

T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE VİRULANS FAKTÖR GENLERİ
İLE BİYOFİLM OLUŞUMLARININ BELİRLENMESİ VE RUMEX GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLÜNÜN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS

Gamze YÜKSEL

ARALIK-2022
GÜMÜŞHANE



T.C.

**GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ ANABİLİM DALI

**KLİNİK GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE VİRULANS FAKTÖR GENLERİ
İLE BİYOFİLM OLUŞUMLARININ BELİRLENMESİ VE RUMEX GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLÜNÜN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**DETERMINATION OF VIRULENCE FACTOR GENES AND BIOFILM
FORMATIONS IN CLINICAL GRAM NEGATIVE BACTERIA AND
INVESTIGATION OF ANTIBIOFILM ACTIVITY OF RUMEX SILVER
NANOPARTICLE**

YÜKSEK LİSANS

Gamze YÜKSEL

**ARALIK-2022
GÜMÜŞHANE**



**T.C.
GÜMÜŞHANE ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

BİYOTEKNOLOJİ DALININ ADI

**KLİNİK GRAM NEGATİF BAKTERİLERDE VİRULANS FAKTÖR GENLERİ
İLE BİYOFİLM OLUŞUMLARININ BELİRLENMESİ VE RUMEX GÜMÜŞ
NANOPARTİKÜLÜNÜN ANTİBİYOFİLM AKTİVİTESİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**DETERMINATION OF VIRULENCE FACTOR GENES AND BIOFILM
FORMATIONS IN CLINICAL GRAM NEGATIVE BACTERIA AND
INVESTIGATION OF ANTIBIOFILM ACTIVITY OF RUMEX SILVER
NANOPARTICLE**

YÜKSEK LİSANS

Gamze YÜKSEL

Danışman: Doç. Dr. Azer ÖZAD DÜZGÜN

**ARALIK-2022
GÜMÜŞHANE**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlamış olduğum **“Klinik Gram Negatif Bakterilerde Virulans Faktör Genleri ile Biyofilm Oluşumlarının Belirlenmesi ve Rumex Gümüş Nanopartikülünün Antibiyofilm Aktivitesinin Araştırılması”** isimli bu tezimin, tamamen kendi çalışmam olduğunu, her alıntıya kaynak gösterdiğimi, alıntı yaptığım tüm çalışmaları kaynakçada belirttiğimi ve Gümüşhane Üniversitesi’nin lisanslı kullanıcısı olduğu intihal yazılım programı ile Lisansüstü Eğitim Enstitüsü’nün belirlediği kıstaslara uygun olarak raporladığımı taahhüt ederim. Tezimin kâğıt ve elektronik kopyalarının Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü arşivinde saklanmasına izin verdiğimi onaylarım.

Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği’nin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

23/12/2022

.....
Gamze YÜKSEL

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans Tezi olarak hazırlanmıştır.

Yüksek Lisans'a başladığım zamandan itibaren dersler ve deneyler boyunca yanımda olan bilgisini ve yardımını esirgemeyen, sayın hocam Doç.Dr. Azer ÖZAD DÜZGÜN'e çok teşekkür ederim. Çalışmada kullanılan klinik izolatin teminini sağlayan Bayburt Devlet Hastanesi yönetimine ve çalışmalarımda desteğini esirgemeyen değerli çalışma arkadaşım Arzu TURHAN'a teşekkür ederim. Hayatım boyunca iyi, kötü ve zor günlerimde her anlamda yanımda bulunan aileme maddi ve manevi destekleri için ayrıca minnettarım. Daima desteklerini arkamda hissettiğim Hatice YÜKSEL'e, babam Mustafa YÜKSEL'e, en yakın arkadaşım olan ve akademik tartışmalarla her zaman bilgi paylaşımında bulunduğum kardeşim Necmi Can YÜKSEL'e bütün içtenliğimle teşekkürlerimi sunarım.

Gamze YÜKSEL
GÜMÜŞHANE – 2022

ÖZET

Çeşitli örneklerden 188 Gram negatif bakteri izole edilmiş ve antibiyotik duyarlılık testleri yapılmıştır. 188 suşta, sınıf 1 integron, virülans ve antibiyotik direnç genlerinin varlığı PCR ile araştırıldı. *bla_{OXA-23}* ve *bla_{OXA-51}* genleri pozitif olan örnekler, pGEM-T vektörüne klonlandı ve plazmitler, DNA dizi analizine gönderildi. Suşların biyofilm oluşturma kapasiteleri ve Rumex gümüş nanopartikülün antibiyofilm etkisi kantitatif olarak belirlendi. İzolatlarda sırasıyla *aer* (%29.78), *sfa* (%28.19), *afa* (%27.12), *cnf* (%21.27), *pap* (%12.76) ve *hly* (%12.76) virülans faktör genleri bulundu. Sınıf 1 integronlar suşlar arasında yüksek oranda (%88.82) tespit edildi. İzolatların %46.27'sinin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlendi. PMQR genleri, 15 izolatta tespit edildi. 16 suşta *bla_{OXA-23}* geni, 19 izolatta ise *bla_{OXA-51}* geni tespit edildi. Bu çalışmada Türkiye'den ilk kez hem *bla_{OXA-23}* hem de *bla_{OXA-51}* genlerini taşıyan klinik *K. oxytoca* izolatu tanımlandı.

Rumex gümüş nanoparçacıklarının (NP'ler), orta ve güçlü biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip farklı izolatlara karşı antibiyofilm aktivitesi gösterdiği ortaya çıktı. NP'ler, 2.66 kat *A. baumannii*'nin, 3.25 kat *K. pneumoniae*'nin ve 1.25 kat *E.coli*'nin biyofilm oluşturma kapasitesini azalttığı gözlemlendi. Mikrobiyal biyofilmin araştırılması, tedavi seçenekleri için yeni stratejiler geliştirmede önemli bir rol oynayabilir. Sonuç olarak, ciddi enfeksiyonlara neden olan antibiyotiğe dirençli Gram negatif patojenlerin tedavi seçeneklerinin sınırlı olması halk sağlığı açısından önemli bir sorun olduğundan, bu patojenlerde antibiyotik direnci, virülans faktör genleri ve biyofilm oluşumunun araştırılması önemlidir.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, Gümüş nanopartiküller *K.oxytoca*, OXA, Virülans faktör geni

SUMMARY

188 Gram-negative bacteria were isolated from various samples and antibiotic susceptibility testing were performed. 188 strains were screened by PCR for class 1 integron, virulence and antibiotic resistance genes. *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} genes positive samples were cloned into the pGEM-T vector and the plasmids were sent for DNA sequence analysis. The biofilm forming capacities of the strains and the antibiofilm effect of Rumex silver nanoparticle were quantitatively determined. Virulence factor genes were found in the isolates *aer* (29.78%), *sfa* (28.19%), *afa* (27.12%), *cnf* (21.27%), *pap* (12.76%) and *hly* (12.76%), respectively. Class 1 integron was detected high rate (88.82%) among strains. The observed that 46.27% of the isolates had the ability to form biofilms. PMQR genes were detected 15 strains. *bla*_{OXA-23} gene was detected in 16 and *bla*_{OXA-51} gene in 19 isolates. In this study, clinical isolate *K. oxytoca* carrying both *bla*_{OXA-23} and *bla*_{OXA-51} genes was identified first time from Turkey.

Rumex silver nanoparticles (NPs) were revealed to exhibit antibiofilm activity against different isolates with moderate and strong biofilm-forming ability. The NPs reduced the biofilm-forming capacity of *A. baumannii* and *K. pneumoniae* by 2.66-fold and 3.25-fold, whereas they decreased the *E. coli* biofilm-forming capacity by 1.25-fold. The investigation of microbial biofilm could play an important role in developing new strategies for treatment options. In conclusion since the limited treatment options of antibiotic-resistant Gram-negative pathogens that cause serious infections are an important problem in terms of public health it is important to investigate antibiotic resistance, virulence factor genes and biofilm formation in these pathogens.

Keywords: Biofilm, Silver nanoparticles *K. oxytoca*, OXA, Virulence factor gene

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI.....	IV
TEŞEKKÜR.....	V
ÖZET.....	VI
SUMMARY	VII
İÇİNDEKİLER	VIII
TABLolar DİZİNİ	X
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	XII
1. GENEL BİLGİLER	1
1.1. Giriş.....	1
1.1.1. Gram Negatif Bakteriler.....	1
1.1.2. Etiyoloji.....	3
1.1.3. Epidemiyoloji.....	4
1.1.4. Gram Negatif Bakterilerde Antimikrobiyal Direnç	4
1.1.4.1. Antibiyotik Direncinin Sonuçları.....	8
1.2. Biyofilm	9
1.2.1. Biyofilm Oluşumu.....	9
1.2.2. Biyofilm Oluşumunda EPS'nin Rolü	10
1.2.3. Biyofilm Aracılı Bakteriyel Enfeksiyonlar	11
1.2.4. Persister hücreler	11
1.3. Gümüş Nanoparçacıklar.....	13
1.3.1. Gümüş Nanopartiküllerin Antibakteriyel Özellikleri.....	14
1.3.2. Nanogümüşün Biyofilm Üzerindeki Etkisi.....	18
2. YAPILAN ÇALIŞMALAR	20
2.1. Materyal	20
2.1.1. Alet ve Ekipmanlar	20
2.1.2. Kimyasallar, Enzimler, Vektörler ve Kitler	21
2.1.3. Besiyerlerinin Hazırlanması.....	21
2.1.4. Çözeltiler ve Tampon Solüsyonlarının Hazırlanışı	21
2.2. Yöntem.....	22
2.2.1. Gram Negatif Bakteri İzolatının Temini ve Antibiyotik Dirençliliği	

Tanımlanması.....	22
2.2.2. İzolatların Stoklanması	22
2.2.3. Genomik DNA izolasyonu:.....	22
2.2.4. Antibiyotik direnç genleri, Virülans Faktör Genleri ve Sınıf 1 İntegronların Tespiti.....	23
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme.....	23
2.2.6. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması	23
2.2.7. PCR Sonucunda Pozitif Çıkan <i>bla</i> _{OXA-23} ve <i>bla</i> _{OXA-51} genlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması.....	23
2.2.8. Plazmid İzolasyonu	24
2.2.9. Mikrodilüsyon yöntemi ile Rumex Gümüş Nanopartiküllerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi:	24
2.2.10. Biyofilm oluşumunun kantitatif tayini:.....	24
2.2.11. Rumex gümüş nanoparçacıklarının biyofilm oluşumuna etkisi:.....	25
3. BULGULAR.....	26
3.1. İzolatların Temini ve Tanımlanması	26
3.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları	26
3.2.1. Virülans Genlerinin Belirlenmesi	28
3.2.2. Sınıf 1 İntegronların PCR ile Belirlenmesi	31
3.2.3. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi	32
3.2.4. Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi	33
3.2.5. Rumex Gümüş Nanoparçacıkların Biyofilm Oluşumuna Etkisi.....	34
4. TARTIŞMA	36
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	41
5.1. Tez Çalışması Sonuçları.....	41
5.2. Öneriler	41
KAYNAKÇA.....	43
ÖZGEÇMİŞ	58

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. Suşların antibiyotik direnç profilleri.....	27
Tablo 2. Virülans faktör gen dağılımı.....	29
Tablo 3. Virülans faktör gen paternleri.....	30
Tablo 4. Sınıf 1 integron taşıyan izolatlar.....	31
Tablo 5. Suşların biyofilm oluşturma kabiliyetleri	33
Tablo 6. Farklı izolatların biyofilm oluşturma değerleri.....	34
Tablo 7. Rumex nanopartikülün antibiyofilm aktivitesi	35



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Gram negatiflerde direnç mekanizması (Breijyeh vd., 2020).....	5
Şekil 2. Antibiyotik direncinin başlamasına karşı antibiyotik direnci elde etme zamanının grafiksel gösterimi	8
Şekil 3. Biyofilm oluşum mekanizmaları.....	10
Şekil 4. Bakteriyel hücrelerle nano ölçekli gümüş etkileşimini özetleyen diyagram (Neal., 2008)..	15
Şekil 5. Gümüş nanoparçacıklarının bakteri hücreesindeki etkisi (Singh vd., 2021).....	16
Şekil 6. Virülans genlerinin jel görüntüsü	28
Şekil 7. Sınıf 1 integron pozitif örneklerinin jel görüntüleri.....	31
Şekil 8. <i>bla</i> _{OXA-23} gen pozitif örnekler.....	32
Şekil 9. <i>bla</i> _{OXA-51} gen pozitif örnekler.....	33
Şekil 10. Transformasyon sonucu mavi-beyaz koloni oluşumu	33

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Absorbans
<i>A. baumannii</i>	: Acinetobacter baumannii
AgNO ₃	: Gümüş nitrat
AM	: Ampisilin
AMC	: Amoksisilin-Klavulonik Asit
AK	: Amikasin
ATP	: Adenosin trifosfat
Bla	: Beta- laktamaz
CAZ	: Seftazidim
CFM	: Sefiksim
CİP	: Siprofloksasin
CN	: Gentamisin
CRO	: Seftriakson
CTX	: Sefotaksim
CXM	: Sefiroksim
DNA	: Deoksiribonükleik asit
Dntp	: Deoksinükleozit trifosfa
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
EUCAST	: Avrupa Klinik Değer Tablosu
FEB	: Sefepim
F100	: Nitrofurantoin
FF-200	: Fosfomisin
<i>E. coli</i>	: Escherichia coli
ETP	: Ertapenem
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz
GNB	: Gram Negatif Bakteriler
IMP	: İmipenem
IPTG	: İzopropiltiogalaktozid intl 1
İYE	: İdrar Yolu Enfeksiyonları
KCl	: Potasyum Klorür
<i>K.oxycotoca</i>	: Klepsiella oxytoca
<i>K. pnueumonia</i>	: Klepsiella pnueumonia

LEV	: Levofloksasin
LB	: Luria Bertani
MEM	: Meropenem
MİK	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
N	: İzolat sayısı
NaCl	: Sodyum klorür
OXA	: Oksilinaz grup β -laktamaz
SAM	: Ampisilin/ sulbaktam
SXT	: Trimetoprim/sulfametoksazol
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
PRL	: Piperasilin
R	: Dirençli
S	: Duyarlı
TAE	: Tris-asetik asit-etilendiamintetraasetik asit
TZP	: Piperasilin-tazobaktam
TOB	: Tobramisin
UV	: Ultraviyole
VIM	: Verona integron kökenli metallo β -laktamaz
X-Gal	: 5-Bromo-4-kloro-3-indol-b-D-galaktozid
μ L	: Mikrolitre
μ M	: Mikromolar

1. GENEL BİLGİLER

1.1. Giriş

Gram negatif bakteriler (GNB), antibiyotiklere karşı yüksek direnç göstermeleri nedeniyle dünyadaki en önemli halk sağlığı sorunları arasında yer almaktadır. Bu mikroorganizmalar, hastaları yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yüksek risk altına almaları, yüksek morbidite sebep olmaları ve mortaliteye yol açtıkları için hastanelerde büyük klinik öneme sahiptir (Ak vd., 2011; Hormozi vd., 2018). Bu organizmalar, klinikte kullanılan birçok antimikrobiyalin etkisini önlemek için bir dizi mekanizmaya sahiptir. Direnç mekanizmalarından bazıları, akış pompaları (Li vd., 2015), ilaç bağlanma bölgesinin ve membran geçirgenliğinin değişmesi (Ruppé vd., 2015), bozunma enzimlerini ve ilacın etkisiz hale gelmesiyle sonuçlanan konformasyonel değişimini içerir (Naas vd., 2006).

