



**ENTEROBACTERIACEAE ÜYELERİNDE PLAZMİD
ARACILI (*mcr-1*, *mcr-2*) VE KROMOZOMAL KOLİSTİN
DİRENÇ GENLERİ (*phoP/phoQ*, *pmrA/pmrB*)
VARLIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

Yaşargül ÖZHELVACI

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİMDALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Doç. Dr. Beytullah KENAR

Tez No: 2019-015

2019-AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

**ENTEROBACTERIACEAE ÜYELERİNDE PLAZMİD ARACILI
(*mcr-1*, *mcr-2*) VE KROMOZOMAL KOLİSTİN DİRENÇ
GENLERİ (*phoP/phoQ*, *pmrA/pmrB*) VARLIKLARININ
ARAŞTIRILMASI**

Yaşargül ÖZHELVACI

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN
Doç. Dr. Beytullah KENAR

Tez No:2019-015

**Bu tez Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon
Birimi BAP 17.SAĞ.BİL.19 proje numarası ile desteklenmiştir.**

2019-AFYONKARAHİSAR

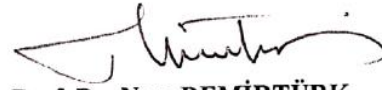
KABUL VE ONAY

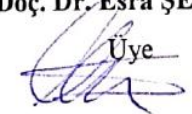
Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
çerçevesinde yürütülmüş bu çalışma, aşağıdaki jüri üyeleri tarafından
Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: 30/05/2019


Doç. Dr. Beytullah KENAR
Jüri Başkanı


Prof. Dr. Neşe DEMİRTÜRK
Üye

Doç. Dr. Eşra ŞEKER

Üye

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Yaşargül Özhelvacı'nın "Enterobacteriaceae Üyelerinde Plazmid Aracılı (*mcr-1*, *mcr-2*) ve Kromozomal Kolistin Direnç Genleri (*phoP/phoQ*, *pmrA/pmrB*) Varlıklarının Araştırılması" başlıklı tezi günü saat 'da Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özal ÖZCAN
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim süresince tez danışmanlığımı yapan sayın Doç. Dr. Beytullah KENAR'a ve vakit ayırarak tez jürimde yer alma nezaketini gösteren ve tezimi değerlendiren sayın Prof. Dr. Neşe DEMİRTÜRK ve sayın Doç. Dr. Esra ŞEKER'e teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarında katkı ve emeği olan, beni her konuda teşvik ederek iyi bir eğitim almamı sağlayan sayın Prof. Dr. Recep KEŞLİ'ye ve çalışmamıza suş desteği sağlayan sayın Doç. Dr. Sebahat AKSARAY'a teşekkür ederim.

Çalışmanın her aşamasında yanımda olan desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, beni teşvik eden, çalışmalarımı kendi çalışması gibi sahiplenen birlikte çalıştığımız, bilgi paylaşımında bulunduğumuz anabilim dalı araştırma görevlilerinden Cengiz DEMİR'e verdiği emek, katkı ve desteklerinden dolayı teşekkürü borç bilirim.

Çalışmalarım süresince bilgi paylaşımında bulunduğumuz, motivasyonunu ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen anabilim dalı araştırma görevlilerinden Hayriye TOKAY'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans eğitimim süresince Tıbbi Mikrobiyoloji AD.'nın tüm laboratuvar personeline, özellikle çalıştığım birimdeki iş arkadaşlarıma, bakteriyoloji ekibine yaptıkları katkılardan dolayı minnettarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince desteklerini her zaman hissettiğim, sevgi ve hoşgörülerini eksik etmeyen değerli dostlarım Arzu KURHAN ve Serkan KURHAN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu zor dönemde sevgi ve desteklerini her zaman hissettiğim ve hayatımın her aşamasında yanımda olan, bana güç veren anneme, babama, babaanneme ve kardeşim Berkin'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yaşargül ÖZHELVACI

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
ŞEKİLLER	vii
TABLolar	viii
1.GİRİŞ	1
1.1.Enterobacteriaceae	2
1.1.1.Sınıflandırma	4
1.1.2. Morfoloji	5
1.1.3. Üreme özellikleri	5
1.1.4. Biyokimyasal özellikler	6
1.1.5. Antijen yapıları	10
1.1.6. Virulans faktörleri	11
1.1.7. Enterobacteriaceae enfeksiyonları	13
1.1.8. Tedavi ve direnç sorunu	13
1.1.8.1. Beta Laktam Antibiyotikleri ve direnç sorunu	14
1.2. Kolistin	18
1.2.1.Etki mekanizması	19
1.2.2 Etki spektrumu	20
1.2.3. Direnç mekanizması	20
1.2.4. Klinik kullanımı	24
1.2.5. Yan etkileri.....	24
2. GEREÇ VE YÖNTEM	26
2.1. Bakteri Suşlarının Toplanması	26
2.2. Bakteri Suşlarının İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	26
2.2.1. Maldı-Tof MS	27
2.2.2. VITEK 2® Otomatize Sistem	28
2.3. Direncin Moleküler Temelinin Araştırılması.....	28
2.3.1. Bakteriden DNA İzolasyonu	29

2.3.2. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi	29
2.3.3. Primerlerin Hazırlanışı	30
2.3.4. <i>mcr-1</i> ve <i>mcr-2</i> Real Time PCR Çalışması.....	30
2.3.5. PCR Ürünlerinin Elektrophorez İşlemi	33
2.3.6. Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi.....	33
2.3.7. <i>pmrA</i> , <i>pmrB</i> , <i>phoQ</i> ve <i>phoP</i> Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması	34
2.3.8. Bakteriden RNA İzolasyonu	34
2.3.9. RNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi	35
2.3.10. RNA Örneklerinden Komplementer DNA (cDNA) Sentezi	36
2.3.11. Real Time PCR (RT-qPCR) Çalışması.....	37
3.BULGULAR	40
3.1. Direncin Moleküler Temelinin Araştırılması.....	44
4.TARTIŞMA	54
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	64
ÖZET	66
SUMMARY	67
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ.....	81

SİMGELER VE KISALTMALAR

ATCC : American Type Culture Collection

BOS : Beyin omurilik sıvısı

cDNA : Complementary deoksiribonükleik asit

CFU : Colony forming unit

Ct : Cycle treshold

DDH₂O : Double distilled H₂O

DNA : Deoksiribonükleik asit

EARS-Net : European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

EUCAST : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GSBL : Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz

L-Ara4N : 4-amino-4-deoxy-L-arabinose

MIK : Minimal inhibitör konsantrasyon

MRSA : Metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus*

NCCLS : National Committee for Clinical Laboratory Standarts

NCBI : National Center for Biotechnology Information

PBP : Penisilin bağlayıcı protein

PCR : Polymerase chain reaction

PEtN : Fosfoetanolamin

RNA : Ribonükleik asit

UV : Ultraviyole

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Görülme sıklığına göre Enterobacteriaceae üyeleri ile gelişen enfeksiyon bölgeleri.....	3
Şekil 1.2. TSİ besiyeri.....	8
Şekil 1.3. Sitrat besiyeri	8
Şekil 1.4. Christensen üre agar besiyeri.....	9
Şekil 3.5. <i>K. pneumoniae</i> suşlarının antibiyotik direnç oranları.....	44
Şekil 3.6. <i>mcr-1</i> geni taşıyan (<i>E.coli</i> NTCC 13846) pozitif kontrol izolatına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	44
Şekil 3.7. <i>mcr-2</i> geni taşıyan izolata ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü.....	45
Şekil 3.8. <i>mcr-2</i> gen bölgesine ait real time PCR sonuçları	46
Şekil 3.9. Kolistine duyarlı ve dirençli suşların <i>pmrA</i> , <i>pmrB</i> , <i>phoP</i> ve <i>phoQ</i> genleri için tespit edilen ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.....	53

TABLÖLAR

Tablo 1.1. E.coli, K.pneumoniae, Enterobacter izolatlarının metabolik reaksiyonları	10
Tablo 2.1. <i>mcr-1</i> ve <i>mcr-2</i> real time PCR çalışmalarında kullanılan primer dizileri	30
Tablo 2.2. <i>mcr-1</i> real time PCR çalışmalarında bir reaksiyon için hazırlanması gereken karışım miktarları	31
Tablo 2.3. <i>mcr-2</i> real time PCR çalışmalarında bir reaksiyon için hazırlanması gereken karışım miktarları	31
Tablo 2.4. <i>mcr-1</i> gen bölgesi PCR protokolü.....	32
Tablo 2.5. <i>mcr-2</i> gen bölgesi PCR protokolü.....	32
Tablo 2.6. cDNA sentezinde PCR çalışması için hazırlanması gereken karışım miktarı.....	36
Tablo 2.7. cDNA sentezi PCR protokolü.....	37
Tablo 2.8. <i>pmrA</i> , <i>pmrB</i> , <i>phoQ</i> , <i>phoP</i> ve <i>rpsL</i> genlerinin real time PCR çalışmalarında kullanılan primer dizileri	37
Tablo 2.9. <i>pmrA</i> , <i>pmrB</i> , <i>phoQ</i> , <i>phoP</i> ve <i>rpsL</i> genlerinin real time PCR çalışması için hazırlanması gereken karışım miktarı	38
Tablo 2.10. <i>pmrA</i> , <i>pmrB</i> , <i>phoQ</i> , <i>phoP</i> ve <i>rpsL</i> genleri için kantitatif real time PCR çalışma protokolü	38
Tablo 3.1. <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı.....	40
Tablo 3.2. <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı	41
Tablo 3.3. Kolistin dirençli <i>K.pneumoniae</i> suşlarının fenotipik direnç sonuçları	41
Tablo 3.4. Kolistin duyarlı <i>K.pneumoniae</i> suşlarının fenotipik duyarlılık sonuçları	42
Tablo 3.5. <i>K. pneumoniae</i> suşlarının antimikrobiyal direnç oranları	43
Tablo 3.6. <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının <i>pmrA</i> gen bölgesi ekspresyon analizi sonuçları	47
Tablo 3.7. <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının <i>pmrB</i> gen bölgesi ekspresyon analizi sonuçları	48
Tablo 3.8. <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının <i>phoP</i> gen bölgesi ekspresyon analizi sonuçları	50
Tablo 3.9. <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının <i>phoQ</i> gen bölgesi ekspresyon analizi sonuçları	51
Tablo 3.10. Kolistine duyarlı (S) ve dirençli (R) kökenlerin ekspresyon düzeyleri araştırılan genler için aykırı değer analizi sonrası ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.	53

1.GİRİŞ

Bakterilerin direnç varlığına evrimsel süreçte baktığımızda sinyalleşme ve savunma faktörü olarak işlevselliğini sürdürdüğünü görmekteyiz. Antibiyotiklerin 1940'lı yıllarda kullanıma girmesi 1990'lardan itibaren dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmekte kullanılabilecek ilaç seçeneklerinin azalması, yeni antimikrobiyal ajanların olmaması dünyayı tehlikeli bir şekilde "Antibiyotik döneminin" sonuna getirmektedir (Granata, 2017). Çoklu ilaç direnci gösteren Enterobacteriaceae'nin ortaya çıkmasıyla birlikte küresel anlamda antimikrobiyal direnç patojenleri de artış göstermiştir. GSBL üreten *K. pneumoniae* suşunda ilk direnç varlığının ortaya çıkmasını karbapenem, penisilin, sefalosporin ve kinolon dirençleri takip etmiştir. Son 10 yılda *K. pneumoniae*'ye bağlı, GSBL ve karbapenemazların küresel yayılımı dikkat çekmektedir (Qamar, 2019). Buna ek olarak, Enterobacteriaceae ailesindeki *K. pneumoniae* suşlarının ekstra genetik özellikler kazanarak antibiyotiklere dirençli hale gelmesi eski antimikrobiyal ajanlardan biri olan kolistinin kullanımını tekrar gündeme getirmiştir. Çoklu ilaç direnci gösteren Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisi için kolistin kullanımındaki mevcut artışla birlikte, kolistin dirençli Gram negatif patojenlerin varlığını rapor eden, kolistin dirençli Enterobacteriaceae salgınları bildirilmeye başlanmıştır. Klinik kullanımda son silahlardan biri olarak görülen kolistinin kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte direnç sorunu gündeme gelmiş ve tedavide tehdit oluşturmuştur. Son dönemlerde hızla gelişen direnç durumu, bu direncin tespit edilmesinin gereksinimini arttırmıştır. Henüz direnç mekanizması net olarak aydınlatılmış olmasa da dünya genelinde araştırmalar devam etmektedir (Perez, 2019). Biz de bu çalışmamızda dönemin bir ihtiyacı olarak gördüğümüz ve sorun teşkil eden Enterobacteriaceae ailesinde plazmid aracılı *mcr-1*, *mcr-2* ve kromozomal gen bölgeleri olan *phoP/phoQ*, *pmrA/pmrB* varlıklarının araştırılmasını amaçladık.

1.1. ENTEROBACTERIACEAE

Enterobacteriaceae üyeleri çok sayıda bakterinin bir araya geldiği, tıbbi olarak önemli olan, insanda enfeksiyon etkeni olarak da sıklıkla izole edilen, en heterojen ve en geniş bakteri topluluğudur. Bu ismi türkçe'ye “enterik bakteriler” olarak çevirmek mümkün olsa da bu şekilde kullanmak anlam karmaşasına sebebiyet vermektedir. Çünkü Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler yalnızca barsakta bulunmadığı gibi barsakta bulunan bakterilerin hepsi de Enterobacteriaceae ailesinden değildir. Bu ailedeki bakterilerin bazıları insan ve hayvanların kalın barsağında daima bulunurken normal floranın çok küçük bir kısmını oluşturmaktadırlar. Örnekeleyecek olursak, Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin normal barsak florasındaki sayısı *Bacteroides* cinsi anaerob bakterilerin 1/1000 i kadardır.

Enterik bakteriler olarak adlandırılan Enterobacteriaceae familyası normal intestinal florada bulunduğu gibi, bitkilerde, toprakta, suda; patojen, kommensal ya da saprofit olarak bulunup doğada çok geniş bir yayılım göstermektedir (Zarakolu, 2016; Töreci, 2002; Donnenberg, 2005; Farmer, 2009).

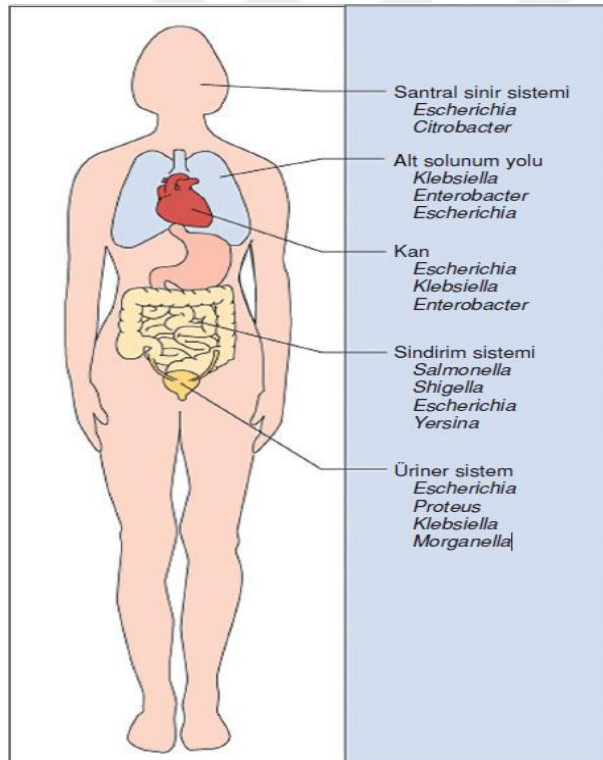
Klinik Önemi

Enterobacteriaceae ailesi, klinik öneme sahip bakterilerin %50'sini kapsayan, hastane enfeksiyonlarında en sık görülen etkenlerden biridir. Septisemi olgularının yaklaşık %50'sinden, üriner sistem enfeksiyonlarının ise %70'inden *Enterobacteriaceae* spp. sorumludur (Töreci, 2002; Donnenberg, 2005). *Enterobacteriaceae* spp. içerisinde en sık enfeksiyon etkeni *Escherichia coli*'dir. *E. coli* üriner sistem enfeksiyonunun en sık etkeni olmakla birlikte, septisemi, yara enfeksiyonu ve yeni doğanlarda menenjitte neden olurken intraoperatif olarak *Klebsiella* ve *Enterobacter* türleri de %68 ve %100 olasılıkla yara enfeksiyonlarına neden olmaktadır. *Klebsiella pneumoniae* ve *Enterobacter cloacae* türlerinde Gram pozitif organizmalardan iki kat daha fazla mortalite görülürken, 4–5 kat daha az

sıklıkla sepsis görülür. *Klebsiella* spp. nozokomiyal üriner sistem enfeksiyonlarının en yaygın 2–4. etkeni iken, toplum kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarının da en yaygın 3–4 etkenidir (Donnenberg, 2005).

Salmonella, *Shigella*, *Yersinia* cinsleri insanlar için daima patojen iken, *Klebsiella*, *Escherichia* cinsleri başka vücut lokalizasyonlarında fırsatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır.

National Healthcare Safety Network (NHSN)’nin 2009-2010 yılı raporlarında nozokomiyal ilişkili enfeksiyonların oluşmasında en çok izole edilen türlerin *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan *E. coli* (% 11,5), *Klebsiella* spp.(% 8), *Enterobacter* spp. (% 4,7) olduğu bildirilmiştir (SIEVERT, 2009-2010).



Şekil 1.1. Görülme sıklığına göre *Enterobacteriaceae* üyeleri ile gelişen enfeksiyon bölgeleri(Töreci, 2002; Donnenberg, 2005).

1.1.1.Sınıflandırma

Mikrobiyoloji alanında yapılan ilk sınıflandırmalarda göz önüne alınan bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri olmuştur. Ancak yeni teknolojilerden yararlanan yeni tanımlama yöntemlerinin ortaya çıkmasıyla bakterilerin tanımlanmasında ve buna bağlı olarak yapılan sınıflandırmada birtakım değişiklikler meydana gelmiştir. Moleküler tekniklerin de gelişmesiyle nükleik asit hibridizasyon, DNA sekans yöntemi gibi yeni tekniklerle aile içindeki bakterilerin evrimsel geçmişini ve diğer kökenlerle yakınlıklarını belirlemek mümkün olmuştur. Bu araştırmalar neticesinde birçok yeni tür tanımlanmış, birçok bakterinin de sınıflandırmadaki yeri değiştirilmiştir (Zarakolu, 2016; Farmer, 2009).

Özellikle moleküler mikrobiyolojik tekniklerin daha fazla kullanılmasıyla birlikte Enterobacteriaceae üyelerinin pek çok cins ve türlerinin isimlendirilmesinde ya da sınıflandırılmasında değişiklikler meydana geldiği gibi alttür, biyogrup, ve serotip düzeyinde de değişiklikler olmuştur. Örneğin; *Pasteurella pestis* ve *Pasteurella pseudotuberculosis* gibi *Pasteurellaceae* ailesinde bulunan türler *Yersinia* cinsine konularak Enterobacteriaceae ailesine geçirilmiştir (Zarakolu, 2016; Töreci, 2002).

Enterobacteriaceae ailesinin sınıflandırılma ve adlandırılmasında günümüze kadar biyokimyasal, fizyolojik, antijenik ve fenotipik özellikler kullanılmaktaydı (Özinel, 2017). Günümüzde artık bu fenotipik özelliklere ek olarak DNA/DNA hibridizasyon ve 16SrRNA dizilimlerine göre sınıflandırılma yapılmaktadır (Lehman, 2007). Enterobacteriaceae'lar Proteobacteria şubesinin Gammaproteobacteri sınıfında, Enterobacteriales takımının içinde yer alan tek ailedir. 1960'larda Enterobacteriaceae ailesindeki cins sayısı 10-12 olarak bilinirken, 1985 yılında 22 cinse ait 69 tür ve 29 adlandırılmamış biyogrup tanımlanmıştır. Günümüzde bu ailede 50'den fazla cins ve 150'den fazla tür tanımlanmıştır (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/www.tax.cgi?id=543>).

1.1.2.Morfoloji

Enterobacteriaceae üyeleri, genellikle homojen ve Gram negatif boyanan, uçları yuvarlak 2-3µm boyunda, 0.3-1.0µm eninde, sporsuz çomak şekilli bakterilerdir ve aside dirençli boyanmazlar. Ancak bazı istisnai durumlar vardır. Örneğin; *Yersinia pestis* ve *Yersinia pseudotuberculosis* daha küçük ve kokobasil görünümünde olup polikromatik boyanırken, *Klebsiella* cinsindekiler ise daha iri görünümündedir.

Enterobacteriaceae üyelerinden *Klebsiella*, *Shigella*, *Leminorella*, *Moellerella* cinsleri, *Salmonella* cinsine ait bazı serovarlar ve *Y. pestis* türü hareketsiz; diğer bütün üyeler hareketlidir. *Proteus* cinsi bakteriler ise katı besiyerinin yüzeyinde yayılacak kadar hareketlidirler. *Y.enterocolitica* ve *Y.pseudotuberculosis* 37°C de üretildiğinde hareketsiz, oda ısısında üretildiğinde ise hareketlidir (Zarakolu, 2016; Koneman, 2006).

1.1.3.Üreme Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin tümü aerobik ve anaerobik ortamda (fakültatif anaerob) üreyebilirler. Genel olarak üreme sıcaklıkları 15-44°C olarak kabul edilir. İnsan ve hayvanlardan izole edilen türler için optimum üreme sıcaklığı 35-37°C olup CO₂'siz ortamda ürerler. *E.coli* de 44°C'de üreme gözlenirken, *Serratia* ve *Yersinia* türleri 1°C'de yavaş da olsa üreyebilir. Geniş bir sıcaklık aralığında üreyebilmeleri bu bakterilerin karışık ortamlardan izole edilmesinde yarar sağlamaktadır.

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler herhangi bir zenginleştirici katkı içermeyen birçok besiyerinde rahatlıkla üreyebilirler. Buyyon besiyerinde 37°C'de 8-12 saatte bulanıklık başlar. Çoğu türü jeloz besiyerinde 18-24 saatte 2-3 mm çapında, ortası kabarık, düzgün kenarlı "S" tipi koloni oluştururlar. Bazı türlerinde ise birkaç

pasajdan sonra kenarları ve yüzeyi düzensiz şekillerde olan “R” tipi koloni oluşumu görülür. *Klebsiella* cinsindeki bakteriler ve diğer belirgin kapsül oluşturan türler “M” tipi koloni yapmaktadır (Özinel, 2017). Ayrıca çikolata ve kanlı agarda gri, geniş, düz, kuru veya mukoid koloniler oluştururlar. Suşların çoğunda kanlı agarda hemoliz görülmezken *E. coli*’nin bazı suşlarında kanlı agarda hemoliz görülebilir. Türlerin çoğu eritrositleri parçalayan hemolizin salgılamaktadır. Eosin methylene blue (EMB) agarda metalik parlaklık veren koloniler oluşurken, laktozu fermente edenler oluşan asit nedeniyle Mac Conkey agarda pembe-kırmızı koloniler meydana getirirler (Winn Jr, 2006; Ustaçelebi, 1999). *Proteus* türleri ise çok hareketli oldukları için besiyeri yüzeyinde yayılarak ürerler ve koloni oluşturmazlar. Bu bakteri kolonilerinden saf kültür elde edilebilmesi için hareketlerinin engellenmesini sağlayan özel yöntemler kullanılmaktadır. *Serratia marcescens* ve *Serratia rubidaea* suşları, jeloz besiyerinde, oda sıcaklığında ürettikleri prodigiosin pigmenti sayesinde kırmızı koloniler oluştururlar. *Escherichia hermanni*, *Escherichia vulneris*, *Enterobacter sakazakii* ve *Pantoea agglomerans* ile *Leclercia* cinsine ait bakteriler sarı koloniler oluştururlar. Ailedeki diğer bakterilerin kolonileri renksizdir (Zarakolu, 2016; Sonnenberg, 2005; Koneman, 2006).

