için temel kriterlerimiz:

- a. Son iki hafta içinde gram pozitif bakterilere karşı etkili bir antibiyotik kullanmamış olmak,
- b. Hayatının bir döneminde mutlaka anne sütü almış olmak,
- c. Üç yaş veya üç yaş altı olmak,
- d. Literatürde belirtilen kriterlere göre alerjik dermatit veya astım tanısı almış olmak (109, 110).

3.1. Gereçler

3.1.1. Kullanılan Besiyerleri

Bifidobakterilerin üretilmesi için kullanılan pek çok seçici ve genel üretici besi yerleri bulunmaktadır. Biz çalışmamızda Trypticase Phytone Yeast (TPY) besi yerini seçici olmayan, genel üretici sıvı besi yeri olarak, modifiye Trypticase Phytone Yeast Agar(TPYA), modifiye Wilkins Chalgren Agar (WCA) başta olmak üzere modifiye de Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA) ve modifiye Coloumbia agar (DP Agar) besi yerlerini de seçici besi yerleri olarak kullandık.

3.1.1.1. TPY (Trypticase Phytone Yeast) Sıvı Besi yeri

Trypticase (Triptikaz) (BBL)	10 gr/L
Phytone (Soya peptone) (BBL)	5 gr/L

Glikoz (Oxoid)	15g/L
Yeast extract (Maya özütü) (Oxoid)	2,5 gr/L
Tween 80	1ml/L
L-Sistein HCl	0,5 gr/L
K ₂ HPO ₄	2gr/L
MgCl 6H ₂ O	0.5 gr/L
Distile su	1000 ml
ZnSO ₄ 7H ₂	0,25 gr/L
CaCl ₂	0,15 gr/L
FeCl ₃	3 gr/L

Gerekli malzemeler karıştırılıp az miktarda distile su içinde eritilip son hacim 1000 ml'ye tamamlandı, son pH 6,5 – 6,8'e ayarlandı ve tüplere 10'ar ml dağıtılıp ağızları pamuklanarak 121°C'de 15 dakika otoklavlandı (47, 54).

3.1.1.2. Modifiye TPYA Besi yeri

TPY besi yeri yukarıda belirtilen malzemeler yanı sıra, katı besi yeri olarak kullanılacağı için 20g/L agar ve aşağıdaki malzemeler ilave edilerek modifiye edildi. Dikloksasilin sulu çözeltisi laktobasil ve streptokokları inhibe etmek için kullanıldı (111).

Hemin (5 mg/ml)	1 ml
Vitamin K1 solüsyon (1mg/ml)	1 ml
Defibrine koyun kanı	50 ml
Dikloksasilin (1mg/ml)	2 ml /L

Hemin otoklavdan önce diğerleri otoklavlama işleminden sonra 45°C'ye kadar soğutulmuş besiyerlerine karıştırıldıktan sonra besi yeri, petrilere 4 mm kalınlığında döküldü.

3.1.1.3. Modifiye WCA (Wilkins-Chalgren Agar) Besi yeri

Wilkins-Chalgren Agar (Oxoid)	42 g/L
Tween 80	5 ml/L
Glikoz	10 g/L
Agar	5 g/L
L-Sistein HCl	0,5 gr/L
Kanamisin (100 mg/ml)	0,075 ml /L
Distile su	1000 ml

Kanamisin dışındaki malzemeler karıştırılıp bir miktar distile suda eritildi ve son hacim 1000 ml'ye tamamlandı, son pH 6,5'e ayarlandıktan sonra, besi yeri 121°C'de 15 dakika otoklavlandı. 45°C'ye kadar soğumuş besi yerine 0,075 ml kanamisin eklendi. Petrilere 4'er mm kalınlığında döküldü (63).

3.1.1.4. Modifiye MRSA (de Man Rogosa Sharpe) Besi yeri

MRS agar (Merck)	68,2 gr/L
Distile su	1000 ml
Dikloksasilin (1mg/mL)	2 ml/L

Dikloksasilin dışındaki malzemeler karıştırılıp distile su içinde erimesi sağlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı, pH 6,8'e ayarladı. 121°C'de 15 dakika

otoklavlandıktan sonra, besi yerinin 45°C'ye kadar soğuması beklendi ve dicloxacilin çözeltisi eklendi. Petrilere 4'er mm kalınlığında döküldü (111).

3.1.1.5. DP Agar (Modifiye Columbia Agar) Besi yeri

Columbia agar (Merck)	42 g/L
Glikoz	5g/L
L- Sistein HCl	0,5 g/L
Dikloksasilin(1mg/ml)	2 ml/L
Propiyonik asit solüsyon	5 ml/L

Antibiyotik dışındaki malzemeler karıştırılıp distile su içinde erimesi sağlandı. Son hacim 1000 ml'ye tamamlandı, pH'nın 6,8 civarında olması sağlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlandıktan sonra 45°C'ye kadar soğuması beklendi ve dikloksasilin çözeltisi eklendi. Petrilere 4'er mm kalınlığında döküldü (112).

3.1.1.6. Çikolatamsı Agar Besi yeri

Mueller Hinton besi yeri	37 g
Agar agar	15 g
Defibrine koyun kanı	50 ml
Distile su	1000 ml

Mueller Hinton besi yeri, su ve agar karıştırılıp, ısıtılarak erimesi sağlandı. 121°C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edildi, 45 °C'ye kadar soğutulduktan sonra içine % 15 oranında defibrine koyun kanı ilave edildi. Kaynar suda 2 dakika tutuldu. İyice karıştırılıp 4 mm kalınlıkta olacak şekilde petri kutularına dağıtıldı. Çikolatamsı besi yeri üreyen muhtemel *Bifidobacterium* türlerinin izolasyonu aşamasında aerotolerans testi için kullanıldı.

3.1.2. Stok Solüsyonlar

3.1.2.1. Hemin Stok Solüsyonu (5 mg/ml)

Hemin	0,5 g
NaOH (1N solüsyon)	10 ml
Distile su	90 ml

Heminin 10 ml 1 N NaOH solüsyonunda çözünmesi sağlandı, 90 ml distile su ilave edildi ve ışık geçirmeyen bir kap içerisinde buzdolabında saklandı.

3.1.2.2. Vitamin K1 Stok Solüsyonu (1 mg/ml)

K1 vitamini (Sigma)	0,1 gr
Saf etanol	100 ml

K1 vitamini saf etanol ile çözülerek hazırlandı. Por büyüklükleri 0,45 μm olan (Orange Scientific) selüloz asetat membran yapıda mikrofiltrelerden süzülüp steril olması sağlandı ve +4 ° C’de, ışık geçirmeyen bir kap içerisinde saklandı.

3.1.2.3. Kanamisin Stok Solüsyonu (100 mg/ml)

Kanamisin (Sigma)	1 g
Steril fosfat tampon (pH=8)	10 ml

Kanamisin pH 8 fosfat tamponda çözüldükten sonra, por büyüklükleri 0,45 μm olan (Orange Scientific) selüloz asetat membran yapıda mikrofiltrelerden süzüldü ve enjektörlere 0,5’er ml dağıtılarak derin dondurucuda saklandı .

3.1.2.4. Dikloksasilin Stok Solusyonu (1 mg/ml)

Dikloksasilin	10 mg
Distile su (steril)	10 ml

Dikloksasilin distile su içinde çözüldükten sonra por büyüklükleri 0,45 μm olan (Orange Scientific) selüloz asetat membran yapıda mikrofiltreler ile süzüldü 1’er ml enjektörlere alınıp -20 °C’de saklandı.

3.1.2.5. PBS(Phosphate Buffered Saline- Sodyum Fosfat Tamponu)(pH=6,8)

A Eriyiği=0,2 M monobazik sodyum fosfat stok çözelti:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 31,2 gr

Saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak eritildi.

B Eriyiği=0,2 M dibazik sodyum fosfat stok çözelti:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 28,39 gr

Saf su ile 1000 ml'ye tamamlanarak eritildi.

A çözeltisinden 51 ml, B çözeltisinden 49,0 ml karıştırılarak pH=6,8'e ayarlandı.

3.1.3. API 20-A Tanımlama Kiti ve Reaktifler

BioMerieux firmasına ait API 20-A Anaerop bakteri tanımlama kiti, 16 şekerin fermentasyonunu, jelatin hidrolizini, eskülin hidrolizini, indol oluşumunu ve üreaz varlığını enzimatik olarak saptayan ve 21 farklı testin yapılmasına olanak sağlayan bir sistemdir.

API 20-A sistemini kullandıktan sonra sonuçların değerlendirilmesi aşamasında bromkresol mavisi (BCP), Ehrlich ayırıcı (EHR), ksilol (XYL) reaktifleri ve mineral yağa ihtiyaç duyulmaktadır. Bu reaktifler kullanıma hazır olarak temin edildi. Bu sistemle besiyerlerimizde üreyen muhtemel Bifidobakteri türlerinin cins düzeyinde ön tanımlaması yapıldı.

3.1.4. Bifidobakterilerin PZR İle Tanımlanmasında Kullanılan Malzemeler

3.1.4.1. Çözelti ve Tamponlar

Deoksinükleotid Trifosfat (dNTP set)

Bu set(Jena bioscience); dATP, dGTP, dCTP, dTTP karışımı içermektedir. 100 mM konsantrasyonunda olan bu setten 10 mM konsantrasyon sağlayacak şekilde hazırlandı.

Taq DNA Polimeraz

Taq DNA polimeraz(FJ Tag DNA Polymerase) 5 U/μl olarak üretici firmadan alındı. İçeriğinde; Taq DNA polimeraz(5U/μl), 1 ml ambalajda 10xPZR buffer(10mM Tris-HCl(pH 8,8), 50mM KCl), 1 ml ambalajda MgCl_2 (50 mM) mevcuttur.

Elektroforez Tamponu(10x TBE – Jel ve Tanklar İçin Tampon)

Fc Biotek marka hazır olarak alındı. İçeriğinde:

Tris baz	108 g
Borik asit	55 g
EDTA 0,5 M, Ph 8,0	40 ml

Deiyonize su bulunmaktadır.

Etidyum Bromür

Fisher Bioreagent marka 10 mg/ml konsantrasyonda hazır olarak alındı. Distile suda manyetik karıştırıcı ile uzun sürede çözünmesi sağlandı. +4 °C’de ışıktan uzak muhafaza edildi.

Yükleme Tamponu>Loading Buffer)

Genoks marka hazır olarak alındı. İçeriğinde;

Bromfenol mavisi	%0,25
Gliserol	%30

Bulunmaktadır. Hazırlanan tampon +4°C’de saklandı.

Agaroz Jel Hazırlanışı

%1,7 oranında agaroz jel hazırlamak için 1,7 g agar (Biomax) tartılarak üstüne 100 ml 0,5X TBE tamponu eklendi. Mikrodalgada 750 watta eriyinceye kadar ısıtılarak jel eritildi. Yaklaşık 50 °C’ye soğutulduktan sonra içine 4 µl etidyum bromür ilave edildikten sonra yürütme tablasına döküldü ve taraklar yerleştirilerek soğuyup katılaşmaya bırakıldı.

3.1.4.2. Primerler

Çalışmamızda *Bifidobacterium* cinsine ait yedi farklı tür-spesifik primer kullanılmıştır (Tablo 3-1).

Tablo 3-1: Multipleks PZR çalışmasında kullanılan 7 farklı primerin özellikleri-Matsuki (113)’den.

Türe spesifik primer	Baz dizilimi	Uzunluk	mol	Ürün boyutu(bp)
Bilon-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	20	200nmol	831
Bilon-2	GGGAAGCCGTATCTCTACGA	20	200nmol	
Biado-1	CTCCAGTTGGATGCATGTC	20	200nmol	279
Biado-2	CGAAGGCTTGCTCCCACT	19	200nmol	
Bibre-1	CCGGATGCTCCATCACAC	19	200nmol	288
Bibre-2	ACAAAGTGCTTGCTCCCT	19	200nmol	
Bibif-1	CCACATGATCGCATGTGATTG	21	200nmol	278
Bibif-2	CCGAAGGCTTGCTCCCAAA	19	200nmol	
Biinf-1	TTCCAGTTGATCGCATGGTC	20	200nmol	828
Biinf-2	GGAAACCCCATCTCTGGGAT	20	200nmol	
Bicatg-1	CGGATGCTCCGACTCCT	17	200nmol	285
Bicatg-2	CGAAGGCTTGCTCCCGAT	18	200nmol	
Pseu1 f	ACGGCGACGTGGAGCGG	17	200nmol	285
Pseu2r	TAGACGGCTCCATCCACAAAG	21	200nmol	

Bilon-1 ve Bilon-2: *Bifidobacterium longum*, Biado-1 ve Biado-2: *Bifidobacterium adolescentis*, Bibre-1 ve Bibre-2: *Bifidobacterium breve*, Bibif-1 ve Bibif-2: *Bifidobacterium bifidum*, Biinf-1 ve Biinf-2: *Bifidobacterium infantis*, Bicag-1 ve Bicag-2: *Bifidobacterium catenulatum* grup, Pseu1 f ve Pseu2 r: *Bifidobacterium pseudocatenulatum*.