Biyofilmler, birbirleriyle ve bir yüzeyle yakın ilişki içinde yaşayan karmaşık bakteri topluluklarıdır. İdrar yolu enfeksiyonları, tıbbi cihazların kullanımından kaynaklanan enfeksiyonlar ve kulak, diş etleri ve kalpte persister hücreler, kronik enfeksiyonlar dahil olmak üzere insan hastalığına neden olduğu bilinen bakteriler biyofilm oluşturabilir. Biyofilmin üyeleri, serbest benzerleriyle karşılaştırıldığında, geleneksel antibiyotiklere, biyositlere karşı olağanüstü bir direnç gösterir (Stoodley vd., 2002).

Gümüş nanopartiküller (AgNP'ler), fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler gibi benzersiz özelliklerinden dolayı antibakteriyel, antifungal, antiviral, antienflamatuar ve antianjiyogenik olarak kullanılmıştır (Gurunathan vd., 2014). Çeşitli patojenik bakterilere karşı tek başına ve geleneksel antibiyotiklerle kombinasyon halinde gümüş nanoparçacıkların antibakteriyel ve anti-biyofilm aktiviteleri araştırılmaktadır. Antibiyotiklerin ve biyojenik AgNP'lerin birleştirilmesinin, bakterilerin neden olduğu bulaşıcı hastalıkların tedavisi için terapötik olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir (Franci, vd., 2015).

1.1.1. Gram Negatif Bakteriler

GNB'nin dış ve iç olmak üzere iki zarı vardır. Dış zar, üç üniteden oluşan güçlü bir bağışıklık tepkisi indükleyicisi olan lipopolisakarit (LPS) ifade eder: bir hidrofilik polisakarit, O antijeni ve hidrofobik alan, lipid A olarak bilinir. Lipid A, daha yüksek

endotoksik aktiviteden sorumludur (Livermore, 2012; Auer ve Weibel, 2017). LPS çeşitli bakteri gruplarında heterojendir ve bazı bakteriler, bu antijeni genetik değişiklikler nedeniyle zayıf bir şekilde gösterir ve Toll benzeri reseptörler tarafından tanınmaz. Böylece LPS, monositler, makrofajlar, dendritik hücreler ve nötrofiller gibi birçok bağışıklık hücresinde meydana gelen Toll benzeri reseptörler 4 (TLR4) aracılığıyla doğuştan gelen bağışıklık tepkisini tetikleyebilir. TLR4 reseptörleri ile birlikte LPS'nin aracılık ettiği doğuştan gelen bağışıklık tepkisinin sonuçta ortaya çıkan aktivasyonu, sitokinlerin, kemokinlerin ve interferonların üretimi ve baskılanması ile şiddetlenen bir tepki ile sonuçlanır. Bağışıklık sisteminin yanıtı hem bulaşıcı sürecin ciddiyetine hem de saldırgan bakterilerdeki LPS'nin yapısına bağlıdır. Sonuç olarak *Escherichia coli* gibi bazı bakteriler bağışıklık sistemini indükler (Oliveira ve Reygaert, 2019).

Enterobacteriaceae doğada yaygın olarak bulunan heterojen bir gruptur. İnsanlarda idrar yolu enfeksiyonları, zatürre, ishal, menenjit, sepsis ve endotoksik şok gibi sayısız hastalığa neden olan tür ile Gram negatif izolatların yaklaşık %80'ini oluştururlar. İnsanları sıklıkla etkileyen cinsler arasında *Escherichia*, *Proteus*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Yersinia*, *Shigella* ve *Salmonella* bulunmaktadır.

Antimikrobiyal direnç bu organizmalarda plazmitlerini konjugasyon yoluyla aktarırlar ve bu da hemen hemen tüm mevcut antibiyotiklere direnç oluşturur. Karbapenemaz enzim ailesinin – KPC, NDM-1, IMP, VIM, OXA-48 – türler arasında yayılma potansiyeli ve bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlara bağlı ölüm oranları göz önüne alındığında, şüphesiz yüzyılın en önemli sağlık sorunlarından biridir (Pitout vd., 2015). Halen çoklu dirençli enfeksiyonları tedavi eden birkaç antibiyotikten biri olan kolistine karşı Enterobacteriaceae cinsinde mobil bir direnç geni olan mcr-1 vardır (Kim vd., 2017). Ayrıca bu genleri genellikle diğer direnç genleriyle (CTX-M, NDM, IMP) ilişkilendirerek sefalosporinlere ve karbapenemlere direnç üreterek bu mikroorganizmaların neden olduğu zararlı etkilerini arttırmaları endişe verici durumlar arasındadır (Livermore, 2012). Fermentör olmayan Gram negatif basiller (BNF), Enterobacteriaceae ile karşılaştırıldığında daha düşük bir izolasyon sıklığına sahiptir; ancak özellikle hastane ortamında ciddi, ölümcül enfeksiyonlara neden oldukları için önemli bir gruptur. Ayrıca invaziv prosedürlere maruz kalan yoğun bakım hastalarında fırsatçı hastalıklara da neden olurlar. İnsanlarda hastalığa neden olan başlıca BNF mikroorganizmaları *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas*, *Alcaligenes*, *Moraxella*'dır. Bunlar aerobik, sporsuz olmaları ile öne çıkar; şekerleri oksidatif yoldan kullanarak fermente edemezler (Perry,

2017). Antimikrobiyal duyarlılık profili söz konusu olduğunda, BNF ile ilgili kritik konu, mikrobisidal eylemi hafifletme yeteneğine sahip çok sayıda mekanizmaya sahip çeşitli genler ürettikleri için gelişen dirençleridir. *P. aeruginosa*'da, AmpC tipi sefalosporinaz ve β -laktamlara direnç kazandıran akış sistemlerinde göze çarpmaktadır. En sık olanları MexAB-OprM (Fruci ve Poole, 2018) ve OprD kaybıdır bu da porin kaybı nedeniyle bakteri hücrelerine geçirimsizlik vermektedir (Ocampo-Sosa vd., 2012). *Acinetobacter baumannii* doğal olarak AmpC sefalosporinaz ve oksasilineaz (OXA) üretir ve bu da onu birçok ilaca karşı kendiliğinden bağışık hale getirir. Bu mikroorganizmanın genetik direnci daha da ileri gider ve yüksek geçirimsizliği genetik plastisite ile birleştirerek geniş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) gibi mekanizmaların direnciyle birleştirir (Hsu vd., 2017). *Stenotrophomonas*, özellikle karbapenemlerle temas etmiş hastalarda, bir içsel çoklu direnç modeli sergiler. Bu nedenle, *Stenotrophomonas* birkaç akış pompası sunar ve sentezde L1 (tüm karbapenemlere direnç) ve L2 (sefalosporinaz) olmak üzere iki karbapenemaz üretir (Yang vd., 2014). Birbiriyle ilişkilide olabilen bu mekanizmalar, tedavi seçeneklerini endişe verici bir düzeyde sınırlar.

1.1.2. Etiyoloji

Gram negatif bakteriler insanlarda hastalık yapma kabiliyetine sahiptir ve organizmada sindirim sistemi, sinir sistemi, üriner sistem ve kan dolaşımı gibi hemen hemen tüm sistemlere ulaşarak şiddetli menenjitte kadar ishalleri gastroenterite neden olur. Bu tür mikroorganizmalar, özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde insan organizmasının diğer bölümlerine yayılmasını destekleyen bağırsakları, solunum yollarını ve cildi kolonize eder. Sağlık profesyonellerinin en büyük zorluklarından biri, GNB patojenlerinin dahil olduğu alt solunum yollarının hastane enfeksiyonlarını tedavi etmektir, çünkü bu enfeksiyonların iyi bir kısmından sorumlu olmalarına rağmen, antibiyotik tedavisine direnç oranları ve ilaçların akciğer parankimine zayıf penetrasyonu sebebiyle yanıt vermemektedirler (Wenzler vd., 2016). Diğer bir önemli endişe ise, dünya çapında milyonlarca insanı etkileyen ve sanitasyon eksikliği ile ilişkili olan *Enterobacteriaceae*'nin (*Shigella spp.*, *Salmonella spp.*, enteropatojenik *E. coli*) neden olduğu gastroenterittir (Crump ve Heyderman, 2015). Ek olarak, hem toplumda hem de hastane ortamında edinilen menenjit - zamanında tedavi edilmezse potansiyel olarak ölümcül bir hastalıktan sorumludurlar (Lee vd., 2016; Porreca vd., 2018). İdrar yolu enfeksiyonları da özellikle genç kadınlarda sık görülür. Bununla birlikte, bu enfeksiyonlar, çoklu dirençli bakterilerin yaygın olarak ortaya çıkmasıyla bir sorun

haline gelmiştir. Son olarak, bakteriyemi, mikroorganizmaların gösterdiği yukarıda bahsedilen direnç nedeniyle de bu enfeksiyonların önemli bir komplikasyonudur (Lee vd., 2016)

1.1.3. Epidemiyoloji

Gram negatif mikroorganizmaların kozmopolit karakteri ve insanlarda enfeksiyona neden olma yetenekleri göz önüne alındığında, günümüzde sağlık çalışanlarının karşılaştığı en büyük sorunun enfeksiyonlara neden olan çok ilaç dirençli bakteri grupları olduğunu belirtmek önemlidir. Çoklu ilaç dirençli Gram-negatif bakterilerin GSBL ve karbapenemaz üretmeleri nedeniyle dünyadaki en önemli sağlık sorunlarından biridir.

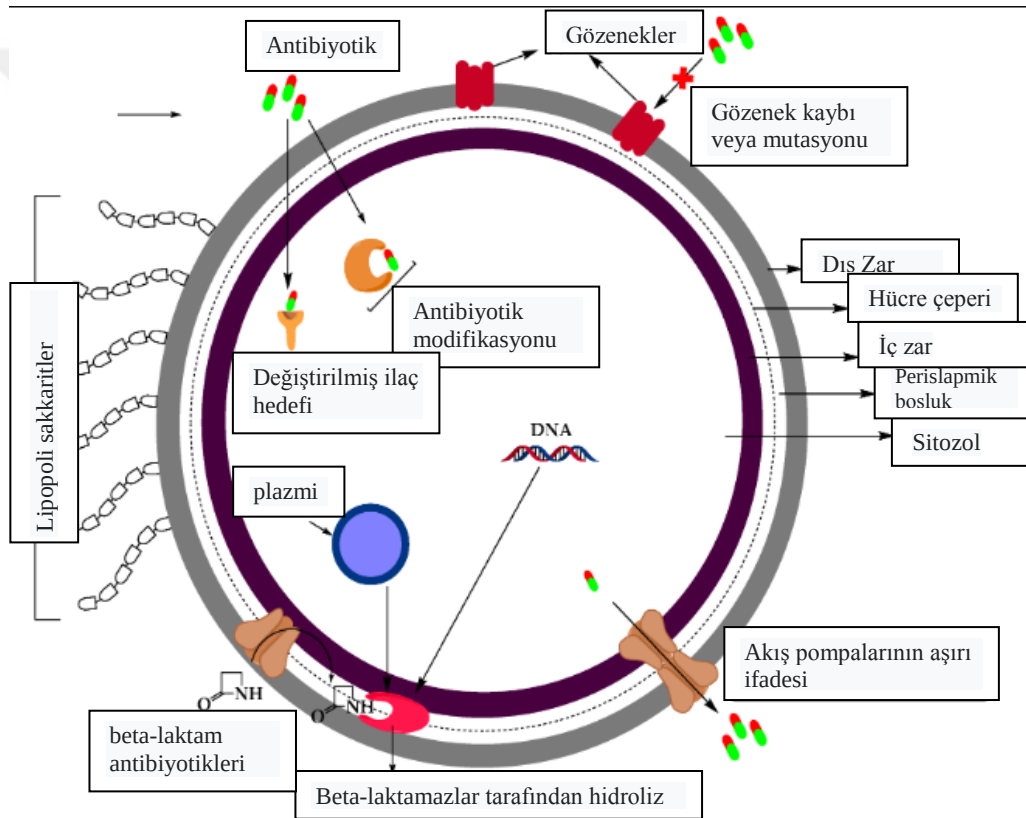
Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi'ne (CDC) göre, Amerika Birleşik Devletleri'nde, Maine ve Idaho dışında, dirençli Gram-negatif bakteriler çok yaygındır (Porreca vd., 2018). Yine de ABD'de yapılan çalışmada 100000 kişi-yılı başına 0,3 ila 2,93 enfeksiyon arasında değişen insidanda bir değişiklik bulunmuştur. Amerika Birleşik Devletleri dışında, hemen hemen her kıtada çoklu ilaç dirençli bakterilere ilişkin raporlar mevcuttur. Örneğin Avrupa'da her yıl yaklaşık 25.000 kişi çoklu ilaca dirençli (MDR) bakterilerin neden olduğu enfeksiyondan dolayı ölmektedir (Livorsi vd., 2018).

Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar (CTX-M, TEM, SHV, PER, VEB, TLA), geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize eden enzimlerdir. Bu enzim ailesinden en yaygın olanı CTX-M ve varyasyonlarıdır. Yapılan araştırmalar ABD'de *E. coli* izolatlarının %12'sinin GSBL ürettiğini gösterirken, Latin Amerika ve Asya'da bu oran sırasıyla %27 ve %38'e ulaşabilmektedir. GSBL salgınlarının başlangıcında hastane ortamıyla bağlantıları vardı; ancak artık, toplum kaynaklı olarak da görülmektedirler (Weingarten vd., 2018; Hawkey, 2015). Karbapenemazlar (KPC, NDM-1, IMP, VIM, OXA-48) karakteristik olarak karbapenem ve diğer birçok beta-laktamı hidrolize eden enzimlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde en yaygın olarak tespit edilenler KPC, NDM ve OXA-48'dir; Avrupa'da en yaygın olanları OXA-48, KPC ve VIM olup, NDM olarak daha az vakada görülmektedir. Ayrıca, bu enzimlerin taşınması, genellikle ek direnç genleri taşıyan ve Gram-negatif bakterileri pan-dirençli hale getiren plazmitler tarafından transfer edilmesidir (Weingarten vd., 2018).