1.1.4.Biyokimyasal Özellikler

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin biyokimyasal özellikleri rutin bakteriyolojik tanıda da önemlidir. Biyokimyasal tanımlama testleri $36 \pm 1^\circ \text{C}$ ‘ de inkübe edilerek yapılır. Test sonuçları büyük çoğunlukla 24 saatte pozitifleşir, bazıları ise 48 saat sonunda tekrar değerlendirilir. Bu ailedeki bakteriler metabolik olarak oldukça aktiftir. Tüm bakteriler glikozu fermente ederken, bazılarında gaz oluşumu görülür. Glikoz dışındaki birçok karbonhidratı asit veya gaz oluşturarak fermente ederler. Dekarboksilasyon yolu ile aminoasitleri parçalarlar. Katalaz reaksiyonları pozitifdir. Oksidaz testleri *Plesiomonas* spp. dışında negatiftir. Enterobacteriaceae üyelerinde sitokrom oksidaz aktivitesinin bulunmaması bu aileyi non-fermentatif Gram negatif basillerden ayırmaktadır. *Pantoea agglomerans* türü hariç diğerleri nitratları nitritlere indirgerler (Zarakolu, 2016; Koneman, 2006;

Ustaçelebi, 1999). Bu biyokimyasal testlere ek olarak indol, metil kırmızı, Voges-Proskauer testi, o-nitrophenyl-beta-D-galactosid (ONPG) aktivitesi, üreaz, lipaz, fenil alanin deaminaz, arginin, lizin ve ornitin dekarboksilaz testleri, hareket, jelatini eritme ve potasyum siyanitli (KCN) ortamda üreme özellikleri bu aile içinde sınıflandırılan bakterilerin tanımlanmasında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Özinel, 2017; Winn Jr, 2006).

Oksidaz testi

Sitokrom oksidaz enzimine sahip bakterilerin tanımlanmasında kullanılan testtir. Oksidaz negatif olarak belirlenen suşlar Triple Sugar Iron (TSİ) agar besiyerine ekim yapılarak değerlendirilir.

TSİ besiyerinin değerlendirilmesi

TSİ besiyerinin çalışma prensibi, bakterilerin glikoz, laktoz ve sukroz üzerindeki etkilerini ve H₂S oluşturup oluşturmadıklarını belirlemeye yöneliktir. Hafif alkali ortamlı olarak hazırlanan TSİ besiyeri, içerdigi fenol kırmızı, içerdigi fenol kırmızı sayesinde alkali ortamda kırmızı görünümdedir. İnoküle edilen bakteri, TSİ ortamında bulunan karbonhidratları fermente ettiği taktirde ortamın pH'ı aside kaymakta ve asit ortamda fenol kırmızı sarı bir renge dönüşmektedir. Glikozu fermente ederek laktoz ve skrozu paralayamayan bakterilerde dip sarı, yatık alan kırmızı renkte görülmektedir. Eğer inoküle edilen bakteri karbonhidratlardan hiçbirini kullanmazsa ortamın pH'ı alkali kalmakta yani besiyerinin rengi kırmızı olarak devam etmektedir.



Şekil 1.2. TSI besiyeri

Sitrat besiyerinin değerlendirilmesi

Sitrat testinde bakterilerin karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığına bakılmaktadır. Yeşil renkteki besiyeri içinde bulunan bromtimal mavisi sayesinde mavi renk oluşması bakterinin sitratı kullandığı anlamına gelir ve test pozitif olarak değerlendirilir. Renk değişimi olmaması ise negatif demektir. Sitrat testi *Klebsiella* türleri için pozitifdir.



Şekil 1.3. Sitrat besiyeri

Christensen üre agar besiyerinin değerlendirilmesi

Üreaz enzimi içeren enterik basillerde, amonyak üretimine bağlı olarak üre besiyerinin pH'ını alkaliye çevirirler ve inkübasyon sonrasında besiyerinin rengi indikatör (fenol kırmızısı) sayesinde sarıdan pembeye renk değiştirir. *K. pneumoniae*'de üreaz pozitifdir.



Şekil 1.4. Christensen üre agar besiyeri

Indol Testi

Triptofanaz enzimi bulunan Gram negatif basiller sıvı besiyerinde triptofondan indol oluştururlar. Besiyerinin üzerine Kovaks solüsyonu konduğunda kırmızı renk oluşumu indol pozitif, sarı renk oluşumu ise indol negatif olarak değerlendirilir. *Klebsiella oxytoca* indol pozitif / *K. pneumoniae* indol negatiftir.

Metil Red Testi (MR)

Glikozun fermente olmasıyla besiyerinde organik asitlerin meydana geldiğini ve pH'ın düştüğünü ortaya koymak için yapılır. Üremiş kültürlerden, besiyerlerine (Tüpte hazırlanmış Clark ve Lubs besiyeri) ekim yapılarak tüpler 37°C'de 2-7 gün arasında inkübasyona bırakılır. Üzerine metil kırmızısı solüsyonundan 4-5 damla damlatılarak karıştırılır, üstte kırmızı renkli bir halkanın oluşumuyla test pozitif olarak değerlendirilir.

Voges Proskauer Testi (VP)

Bu testi uygulamak için metil red testi yapılmış olmalıdır. Bu test, bazı mikroorganizmaların glikozu fermente ederek, nötral bir ürün olan acetyl methyl carbinol (acetoin) oluşumunu tayin etmede kullanılır. İçinde glikoz bulunan bufferlı MR/VP (Clark-Lubs, pH 6.9,5 ml) besiyerine kültürden ekim yapılır ve 37°C'de 2-7

gün arasında inkübe edilir. Bu sürenin sonunda kültürlerle ve ekilmemiş tüplere O'Meara ayırıcından (veya Barzıt VP ayıracı) 1 ml ilave edilerek su banyosunda 37°C de 4 saat tutulur ve aralıklı olarak hafifçe çalkalanır. Besiyerinin üstünde 2-5 dakika içinde pembe renk oluşumu acetoin varlığını ortaya koyduğundan pozitif reaksiyon olarak kabul edilir.

Tablo 1.1. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* izolatlarının metabolik reaksiyonları

	Indol	Metil-Red	Voges Proskauer	Sitrat	Üre	TSİ			
						Gaz	H ₂ S	Dip	Yatık
<i>E.coli</i>	+	+	-	-	-	D	-	Asit (S)	Asit (S), Alkali (K)
<i>K. pneumoniae</i>	-	-	+	+	+	+	-	Asit (S)	Asit (S), Alkali (K)
<i>Enterobacter</i>	-	-	+	+	D	+	-	Asit (S)	Asit (S)

(S): Sarı (K): Kırmızı

1.1.5. Antijen Yapıları

Enterobacteriaceae üyelerinin antijenik yapıları epidemiyolojik ve klinik araştırmalarda tiplendirme için kullanılmaktadır. *Pectobacterium chrysanthemi* dışındaki tüm Enterobacteriaceae türlerinde bakteri hücre duvarında yer alan lipopolisakkarid tabakanın derin kısımlarında "Enterobacterial Common Antigen" (ECA) bulunur. ECA; ortak bir antijendir ve ailenin en önemli ayırt edici özelliklerinden birisidir.

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin tümünde, ECA dışında karmaşık ve güçlü bir yapıya sahip üç yüzey antijeni bulunmaktadır. Bakterilerin bu temel antijenik yapılarına baktığımızda;

- Hücrenin dış duvarında yer alan somatik antijen (O antijeni),
- Kirpikli olan türlerde kirpik antijeni (H antijeni),
- Bazı bakterilerde bakteri duvarını çevreleyen bir katman şeklinde, bazı bakterilerde ise bir yüzey maddesi şeklinde az miktarda bulunan kapsül antijeni (K antijeni) karşımıza çıkmaktadır (Zarakolu, 2016; Ustaçelebi, 1999).

1.1.6. Virulans Faktörleri

Virulans, mikroorganizmanın hastalık oluşturma yeteneği olup, mikroorganizmanın patojenite derecesini gösterir. Enterobacteriaceae ailesindeki türler patojeniteleri açısından çok geniş bir yelpaze oluştururlar. Bazı türler çok yüksek morbidite ve mortaliteye sahip fırsatçı enfeksiyon etkeni iken bazıları çok nadir olarak hastalık oluşturur. Bir kısmı da insanda enfeksiyon etkeni olarak bilinmeyen türlerdir. Patojenitelerindeki bu farklılık bakterilerin değişik virulans faktörlerine sahip olmalarıyla açıklanmaktadır (Farmer, 2005).

Enterobacteriaceae üyelerinde çok çeşitli virülans faktörleri bulunmaktadır. Endotoksin, kapsül, antijenik faz varyasyonları, çoğalma faktörleri, sekresyon sistemleri, serumun bakterisidal etkisine ve antimikrobiyallere direnç virülans faktörleri arasındadır (Zarakolu, 2016).

Endotoksin: Hücre duvarının en dışında bulunan lipopolisakkarid (LPS) tabakasının “lipid A” bölümü endotoksin aktivitesi göstermektedir. Endotoksinler bakteri hücrelerinden dışarı salınmayan, bakterinin ölümüyle ya da hücre duvarının yıkımı ile açığa çıkan ürünlerdir. Isıya, proteolitik enzimlere dayanıklı, asit hidrolizine duyarlıdır. Bütün bakterilerin endotoksinlerinin fizyolojik etkileri benzer özellik göstermektedir.

Ekzotoksin: Protein yapısında, sekresyon sistemi ile hücre dışına salınan, özgül fizyolojik etkilere sahip ve toksik etkileri oldukça güçlü moleküllerdir. Enterotoksijenik *E. coli*'nin (ETEC) ısıya duyarlı toksinleri molabil (LT) ve termostabil (ST), Enterohemorajik *E. coli*'nin (EHEC) salgıladığı verotoksin 1 ve verotoksin 2, *Shigella dysenteriae*'nin salgıladığı shiga toksin *Enterobacteriaceae* ailesindeki en önemli ekzotoksinlerdir (Donnenberg, 2005; Zarakolu, 2016).

Adhezinler: Mikroorganizmanın ilk kritik basamağı hedef hücreye mümkün olduğunca yakınlaşmaktır. Bakterinin hedef hücredeki reseptörlere bağlanarak tutunmasını adhezinler sağlamaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesindeki önemli adhezinler fimbria ve dış membran proteinleridir.

Kapsül: *Enterobacteriaceae* üyesinin birçoğunda bulunan, bakteri yüzeyine yakın ve antijenik yeteneği olan, fagositozu önleyerek bakteriyi komplementin bakterisidal etkisinden koruyan yapılardır. *Klebsiella*'larda bulunan geniş polisakkarit kapsülü hücreyi fagositozdan koruyan önemli bir virulans faktörüdür. Yenidoğan sepsis ve menenjitine sebep olan *E. coli* K1 serotipinin kapsülü; bakterinin kan-beyin bariyerini geçmesine yardımcı olmaktadır (Töreci, 2002; Farmer, 2005).

Bakteriyosinler: Gram negatif bakterilerin çoğu tarafından üretilen, benzer bir tür içindeki bakterilere karşı bakterisidal özellik gösteren maddelerdir. Bakteriyosinler bakteriye özel yapıda olup plazmid kontrolünde üretilirler. *E. coli* tarafından üretilen bakteriyosine kolisin, *Klebsiella* spp. tarafından üretilene klebsin, *Serratia marcescens* tarafından üretilene de marcescin denilmektedir (Gür, 2010).

1.1.7. Enterobacteriaceae Enfeksiyonları

Enterobacteriaceae, intestinal ve ekstraintestinal enfeksiyonlarla ilişkili olup, Klinik Mikrobiyoloji laboratuvarında enfeksiyon etkeni olarak izole edilen tüm mikroorganizmaların %50'si, klinik olarak önemli Gram negatif basillerin %80'ini oluşturmaktadır. Görülme sıklığına göre üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi, pnömoni, abdominal veya pelvik enfeksiyonu, cerrahi alan enfeksiyonları, menenjit, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları ve barsak enfeksiyonlarının önemli bir kısmı bulunmaktadır. Enterik patojen olarak bilinen türlerden *Y. pestis* veba, çeşitli *Salmonella* serotipleri tifo ve paratifo enfeksiyonlara neden olmaktadır. Genellikle nozokomiyal olan bu enfeksiyonlar ciddi seyirli ve mortaliteleri yüksektir (Özinel, 2017; Bilgehan, 2006; Landraud, 2010).

Enterobacteriaceae ailesi içinde tıbbi önemi olan başlıca patojenler: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Shigella* ve *Salmonella*'dır (Töreci, 2002; Farmer, 2009; Farmer, 2005).

1.1.8. Tedavi ve Direnç Sorunu

Enterobacteriaceae suşlarında direnç, plazmidlere aktarılan, daha sonra da hücreler arasında aktarılabilen çoğu farklı tür hatta farklı cins olmak üzere kaynak hücrelerden alınan "mobil" genler aracılığıyla olmaktadır. Bu mobil genler tek antibiyotik sınıfına karşı direnci temsil etse de bazı plazmidler birçok antibiyotiğe karşı direnç genlerini bir arada bulundurabilmektedirler (Galimand, 2003). Bunun yanı sıra, kromozomal genlerdeki mutasyonlar da direnç oluşumu için önem taşımaktadır (Nordmann, 2014; Partridge, 2015).

Enterobacteriaceae üyelerinde, genellikle çoklu ilaç direnci gösteren izolatların neden olduğu epidemik hastane enfeksiyonlarından endişe duyulmaktadır.

Aminoglikozid direnci 1970'lerde sorun teşkil ederken, 1982'den GSBL üreten kökenler ortaya çıkmıştır. GSBL'lerin genellikle plazmid aracılı olması ve kolay geçiş göstermesi direncin hızlı yayılması açısından önemlidir. Enterobacteriaceae ailesinde son yıllarda hızla yayılan karbapenem direnci (özellikle *K. pneumoniae*) günümüzün büyük sağlık sorunlarından biri haline gelmiştir. Bu aile içindeki karbapenem dirençli bakterilerin çoğu aynı zamanda birçok antibiyotiğe de direnç göstermesi nedeniyle tedavide ciddi sorunlar yaratmıştır. Gelineen noktada, nispeten direncin az olduğu, uzun zamandır çeşitli nedenlerle yaygın olarak kullanılmayan eski antimikrobiyal ajanlardan kolistinin yeniden kullanımı gündeme gelmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarında karbapenem direnci ve çoklu ilaç direnci gösteren Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kolistin kullanılmaktaydı. Ancak kolistin direncinin artması ve son yıllarda tanımlanan plazmid kaynaklı mobilize kolistin direnç geni (*mcr-1*)'in hızlı yayılımı bir tehdit unsuru olarak kolitsini tüketme potansiyeli taşımaktadır (Aydoğan,2000).

1.1.8.1. Beta-Laktam Antibiyotikler ve Direnç Sorunu

Enterobacteriaceae ailesi içinde yer alan bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde, beta laktam grubu antibiyotiklerin geniş spektrumlu ve güvenilir olmalarından ötürü dünyada yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin %60'ını oluşturmaktadır (Livermore, 2006).

Beta-laktam grubu antibiyotikler, penisilin bağlayan proteinleri, transpeptidaz ve karboksipeptidazları inhibe ederek hücre duvar sentezini durdurmak suretiyle etkilerini gösterirler (Gülay, 2004). Beta-laktam grubu antibiyotikler toksisiteyi düşük ve bakterisid etkisi olan ilaçlardır. Bu grup antibiyotiklerin ortak özellikleri ise yapılarındaki beta-laktam adı verilen 4 atomlu halka içermeleridir (Durupınar, 2001). Her gruptaki beta laktam antibiyotiğinin özelliği bu halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirlerin olmasıdır. Tüm üyeleri beta-laktam halkası içeren 5 gruptan oluşur. Bunlar penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta-laktamaz

inhibitörü (klavulanat, sulbaktam, tazobaktam) beta-laktamlardır. Monobaktamlarda beta-laktam halkasına bağlanan başka halka yoktur. (Leblebicioğlu, 2008).

Bu gruptan sefalosporinler ve GSBL üreten izolatların yaygınlaşmasıyla karbapenemler Enterobacteriaceae ailesi enfeksiyonlarında sıklıkla kullanılan antibiyotiklerden olmuştur.

Sefalosporinler

Sefalosporinler günümüzde kullanımda olan en geniş antibiyotik gruplarından birisidir. Penisilinlerden farkı beş üyeli tiazolidon halkası yerine, altı üyeli dihidrotiazin halkası'nın olmasıdır. Bu halka sefalosporinlerin beta-laktamazlara karşı daha stabil olmasını sağlar. Penisilin bağlayan protein (PBP)'lere bağlanarak hücre duvarının sentezini önler ve bakterisidal aktivite gösterirler. Sefalosporinlere direnç başlıca 3 mekanizmayla gelişir. Bunlar; beta-laktamaz yapımı, bakteri hücre duvar geçirgenliğinin azalması ve PBP'lerde modifikasyondur. Sefalosporin direncine en sık yol açan mekanizma beta laktamaz yapımı olup, stabilitesi farklılık göstermektedir. Sefalosporinler Gram negatif bakteri hücre duvarından protein yapısında olan porin denilen su dolu kanalları kullanarak geçer. Porinlerin sayı veya çapındaki değişiklikler bakteriyel direnç ile sonuçlanır (Gülay, 2004; Leblebicioğlu, 2008; Essack,2001).

Günümüze kadar geliştirilen ilaçlar birinci, ikinci, üçüncü, dördüncü ve beşinci kuşak sefalosporinler olarak adlandırılmışlardır. Birinci kuşak sefalosporinler daha çok Gram pozitif bakteriler üzerinde etkili dar spektrumlu olup, ikinci kuşak sefalosporinlerin etkisinin Gram negatif bakteriler üzerinde olmaları nedeniyle daha geniş etki spektrumuna sahiptirler. Bu gruptaki sefamisinler, başta sefoksitin olmak üzere, anti-anaerobik etkinlik gösterirler. Üçüncü kuşak sefalosporinler geniş etki spektrumlu, beta-laktamaz enzimlerine de oldukça dayanıklıdır. Bu grupta *P.*

aeruginosa'ya karşı etkili, anti-pseudomonal, sefalosporinler bulunmaktadır. Dördüncü kuşakta Gram negatif ve pozitif bakteriler üzerinde etkili olan çoğu beta-laktamaz dirençli en geniş spektrumlu sefalosporinlerin olduğu gruptur. Beşinci kuşaktakiler, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) suşlarına karşı etkilidir. Bu grubun üyeleri olan seftarolin ve seftobiprol başta MRSA olmak üzere dirençli Gram pozitif patojenlerin tedavisinde kullanılmaktadır (Mehta,2015).

Karbapenemler

Karbapenemlerin, tıbbi kullanıma girmeleri 1970'li yılların ortalarında *Streptomyces cattleya*'dan elde edilen "thienamycin" bulunmasıyla başlar. Bu grubun ilk üyesi imipenemdir. Diğer bir üyesi olan meropenem ile birlikte güçlü non fermentatif etkinlikleri nedeniyle hastane enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmaktadır. Grubun diğer üyeleri ise ertapenem ve doripenemdir (Jacoby, 2005; Knapp,2001). Karbapenemler günümüzde mevcut olan beta-laktam antibiyotik grubunda yer alan antibakteriyel spektrumu en geniş olanlardır. Penisilin bağlayan proteinlere yüksek afiniteleri sayesinde hücre duvar sentezini inhibe ederek etki göstermektedirler. Beta laktamazlara dayanıklılıkları ve yüksek afiniteleriyle mevcut beta-laktam antibiyotiklerden (penisilinler, sefalosporinler vb.) ve beta-laktam / beta-laktamaz inhibitörü (klasik inhibitörler: tazobaktam, klavulanat gibi) kombinasyonlarından daha geniş antibakteriyel spektrum göstermektedir. Bu durum, temel olarak Gram negatif bakterinin hücre duvarından hızlı şekilde penetrasyonu, PBP'lere karşı seçici afinite ve çoğu beta-laktamaz direncinden kaynaklanmaktadır. Karbapenemler hem Gram pozitif hem Gram negatif aerob ve anaerob bakterilere karşı kullanılan güçlü bir antibiyotik grubudur (Papp-Wallace, 2011; Bassetti, 2009). Ancak, insan hücresine penetrasyonları iyi olmadığından intrasellüler patojenlerin tedavisinde kullanılamamaktadırlar. Karbapenemlerin Gram pozitif bakterilere etkinliği, tıpkı birinci kuşak sefalosporinler ve penisilinler gibi oldukça fazla olmakla birlikte, MRSA kökenlerinde de karbapenem direnci görülebilir (Topçu, 1996; Çolak, 1996).

Enterobacteriaceae suşlarının neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde GSBL, AmpC beta-laktamaz üreten ve çoklu ilaç direnci (ÇİD) olan bakterilere karşı sıklıkla karbapenemler kullanılmaktadır (Harris, 2016; Viale, 2015). Ayrıca alternatif ve optimal tedavi seçenekleri yetersizliğinden monoterapide ve kombine terapilerde de sıkça denenmektedirler (Daikos, 2011).

Beta-laktamaz inhibitörü beta-laktamlar

Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç, beta-laktamazların, beta-laktam halkasındaki karbonil grubu ile ester köprüsü kurarak siklik amid bağını bozması ve antibiyotiğin etkisini yok eden enzimlerin varlığından dolayı görülmektedir. Beta-laktamazlar Gram negatif ve Gram pozitif bakteriler tarafından üretilebilirler. Gram negatif bakterilerden özellikle Entrobacteriaceae üyelerinde beta-laktam direnci en önemli mekanizmadır. Beta-laktamaz genleri bakteri kromozomunda, plazmid, transpozon, integron gibi mobil genetik yapılar da bulundurabilir. Bu enzimler, Gram pozitif bakterilerde doğrudan dış ortama salınmakta, Gram negatif bakterilerde ise periplazmik aralıkta bulunmaktadır (Gülay, 2005).