3.2. Yöntemler

Çalışmamızda numune alımından Bifidobakteri türlerinin PZR ile tanımlanmasına kadar olan aşamalarda kullandığımız yöntemler aşağıda özetlenmiştir.

Hastalara ait bilgilerin yer aldığı formların doldurulması

Hastalardan örnek toplanması ve laboratuvara getirilmesi

Spesifik besi yerlerine ekim ve Anaerop ortamda inkübasyon

Bifidobacterium cinsinin izolasyonu ve tanımlanması

3.2.1. Hastalara Ait Bilgilerin Yer Aldığı Formların Doldurulması

Çalışmamızda İstanbul Üniversitesi Tıbbi Etik Kurul Yönergesi’ne göre hastaların yasal temsilcilerinin bilgilendirilmiş onayları alındı. Dışkı numunesi alınan alerji polikliniğine ve enfeksiyon servisine gelen çocukların yakınlarından alınan bilgilerle hastalara ait formlar dolduruldu. Bu formlarda çocukların yaş, cinsiyet, alerji şikayetleri ve şikayetin ne zaman başladığı, yapıldı ise total ve spesifik IgE ölçümleri, deri testleri sonuçları, antibiyotik kullanımları, doğum şekilleri, doğumu takiben anne sütü alım süreleri ve ailede alerjik birey varlığı, kabızlık veya ishal rahatsızlıklarının olup olmadığı yer aldı. (Form 1)

3.2.2. Hastalardan Örnek Toplanması ve Laboratuvara Getirilmesi

Örnek toplama aşamasında hastalardan gaita örnekleri plastik dışkı toplama kaplarında alındı ancak çocuk bezlerinden alınması gereken örnekler, bezden derhal plastik gaita kaplarına aktarıldı. Gaita numuneleri TPY besi yerine aktarılarak, anaerop jar içinde , anaerop ortamda laboratuvara getirildi. Taze olarak TPY besi yerine aktarılamayan örnekler ise oksijensiz ortamda +4°C’de saklanarak en geç 24 saat içinde işleme alınmaları sağlandı (114).

3.2.3. Anaerop Ortamın Sağlanması ve İnkübasyon

Laboratuvara TPY sıvı besi yerinde gelen örnekler, anaerop jarlarda anaerop ortam sağlayıcılar (Oxoid Anaerogen™, BD GasPak EZ Anaerobe Container System)ile 37 °C’de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası TPY besi yerlerinden Bifidobakteri üretimi için spesifik Trypticase Phytone Yeast Agar (TPYA) ve Wilkins Chalgren Agar (WCA) ve Man Rogosa Sharpe Agar (MRSA) ve Modifiye Columbia Agar (DP) besi yerlerine ekimler yapıldı.

3.2.4. Bifidobakterilerin Tanımlanması

3.2.4.1. Gram Boyama ve Aerotolerans Testi

Anaerop ortamda 72 saat inkübe edilen petriler açıldı ve farklı morfolojideki koloniler incelenerek not edildi. Her farklı koloniden preparasyon hazırlanarak Gram boyama yöntemi ile boyandı ve boyanma özellikleri not edildi. Mikroskopik inceleme sonucunda Gram pozitif çomak görünümünde olan bakteri kolonileri aerotolerans testine tabi tutuldu. Bunun için kolonilerden hem mWCA, mTPY, mMRSA VE DP besiyerlerine hem de çikolatamsı besi yerine pasajlar alındı. mWCA, mTPY, mMRSA ve DP besiyerleri anaerop ortamda 37 °C’de 48 saat inkübe edildi, çikolatamsı agarlar ise 24 saat 37 °C’de tutuldu. Bu test sonucunda aerop ortamda üremeyip anerop ortamda üreyen kolonilerin tekrar Gram morfolojileri incelendi ve Gram pozitif sporsuz çomak görünümünde olanlar ileri çalışmalar için ayrıldı.

3.2.4.2. Api 20-A Kiti İle Tanımlama

BioMérieux firmasına ait API 20-A test stripleri ile identifikasyon yapmak için anaerop şartlarda üretilen, katalaz negatif, Gram pozitif sporsuz çomakların 48 saatlik kültürleri kullanıldı. API 20-A hazırlanırken, bir eküvyon aracılığı ile üremiş, saf olduğuna emin olunan koloniler alındı ve kit içinde mevcut olan sıvı besi yeri

içerisine bulanıklık 3 McFarland’a eşit olacak şekilde aktarıldı. Steril bir enjektör ile hazırlanan inokulumdan API şeridindeki kuyucuklara önerilen miktarlarda dağıtılarak, yine önerilen kuyucuklar mineral yağ ile kapatıldı. API 20-A şeritleri kıvrılıp petri kutularına konuldu ve kapakları kapatıldı. Anaerobik jarda, 35-37°C’de 48 saat inkübe edildikten sonra jardan çıkartılan API 20-A şeridinde, karbonhidratlara etki, indol ve üreaz aktiviteleri için belirtilen kuyucuklara reaktifler damlatılarak renk değişimlerine bakıldı. API 20-A kataloğundaki kriterlere göre *Bifidoacterium spp.* olarak tanımlandı (Tablo 3-2).

Tablo 3-2: API 20 A kitinde Bifidobakterilere ait biyokimyasal özellikler*

	İndol	Üreaz	D-glukoz	D- mannitol	D- laktoz	D-sakkaroz	D- maltoz	Salisin	D-ksiloz	L-arabinoz	Jelatin	Eskülin
Bifidobacterium spp 1	0	0	99	30	99	99	99	70	60	75	2	40
Bifidobacterium spp 2	0	0	99	99	99	99	99	99	90	80	1	75
	Glisrol	D-sellobiyoz	D- mannoz	D-melezitoz	D-raffinaz	D-sorbitol	L-ramnoz	D-trehaloz	Katalaz	Gram	Spor	Kök
Bifidobacterium spp 1	0	40	91	20	91	25	0	35	0	99	0	0
Bifidobacterium spp 2	45	99	99	85	100	75	50	99	0	99	0	0

*Rakamlar suşların testlere pozitif verme yüzdelерini göstermektedir.

3.2.4.3. PZR ile Tanımlama

PZR çalışmaları için farklı besiyerlerinde üreyen ve cins düzeyinde tanımlanan kökenlerden PBS içine hazırlanan yaklaşık 3 Mc Farland’lık bakteri süspansiyonları 1.5 ml’lik 2 ependorfa her birine 1’er ml olacak şekilde aktarıldı. Aynı zamanda bu kolonilerden vida kapaklı boncuklu suş saklama tüpleri içine 1 ml kaymağı alınmış süt konularak saklandı , stok kökenler önce -20 °C’ye daha sonra -70 °C’e kaldırıldı.

DNA İzolasyonları

PZR çalışmamız için çok sayıda mikroorganizma içeren gaita örnekleri yerine bu örneklerin anaerop kültüre alınmasıyla elde edilen kolonilerden veya üretilen kolonilerin PBS ile hazırlanmış süspansiyonlarından aynı zamanda içinde numune bulunan seçici sıvı TPY besi yerinde üremiş bakterilerden DNA izolasyonu yapıldı.

DNA izolasyonu için FC Biotek firmasına ait izolasyon kiti kullanıldı ve kit çalışma protokolü takip edildi. Buna göre

1. PBS içindeki bakteri süspansiyonu 14.000 rpm’de santrifüj edildi, süpernatant kısmı atılarak pellet üzerine 800 µl kit içerisindeki solüsyon 1 eklenmiş ve vorteksleme işlemi ile kolonilerin lizisi sağlandı. Ardından 15-20 µl iyice vortekslenmiş solüsyon 4 eklendi, bu karışım da 10 sn vortekslenerek homojenize olması sağlandı, oda sıcaklığında alt üst edilerek 5 dk bekletildi.

2. 4000 rpm ‘de 1 dk’lık santrifüj işleminden sonra süpernatant atıldı ve pellet üzerine 800 µl solüsyon 2 eklendi. Yine pelletin solüsyon içinde iyice çözülmesi için hafifçe vorteksleme işleminden sonra 1 dk 4000 rpm’de santrifüj edildi.

3. Süpernatant atıldıktan sonra pellet üzerine tekrar 2. işlem tekrarlandı ve 4000 rpm ‘de 1 dk santrifüj edildi.

4. Süpernatant kısmı atıldıktan sonra bu sefer pellet üzerine 1000 µl solüsyon 3 eklendi, pelletin çözülmesini takiben 1 dk santrifüj işleminden sonra bu işlem tekrarlandı.

5. En son 10.000 rpm’de santrifüj edildikten sonra süpernatant yine atıldı ve pelletin oda sıcaklığında 15 dk kadar kuruması beklendi.

6. Kuruyan pellet üzerine 50- 100 µl distile su eklendi ve pellet hafifçe vortekslenerek 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.

7. 10. 000 rpm’de 1 dklık santrifüj işleminden sonra bu kez süpernatant alındı , temiz bir ependorfa aktarıldı ve PZR analizleri için -20 °C’ye kaldırıldı.

DNA Amplifikasyonu

Örnekler Thermal Cycler'a aşağıda verilen miktarlarda karışım hazırlanarak yerleştirildi (Tablo 3-3).

Tablo 3-3: PZR karışımı hazırlanmasında kullanılan maddelere ait miktarlar

Bileşen	Miktar	Son konsantrasyon
DNAz-RNAz içermeyen su	36,75 µl	-
dNTP karışımı	1,0 µl	200 µM
<i>Bifido</i> primerler R	1,0 µl	0,4 µM
<i>Bifido</i> Primerler F	1,0 µl	0,4 µM
10x Taq Buffer	10x Taq Buffer	1x
MgCl ₂	2,0 µl	2 mM
Taq DNA Polimeraz	0,25 µl	1,25 U
Toplam	47 µl	
Örnek DNA'sı	3 µl	
Toplam reaksiyon hacmi	50 µl	

Amplifikasyon ABI 9700 Thermal Cycler'da gerçekleştirildi (Applied Biosystems, CA, USA) ve tablodaki PZR programı uygulandı (Tablo 3-4).

PZR Ürünlerinin Görüntülenmesi

Amplifikasyon sonrası PZR ürünleri yatay agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Bu amaçla elektroforez tamponu 0,5X TBE tamponu olacak şekilde dilüe edildi ve tanka yüklendi. Ayrıca %1,7 oranında hazırlanmış olan agaroz jel elektroforez tanklarına yerleştirildi. 10 µl DNA örneği %1'lik yükleme tamponu ile karıştırılıp elektroforez tanklarına yerleştirildi. Her yürütülen ürün grubuna elde edilen bantların büyüklüğünü karşılaştırmak için 50-1000bp arası (bp: base pair (baz çifti)) size marker (Genoks) kullanıldı. 130 V'da 30-45 dakika (Minnie. The. Gel. CicleHE 33, Hoefer Scientific Instruments, San Fransisco) yürütüldükten sonra UV translüminatör (Model

Tuv 20 Owl Scientific, A.B.D) altında incelendi ve araştırılan bantlar değerlendirilerek pozitif kontrollere göre yorumlandı.

Tablo 3-4: Multipleks PZR programı

Aşama	Sıcaklık	Süre(dakika)	Tanım
1. Bekleme	94 °C	05.00	Denatürasyon
	94 °C	00.20	
2. PZR	55 °C	00.20	35 döngü PZR ile çoğaltma
	72 °C	00.30	
3. Bekleme	72 °C	05.00	Uzaması tamamlanmamış ürünlerin tamamlanması
4. Bekleme	4 °C	Sonsuz	Yürütme aşamasına kadar saklamak için

3.2.5. İstatistikler

Sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesinde McNemar testi kullanılmıştır. $p<0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir. Bu test, sağlıklı çocukların bağırsak florasında bulunan bifidobakteri türleri ile alerjik dermatit veya astım tanısı almış çocukların bağırsak florasındaki bifidobakteri türlerini kıyaslamak amacı ile kullanılmıştır.