1.1.4. Gram Negatif Bakterilerde Antimikrobiyal Direnç

Birçok Gram negatif patojendeki dirençli suşların yüzdesi, son 10 yılda küresel

olarak artmaktadır. Antibiyotik yapıları bu direnç sorununa ayak uyduramamıştır. Yeni bir kimyasal yapıya, kullanılmamış bir hedefe veya yeni bir etki şekline sahip yeni bir antibiyotik, onlarca yıldır geliştirilmemiştir ve pazarlanamamıştır. Bilinen antibiyotik sınıflarının ortaya çıkan dirence yanıt verme yeteneğinde önemli gelişmeler, ilk karbapenemin 1985'te piyasaya sürülmesinden bu yana görülmemiştir. DSÖ Küresel Öncelik Listesi'nde vurgulandığı gibi, yeni antibiyotiklerin araştırılmasına, keşfedilmesine ve geliştirilmesine rehberlik etmek için acilen ihtiyaç duyulan tedavi seçeneklerinin boşluğunu doldurmak ve yeni antibiyotikler için kritik öncelikli hedeflerdendir (DSÖ, 2007). Şekil 1'de Gram negatiflerde direnç mekanizması (Breijyeh vd., 2020) gösterilmiştir.



Şekil 1. Gram negatiflerde direnç mekanizması (Breijyeh vd., 2020).

Yoğun bakım servisi kaynaklı enfeksiyonların yaklaşık üçte biri ve yoğun bakım ünitelerinde %40'tan fazlasına bu üç DSÖ öncelikli patojen neden olur (Weiner vd., 2016; Vincent vd., 2009). Bu enfeksiyonların tedavisi zordur ve duyarlı suşlara bağlı enfeksiyonlardan daha yüksek morbidite ve mortalite ile ilişkilidir (Kaye ve Pogue, 2015). Duyarlı bakterilerle enfekte olanlara kıyasla CR AB ile enfekte hastalarda artan mortalite, PA ile enfekte olan hastalara benzer sonuçları doğrulamaktadır (Lemos vd., 2014).

Gram-negatif bakterilerin prevalansına dayalı tedavi edilebilirliğe ilişkin güvenilir veriler mevcut değildir. Hastane bazlı raporlar, tedavi seçenekleri sınırlı olan veya hiç olmayan bu tür patojenlerin giderek daha fazla teşhis edildiğini göstermektedir. Şüphesiz, bu patojenlere karşı etkinliği olan yeni antibiyotiklere acilen ihtiyaç duyulmaktadır (Perez vd., 2016). En az yirmi yıldan fazla bir süredir karbapenemler, giderek yaygınlaşan MDR Gram-negatif patojenler için son çare kapsamı sağlamıştır. Karbapenemler dünyanın birçok yerinde birinci basamak tedavi haline gelmiştir. Özellikle Gram negatiflerde, *Klebsiella*, *Pseudomonas* ve *Acinetobacter*'de CR direncinin yayılımı sorunuyla karşı karşıya gelinmektedir (Theuretzbacher, 2017).

En dirençli Gram negatif patojenlere karşı yeni antibiyotiklere yönelik klinik ihtiyaca yanıt olarak ilaç şirketleri farklı stratejiler izlemiştir. İleri klinik geliştirme aşamasındaki ilaçlar iki konsepte dayanmaktadır: bilinen antibiyotik sınıflarının modifikasyonu ve beta-laktamaz inhibitörleri (BLI) ile iyi bilinen kombinasyonlar. Yakın zamanda iki BLI kombinasyonu kaydedilmiştir, seftazidim/avibaktam ve seftolozan/tazobaksin (Bush, 2015). Her iki ilaç da mevcut ilaçlarla karşılaştırıldığında bazı duyarlılık kazanımları sağlar. Geç evre klinik geliştirmedeki BLI kombinasyonları, yeni bir BLI (meropenem-vaborbactam, imipenem-relebaktam) ile kombinasyon halinde bir karbapenemden oluşur. Böyle bir kombinasyon KPC'lere ve diğer A sınıfı BL'lere ve AmpC'ye (sınıf C) karşı çalışır (Lapuebla vd., 2015). Sefiderokol, Gram-negatif hücreye alımı kolaylaştıran bir siderofora konjuge olduğu için sefalosporin sınıfına yeni bir yaklaşımdır. Bu siderofor-sefalosporin, çoğu β -laktamaz tarafından hidrolize karşı özünde stabildir (Ito-Horiyama vd., 2016) ve şimdiye kadar çalışılmış olan en dirençli Gram-negatif patojenlere karşı iyi in vitro aktiviteye sahiptir (Falagas vd., 2017). Mevcut ilaçlarla diğer BLI kombinasyonları, kısa vadeli çözümler sağlamak için yeniden canlandırılmış, Aztreonam ve avibaktamın birleştirilmesi, monobaktamın MBL'lere karşı stabilitesini ve avibaktamın diğer BL'lerin çoğuna karşı inhibe edici işlevini kullanılmıştır. Bu kombinasyon, örneğin KP ve AB'de BL'ler ana direnç mekanizması olduğunda, aztreonamın aktivitesini iyileştirir. Örneğin sefepim/tazobaktam gibi diğer BLI kombinasyonları geliştirilmektedir, ancak hali hazırda kayıtlı ilaçlara göre çok az avantajı vardır. Aminoglikozid ve tetrasiklin sınıfı gözden geçirilmiş ve ana sınıfa özgü direnç mekanizmalarını ele alan ve duyarlılık oranını artıran yeni analoglar geliştirilmiştir (Theuretzbacher, 2017).

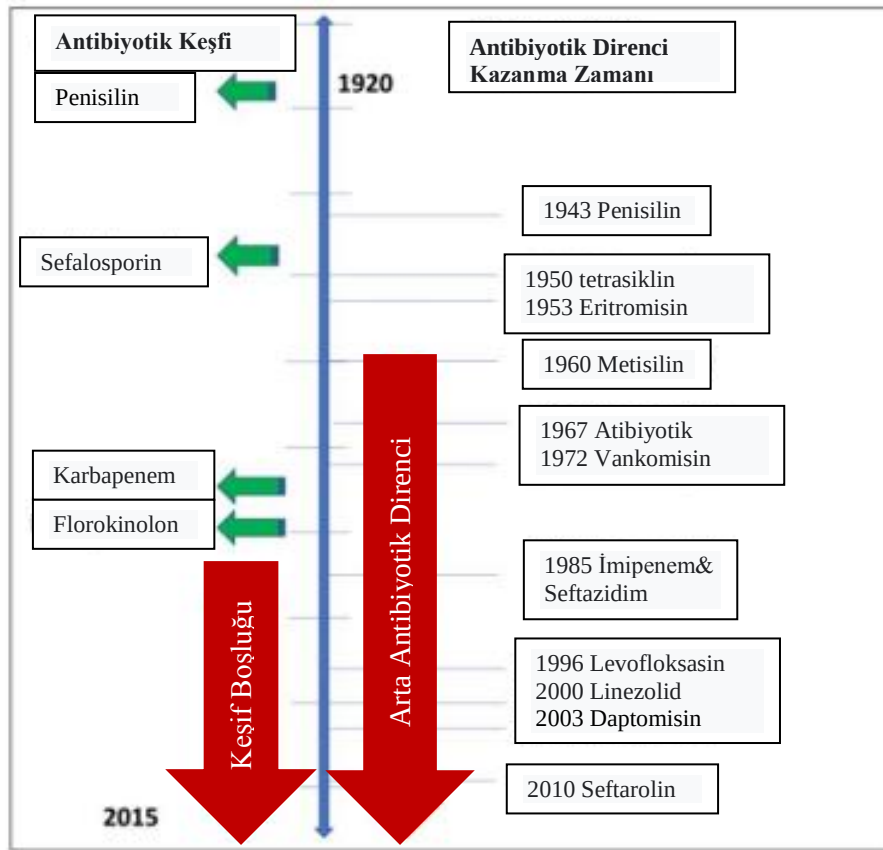
Antibiyotik direnci hem halk sağlığı üzerindeki etkileri hem de ekonomik yükü nedeniyle sadece dünya sağlık gündeminin değil, genel olarak küresel gündemin de en önemli konuları arasında yer almıştır. Özellikle son zamanlarda dünyada hızla artan

antibiyotik direnç oranları; Küresel sağlık, sürdürülebilir kalkınma, küresel ekonomi, ticaret ve ülkelerin istikrarı üzerinde etkisi bulunmakta ve önümüzdeki yıllarda çok önemli etkilerinin olacağı öngörülür her geçen gün artmaktadır. (Chopra vd., 2002)

Geçmişte bakteriyel hastalıkların çoğu antimikrobiyal ajanlarla tedavi edilebilirken, antibiyotiklerin yanlış kullanımı sonucunda yeni keşfedilen her antibiyotiğe karşı kısa sürede direnç gelişmektedir. Antibiyotik direnci piyasaya yeni ilaçların çıkmasından sonra doğal bir seleksiyon süreci olarak ortaya çıkmıştır. Bilinçsiz antibiyotik kullanımı mikropların dirençli hale gelmesinden sorumludur (Levy ve Marshall, 2004).

Direnç sonucu klasik antibiyotik tedavisine yanıt vermeyen bakteriyel ajanlar tüm dünyada yüksek morbidite ve mortaliteye sahip enfeksiyonlara neden olmaktadır. Böylece antibiyotik direnci tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu haline gelmiş ve sadece bugünü değil geleceği de tehdit etmektedir (Levy, 1997). Antibiyotiklerin kullanılmaya başlamasından önce de direnç belgelenmiştir. 1937'de sülfonamidlerin piyasaya sürülmesinden bu yana, bu ilaca direnç gözlenmiştir. Bununla birlikte, sülfonamid direnci 1930'larda rapor edilmiş ve şu anda bile aynı direnç mekanizması ile işlev göstermektedir (Chopra vd., 2002).

Tarımda kullanılan antibiyotikler de ilaç direnci geliştirmiştir. Besin zinciri ile antibiyotiğe dirençli hayvanlardan diğer hayvanlara ve insanlara bulaş görülebilir. Tarımda kullanılan antibiyotikler genellikle kullanılan antibiyotik bileşikleriyle aynı veya benzerdir (Witte, 1998).



Şekil 2. Antibiyotik direncinin başlamasına karşı antibiyotik direnci elde etme zamanının grafiksel gösterimi (Antibiyotik keşfinin tarihi (yeşil ok) ve antibiyotik direncinin ilk rapor edildiği yıl (sağ taraf), kırmızı ok (alt yön) keşif boşluğunu ve artan antibiyotik direncini gösterir, mavi çizgi zaman akışını gösterir).

1.1.4.1. Antibiyotik Direncinin Sonuçları

Antimikrobiyal direnç, dünya çapında en az 1.27 milyon insanı öldüren ve 2019 da yaklaşık 5 milyon ölümle ilişkilendirilen bir halk sağlığı tehditidir. ABD’de her yıl 2.8 milyondan fazla antimikrobiyal dirençli enfeksiyon meydana gelmektedir. CDC’nin 2019 antibiyotik direnci (AR) tehditler raporuna göre 35 000’den fazla insan bunun sonucunda ölüyor. (Lipp vd., 2002). Antimikrobiyal direnç sağlık veterinerlik ve tarım endüstrilerinin yanı sıra yaşamın herhangi bir aşamasında insanları etkileme potansiyeline sahiptir. Bu onu dünyanın en acil halk sorunlarından biri yapmaktadır (Aminov ve Mackie, 2007). Yoğun bakım hizmetleri, hematoloji gibi yüksek riskli hasta popülasyonuna sahip klinikler -onkoloji servisleri ve nakil merkezleri, dirençli mikroorganizma enfeksiyonlarının ciddi tehdidi altındadır. Son yıllarda yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi konusundaki araştırmalar, kanser tedavisi, aşı çalışmaları, kardiyovasküler sistem üzerinde etkili ilaçlar gibi farmakolojinin diğer alanlarıyla karşılaştırıldığında yetersiz kalmaktadır. FDA tarafından tedavi için onaylanan antibiyotikler, yeni moleküllerin keşfinden ziyade eski antibiyotiklerin türevleridir.

Daha önceki yıllarda klinik kullanıma girmiş ve halen önemini koruyan glikopeptidler olan vankomisin ve teikoplanine dirençli mikroorganizmaların sayısının arttığı görülmektedir. Bu nedenle yakın zamanda FDA onayı alan glikopeptidlerin üst sınıfı olan "lipoglikopeptidler" geliştirilmiştir. Kliniğe bir lipoglikopeptit sınıfı olarak giren ilaçlar telavansin, oritavansin ve dalbavansindir. Bu ilaçlar, vankomisine ve teikoplanine dirençli bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

1.2. Biyofilm

Biyofilmler, çoklu ilaca direnç yetenekleri, konak savunması ve diğer stresleri nedeniyle ciddi sağlık sorunlarıdır (De La Fuente-Nunez vd., 2013). Bu nedenle dünya çapında kronik bakteriyel enfeksiyonlara yol açmaktadır (Subhadra vd., 2018; Sharma vd., 2019). Biyofilm, bir yüzeye bağlı ve bir Ekstraselüler Polimerik Madde (EPS) matrisinde esnek olmayan bir şekilde gömülü olan bakterilerin karmaşık üç boyutlu (3-D) agregasyonunu ifade eder. (Lebeaux vd., 2014; Padmavathi vd., 2017; Kannappan vd., 2020). Biyofilm içindeki bakteriler ayrıca zorlu koşullara dayanabilir ve polisakkaritler, hücre dışı DNA (e-DNA), proteinler ve amiloidojenik proteinler gibi salgılanan polimerleri tutabilir (Sharma vd., 2019). Biyofilm kütlesinin %97'sini su oluşturur. Matristeki diğer bileşenler; %1-2 EPS, %1-2 küresel glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 nükleik asitler, lipidler, fosfolipidlerdir. Ancak bu oranlar, mevcut organizmaların türüne, fizyolojik özelliklerine, büyüme ortamının doğasına, sıvının türüne ve genel fiziksel özelliklere bağlı olarak değişebilir (Batoni vd., 2016; Nazir vd., 2019).

1.2.1. Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu ve bakterilerin yüzeylere tutunma düzeyi, ortamın pH ve sıcaklığı, bakteri türleri, bakteri hücre duvarının yapısı (Gram pozitif veya Gram negatif), bakteri sayısı, tutunduğu yüzeyin özellikleri, hücre hareketliliği, ortamdaki besin içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu gibi birçok faktörle değişebilir. Bazı bakterilerin biyofilm oluşturma eğilimi yüksektir. Bunlardan en yaygın olanları *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus*'tur. Bu mikroorganizmalar, besin açısından zengin birçok ekosistemde tüm yüzey tiplerinde biyofilm oluşturabilir (Dusan vd., 2011).

Genel olarak, herhangi bir alt tabaka/katman üzerinde bakteriyel patojenler tarafından biyofilm oluşumu beş ana aşamadan oluşur (Kostakioti vd., 2013; Yin vd.,

2019).

1) ilk aşamada Serbest yüzen planktonik hücreler, asit baz, hidrofobik, Van der Waals ve elektrostatik kuvvetler gibi zayıf etkileşimler yoluyla biyotik veya abiyotik yüzeylere geri dönüşümlü olarak bağlanır.