Bu grubun üyeleri beta-laktamaz inhibitörleri ile kombine edilmiş beta-laktam antibiyotiklerdir. Bu enzimlerin sayı ve çeşitliliğinin artması gruplandırılmalarını zorunlu hale getirmiştir. Bu enzimler pratik olarak;

- klavulanik asit ile kombine edilmiş (amoksisilinetikarsilin, amoksisilin/klavulonat, tikarsilin/klavulonat)
- sulbaktam ile kombine edilmiş ampisilin ve sefoperazon, (ampisilin/sulbaktam)
- tazobaktam ile kombine edilmiş piperasilin (piperasilin/tazobaktam) olarak gruplandırılmışlardır.

Sıklıkla rastlanan toplum kökenli enfeksiyonlarda beta laktamaz direncinin artmasından dolayı tercih edilen bileşiklerdir.

1.2. Kolistin

Polimiksinler, *Bacillus* cinsi bakteriler tarafından ribozom dışı olarak üretilen katyonik yapıli polipeptidlerdir. Kimyasal olarak beş farklı bileşikden (polimiksin A-E) meydana gelmektedirler. Bunlardan polimiksin B *Bacillus polymyxa* türünden izole edilmiş, polimiksin E ise *Bacillus colistinus* türünden izole edilmiştir. Moleküler ağırlıkları 1000 ve daha üzerinde olan ajanlardır. Klinikte tedavi amacıyla polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) kullanılmaktadır (Falagas, 2005; Kwa, 2007).

İlk olarak 1947 yılında üretilen polimiksinler, 1950 ve 1980’li yıllar arasında ciddi Gram negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmıştır. Aynı yıllarda *P.aeruginosa* kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde etkili bir ajan olan gentamisin gibi aminoglikozidlerin kullanılmaya başlanmasıyla daha az tercih edilmiştir. 1980’li yılların başında nefrotoksik yan etkilerinin ortaya çıkmasıyla daha çok rezerv konumunda tutulmuş, uzun yıllar yalnızca kistik fibrozisli hastaların tedavisinde kullanılmıştır. Bunun haricinde gerekli görüldüğünde de daha çok topikal ya da oral kullanımı tercih edilmiştir (Falagas, 2006). Son yıllarda giderek artan dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında kullanılabilecek antibiyotiklerin kısıtlı hale gelmesi polimiksinlerin klinik kullanımını tekrar gündeme getirmiştir (Öncül, 2012).

Polimiksinler çoklu ilaç direnci gösteren *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve karbapenemaz üreten enterik bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde zorunlu olarak tercih edilen spesifik ajanlardan biri olmuştur (Falagas, 2010).

Kolistin, kolistimetat sodyum (kolistin metan sülfat, pentasodyum kolistimetansülfat, kolistin sülfonil metat) ve kolistin sülfat olmak üzere iki farklı ticari formda bulunur (Falagas, 2005; Öncül, 2012). Bunlardan kolistimetat sodyum *in vitro* ve *in vivo* ortamda hidrolize olabilen daha az aktif olan ajandır. Kolistimetat sodyum, kolistin sülfata kıyasla daha az teröpatik etkinlik ve yan etkilere sahiptir. Ayrıca intravenöz, intramusküler ve inhaler gibi parenteral formları bulunmakla birlikte, polimiksin grubu antibiyotikler içinde en fazla kullanılan parenteral formdur. Kistik fibrozisli hastalarda nebulizatör ile inhaler uygulanması, ayrıca intratekal ve intraventriküler enjeksiyona müsait olması avantaj kazandırmıştır. ABD’de sadece kolistimetat sodyum ve polimiksin B kullanımı mevcuttur (Kwa, 2007; Li, 2001). Kolistin sülfat bağırsak dekontaminasyonundan dolayı oral yolla kullanılırken, cilt enfeksiyonlarının tedavisinde ise topikal formu kullanılabilir (Falagas, 2005).

1.2.1. Etki Mekanizması

Kolistinin hedefi bölgesi bakterinin hücre duvarındaki lipopolisakkarit tabakasıdır. Gram negatif bakterilerin hücre membranında bulunan anyonik lipopolisakkarid yapısındaki moleküller için yüksek bir bağlanma afinitesi oluştururlar. Kolistinin elektrostatik etkileşimi sonunda hücre membran yapısında bulunan ve membranı stabil halde tutan divalan katyonlarının (Ca^{+2} ve Mg^{+2}) iyon dengesi bozulur, yerleri değişen divalan katyonları lipid yapısından ayrılarak permeabilite artışına neden olmaktadır. Bu artış membran yapısını bozduğundan hücre içeriği dışarı sızar ve hücrenin ölümü ile durum sonlanır (Falagas, 2005; Peterson, 1985). Kolistin, antibakteriyel etkisi dışında güçlü bir anti-endotoksik aktivite de göstermektedir. Gram negatif bakterilerin endotoksik aktivitesi kolistinin lipopolisakkarid moleküllerinin lipid A bölümüne bağlanarak nötralize etmek üzerine kurgulanmıştır (Falagas, 2005).

1.2.2. Etki Spektrumu

Kolistinler, son yıllarda giderek artan çoklu ilaç direnci gösteren *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve karbapenem dirençli *Klebsiella* spp. enfeksiyonlarından dolayı tedavide zorunlu olarak tercih edilen antimikrobiyal ajanlardır. Ayrıca *Enterobacter* spp., *E.coli*, *Shigella* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Bordetella pertussis* ve *Y. pseudotuberculosis*'e karşı bakterisidal etkinlik göstermektedirler. *Stenotrophomonas maltophilia* enfeksiyonlarında da etkin olmasına rağmen, değişken duyarlılıklar görülebilmektedir. Bununla birlikte, kolistinin bazı Mikobakteri türleri üzerinde de etkili olabileceği gösterilmiştir.

Kolistine karşı doğal direnç, başta Gram pozitif ve anaerob bakteriler olmak üzere *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Proteus mirabilis*, *Providencia* spp., *Morganella morganii*, *Neisseria* spp., *Brucella* spp., *Moraxella catarrhalis* ve *Serratia marcescens* gibi bakterilerde görülmektedir.

1.2.3. Direnç Mekanizması

Kolistine karşı edinilmiş direnç mekanizması, hedef hücre membranında bulunan lipopolisakkaritlerin yapılarındaki meydana gelen değişikliklerdir. Yakın zamana kadar meydana gelen dirençten kromozomal genlerdeki bazı mutasyonlar sorumlu tutulmaktaydı. Ancak 2016 yılında Çin'de tanımlanan ve plazmid aracılığı ile kodlanan *mcr-1* adlı genin membrandaki lipid A bölgesine fosfoetanolamin eklenmesiyle kolistin direncine neden olduğu saptanmıştır (Liu, 2016).

Kolistin direncindeki temel moleküler mekanizmaya, hücre membranında bulunan lipopolisakkarit tabakasının lipid A bölümüne fosfoetanolamin (PEtN) veya 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) eklenmesine ek olarak deasetilasyon veya hidroksilasyon gibi kovalent değişikliklerin neden olduğu düşünülmektedir. Bunun

yanı sıra, kapsül oluşumu ve efluks pompaları da etkili olmaktadır (Olaitan, 2014). En sık karşılaşılan lipopolisakkarit değişimi L-Ara4N eklenmesiyle lipid A'nın net negatif yükünü 0'a düşüren katyon değişimidir. İkinci değişim şekli ise PEtN eklenmesiyle, net negatif yükü -1/-1,5 aralığına düşüren modifikasyondur (Nikaido, 2003). Bu direnç mekanizmaları lipopolisakkaritin negatif yükünü azaltarak kolistin hücre membranına bağlanmasını zorlaştırmakta ve direncin gelişmesine neden olmaktadır.

Genel olarak, *pmrA/pmrB* ve *phoP/phoQ* gibi hücre membranında etkili olan regülatuar sistemlerde çevresel veya spesifik mutasyonel etkenlerle aktivasyon artışı gözlenirken, bu etkenler lipopolisakkarit modifiye eden genlerin ekspresyonlarının artmasına neden olmaktadır. Örneğin, *pmrA/pmrB* regülatuar sistem aktivasyonunun sırasıyla PEtN ve L-Ara4N moleküllerinin sentezini ve lipid A'ya transferini sağlayan *pmrCAB* ve *arnBCADTEF-pmrE* (diğer adıyla *pmrHFIJKLM-ugd*) operonlarının regülasyonu; *phoP/phoQ* regülatuar sistem aktivasyonu *pmrA/pmrB* regülatuar sisteminin *pmrD* üzerinden dolaylı aktivasyonu ile dirence katkı sağladığı tespit edilmiştir. Kolistin direnç gelişiminde farklı bakteri gruplarında farklı genetik modifikasyonlar gerçekleşmektedir. Özellikle nonfermentatif bakteriler ve *Enterobacteriaceae* üyelerindeki kazanılmış direnç mekanizmalarında farklılıklar görülmektedir (Olaitan, 2014). Son yıllarda çoklu ilaç direnci gösteren *K. pneumoniae* kökenlerinin neden olduğu hastane enfeksiyonlarında kolistin direnci klinik açıdan oldukça önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda, dirençli bakterilerin lipid A yapısında 5 kat daha fazla L-Ara4N bulunduğu saptanmıştır (Helander, 1996). Aynı kökenlerin *pmrA/pmrB* ve *phoP/phoQ* regülatuar sistemlerinde gerçekleşen mutasyonlarda, *pmrC* ve *arnBCADTEF* operonlarının upregülasyonuna neden olarak lipid A yapısında PEtN ve L-Ara4N ile modifikasyonuna neden olduğu tespit edilmiştir (Cheng, 2010).

K. pneumoniae izolatlarında kolistin direncinden sorumlu bir transmembran proteinini kodlayan kromozomal bir gen *mgrB*'nin varlığı ortaya çıkmıştır. Bu genin görevi *phoP/phoQ* regülatuar sistemine negatif feedback sağlamaktır (Cannatelli, 2013; Lipka; 2009). *mgrB* mutasyonları, *pmrA* ve/veya *phoP*'nin fosforillenmesiyle,

arnBCADTEF operonunu regüle ederek lipid A yapısına L-Ara4N eklenmesiyle dirence neden olmaktadır (Cheng, 2010 Kim, 2014). Kapsül sentezi ile ilişkili olan *rscB* geninin *phoP/phoQ* sistemi üzerindeki baskılayıcı etkisi ve bu gendeki mutasyonlar *phoP/phoQ* sistemini aktive ederek kolistin direncine neden olabileceği açıklanmıştır.

Antimikrobiyal direncin ciddi sorun teşkil ettiği bir diğer Enterobacteriaceae üyesi olan *E. coli* kökenlerinde de kolistin direncinin, çoğunlukla lipid A'nın L-Ara4N veya 2-aminoethanol moleküllerinin modifikasyonu ile ilişkili olduğu gösterilirken, az sayıda da olsa lipid A'nın PEtN ile modifiye olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Nummila, 1995; Kim, 2006).

Kolistin dirençli *E. coli* suşlarında bir başka direnç mekanizması ise Enterobacteriaceae üyelerinde korunmuş bir gen olan *mgrR* genindeki mutasyonlardır. *mgrR* geni, lipid A'nın PEtN ile modifikasyonundan sorumlu *eptB* geninin negatif regülatörü olduğu belirlenmiştir. Bu sayede *mgrR* mutasyonlarının lipid A'yı modifiye ederek kolistin direncine neden olabileceği düşünülmektedir (Reynolds, 2005; Raetz, 2007). Ayrıca, *mgrR* geninin *phoP/phoQ* sistemi tarafından regülasyonu, aynı yol üzerinden mutasyonlara uğraması kolistin direncine neden olabileceğini göstermektedir (Moon, 2009). *micA* geni de *E. coli* izolatlarında *phoP/phoQ* sisteminin regülasyonuna, özellikle *phoP* gen bölgesinin baskılanmasına neden olmaktadır. Bu durumda yine gende meydana gelen mutasyonların kolistin direncinden sorumlu olabileceği gösterilmiştir (Coornaert, 2010).

Günümüzde antibiyotik direncinin ciddi boyutlara ulaştığı bakteri türlerinden olan *A. baumannii*, L-Ara4N sentezi için gerekli genetik mekanizmalara sahip olmadığından direnç PEtN üzerinden gerçekleşmektedir. *A. baumannii* kökenlerinde tanımlanan iki farklı mekanizmanın kolistin direncine neden olduğu düşünülmektedir. Birincisi enterik bakterilere benzer olarak, *pmrA/pmrB* bölgelerinde görülen mutasyonlar sonucunda Lipid A yapısına PEtN eklenmesidir. Bu mutasyonlar en sık *pmrB* geninde ve genlerin değişik bölgelerinde

görülebilmektedir (Olaitan, 2014). Ayrıca, kolistin dirençli *A. baumannii* türlerinde, *pmrC* benzeri bir fosfoetanol transferaz geni olan *eptA* 'nın ekspresyon seviyelerinde anlamlı derecede artış olduğu yapılan çalışmalar mevcuttur. Bu genin konumunun mobil genetik elemanlara yakınlığı horizontal geçiş olasılığını da akla getirmektedir (Arroyo, 2011; Lesho, 2013). Diğer direnç mekanizması ise lipid A sentezinden sorumlu olan genlerde (*lpxA*, *lpxC* ve *lpxD*) meydana gelen nükleotid değişimi, delesyonlar veya bu genlere ISAb11 elementinin insersiyonuyla sentezin bozulması veya lipopolisakkaritlerin tamamen kaybolması olarak belirlenmiştir. Bu tip mutasyonun görüldüğü kökenlerde genellikle antibiyotığın hedef bölgesi olan lipid A molekülünün bulunmaması yüksek düzey dirence sebebiyet vermektedir. Ayrıca, moleküler mekanizmaların tam olarak aydınlatılamaması, heterodirençli kolistin subpopülasyonların direnç oranlarının artmasına ve tedavide başarısızlıklara neden olduğu düşünülmektedir (Moffatt, 2010).

P. aeruginosa suşlarında kolistin direnç mekanizmaları, *A. baumannii*'den çok enterik bakterilere benzerlik göstermektedir. Kolistin direncinden sorumlu 5 farklı regülatuar sistem tespit edilmiştir. Bunlar *pmrA/pmrB* (McPhee, 2003; Moskowitz, 2004; Moskowitz, 2012; Abraham, 2009), *phoP/phoQ* (Macfarlane, 2009; Barrow, 2009; Schurek, 2009; Miller, 2011), *parR/parS* (Lesho, 2013; Moffatt, 2010), *colR/colS* ve *cprR/cprS* genleridir (Gutu, 2013). Kolistin dirençli *P. aeruginosa* izolatlarıyla yapılmış çalışmalarda, direnç nedeni mutasyonlar çoğunlukla *pmrB* geninde saptanmış, *pmrA* mutasyonlarına da nadiren rastlanmıştır (Lee, 2014). Enterik bakterilerden farklı olarak, *phoP/phoQ* regülatuar sistemindeki mutasyonlardan kaynaklı değişiklikler *pmrA/pmrB* sisteminden bağımsız gerçekleşmektedir. Ayrıca *pmrB* ve *phoQ* mutasyonlarının beraber görüldüğü izolatların daha dirençli olma olasılığı tespit edilmiştir (Owusu-Anim, 2012). Özellikle *phoQ* mutantlarında görülen mutasyonların yüksek oranda dirence neden olduğu saptanmıştır (Gutu, 2013). Ayrıca, *cprR/cprS* ve *parR/parS* regülatuar sistemlerinde, kolistin haricindeki diğer antimikrobiyal peptidlerin aktivasyonunu arttırması lipopolisakkarit tabakasında modifikasyona yol açtığı bildirilmiştir (Fernandez, 2010).

Kolistin içeren kombinasyon terapileri gelişmekte olan kolistin direncini azaltmak ve antibiyotiğın bakterisidal etkisini arttırmak amacıyla sıklıkla kullanılmaktadır. Bu amaçla yapılan çalışmalarda rifampin başta olmak üzere karbapenemler, sulbaktam, minosiklin, glikopeptidler, tigesiklin ve bazı antibiyotikler ile kolistinin sinerjistik etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmalarda time-kill assay, checkerboard assay ve gradient strip yöntemleri uygulanmıştır. Time-kill assay altın standart yöntem olarak kabul edilmiştir (Biswas, 2012; Bremmer, 2016; Lee, 2008; Principe, 2009; Gazel, 2014; Pachon-Ibanez, 2010).

1.2.4. Klinik Kullanımı

Ülkemizde, Nisan 2010 tarihinde ruhsat almış olan kolistinin kolistimetat sodyum içeren formatı, çoklu ilaç direnci gösteren Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında, özellikle karbapenem direncinin yaygın olduğu merkezlerde ya da *in vitro* olarak duyarlı bulunan antibiyotikler ile tedaviye yanıt alınamadığında, uygun antimikrobiyal duyarlılık testi sonuçları doğrultusunda kullanılmaktadır. İntravenöz, inhaler ve intratekal kullanım formları kolistinin klinik kullanım spektrumunu arttırmaktadır. Alt solunum yolu enfeksiyonlarında inhaler kullanımı ile elde edilen sonuçlar, intravenöz kullanımı ile elde edilen sonuçlardan daha başarılıdır (Falagas, 2005). Çoklu ilaç direnci olan Gram negatif basillerden kaynaklanan ventilatör ilişkili pnömoni olgularında da kolistin monoterapi veya kombine olarak kullanılırken, yanık enfeksiyonları ve ventrikülit olgularında (intratrakeal olarak) kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (Bremmer, 2016).

1.2.5. Yan Etkileri

Nefrotoksisite ve nörotoksisite kolistinin en sık karşılaşılan yan etkileridir. Toksisitenin moleküler mekanizması kesin olarak bilinmese de, doza bağımlı ve geri dönüşümlü olduğu düşünülmektedir. Nefrotoksisiteyle ilişkilendirilen total kümülatif kolistimetat sodyum dozu, uzamış tedavi sürelerinde yan etkileri artırıcı rol

oynamaktadır (Biswas, 2012). Diğer bir risk faktörü ise, kolisitinin nefrotoksik ilaçlar ile birlikte verilmesidir. Geçmişte toksisiteye neden olduğu gerekçesiyle kolistin yerine aminoglikozidler tercih edilmiş, ancak aminoglikozidlerin günümüzde daha az nefrotoksik olduğu ortaya çıkmıştır (Falagas 2010; Yahav, 2011). Nörotoksosite, yaklaşık %7 civarında olguda görüldüğü tespit edilmiştir. Başlıca semptomları baş dönmesi, güçsüzlük, fasyal ve periferik parestezi, vertigo, görme bozuklukları, ataksi, konfüzyon ve solunum yetmezliğine neden olabilen nöromusküler blokaj şeklinde kendini göstermektedir (Falagas, 2005).

Son yıllarda kolistin ile ilgili yapılan çalışmalarda nörotoksik ve nefrotoksik yan etkilerin beklenenden daha az olduğu bildirilmiştir (Matthaiou, 2008). Bunun en önemli nedenleri, hastaların daha iyi monitörize edilmesi, nefrotoksik ilaçlar ile birlikte kolistin kullanımının sınırlandırılması, bu konudaki farkındalığın artması ve içeriğindeki bulunan nefrotoksik maddelerin azaltılıp daha pürifiye hale getirilmiş olmasıdır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Enterobacteriaceae üyelerinde plazmid aracılı (*mcr-1*, *mcr-2*) ve kromozomal kolistin direnç genleri (*phoP/phoQ*, *pmrA/pmrB*) varlıklarının araştırılması ve kolistin direncinin moleküler mekanizmalarının aydınlatılması amacıyla yapıldı.

Çalışmanın gerçekleştirilmesi için Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı'ndan 07.04.2017 tarihinde alınan 2017/4 toplantı numaralı karar ile etik kurul onayı alınmıştır.

2.1. Bakteri Suşlarının Toplanması

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na 01.05.2017 ve 31.10.2018 tarihleri arasında çeşitli servislerdeki hastalardan gönderilen klinik örneklerden izole edilen *Enterobacteriaceae* ailesine ait kolistin dirençli 40 izolat ve kontrol grubu amacıyla 8 adet kolistine duyarlı suş çalışma kapsamına alındı.

2.2. Bakteri Suşlarının İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Laboratuvara gönderilen kan, beyin omirilik sıvısı (BOS), idrar, balgam, yara yeri sürüntüsü gibi örnekler kültürü yapılmak üzere kanlı agar, çikolata agar ve EMB agar besiyerlerine ekildi. 37°C'lik etüvde 24 saat boyunca inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bakterilerin saf kültürleri elde edildi. Kolonilerin morfolojileri incelenerek, laktoz pozitif şüpheli koloniler kabul edildi. İdrar kültürlerindeki koloni sayısı 5×10^4 'den fazla olan örnekler değerlendirmeye alındı. EMB agarda yeşilimsi

metalik r fle veren, kanlı agarda S koloni yapan 2-3 mm çapında *E. coli* olduğu düşünülen şüpheli koloniler alındı. EMB agarda 3-4 mm çapında pembe mukoid, kanlı agarda mukoid 3-4 mm boyutundaki *Klebsiella* spp. olduğu düşünülen ve yine EMB agarda üremesi gözlenen pembe, *Klebsiella* kolonileri kadar mukoid olmayan, kanlı agarda ise düzgün 3-4 mm boyundaki, laktoz pozitif *Enterobacter* olduğu düşünülen şüpheli koloniler Gram boyama işlemine tabi tutuldu. TSI besiyerinde glukoz, laktoz ve sükroz kullanımı ile gaz ve H₂S oluşturması, sitrat besiyerinde sodyum sitrat kullanımı, üre agar besiyerinde üreaz üretimi, indol oluşumu ve SIM (Sulfide Indole Motility) besiyerinde enterik hareketlilik yönünden değerlendirildi. Gram negatif olduğu anlaşılan kolonilerden MALDI-TOF MS (BioMerieux, Fransa) ve VITEK 2 (BioMerieux, USA) otomatize sistem ile tür düzeyinde tanımlama yapıldı. Duyarlılık testleri ve moleküler testler  alı ılıncaya kadar su lar %15 gliserol eklenmiş triptik soy broth içeren 2 ml'lik steril ependorf tüplerinde süspanse edildi ve -80 C'de saklandı.

Çalışmamıza dahil ettiğimiz bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek amacıyla kirby bauer yöntemi ve VITEK 2 otomatize sistemi kullanılmıştır. Dirençli su lar E test yöntemi ile doğrulanmıştır. Tüm fenotipik duyarlılık testlerinde ve *K.pneumoniae* ATCC 700603 standart su ları kullanıldı.

2.2.1. Maldi-Tof MS (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization time of flight, Mass Spectrometry)

Çalışmaya alınan tüm bakteri izolatları EMB besiyerine pasajlandı. 24 saatlik kültürlerden tek koloni alınarak 96 bölümlük test plağına bölüm dışına ta mayacak ince bir film tabakası oluşturacak şekilde yayıldı. Hücre duvarını parçalayarak protein ekstraksiyonunu sağlamak amacıyla üzerine 0,5 L VITEK-MS-FA (Formikasit) ilave edilerek kısa bir süre bekletildi. Daha sonra üzerine matriks çözeltisi olarak 1 L VITEK MS-CHCA (= -Cyano-4-hydroxycinnamic acid) eklendi ve oda sıcaklığında kurutuldu. Plak cihaz içine yerleştirilerek işlem başlatıldı. Çalışmamızda MALDI-TOF-MS sistemi olarak VITEK- MS ticari sistemi

kullanıldı, ölçümler üretici firmanın önerdiği ayarlar ile yapıldı. Elde edilen spektrumlar güncel IVD (invitro diagnostik) VITEK MS V.2.0 yazılımı kullanılarak analiz edildi.