4. BULGULAR

Tablo 4-1: Astım veya Alerjik dermatit tanısı almış hastaların yaş ve cinsiyete göre dağılımı

HASTALAR	YAŞ	YAŞ	YAŞ
	0-1	1-2	2-3
Erkek hasta	21	9	19
Kız hasta	16	11	24
Toplam hasta	37	20	43

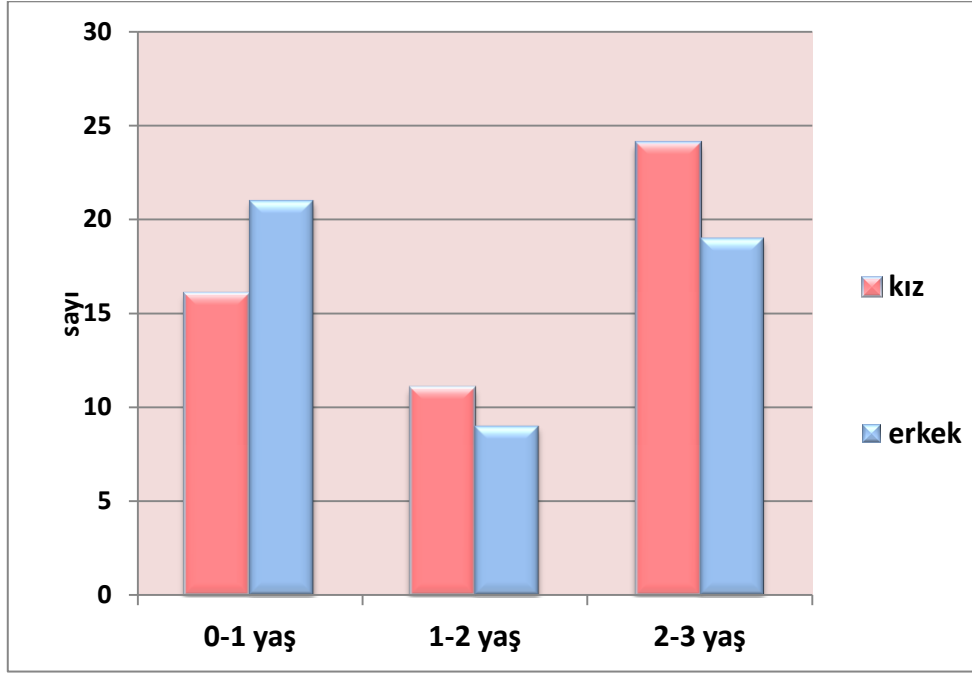
Çalışmaya dahil ettiğimiz hastalar yaş ve cinsiyet bakımından incelendiğinde 2-3 yaş grubu hastalarımızın (43), diğer yaş gruplarındaki hastalardan daha fazla olduğu görülmektedir. Ayrıca, tablo ve grafikten anlaşılabileceği gibi, numunelerin toplandığı erkek hastaların en fazla 0-1 yaş grubunda (21), kız hastaların ise en fazla 2-3 yaş grubunda (24) olduğu görülmüştür (Şekil 4-1 ve Tablo 4-1).

Tablo 4-2: Sağlıklı çocukların yaş ve cinsiyet dağılımı

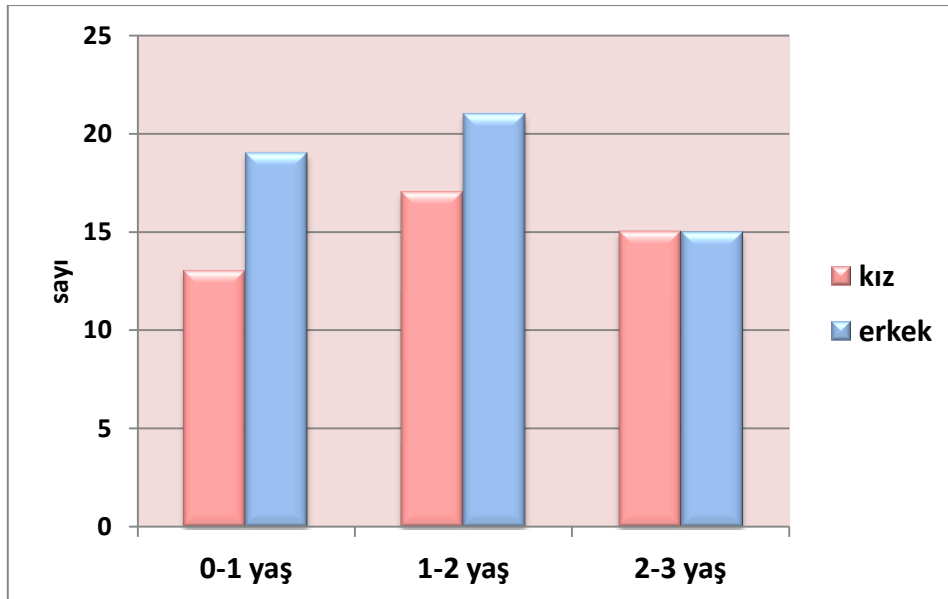
ÇOCUK SAYISI	0-1	1-2	2-3
	YAŞ	YAŞ	YAŞ
Erkek çocuk sayısı	19	21	15
Kız çocuk sayısı	13	17	15
Toplam çocuk sayısı	32	38	30

Çalışmaya dahil ettiğimiz sağlıklı çocuklar yaş ve cinsiyet bakımından değerlendirildiğinde, sağlıklı çocuk grubumuzun en fazla 1-2 yaş grubundaki (32) çocuklardan oluştuğu görülmektedir. Ayrıca, tablo ve grafikten anlaşılabileceği gibi,

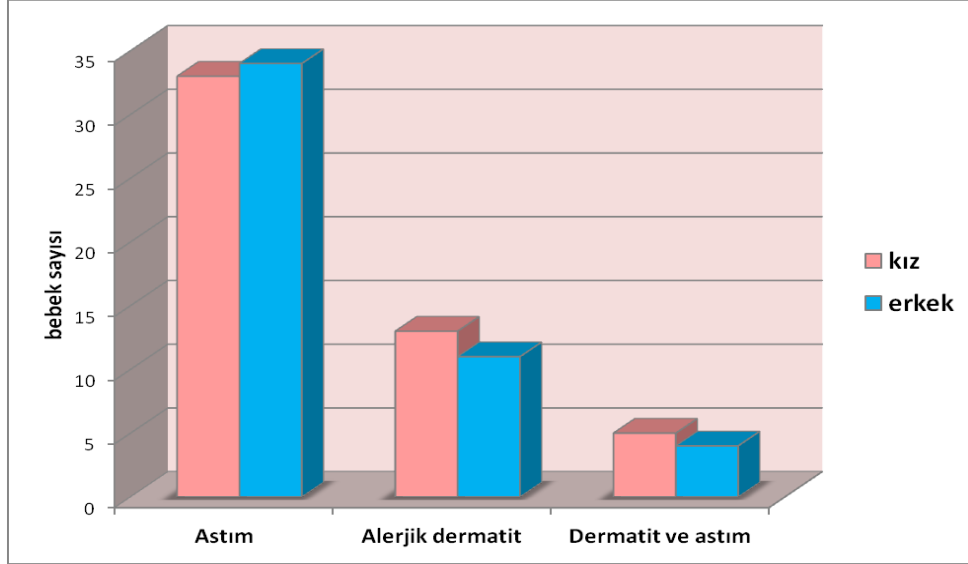
numunelerin toplandığı sağlıklı erkek (21) ve sağlıklı kız çocukların (17) en fazla 1-2 yaş grubundaki çocuklardan oluştuğu gözlenmiştir (Tablo 4-2 ve Şekil 4-2).



Şekil 4-1: Astım veya alerjik dermatit tanısı almış hastaların yaş ve cinsiyetlere göre dağılım grafiği



Şekil 4-2: Sağlıklı çocukların yaş ve cinsiyet dağılım grafiği



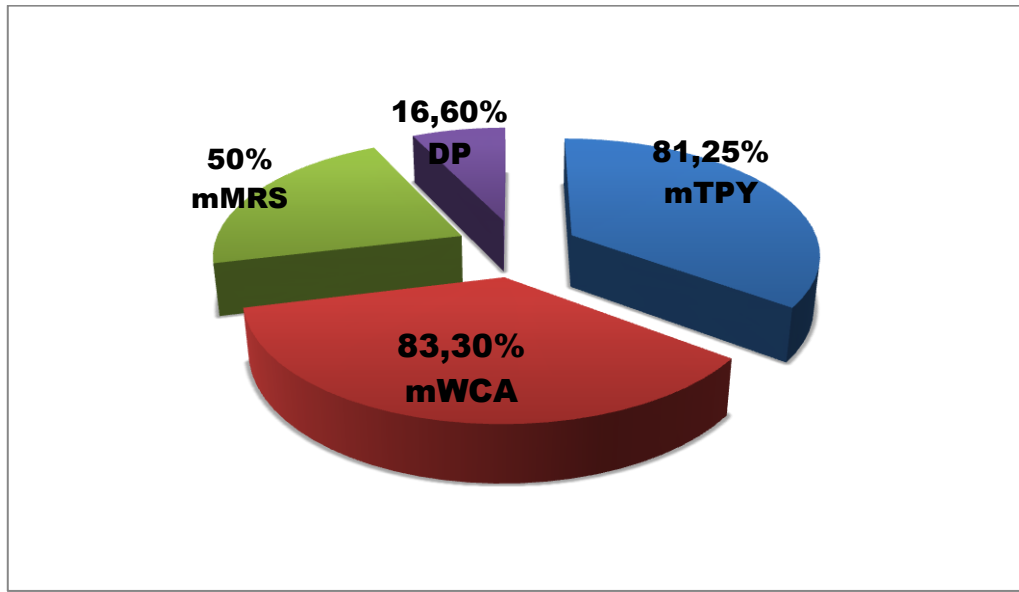
Şekil 4-3: Astım /Alerjik dermatit /Hem astım hem de alerjik dermatit tanısı almış hastaların cinsiyete göre dağılım grafiği

Tablo 4-3: Astım /Alerjik dermatit /Astım+Alerjik dermatit tanısı almış hastaların cinsiyete göre dağılımı

HASTALAR	ASTİM TANISI ALMIŞ HASTALAR	ALERJİK DERMATİT TANISI ALMIŞ HASTALAR	ALERJİK DERMATİT VE ASTİM TANISI ALMIŞ HASTALAR
	sayı	sayı	Sayı
Kız Hastalar	33	13	5
Erkek Hastalar	34	11	4
Toplam Hasta	67	24	9

Çalışmamıza dahil edilen hastalar, hastalık tanılarına göre gruplandırıldığında, astım tanısı almış hastaların sayıca diğer hastalardan daha fazla olduğu (67 hasta), bunu 24 hasta ile alerjik dermatit tanısı almış hasta grubunun izlediği, astım ve alerjik dermatit tanısını birlikte almış hastaların sayısının (9 hasta) ise en düşük sayılı hasta grubumuzu oluşturduğu gözlenmiştir. Her bir hasta grubunda kız ve erkek hasta sayısının, birbirine oldukça yakın olduğu görülmektedir. (Tablo 4-3 ve Şekil 4-3)

Bifidobacterium cinsi bakterilerin üretiminde kullandığımız besiyerlerinin hepsinden kültür sırasında benzer verim alamadığımızı gözlemledik. Kullandığımız besiyerlerinden mWCA ve mTPY, kökenlerimizin en iyi ürettiği besiyerleri (sırasıyla %83,3 ve %81,25) olmuştur. Buna karşın, L-sistein içermeyen selektif mMRS besi yerinde kökenlerimizin ancak %50 si, DP besi yerinde ise kökenlerimizin ancak %16,6'sı üremiştir. Sıvı bir besi yeri olan TPY besi yeri transport amaçlı kullanıldığı için üretim performansı belirtilmemiştir (Şekil 4-4).



Şekil 4-4: Anaerop kültürde üretilen toplam 306 Bifidobakteri kökeninin kullanılan besiyerlerinde üreme oranı.

Bifidobakterilerin kültür ve tanımlanması sırasında anaerop kültür ile üretilen ve tanımlanabilen bifidobakteri kökenleri ile transport için kullandığımız sıvı (TPY) besi yerinden multipleks PZR yöntemi ile saptanabilen kökenler arasında farklılıklar olmuştur. Anaerop kültürde üretilen API 20-A ile cins düzeyinde bifidobakteri olarak saptadığımız halde multipleks PZR için kullandığımız elimizdeki primerler ile tür düzeyinde tanımlama yapamadığımız 10 hasta çocuk numunesine ait 14 köken ve 4 sağlıklı çocuk numunesine ait 5 köken saptanmıştır (Tablo 4-4).

Tablo 4-4: Anaerop kültürde üretilen ancak multipleks PZR için kullandığımız primerler ile tür düzeyinde tanımlanma yapılamayan numune ve köken sayısı

Numune sayısı	Köken sayısı
Hasta çocuk numunesi (10)	14
Sağlıklı çocuk numunesi (4)	5

Bunun yanı sıra Anaerop kültürde katı besi yerinde üretmediğimiz halde transport için kullandığımız sıvı (TPY) besi yerinden yapılan DNA izolasyonu ile PZR’da saptadığımız hasta çocuk numunelerine ait 41 köken ve sağlıklı çocuk numunelerine ait 47 köken saptanmıştır (Tablo 4-5).

Tablo 4-5: Anaerop kültürde katı besi yerinde üretilmeyen ancak PZR tekniği ile *Bifidobacterium spp* saptanan numune ve köken sayısı*

Numune sayısı	Köken sayısı
Hasta çocuk numunesi (17)	41
Sağlıklı çocuk numunesi (23)	47

*Sıvı transport TPY besi yerinde bulunan numuneden yapılan DNA izolasyonu sonucu izole edilmiştir.

Anaerop kültür için kullandığımız katı besiyerlerinde ve transport besi yerinde herhangi bir üreme kaydedemediğimiz bunun yanında multipleks PZR yöntemi ile de herhangi bir bifidobakteri türü tespit edemediğimiz 7 hasta çocuk numunesi de belirlenmiştir (Tablo 4-6).