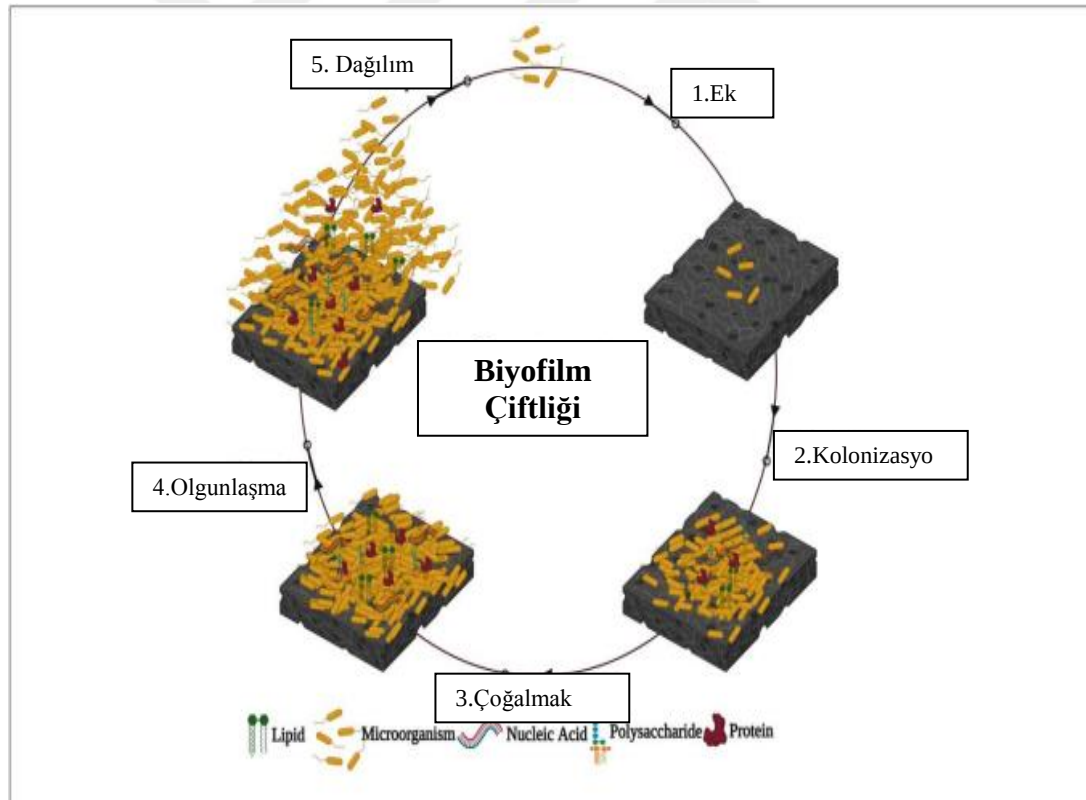
2) Kolonizasyon: Bakteriyel patojenler, kollajen bağlayıcı yapışkan proteinler, lipopolisakkaritler, flagella ve pili gibi daha güçlü etkileşimler yoluyla yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanır

3) Çoğalma: çok katmanlı bakteri hücreleri derinden birikmiştir ve muazzam miktarlarda EPS üretilir.

4) Olgunlaşma: tipik 3D biyofilm yapısı ile olgunlaşmış biyofilm içinde büyütülen bağlı çok katmanlı bakteri hücreleri.

5) Dispersiyon: Biyofilmin tamamen gelişmesinden sonra, mekanik ve aktif işlemler kullanılarak demonte edilir veya dağıtılır.

Biyofilm oluşum aşamalarının gelişimi Şekil 3'te gösterilmiştir.



Şekil 3. Biyofilm oluşum mekanizmaları

1.2.2. Biyofilm Oluşumunda EPS'nin Rolü

EPS, biyofilm topluluklarının yapışkan yapısını açıklayan ve polisakkaritler, proteinler, e-DNA ve fosfolipidler dahil olmak üzere biyopolimerlerin karmaşık bir karışımı olan bir süper yapıştırıcıdır (Nazir vd., 2019). Genel olarak EPS bileşimi

patojenlerin türü, biyofilm yaşı ve çevresel koşullarına göre değişir (kuruma, pH, oksijen, azot, sıcaklık ve besin mevcudiyeti) (Mayer vd., 1999; Kostakioti vd., 2013). Biyofilmde bulunan bakteriler, EPS kompozisyonlarını ve yapışmalarını değiştirerek çevrelerine tepki verebileceklerini öne sürüyorlar. EPS, hücreler ve yüzeyler arasındaki bağlantı için fiziksel bir çerçeve sağlar. Aynı zamanda biyofilm hücreleri ve çevre arasında bir abluka görevi görür (Mitchell vd., 2016). Mikropları antimikrobiyal bileşiklerden, kimyasallardan, kuruma, radyasyon ve olumsuz çevre koşullarından korur. Ayrıca, biyofilm içindeki bakteri hücrelerini sürekli bir besin kaynağı ile besliyorlar ve çevresel değişikliklere cevap verme yeteneklerini koruyorlar. EPS'nin bir diğer hayati bileşeni, biyofilm yapısal bütünlüğünü, genetik bilgi alışverişini, besin maddelerini, biyofilm stabilitesini ve ilaç direncini artıran e-DNA'dır (Donlan, 2002; Martins vd., 2010).

1.2.3. Biyofilm Aracılı Bakteriyel Enfeksiyonlar

Klinik bakım düzeyi birkaç yıl içinde çarpıcı bir şekilde ilerlemiştir, ancak bakteriyel biyofilm enfeksiyonları halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaya devam etmektedir. Hoiby, Lam ve meslektaşları arasında doğrudan bir korelasyon tanımlayan ilk kişilerdi. Özellikle kistik fibroz hastalarında *P. aeruginosa* ile biyofilm oluşumu ve tekrarlayan enfeksiyonları ele almışlardır (Hoiby, 1977; Lam vd., 1980). Takip eden on yıllar, biyofilmlerin dokuya bağlı enfeksiyonların önemli bir kaynağı olduğu fikri benimsenmiştir (Lebeaux vd., 2013). Ayrıca, gömülü tıbbi cihazların farklı formlarının kullanılmasının, bakterilerin yapışmasını ve kolonizasyonunu destekleyerek enfeksiyonlara neden olacağı anlaşılmıştır (Marrie vd., 1982; Donlan ve Costerton, 2002). Ayrıca, çeşitli gömülü tıbbi cihaz türleri, bakteriyel biyofilmlerin gelişimi ile ilişkilidir (Şekil 2). Dahası, ventilatör pnömonisi, merkezi hat kan dolaşımı enfeksiyonları, idrar, kalp pili ve periferik vasküler kateter enfeksiyonları, cihazla ilgili en yaygın bakteriyel biyofilm enfeksiyonlarıdır (Kamaruzzaman vd., 2018; Kannappan vd., 2019b).

1.2.4. Persister Hücreler

Persister hücreler hücrelerin oluşumu, antibiyotik toleransının başka bir mekanizmasıdır. Belirli bir bakteri popülasyonunda, büyümeyenler olarak bilinen küçük bir alt popülasyon mevcuttur (Lewis, 2010; Jayaraman, 2008). Bu özelleşmiş hücrelerin, stres koşullarında hayatta kalmalarını sağlayan ve ölümü önleyen bir uyku durumuna girdiği öne sürülmüştür, çünkü antibiyotikler hücre büyümesini hedef alır. Persister

hücreler, yüksek antibiyotik konsantrasyonlarına karşı aşırı derecede toleranslıdır. Bunlar antibiyotiğe dirençli mutantlar değil, daha ziyade genetik olarak özdeş hücrelerden oluşan klonal bir popülasyonda stokastik olarak oluşan yabani türün fenotipik varyantlarıdır (Levin ve Rozen, 2006).

Büyüyen bir bakteri popülasyonundaki persister hücre sayısı, logaritmik fazın ortasında yükselir ve durağan fazda yaklaşık %1'e ulaşır. Benzer şekilde, yavaş büyüyen biyofilmler önemli sayıda persister hücreler hücre üretir. Persister hücreler bir kültür taze ortama aşılandığında, persister hücreler uyku durumundan yeniden canlanır. Persister hücreler sağkalıma dayalı bakteriyel biyofilmlerin bir antibiyotik tolerans modeli önerilmiştir (Lewis, 2008)

Antibiyotikle ilk tedavi, planktonik hücreleri ve biyofilm hücrelerinin çoğunu öldürerek persister hücreleri sağlam bırakır. Konağın bağışıklık sistemi planktonik persister hücreleri hedefler ve öldürür, ancak biyofilm tutucular, biyofilm matrisi tarafından konak savunmasından korunur. Antibiyotik tedavisi durdurulduktan sonra, persister hücreler biyofilmi yeniden doldurur ve enfeksiyon tekrarlar. Bu modele dayanarak, persister hücreler, yalnızca biyofilm enfeksiyonları bağlamında olduğundan çok daha geniş bir klinik öneme sahiptir. Gerçekten de, bu özelleşmiş hücrelerin, bağışıklık tepkisi sınırlı olduğunda, tedaviye direnç göstermede kritik bir rol oynaması muhtemeldir. Bu gibi durumlar, bağışıklığı baskılanmış hastalarda (örn. HIV pozitif, kanser kemoterapisi) veya patojenin konak savunma mekanizmalarının çoğuna erişilemeyen vücut bölgelerinde bulunduğu durumlarda bağışıklığı yeterli hastalarda yayılmış enfeksiyonları içerir ve antibiyotiğin hedefe bağlanmasını engellerler (Lewis, 2010). Buna karşılık, persister hücrelerin toleransı hedefleri kapatarak çalışır. Bakterilerin persister hücreler ile ilgili ana sorulardan biri, bakterilerin bakterisidal antibiyotiklere maruz kalmaya devam etmelerini sağlayan özel bir mekanizma geliştirip geliştirmediğidir. Bu tür bir mekanizma potansiyel olarak toksik proteinlerin küçük bir hücre fraksiyonunda onları uykuda veya büyümemiş durumda tutmak için kasıtlı veya sporadik ekspresyonuna dayanabilir. (Hayes, 2003).

Genellikle biyofilm, biyofilm dışında yaşayan bakteriler için minimum öldürücü dozun birkaç yüz katı antibiyotik dozlarına toleranslıdır. Biyofilm enfeksiyonlarını ortadan kaldırması beklenen konsantrasyonlar, genellikle, antibiyotiklerin uygulanabilir en yüksek dozlarını aşar.

Ayrıca antibiyotiklerin (tıp alanında ve tıp dışında) yaygın olarak kullanılması, antibiyotiğe dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında önemli rol oynamaktadır. Sonuç olarak, antibiyotik toleransında yer alan mekanizmaları tam olarak anlamak ve biyofilm

enfeksiyonlarıyla mücadele için yeni terapötik stratejiler geliştirmek için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bakteriyel iletişim sistemleriyle etkileşim normal biyofilm için gerekli olan hücreden hücreye iletişime müdahale eden mikrobiyal sinyal moleküllerinin analoglarını geliştirmek olabilir. Quorum Sensing'in birçok farklı bakteri türünde küresel bir düzenleyici sistem oluşturduğuna dair artan kanıtlar vardır (Parsek ve Greenberg, 2005). Örneğin, hücre hareketliliğini veya hücre yüzeyi kimyasını etkileyen herhangi bir şey, biyofilm eksikliği olan bir fenotipe dönüşebilir. Quorum Sensing inhibisyonu biyofilmi önlemek için ideal bir yol olabilir. Bunun için kullanılan alg ve doğal ürünler (halojene edilmiş furanon bileşikler) kullanılarak bakteriyel kolonizasyonu engellemek için geliştirilmiş kimyasal savunma mekanizmaları geliştirilmiştir (De Nys vd., 1995).

Bakteriyel membran organizasyonunu hedefleyen antimikrobiyaller biyofilm önlemek için umut verici olabilir. Bu ajanlar, konakçının bağışıklık sistemi tarafından sentezlenen antimikrobiyal peptitlere benzer olacaktır, burada bu moleküller doğrudan zar öldürücü hücreler üzerinde etki eder. Bu tür membran etkili antimikrobiyaller, fiziksel bütünlüğü ve enerji üretiminde yer alan zara bağlı enzimler gibi çok sayıda hücresel işlevi bozmak için bakteriyel membran çift tabakasını doğrudan bağlamak ve geçirgen kılmak için lipofilik olacaktır (Welte ve Pletz, 2010).

1.3. Gümüş Nanoparçacıklar

Nanoteknoloji, istenen uygulamalar için uygun şekilde manipüle edilebilecek benzersiz özelliklere ulaşmak için malzemelerin atomik düzeyde uyarlanmasını içerir. Doğal süreçlerin çoğu nanometre ölçeğinde de gerçekleşir. Bu nedenle, nanoteknoloji ve biyolojinin birleşmesi birçok biyomedikal sorunu çözebilir ve sağlık ve tıp alanında devrim yaratabilir. Nanoteknoloji şu anda, görüntüleme, algılama, hedefe yönelik ilaç dağıtımı ve gen dağıtım sistemleri ve yapay implantlar gibi çeşitli yollarla tıp bilimlerinin en karanlık yollarını keşfetmek için bir araç olarak kullanılmaktadır (Singh vd., 2008). Bu nedenle, nano boyutlu organik ve inorganik parçacıklar, biyolojik işlevselleştirmeye yatkınlıklarından dolayı tıbbi uygulamalarda artan bir ilgi görmektedir.