2.2.2. VITEK 2® Otomatize Sistem

Mikroorganizmaların çalışılması için identifikasyon amacıyla hazırlanan 0.5 McFarland bulanıklığındaki bakteri çözeltilisinden 145 µl alınarak yeni hazırlanmış olan 3 ml'lik steril deney tüpündeki serum fizyolojik ile süspanse edildi. Hazırlanan bakteri süspansiyonları, üretici firma prosedürüne uygun olarak identifikasyon (VITEK 2 GN Card) ve antimikrobiyal duyarlılıkların belirlenmesi için (VITEK 2 AST Card) (bioMérieux, Fransa) inokülasyon kartlarına dağıtılarak cihaza (bioMérieux, Fransa) yerleştirildi. Her bir antibiyogram kartı liyofilize olarak antibiyotiklerin farklı konsantrasyonlarını ve Mueller Hinton Broth içermektedir. Bu kartlar mikrodilüsyon tekniğinin küçültülmüş ve kısaltılmış şekliyle MİK/breakpoint değerini tespit etmektedir. İnkübasyonun sonunda bakteri türleri belirlendi. MİK değerleri EUCAST kriterlerine göre yorumlandı.

2.3. Direncin Moleküler Temelinin Araştırılması

Kolistin dirençli 40 ve kolistine duyarlı 8 adet *K. pneumoniae* suşu moleküler direnç mekanizmasının araştırılması için çalışmaya dahil edildi. Bu aşamada, literatürde kolistin direncinden sorumlu olabileceği bildirilen plazmid aracılı *mcr-1* ve *mcr-2* genlerinin varlığı ile kromozomal *pmrA*, *pmrB*, *phoP* ve *phoQ* genlerinin ekspresyon seviyeleri incelendi. Moleküler çalışmalarımızda *mcr-1* pozitif kontrol suşu *E. coli* NTCC 13846 kullanıldı.

2.3.1. Bakteriden DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu yapılacak kökenlerin tamamı yeniden canlandırma işlemi için -80°C'den çıkarıldı, Brain Heart İnfüzyon Buyyonda (BHI) bir gece inkübe edildi, kanlı ve EMB agara subkültürleri yapıldı. Koyun kanlı agardaki taze pasajlarından steril öze ile alınan 3-5 koloni, 300 µl distile su içinde dağıtılıp, numaralandırılan kilitli steril ependorf tüpler içerisinde süspanse edildi ve iyice çözünmesi sağlandı. Her bir örnek en az 30 saniye vortekslenerek homojen hale getirildi. Daha sonra içi su dolu beher içinde köpük spora yerleştirilerek 95°C'de 20 dakika kaynatıldı. Ependorflar oda sıcaklığına geldikten sonra 14000 devirde 5 dakika boyunca santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatantın 100 µl'si amplifikasyon için kalıp DNA kaynağı olarak kullanıldı. Elde edilen DNA örnekleri -20°C'de PCR işlemine kadar saklandı.

2.3.2. DNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi

Çalışmada 48 bakteri örneğinden izole edilen DNA'nın konsantrasyonu ve saflık derecesi için NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 UV/VIS) cihazı kullanıldı. Spektrofotometrik yöntem ile üretici direktifleri doğrultusunda 1µl DNA kullanılarak ölçüm yapıldı. 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri (A260) DNA solüsyonu içerisindeki DNA ve RNA miktarını gösterirken; 280 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri (A280) ise protein miktarlarını göstermektedir. 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan absorpsiyon değerleri arasındaki oran (A260/A280) hesaplanarak DNA'nın saflık derecesi belirlendi. A260/A280 değeri ≥ 2 olan örnekler saf olarak kabul edildi, farklı sonuç veren örnekler için izolasyon aşaması tekrar edildi.

2.3.3. Primerlerin Hazırlanışı

Gen bölgelerinin gösterilmesi için iki ayrı primer seti kullanıldı. Gen bankası verilerinden hedeflenen DNA dizileri bulundu. Seçilecek primerlerin belirlenen hedef DNA'ya özgün olup olmadığını saptamak için Primer3 Plus programı kullanıldı. *mcr-1* ve *mcr-2* için yaklaşık olarak 18 basepare (bp) uzunluğundaki primerler forward ve reverse olarak belirlendi. Primer dizilerinin uygunluğu diğer yayınlarla desteklenerek literatür tarandı ve primer dizaynına karar verildi. Ticari olarak satın alınan liyofilize haldeki primerlere (Sentegen, Türkiye) üretici firma protokolüne uygun olarak sulandırma işlemi yapılarak 100 pmol/μl konsantrasyonda stok primerler elde edildi. Ancak çalışma için primerlerin konsantrasyonu 10 pmol/μl olarak planlandı. Bunun için 100 pmol/μl konsantrasyondaki stok primerden 10 μl ve distile sudan 90 μl alındı, toplam hacim 100 μl olacak şekilde tekrar sulandırılarak, ependorflara ayrılıp -20°C'de muhafaza edildi.

2.3.4. *mcr-1* ve *mcr-2* Real Time PCR Çalışması

mcr-1 ve *mcr-2* çalışması Tablo 3.1'de görülen primerler ve Real-Amp™ SYBR qPCR Master mix (Cat. No. 801-050, Geneall Biotechnology, Güney Kore) kiti kullanılarak üretici direktifleri doğrultusunda Rotor-Gene Q (QIAGEN, Hilden, Germany) real time PCR cihazında gerçekleştirildi.

Tablo 2.1. *mcr-1* ve *mcr-2* real time PCR çalışmalarında kullanılan primer dizileri.

Primer adı	Oligonukleotid dizi	bp	Referans
<i>mcr-1</i> F	5 - CGGTCAGTCCGTTTGTTTC - 3	309 bp	(Zaki MES, 2018)
<i>mcr-1</i> R	5 - CTTGGTCGGTCTGTAGGG - 3	309 bp	(Zaki MES, 2018)
<i>mcr-2</i> F	5 - TGGTACAGCCCCTTTATT - 3	567 bp	(Zaki MES, 2018)
<i>mcr-2</i> R	5 - GCTTGAGATTGGGTTATGA - 3	567 bp	(Zaki MES, 2018)

PCR şartlarının belirlenmesinin ardından çalışmada kullanılacak *mcr-1* ve *mcr-2* primer gruplarının ve hasta örneklerinin PCR ile analizi aşamasına geçildi. Her PCR reaksiyonu için 40 hasta örneğine ait DNA, *mcr-1* pozitif *E. coli* kontrol (PK) DNA'sı ve negatif kontrol (NK) çalışıldı. PCR karışımı (Tablo 3.2, Tablo 3.3) pipetaj hata payı dahil edilerek 55 örnek için hazırlandı, artan karışım miktarı kullanılmadan atıldı.

Tablo 2.2. *mcr-1* real time PCR çalışmalarında bir reaksiyon için hazırlanması gereken karışım miktarları.

Komponent	Miktar
SYBR Green master mix	12,5µl
<i>mcr-1</i> forward	1 µl
<i>mcr-1</i> reverse	1 µl
RNase/DNase içermeyen steril su	9,5 µl
DNA	1 µl
Toplam	25 µl

Tablo 2.3. *mcr-2* real time PCR çalışmalarında bir reaksiyon için hazırlanması gereken karışım miktarları.

Komponent	Miktar
SYBR Green master mix	12,5µl
<i>mcr-2</i> forward	1 µl
<i>mcr-2</i> reverse	1 µl
RNase/DNase içermeyen steril su	9,5 µl
DNA	1 µl
Toplam	25 µl

PCR karışımların hazırlanması sırasında PCR tüpleri, sıcaklıklarını korumak amacıyla -20°C dondurucudan çıkarılan özel zemin üzerine yerleştirilerek çalışıldı. PCR master mix, dH₂O, primerler ve çalışılacak DNA'lar sadece çözülmelerine yetecek süre kadar soğutucu dışında tutuldu, kullanıldıktan hemen sonra dolaba kaldırıldı. Daha sonra, Rotor-Gene Q cihazında Tablo 3.4 ve Tablo 3.5'teki kantitatif real time PCR protokolü uygun olarak çalışma gerçekleştirildi.

Tablo 2.4. *mcr-1* gen bölgesi PCR protokolü.

94°C	5 dakika	1 siklus
94°C	45 saniye	40 siklus
60°C	60 saniye	
72°C	60 saniye	
72°C	7 dakika	1 siklus

Tablo 2.5. *mcr-2* gen bölgesi PCR protokolü.

94°C	5 dakika	1 siklus
94°C	45 saniye	40 siklus
55°C	60 saniye	
72°C	60 saniye	
72°C	7 dakika	1 siklus

2.3.5.PCR Ürünlerinin Elektroforez İşlemi

Öncelikle 10X TBE (Tris-Borik-Asit-EDTA) tamponundan 100 ml, steril deiyonize sudan 900 ml alınmış ve 1000 ml'lik 1X TBE tamponu hazırlandı. Sonrasında 50 ml 1X TBE tamponu içerisine 1 gr agaroz eklenerek % 2 konsantrasyonluk agaroz jel hazırlandı. Karışım mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) 3-5 dakika kaynatılarak çözdürüldü. Elektroforez tablasının içine yükleme kuyucuklarını oluşturacak şekilde taraklar düzgün bir şekilde yerleştirildi. Sıvı halde bulunan karışım jel tablasının içerisine yavaş ve kabarcık oluşturmayacak şekilde döküldü ve 25-30 dakika oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı, jel donduktan sonra elektroforez tankına yerleştirildi. Üzerini kaplayacak şekilde 1X TBE tamponu jel üzerine eklendi. Katılaştıran jel içerisinden taraklar çıkarıldı.

PCR ürünleri örnek numarasına göre sıralandı. Yüklemede 10 µl PCR ürünü, 2 µl loading dye ile karıştırılarak sırayla kuyucuklara yerleştirildi. Her PCR reaksiyonu için kullanılan pozitif kontrol ve negatif kontrol de aynı şekilde jel kuyucuklarına yüklendi, en son kuyucuğa da 100 bp'lik bantlara sahip olan 5 µl DNA ladder (Genesta, GeneAll) yine 0.5 µl loading dye ile karıştırılarak yüklendi. Jele marker ve örneklerin yüklemesi yapıldıktan sonra elektroforez tankının kapağı kapatıldı, güç kaynağına bağlanarak 100 Volt elektrik ile 30 dakika boyunca yürütüldü.

2.3.6.Sonuçların Gözlenmesi ve Analizi

Elektroforez işlemi sonunda jel dikkatli bir şekilde, DNA görüntüleme işleminde kullanılan 5µg/ml Etidyum Bromür (boyar madde) içeren 400 ml ultra saf suda ışık geçirmeyen ağzı kapalı bir kapta 15 dakika boyanmaya bırakıldı. Boyama işlemi sonunda çıkarılan jel vakit kaybetmeden UV ışık altında görüntülendi. Jel transluminatör cihazındaki uygun odacığa yerleştirilerek ultraviyole ışık altında, PCR sonucu oluşan ürünler, marker baz uzunlukları ile karşılaştırılarak incelemeye alındı.

Zayıf bile olsa ışına görülmesi, bakteride ilgili plazmid veya gen bölgesinin mevcut olduğu anlamına geldiğinden pozitif kabul edildi.

2.3.7. *pmrA*, *pmrB*, *phoQ* ve *phoP* Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin Araştırılması

Kromozomal gen bölgeleri için öncelikle RNA izolasyonu gerçekleştirildi ardından cDNA elde edildi. Elde edilen cDNA'lar ile *pmrA*, *pmrB*, *phoP* ve *phoQ* genlerinin ekspresyon seviyeleri analiz edildi. Moleküler çalışmalarımızın tamamında kolistine duyarlı *K. pneumoniae* ATCC 700603 kontrol suşu kullanıldı.

2.3.8. Bakteriden RNA İzolasyonu

Pure Gene RNA Isolation Kit (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak üretici firmanın önerdiği protokol doğrultusunda RNA izolasyonu gerçekleştirildi;

1. Kanlı agardan öze yardımıyla alınan 4-5 bakteri kolonisi 1000 µl Lizis buffer içerisinde kuvvetli bir şekilde süspanse edildi.
3. 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
4. Karışımın üzerine 200µl Kloroform izoamilalkol (49:1) karışımı eklendi. Alt-üst ederek karıştırıldı ve oda sıcaklığında 3 dakika daha bekletildi.
5. Karışımı 4°C'de 12000 x g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası en üstte bulunan sıvı fazdaki süpernatantı yeni bir tüpe aktarıldı (≈600µl).
6. Üzerine 1.25 kat (≈800µl) etanol (%96-100) eklendi ve pipetleyerek karıştırıldı.
7. 700 µl lizat kolona transfer edildi ve oda sıcaklığında 12000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün içerisine yerleştirildi. Tüm lizatlar kolona transfer edilinceye kadar bu basamak tekrarlandı.

8. Kolonun üzerine 700µl wash buffer 1 solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 12000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi, tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi.
9. Kolonun üzerine 500µl wash buffer 2 solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 12000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi, tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi.
10. Kolonun üzerine 500µl wash buffer 2 solüsyonu eklendi, oda sıcaklığında 12000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi, tüp döküldü ve kolon tekrar tüpün üzerine yerleştirildi.
11. Kolon tekrar 1 dakika maksimum hızda santrifüj edildi ve kolon 1,5 ml'lik ependorf tüpünün üzerine yerleştirildi.
12. Kolonun merkezine 30-50µl 65-70°C'de bekletilmiş nükleaz free ultra distile su eklendi, oda sıcaklığında 12000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
13. Elde edilen RNA -80 °C'de muhafaza edildi.

2.3.9. RNA Miktar Tayini ve Saflık Derecesinin Belirlenmesi

Kırk sekiz bakteri örneğinden izole edilen RNA'nın miktar tayini ve saflık derecesi için NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific NanoDrop™ 1000 UV / VIS, ABD) cihazı kullanıldı. Spektrofotometrik yöntem ile üretici direktifleri doğrultusunda 1µl RNA kullanılarak ölçüm yapıldı. 260 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri (A260) DNA solüsyonu içerisindeki DNA ve RNA miktarını gösterirken; 280 nm dalga boyundaki absorpsiyon değerleri (A280) ise protein miktarlarını göstermektedir. 260 ve 280 nm dalga boylarında okunan absorpsiyon değerleri arasındaki oran (A260/A280) hesaplanarak RNA'nın saflık derecesi belirlendi. A260/A280 değeri ≥ 2 olan örnekler saf olarak kabul edildi, farklı sonuç veren örnekler için izolasyon aşaması tekrar edildi.

2.3.10. RNA Örneklerinden Komplementer DNA (cDNA) Sentezi

RNA izolasyonunun ardından, komplementer DNA (cDNA) sentezi, aşağıdaki aşamalar izlenerek High Capacity cDNA Transcription Kit (appliedbiosystems, Thermo Fisher Scientific, Litvanya) kullanılarak üretici firma direktifleri doğrultusunda gerçekleştirildi;

1. -80°C’de muhafaza edilen RNA’lar ve -20°C’de muhafaza edilen cDNA kiti içerisinde bulunan kimyasallar eş zamanlı olarak çalışmaya uygun hale getirildi.
2. Ters transkripsiyon işlemi için gerekli master mix farklı bir tüp içerisinde Tablo 2.6’daki sırayla hazırlandı;

Tablo 2.6. cDNA sentezinde PCR çalışması için hazırlanması gereken karışım miktarı.

Komponent	Miktar (1 reaksiyon için)
10 X RT Buffer	2µl
25 X dnTP mix	0,8µl
10 X Random Primer	2µl
Multi Scribe Reverse Transcriptase	1µl
Toplam	5,8 µl

3. Master mix karışımı kit protokolüne göre her bir örnek için 5,8µl olarak belirlendi. 500 ng RNA içerecek şekilde µl cinsinden tüm örneklerde RNA miktarı hesaplandı ve buna uygun olarak toplam hacmi 20 µl’ye tamamlayacak kadar RNase/DNase içermeyen steril su eklendi.
4. Bu aşamadan sonra tüpler PCR (MiniAmp Thermal Cycler appliedbiosystems, Thermo Fisher Scientific)) cihazına yerleştirildi.
5. High Capacity cDNA Transcription Kit prosedürüne uygun şekilde PCR döngüsü Tablo 2.7’deki gibi oluşturuldu.

Tablo 2.7. cDNA sentezi PCR protokolü.

	Aşama 1	Aşama 2	Aşama 3	Aşama 4
Sıcaklık	25°C	37°C	85°C	4°C
Zaman	10 dakika	120 dakika	5 dakika	∞

6. İşlem sonunda elde edilen cDNA'lar bir sonraki çalışma süresine kadar -20°C'de muhafaza edildi.

2.3.11. Real Time PCR (RT-qPCR) Çalışması

pmrA, *pmrB*, *phoQ* ve *phoP* gen bölgelerinin ekspresyon düzeylerini ölçmek için Tablo 2.8'de belirtilen primerler (Sentegen, Türkiye) kullanıldı (Bremmer, 2016; Yahav, 2011 Matthaïou, 2008). Real time PCR çalışması, Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, ABD) kiti kullanılarak StepOnePlus Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, ABD) cihazında gerçekleştirildi. Kontrol geni olarak *rpsL* (Tablo 2.8) geni housekeeping (referans) gen kullanıldı.

Tablo 2.8. *pmrA*, *pmrB*, *phoQ*, *phoP* ve *rpsL* genlerinin real time PCR çalışmalarında kullanılan primer dizileri.

Primer adı	Oligonukleotid dizi
<i>PmrA</i> Forward	GAT GAA GAC GGG CTG CAT TT
<i>pmrA</i> Reverse	ACC GCT AAT GCG ATC CTC AA
<i>pmrB</i> Forward	TGC CAG CTG ATA AGC GTC TT
<i>pmrB</i> Reverse	TTC TGG TTG TTG TGC CCT TC
<i>phoP</i> Forward	TCT ACC GGG TCA GCG AAT AC
<i>phoP</i> Reverse	GAT CAG GAT CGG GAA GGA CT
<i>phoQ</i> Forward	ATA TGC TGG CGA GAT GGG AAA ACGG
<i>phoQ</i> Reverse	CCA GCC AGG GAA CAT CAC GCT
<i>rpsL</i> Forward	CCG TGG CGG TCG TGT TAA AGA
<i>rpsL</i> Reverse	GCC GTA CTT GGA GCG AGC CTG

pmrA, *pmrB*, *phoQ*, *phoP* ve *rpsL* genlerinin kantitatif real time PCR çalışması için hazırlanması gereken bir reaksiyonluk master mix miktarı Tablo 2.9’da verilmiştir.

Tablo 2.9. *pmrA*, *pmrB*, *phoQ*, *phoP* ve *rpsL* genlerinin real time PCR çalışması için hazırlanması gereken karışım miktarı.

Komponent	Miktar
SYBR Green master mix	5 µl
Primer F	0,5 µl
Primer R	0,5 µl
RNase/DNase içermeyen steril su	1,5 µl
Toplam	7,5 µl

Her bir örnek için toplam reaksiyon hacmi 10 µl olarak belirlenmiştir. RNA’lardan sentezlenen 500ng içeren cDNA’ların hacmi, 1/5 oranında sulandırılarak 100 ng’a eşitlendi (4µl RNA + 16µl su). Plate kuyucuklarına 7,5 µl master mix üzerine, 2,5 µl cDNA eklenerek kuyucuklardaki son hacim 10 µl’ye tamamlandı ve plate kapatıcı ile kapatıldı. StepOnePlus Real-Time PCR System cihazı kullanılarak Tablo 2.10’daki kantitatif real time PCR protokolü doğrultusunda çalışılma gerçekleştirildi.

Tablo 2.10. *pmrA*, *pmrB*, *phoQ*, *phoP* ve *rpsL* genleri için kantitatif real time PCR çalışma protokolü.

Aşama	Döngü sayısı	Süre	Sıcaklık
Enzim Aktivasyonu	1 siklus	10 dakika	95° C
Amplifikasyon	40 siklus	15 saniye	95°C
		1 dakika	60°C
		30 saniye	72°C
Melting	1 siklus	15 saniye	95°C
		1 dakika	60°C (+0,3 °C)

PCR işlemi sonucunda hedef gen (*pmrA*, *pmrB*, *phoQ* ve *phoP*) ve referans gen (*rpsL*) Ct değerleri analiz edildi. Çalışmaya dahil edilen bütün örnekler için erime eğrisi analizleri yapıldı, erime eğrileri birbirine uymayan kuyucuklardaki örnekler tekrar çalışmaya dahil edildi. Elde edilen gen ekspresyon düzeyleri Livak ve ark.'nın (Livak, 2001) belirttiği şekilde C_T Mean, ΔC_T Mean, $\Delta\Delta C_T$, $2^{-\Delta\Delta C_T}$ değerleri tek tek hesaplanarak değerlendirildi ve sonuçların istatistiksel değerlendirmesi yapıldı.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde *pmrA*, *pmrB*, *phoQ* ve *phoP* genleri için SPSS 22.0 software (Chicago, ABD) programı ile t-test yöntemi kullanıldı. İstatistiksel olarak $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edildi.

3. BULGULAR

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli servislerden gönderilen klinik örneklerden izole edilen, *Enterobacteriaceae* ailesine ait kolistin dirençli 40 *K. pneumoniae* izolatı çalışma kapsamına alındı. Çalışmamız *Enterobacteriaceae* suşlarının dahil edileceği şekilde planlandı ve proje bu yönde hazırlanarak etik kurul onayı alındı. Ancak suşların arşivlendiği bu süre içerisinde laboratuvarımıza gönderilen klinik örneklerden planlanan çalışmaya uygun olarak (kolistin dirençli izolat) sadece *K.pneumoniae* suşları izole edilmiştir. Bu yüzden kontrol grubu olarak kolistine duyarlı 8 adet, dirençli 40 adet *K. pneumoniae* suşu çalışmaya dahil edildi.