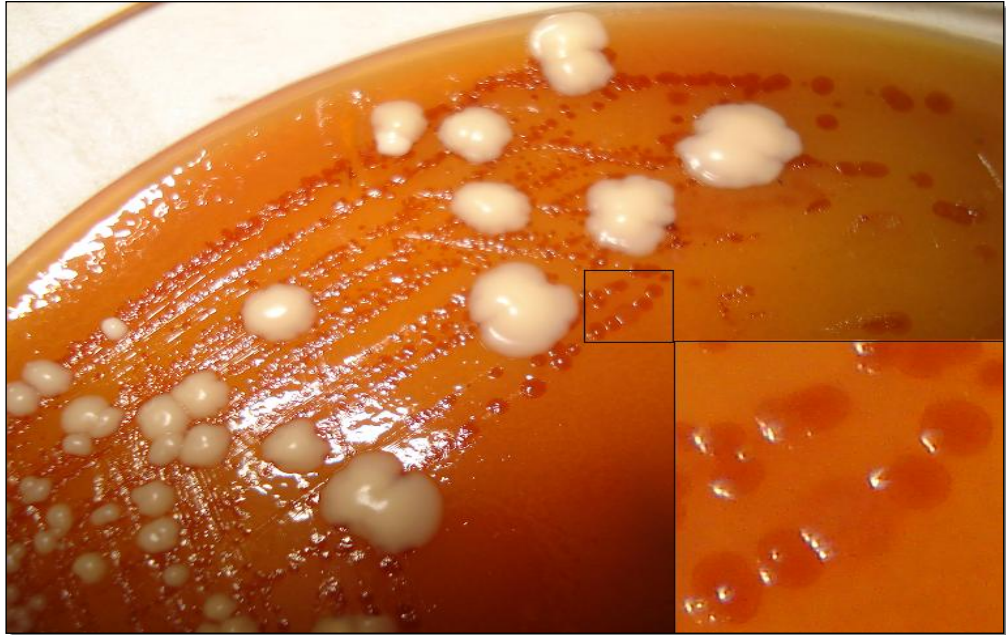
Tablo 4-6: Anaerop kültürde katı besi yerinde üretilmeyen ve PZR tekniği ile *Bifidobacterium spp* saptanamayan numune sayısı

Hasta çocuk numunesi	7
Sağlıklı çocuk numunesi	0
Toplam çocuk numunesi	7

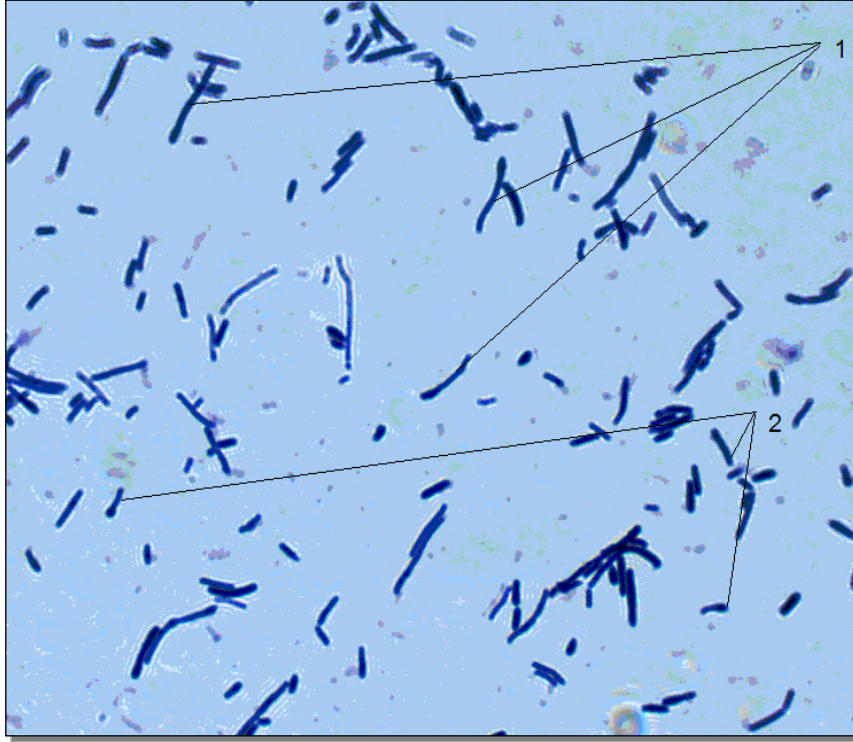


Şekil 4-5: mWCA besi yerinde üreyen farklı morfolojide Bifidobakteri kolonileri.

1-Bifidobacterium spp 1, 2- Bifidobacterium spp 2.



Şekil 4-6: mWCA besi yerinde üreyen besi yeri zemini kaplamış halde kahverenkli Bifidobakteri kolonileri.



Şekil 4-7: Bir hasta çocuğun gaita numunesinden, anaerob şartlarda ürettiğimiz farklı morfolojideki *Bifidobacterium* türlerinin Gram preparasyondaki görünümü.

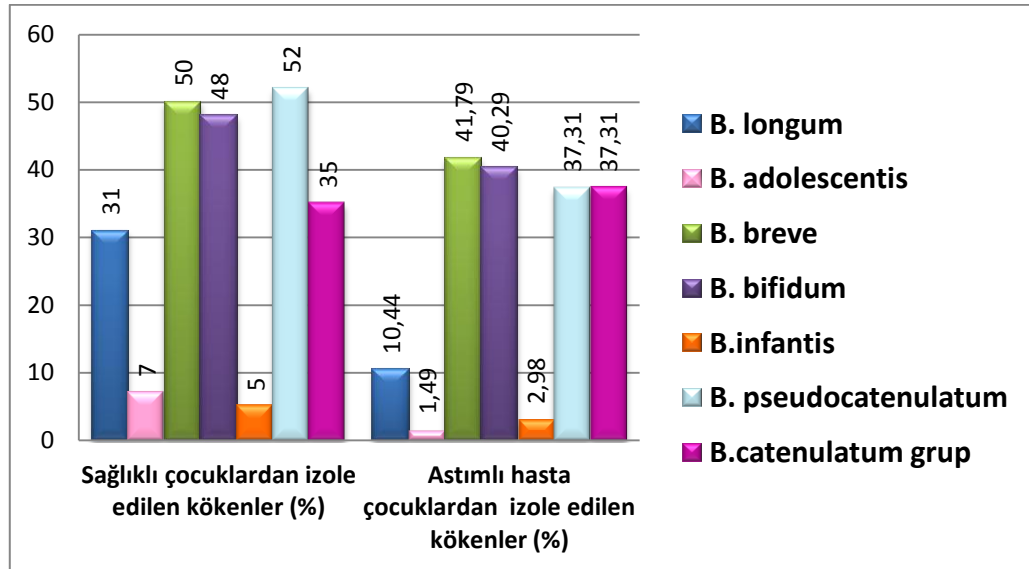
1-*Bifidobacterium* spp 1, 2- *Bifidobacterium* spp 2



Şekil 4-8: Bir hasta çocuktan izole ettiğimiz Bifidobakteri suşu ile yapılan Apı 20-A testi sonuçları.

API 20-A kiti *Bifidobacterium spp 1* ve *Bifidobacterium spp 2*'yi tanımlamaktadır. Bu 2 tür *B.adolescentis 1* ve *B.adolescentis 2* kökenlerine karşılık gelmektedir. Diğer Bifidobakterilerin API 20-A kiti ile tür düzeyinde tanımlanma imkanı olmadığından, Bu kit ürettiğimiz kökenlerin *Bifidobacterium* cinsi olup olmadığının belirlenmesi ve *B.adolescentis*'in ön tanısı için kullanıldı.

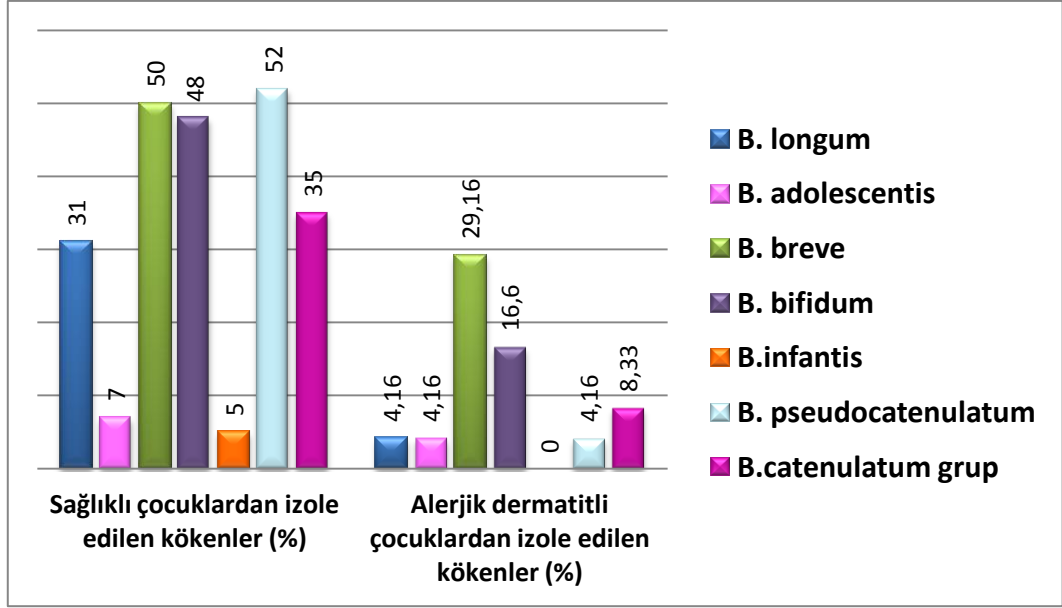
Elde ettiğimiz PZR verilerine göre sağlıklı çocukların numunelerinden en yüksek oranda izole ettiğimiz tür *B. pseudocatenulatum* olmuştur (%52). Bunu sırasıyla *B. breve* (%50), *B. bifidum* (%48), *B. catenulatum grup*(%35), *B. longum* (%31) ve *B. adolescentis* (%7) izlemiştir. *B. infantis* ise sağlıklı çocuklardan en düşük oranda izole edilen tür olmuştur (%5). Astımlı çocuklardan izole ettiğimiz türler incelendiğinde en fazla izole edilen tür *B.breve* olarak görülmektedir (%41.79). Bunu %40,29'luk oranla *B. bifidum*, %37,31'lik oranlarda *B.pseudocatenulatum* ve *B.catenulatum grup* izlemektedir. En az izole edilen türler alerjik dermatitli çocuklardan elde edilen izolasyon oranlarına yakın % 10,44 lük oranla *B.longum*, %2,98 lik oranla *B.infantis* ve % 1,49 luk oranla *B.adolescentis* izlemektedir. Bu oranlar sağlıklı çocuklardaki türlerin oranlarıyla kıyaslandığında, *B.longum* ve *B.adolescentis* astım tanısı almış çocuklarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaktadır ($p<0,05$)(Tablo 4-7).



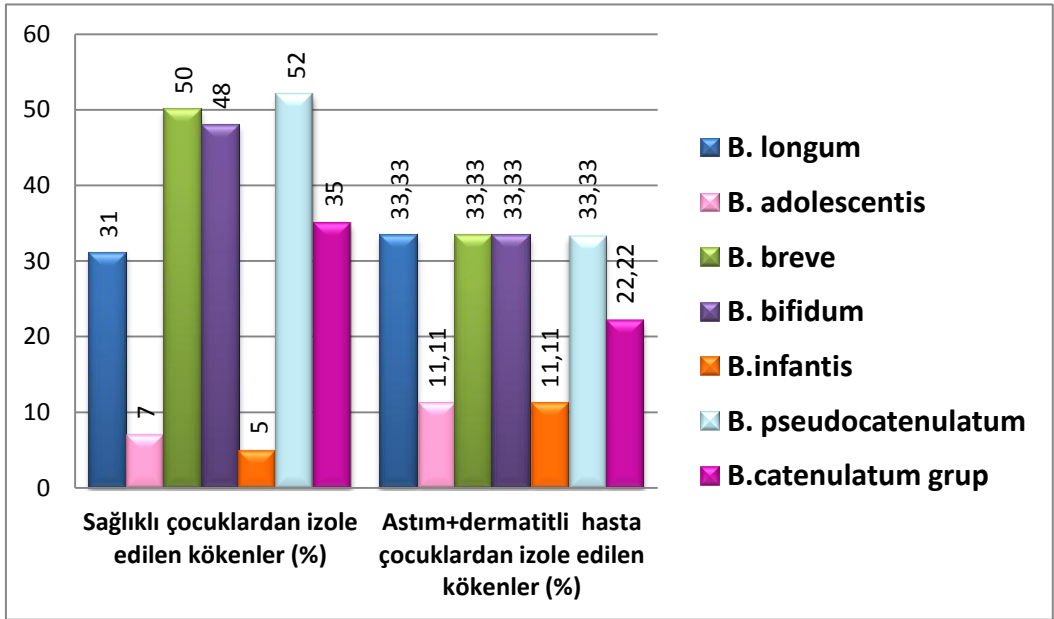
Şekil 4-9: Astımlı hasta çocuklardan izole edilen *Bifidobacterium* kökenlerinin sağlıklı çocuklardakine göre dağılım oranları (%).