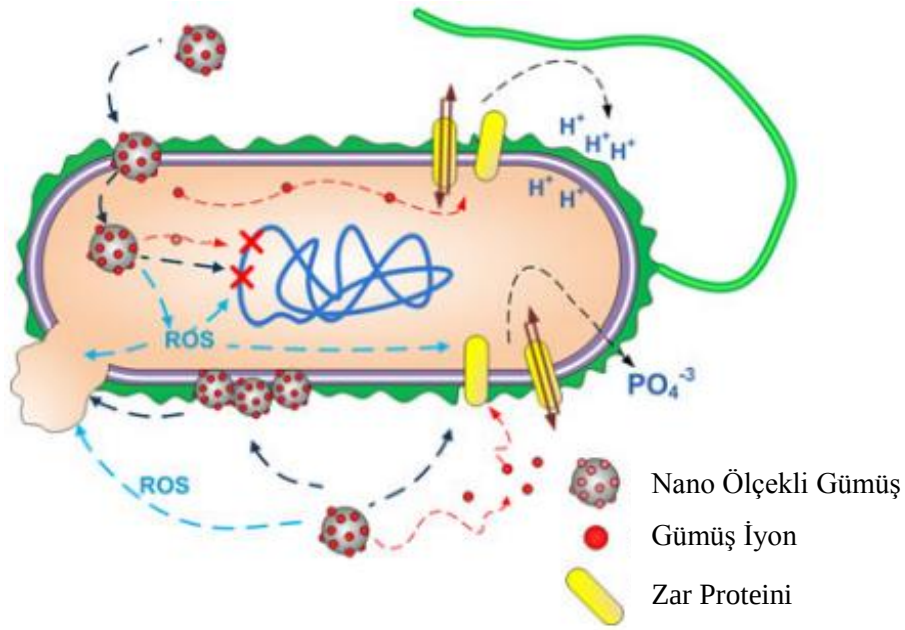
Uzun zamandır gümüşün dezenfekte edici bir etkisi olduğu biliniyor ve geleneksel ilaçlarda ve mutfak eşyalarında uygulamalar bulmuştur. Çeşitli gümüş tuzları ve türevleri, ticari olarak antimikrobiyal ajanlar olarak kullanılmaktadır (Shockman ve Barren, 1983). Bu nedenle, gümüşün nanoparçacıkları, antibakteriyel özellikleri açısından uygun bir şekilde araştırılmıştır (Morones vd., 2005). Gümüş

nanopartiküllerin bakteri ile boyuta bağlı etkileşimini ortaya çıkaran elektron mikroskobu kullanılarak bu özelliği araştırmak için övgüye değer çabalar gösterilmiştir (Kyriacou, vd., 2004). Bununla birlikte, bu nanopartiküllerin bakterisidal özelliği, büyüme ortamındaki stabilitelerine bağlıdır, çünkü bu, bakteri-nanopartikül etkileşimi için daha uzun alıkonma süresi sağlar. Bakteri üremesini önemli ölçüde kısıtlamaya yetecek kadar kararlı gümüş nanoparçacıklarının hazırlanmasında güçlü bir zorluk vardır. Hem antibiyotiğe dirençli hem de dirençli olmayan Gram-negatif suşlar ve dirençli olmayan bir Gram-pozitif bakteri suşu üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Çok ilaca dirençli bir Gram negatif bakteri suşu da nanopartiküllerin antibakteriyel etkisini incelemek için analize tabi tutulmuştur. Bu tür antimikrobiyal etkilerin altında yatan moleküler mekanizmayı anlamak için çaba gösterilmiştir. Nanopartiküllerin etkisinin, suşların dirençli olup olmadığına bakılmaksızın, Gram-negatif suşlar üzerinde, Gram-pozitif organizmalara göre önemli ölçüde daha belirgin olduğu bulunmuştur. Nanopartiküllerin bu gelişmiş antibakteriyel etkisini, bakteri proteinlerinin fosfotirozin profilini modüle eden ve bakteri büyümesini durduran bir kolloid olarak ortamdaki stabilitelerine bağlanmaktadır (Kirstein ve Turgay, 2005).

Gümüş nanopartiküllerin bakteri proteinlerinin fosfotirozin profili üzerindeki etkisi Spesifik bir monoklonal antikor kullanılarak Gram pozitif ve negatif bakterilerden türetilen proteinlerin fosfotirozin içeriğinin incelenmesiyle, nanopartiküllerin büyümeyi etkileyen 120 bakteri sinyal iletimi üzerindeki olası etkisi incelenmiş ve çeşitli protein substratlarının fosforilasyonunu ve bakteriyel sinyal iletimini etkilediği bulunmuştur (Kirstein ve Turgay, 2005).

1.3.1. Gümüş Nanopartiküllerin Antibakteriyel Özellikleri

Nano ölçekli gümüşün bakteriler üzerindeki aktivitesinin arkasındaki mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da, bugüne kadar önerilen en yaygın üç toksisite mekanizması şunlardır: serbest gümüş iyonlarının alımı, ardından ATP üretiminin ve DNA replikasyonunun bozulması, gümüş nanoparçacık ve gümüş iyonu ROS üretimi ve hücre zarlarına doğrudan zarar verir (Marambio-Jones, ve Hoek, 2010). Gümüş nanomalzemeler ve bakteri hücreleri arasındaki çeşitli gözlemlenen ve varsayımsal etkileşimler Şekil 4'te gösterilmektedir.

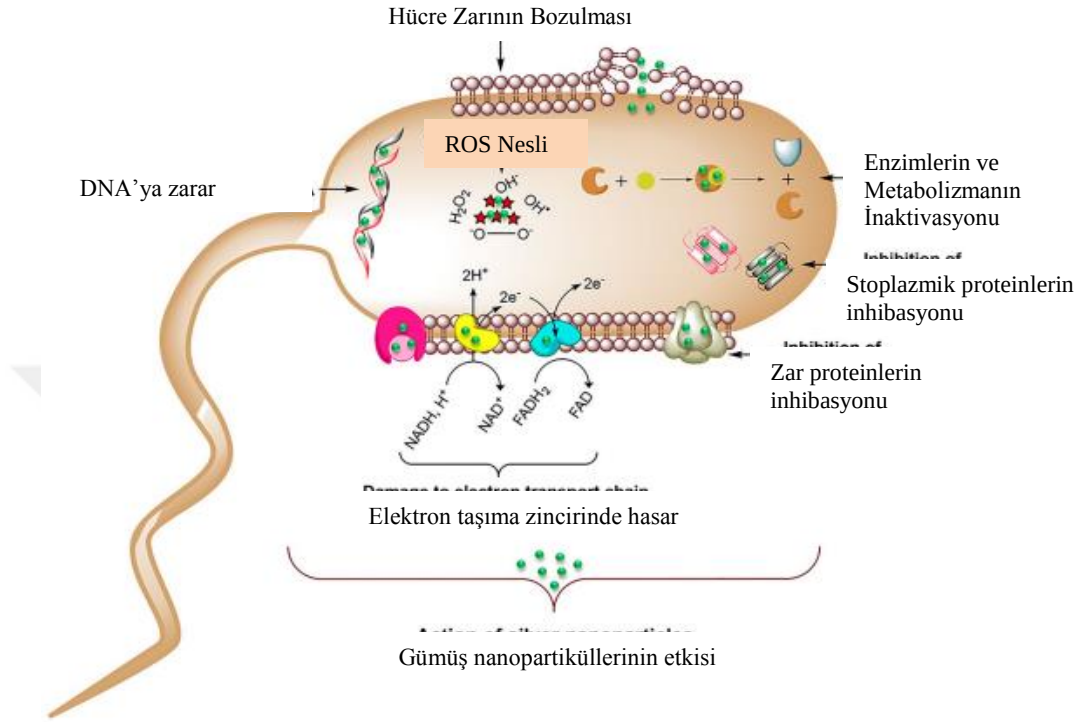


Şekil 4. Bakteriyel hücrelerle nano ölçekli gümüş etkileşimini özetleyen diyagram. Nano ölçekli gümüş (gümüş iyonları salabilir ve ROS oluşturabilir ve zar proteinleri ile etkileşime girer ve zar geçirgenliğini etkileyen hücre zarında birikir; ROS oluşturabileceği, gümüş iyonları salabileceği ve DNA'yı etkileyebileceği hücreye girer. Üretilen ROS ayrıca DNA, hücre zarı ve zar proteinlerini de etkileyebilir ve gümüş iyonu salınımı muhtemelen DNA ve zar proteinlerini etkileyecektir (Neal., 2008).

Serbest gümüş iyonu alımı Gümüş nanoparçacıklarının gümüş iyonları oluşturarak çözündüğü rapor edilmiştir ve in vivo bu salınımın gümüş reaksiyonlarının ürünü olacağı düşünülmektedir. H_2O_2 ile gümüş nanoparçacık oksidatif çözünmesi için olası bir mekanizma olarak aşağıdaki reaksiyonu önerilmiştir. Benzer şekilde, proton hareket kuvvetinin gerçekleştiği bakteri hücre zarında da benzer bir mekanizmanın meydana gelebileceği varsayılmıştır (Asharani vd., 2009).

İyonik gümüş, bilinen antibakteriyel özelliklere sahiptir; bu nedenle, gümüş nanoparçacıklardan ayrıştırılan iyonların antibakteriyel özelliklerinin en azından bir kısmından sorumlu olması beklenir. Mikromolar altı konsantrasyonlarda, NADH dehidrogenaz gibi solunum zincir reaksiyonunun enzimleri ile etkileşime girerek solunumun ATP sentezinden ayrılmasına neden olur. Gümüş iyonları ayrıca proton sızıntısına yol açan taşıma proteinlerine bağlanır ve proton hareket kuvvetinin çökmesine neden olmaktadır (Lok vd., 2006). Gümüş, fosfat alımını engeller ve hücre içi fosfatın dışarı akışına neden olur (Schreurs ve Rosenberg 1982). Solunum ve taşıma proteinleri ile etkileşim, Ag bu proteinlerin sistein kalıntılarındaki bulunan tiyol gruplarıyla açıklanmıştır (Holt ve Bard, 2005). Mili-molar Ag'ye maruz kalan bakteri hücreler dozlar, sitoplazma büzülmesi ve hücre duvarı zarının ayrılması, DNA

yoğunlaşması ve hücrenin merkezinde bir elektron ışığı bölgesinde lokalizasyon ve hücre içi içeriğin sızmasına izin veren hücre zarı bozulması gibi morfolojik değişikliklere maruz kalır (Jung vd., 2008). Gümüş nanoparçacıklarının bakteri hücreesindeki etkisi (Singh vd., 2021) Şekil 5'te gösterilmektedir.



Şekil 5. Gümüş nanoparçacıklarının bakteri hücreesindeki etkisi (Singh vd., 2021).

Aynı çalışmada, antibakteriyel etkinliğini artırmak için daha yüksek yüzey alanına sahip gümüş nanoparçacıklar elde etmek için suda çözünür ligandlar kullanan ikinci bir gümüş nanoparçacık preparasyonu kullanılmıştır. Bununla birlikte, gümüş nanoparçacıkların ikinci preparasyonu, bakteri hücrelerine karşı kaplanmamış tozlardan daha düşük toksisite göstermiştir bu da ligandların gümüş iyonu erozyonunu önlediğini düşündürmüştür; böylece, ortaya çıkan toksisiteyi azalttığı varsayılmıştır. Bu sonucun bir başka olası nedeni, yüzey kaplamalarının gümüş nanoparçacıkların bakteri hücre yüzeyine yapışmasını engellemesidir (Smetana vd., 2008). Gümüş nanoparçacıklarına kıyasla membran protein hasarına duyarlı biyoluminesans bakterilerinde aynı etkiyi ve süperoksitlere duyarlı bir suşta biraz daha az etkiyi indüklemiştir bu da gümüş nanoparçacıkların, oksijenle redoks reaksiyonları yoluyla ROS üreten hücre içinde hareket eden gümüş iyonları ürettiği öne sürülmüştür (Hwang vd., 2008). Başka bir çalışmada ise aktif karbon fiber destekli gümüşün bakteriyel aktivitesi, gümüş iyonlarının, süperoksitlerin ve hidrojen peroksitin sinerjistik etkisine bağlanmıştır (Le Pape vd., 2004).

Bakteri suşlarında oksidatif stres, DNA hasarı ve protein veya membran hasarı gibi gümüş nanoparçacık toksisitesinin farklı yollarını test etmek için bir rekombinant biyoluminesan bakteri paneli kullanılmıştır. Büyüyen bakteri kültürlerine gümüş nanopartiküllerin eklenmesi, hidroksil radikallerinin değil, süperoksit radikallerinin üretilmesine yol açtığı gösterilmiştir. Toksisitenin membran protein hasarı ve oksidatif stres yoluyla meydana geldiği, ancak DNA hasarı olmadığı sonucuna varılmıştır (Hwang vd., 2008).

Doğrudan hücre zarı hasarı Gümüş nanoparçacıklar bakteri zarıyla etkileşime girer ve hücrenin içine nüfuz edebilir. Transmisyon elektron mikroskobu verileri, gümüş nanopartiküllerin *E. coli* hücrelerine yapıştığını ve içine nüfuz ettiğini ve ayrıca hücre zarında çukur oluşumunu indükleyebildiğini göstermektedir (Choi ve Hu, 2008; Raffi vd., 2008; Soni ve Salopek-Soni, 2004). *E. coli* hücrelerinde orijinal parçacıklardan çok daha küçük boyutlarda olsa da gümüş nanoparçacıklar gözlenmiştir; dahası, oksitlenmiş yüzeylere sahip gümüş nanoparçacıklar, etkileşimden sonra *E. coli* yüzeylerinde "dev delikler" oluşumuna neden olur ve hücresel içeriğin büyük bir kısmı "yenilip atılır" (Smetana vd., 2008). *V. cholera*, *P. aeruginosa* ve *S.tyhus* gibi diğer bakteriler için hücre zarında gümüş nanoparçacık birikimi ve hücre içinde alım da rapor edilmiştir. Bu durumlarda sadece 10 nm'den küçük nanopartiküller bakteri hücre zarlarına yapışır veya bakteri içinde gözlemlenmiştir (Morones vd., 2005). Ancak diğer araştırmalarda boyutları 80 nm'ye kadar olan gümüş nanopartiküller *P. aeruginosa*'nın iç ve dış zarından taşınmıştır (Xu vd., 2004; Vertelov vd., 2008; Zhang vd., 2008). Gümüş nanoparçacıkların sitoplazmik membranlarla etkileştiği ve hücrelerin içine nüfuz edebildikleri ayrıntılı mekanizma tam olarak belirlenmemiştir (Raffi vd., 2008).

Gümüş nanopartiküller tarafından *E. coli* membran hasarının önerilen başka bir mekanizması, metal tükenmesi, yani dış zarda düzensiz şekilli çukurların oluşumu ve LPS moleküllerinin ve zar proteinlerinin ilerleyici salınımı ile zar geçirgenliğinde değişiklik ile ilgilidir (Soni ve Salopek-Soni, 2004). Bu Gram negatif bakteriler için oldukça genel olabilir. *P. aeruginosa*'nın MexAB-OprM sistemi gibi ekstrüzyon pompa sistemlerinin de canlı hücrelerde gümüş nanoparçacıkların birikimini kontrol etmede önemli bir rol oynayabileceği bildirilmiştir (Xu vd., 2004).

Etkileşim mekanizmasına rağmen, bakteri hücre zarlarına bağlanan gümüş nanopartiküllerin geçirgenliği arttırdığı ve solunumu bozduğu açıktır. Proteomik veriler, gümüş nanopartiküllere maruz kaldıktan sonra *E. coli* hücrelerinde zarf protein öncülerinin birikimini gösterir (Lok vd., 2006).

1.3.2. Nanogümüşün Biyofilm Üzerindeki Etkisi

Biyofilmler, esas olarak ekzopolisakkaritlerden (EPS) oluşan kendi kendine üretilen ekzopolimer matrislerine gömülü mikrobiyal konsorsiyumlardır. Bu matrislerde yaşayan mikroplar besin ve su kaynaklarından yararlanır (Goller ve Romeo, 2008); geliştirilmiş yanal gen transferi (Maha ve O'Toole, 2001); ve deterjanlar, dezenfektanlar ve antibiyotikler dahil kuruma ve kimyasallar gibi olumsuz çevresel koşullara karşı koruma (Stewart ve Costerton, 2001; Costerton, 2007) sağlar.