K. pneumoniae izolatlarının izole edildikleri klinik örneklerin dağılımı Tablo 3.1'de verilmiştir.

Tablo 3.1. *K. pneumoniae* izolatlarının klinik örneklere göre dağılımı

Klinik Örnek	Sayı	%
İdrar kültürü	12	25
Kan kültürü	10	20,8
Trakeal aspirat kültürü	10	20,8
Yara kültürü	8	16,6
Katater kültürü	4	8,3
Balgam kültürü	4	8,3

Çalışmamızda kullandığımız *K.pneumoniae* izolatlarının gönderildikleri kliniklere göre dağılımı Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. *K.pneumoniae* izolatlarının gönderildiği servislerin dağılımı

Klinikler	Sayı	%
Anesteziyoloji ve Reanimasyon	16	33,3
Yoğun Bakım Ünitesi	9	18,9
Palyatif Bakım Ünitesi	4	8,4
Dahiliye	4	8,4
Beyin Cerrahisi	3	6,2
Genel Cerrahi	3	6,2
Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	2	4,2
Plastik ve Rekonstruktif Cerrahi	2	4,2
Nöroloji	2	4,2
Kadın Hastalıkları	1	2
Kalp ve Damar Cerrahi	1	2
Diğer Cerrahi Servisler	1	2
Toplam	48	100

Bu çalışmaya dahil edilen kolistine dirençli *K. pneumoniae* kökenlerinin fenotipik direnç sonuçları Tablo 3.3’de, kolistine duyarlı *K. pneumoniae* kökenlerinin fenotipik duyarlılık testleri ile alınan sonuçlar ise Tablo 3.4’te gösterilmiştir.

Tablo 3.3. Kolistin dirençli *K. pneumoniae* suşlarının fenotipik direnç sonuçları

Örnek (n=40)	VITEK 2		Gradient Strip Test (MIC)	
	MİK	Yorum	MİK	Yorum
Suş No: 1.	≥16	R*	3	R*
Suş No: 2.	≥16	R	3	R
Suş No: 3.	≥16	R	3	R
Suş No: 4.	≥16	R	6	R
Suş No: 5.	≥16	R	3	R
Suş No: 6.	≥16	R	8	R
Suş No: 7.	≥16	R	4	R
Suş No: 8.	≥16	R	4	R
Suş No: 9.	≥16	R	4	R
Suş No: 10.	≥16	R	4	R

Suş No: 11.	≥16	R	4	R
Suş No: 12.	≥16	R	4	R
Suş No: 13.	≥16	R	6	R
Suş No: 14.	≥16	R	3	R
Suş No: 15.	≥16	R	3	R
Suş No: 16.	≥16	R	4	R
Suş No: 17.	≥16	R	8	R
Suş No: 18.	≥16	R	8	R
Suş No: 19.	≥16	R	3	R
Suş No: 20.	8	R	3	R
Suş No: 21.	8	R	3	R
Suş No: 22.	≥16	R	6	R
Suş No: 23.	≥16	R	6	R
Suş No: 24.	≥16	R	4	R
Suş No: 25.	8	R	4	R
Suş No: 26.	≥16	R	4	R
Suş No: 27.	≥16	R	3	R
Suş No: 28.	≥16	R	8	R
Suş No: 29.	≥16	R	8	R
Suş No: 30.	≥16	R	3	R
Suş No: 31.	≥16	R	3	R
Suş No: 32.	≥16	R	3	R
Suş No: 33.	≥16	R	3	R
Suş No: 34.	≥16	R	3	R
Suş No: 35.	≥16	R	4	R
Suş No: 36.	≥16	R	4	R
Suş No: 37.	≥16	R	3	R
Suş No: 38.	≥16	R	4	R
Suş No: 39.	≥16	R	4	R
Suş No: 40.	≥16	R	6	R

R: dirençli

Tablo 3.4. Kolistin duyarlı *K.pneumoniae* suşlarının fenotipik duyarlılık sonuçları

Örnek (n=8)	VITEK 2		Gradient Strip Test (MIC)	
	MİK	Yorum	MİK	Yorum
Kp 1.	≤0,5	S*	1	S*
Kp 2.	≤0,5	S	2	S
Kp 3.	≤0,5	S	2	S
Kp 4.	≤0,5	S	1	S
Kp 5.	≤0,5	S	0,75	S
Kp 6.	≤0,5	S	1	S
Kp 7.	≤0,5	S	2	S

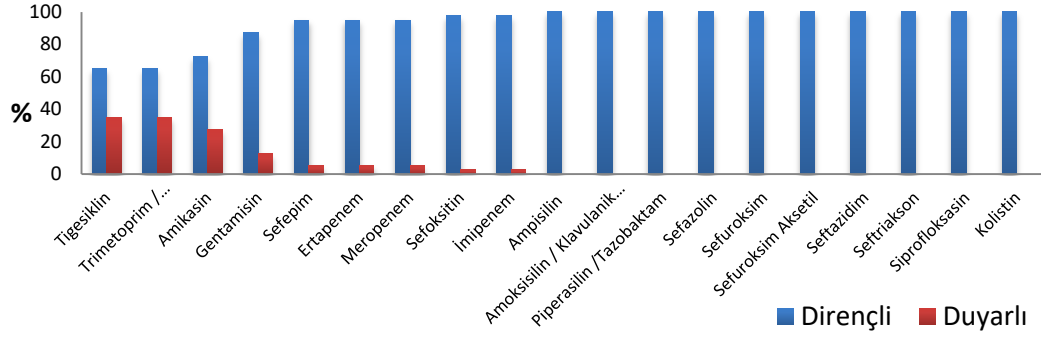
ATCC 700603	2	S	0,75	S
--------------------	---	---	------	---

S: duyarlı

K. pneumoniae suşlarının duyarlılıkları VITEK 2 (BioMérieux, ABD) otomatize sistemi ile saptandı. Dirençli suşlar E test metodu ile doğrulandı. Çalışmaya alınan izolatların antibiyotik direnç profili Tablo 3.5 ve Şekil 3.5’te verilmiştir.

Tablo 3.5. *K. pneumoniae* suşlarının antimikrobiyal direnç oranları

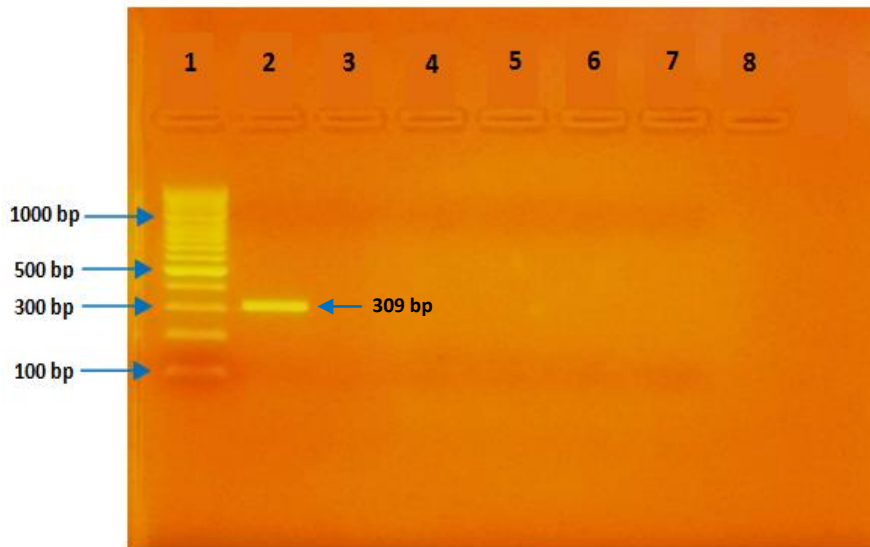
Antibiyotik	Dirençli Suş Sayısı	%
Ampisilin	40	100
Amoksisilin / Klavulanik Asit	40	100
Piperasilin /Tazobaktam	40	100
Sefazolin	40	100
Sefuroksim	40	100
Sefuroksim Aksetil	40	100
Sefoksitin	39	97,5
Seftazidim	40	100
Seftriakson	40	100
Sefepim	38	95
Ertapenem	38	95
Meropenem	38	95
İmipenem	39	97,5
Amikasin	29	72,5
Gentamisin	35	87,5
Siprofloksasin	40	100
Tigesiklin	26	65
Kolistin	40	100
Trimetoprim / Sülfametaksazol	26	65



Şekil 3.5. *K. pneumoniae* suşlarının antibiyotik direnç oranları

3.1. Direncin Moleküler Temelinin Araştırılması

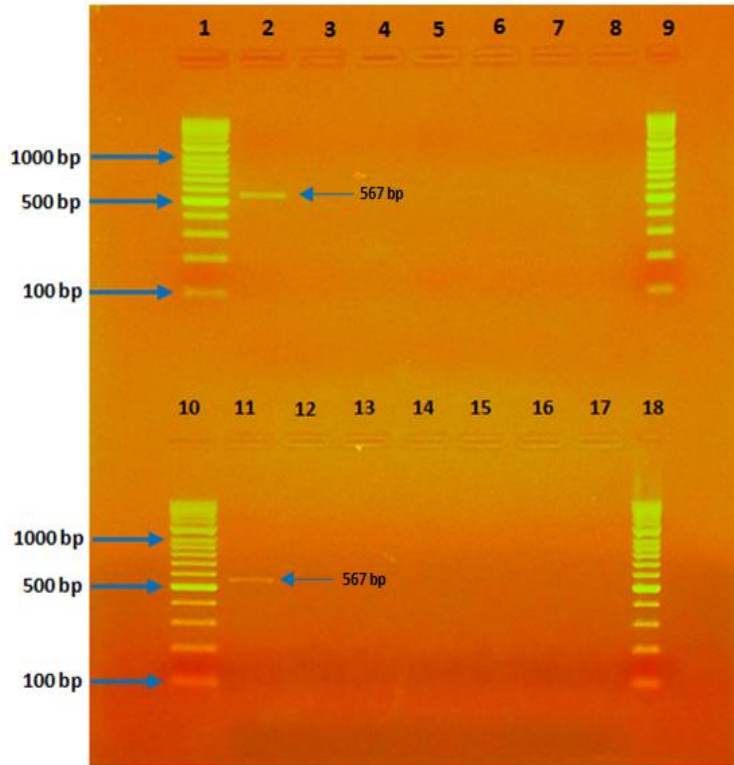
Bu çalışmada Kolistin direncinden sorumlu mekanizmaları araştırmak için dirençli 40, duyarlı 8 *K. pneumoniae* kökeni çalışmaya dahil edildi, plazmid aracılı direnç genlerinin (*mcr-1*, *mcr-2*) varlığı PCR ile incelendi. Moleküler çalışmalarda *E.coli* NTCC 13846 *mcr-1* suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı. İncelemelerimiz sonucunda *K. pneumoniae* kökenlerinin hiçbirinde *mcr-1* varlığına rastlanmadı (Şekil 3.6).



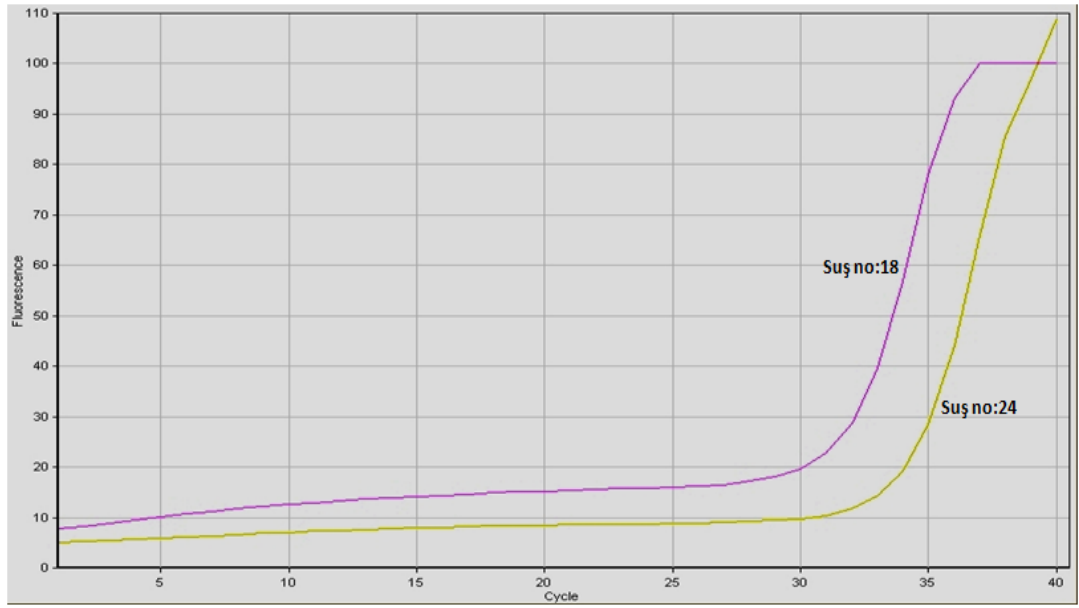
Şekil 3.6. *mcr-1* geni taşıyan (*E. coli* NTCC 13846) pozitif kontrol izolatına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (Hat 1: 100bp DNA ladder (Genesta, GeneAll); Hat 2: *mcr-1* gen

bölgesi pozitif kontrol (309bp); Hat 3-7: çalışmaya dahil edilen *K. pneumoniae* suşları; Hat 8: Negatif kontrol).

Çalışmamızda 2 adet bakteri suşunda (Suş no: 18 ve 24) *mcr-2* geni pozitif olarak tespit edildi. Pozitif suşların agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve real time PCR grafiği şekil 3.7 ve şekil 3.8’de gösterildi.



Şekil 3.7. *mcr-2* geni taşıyan izolata ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü (Hat 1-9 ve Hat 10-18: 100bp DNA ladder (Genesta, GeneAll); Hat 2 ve 11: *mcr-2* pozitif *K. pneumoniae* izolatları (Suş No:18 ve 24) (567bp); Hat 3-7 ve Hat 12-16: *mcr-2* negatif *K. pneumoniae* izolatları; Hat 8 ve 17: Negatif kontrol).



Şekil 3.8. *mcr-2* gen bölgesine ait real time PCR sonuçları.

Kolistin direncinden sorumlu olduğu düşünülen *pmrA*, *pmrB*, *phoP* ve *phoQ* genlerinin ekspresyon seviyelerindeki artış incelendi. Çalışmamızda, kolistine dirençli kökenlerdeki ekspresyon seviyeleri, kolistine duyarlı kökenler ile karşılaştırıldı. *pmrA*, *pmrB*, *phoP* ve *phoQ* genlerinin ekspresyon düzeyleri aykırı değer analizi sonrası ortalama $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplandı, istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanamadı.

Sonuçların istatistiksel değerlendirilmesinde SPSS 22.0 software (Chicago, ABD) programı ile t-test yöntemi kullanılarak yapıldı. İstatistiksel olarak $p \leq 0,05$ anlamlı kabul edildi.

Gen ekspresyon sonuçları Tablo 3.6 – Tablo 3.9’da, duyarlı ve dirençli izolatların ortalama değerleri ise Tablo 3.10’da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. *K. pneumoniae* izolatlarının *pmrA* gen bölgesi ekspresyon analizi sonuçları.

Örnek	<i>rpsL</i> Geni	<i>pmrA</i> Geni	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Suş No: 1.	16,82	23,04	0,2
Suş No: 2.	17,98	24,36	0,2
Suş No: 3.	16,68	28,77	0,0
Suş No: 4.	17,55	26,41	0,0
Suş No: 5.	17,83	26	0,0
Suş No: 6.	19,35	25,96	0,1
Suş No: 7.	17,2	24,62	0,1
Suş No: 8.	20,06	27,08	0,1
Suş No: 9.	17,89	26,94	0,0
Suş No: 10.	17,39	24,04	0,1
Suş No: 11.	25,53	25,5	13,1*
Suş No: 12.	20,59	29,79	0,0
Suş No: 13.	18,68	27,8	0,0
Suş No: 14.	19,31	21,9	2,1
Suş No: 15.	22,04	29,72	0,1
Suş No: 16.	20,84	27,94	0,1
Suş No: 17.	22,37	28,5	0,2
Suş No: 18.	20,67	27,95	0,1
Suş No: 19.	19,14	28,87	0,0
Suş No: 20.	18,45	26,47	0,0
Suş No: 21.	19,51	25,5	0,2
Suş No: 22.	17,3	26,42	0,0
Suş No: 23.	18,58	27,72	0,0
Suş No: 24.	20,01	27,07	0,1
Suş No: 25.	20,07	26,36	0,2
Suş No: 26.	18,5	23,72	0,3
Suş No: 27.	18,94	24,8	0,2
Suş No: 28.	18,78	25,26	0,1
Suş No: 29.	18,81	25,88	0,1
Suş No: 30.	20,17	25,68	0,3
Suş No: 31.	18,17	25,48	0,1
Suş No: 32.	19,93	25,8	0,2

Suş No: 33.	21,82	26,29	0,6
Suş No: 34.	21,05	28,06	0,1
Suş No: 35.	20,53	29,97	0,0
Suş No: 36.	21,39	27	0,3
Suş No: 37.	17,93	28,09	0,0
Suş No: 38.	20,83	29,12	0,0
Suş No: 39.	21,97	28,38	0,2
Suş No: 40.	19,8	26,42	0,1
Kp 1.	20,67	24,87	0,7
Kp 2.	21,17	22,5	5,1*
Kp 3.	21,37	26,07	0,5
Kp 4.	21,32	26,69	0,3
Kp 5.	19,79	20,49	7,9*
Kp 6.	19,59	22,67	1,5
Kp 7.	20,08	26,74	0,1
ATCC 700603	21,35	24,73	1,2

* : Örneklerin sonuçları aykırı değer analizi doğrultusunda istatistiksel değerlendirmeden çıkarılmıştır.

Tablo 3.7. *K. pneumoniae* izolatlarının *pmrB* gen bölgesi ekspresyon analizi sonuçları.

Örnek	<i>rpsL</i> Geni	<i>pmrB</i> Geni	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Suş No: 1.	16,82	21,1	0,1
Suş No: 2.	17,98	22,44	0,1
Suş No: 3.	16,68	24,32	0,0
Suş No: 4.	17,55	21,46	0,1
Suş No: 5.	17,83	21,72	0,1
Suş No: 6.	19,35	22,17	0,2
Suş No: 7.	17,2	21,05	0,1
Suş No: 8.	20,06	34,21	0,0
Suş No: 9.	17,89	23,53	0,0
Suş No: 10.	17,39	20,48	0,2
Suş No: 11.	25,53	21,81	19,1*
Suş No: 12.	20,59	25,52	0,0

Suş No: 13.	18,68	23,9	0,0
Suş No: 14.	19,31	20,9	0,5
Suş No: 15.	22,04	25,39	0,1
Suş No: 16.	20,84	24,26	0,1
Suş No: 17.	22,37	33,03	0,0
Suş No: 18.	20,67	23,09	0,3
Suş No: 19.	19,14	23,9	0,1
Suş No: 20.	18,45	22,58	0,1
Suş No: 21.	19,51	21,95	0,3
Suş No: 22.	17,3	22,6	0,0
Suş No: 23.	18,58	23,3	0,1
Suş No: 24.	20,01	22,93	0,2
Suş No: 25.	20,07	21,59	0,5
Suş No: 26.	18,5	20,21	0,4
Suş No: 27.	18,94	20,94	0,4
Suş No: 28.	18,78	21,47	0,2
Suş No: 29.	18,81	21,91	0,2
Suş No: 30.	20,17	21,75	0,5
Suş No: 31.	18,17	21,95	0,1
Suş No: 32.	19,93	22,22	0,3
Suş No: 33.	21,82	22,43	0,9
Suş No: 34.	21,05	23,9	0,2
Suş No: 35.	20,53	25,75	0,0
Suş No: 36.	21,39	22,99	0,5
Suş No: 37.	17,93	23,43	0,0
Suş No: 38.	20,83	24,75	0,1
Suş No: 39.	21,97	24,34	0,3
Suş No: 40.	19,8	22,59	0,2
Kp 1.	20,67	20,74	1,4
Kp 2.	21,17	31,73	1,4
Kp 3.	21,37	22,8	0,5
Kp 4.	21,32	23,64	0,3
Kp 5.	19,79	16,75	11,9*
Kp 6.	19,59	20,34	0,9

Kp 7.	20,08	22,96	0,2
ATCC 700603	21,35	20,68	2,3

* : Örneklerin sonuçları aykırı değer analizi doğrultusunda istatistiksel değerlendirmeden çıkarılmıştır.

Tablo 3.8. *K. pneumoniae* izolatlarının *phoP* gen bölgesi ekspresyon analizi sonuçları.

Örnek	<i>rpsL</i> Geni	<i>phoP</i> Geni	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Suş No: 1.	16,82	36,4	0,0
Suş No: 2.	17,98	35,5	0,1
Suş No: 3.	16,68	34,54	0,1
Suş No: 4.	17,55	35,6	0,1
Suş No: 5.	17,83	33,96	0,3
Suş No: 6.	19,35	37,8	0,1
Suş No: 7.	17,2	35,39	0,1
Suş No: 8.	20,06	35,4	0,5
Suş No: 9.	17,89	36,9	0,0
Suş No: 10.	17,39	34,75	0,1
Suş No: 11.	25,53	33,4	96,2*
Suş No: 12.	20,59	_**	_**
Suş No: 13.	18,68	34,24	0,5
Suş No: 14.	19,31	34,11	0,8
Suş No: 15.	22,04	35,44	2,1
Suş No: 16.	20,84	34,59	1,6
Suş No: 17.	22,37	38,2	0,4
Suş No: 18.	20,67	38,64	0,1
Suş No: 19.	19,14	34,5	0,5
Suş No: 20.	18,45	36,2	0,1
Suş No: 21.	19,51	36,66	0,2
Suş No: 22.	17,3	34,42	0,2
Suş No: 23.	18,58	34,64	0,3
Suş No: 24.	20,01	34,23	1,2
Suş No: 25.	20,07	35,8	0,5
Suş No: 26.	18,5	34,14	0,4

Suş No: 27.	18,94	33,49	0,9
Suş No: 28.	18,78	32,94	1,2
Suş No: 29.	18,81	33,84	0,7
Suş No: 30.	20,17	34,82	0,9
Suş No: 31.	18,17	._**	1,0
Suş No: 32.	19,93	34,51	1,0
Suş No: 33.	21,82	39,1	0,1
Suş No: 34.	21,05	34,17	2,5
Suş No: 35.	20,53	36,5	0,3
Suş No: 36.	21,39	34,31	3,0
Suş No: 37.	17,93	33,3	0,5
Suş No: 38.	20,83	33,96	2,5
Suş No: 39.	21,97	34,7	3,3
Suş No: 40.	19,8	33,43	1,8
Kp 1.	20,67	34,02	2,1
Kp 2.	21,17	34,17	2,7
Kp 3.	21,37	33,8	4,1*
Kp 4.	21,32	34,44	2,5
Kp 5.	19,79	38,01	0,1
Kp 6.	19,59	33,53	1,4
Kp 7.	20,08	-	-
ATCC 700603	21,35	38,5	0,155

* : Örneklerin sonuçları aykırı değer analizi doğrultusunda istatistiksel değerlendirmeden çıkarılmıştır.

** : Ekspresyon düzeyi saptanamadı.

Tablo 3.9. *K. pneumoniae* izolatlarının *phoQ* gen bölgesi ekspresyon analizi sonuçları.