Elde ettiğimiz PZR sonuçlarına göre alerjik dermatitli hasta çocuklardan en yüksek oranda izole edilen türün *B. breve* (%29,16) olduğu görülmektedir (Şekil 4-10). Bunu sırasıyla *B. bifidum* (%16,6), *B. catenulatum grup* (%8, 33) ve eşit oranlarla *B. longum*, *B. adolescentis* ve *B. pseudocatenulatum* (%4,16) izlemiştir. *B. infantis* ise alerjik dermatitli çocuklardan hiç izole edilememiştir. Bu oranları sağlıklı çocuklardan izole ettiğimiz oranlarla kıyaslarsak en fazla fark *B. longum* türünde görülmektedir. *B. longum* sağlıklı çocuklarda %31 oranında tespit edilirken alerjik dermatitli çocuklarda bu oran %4,16 olarak görülmektedir. *B. pseudocatenulatum*, *B. bifidum* ve *B. catenulatum grup*'un da alerjik dermatitli çocuklarda sağlıklı çocuklara nazaran istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azaldığı görülmektedir ($p<0,05$) (Tablo 4-7).

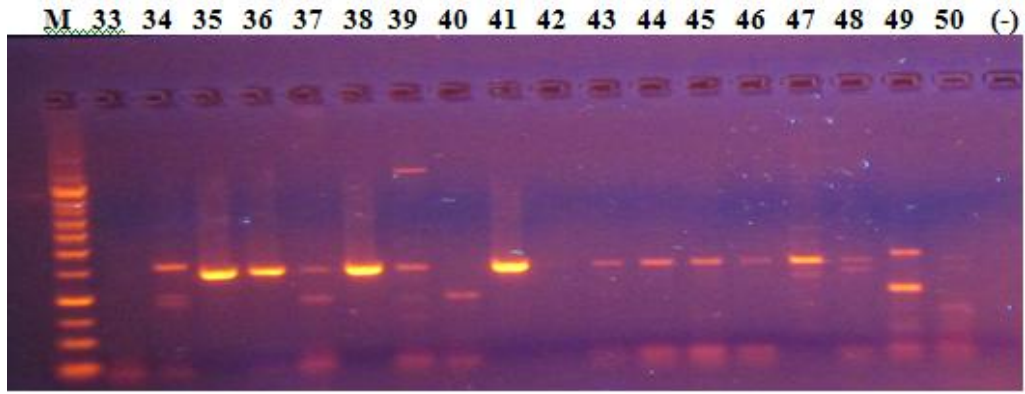
PZR sonuçlarına göre hem astım hem alerjik dermatit tanısı almış 9 çocuktan izole edilen türler içinde tek bir türün diğerlerine baskın oranda olduğu gözlenmemektedir. *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* ve *B. pseudocatenulatum* türleri bu grupta %33,33 lük oranla en fazla izole edilen türler olmuştur. *B. catenulatum grup* ise %22,22' lik oranla bunları izlerken *B. infantis* ve *B. adolescentis* türlerinin her ikisi de %11,11' lik oranla en az izole edilen türler olmuştur. Sağlıklı çocuklardan izole edilen türler ile hem astım hem de alerjik dermatit tanısı almış çocuklardan izole edilen türler arasında kıyaslama yapacak olursak en yüksek farkın *B. pseudocatenulatum* türünde olduğu görülmektedir. Sağlıklı çocuklarda bu tür %52 oranında tespit edilirken hem astım hem de alerjik dermatit tanısı almış çocuklarda bu oran %33,33 olarak bulunmuştur. Sağlıklı çocuklardan izole edilen türler ile hem astım hem alerjik dermatit tanısı almış çocuklardan izole edilen türler arasında istatistiksel bir fark olup olmadığı bu gruptaki hasta sayısı az olduğundan araştırılmamıştır (Tablo 4-7).



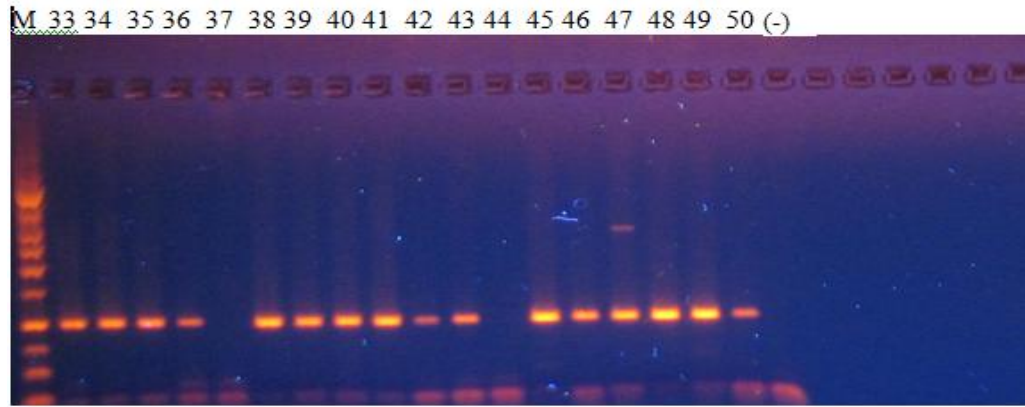
Şekil 4-10: Alerjik dermatitli hasta çocuklardan izole edilen *Bifidobacterium* kökenlerinin, sağlıklı çocuklardakine göre dağılım oranları (%).



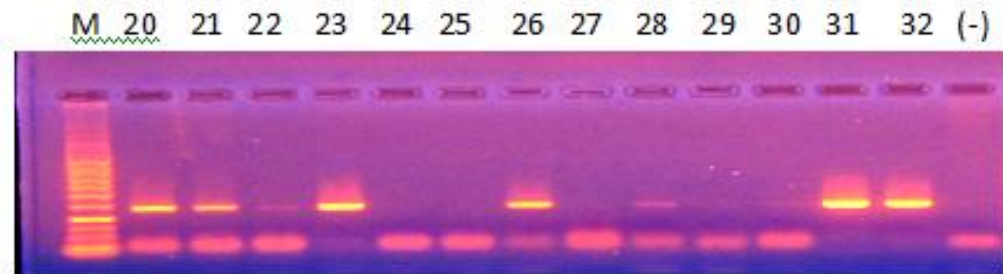
Şekil 4-11: Hem alerjik dermatit hem de astım tanısı almış hasta çocuklardan izole edilen *Bifidobacterium* kökenlerinin, sağlıklı çocuklardakilere göre dağılım oranları (%).



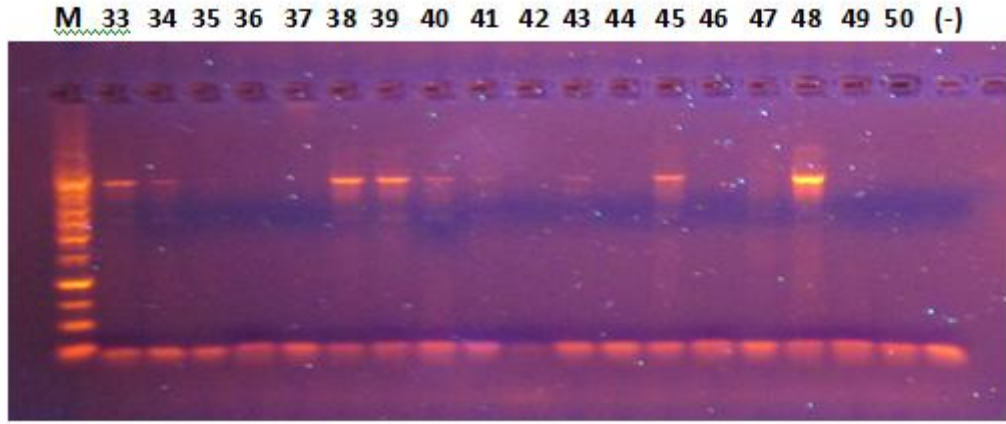
Şekil 4-12: Multipleks PZR tekniği ile saptanan *Bifidobacterium catenulatum* grubuna ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü. M: marker, (-): Negatif kontrol, Pozitif örnekler: 34- 39, 41, 43- 49, Negatif örnekler: 33, 40, 42, 50. DNA ladder 100 bp, PZR ürünü 285 bp.



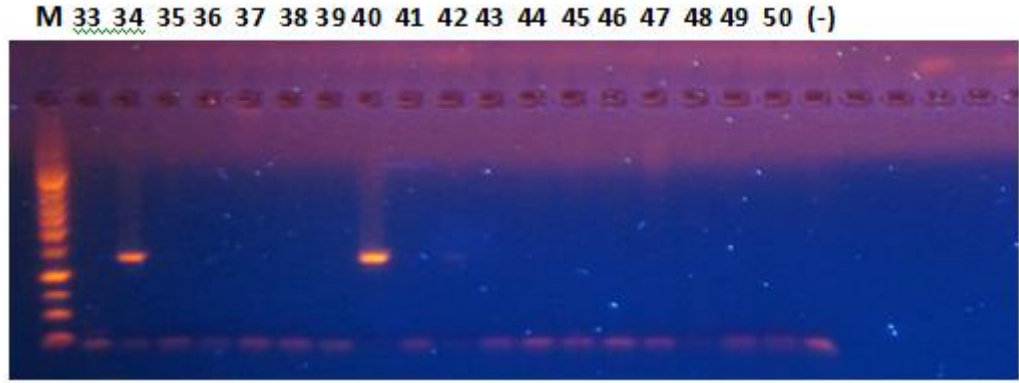
Şekil 4-13: Multipleks PZR tekniği ile saptanan *B. pseudocatenulatum*'a ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü. M: marker, (-): Negatif kontrol, Pozitif örnekler: 33-36, 38-43, 45-50 Negatif örnekler: 37, 44; DNA ladder 100 bp, PZR ürünü 200 bp.



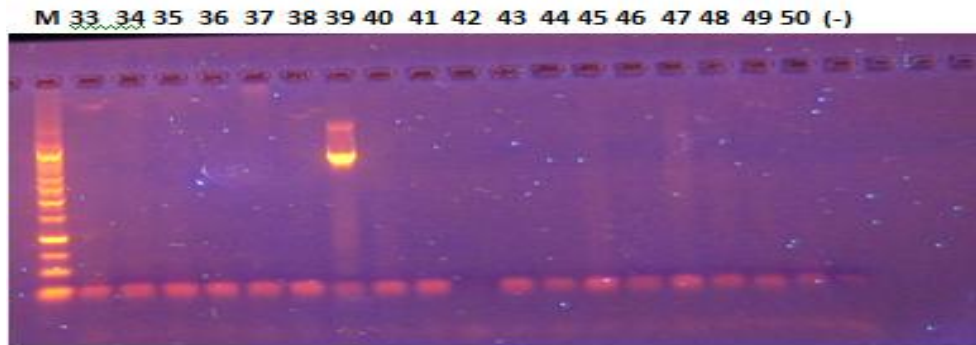
Şekil 4-14: Multipleks PZR tekniği ile saptanan *B. bifidum*'a ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü. M: marker, (-): Negatif kontrol, Pozitif örnekler: 20-23, 26, 28, 31, 32. Negatif örnekler: 24, 25, 27, 29, 30, 33; DNA ladder 100 bp, PZR ürünü 278 bp.



Şekil 4-15: Multipleks PZR tekniği ile saptanan *B. longum*'a ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü. M: marker,(-): Negatif kontrol, Pozitif örnekler: 33, 34, 38-40, 43, 45, 48 Negatif örnekler: 35-37, 41, 42, 44, 46, 47, 49, 50; DNA ladder 100 bp, PZR ürünü 831 bp.



Şekil 4-16: Multipleks PZR tekniği ile saptanan *B. adolescentis*'e ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü. M: marker,(-): Negatif kontrol, Pozitif örnekler: 34,40 Negatif örnekler: 33, 35-39, 41-50; DNA ladder 100 bp, PZR ürünü 279 bp.



Şekil 4-17: Multipleks PZR tekniği ile saptanan *B. infantis*'e ait gen bölgesinin agaroz jelde görünümü. M: marker,(-): Negatif kontrol, Pozitif örnekler: 39 Negatif örnekler: 33-38, 40-50; DNA ladder 100 bp, PZR ürünü 828 bp.

Tablo 4-7:PZR ile izole edilen Bifidobakteri türlerine ait kökenlerin hasta gruplarına göre dağılım oranı (%)

Bifidobakteri türleri	Toplam saptanan Bifidobakteri kökenleri	100 Sağlıklı çocukta saptanan kökenler (%)	67 Astımlı hasta çocukta saptanan kökenler (%)	24 Alerjik dermatitli hasta çocukta saptanan kökenler (%)	9 Astım+A.dermatitli hasta çocukta saptanan kökenler (%)	p1	p2
<i>B. longum</i>	42	31(31)	7(10,44)	1(4,16)	3(33,33)	P<0.05	P<0.05
<i>B. adolescentis</i>	10	7(7)	1(1,49)	1(4,16)	1(11,11)	P<0.05	P<0.05
<i>B. breve</i>	88	50(50)	28(41,79)	7(29,16)	3(33,33)	p>0.05	p>0.05
<i>B. bifidum</i>	82	48(48)	27(40,29)	4(16,6)	3(33,33)	p>0.05	P<0.05
<i>B.infantis</i>	8	5(5)	2(2,98)	0 (%0)	1(11,11)	p>0.05	P<0.05
<i>B. pseudocat.</i>	81	52(52)	25(37,31)	1(4,16)	3(33,33)	p>0.05	P<0.05
<i>B.catenulatum</i> grup	64	35(35)	25(37,31)	2(8,33)	2(22,22)	p>0.05	P<0.05

P1: Astımlı hasta çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında *Bifidobacterium* türlerinin istatistiksel durumu.