Son yıllarda nanopartiküllerin (NP'ler) çeşitli alanlardaki uygulamaları önemli ölçüde genişlemiştir. NP'ler, tıbbi ve farmasötik nanomühendislikte, terapötik ajanların dağıtımı için (Zhang vd., 2008), kronik hastalık teşhisinde ve sensörlerde (Hong vd., 2008) başarıyla kullanılmıştır. AgNP'ler, planktonik formda geniş bir bakteri ve mantar türlerinin büyümesine karşı spesifik olmayan etkili antimikrobiyal ajanlardır (Kim vd., 2007; Martínez-Gutierrez vd., 2010). Antimikrobiyal aktiviteleri, AgNP'lerin yüksek yüzey alanı, kütle oranı, yüksek reaktivite ve nanometre aralığındaki boyutlar gibi benzersiz fiziko-kimyasal özelliklerine atfedilir ve bu da onlara çoklu karşı alternatif ürünlerin geliştirilmesi için büyük bir avantaj sağlar (Martínez-Gutierrez vd., 2012; Park vd., 2011; Elechiguerra vd., 2005).

AgNP'lerin *Pseudomonas aeruginosa*'nın büyümesini engelleyebildiği ve ayrıca biyofilm matrisinde yaşayan hücreler için öldürücü olduğu görülmüştür (Stewart, 2003). Bu da AgNP'lerin mikrobiyal kolonizasyonu ve biyofilm oluşumunu önlemek için tıbbi cihazlara gömülebileceğini düşündürmektedir.

Kanıtlanmış antimikrobiyal aktiviteye sahip metal nanopartiküller arasında, gümüşten yapılanlar özellikle etkili bakterisidal ajanlardır (Seil ve Webster, 2012). Gümüşün antibakteriyel özellikleri uzun zamandır bilinmektedir ve bu metalin (AgNP'ler) nanoparçacıklarının gümüş iyonlarından daha az toksik olduğuna inanılmaktadır. Çalışılan çeşitli nano-gümüş aktivitelerinin karşılaştırılması, kullanılan parçacıkların kimyasındaki ve fiziksel özelliklerindeki farklılıklardan dolayı zordur. Ayrıca AgNP'lerin bakterisidal etkisi partiküllerin boyutuna ve şekline bağlıdır (Panáček vd., 2006; Pal vd., 2007). Nanopartiküllerin biyolojik aktivitesini etkileyen diğer özellikler, zeta potansiyeli ve partikül kimyasıdır, birincisinin partiküllerin hücreye nüfuz etme kabiliyetinde önemli bir rol oynaması muhtemeldir (Seil ve Webster, 2012). Antibakteriyel etkinin birçok mekanizması vardır, ancak bu konudaki mevcut bilgi eksikliğinden dolayı, AgNP'lerin aktivitesinin kesin temeli hala karakterize edilmemiştir. Bazı çalışmalar AgNP'lerin su varlığında Ag+iyonları saldıgını göstermiştir (Santoro vd., 2007; Asharani vd., 2008). Lok ve arkadaşları, gümüşün

yaklaşık %12'sinin iyonik formda bulunduğunu ve oksidasyon tabakasıyla sıkı bir şekilde ilişkili olduğunu hesapladılar (Lok vd., 2007). Ancak, deneysel tasarımları AgNP'lerin ve çözünmüş Ag⁺ iyonlarının etki mekanizmalarını ayırt etmeyi zorlaştırmaktadır. Bu nedenle nano-gümüşün hücre zarı yüzeyine tutunarak ve hücre potansiyelini değiştirerek bakteri zarı geçirgenliğini etkilediği öne sürülmüştür. Bakterilerin içinde çok sayıda nanopartikülün gözlemlenmesi, bunun antibakteriyel mekanizma için önemli olduğunu düşündürmektedir (Morones vd., 2005).

E. coli hücrelerinin proteomik analizi (2-DE ve MS tanımlaması), AgNP'lere kısa süreli maruz kalmanın, proton hareket kuvvetinin dağıldığının göstergesi olan zarf öncüllerinin birikmesiyle sonuçlandığını ortaya çıkarmıştır. Ekspresyonunun AgNP'ler tarafından 1.8 kattan fazla uyarıldığı bulunan proteinler, moleküler şaperonlar olarak görev yapan inklüzyon gövdesi bağlayıcı proteinler A ve B (IbpA ve IbpB) ve 30S ribozomal alt birim proteini S6'dır (Lok vd., 2007). Ayrıca, AgNP'lerin bakteriyel membran proteinleri, hücre içi proteinler, DNA'daki fosfat kalıntıları ile etkileşime girdiği ve hücre bölünmesine müdahale ederek bakteriyel hücre ölümüne yol açtığı gösterilmiştir (Sondi ve Salopek-Sondi, 2004; Xu vd., 2004). Nanopartikül yüzeylerinden salınan biyosidal Ag⁺ iyonlarının mevcudiyeti, hücreyi toksik etkilerden koruyan, ancak aynı zamanda replikasyon kabiliyetini de tehlikeye atan bakteriyel DNA konglomerasyonu savunma mekanizmalarını harekete geçirir. Bu nedenle iyonik gümüş ve nanopartiküllere karşı mikrobiyal tepkiler farklıdır ve AgNP'lerin antibakteriyel aktivitesinin tam olarak anlaşılması için her ikisinin de bilgisi gereklidir.

Bir çalışmada hidrolize kazein peptitleri tarafından stabilize edilen AgNP'lerin (yaklaşık 8 nm çapında), bazı Gram-negatif bakteriler tarafından biyofilm oluşumunu güçlü bir şekilde inhibe ettiğini bulunmuştur. AgNP konsantrasyonu mililitre başına 5 ila 10 mikrogram arasında olduğunda *E. coli*, *P. aeruginosa* ve *Serratia proteamaculans* biyofilmlerindeki bakteri kütlelerinde bir azalma gözlemlenmiştir (Radzig vd., 2013). Farklı bir çalışmada ise 1-2 mM gibi çok düşük konsantrasyonlarda nişasta ile stabilize edilmiş nanopartiküllerin (çap olarak yaklaşık 20 nm), *P. aeruginosa* ve *S. aureus* biyofilm oluşumunu sırasıyla %65 ve %88 oranında azalttığını gösterilmiştir (Mohanty vd., 2012).

Gümüş nanopartiküller, daha önce gösterildiği gibi, geleneksel antibiyotiklerin anti-bakteriyel ve anti-biyofilm aktivitesini de artırabilir. Biyofilm canlılığını standart gümüş hidrojelinden daha etkili bir şekilde azalttığını göstermiştir.

2. YAPILAN ÇALIŞMALAR

2.1. Materyal

2.1.1. Alet ve Ekipmanlar

Çalışmada kullanılan, Gümüşhane Üniversitesi, Mühendislik ve Doğa Bilimleri Fakültesi, Genetik ve Biyomühendislik Bölümü Laboratuvarında bulunan cihazlar şunlardır:

- Buzdolabı (Beko, Türkiye),
- Buz makinesi (Scotsman Ice, Italia),
- Çalkalayıcı inkübatör (Shel Lab, USA),
- Diktip otoklav (Hirayama, Japan),
- Distile su cihazı (mes, Türkiye),
- Elektroforez Güç Kaynağı (BIO-RAD, USA),
- Elektroforez tankı (Scie-Plas HU10 Mini, England),
- Etüv (Daihan, Türkiye),
- Hassas terazi (Kern ABJ-NM/ABS-N, England),
- Manyetik karıştırıcı (IKA RH Basic 2, Germany)
- Mikrodalga fırın (Altus, Türkiye),
- Otomatik pipetler (Eppendorf, Germany)
- Santrifüj (Allegra, Germany),
- Steril Kabin,
- Termal döngü cihazı (Thermo scientific, USA),
- Thermo-Shaker inkübatör (Thermo Scientific, USA),
- UV illüminatör (Herolab, Germany),
- Vorteks (Heidolph, Germany),

Genetik ve Biyomühensilik Laboratuvarında bulunan erlenmayer, mezür, beher, pöze, jel dökme tepsisi ve tarak, petri, deney tüpü, eküvyon çubuğu, tüplük ve parafilm kullanıldı.

2.1.2. Kimyasallar, Enzimler, Vektörler ve Kitler

Kullanılan kimyasallar:

Agar (Liofilchem, Ital), Agaroz (Sigma, USA), Gliserol (ADR), dNTP (Solis Bıodyn), DNA ladder (Promega), MgCl₂ (GeneON), Etidyum bromür (PanReac AppliChem, Germany), Etanol (Alkomed, Türkiye), NaCl, Tripton (Pronadisa, Spain), Buffer (GeneON), Ampisilin, KCl, Tris, CaCl₂.2H₂O (Sigma), KCO₂CH₃ (Sigma), IPTG (Sigma), X-gal (Sigma), EDTA, Glasiyal asetik asit (Merck), Kristal viyole (Merck).

Kullanılan enzimler:

Taq DNA polimeraz (GeneON).

Kullanılan kitler ve vektörler:

pGEM-T Easy klonlama kiti ,Plazmid DNA izolasyon kiti (Thermo Fisher Scientific, ABD) kullanıldı.

2.1.3. Besiyerlerinin Hazırlanması

LB (Luria-Bertani): 5 g yeast, 10 g tripton, 5 g NaCl hassas terazide tartıldı. Çözeltiler 1000 ml saf suda çözüldü. 90 dk süreyle 121°C’de otoklav cihazında steril edildi.

Ampisilinli LB (Luria-Bertani): 10 g tripton, 5 g yeast, 5 g NaCl hassas terazide tartıldı. Çözelti 1000 ml saf suda çözüldü. 90 dk’ 120°C’de otoklavlandı. Steril edildikten sonra, sıcaklık 55°C’ye düşünce çözelti içine 1000 µl ampisilin eklendi.

LB (Luria-Bertani) Agar: 5 g yeast, 10 g tripton, 5 g NaCl, 15 g agar hassas terazide tartıldı. 1000 ml saf suda çözüldükten sonra 90 dk boyunca 120°C’de otoklav cihazında steril edildi. Sıcaklık 55°C’ye düştükten sonra petri plaklarına 4 mm kalınlığında döküldü ve donduruldu.

Ampisilinli LB (Luria-Bertani) Agar: 10 g tripton, 5 g yeast, 5 g NaCl, 15 g agar hasaas terazide tartıldı ve 1000 ml saf suda çözüldü. 90 dk boyunca 120°C’de otoklavlandı. Steril edildikten sonra sıcaklık 55°C’ye düşünce 1000 µl ampisilin eklendi Petri kaplarına 4 mm kalınlığında ampisilinli LB besiyeri döküldü.

2.1.4. Çözeltiler ve Tampon Solüsyonlarının Hazırlanışı

Primerlerin hazırlanması: Liyofilize halde bulunan primerler steril saf su ile hazırlandı. Her bir primerin konsantrasyonu 10 pmol/µl olacak şekilde tüplere stok çözeltilerden 10 µl eklendi ve üzerine 90 µl steril saf su ilave edilerek primerler hazırlandı. Hazırlanan primerler -20°C’de saklanarak muhafaza edildi.

1X TAE'nin Hazırlanışı: 980 ml steril deiyonize su üzerine 20 ml 50X TAE'den eklenerek hazırlandı.

%1 Agaroz Jel hazırlanması: 80 ml 1X TAE tamponuna 0.8 gram agaroz eklendi ve mikrodalga fırında yaklaşık 2 dk bekletildi. Daha sonra 2 µl etidyum bromür eklenerek jel tepsisine aktarıldı

%1 Kristal viyole: 1 g Kristal viyole, %95'lik Etil alkol (etanol) kullanılarak hazırlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. Gram Negatif Bakteri İzolatının Temini ve Antibiyotik Dirençliliği Tanımlanması

Çalışmaya 2021 yılında Bayburt Devlet Hastanesi'nden temin edilen idrar, aspirat, balgam, kan, yara, kulak kültürü olmak üzere 188 Gram negatif klinik suş dahil edilmiştir. Tüm klinik izolatlar biyokimyasal yöntemler ile tanımlanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi için kullanılan antibiyotikler; sefepim, amoksisilin -klavulanik asit, seftazidim, nitrofurantoin, sefiksim, gentamisin, sefotaksim, sefoksitin, sefuroksim, piperasilin-tazobaktam, ampisilin, seftriakson, tobramisin, fosfomisin, amikasin, siprofloksasin, levofloksasin, sülfametoksazol-trimetoprim, meropenem, ertepenem, imipenem, ampisilin-sulbaktam, piperasilindir. Antibiyotik duyarlılık testleri, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmış ve EUCAST standartlarına göre değerlendirilmiştir.

2.2.2. İzolatların Stoklanması

İzolatlardan birer koloni seçilerek 3 ml antibiyotiksiz Luria-Bertani (LB) besiyerine ekildi. Gece boyu 16 saat 37°C'de etüvde inkübe edildi. Bakteriyel süspansiyonların 800'er µl'si alındı ve % 20'lik gliserol stoklar hazırlandı. Stoklar -20°C'de saklandı (Iraz vd., 2015).

2.2.3. Genomik DNA İzolasyonu

3 ml gece kültürü 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj edildi. Pellete 1000 µl saf su eklendi ve vortekslendi. Daha sonra 2 dk boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edildi. 1000 µl saf su tekrar pellet üzerine eklendi. Yeniden vortekslendi. Vortekslendikten sonra 10 dk boyunca 100°C'de kaynatıldı. Kaynatıldıktan sonra 2 dk boyunca 10.000 rpm'de santrifüj edildi. Tüpün üst kısmından 500 µl DNA alınıp PCR (Polimeraz Zincir

Reaksiyonu) reaksiyonlarında kullanılmak üzere tüplere aktarıldı. Örnekler saklanması için -20°C'ye yerleştirildi (Iraz vd., 2015; Özad Düzgün vd., 2019).

2.2.4. Antibiyotik Direnç Genleri, Virülans Faktör Genleri ve Sınıf 1

İntegronların Tespiti

Virülans genleri (pap, sfa, afa, hly, aer ve cnf), β -laktamaz kodlayan genler (*bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{IMP} and *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}), fosfomisin direnç genleri (fosA, fosC2 ve fosA3), kinolon direnç genleri (qnrA, qnrB ve qnrS) ve sınıf 1 integron gen kasetleri primerleri kullanılarak araştırıldı. PCR karışımı; 5 μ l genomik DNA, her primerden 20 pM, 5 μ l reaksiyon tamponu, 3 μ l 25mM MgCl₂, 2.5 μ l 4mM dNTP ve 0.5 U Taq DNA Polimeraz (GeneON) ve 50 μ l nihai hacimde hazırlandı (Iraz vd., 2015; Özad Düzgün vd., 2019).

2.2.5. Agaroz Jel Elektroföresi ve Görüntüleme

PCR ürünlerini görüntülemek için agaroz jel elektroföresi ile yapıldı. Hazırlanan %1'lik agaroz jele PCR ürünlerinden 5 μ l ve 3 μ l yükleme tamponu ile pipetaj yapılarak yüklendi. Örnekler 90 voltta yürütüldü. Sonuçlar UV'de gözlemlendi (Iraz vd., 2015; Özad Düzgün vd., 2019).