Örnek	<i>rpsL</i> Geni	<i>phoQ</i> Geni	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
Suş No: 1.	16,82	21,91	0,1
Suş No: 2.	17,98	19,63	0,9
Suş No: 3.	16,68	22,3	0,1
Suş No: 4.	17,55	19,43	0,8
Suş No: 5.	17,83	20,14	0,6
Suş No: 6.	19,35	20,98	0,9

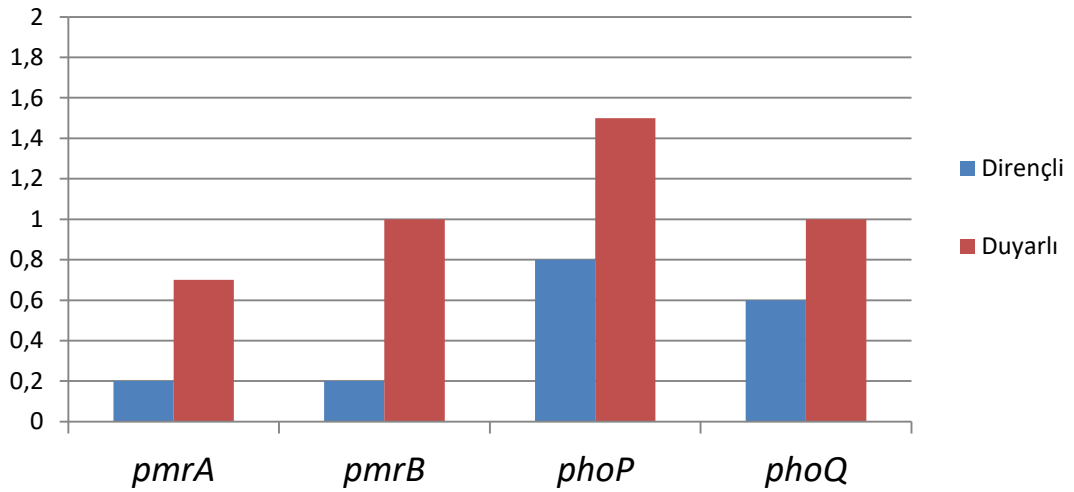
Suş No: 7.	17,2	19,52	0,6
Suş No: 8.	20,06	23,93	0,2
Suş No: 9.	17,89	21,94	0,2
Suş No: 10.	17,39	19,71	0,6
Suş No: 11.	25,53	22,39	25,4*
Suş No: 12.	20,59	24,85	0,2
Suş No: 13.	18,68	23,73	0,1
Suş No: 14.	19,31	18,22	6,1
Suş No: 15.	22,04	24,5	0,5
Suş No: 16.	20,84	23,62	0,4
Suş No: 17.	22,37	24,08	0,9
Suş No: 18.	20,67	22,67	0,7
Suş No: 19.	19,14	27,62	0,0
Suş No: 20.	18,45	20,35	0,8
Suş No: 21.	19,51	20,68	1,3
Suş No: 22.	17,3	21,24	0,2
Suş No: 23.	18,58	22,63	0,2
Suş No: 24.	20,01	25,24	0,1
Suş No: 25.	20,07	21,86	0,8
Suş No: 26.	18,5	20,26	0,9
Suş No: 27.	18,94	21,34	0,5
Suş No: 28.	18,78	21,37	0,5
Suş No: 29.	18,81	21,75	0,4
Suş No: 30.	20,17	22,99	0,4
Suş No: 31.	18,17	21,67	0,3
Suş No: 32.	19,93	22,22	0,6
Suş No: 33.	21,82	22,55	1,7
Suş No: 34.	21,05	23,53	0,5
Suş No: 35.	20,53	24,58	0,2
Suş No: 36.	21,39	24,62	0,3
Suş No: 37.	17,93	23,52	0,1
Suş No: 38.	20,83	23,77	0,4
Suş No: 39.	21,97	24,21	0,6
Suş No: 40.	19,8	23,44	0,2

Kp 1.	20,67	22,08	1,1
Kp 2.	21,17	23,01	0,8
Kp 3.	21,37	23,1	0,9
Kp 4.	21,32	23,14	0,8
Kp 5.	19,79	20,07	2,4*
Kp 6.	19,59	20,48	1,6
Kp 7.	20,08	23,54	0,3
ATCC 700603	21,35	22,14	1,7

*Örneklerin sonuçları aykırı değer analizi doğrultusunda istatistiksel değerlendirmeden çıkarılmıştır.

Tablo 3.10. Kolistine duyarlı (S) ve dirençli (R) kökenlerin ekspresyon düzeyleri araştırılan genler için aykırı değer analizi sonrası ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.

	<i>pmrA</i>	<i>pmrB</i>	<i>phoP</i>	<i>phoQ</i>
Direnç Ortalaması	0,2	0,2	0,8	0,6
Duyarlı Ortalaması	0,7	1	1,5	1
R/S Ortalaması	0,5	0,6	1,2	0,8



Şekil 3.9. Kolistine duyarlı ve dirençli suşların *pmrA*, *pmrB*, *phoP* ve *phoQ* genleri için tespit edilen ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri.

4. TARTIŞMA

Antimikrobiyal direnç (AMR), bir bakteri suşunun normal olarak büyümesini durduran veya ilaçlara karşı dayanmalarını sağlayan antibiyotiklere karşı direnç gösterdiğinde tanımlanır. Son 2 yılda, dünyada ESBL üreten patojenler, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) ve NDM üreten bakteriler gibi ilaca dirençli ve yaygın olarak da çok ilaca dirençli *Mycobacterium tuberculosis* (MDR, XDR-MTB), MBL üreten bakterilerin ortaya çıkışıyla dünya genelinde çeşitli antimikrobiyal ajanlara dirençli patojenler ortaya çıkmıştır. Bu izolatların mevcut tedavi rejimi ile tedavisi neredeyse imkansızdır (Ventola, 2015). AMR, 1940 yılında doğal bakteri işlemlerinden sonra ilk antibiyotik olan “penisilin” in keşfedilmesiyle ortaya çıktı. Kuşkusuz, bazı bakteri suşlarına direnç sağlayan genler milyonlarca yıl önce yani antibiyotiklerden önce ortaya çıktı (Read, 2014).

Günümüzde AMR, dünya çapında aşırı finansal yüke, hastanede kalma süresini uzatan ve hatta ölümcül sonuçlara neden olabilen, ayrıca antibiyotiklerin aşırı ve yanlış doz kullanımı sonucu ortaya çıkmıştır (Viswanathan, 2012). Antibiyotiklere dirençli patojenler, hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde morbidite ve mortalitenin ana nedenlerinden biridir. Yayınlanan verilere göre, dünya genelinde her yıl antimikrobiyal ajanlara dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar nedeniyle yaklaşık 700.000 kişi ölmekte ve verilerin çoğu yetersiz raporlama ve süveyans çalışmaları nedeniyle hala rapor edilememektedir (de Kraker 2016). Öte yandan, Center for Disease Control and Prevention (CDC) verilerine göre dirençli bakteriler nedeniyle her yıl 2 milyondan fazla kişi enfekte olmaktadır ve 23.000’den fazla ölüm gerçekleşmektedir (Lim, 2016).

Benzer şekilde, Hindistan’da yapılan bir çalışmada, yılda 60.000 yenidoğanın dirençli bakteri enfeksiyonları nedeniyle öldüğünü tespit etmişlerdir (Laxminarayan, 2013). Aynı şekilde, 2009 yılında Pakistan’da yapılan bir araştırmada yeni doğanların %40’ının MDR patojenleri (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*) nedeniyle öldüğü belirtilmiştir (Hannan, 2013). Pakistan’dan bir başka araştırmada, 78 kan örneğinden izole edilen MDR-*Acinetobacter* spp.’nin neden olduğu enfeksiyonda 37

hastanın öldüğü raporlanmıştır (Saleem, 2009). Qamar ve arkadaşları, Pakistan İslamabad'da yaptıkları araştırmada, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ye bağlı NDM-1 pozitif izolatları nedeniyle her 9 çocuktan 4'ünün öldüğünü bildirmiştir (Qamar, 2015).

En yüksek ölüm oranı, gelişmiş ülkelere kıyasla gelişmekte olan ülkelerde çoğunlukla immün sistemi baskılanmış kişilerde bildirilmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde hastanelerdeki başlıca risk faktörleri; sağlık çalışanlarının zayıf hijyenik uygulamaları, antibiyotiklerin kontrolsüz kullanımı, hastane dışı patojenler, hastanelerin aşırı kalabalık olması, ameliyathanelerin kötü durumudur (Qamar 2014). Her yıl, dünyadaki antimikrobiyal dirence bağlı enfeksiyonların oranını azaltmak için milyonlarca dolar harcanmaktadır. Avrupa Birliği, sadece Avrupa'daki yaklaşık 23.000 ölümden sorumlu olan dirençli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonların üstesinden gelmek için yılda yaklaşık 1,5 milyar Avro yatırım yapmaktadır (Davies, 2013). Bununla birlikte, Amerika Birleşik Devletleri her yıl antibiyotik direncine bağlı enfeksiyonu olan 20 milyon hastayı tedavi etmek için 20 milyar doların üzerinde harcama yapmaktadır (Hampton, 2013).

K. pneumoniae ile enfeksiyonlar özellikle hastanelerde, erken doğan bebeklerin ve bağışıklık sistemi bozulmuş, şeker hastalığı veya aşırı alkol tüketimi olan ve yoğun tıbbi bakım alan hastalar gibi hassas kişiler arasında görülür. En yaygın olanı idrar ve solunum yolu enfeksiyonları ve yeni doğanlarda kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır (World, 2014). Güçlü ve ark'nın 126 karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatını dahil ederek yaptığı çalışmada en sık solunum örneklerinden (%31), sonrasında da idrar (%29,4) ve kan kültürlerinden (%20,6) izole edildikleri görülmüştür (Doktora Tezi. 2017). Akbulut ve ark'nın yaptığı çalışmada klinik tiplerine göre izole edilen *K. pneumoniae* incelendiğinde en sık bakteri izolasyonunun idrar (%66.62)'da olduğu görülürken, bunu sırasıyla yara yeri sürüntüsü (%7.2), kan (%7), solunum sekresyonları (%5.8), vajinal sürüntü (%4.1), batın bölgesi örnekleri (%1.4), steril sıvılar (%1), apse sürüntüsü (%0.7) ve diğer örnekler (%6.1) olduğu görülmüştür (Akbulut, 2017).

Bizim çalışmamızda *K.pneumoniae* suşlarında en sık idrar kültürü (%25), kan kültürü (%20,8), trakeal aspirat kültürü (%20,8) ve yara kültürü (%16,6) izole edilmiştir (Tablo 4.1).

Antibiyotik direnç profilleri incelendiğinde Bayram G. ve ark'nın yaptığı çalışmada 108 *E. coli* suşunun, seftazidime 107 (%99.1)'sinin, seftriaksona 106 (%98.2)'sının ve sefepime 108 (%100)'ünün dirençli olduğu tespit edilmiştir. İmipenem ve meropeneme dirençli suş bulunmamıştır, amikaside 4 (%3.7), gentamisine 58 (%53.7), siprofloksasin ve levofloksasine 59 (%54.6), trimetoprim-sülfametoksazole 74 (%68.5)'ü dirençli olarak bulunmuştur. *K. pneumoniae* suşları incelendiğinde ise; 23 suş içerisinde sefoksitine 12 (%52.2)'si, seftazidim, seftriakson ve sefepime yirmi üç (%100)'ü, imipenem 1 (%4.4)'i ve meropenem 1 (%4.4)'i, diğer antibiyotiklerden ise amikaside 4 (%17.4)'ü, gentamisine 13 (%59.5)'ü, siprofloksasin ve levofloksasine 15 (%65.2)'i ve trimetoprim-sülfametoksazole 11 (%47.8)'i dirençli olarak tespit edilmiştir (Bayram, 2016).

Şafak B. ve ark'nın 2016 yılında yaptıkları çalışmada amikaside %33,4, seftazidime %81,5, siprofloksasine %50, gentamisine %48,3, seftriaksona %83,7, imipenem %38,2, meropenem %41,1, trimetoprim-sülfametoksazole %54,6, oranında direnç saptanmıştır (Şafak, 2016).

Yezli S. ve ark'nın bildirdiği çalışmaya göre amikaside %100, seftazidime %61,3, siprofloksasine %42, gentamisine %55, seftriaksona %59, imipenem %8,7, meropenem %3, trimetoprim-sülfametoksazole %29 oranında direnç bildirilmiştir (Yezli, 2014).

Hollanda'da yapılan bir çalışmada *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarının en duyarlı oldukları antibiyotikler imipenem (%100-99.6) ve penisilinlerden piperasilin-tazobaktam (%94.9-87.4) iken, sefalosporinlerden, *E.coli* için sefepim (%94.9) ve *Klebsiella* spp. için sefoksitin (%98.6-95.6) duyarlı bulunmuştur (Nijssen, 2004).

Ariffin ve ark. geniş spektrumlu antibiyotik alan pediatrik hastalar üzerinde yaptıkları araştırmada MIC yöntemi ile en çok *Klebsiella* spp. (%36.5) izole edilmiş. *Klebsiella* spp. ve *E.coli* suşlarının genelinde seftazidim (%50), sefotaksim (%52) ve seftriakson (%50)'a yüksek oranda direnç saptanırken, imipenem (%100) ve amikasin (%96) duyarlı bulunmuştur. (Ariffin, 2004)

Çalışmamızda izole ettiğimiz *K.pneumoniae* kökenlerinin antimikrobiyal ajanlara göre direnç oranları incelendiğinde; en etkili antibiyotikler tigesiklin (%65) ve trimetoprim sülfametaksazol (%65) olarak tespit edilirken karbapenem direncinin > %95 olduğu görülmektedir (Tablo 4.5).

1990'lardan bu yana farklı antibiyotik gruplarına karşı bakterilerin direnç göstermesi nedeniyle mortalite oranları giderek artmaktadır. Günümüzde, birçok bakteriyel patojen, özellikle de *K. pneumoniae*, çeşitli antibiyotiklere yapısal olarak direnç göstermektedir. Bunun yanı sıra plazmid aracılı genler ve kromozomal genler ile antimikrobiyal direnç kazanırlar ve kodlarlar (Tenover, 2006). Son on yılda, karbapenemlere dirençli Enterobacteriaceae (CRE) özellikle yoğun bakım ünitelerinde, hastane enfeksiyonlarından sorumlu en önemli patojenlerden biri haline gelmiştir. CRE, aminoglikozidler, florokinolonlar, sefalosporinler ve karbapenemler gibi çoklu antibiyotik direnci gösteren bakterilere karşı tedavinin seçilmesi giderek zor hale gelmiştir. Geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteleri olan polimiksinlere ait olan kolistin (polimiksin E), CRE'in neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için kullanılabilecek son seçenek antimikrobiyal ajanlardan biri olmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) son derece önemli antibiyotikler listesinde kolistine yer vermiştir (Falagas, 2005).

Dünya genelinde artan CRE prevalansı, özellikle İtalya ve Yunanistan gibi CRE'nin endemik olduğu ülkelerde, polimiksin direncinin artmasına neden olmuş ve kolistin kullanımını arttırmıştır (Kontopidou, 2014; Kontopidou, 2011; Neonakis, 2010; Rojas, 2017; Venditti, 2017).

Dünya genelinde farklı referans yöntemlerinin kullanıldığı çalışmalarda birbirinden farklı sonuçlar bildirilmiştir. Rojas ve ark.'nın 2011- 2014 yılları arasında gerçekleştirdiği çalışmada, *K. pneumoniae*'da kolistin duyarlılığı 246 hastada araştırılmış ve % 13 oranında kolistin direnci saptanmıştır. Bu çalışma sonucuna göre kolistin dirençli *K. pneumoniae* enfeksiyonları yüksek mortalite ile ilişkilendirilmiştir (Rojas, 2017).

Ülkemizde, Kahraman ve ark.'nın retrospektif olarak yaptıkları çalışmada, kök hücre nakli yapılan hastalarda nakil sırasında gelişen enfeksiyonlardan 2012-2018 yılları arasında izole edilen karbapenem dirençli *K. pneumoniae* izolatlarının % 20'sinin kolistin dirençli olduğunu tespit edilmiştir (Kahraman, 2018).

Arabacı ve ark.'nın 2018 yılında otomatize sistem ile anitibiyotik duyarlılığın tespit edildiği 57 *K.pneumoniae* izolatını dahil ettikleri çalışmada ise kolistin direnci % 60 olarak bulunmuştur (Arabacı, 2018).

Kolistin, dirençli kökenlerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan önemli antimikrobiyal ajanlardan biridir (Öncül, 2012). 2015 yılının sonlarına kadar bildirilen polimiksin direnç mekanizmaları genellikle özgül iki bileşenli düzenleyici sistemlerini kodlayan genlerde mutasyonlara neden olan mekanizmalar ile kontrol edilen kromozomal genler kaynaklıydı (Miller, 2011). 2016 yılında Liu ve ark., (Liu, 2016)'nın yaptıkları çalışmada hayvan örnekleri üzerinden izole ettikleri bir *E. coli* suşunda, plazmid tarafından kodlanan *mcr-1* geninin kolistin direncinden sorumlu olduğunu bildirmişlerdir. İlk olarak 2016 yılında Belçika'dan bildirilen *mcr-2* ise, *mcr-1* ile nükleotit dizi benzerliği yüksek olan bir diğer plazmid aracılı direnç genidir. (Xavier, 2016; SARI, Ayşe Nur, ve ark, 2017).

Kolistin direnci, bütün Enterobacteriaceae üyesi bakterilerde giderek artan ve tehlike arz eden bir durum teşkil etmektedir. Webb HE. ve ark.'nın 2016 yılında yapmış oldukları çalışmada 8684 Salmonella suşu *mcr-1* varlığı açısından incelenmiş ve 4 adet suş pozitif bulunmuştur (Webb, 2016). Srijan A. ve ark.'nın Tayland'da 2017 yılında yaptıkları çalışmada 118 çok ilaca dirençli Enterobacteriaceae (74 *E.*

coli, 39 *K. pneumoniae*, 3 *Proteus mirabilis*, 1 *Enterobacter aerogenes* ve 1 *Enterobacter cloacae*) üyesinde 2 adet *K.pneumoniae* izolatında *mcr-1* genini pozitif bulmuşlardır (Srijan, 2018).

Zaki MES. ve ark'nın Mısır'da 2018 yılında yapmış oldukları çalışmaya 50 Enterobacteriaceae suşunu dahil etmişlerdir. MIC > 2 mg/L olan kolistin dirençli izolatların dahil edildiği bu çalışmada *mcr-1* ve *mcr-2* geni araştırılmıştır. PCR ile yapılan çalışmada 1 *E.coli*, 1 *K.pneumoniae* suşunda *mcr-1* geni pozitif olarak tespit edilmiştir. Zaki MES ve ark'nın bu çalışmalarında *mcr-2* geni saptanamamıştır (Zaki, 2018).

Dalmolin ve ark'nın 2018 yılında Brezilya'da karbapenem dirençli suşlarda KPC-2 gen bölgesini araştırdıkları çalışmada kolistin direncinden sorumlu plazmid aracılı *mcr-1* gen bölgesine de bakmışlardır. Bir *K.pneumoniae* suşunda *mcr-1* geni bulmuşlardır. Bu bulgular, hem *mcr-1* hem de KPC-2 taşıyan *K.pneumoniae* izolatlarının, antimikrobiyal tedaviye ciddi bir tehdit olarak ortaya çıkabileceğini vurgulamaktadır. (Dalmolin, 2018).

Çalışmamıza çeşitli kliniklerden izole edilen kolistin dirençli 40 *K. pneumoniae* suşu dahil edilmiştir. Tüm PCR çalışmaları sonucunda pozitif kontrol izolatında *mcr-1* gen bölgesi için 309 baz çifti (bp) beklenen bant büyüklüğü elde edilmiştir. Real time PCR ile plazmid aracılı gen varlığını araştırdığımız çalışmamızda *mcr-1* geni tespit edilememiştir.

Xavier ve ark'nın 2016 yılında Belçika'da kolistin dirençli *E.coli* suşları ile yaptıkları bir çalışmada *mcr-1* geni negatif bulunmuş ancak, *mcr-1*'den 9 baz daha kısa olacak şekilde 1617 bp uzunluğunda ve *mcr-1* ile %76,75 sekans uyumu gösteren *mcr-2* geni tanımlanmıştır. (Xavier, 2016).

Toplam 2049 Enterobacteriaceae izolatının dahil edildiği Liassine N. ve ark'nın, 2016 yılında yaptıkları çalışmada suş dağılımları şöyledir; *E. coli* (n=1704),

K. pneumoniae (n=151), *Proteus mirabilis* (n=73), *Citrobacter spp.* (n=32), *Klebsiella oxytoca* (n=22), *Enterobacter cloacae* (n =18), *Morganella morganii* (n=13), *Enterobacter aerogenes* (n=15), *Proteus vulgaris* (n=7), *Serratia spp.* (n=7), *Providencia rettgeri* (n=3), *Salmonella group D* (n=2), *Hafnia alvei* (n=1) ve *Kluyvera ascorbata* (n=1). İsviçre'deki bu çalışmada *mcr-2* ve *mcr-1* gen bölgeleri araştırılmıştır. Bir tane *E.coli* suşunda *mcr-1* pozitif olarak tespit edilirken *mcr-2* genine sahip herhangi bir suş bulunamamıştır. (Liassine, 2016).

Garcia-Graells C. ve ark'nın 2018 yılında Belçika'da 105 *Salmonella* suşunda yaptıkları sürveyans çalışmasında suşların 2'si *mcr-1* ve 1'i *mcr-2* pozitif olarak bulunmuştur (Garcia-Graells, 2018). Rhouma M., ve ark'nın Tunus'da 2018 yılında develerde yapmış oldukları çalışmada *mcr-1* ve *mcr-2* geni araştırmışlardır. Her iki gen de bu çalışmada tespit edilememiştir (Rhouma, 2018).

Çalışmamızdaki suşların izole edildiği örnek tipleri kan, beyin omurilik sıvısı, intraabdominal sıvı, kateter ucu, yara, trakeal sekresyon, balgam ve idrar örnekleridir. Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlarda *mcr-2* gen bölgesi de PCR yöntemiyle araştırılmıştır. İki adet kolistin dirençli *K.pneumoniae* izolatında *mcr-2* geni tespit edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlandığı tarih itibarıyla kolistin direncinden sorumlu olduğu düşünülen plazmid aracılı genler ile ilgili Türkiye'den yapılmış bildirim bulunmamakla birlikte; bu çalışma ülkemizden kolistin dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında *mcr-2* gen bölgesinin varlığının ortaya konulduğu ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Günümüzde hızla gelişen bir mobil kolistin direnci (*mcr*) ailesi enziminin ortaya çıkması ve hızlı bir şekilde yayılması, kolistin klinikte son seçenek olarak kullanılıyor olmasını tehdit etmektedir (Mendelson, 2018). Dünya genelinde *mcr* gen bölgesinin ilk tanımlanmasından bu yana, son 3 yılda *mcr* ailesine ait yedi farklı üye (*mcr-2* - *mcr-8*) tespit edilmiştir (Wang, 2018; Zhang, 2019). Bu gen bölgeleri içerisinde en yaygın olanı, yedi kıtanın altısında, yaklaşık 50 ülkede tespit edilen *mcr-1*'dir (Mendelson, 2018). *mcr-1*'de görülen heterojenik farklılığa benzer şekilde *mcr-3*'te 10'dan fazla genetik değişkenlik içeren varyasyonlar (*mcr-3.1* ile *mcr-*

3.12) mevcuttur (Yin, 2017; Kieffer, 2018). Bu nedenle, *mcr* ailesinin iki ana üyesinin (*mcr-1* ve *mcr-3*) şu ana kadar bilinmeyen bazı evrimsel seçimlerden geçtiği varsayılmaktadır. *mcr* ailesinde nadir olarak görülen diğer beş üyeden (*mcr-2*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-8*) farklı olarak, *mcr-4* orta derecede genetik heterojeniteye (*mcr-4.1*, *mcr-4.2* [Q331R], *mcr-4.3*, *mcr-4.4* [H205N&Q331R], *mcr-4.5* [P110L&Q331R] ve *mcr-4.6* [V236F] sahiptir (Zhang, 2019). Açıkça görülüyor ki, *mcr* ailesinde görülen bu heterojenite karmaşıklığı ve çeşitliliği, klinik kullanımda kolistin etkisiz hale getirilmesini arttırmaktadır.