P2:Alerjik dermatitli çocuklar ile sağlıklı çocuklar arasında *Bifidobacterium* türlerinin istatistiksel durumu.

5. TARTIŞMA

Bağırsak florasının en önemli bakterileri arasında yer alan *Bifidobacterium* türleri ile ilgili araştırmalara son yıllarda ağırlık verildiği bu bakterilerin pek çok araştırmaya konu olmasıyla görülmektedir. Bazı araştırmalarda insanda oluşan fizyolojik düzensizlikler ve enfeksiyon hastalıkları, insan bağırsak mikroflorasındaki bifidobakteri ve laktobasillerin sayısındaki azalma ile ilişkilendirilmiştir (26, 28, 114, 115). Son yıllarda alerjik hastalıklarla bifidobakteri türleri arasında ilişki kurulabileceği üzerinde durulmuş ve kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Bjorksten B. ve ark. (28)'nın alerjik hastalıkların yüksek olduğu İsveçli çocuklar ile alerjinin düşük görüldüğü Estonya'lı çocukların intestinal florasının farklı olduğunu bildirmesinden sonra, intestinal floranın düzenlenmesi ile alerjik hastalıkların sıklığının ve şiddetinin azaltılması olasılığı doğmuş ve buna paralel olarak probiyotiklerin yaygın kullanım alanlarından biri de alerjik hastalıklar olmuştur.

Yapılan araştırmalarda alerjik hastalar, bağırsak florasının henüz gelişme aşamasında olduğu iki yaş ve altı çocuklardan seçilmiştir. Çevresel faktörlere bağlı olarak alerji belirtilerinin ortaya çıkmasıyla bağırsak florasındaki bifidobakteri türleri belirlenerek elde edilen sonuçların aynı yaş grubunda sağlıklı çocukları ile karşılaştırılmasına gidilmiştir (26, 28, 114, 115).

Araştırmamız, kaynaklar ışığında üç yaş ve altını kapsayan hastalar ve sağlıklı çocuklar ile yapılmıştır. Alerjik hastalar ve *Bifidobacterium* ilişkili çalışmalarda hastaların cinsiyeti ile ilişkili bir bağlantı rastlanmadığından çalışmamıza dahil edilen hastaların cinsiyeti rastgele seçilmiştir. Hasta grubumuzun %51'ini kız çocuklar ve %49'unu erkek çocuklar oluşturmaktadır.

İnsanda bağırsak florasının büyük bölümü anaerop bakterilerden oluşmaktadır. Küçük çocuklarda özellikle anne sütü ile beslendikleri dönemde bağırsakta bulunan *Bifidobacterium* oranının %90'lara ulaştığı 2005 yılında Harman ve Knol (116) tarafından bildirilmiştir. Smehilova ve ark. (26) 2008 yılında sağlıklı çocukların %82'sinde kültür yöntemiyle bağırsakta *Bifidobacterium* varlığını göstermişlerdir. Walligora-Dupriet ve ark. (25) 2011 yılında 2 yaş altı sağlıklı çocuklarda bağırsak *Bifidobacterium* oranını %95 olarak bulmuşlardır. Ülkemizde küçük çocuklarda bağırsak florasında bifidobakterilerin diğer anaeroplara göre oranını belirtir bir veriye

rastlayamadık. Özellikle çocukluk yaşlarında bağırsak florasında bifidobakterilerin yüksek oranda bulunmasına karşın bu bakterilerin anaerob kültürlerle üretimi oldukça zordur. Pek çok araştırmacı bifidobakteri türlerinin üretimi ve tür düzeyinde tanımına yönelik çalışmalarında gerek selektif gerekse non-selektif besiyerlerine ihtiyaç duymuştur (25, 47, 111, 112). Hadadji ve ark. (117) 2005 yılında yaptıkları araştırmada bifidobakterileri üretmek için TPY agarı kullanmışlardır. Aynı şekilde 1990 yılında Sozzi ve ark. (111) TPY ve MRS agarı dikloksasilin ilavesiyle modifiye ederek kullanmışlardır. Harman ve Knol (116) çalışmalarında bifidobakteri türlerini üretebilmek için mMRS sıvı besi yerini, 2011 yılında Walligora-Dupriet ve ark. (25) kanamisin, L sistein ve Tween 80 ile selektif hale getirilmiş WCA agar besi yerini kullanmışlardır. Bonaparte ve ark. (112) ise bifidobakteri üretimi için 1997 yılında dikloksasilin ve propiyonik asit ile zenginleştirilmiş DP agarı kullanmışlardır. Biz çalışmamızda bu dört agarın hepsini bir arada kullanarak bifidobakterileri üretmeye çalıştık ancak çalışmanın ilerleyen dönemlerinde DP agar ve mMRS agarda aldığımız verimin mTPY ve mWCA'ya göre oldukça düşük olduğunu gördük bu nedenle benzer araştırmalarda bifidobakteri üretimi için mTPY agar veya mWCA agarın kullanılmasında yarar olacağı kanaatindeyiz.

Son yıllarda bağırsakta, fekal florada bulunan *Bifidobacterium* türleri ile bazı hastalıklar arasında ilişki olabileceği düşünülmüş ve bu yönde araştırmalara başlanmıştır (25, 26, 28, 115). Smehilova ve ark. (26) 2008 yılında sağlıklı çocukların bağırsak mikrobiyotası ile alerjik koliti olan çocukların bağırsak mikrobiyotasını bifidobakteriler yönünden karşılaştırmış ve sağlıklı çocuklarda *Bifidobacterium longum*'un %54'lük oranla en üst sırada yer aldığını ve bu türü sırasıyla %20'lik oranla *Bifidobacterium adolescentis*, %18'lik ve %16'lık oranlarla *Bifidobacterium breve* ve *Bifidobacterium bifidum*'un ve %1'lik oranla *Bifidobacterium pseudocatenulatum*'un izlediğini göstermiştir. Bununla birlikte alerjik kolitli çocuklarda toplam bifidobakteri oranında azalma olduğunu belirtmiştir. He F (115) 2001 yılında sağlıklı çocukların bağırsak florasında *Bifidobacterium bifidum*'un en yüksek oranda izole edilen bakteri olduğunu, bunu *Bifidobacterium infantis* ve *Bifidobacterium adolescentis*'in takip ettiğini göstermiştir. Hadadji ve ark. (117) 2005 yılında sağlıklı çocukların bağırsak florasında *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum* ve *Bifidobacterium bifidum*'un çoğunlukla yer aldığını belirtmişlerdir. Son olarak 2011 yılında Walligora-Dupriet (25) 2 yaş altı sağlıklı çocuklarda *Bifidobacterium breve*'i hem hasta hem de

sağlıklı çocuklarda yüksek sayıda izole etmiştir. *Bifidobacterium longum* ise hasta çocuklarda sağlıklılara nazaran daha fazla izole edilmiştir. Aynı araştırmacılar sağlıklı çocuklarda, alerjik dermatitlilere nazaran *Bifidobacterium bifidum*'un daha fazla bulunduğunu belirtmişlerdir. Biz araştırmamızda sağlıklı çocukların bağırsaklarında *Bifidobacterium pseudocatenulatum* başta olmak üzere *Bifidobacterium breve* ve *Bifidobacterium bifidum*'u diğer türlere kıyasla sırasıyla %52, %50, %48 oranlarıyla daha fazla sayıda ürettik. Bu oranları %35'lik oranla *Bifidobacterium catenulatum* grup ve *Bifidobacterium longum* takip etti (%35 ve %31). Sağlıklı çocuklarda en düşük oranda tespit ettiğimiz türler *Bifidobacterium adolescentis* (%7) ve *Bifidobacterium infantis* (%5) olmuştur. Çalışmamızın sağlıklı çocuklar yönünden bulguları oranlar yönünden Walligora-Dupriet'in bulguları ile özellikle *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium catenulatum* grup yönünden benzeşmektedir.

Grönlund MM ve ark. (114) 2007 yılında bir aylık sağlıklı çocuklarda bağırsak florasında en fazla kolonize olan bifidobakterileri değişik ülkelerden gelen verilerle bildirmişlerdir. Buna göre 2007 yılında Finlandiya'dan, 2004 yılında Gana ve İngiltere'den, 1999 yılında Japonya'dan ve 1995 yılında Almanya'dan bildirilen verilerde *Bifidobacterium longum* grup'un en yüksek oranda izole edildiği belirtilmiştir. Bu grubun bir üyesi olan *Bifidobacterium longum* ise 2004 yılında Gana'da %6 oranında bulunurken aynı yıl İngiltere'den %52 oranında bildirilmiştir. Tam tersine *Bifidobacterium infantis* Gana'dan %72 olarak bildirilirken aynı yıl İngiltere'den %0 olarak bildirilmiştir. Japonya ve Almanya'dan *Bifidobacterium infantis*'in izolasyon oranı %41-55 arasında olmuştur. Japonya'dan 1999 yılında aynı çocukların bağırsak florasında *Bifidobacterium breve*, %70'lik oranla *Bifidobacterium longum* grup'tan sonra en fazla izole edilen tür olmuştur. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* yalnızca İngiltere'den bildirilirken *Bifidobacterium catenulatum* grup Japonya ve Finlandiya'dan bildirilmiştir. Grönlund'a göre çalışmaya katılan diğer ülkelerden bu türler hakkında bir veri girişi bulunmamaktadır. Çalışmamızın bulgularında *Bifidobacterium breve*' in sağlıklı çocuklarda saptanma durumu 1999 yılında Japonya'dan, 2011 yılında Fransa'dan bildirilen verilerle uyushmaktadır; ancak *Bifidobacterium pseudocatenulatum* ve *Bifidobacterium catenulatum* grup için elde ettiğimiz oranlar bu ülkelerden gelen verilerin çok üstünde kalmıştır. Sağlıklı çocuklarda *Bifidobacterium adolescentis* oranımız %7 olarak bulunmuştur. Bu oran 2001 yılında

He F ve ark. (115)'nin bulgusuyla benzeşmektedir. *Bifidobacterium bifidum* ise He F ve ark.'nın belirttiğine yakın olarak en yaygın türler arasında karşımıza çıkmıştır. Bu bulgumuz Smehilova'nın sağlıklı çocuklardan izole ettiği %16,4'lük oranın çok üstünde kalmıştır.

He F ve ark. (115) 2001 yılında alerjik dermatitli çocukların bağırsak florasında özellikle *Bifidobacterium adolescentis* ve *Bifidobacterium infantis*'in yoğunlukta olduğunu belirtmişlerdir. Bu bulgu bizim araştırmamızda alerjik dermatitli çocuklardan izole ettiğimiz oldukça düşük olan *B. adolescentis* ve *B. infantis* oranlarına ters düşmektedir.

Lyon, (118) Bifidobakterileri bağırsak florasında yeterli miktarda bulunduran çocuklarda alerjik astım gelişme olasılığının azaldığını belirtmektedir. Gutkowski (119) 12 hafta süreyle *Bifidobacterium bifidum* preparatı kullanan alerjik astım tanısı almış çocuklarda, klinik tabloda düzelme olduğuna değinmiştir. Ma Hong ling (120) alerjik astım tanısı almış çocuklarda, *Bifidobacterium adolescentis* kullanımını takiben dendritik hücrelerden IL-12 ve INF γ salınımının arttığını göstermiştir .

Araştırdığımız ulusal ve uluslar arası kaynaklarda, astım tanısı almış çocukların bağırsak florasındaki bifidobakteri türleri hakkında bir veriye rastlayamadık. Kaynaklar, alerjik astım tanısı almış çocuklarda, bifidobakteri preparatları kullanmalarını takiben iyi yönde gelişme görüldüğünü belirtmektedir, ancak bu değişim aşamalarında floradaki bifidobakteri türlerinin ya da yoğunluğunun ne olduğu hakkında bilgi vermemektedir.

Astım ve alerjik dermatit tanılarının her ikisini birden alan çocuklarımızda ürettiğimiz *Bifidobacterium* türleri hakkında, bu gruptaki hasta sayımız çok az olduğundan sağlıklı bir oran tespit edilememiştir. Bu nedenle bu grupta elde ettiğimiz sonuçların sağlıklı çocukları ile kıyaslanması ancak bir ön bilgi mahiyetinde olmaktadır. Anlamlı bir tartışma için bu gruptaki hasta sayısının ileri çalışmalarla artırılması gerekmektedir.