2.2.6. Kompetent Hücrelerin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan *E. coli* DH5 α kompetent hücreler kalsiyum klorür yöntemi kullanılarak hazırlandı. *E. coli* DH5 α 3 ml LB besiyerine tek bir koloni seçilerek ekim yapıldı. Sıvı kültürü 37°C'de gece boyunca 200 rpm'de üretildi. Hazırlanan gece kültürünün yoğunluğu 600 nm'de ölçüldü ve OD'si 0.1 olacak şekilde yeniden 30 ml LB besiyerine ekim yapıldı. Optik yoğunluk 600 nm'de 0.4–0.6 arasına ulaştıktan sonra hücreler 5 dk 4°C'de 4000 rpm'de santrifüj edilerek toplandı. Hücre pelletinin 10 ml soğuk 0.1 M CaCl₂ ilave edilerek çözünmesi sağlandı. CaCl₂ ilavesinin ardından hücreler buz üzerinde 30 dk bekletildi. Daha sonra 5 dk boyunca 4°C'de 4000 rpm'de santrifüj edildi. Pellet 2 ml 0.1 M CaCl₂ çözeltisinde süspanse edildi 2-24 saat bekletildikten sonra kullanıldı (Çiçek vd., 2014).

2.2.7. PCR Sonucunda Pozitif Çıkan *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} Genlerinin pGEM-T Easy Vektörüne Klonlanması

PCR sonucu pozitif çıkan *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} genlerinin pGEM-T Easy vektörüne ligasyonu sağlandı. Ligasyon reaksiyonunu hazırlamak için 2 μ l 2X T4

ligasyon tamponu, 4 µl hacimde 0.2 µl pGEM-T easy (10 ng) vektörü, 0.2 µl T4 DNA ligaz ve 1.6 µl PCR ürünü eklendi. Ligasyon ürünü 4 µl hacimde hazırlanarak 16 saat boyunca 16°C'de bekletildi. PCR ürünü bulunduran pGEM-T easy vektörünün 4 µl'si pipetlenerek *E. coli DH5α* kompetent hücrelerine kimyasal yollarla transforme edildi. Transferlerin seçimi için mavi-beyaz koloni tekniği uygulandı. Bu tekniğe göre AMP'li LB agar üzerine 40 µl IPTG ve 40 µl X-gal yayıldı. Hücreler bu petriler üzerine ekildi. Gece boyunca 37°C'de bekletildi. Petrilerde oluşan mavi-beyaz kolonilerden beyaz kolonilerin seçimi yapıldı (Çiçek vd., 2014).

2.2.8. Plazmid İzolasyonu

Ayrı tüplere her koloni 3 ml AMP'li LB besiyeri koyuldu. Pens ucu ile tutulan pipet ucuyla tüpler içine seçimi yapılan koloniler ekildi. 16 saat 37°C'de üretilmesi için bekletildi. Üretme işleminden sonra eppendorf tüplere aktarım yapıldı. Kültürler 2 dk süresince 12.000 rpm'de santrifüj edildi. Sonra DNA izolasyonu bakteri pelletinden GeneJET Plazmid Miniprep kitindeki protokole göre plazmid yapıldı. Elde edilen plazmid DNA'lar %1'lik agaroz jelde yürütüldü. Rekombinant plazmitler dizileme için Sentegen'e (Ankara) gönderildi. Dizi sonuçları biyoinformatik programları kullanılarak değerlendirildi (Çiçek vd., 2014).

2.2.9. Mikrodilüsyon Yöntemi ile Rumex Gümüş Nanopartiküllerin Minimum İnhibitör Konsantrasyonlarının (MİK) Belirlenmesi

Bu çalışmada daha önce yeşil sentez ile üretilmiş ve karakterize edilmiş Rumex gümüş nanoparticle (yayınlanmamış veri) kullanıldı. Rumex gümüş nanopartikülünün minimum inhibitör konsantrasyonu sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile belirlendi. Rumex sulu gümüş nanopartikül konsantrasyonu 500-67.5 ug/ml olarak hazırlandıktan sonra deneyler 96 oyuklu bir plakada üç kopya halinde yapıldı. Kontrol olarak *E. coli DH5α* kullanıldı. Suşların biyofilm oluşumuna etkisinin araştırılmasında elde edilen MİK değerleri referans olarak kullanıldı (Çimen ve Özad Düzgün, 2021).

2.2.10. Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Tayini

188 Suşunun biyofilm kantitatif analizi, yarı kantitatif kristal mor boyama kullanılarak yapıldı. Mueller-Hinton Agar (MHA) ortamına aşıl原因an suşlar gece boyunca 37°C'de inkübe edildikten sonra, koloniler tek tek alınarak LB ortamı ile karıştırıldı ve 96 kuyucuklu plakanın her bir kuyucuğuna 200 µl süspansiyon ilave edildi. Her numune için 3 tekrar yapıldı. Plakalar 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Kuyucuklardaki bakteri süspansiyonları inkübasyondan sonra dökülerek plakalar üç kez distile su ile yıkandı. Yıkandıktan sonra her bir kuyucuğa 200 ml %1 kristal viyole boya eklenerek oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. Her kuyucuğa 200 ml %95 etanol eklendikten sonra, optik absorbans (A) değeri 620 nm'de spektrometrede okundu. Kontrol olarak *E.coli DH5a* kullanıldı. Suşların biyofilm oluşumu kontrolün (Ac) OD değerine göre 4 farklı grupta değerlendirildi: (1) negatif (-), $A \leq AC$; (2) zayıf pozitif (+), $Ac < A < 4Ac$ (Çimen ve Özad Düzgün, 2021).

2.2.11. Rumex Gümüş Nanoparçacıklarının Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Suşlar üzerinde MİK değeri belirlenen Rumex gümüş nanoparçacığının orta ve güçlü biyofilm oluşturan suşların biyofilm oluşumuna etkisini araştırmak için kullanıldı. Rumex gümüş nanopartikülün Mik değeri 250µl/mg mikrolitre olarak belirlendikten sonra iki farklı konsantrasyon (125-67.5) µl/mg) biyofilm deneylerinde kullanıldı. Deneyler, 96 oyuklu plakalar üzerinde üç kopya halinde yapıldı. Inkübasyondan sonra, daha önce bahsedilen biyofilm oluşumunun kantitatif tayini yöntemi uygulanmıştır (Çimen ve Özad Düzgün, 2021).

3. BULGULAR

3.1. İzolatların Temini ve Tanımlanması

2021 yılında Türkiye’de Bayburt Devlet Hastanesi’nden 188 suşun 149'u (%79.25) idrardan, 17'si (%9.04) aspirattan, 13'ü (%6.91) balgamdan, 5 (%2.65) kandan, 2'si (%1.069) yaralardan ve 2'si (%1.06) kulak kültürlerinden izole edilmiştir. 188 izolat arasında 129 (%67.55) *E.coli*, 12 (%6.38) *Enterobacter spp.* 15 (%7.97) *Acinetobacter baumannii*, 3 (%1.59) *Citrobacter freundii*, 11 (%5.85) *Klepsiella spp.* 5 (%2.65) *Klepsiella pneumoniae*, 2 (%1.06) *Klepsiella oxytoca*, 3 (%51.59) *Proteus spp.*, 6 (%3.19) *Proteus mirabilis*, 2 (%1.06) *Pseudomonas spp.* izolatı tanımlanmıştır.

3.2. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

İzolatların sefepim, amoksisilin -klavulanik asit, seftazidim, nitrofurantoin, sefiksim, gentamisin, sefotaksim, sefoksitin, sefuroksim, piperasilin-tazobaktam, ampisilin, seftriakson, tobramisin, fosfomisin, amikasin, siprofloksasin, levofloksasin, sülfametoksazol-trimetoprim, meropenem, ertepenem, imipenem, ampisilin-sulbaktam, piperasilin antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları belirlendi.

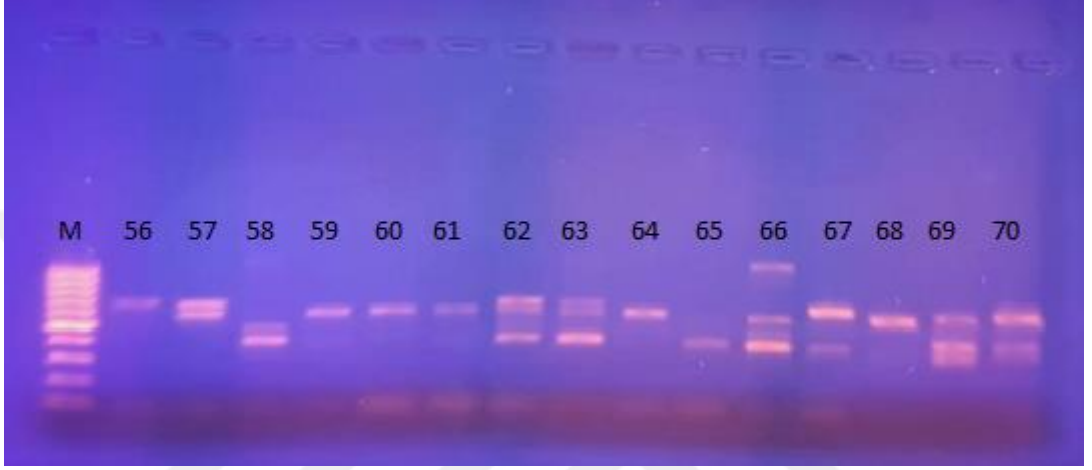
Toplamda suşların sefipime %37.76, amoksisilin -klavulanik asite %52.12, seftazidime %38.29, nitrofurantoin %34.57, sefiksim %46.27, gentamisine %27.65, sefotaksime %43.08, sefoksitine %35.10, sefuroksime %44.68, piperasilin-tazobaktama %30.31, ampisiline %97.34, seftriaksona %39.36, tobramisine %29.78, fosfomisine %29.78, amikasına %22.87, siprofloksasine %37.76, levofloksasine %35.63, sülfametoksazol-trimetoprim %47.34, meropeneme %20.74, ertepeneme %23.93, imipeneme %15.95, ampisilin-sulbaktama %92.02 - ve piperasiline karşı %0.53 direnç gösterdiği belirlendi (Tablo 1).

Tablo 1. Suşların antibiyotik direnç profilleri

Antibiyogram Adı	Toplam	<i>E.coli</i>	Enterobacter spp.	<i>A. baumannii</i>	Klepsiella spp.	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	Proteus spp.	<i>Proteus mirabilis</i>	Pseudomonas spp.
FEB	71(%37.76)	34(%26.35)	9(%75)	14(%93.33)	6(%54.55)	2(%40)	0	3(%100)	0	1(%16.66)	2(%100)
AMC	98(%52.12)	55(%42.63)	12(%100)	14(%93.33)	7(%63.63)	4(%80)	1(%50)	3(%100)	1(%33.33)	1(%16.66)	0
CAZ	72(%38.29)	33(%25.68)	9(%75)	15(%100)	7(%63.63)	2(%40)	1(%50)	3(%100)	0	1(%16.66)	1(%50)
F100	65(%34.57)	17(%13.17)	9(%75)	15(%100)	9(%81.81)	2(%40)	1(%50)	3(%100)	3(%100)	6(%100)	0
CFM	87(%46.27)	48(%37.20)	10(%83.33)	15(%100)	7(%63.63)	2(%40)	1(%50)	3(%100)	0	1(%16.66)	0
CN	52(%27.65)	18(%13.95)	9(%75)	15(%100)	3(%27.27)	1(%20)	1(%50)	2(%66.66)	1(%33.33)	1(%16.66)	1(%50)
CTX	81(%43.08)	42(%32.55)	9(%75)	15(%100)	8(%72.72)	2(%40)	1(%50)	3(%100)	0	1(%16.66)	0
FOX	66(%35.10)	26(%20.15)	12(%100)	15(%100)	6(%54.55)	1(%20)	1(%50)	3(%100)	1(%33.33)	1(%16.66)	0
CXM	84(%44.68)	43(%33.33)	9(%75)	15(%100)	9(%81.81)	2(%40)	1(%50)	3(%100)	1(%33.33)	1(%16.66)	0
TPZ	57(%30.31)	20(%1.55)	9(%75)	15(%100)	5(%45.45)	3(%60)	1(%50)	2(%66.66)	0	1(%16.66)	1(%50)
AM	183(%97.34)	126(%97.67)	12(%100)	15(%100)	11(%100)	5(%100)	2(%100)	3(%100)	3(%100)	6(%100)	0
CRO	74(%39.36)	37(%28.68)	9(%75)	15(%100)	6(%54.55)	2(%40)	1(%50)	3(%100)	0	1(%16.66)	0
TOB	56(%29.78)	20(%1.55)	9(%75)	15(%100)	4(%36.36)	2(%40)	1(%50)	2(%66.66)	1(%33.33)	1(%16.66)	1(%50)
FF200	56(%29.78)	19(%14.72)	6(%50)	13(%86.66)	9(%81.81)	2(%40)	0	3(%100)	1(%33.33)	3(%50)	0
AK	43(%22.87)	12(%9.30)	9(%75)	15(%100)	2(%18.18)	1(%20)	1(%50)	2(%66.66)	0	1(%16.66)	0
CİP	71(%37.76)	32(%24.80)	9(%75)	15(%100)	6(%54.55)	2(%40)	1(%50)	2(%66.66)	2(%66.66)	1(%16.66)	1(%50)
LEV	67(%35.63)	29(%22.48)	9(%75)	14(%93.33)	6(%54.55)	2(%40)	1(%50)	2(%66.66)	2(%66.66)	1(%16.66)	1(%50)
SXT	89(%47.34)	51(%39.53)	9(%75)	14(%93.33)	8(%72.72)	1(%20)	0	2(%66.66)	3(%100)	1(%16.66)	0
MEM	39(%20.74)	9(%6.97)	9(%75)	15(%100)	1(%9.09)	1(%20)	0	2(%66.66)	0	1(%16.66)	1(%50)
ETP	45(%23.93)	13(%10.07)	9(%75)	15(%100)	2(%18.18)	1(%20)	1(%50)	3(%100)	0	1(%16.66)	0
İPM	30(%15.95)	7(%5.42)	5(%41.66)	13(%86.66)	1(%9.09)	1(%20)	0	2(%66.66)	0	1(%16.66)	0
SAM	173(%92.02)	121(%93.79)	11(%91.66)	14(%93.33)	10(%90.90)	1(%20)	1(%50)	2(%66.66)	3(%100)	6(%100)	0
PRL	1(%0.53)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(%50)

3.2.1. Virülans Genlerinin Belirlenmesi

İzolatların PCR sonrası UV altında görüntüleme sonrası elde edilen verilere göre 188 suşun 121'inde virülans faktör gen tespit edildi (Şekil 7). En yüksek oranda *aer* 56 (%29.78) virülans faktör geni belirlendi. *Aer* virülans faktör genini sırasıyla 53 *sfa* (%28.19), 51 *afa* (%27.12), 40 *cnf* (%21.27), 24 *pap* (%12.76) ve 24 *hly* (%12.76) virülans faktör genleri takip etti.