Plazmid aracılı tüm direnç mekanizmaları gibi, *mcr-1* ve *mcr-2* genleri de kolay ve hızlı yayılarak, kolistin direncinde hızlı artışa sebep olma potansiyallerinden dolayı tüm dünyada endişe yaratmaktadır. Çalışmamıza dahil edilen izolatlarımızın tümü klinik izolatlardan oluşmaktadır. *mcr-1* ya da *mcr-2*'nin tespit edildiği klinik izolatlar ile yapılan çalışmaların çoğunda, bu izolatların kaynağı belirlenememiş olmasına rağmen, direnç genlerinin daha çok hayvanlarda görüldüğü unutulmamalıdır. Bu çalışmanın ileri aşamasında hayvandan insana geçiş sürecinin takip edilerek daha fazla suş ve farklı mobil genlerin araştırılmasına yönelik çalışmalar önerilmektedir.

İran'da 2017 yılında Haeili M. ve ark'nın *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrK* ve *pmrC* kromozomal gen bölgelerine ait ekspresyon düzeyi ve plazmid aracılı dirençten sorumlu *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3* ve *mcr-4* gen bölgelerinin varlığı araştırılmıştır. Kolistin dirençli *K. pneumoniae* kökenlerinin hiç birinde plazmid gen varlığına rastlanmamıştır. Ancak kromozomal genlerdeki ekspresyon artışının kolistin direnci ile ilişkili olduğu bu çalışmada belirtilmiştir (Haeili, 2017).

K. pneumoniae izolatlarında kolistin direncine neden olan mekanizmaların araştırıldığı çalışmalar incelendiğinde, genel olarak sorumlu mekanizmanın kromozomal genler üzerinde kodlanan *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* gibi hücre membranı üzerinde etkili regülatuar sistemlerde gerçekleşen mutasyonlar sonucunda kolistin hedef bölgesi olan lipopolisakkarit tabakanın modifikasyonu olduğu tespit edilmiştir (Olaitan, 2014).

Kim S.J ve ark'nın 2018 yılında yaptıkları çalışmada *K.pneumoniae* suşlarında *pmrA*, *pmrB*, *phoP*, *phoQ* ve *pmrD* gen bölgelerinin ekspresyon düzeyleri incelenmiştir. Bu çalışmada bizim çalışmamıza benzer olarak *pmrA*, *pmrB*, *phoP* ve *phoQ* genleri için tespit edilen ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerlerinde anlamlı bir artış tespit edilemezken *pmrD* gen bölgesinde dirençli suşların duyarlı suşlara oranla ekspresyon düzeylerinde anlamlı bir artış görülmüştür (Kim, 2018).

Jayol, A ve ark'ları yaptıkları çalışmada kantitatif real time PCR (qRT-PCR), kullanarak *pmrC*, *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *pmrE* ve *pmrK* genlerinin ekspresyon düzeylerini analiz etmişlerdir. Çalışmada kontrol geni olarak *rpsL* gen bölgesi incelenmiştir. Dirençli gen bölgelerine ait veriler $2^{-\Delta\Delta CT}$ formülü kullanılarak *rpsL* kontrol geni ve duyarlı izolatlar ile karşılaştırıldı. Nispi ortalama incelendiğinde, *pmrC* için 170 kat, *pmrA* ve *pmrB* için 70 kat ve *pmrK* için 40 kat artış olduğu görülmüşken, *pmrD* ve *pmrE* (sırasıyla, 1.9 ve 1.4 kat artış) gen bölgelerinin ekspresyon seviyelerinde anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Jayol, 2014).

Cheng, Y.H ve ark'nın Tayvan'da 2015 yılında 26 kolistin dirençli ve 8 kolistin duyarlı suşta *pmrH* ekspresyonunu RT-qPCR yöntemi ile araştırmışlardır. Bu çalışmada, kolistin duyarlı suşlara karşı RNA ekspresyonundaki nispi kat değişimi, $2^{-\Delta\Delta CT}$ 'ye göre hesaplanmıştır. Buna göre kolistine dirençli suşların % 88,5'inin (23/26) ekspresyon seviyelerinin, kolistine duyarlı suşlardan anlamlı derecede daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca başka bir gen olan *pmrK* ifadesi de aynı suşlarda ölçülmüştür. Üç suşta *pmrH* genine benzer şekilde *pmrK* geninde de ekspresyon gözlenmiştir. Ancak bu üç suşun sadece ikisinde ekspresyon düzeyi kolistine duyarlı suşlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (Cheng, 2015).

Hong Y.K. ve ark'nın 51 kolistin dirençli, 5 kolistin duyarlı *Enterobacter cloacae* izolatını dahil ettikleri çalışmada *phoQ* ve *pmrB* gen ekspresyon düzeyleri ölçülmüştür. RT-qPCR sonuçlarına göre, kolistine dirençli izolatların, kolistine duyarlı izolatlarla kıyasla anlamlı derecede yüksek bir fark tespit edilememiştir (Hong, 2019).

Ülkemizde 2018 yılında 20 kolistin dirençli, 20 kolistin duyarlı *K.pneumoniae* suş ile yapılan çalışmada plazmid kökenli *mcr-1* ve *mcr-2* gen bölgelerinin varlığı ve *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *pmrK*, *phoP* ve *phoQ* kromozomal gen bölgelerine ait ekspresyon düzeyleri araştırılmıştır. *mcr-1* ve *mcr-2* genlerini barındıran plazmidlerin varlığı bu çalışmada saptanamamıştır. Ancak kolistin direnci ile ilişkili olduğu düşünülen *pmrA*, *pmrB*, *pmrD*, *pmrK*, *phoP* ve *phoQ* gen bölgelerinin ekspresyonlarında anlamlı dercede artış saptanmıştır (Borsa, 2018).

Çalışmamızda, *phoP*, *phoQ*, *pmrA* ve *pmrB*'nin mRNA ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu ile ölçülmüştür. Kolistine dirençli kökenlerdeki ekspresyon düzeyleri kolistine duyarlı kökenler ile karşılaştırılmış ve *pmrA*, *pmrB*, *phoP* ve *phoQ* ekspresyon düzeyleri aykırı değer analizi sonrası ortalama $2^{-\Delta\Delta C_t}$ değerleri hesaplanmıştır. Gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanamamıştır. Bu konuya ilişkin Türkiye’de henüz araştırmalar çok sınırlı sayıdadır. Klinikte son seçenek olarak kullanılan kolistin antibiyotiğine karşı gelişen direnç mekanizmalarının ortaya konulması ülkemizde antibiyotik direncinin kontrol altına alınması açısından önem arz etmektedir. Dolayısıyla kolistin direncinden sorumlu tutulan diğer kromozomal genlerin (çalışmamıza dahil etmediğimiz) ekspresyon düzeylerinin ileri çalışmalarda ele alınmasını önermekteyiz.

Kromozomal genlerdeki mutasyonun direnç mekanizması günümüzde kesin olarak bütünüyle açıklanamamakla birlikte, kromozomal dirençten sorumlu tutulan ikili bileşen sistem (*pmrA/B*, *phoP/Q*) genlerini regüle eden mutasyon genlerinin varlığı araştırılmalı ve gen ekspresyonu dışında bu genlerdeki dizi analizine bakılarak sekanslama yapılmalıdır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

- 1.Çoklu ilaç direnci olan Gram negatif bakterilerde kolistin duyarlılığı mutlaka çalışılmalıdır ve temel enfeksiyon kontrol önlemlerine mutlaka dikkat edilmelidir.
- 2.Çalışmamızda *K. pneumoniae* suşlarında en sık idrar kültürü (%25), kan kültürü (%20,8), trakeal aspirat kültürü (%20,8) ve yara kültürü (%16,6) izole edilmiştir.
- 3.İzole ettiğimiz *K. pneumoniae* kökenlerinin antimikrobiyal ajanlara göre direnç oranları incelendiğinde; en etkili antibiyotikler tigesiklin (%65) ve trimetoprim /sülfametaksazol (%65) olarak tespit edilirken, karbapenem direncinin > %95 olduğu görülmektedir.
- 4.Kolistin direncinden sorumlu mekanizmaları araştırmak için dirençli 40, duyarlı 8 *K. pneumoniae* kökeni bu çalışmaya dahil edilmiş ve plazmid aracılı direnç genlerinin (*mcr-1*, *mcr-2*) varlığı PCR ile incelenmiştir. İncelemelerimiz sonucunda *K. pneumoniae* kökenlerinin hiçbirinde *mcr-1* varlığına rastlanmamıştır. Çalışmamızda 2 adet bakteri suşunda ise *mcr-2* geni pozitif olarak tespit edilmiştir.
- 5.*mcr-1* ya da *mcr-2*'nin tespit edildiği klinik izolatlar ile yapılan çalışmaların çoğunda, bu izolatların kaynağı belirlenememiş olmasına rağmen, direnç genlerinin daha çok hayvanlarda görüldüğü unutulmamalıdır. Bu çalışmanın ileri aşamasında hayvandan insana geçiş sürecinin takip edilerek daha fazla suş ile çalışılmasını önermekteyiz.
- 6.Kolistine dirençli kökenlerdeki ekspresyon düzeyleri kolistine duyarlı kökenler ile karşılaştırılmış ve *pmrA*, *pmrB*, *phoP* ve *phoQ* ekspresyon düzeyleri aykırı değer analizi sonrası ortalama $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değerleri hesaplanmıştır. Gen ekspresyonlarında istatistiksel olarak anlamlı bir artış saptanmamıştır.
- 7.Günümüzde insan ve hayvan sağlığında klinik amaçlı kullanılan mevcut bilinen tüm antibiyotiklere karşı bakterilerde direnç gelişimleri bildirilmektedir. Antibiyotik direnci tüm dünyayı ilgilendiren ve sadece bu günü değil geleceği de etkileyen çok önemli bir sorun olarak görülmektedir.

8.Antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin kontrol altına alınabilmesi için antibiyotikler kısıtlı ve dönüşümlü olarak kullanılmalı, antibiyotik kullanımı eğitimi verilmeli, ilaç firmaları denetlenmeli, antibiyogram yaparak doğru antibiyotik seçilmeli, antibiyotiklere karşı direnç durumu belirlenmelidir.

9.Dünyanın herhangi bir bölgesinde ortaya çıkan antibiyotik direnci sorunu çok kısa süre içinde tüm dünyayı kapsayan global bir boyuta ulaşmaktadır. Bu nedenle, antibiyotik direncinin önlenmesi konusunda ulusal ve dünya çapında çalışmaların yapılması ve bu çalışmalar doğrultusunda tüm dünyada eş zamanlı olarak yasal düzenlemelerin yapılma gerekliliği önem arz etmektedir.



ÖZET

Enterobacteriaceae Üyelerinde Plazmid Aracılı (*mcr-1*, *mcr-2*) ve Kromozomal Kolistin Direnç Genleri (*PhoP/PhoQ*, *PmrA/ PmrB*) Varlıklarının Araştırılması

Çoklu ilaç direnci gösteren Gram negatif bakterilerin global yükselişi, hasta güvenliği için artan bir tehdit oluşturmaktadır. Son dekatta, karbapenemlere dirençli Enterobacteriaceae (CRE) hastane enfeksiyonlarında, özellikle yoğun bakım ünitelerindeki en önemli patojenlerden biri olmuştur. CRE, aminoglikozitler, florokinolonlar, sefalosporinler ve karbapenemler gibi çoklu antibiyotik direnci gösteren bakterilere karşı tedavinin seçilmesinde sorun yaratmaktadır. Geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteleri olan polimiksinlere ait olan kolistin, CRE'in neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için kullanılabilecek son seçenek antimikrobiyal ajanlardan biri olmuştur. Kolistin kullanılmasıyla birlikte kolistin dirençli bakteri prevalansının da arttığı görülmektedir. Birçok bakteriyel patojen, özellikle de *K. pneumoniae*, çeşitli antibiyotiklere yapısal olarak direnç göstermektedir. 2015 yılına kadar, polimiksin dirençli genlerin kromozomal ikibileşenli sistemler *pmrA/pmrB*, *phoP/phoQ* ve negatif düzenleyici *mgrB* geninin kodlanması aracılığı ile olduğu bilinmekteydi. Ancak Kasım 2015'te ilk plazmid aracılı kolistin direnç geni *mcr-1* tanımlanmıştır. 2016'da *mcr-1* geninin hayvanlardan insanlara bulaştığı tespit edilmiş ve takip eden süreçte diğer *mcr* genlerinin varlıklarının ortaya konulması ve hızla yayılması soruna farklı bir boyut kazandırmıştır. Direncin önlenmesinde, bir antibiyotiğe karşı geliştirilen direncin doğru tanımlanması ve moleküler mekanizmaların bilinmesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada, Enterobacteriaceae üyelerinde plazmid aracılı *mcr-1* ve *mcr-2* ile kromozomal kaynaklı direnç genlerinin (*phoP/phoQ*, *pmrA/pmrB*) varlıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen izolatlarda *pmrA*, *pmrB*, *phoP* ve *phoQ* genlerinin ekspresyon seviyelerinde, dirençli suşlarda duyarlı suşlara oranla anlamlı bir artış saptanmamıştır. Bunun yanı sıra plazmit aracılı direnç mekanizmalarından olan *mcr-1* geni varlığına rastanmamışken, 2 adet *K.pneumoniae* suşunda ise *mcr-2* geni tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Klebsiella pneumoniae*, kolistin, *mcr-1*, *mcr-2*, *pmrA/B*, *phoP/Q*

SUMMARY

Investigation of Existence of Plasmid-mediated (*mcr-1*, *mcr-2*) and Chromosomal Colistin Resistance Genes (*PhoP/PhoQ*, *PmrA/PmrB*) in Members of Enterobacteriaceae

The global rise of multi-drug resistance Gram-negative bacteria is an increasing threat to patients. In the last decade, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) has become one of the most important pathogens in nosocomial infections, especially in intensive care units. CRE poses a problem in the selection of treatment against multiple antibiotic resistance bacteria such as aminoglycosides, fluoroquinolones, cephalosporins and carbapenems. Colistin, which belongs to polymyxins with broad spectrum antimicrobial activities, has been one of the last options antimicrobial agents for the treatment of CRE-mediated infections. The prevalence of colistin-resistant bacteria increased with the use of colistin. Many bacterial pathogens, particularly *K. pneumoniae*, are structurally resistant to a variety of antibiotics. Until 2015, polymyxin-resistant genes were known to be encoded by chromosomal two-component systems *pmrA* / *pmrB*, *phoP* / *phoQ* and the negative regulatory *mgrB* gene. However, in November 2015, the first plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* was identified. In 2016, the *mcr-1* gene was found to be transmitted from animals to humans, and in the following process, the presence and rapid spread of the presence of other *mcr* genes gave a different dimension to the problem. In the prevention of resistance, it is very important to define the resistance developed against an antibiotic and to know the molecular mechanisms. The aim of this study was to investigate the presence of plasmid-mediated *mcr-1* and *mcr-2* and chromosomal resistance genes (*phoP/phoQ*, *pmrA/pmrB*) in Enterobacteriaceae members. There was no significant increase in expression levels of *pmrA*, *pmrB*, *phoP* and *phoQ* genes in resistant strains compared to susceptible strains. In addition, *mcr-1* gene, which is one of the plasmid-mediated resistance mechanisms, was not detected, whereas *mcr-2* gene was detected in 2 *K.pneumoniae* strains.

Key Words: *Klebsiella pneumoniae*, colistin, *mcr-1*, *mcr-2*, *pmrA/B*, *phoP/Q*

KAYNAKLAR

- ABRAHAM N, KWON DH. A. (2009). single amino acid substitution in PmrB is associated with polymyxin B resistance in clinical isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol Lett. 298: 249-54.
- AKBULUT RE. (2017).Hastanemizde *Escherichia Coli* Ve *Klebsiella Pneumoniae* Bakterilerinde Karbapenem Direnç Durumu. Doktora Tezi.
- ARABACI Ç, DAL T, BAŞYİĞİT T, GENİŞEL N, DURMAZ R. (4-8 Kasım 2018). Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında karbapenemdirenç mekanizmalarının değerlendirilmesi ve mcr-1 geninin araştırılması. XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya. SS-084.
- ARİFFİN H, NAVARATNAM P, KEE TH, BALAN G (2004). Antibiotic resistance patterns in nosocomial gram negative bacterial infections in units with heavy antimicrobial usage. J Trop Ped. 50: 26-31.
- ARROYO LA, HERRERA CM, FERNANDEZ L, HANKINS JV, TRENT MS, HANCOCK RE. (2011). The pmrCAB operon mediates polymyxin resistance in *Acinetobacter baumannii* ATCC 17978 and clinical isolates through phosphoethanolamine modification of lipid A. Antimicrob Agents Chemothe. 55: 3743-51.
- AYDOĞAN H, BASUSTAOĞLU A. (2000). Nozokomiyal patojen olarak *Klebsiella* türlerinin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri. Hastan Enfeksiyonları Derg. 4: 135- 43.
- BARROW K, KWON DH. (2009). Alterations in two-component regulatory systems of phoPQ and pmrAB are associated with polymyxin B resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 53: 5150-4.
- BASSETTI M, NICOLINI L, ESPOSITO S, RIGHI E, VISCOLI C. (2009). Current status of newer carbapenems. Curr. Med. Chem. 16:564-575.
- BAYRAM G., DELİALİOĞLU, N., EMEKDAŞ, G., ÖZTÜRK, C., & SERİN, M. S. (2016). Enterobacteriaceae Klinik İzolatlarında Beta-Laktamaz ve Kinolon Direnç Genlerinin Araştırılması. FLORA. 21(2), 64-76.
- BİLGEHAN H. (2006). Klinik mikrobiyoloji: Özel bakteriyoloji ve bakteri enfeksiyonları: İzmir: Şafak Matbaacılık.
- BİSWAS S, BRUNEL JM, DUBUS JC, REYNAUD-GAUBERT M, ROLAIN JM. (2012). Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. Expert Rev Anti Infect Ther. 10: 917-34.

- BORSA, B.A. (2017). *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinde kolistin direncinin fenotipik ve moleküler yöntemlerle araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.
- BREMMER DE, BAUER KA, POUCH SM, THOMAS K, SİTH D, GOFF DA, et. al. (2016). Correlation of checkerboard synergy testing with time-kill analysis and clinical outcomes of extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* respiratory infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 60(11): 6892-95.
- CANNATELLI A, D'ANDREA MM, GIANI T, DI PV, ARENA F, AMBRETTI S, et al. (2013). In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. *Antimicrob Agents Chemother.* 57: 5521-6.
- CHENG HY, CHEN YF, PENG HL. (2010). Molecular characterization of the PhoQ- PmrD-PmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *J Biomed.* 17: 60.
- CHENG Y. H., LIN T. L., PAN Y. J., WANG, Y. P., LIN, Y. T., & WANG, J. T. (2015). Colistin resistance mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* strains from Taiwan. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 59(5), 2909-2913.
- COORNAERT A, LU A, MANDIN P, SPRINGER M, GOTTESMAN S, GUILLIER M. (2010). MicA sRNA links the PhoP regulon to cell envelope stress. *Mol Microbiol.* 76:467-79.
- ÇOLAK D. (1999). Antimikrobik ilaçlar ve etki mekanizmaları. İçinde Ustaçelebi Ş, editör. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi. pp. 81-91.
- DAIKOS GL, MARKOGIANNAKIS A. (2011). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect.* 17:1135-41.
- DALMOLIN TV., et al. (2018). "Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil." *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 90.2:132-133.
- DAVIES SC, FOWLER T, WATSON J, LIVERMORE DM, WALKER D. (2013). Annual report of the chief medical officer: Infection and the rise of antimicrobial resistance. *Lancet.* 381:1606-1609.
- DE KRAKER MEA, STEWARDSON AJ, HARBARTH S. (2016). Will 10 million people die a year due to antimicrobial resistance by 2050 ? *PLOS Medicine.* 13: e1002184.

- DONNENBERG MS. (2005). "Enterobacteriaceae" Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2567-2587.
- DURUPINAR B. (2001). Antibiyotiklere dirençte yeni eğilimler. *Klinik Dergi*: 14 (1): 47-55.
- ERDEM B AT, USTAÇ. MUTLU G, İMİR T, CENGİZ LEBİ İ, TÜMBAY E, METE Ö (eds). (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi. 471-515.
- ESSACK SY. (2001). The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases, *Pharmaceutical Research*. 18 (10):1391-1399.
- FALAGAS ME, KASIÁKOU SK. (2005). Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 40(9): 1333-41.
- FALAGAS ME, KASIÁKOU SK. (2006). Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies, *Crit Care*;10(1):R27. <http://dx.doi.org/10.1186/cc3995> PMID:16507149 PMCID:1550802.
- FALAGAS ME, RAFAİLÍDİS Pİ, IOANNÍDOU E. et al. (2009). Colistin therapy for microbiologically documented multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections: a retrospective cohort study of 258 patients, *Int J Antimicrob Agents* 2010;35(2): 194-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.10.005> PMID:20006471.
- FARMER JJ, BOATWRIGHT KD, JANDA JM. (2009). "Enterobacteriaceae: Introduction and Identification" İçinde: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen HJ Landry ML, Pfaller (eds). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th ed. Washington DC: ASM Press. 649–669.
- FARMER JJ, FARMER MK, HOLMES B. (2005). "The Enterobacteriaceae: General Characteristics". İçinde: Borriello SP, Murray RP, Funke G (eds). *Topley and Wilson's Microbiology and Microbial Infections, Bacteriology*, 10th ed. Washington DC: ASM Press. 1317-1360.
- FERNANDEZ L, GOODERHAM WJ, BAİNS M, MCPHEE JB, WİEGAND I, HANCOCK REW. (2010). Adaptive resistance to the "lasthope" antibiotics polymyxin B and colistin in *Pseudomonas aeruginosa* is mediated by the novel two-component regulatory system ParR-ParS *Antimicrob Agents Chemother*. 54: 3372-82.
- GALİMAND M, COURVALİN P, LAMBERT T. (2003). Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae Due to 16SrRNA Methylation. *Antimicrob Agents Chemother*. 47(8): 2565–2571.
- GARCİA-GRAELLS, CRİSTİNA, ET AL. (2018). "Detection of Plasmid-Mediated Colistin Resistance, mcr-1 and mcr-2 Genes, in *Salmonella* spp. Isolated from Food at Retail in Belgium from 2012 to 2015." *Foodborne pathogens and disease*. 15.2. 114-117.