Sonuç olarak, sağlıklı çocuklarla kıyaslandığında, astım tanısı almış çocukların bağırsak florasında *Bifidobacterium longum* ve *Bifidobacterium adolescentis*'in anlamlı düzeyde azaldığı belirlenmiştir. Alerjik dermatit tanısı almış çocuklarda ise başta yine *Bifidobacterium longum* olmak üzere *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium*

pseudocatenulatum ve *Bifidobacterium catenulatum* türlerinde de anlamlı derecede azalma saptanmıştır. Aynı zamanda her iki hasta grubundaki çocuklar sağlıklı çocuklar ile karşılaştırıldığında bağırsak floralarındaki bütün bifidobakteri türlerinde azalmalar görülmüştür. Kaynaklarda benzer konularda yapılan araştırmalarda seçilen metotların ve kullanılan bifidobakteri primerlerinin standart olmadığı görülmüştür. Bu durum, sonuçların sağlıklı şekilde yorumlanmasını etkilemektedir. Bu konuda kapsamlı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Fang He ve ark. (121) tarafından yapılan bir çalışmada, atopik dermatitli bebeklerde bifidobakterilerin in vitro şartlarda yüksek oranda proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını teşvik ederken, sağlıklı bebeklerde antiinflamatuvar salınımını teşvik ettiği gösterilmiştir. Winkler ve ark. (122)'na göre, probiyotiklerin kullanımı TLR'i ve enterositlerin proteoglikan tanıma proteinlerini düzenleyerek dendritik hücrelerin aktivasyonunu sağlamakta ve alerjik rahatsızlıklarda Th2 yönüne kayan sitokin dengesini Th1 yönüne çevirmektedir. Eğer Th1 yönünde olan bu özgün immün tolerans yaşamın erken safhalarında ya da yaşam boyunca oluşmazsa inflamatuvar, otoimmün ve alerjik hastalıkların oluşması için bir risk faktörü teşkil edebileceği görüşü günümüzde kabul görmektedir. Alerjik rahatsızlıkların, bu bozulmuş Th2 yanıtı ile ilişkili olduğu görüşü halen kabul gördüğü halde, T hücrelerine ait alt grupların tanımlanmasına yönelik araştırmaların hız kazanmasıyla birlikte, hastalığın altında yatan kompleks mekanizmanın açıklanmasında, bozulmuş Th2 yanıtının tek başına yeterli olmayabileceği görüşüne de yer verilmektedir (123).

Gerek bütün probiyotiklerin gerekse bifidobakterilerin immün sistem üzerindeki etkisi, daha önce yapılan “alerji ve probiyotik kullanımı” ile ilgili çalışmalarda belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da alerjik bebeklerdeki semptomların varlığı, bağırsaklarında azalmış bifidobakteri oranının immüntoleransı etkileyebilme potansiyeli ile ilişkilendirilebilir.

Son yıllarda mikrobiyon üzerine yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Kaynaklarda astımlı çocukların fekal florasında bulunan *Bifidobacterium* türleri hakkında bir araştırma bulunmaması nedeniyle çalışma sonuçlarımızın ülkemiz için önemli bir kaynak olacağı kanaatindeyiz.

6. KAYNAKLAR

1. Kültürsay N. Bebeklikte bağırsak florası gelişimi ve immun sisteme etkileri. *Çocuk Enf Derg.* 2009; **3**: 75-78.
2. Saevedra JM. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutr Clin Pract.* 2007; **22**: 351-365.
3. Tezcan Fİ. İntestinal immun sistem. *Türkiye klinikleri J Pediatr Sci.* 2007; **3**: 65-67.
4. Neish A. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009; **136**: 65-80.
5. Turan İ, Özütemiz Ö. İntestinal mikroflora. *Güncel Gastroenteroloji* 2005; **9**: 126-144.
6. Simon GL, Gorbach SL. İntestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984; **86**: 174-193.
7. Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic flora. *Gut* 1998; **42**: 2-7.
8. Mamal Torun M, Bahar H, Gür E, Taştan Y, Alikasıfoğlu M, Arvas A. Anaerobic fecal flora in healthy breast-fed Turkish babies born by different methods. *Anaerobe* 2002; **8**: 63-67.
9. Yıldırım Z, Yıldırım M. 2000. Probiyotik Özellik Gösteren Bifidobakteriler. *VI. Süt ve Süt Ürünleri Sempozyumu (Süt Mikrobiyolojisi ve Katkı Maddeleri)* Tekirdağ, 266–271.
10. Alp G, Aslım B. İnsan bağırsak sisteminde probiyotik olarak bifidobakterilerin önemi. *Anadolu Üniversitesi Bilim ve Teknoloji Dergisi* 2009; **10**: 343-354.
11. Guarner F, Malageldá JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; **22**: 360-366.
12. Prestamo G, Pedrazuelab A, Penasa E, Lasuncionc MA ve Arroyob G. Role of buckwheat diet on rats as prebiotic and healthy food. *Nutrition Research* 2003; **23**: 803–814.
13. Kaptan H. Bifidobakteriler, karakterisitik özellikleri, insan sağlığındaki rolleri ve süt ve süt ürünlerindeki potansiyel kullanımları. *Gıda* 2000; **25**: 459-465.

14. Aygün G, Aslan M, Yaşar H ve Atlas K. Antibiyotik ile ilişkili ishal olgularında *Clostridium difficile* toksin A+ B araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi* 2003; **33**: 39-41.
15. Anand SK, Srinivasan RA ve Rao LK. Antimicrobial activity associated with *Bifidobacterium*-II. *Culture Dairy Production of Journal* 1985; **2**: 22-21.
16. Garsse J, Herreillers M, Loveren H, Van Vos J ve Opperhuizen A. Immunomodulation by probiotics: a literature survey. *RIVM report 340320001*, Bilthoven 2003; 6-33.
17. Rasic LJ ve Kurman JA. Bifidobacteria and their role. *Experientia suppl* 1983; **39**: 3-34.
18. Rowland IR, Rumney CJ, Countts JT ve Lievens LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin a gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* 1998; **19**: 281-285.
19. Klaver FAM ve Van Der Meer R. The assumed assimilation of cholesterol by *Lactobacilli* and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Applied Environmental Microbiology* 1993; **59**: 1120-1124.
20. Yıldırım M, Özcanlı Ç. Atopik dermatit. *S.D.Ü. Tıp Fak. Derg.* 2004; **11**: 21-25.
21. Leung DY, Tharp M, Boguniewicz M. Atopic dermatitis. İçinde Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolf K, Freedberg IM, Austen KF, editor. *Fitzpatrick's Dermatology In General Medicine*. 5th ed. Newyork: Mc Graw Hill; 1999. pp. 1464-1480.
22. Brehler RB, Luger TA. Atopic dermatitis: the role of pityrosporum ovale. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2001; **15**: 5-6.
23. Kristal L. Atopic dermatitis in infants and children. An update. *Pediatr Clin North Am*. 2000; **47**: 877-895.
24. Türk Toraks Derneği Dergisi Astım Tanı ve Tedavi Rehberi. Haziran 2009; **10(ek 10)**.
25. Walligora-Dupriet AJ, Campetto F, Romero K, Mangin I, Rouzard G, Ménard O ve ark. Diversity of gut *Bifidobacterium* species is not altered between allergic and non- allergic French infants. *Anaerobe* 2011; **17** : 91-96.
26. Šmehilová M, Vlková E, Nevoral J, Flajšmanová K, Killer J, Rada V. Comparison of intestinal microflora in healthy infants and infants with allergic colitis. *Folia Microbiol*. 2008; **53**: 255–258.

27. Young SL, Simon MA, Baird MA, Tannock GW, Bibiloni R, Spencely K ve ark. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surfacemarkers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004; **11**: 686–690.
28. Bjorkstén B, Naaber P, Sepp E ve Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clinical and Experimental Allergy* 1999; **29**: 342-346.
29. Yılmaz M. Prebiyotik ve Probiyotikler. *Güncel Pediatri* 2004; **2**: 142-145.
30. Finegold SM, Sutter VL, Mathisen GE. Normal indigenous intestinal flora. İçinde Hentges DJ, editor. *Human İntestinal Flora in Health and Disease*. Newyork, London, Paris: Academic Press; 1983.
31. Pulverer G, Beuth J, Roszkowski W, Burrichter H, Roszkowski K, Yassin A ve ark. Bacteria of human physiological microflora liberate immunomodulating peptides. *Zbl Bakt.* 1990; **272**: 467-476.
32. Mountzouris KC, Gibson GR. Colonization of gastrointestinal tract. *Annales Nestle* 2003; **61**: 43-54.
33. Turgay Coşkun. Pro-, Pre- ve Sinbiyotikler[web page on the internet]. Erişim 14.05.2012, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi: http://www.cshd.org.tr/csh/images/figure_CSH_204_0.jpg
34. Hooper LV, Wong MH, Thelin A. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; **291**: 881-884.
35. Hart AL, Stagg AJ. The role of the gut flora in health and disease and its modification as therapy. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; **16**: 1383-1393.
36. Özden A. Gastro-intestinal sistem ve probiyotik-prebiyotik synbiyotik. *Güncel Gastroenteroloji* 2005; **9**: 3.
37. Bullen CL ve Tearle PV. bifidobacteria in the intestinal tract of infants: an in vitro study. *J. Med. Microbiol.* 1976; **9**: 355.
38. Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discovery Today* 2003; **8**: 692-700.
39. Gürsoy O ve Kınık Ö. Probiyotik bakterilerin klinik uygulamalarında yeni gelişmeler-I. *Ege Üniv Ziraat Fak Derg.* 2006; **43**: 181-188.
40. Alam M, Midtvedt T, Uribe A. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. *Scan J Gastroenterol.* 1994; **29**: 445-51.

41. Caicedo RA, Schanler RJ, Li N, Neu J. The developing intestinal ecosystem: Implications for the neonate. *Pediatr Res*. 2005; **58**: 625-628.
42. Taguchi H, Takahashi M, Yamaguchi H. Experimental infection of germ-free mice with hyper-toxigenic enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, strain 6. *J Med Microbiol*. 2002; **51**: 336-343.
43. Van der Waaij D. The ecology of the human intestine and its consequences for overgrowth by pathogens such as *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol*. 1989; **43**: 69-87.
44. Spahn TW, Kucharzik T. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs [web page on the internet], Erişim 03.06.2012, Gut-An International Journal of Gastroenterology ang Hepatology. <http://gut.bmj.com/content/53/3/456/F1.large.jpg>
45. Bezkorovainy A ve Miller-Catchpole R. *Biochemistry And Physiology Of Bifidobacteria*. 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Pres; 1989.
46. Mitsuoka T. Bifidobacteria and their role in human health. *Journal of Indiana Microbiology and Biotechnology* 1990; **6**: 263-268.
47. Rada V ve Petr J. Enumeration of bifidobacteria in animal intestinal sample. *Veterinarni Medicina* 2002; **47**: 1-4.
48. Huges DB ve Hoover DG. Bifidobacteria: their potential use in America dairy products. *Food technol*. 1991; **45**: 74-76.
49. Ishibashi N ve Shimamura S. Bifidobacteria: research and development in Japan. *Food technol*. 1993; 126.
50. Castellani A. ve Chalmers AJ. *Manual of Tropical Medicine*. 3rd ed. New York, NY: William Wood and Co; 1919.
51. De Vries W, Gerbrandy SJ, ve Stouthamer AH. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1967; **136**: 415-425.
52. Holt JGNR, Krieg PHA, Sneath T, Williams ST, editörler. *Genus Bifidobacteria Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 9th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1993.
53. Buchanan RE ve Gibbons NE, editörler. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore, MD: Williams and Wilkins; 1974.

54. Biavati B ve Mattarelli P. The Family Bifidobacteriaceae. İçinde Dworkin M, editor (in chief). *The prokaryotes Vol 3: Archaea. Bacteria: Firmicutes, Actinomycetes*. 3rd ed. New York, NY: Springer; 2006. pp. 322-382.
55. Poupard JA, Husain I ve Norris RF. Biology of the *Bifidobacteria*. *Bacteriological Reviews* 1973; **37**: 136-165.
56. Leahy SC, Higgins DG, Fitzgerald GF ve Sinderen Va D. Getting better with *Bifidobacteria*. *Journal of Applied Microbiology* 2005; **98**: 1303-1315.
57. Fooks LJ, Fuller R ve Gibson GR. Prebiotics, Probiotics and human gut microbiology. *International Dairy Journal* 1999; **9**: 53-61.
58. Bacterial guests double as bodyguards [web page on the Internet]. 04.05.2011, Erişim 01.06.2012, phys.org: <http://phys.org/news/2011-05-bacterial-guests-bodyguards.html>
59. Hassinen JB, Durbin J T, Tomarelli RB ve Bernhart FW. The minimal nutritional requirements of lactobacillus bifidus. *J. Bacteriol* 1951; **62**: 771.
60. Hidaka H, Eida T, Takizawa T, Tokunaga T ve Tashiro Y. Effects of fructooligosaccharides on intestinal flora and human health. *Bifidobacteria Microflora* 1986; **5**: 37.
61. Gyorgy P, Rose CS. Further observations on the metabolic requirements of *Lactobacillus bifidus* var. *pennsylvanicus*. *J Bacteriol* 1955; **69**: 483-490.
62. Roy Dennis. Media for detection and enumeration of bifidobacteria in food products. İçinde Corry JEL, Curtis GDW ve Baird RM, editörler. *Handbook of Culture Media for Food Microbiology, Progress in Industrial Microbiology Vol 37*. Amsterdam: Elseiver Science BV; 2003.
63. Ferraris L, Aires J, Waligora-Dupriet AJ, Butel MJ. New selective medium for selection of bifidobacteria from human feces. *Anaerobe* 2010; **16**: 469-471.
64. Gomes AMP ve Malcata FX. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutic properties relevant for use as probiotics. *Trends Food Science and Technology* 1999; **10**: 139.
65. Salminen S, Bouley C, Boutron- Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR ve ark. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Britain Journal of Nutrition* 1998; **80**: 147.
66. Bengmark S. Pre-, pro and symbiotic. *Currient Opinion Clinical Nutrition* 2001; **4**:571-579.

67. Gibson GR. Prebiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; **18**: 287-298.
68. Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulasyon of human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; **125**: 1401-1412.
69. Schrezenmeir J, de Vrese M. Probiotics, prebiotics and synbiotics-approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 2001; **73(suppl)**: 361–364.
70. Salminen S, Bouley C, Boutron- Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR ve ark. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Britain Journal of Nutrition* 1998; **80**: 147.
71. Huges DB ve Hoover DG. Viability and enzyme activity of bifidobacteria in milk. *J Dairy Sci.* 1995; **78**: 268.
72. Jiang T, Mustapha A, Savaiano DA. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. *J Dairy Sci.* 1996; **79**: 150.
73. Bezkoravainy A ve Solberg L. Ferrous iron uptake by *Bifidobacterium breve*. *Biol. Trace Elem. Res.* 1989; **20**: 251.
74. Mitsuoka T. *A Profile of Intestinal Bacteria*. Tokyo: Yakult Honsha Co, Ltd.; 1989.
75. Fernandes CF ve Shahani KM. Anticarsinogenic ve immunological properties of dietary Lactobacilli. *J of food Prot.* 1990; **53**: 704.
76. Kirjavainen PV, Arvola T, Salminen SJ, Isolauri E. Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning. *Gut* 2002; **51**: 51–55.
77. Hanifin JM, Chan S. Biochemical and immunologic mechanisms in atopic dermatitis: new targets for emerging therapies. *J Am Acad Dermatol.* 1999; **41**: 72-77.
78. Meagher LJ, Wines NY, Cooper AJ. Atopic dermatitis: review of immunopathogenesis and advances in immunosuppressive therapy. *Australas J Dermatol.* 2002; **43**: 247-254.
79. Thestrup-Pedersen K, Ring J. Atopic dermatitis: summary of the 1st Georg Rajka symposium 1998 and a literature review *Acta Derm Venereol.* 1999; **79**: 257-264.
80. Olesen BA. Role of the early environment for expression of atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol.* 2001; **45(1 Suppl)**: S37-40.

81. Savaşkan H. Atopik dermatit. İçinde Tüzün Y, Kotoğyan A, Aydemir EH, Baransü O. *Dermatoloji* 1st ed. İstanbul: Cem Ofset Matbaacılık; 1994. pp. 257-265.
82. Baykal C. Atopik dermatit. İçinde *Dermatoloji Atlası* 1st ed. İstanbul: ARGOS İletişim Hizmetleri; 2000. pp. 189-192.
83. Odom RB, James WD, Berger TG. Atopic dermatitis, eczema, and non infectious immuno deficiency disorders. İçinde *Andrews' Disease of the Skin* 9th ed. Philadelphia, W.B. Saunders Company; 2000. pp. 69-76.
84. Aksungur VL. Atopik dermatit. İçinde Aksungur VL, Acar MA. *Deri Sorunlarında Basamak Basamak Tanı ve Öneriler* 1st ed. Adana, 5G Matbaacılık; 1999. pp. 186-188.
85. Hanifin JM, Toft SJ. Update on therapy of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 1999; **104 (3 Pt 2)**: S123-125.
86. Ruzicka T. Atopic eczema between rationality and irrationality. Atopic eczema between rationality and irrationality. *Arch Dermatol.* 1998; **134**: 1462-1469.
87. Aksungur V. Atopik Dermatit. İçinde Oğuz O, Serdaroğlu S. *Dermatolojide Gelişmeler* 3rd ed. İstanbul: 1998. pp. 87-100.
88. Michail S. Review: The role of probiotics in allergic diseases. *Allergy Asthma Clin. Immunol.* 2009; **5**: 5.
89. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; **357**: 1076-1079.
90. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H ve Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; **361**: 1869-1871.
91. Demir AU, Karakaya G, Bozkurt B, Sekerel BE, Kalyoncu AF. Asthma and allergic diseases in schoolchildren: third cross-sectional survey in the same primary school in Ankara, Turkey. *Pediatr Allergy Immunol.* 2004; **15**: 531-538.
92. Önes U, Akçay A, Tamay Z, Güler N, Zencir M. Rising trend of asthma prevalence among Turkish schoolchildren (ISAAC phases I and III) *Allergy* 2006; **61**: 1448-1453.

93. Demir E, Tanac R, Can D, Gülen F, Yenigün A ve Aksakal K. Is there an increase in the prevalence of allergic diseases among schoolchildren from the Aegean region of Turkey? *Allergy Asthma Proc* 2005; **26**: 410-414.
94. Global Strategy for Asthma Management and Prevention 2007 (update). www.ginasthma.org
95. Ober C. Perspectives on the past decade of asthma genetics. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; **116**: 274-278.
96. Holgate ST. Genetic and environmental interaction in allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999; **104**: 1139-1146.
97. Mungan D, Celik G, Bavbek S, Misirligil Z. Pet allergy: how important for Turkey where there is a low pet ownership rate. *Allergy Asthma Proc* 2003; **24**: 137-142.
98. Bousquet J, Jeffery PK, Busse WW, Johnson M, Vignola AM. Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **161**: 1720-1745.
99. Akbari O, Faul JL, Hoyte EG, Berry GJ, Wahlström J, Kronenberg M ve ark. CD4+ invariant T-cellreceptor+natural killer T cells in bronchial asthma. *N Engl J Med* 2006; **354**: 1117-1129.
100. Çokuğraş H, Akçakaya N, Seçkin, Camcioğlu Y, Sarımurat N, Aksoy F. Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax* 2001; **56**: 25-29.
101. Wenzel S. Mechanisms of severe asthma. *Clin Exp Allergy* 2003; **33**: 1622-1628.
102. James A. Airway remodeling in asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2005; **11**: 1-6.
103. Wenzel SE. Asthma: defining of the persistent adult phenotypes. *Lancet* 2006; **26**; **368**: 804-813.
104. Kalyoncu F, Çöplü L, Selçuk ZT, Emri AS, Kolaçan B, Kocabaş A.ve ark. Survey of the allergic status of patients with bronchial asthma in Turkey: a multicenter study. *Allergy* 1995; **50**: 451-455.
105. Expert Panel Report 3(EPR-3): Guidelines for the diagnosis and management of asthma-Full Report 2007, *J Allergy Clin Immunol* 2007; **120**: S94-S138.
106. Karakurt Z, Ceyhan B, Karakurt S, Türker H. Induced sputum cell profile in mild to severe stable asthmatics and healthy adults. *Turkish Respiratory Journal* 2001; **2**: 22-27.

107. Yıldız F, Başıyigit İ, Boyacı H, Ilgazlı A, Özkara S. Comparison of induced sputum cell counts in COPD and asthma. *Turkish Respiratory Journal* 2003; **4**: 43-46.
108. Toraks Derneği, Ulusal Astım Tanı ve Tedavi Rehberi. *Toraks Dergisi* 2000; **1**: 4-31.
109. Eichenfield LF, Hanifin JM, Luger TA, Stevens SR, Pride HB. Consensus conference on pediatric atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2003; **49**: 1088-1095.
110. *From the Global Strategy for the Diagnosis and Management of Asthma in Children 5 Years and Younger*, Global Initiative for Asthma (GINA) 2009. Available from: <http://www.ginasthma.org/>.
111. Sozzi T, Brigidi P, Mignot O, Matteuzzi D. Use of dicloxacillin for the isolation and counting of *Bifidobacteria* from dairy products. *Lait* 1990; **70**: 357-361.
112. Bonaparte C. *Selective Isolation and Taxonomic Position of Bifidobacteria Isolated from Commercial Fermented Dairy Products in Central Europe*. Berlin Technical University Dissertation, Münster, DE: Schöling; 1997.
113. Matsuki T, Watanabe K and Tanaka R. Genus- and Species-Specific PCR Primers for the Detection and Identification of *Bifidobacteria*. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* 2003; **4**: 61-69.
114. Grönlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the *Bifidobacterium* microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2007; **37**: 1764-1772.
115. He F, Ouwehand AC, Isolauri E, Hashimoto H, Benno Y, Salminen S. Comparison of mucosal adhesion and species identification of bifidobacteria isolated from healthy and allergic infants. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2001; **30**: 43-47.
116. Haarman M, Knol J. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol.* 2005; **71**: 2318-2324.
117. Hadadji M, Benama R, Saidi N, Henni DE, Kihal M. Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast-fed infants faeces in West-Algeria. *African Journal of Biotechnology* 2005; **4**: 422-430.

118. Brodhead P. *Healing the Gut and Working with Food Allergies*. Compiled from, Is Your Child's Brain Starving? [web page on the internet], Erişim 02.06.2012, PDFfinder.net:<http://www.brighterdayfoods.com/PDFDocs/d/DR3C27M98FWC9G33VJ916NSGP7RTAG86.PDF>
119. Gutkowski P, Madaliński K, Grek M, Dmeńska H, Syczewska M, Michałkiewicz. Effect of orally administered probiotic strains *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* in children with atopic asthma. *Centr Eur J Immunol* 2010; **35**: 233-238.
120. Ma H, Wang H, Wang L, Zheng Y, Li C. The effects of *Bifidobacterium* on the secretion of IL-10 and IL-12 by dendritic cells from children with allergic asthma. *Chinese Journal of Microecology* 2009; **21**: 407-409.
121. He F, Morita H, Hashimoto H, Hosoda M, Kurisaki J, Ouwehand AC ve ark. Intestinal *Bifidobacterium* species induce varying cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*. 2002; 109: 1035-1036.
122. Winkler P, Ghadimi D, Schrezenmeir J, Kraehenbuhl JP. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J Nutr*. 2007; **137**(3 Suppl 2):756-772.
123. Mcloughlin RM, Mills KH. Influence of gastrointestinal commensal bacteria on the immune responses that mediate allergy and asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2011; **127**: 1097-1107.

HASTA BİLGİ FORMU						
Adı –soyadı						
Doğum tarihi-cinsiyeti						
Dosya no(yatan)						
TC no						
Ev telefonu:						
Anne adı- cep no						
Baba adı- cep no						
Adres						
Numune alınan tarih						
Klinik tanı						
Klinik tanı tarihi						
Deri testleri						
Total IgE	Bakıldı/bakılmadı			Sonuç:		
Spesifik IgE	Bakıldı/bakılmadı			Sonuç:		
Antihistaminik kul.						
Antibiyotik kullanımı						
Doğum şekli						
Beslenme:						
Anne sütü-süresi						
İnek sütü-mama						
Ek gıda						
Günlük dışkılama s.						
Ailede alerjik birey?						



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : 8091
Konu :

İstanbul / /

Temel Tıp Bilimleri Bölümü
Başkanlığına

02 Mart 2011

İLGİ: 04.02.2011 tarihli, 194 sayılı yazınıza:

Bölümünüze bağlı Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim öğretim üyesi
Doç.Dr. Hrisi BAHAR'ın danışmanlığında **Yüksek Lisans Öğr. Hatice Kübra AKAY**'ın yürüteceği
“ **Allerjik Dermatit veya Astım Tanısı Almış Çocuklarla Sağlıklı Çocuklarda Arasında Barsak
Florasındaki BIFIDOBACTERIUM Türlerinin Karşılaştırılması**” ” başlıklı Yüksek Lisans Tezi hakkında
ilgi yazınız ve ekleri **08 Şubat 2011** tarihinde toplanan Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Değerlendirme
Kurulunca müzakere edilmiş olup, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) desteği alınması koşuluyla,etik açıdan
uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bilgilerinizi, durumun adı geçen anabilim dalı başkanlığına bildirilmesini saygılarımla
rica ederim.

Eki:
1 dosya

Prof.Dr.Fatih ALTINDAŞ
Dekan Yardımcısı ve Klinik Araştırmalar
Etik Değerlendirme Kurulu Başkanı

Not: Yanıtlarda yazımızın gün sayısının belirtilmesi rica olunur.Tel(0212)4143000

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Hatice Kübra	Soyadı	AKAY
Doğ.Yeri	Yahyalı/KAYSERİ	Doğ.Tar.	28/03/1986
Uyruğu	T.C.	TC Kim No	41569635470
Email	akayhkubra@gmail.com	Tel	05556801872

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
Yük.Lis.	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.B.D.	2012
Lisans	Erciyes Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009
Lise	Kartal Anadolu İmam Hatip Lisesi	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1. Yüksek Lisans ve Gönüllü mikrobiyoloji laboratuvarında çalışma	İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji A.B.D.	2009-2012
2. Gönüllü Mikrobiyoloji Laboratuvarında staj	Ümran Tıp Merkezi (Ümraniye)	2007 (30 gün)

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS Puanı(2011)
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	70
Arapça	İyi	Orta	Orta	-

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı (2011)	78	83	73

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Office 2007	Çok iyi

Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

Anaerop Enfeksiyonların Rutin Tanısı/Teorik Kurs Sertifikası-2011

Özel İlgi Alanları (Hobileri):

Kitap okuma, geleneksel Türk el sanatları, resim yapma, fotoğrafçılık.