- GAZEL D, ZANAPALIOĞLU GAZEL Ö, AKÇALI A. (2014). Kolistin dirençli *Acinetobacter baumannii* suşlarına vankomisin in-vitro etkisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 44(4): 144-8.
- GRANATA, G., & PETROSİLLO, N. (2017). Resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*: a 4.0 strain?. *Infectious disease reports.* 9(2).
- GUTU AD, SGAMBATI N, STRASBOURGER P, BRANNON MK, JACOBS MA, HAUGEN E, ET AL. (2013). Polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* phoQ mutants is dependent on additional two-component regulatory systems. *Antimicrob Chemother.* 57: 2215.
- GÜÇLÜ AÜ. (2017). Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında blaOXA-48, blaKPC, blaIMP, blaVIM ve blaNDM direnç genlerinin araştırılması. Doktora Tezi.
- GÜLAY Z. (2005). Beta-laktamlara direnç mekanizmaları. İçinde Ulusoy S, editör. *Beta Laktamazlar ve Klinik Önemi.* Bilimsel Tıp Yayınevi. pp. 9-34.
- GÜLAY Z. (2004). ESBL'lerin tanı yöntemleri. Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ.(eds). *Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen Enfeksiyonlar Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar.* Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. syf.13-26.
- GÜR D. (2010). "Enterik Gram Negatif Çomaklar" İçinde: Brooks GF, Carrol CK, Butel JS, Morse SA (eds). *Jawetz, Melnick, Adelberg Tıbbi Mikrobiyoloji.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 249-260.
- HAEİLİ M. et al. (2017). "MgrB alterations mediate colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from Iran." *Frontiers in microbiology.* 8. 2470.
- HAMPTON T. (2013). Report reveals scope of us antibiotic resistance threat. *Journal of the American Medical Association.* 310:1661-1663.
- HANNAN A, QAMAR MU, USMAN M, WAHEED KAI, RAUF K. (2013). Multidrug resistant microorganisms causing neonatal septicaemia: In a tertiary care hospital Lahore, Pakistan. *African Journal of Microbiology Research.* 7:1896-1902.
- HARRİS PN, WEİ JY, SHEN AW, ABDİLE AA, PAYNTER S, HUXLEY RR, PANDEYAN, DOİ Y, HUH K, O'NEAL CS, TALBOT TR, PATERSON DL. (2016). Carbapenems versus alternative antibiotics for the treatment of bloodstream infections caused by *Enterobacter*, *Citrobacter* or *Serratia* species: a systematic review with meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 71(2):296-306.

- HELANDER IM, KATO Y, KILPELAINEN I, KOSTIAINEN R, LINDNER B, NUMMILA K, et al. (1996). Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. *Eur J Biochem.* 237: 272–278.
- HONG, Y. K., & KO K. S. (2019). PmrAB and PhoPQ Variants in Colistin-Resistant *Enterobacter* spp. Isolates in Korea. *Current microbiology.* 1-6.
- JACOBY, G.A. and L.S (2005). Munoz-Price, The new beta-lactamases. *N Engl J Med.* 352(4): p. 380-91.
- JAYOL A., POIREL, L., BRINK, A., VILLEGAS, M. V., YILMAZ, M., & NORDMANN, P. (2014). Resistance to colistin associated with a single amino acid change in protein PmrB among *Klebsiella pneumoniae* isolates of worldwide origin. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 58(8), 4762-4766.
- KAHRAMAN S, ECE G, OCAKCI S, ÇAĞIRGAN S. (4-8Kasım 2018). Hastanemize başvuran hematolojik maligniteli hastalarda allogeneik hematopoetik kök hücre nakli esnasında gelişen enfeksiyonların değerlendirilmesi. XXXVIII Türk Mikrobiyoloji Kongresi. Antalya. SS-040.
- KIEFFER N., NORDMANN, P., MORENO, A. M., MORENO, L. Z., CHABY, R., BRETON, A., et al. (2018). Genetic and functional characterization of an MCR-3-like enzyme-producing *Escherichia coli* isolate recovered from swine in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 62(7), e00278-18.
- KİM S. J., KO K. S. (2018). Diverse genetic alterations responsible for post-exposure colistin resistance in populations of the same strain of *Klebsiella pneumoniae*. *International journal of antimicrobial agents.* 52(3), 425-429.
- KİM SH, JIA W, PARREIRA VR, BISHOP RE, GYLES CL. (2006). Phosphoethanolamine substitution in the lipid A of *Escherichia coli* O157:H7 and its association with PmrC. *Microbiology.* 152, 657-66.
- KİM SY, CHOİ HJ, KO KS. (2014). Differential expression of two- component systems, pmrAB and phoPQ, with different growth phases of *Klebsiella pneumoniae* in the presence or absence of colistin. *Curr.Microbiol.* 69: 37–41.
- KNAPP, K.M., ENLISH, B.K. (2001). Carbapenems. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases.* 12(3): p. 175-185.
- KONTOPIDOU F, GIAMARELLOU H, KATERELOS P, MARAGOS A, KIOUMIS I, TRIKKA-GRAPHAKOS E, VALAKIS C, MALTEZOU HC. (2014). Group of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in intensive care units. A multicenter study on the clinical outcome and treatment of infections caused by

carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients in intensive care units in Greece.

KONTOPÍDOU F, PLACHOURAS D, PAPADOMÍCHELAKÍS E, KOUKOS G, GALANÍ I, POULAKOU G, DÍMOPOULOS G, ANTONÍADOU A, ARMAGANÍDÍS A, GIAMARELLOU H. (2011). The colonization and infection of colistin-resistant Gram-negative bacteria in the cohort of critically ill patients.

KWA A, KASIÁKOU SK, TAM VH et al. (2007). Polymyxin B similarities to and differences from colistin (polymyxin E), *Expert Rev Anti Infect Ther.* 5(6):811-21 <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.5.5.811> PMID:17914915.

LANDRAUD L, BRISSE S. (2010). Enterobacteriaceae. Cohen J, Powderly W, Opal S. (editors). *Infectious Diseases*. Elsevier. Limited: 1690-1703.

LAXMÍNARAYAN R, DUSE A, WATTAL C, ZAÍDÍ AK, WERTHEİM HF, SUMPRADÍT N, et al. (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*.13:1057-1098.

LEBLEBİCİOĞLU H, USLUER G, ULUSOY S. (2008). Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara. 285-329.

LEE CH, TANG YF, SU LH, CHİEN CC, LİU JW, et. al. (2008). Antimicrobial effects of varied combinations of meropenem, sulbactam, and colistin on a multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolate that caused meningitis and bacteremia. *Microbial Drug Resistance*. 14(3): 233-7.

LEE JY, KO S. (2014). Mutations and expression of PmrAB and PhoPQ related with colistin resistance in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 78: 27-6.

LEHMAN D, MAHON C, SUVARNA K. (2007). *Textbook of Diagnostic Microbiology*, 3rd ed St Louis, Saunders Elsevier. 382-409.

LESHO E, YOON EJ, MCGANN P, SNESRUD E, KWAK Y, MİLİLLO M, et al. (2013). Emergence of colistin-resistance in extremely drug-resistant *Acinetobacter baumannii* a novel pmrCAB operon during colistin therapy of wound infections. *J Infect Dis.* 208:1142-51.

Lİ J, TURNİDGE J, MİLNE R. et al. (2001). In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanosulphonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis, *Antimicrob Agents Chemother.* 45(3):781-5.

- LİASSİNE, NADİA, et al. (2016). "Very low prevalence of MCR-1/MCR-2 plasmid-mediated colistin resistance in urinary tract Enterobacteriaceae in Switzerland." *International journal of infectious diseases*. 51 4-5.
- LİM C, TAKAHASHİ E, HONGSUWAN M, WUTHİEKANUN V, THAMLIKİTKUL V, HİNJOY S, et al. (2016). Epidemiology and burden of multidrug-resistant bacterial infection in a developing country. *Life*. 5:e18082.
- LİPPA AM, GOULİAN M. (2009). Feedback inhibition in the PhoQ/PhoP signaling system by a membrane peptide. *PLoS Genet*. 5(12): e1000788.
- LİU YY, WANG Y, WALSH TR, et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 16(2): 161-8.
- LİU YY, WANG Y, WALSH TR, Yİ LX, ZHANG R, SPENCER J et al. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 161-8.
- LİVAK KJ, SCHMİTTGEN TD. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25(4):402-8.
- LİVERMORE DM, WOODFORD N. (2006). The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. *Trends Microbiol*. 14(9): 413-20.
- MACFARLANE EL, KWASNİCKA A, OCHS MM, HANCOCK RE. (2009). PhoP-PhoQ homologues in Pseudomonas aeruginosa regulate expression of the outer-membrane protein OprH and polymyxin B resistance. *Mol Microbiol*. 34: 305-16.
- MATTHAİOU DK, MİCHALOPOULOS A, RAFAİLİDİS PI et al. (2008). Risk factors associated with the isolation of colistin-resistant gram-negative bacteria: a matched case-control study, *Crit Care Med*. 36(3):807-11. <http://dx.doi.org/10.1097/CCM.0B013E3181652FAE> PMID:18431267.
- MCPHEE JB, LEWENZA S, HANCOCK RE. (2003). Cationic antimicrobial peptides activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to B and cationic antimicrobial peptides in Pseudomonas aeruginosa. *Mol Microbiol*. 50: 205-17.
- MEHTA D, SHARMA AK. (2015; 2016). Cephalosporins: A review on imperative class of antibiotics. *Inventi Rapid: Molecular Pharmacology*. (1): 1-6.
- MENDELSON, M., BRİNK, A., GOUWS, J., MBELLE, N., NAİDOO, V., POPLE, T., ...& BOKABA, K. (2018). The One Health stewardship of colistin as an

antibiotic of last resort for human health in South Africa. *The Lancet Infectious Diseases*. 18(9), e288-e294.

MILLER AK, BRANNON MK, STEVENS L, et al. (2011). PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 55(12): 5761-9.

MILLER AK, BRANNON MK, STEVENS L, JOHANSEN HK, SELGRADE SE, MILLER SI, et al. (2011). PhoQ mutations promote lipid A modification and polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*. 55: 5761-9.

MOFFATT JH, HARPER M, HARRISON P, HALE JD, VINOGRADOV E, SEEMANN T, et al. (2010). Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. *Antimicrob Agents Chemother*. 54: 4971-7.

MOON K, GOTTESMAN S. (2009). A PhoQ/P-regulated small RNA regulates sensitivity of *Escherichia coli* to antimicrobial peptides. *Mol Microbiol*. 74: 1314-30.

MOSKOWITZ SM, BRANNON MK, DASGUPTA N, PIER M, SGAMBATI N, MILLER AK, et al. (2012). PmrB mutations promote polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from colistin-treated cystic fibrosis patients. *Antimicrob Agents Chemother*; 56: 1019-30.

MOSKOWITZ SM, ERNST RK, MILLER SI. (2004). PmrAB, a two-component regulatory system of *Pseudomonas aeruginosa* that modulates resistance to cationic antimicrobial peptides and addition of aminoarabinose to lipid A. *J Bacteriol*; 186: 575-9.

NEONAKIS IK, SAMONIS G, MESSARITAKIS H, BARITAKI S, GEORGILADAKIS A, MARAKI S, SPANDIDOS DA. (2010). The resistance of *Klebsiella pneumoniae* and its evolutionary tendency isolate it in a university hospital in Greece: increasing the ineffectiveness of carbapenems and increasing resistance to colistin. *Chemotherapy* : 448 – 452.

NIJSSEN S, FLORIJN A, BONTEN MJM, SCHMITZ FJ, VERHOEF J, FLUIT AC. (2004). Beta lactam susceptibilities and prevalence of ESBL producing isolates among more than 5000 European Enterobacteriaceae isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 24: 585-591.

NIKAIDO H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 67(4): 593-656.

NORDMANN P. (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect*. 44(2):51-6.

- NUMMILA K, KILPELAINEN I, ZAHRIINGER U, VAARA M, HELANDER IM. (1995). Lipopolysaccharides of polymyxin B-resistant mutants of *Escherichia coli* are extensively substituted by 2-aminoethyl pyrophosphate and contain amino arabinose in lipid A. *Mol Microbiol.* 16: 271-8.
- OLAİTAN A.O., MORAND, S., ROLAİN J.M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology.* 5, 643.
- OWUSU-ANİM D, KWON DH. (2012). Differential role of two-component regulatory systems (phoPQ and pmrAB) in polymyxin B susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*. *Adv Microbiol.* 2(1): 1-12.
- ÖNCÜL O. (2012). Kolistin: Endikasyon ve klinik kullanımı. *ANKEM Derg.* 26: 12-18.
- ÖZİNEL MA. TOPCU WILLKE A, SÖYLETİR G, DOGANAY M. (2017). Enterobacteriaceae. Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyoloji. 4. baskı. Nobel Tıp Kitap Evi. 1853-95.
- PACHON-IBANEZ ME, DOCOBO-PEREZ B, LOPEZ-ROJAS R, DOMİNGUEZ-HERRERA J, JİMENEZ-MEJİAS ME, GARCİA-CURİEL A, et. al. (2010). Efficacy of rifampin and its combinations with imipenem, sulbactam, and colistin in experimental models of infection caused by imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 54(3): 1165-72.
- PAPP-WALLACE KM, ENDİMİANİ A, TARACİLA MA, BONOMO RA. (2011). Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob Agents Chemother.* 55(11): 4943–4960.
- PARTRİDGE SR. (2015). Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Pathology.* 47(3):276-84.
- PEREZ, F., EL CHAKHTOURA, N. G., YASMİN, M., & BONOMO, R. A. (2019). Polymyxins: To Combine or Not to Combine?. *Antibiotics.* 8(2), 38.
- PETERSON AA, HANCOCK RE, MCGROARTY EJ. (1985). Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*, *J Bacteriol.* 164(3):1256-61. PMID:2999076 PMCID:219323.
- PRİNCİPE L, AREZZO SD, CAPONE A, PETROSİLLO N, VİSCA P. (2009). In-vitro activity of tigecycline in combination with various antimicrobials against multidrug resistant *Acinetobacter baumannii*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 8(18): 1-10.
- QAMAR MU, HANNAN A, ARSHAD MU, ARSHAD M. (2014). Metallo- β -lactamase producing *Enterobacter cloacae*: An emerging threat in neonates. *African Journal of Microbiology Research.* 8:525-528.

- QAMAR MU, NAHİD F, WALSH TR, KAMRAN R, ZAHRA R. (2015). Prevalence and clinical burden of NDM-1 positive infections in paediatric and neonatal patients in Pakistan. *The Paediatric Infectious Disease Journal*. 34:452-454.
- RAETZ CR, REYNOLDS CM, TRENT MS, BISHOP RE. (2007). Lipid A modification systems in gram-negative bacteria. *Annu Rev Biochem*. 76: 295-329.
- READ AF, WOODS RJ. (2014). Antibiotic resistance management. *Evolution, Medicine, and Public Health*. 147.
- REYNOLDS CM, KALB SR, COTTER RJ, RAETZ CR. (2005). A phosphoethanolamine transferase specific for the outer 3-deoxy-D-manno-octulosonic acid residue of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Identification of the eptB gene and Ca²⁺ hypersensitivity of an eptB deletion mutant. *J Biol Chem*. 280: 21202-11.
- RHOUMA M., et al. (2018). "Screening for fecal presence of colistin-resistant *Escherichia coli* and mcr-1 and mcr-2 genes in camel-calves in southern Tunisia." *Actaveterinaria scandinavica*. 60.1.35.
- ROJAS LJ, SALİM M, COBER E, et al. (2017). Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Laboratory detection and impact on mortality. *Clin Infect Dis*. 64(6):711-8.
- RİCHTER SS, PEREZ F, SALAD RA, KALAYJIAN RC, WATKINS RR, MARSHALL S, RUDİN SD, DOMİTROVİC TN, HUJER AM, HUJER KM, DOI Y, KAYE KS, EVANS S, BONOMO RA, VAN DUİN D. (2017). Antibacterial Resistance Leadership Group.
- SALEEM AF, AHMED I, MİR F, ALİ SR, ZAİDİ AK. (2009). Pan-resistant *Acinetobacter* infection in neonates in Karachi, Pakistan. *Journal of Infection in Developing Countries*.4:30-37.
- SARI, AYŞE NUR, VE ARK. (2017). Ülkemizde klinik Enterobacteriaceae izolatlarında plazmit aracılı kolistin direnç genlerini (mcr-1 ve mcr-2) araştıran çok merkezli çalışmaya ait sonuçlar. *Mikrobiyol Bul*. 51.3 299-303.
- SCHUREK KN, SAMPAIO JL, KIFFER CR, SINTO S, MENDES CM, HANCOCK RE. (2009). Involvement of pmrAB and phoPQ in polymyxin B adaptation and inducible resistance in non-cystic fibrosis clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 53: 4345-51.
- SİEVERT, DM. RİCKS, P. EDWARDS, JR. (2013). Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009–2010. *Infect Control Hosp Epidemiol*. (34)1–14.

- SRIJAN, APICHAİ, et al. (2018). "Genomic characterization of nonclonal mcr-1-positive multidrug-resistant Klebsiella pneumoniae from clinical samples in thailand." Microbial Drug Resistance. 24:4403-410.
- ŞAFAK, B., KILINÇ, O. (2016). 2010-2015 Yılları Arasında Kan Kültürlerinde Üreyen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. Klimik Journal/Klimik Dergisi. 29(2).
- TENOVER FC. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. American Journal of Infection Control 34:3-10; 64-73.
- WINN W JR, ALLEN S, JANDA W, KONEMAN E, PROCOP G, SCHRECKENBERGER P, WOODS G (EDS). (2006). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins. 213.
- THE INDIAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE STUDY GROUP, MATHIA D, RHOMBERG PR, BIEDENBACH DJ, JONES RN. (2002). Evaluation of the in vitro activity of six broad spectrum beta lactam antimicrobial agents tested against recent clinical isolates from India: A survey of ten medical center laboratories. Diagn Microbiol Infect Dis. 44: 367- 377.
- TOPÇU AW., SÖYLETİR G, DOĞANAY M, (1996). Antibakteriyel ilaçlar. Enfeksiyon Hastalıkları. Nobel Tıp Yayınevi. pp.130-43.
- TÖRECİ K., WILLKE TOPÇU A, SÖYLETİR G, DOĞANAY M (EDS). (2002). "Enterobacteriaceae Genel Özellikleri" İçinde:İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri. 1555.
- TUMBARELLO M, VIALE P, VISCOLI C, TRECARICHI EM, TUMIETTO F, MARCHESE A, SPANU T, AMBRETTI S, GINOCCHIO F, CRISTINI F, LOSITO AR, TEDESCHI S, CAUDA R, BASSETTI M. (2012).Predictors of Mortality in Bloodstream Infections Caused by Klebsiella pneumoniae Carbapenemase-Producing K. pneumoniae: Importance of Combination Therapy.
- VENDITTI C, NISII C, D'AREZZO S, VULCANO A, DI CARO A. (2017). Letter to the editor: Overexpression of mcr-1 and mcr-2 genes in carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strains from an Italian hospital. Euro Surveill. 22 (35): pii = 30604 2nd.
- VENTOLA CL. (2015). The antibiotic resistance crisis: Part 1: Causes and threats. P & T: A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management. 40:277-283.
- VIALE P, GIANNELLA M, TEDESCHI S, LEWIS R. (2015). Treatment of MDR-Gram negative infections in the 21st century: A never ending threat for clinicians. Current Opinion in Pharmacology. 24:30-7.

- VISWANATHAN R, SINGH AK, BASU S, CHATTERJEE S, SARDAR S, ISAACS D. (2012). Multi-drug resistant gram negative bacilli causing early neonatal sepsis in India. *Archives of Disease in Childhood Fetal and Neonatal* Edition. 97:182-187.
- QAMAR, M. U., RASOOL, M. H., JAHAN, S., SHAFIQUE, M., & ASLAM, B. (2019). Antimicrobial Resistance. In *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. IntechOpen.
- WANG, X., WANG, Y., ZHOU, Y., LI, J., YIN, W., WANG, S., ...& WANG, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Emerging microbes & infections*. 7(1), 122.
- WEBB HE, GRANIER SA, MARAULT M, MILLEMAN Y, DEN BAKKER HC, et al. (2016). Dissemination of the mcr-1 colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis*. 16: 144-145.
- WINN JR W, ALLEN S, JANDA W, et al. (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Koneman EW (ed). 6th edi.:212-27.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (2014). *Antimicrobial resistance: 2014 global report on surveillance*. World Health Organization.
- XAVIER BB, LAMMENS C, RUHAL R, et al. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, June 2016. *Euro Surveill*. 21(27).
- XAVIER BB, LAMMENS C, RUHAL R, KUMAR-SINGH S, BUTAYE P, GOOSSENS H, et. al. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Euro Surveill*. 21(27): 30280.
- YAHAV D, FARBMAN L, LEIBOVICI L, PAUL M. (2011). Colistin: new lessons on an old antibiotic, *Clin Microbiol Infect* 2012;18(1):18-29. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.03734.x> PMID:22168320.
- YEZLI, S., SHIBL, A. M., LIVERMORE, D. M., MEMISH, Z. A. (2014). Prevalence and antimicrobial resistance among Gram-negative pathogens in Saudi Arabia. *Journal of chemotherapy*. 26(5), 257-272.
- YIN W., LI H., SHEN Y., LIU Z., WANG S., SHEN Z., et al. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio* 8: e00543-17. Doi,10, 00543-17.

ZAKİ MES et.al. (2018). Molecular study of colistin resistant clinical isolates of Enterobacteriaceae species. J Clin Mol Med1: DOI:10.15761/JCMM.1000103.

ZARAKOLU İP. (2016). Enterobacteriaceae. Us AD, Başustaoğlu A, editors. Tıbbi Mikrobiyoloji: Pelikan Yayıncılık. p. 258-72.

ZHANG H., WEI W., HUANG M., UMAR Z., FENG Y. (2019). Definition of a Family of Nonmobile Colistin Resistance (NMCR-1) Determinants Suggests Aquatic Reservoirs for MCR-4. Advanced Science. 1900038.



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Yaşargül ÖZHELVACI

Doğum Yeri ve Tarihi: İzmir/Konak 1989

Yabancı Dili: İngilizce

İletişim (Telefon/e-posta) : 0555 625 36 33 / gul.ozheltaci@gmail.com

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl): Lise: Suphi Koyuncuoğlu Lisesi /2007

Lisans: Afyon Kocatepe Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü / 2012

Yayınları (SCI ve diğer): Yok