Şekil 6. Virülans genlerinin jel görüntüsü (M=Marker, 56=afa, 57=afa+aer, 58=sfa+hly+aer+cnf, 59=sfa+aer, 60=aer+cnf, 61=sfa+aer, 62=sfa+afa+hly+cnf+ aer, 63= sfa+afa+hly+cnf, 64=aer, 65=sfa+hly+aer, 66= sfa+afa+hly+cnf, 67=sfa+ afa,68=aer, 69=pap+sfa+aer, 70=s

188 Gram negatif izolat arasında 35 farklı virülans faktör gen paterni belirlendi. 6 tekli, 11 ikili, 10 üçlü, 6 dördü ve iki beşli virülans faktör gen paterni (afa, aer , cnf , sfa , pap, pap+sfa , sfa+afa , aer+cnf , pap+afa , pap+hly , pap+aer , pap+ cnf , sfa+aer , sfa+cnf , afa+aer , afa+cnf , pap+afa+cnf , pap+sfa+aer , pap+sfa+cnf , pap+sfa+afa , sfa+afa+aer , sfa+ hly+aer , sfa+hly+cnf , afa+hly+aer , afa+aer+cnf , hly+aer+cnf), (pap+ sfa +afa+aer , pap+sfa+hly+cnf , pap+sfa+aer+cnf , sfa+hly+aer+cnf , afa+hly+aer +cnf , sfa+afa+hly+aer ,pap +sfa+afa+hly+cnf , sfa+afa+hly+aer+cnf) tespit edildi (Tablo 2).

Çalışılan virülans faktör genlerinden ***pap***; *E.coli*' de %13.17, *A. baumannii*'de %13.33, *Klepsiella spp*'de %36.36 ve *P. mirabilis* 'de %16.16, ***sfa***; *E.coli*'de %30.23, *Enterobacter spp*' de %16.66, *A. baumannii*'de %20, *Klepsiella spp*'de %18.18, *K. pneumoniae*'de %40, *C. freundii*'de %66.66 ve *P. mirabilis* 'de %16.16, ***afa***; *E.coli*'de %34.88, *Enterobacter spp*' de %8.33, *A. baumannii*'de %6.66, *Klepsiella spp*'de %36.36, *K. pneumoniae*'de %20 ve *P. mirabilis* 'de %16.16, ***hly***; *E.coli*'de %13.17, *C. freundii*'de %66.66, *Klepsiella spp*'de %27.27 ve *P. mirabilis* 'de %16.16, ***aer***;

E.coli'de %33.33, *Enterobacter spp*' de, %8.33, *A. baumannii*'de %13.33, *Klepsiella spp*'de %36.36, *K. pneumoniae*'de %20, *Proteus spp* 'de %33.33, *P. mirabilis* 'de %33.33 ve *C. freundii*'de %66.66, **cnf**; *E.coli*'de %24.03, *Enterobacter spp*' de %8.33, *A. baumannii*'de %6.66, *Klepsiella spp*'de %54.54, *C. freundii*'de %33.33, *P. mirabilis* 'de %16.16 oranlarında tespit edilmiştir (Tablo 3)

Tablo 2. Virülans faktör gen dağılımı

	Pap	sfa	afa	hly	aer	Cnf
Toplam - Adet	24	53	51	24	56	40
Toplam-Yüzdesi	%12.76	%28.19	%27.12	%12.76	%29.78	%21.27
<i>E.coli</i> -Adet	17	39	45	17	43	31
<i>E.coli</i> -Yüzdesi	%13.17	%30.23	%34.88	%13.17	%33.33	%24.03
<i>Enterobacter spp.</i> -Adet	0	2	1	0	1	1
<i>Enterobacter spp.</i> -Yüzdesi	0	%16.66	%8.33	0	%8.33	%8.33
<i>Acinetobacter baumannii</i> -Adet	2	3	1	1	2	1
<i>Acinetobacter baumannii</i> -Yüzdesi	%13.33	20%	%6.66	%6.66	%13.33	%6.66
<i>Klepsiella spp.</i> -Adet	4	4	2	3	4	6
<i>Klepsiella spp.</i> -Yüzdesi	%36.36	%36.36	%18.18	%27.27	%36.36	%54.54
<i>Klepsiella pneumoniae</i> -Adet	0	2	1	0	1	0
<i>Klepsiella pneumoniae</i> -Yüzdesi	0	40%	20%	0	20%	0
<i>Citrobacter freundii</i> -Adet	0	2	0	2	2	1
<i>Citrobacter freundii</i> -Yüzdesi	%	%66.66	%	%66.66	%66.66	%33.33
<i>Proteus spp.</i> -Adet	0	0	0	0	1	0
<i>Proteus spp.</i> -Yüzdesi	0	0	0	0	%33.33	0
<i>Proteus mirabilis</i> -Adet	1	1	1	1	2	1
<i>Proteus mirabilis</i> -Yüzdesi	%16.66	%16.66	%16.66	%16.66	%33.33	%16.66

Tablo 3. Virülans faktör gen paternleri

o	Bakteri Virulans Genler	Toplam	<i>E.coli</i>	<i>Enterobacter</i> <i>spp.</i>	<i>Acinetobacter</i> <i>baumannii</i>	<i>Klepsiella</i> <i>spp.</i>	<i>Klepsiella</i> <i>pneumoniae</i>	<i>Citrobacter</i> <i>freundii</i>	<i>Proteus</i> <i>mirabilis</i>
1	pap+cnf	1(%0.53)	0	0	0	1 (%9.09)	0	0	0
2	pap+aer	4(%2.12)	2(%1.55)	0	1(%25)	0	0	0	1(%16.66)
3	pap+afa	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
4	pap+sfa	2(%1.06)	2(%1.55)	0	0	0	0	0	0
5	pap+hly	1(%0.53)	0	0	0	1 (%9.09)	0	0	0
6	aer+cnf	5(%2.65)	3(%2.32)	0	0	2(%18.18)	0	0	0
7	sfa+aer	9(%4.78)	5(%3.87)	1(%8.33)	0	2(%18.18)	1(%20)	0	0
8	afa+aer	3(%1.59)	3(%2.32)	0	0	0	0	0	0
9	sfa+afa	7(%3.72)	6(%3.19)	0	1(%25)	0	0	0	0
10	sfa+cnf	2(%1.06)	1(%0.77)	1(%8.33)	0	0	0	0	0
11	afa+cnf	4(%2.12)	3(%2.32)	0	0	0	0	0	1(%16.66)
12	afa+hly+aer	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
13	sfa+hly+aer	3(%1.59)	1(%0.77)	0	0	0	0	1(%33.33)	1(%16.66)
14	pap+sfa+aer	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
15	pap+sfa+afa	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
16	pap+sfa+cnf	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
17	aer+cnf	2(%1.06)	2(%1.55)	0	0	0	0	0	0
18	sfa+hly+cnf	4(%2.12)	4(%3.10)	0	0	0	0	0	0
19	sfa+afa+aer	3(%1.59)	3(%2.32)	0	0	0	0	0	0
20	pap+afa+cnf	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
21	hly+aer+cnf	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
22	sfa+hly+aer+cnf	4(%2.12)	2(%1.55)	0	1(%9.09)	0	0	1(%33.33)	0
23	sfa+afa+hly+aer	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
24	afa+hly+aer+cnf	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
25	pap+sfa+afa+aer	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
26	pap+afa+aer+cnf	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
27	pap+sfa+hly+cnf	3(%1.59)	3(%2.32)	0	0	0	0	0	0
28	sfa+afa+hly+aer+cnf	1(%0.53)	1(%0.77)	0	0	0	0	0	0
29	pap+sfa+afa+hly+cnf	4(%2.12)	2(%1.55)	0	0	2(%18.18)	0	0	0

3.2.2. Sınıf 1 İntegronların PCR ile Belirlenmesi

Sınıf 1 integronlara özgül primer çiftleri kullanılarak yapılan 188 Gram negatif izolattan PCR sonucunda toplamda 167 Gram negatif izolatının sınıf 1 integron (%88.82) taşıdığı tespit edildi. PCR pozitif sınıf 1 integronların agaroz jel görüntüsü Şekil 8’de gösterilmektedir.



Şekil 7. Sınıf 1 integron pozitif örneklerinin jel görüntüleri.

E.coli de %90.69, *Enterobacter spp.* de %91.66, *Acinetobacter baumannii* de 100%, *Klebsiella oxytoca* da 50%, *Klebsiella spp.* de %90.90, *Klebsiella pneumoniae* de 100%, *Citrobacter freundii* de 100%, *Proteus spp.* de 100%, *Proteus mirabilis* de %66.66, *Pseudomonas spp.* de 100% Sınıf-1 integron geni tespit edilmiştir (Tablo 4).

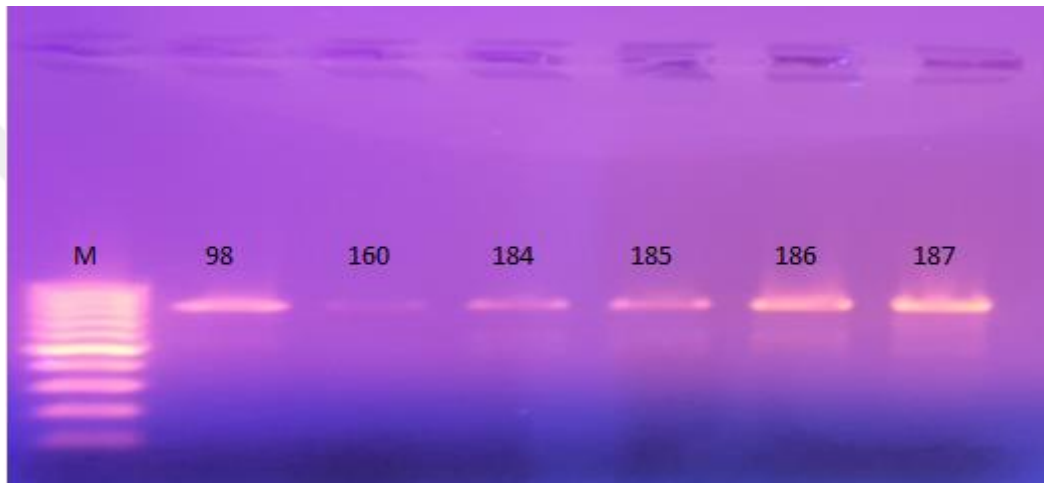
Tablo 4. Sınıf 1 integron taşıyan izolatlar

	Sınıf-1 integron Adet	Sınıf-1 integron Yüzde
Toplam	167	%88.82
<i>E.coli</i>	117	%90.69
<i>Enterobacter spp.</i>	11	%91.66
<i>Acinetobacter baumannii</i>	11	100%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	1	50%
<i>Klebsiella spp.</i>	10	%90.90
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	5	100%
<i>Citrobacter freundii</i>	3	100%
<i>Proteus spp.</i>	3	100%
<i>Proteus mirabilis</i>	4	%66.66
<i>Pseudomonas spp.</i>	2	100%

3.2.3. Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi

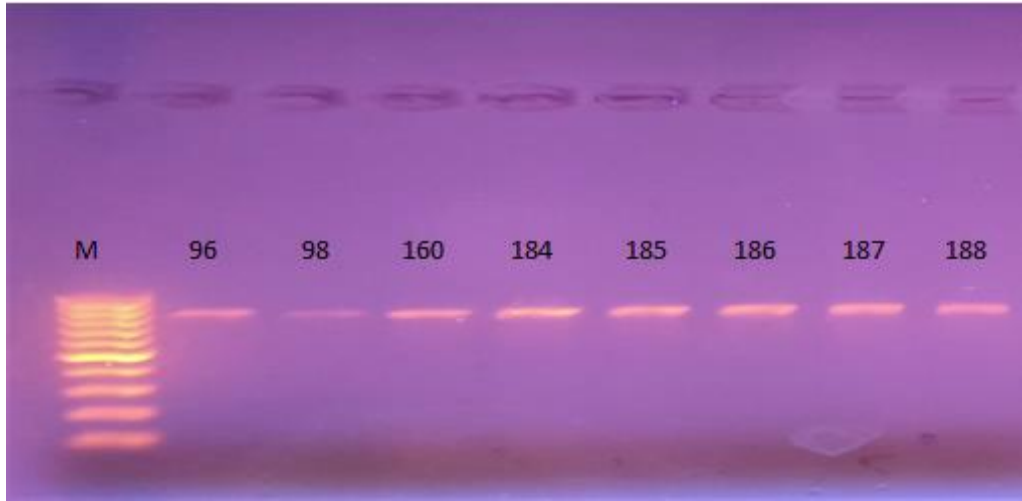
Fosfomisine dirençli 51 suшта fosA, fosC2 ve fosA3 genlerinin varlığı araştırılmış ve suşlar arasında pozitif gen belirlenmemiştir. Kinolon grubu antibiyotiklere dirençli 67 izolatta plazmit aracılı kinolon direnci genleri olan qnrA, qnrB ve qnrS araştırılmış ve 15 suşun plazmit aracılı kinolon direnç genlerini taşıdığı tespit edilmiştir.

Karbapenem dirençli 41 izolatta *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-40}, *bla*_{OXA-51}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{VIM} genleri araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre 16 suşun OXA-23 (Şekil 9) ve 19 suşun OXA-51 (Şekil 10) beta laktamaz taşıdığı belirlenmiştir. OXA-23 taşıyan suşlar; *A. baumannii* (n=13), *E.coli* (n=2) ve *K.oxytoca* (n=1).

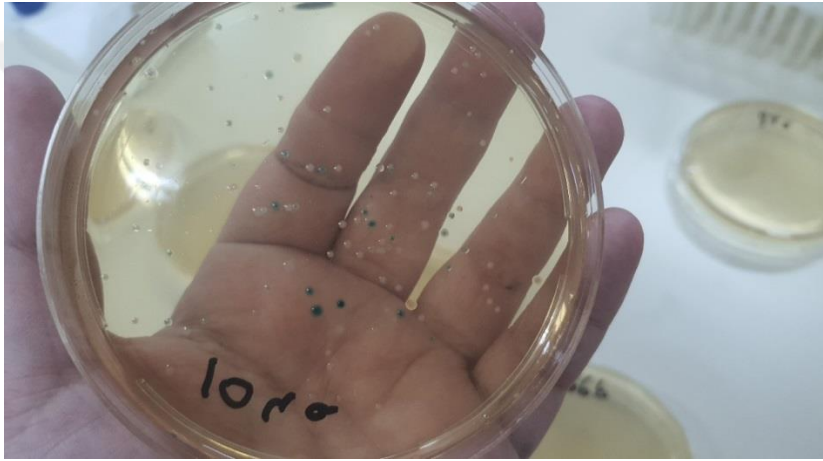


Şekil 8. *bla*_{OXA-23} gen pozitif örnekler (M=Marker ve pozitif suş numaraları)

OXA-51 beta laktamaz üreten suşlar ise; *A. baumannii* (n=15), *E.coli* (n=2), *K.oxytoca* (n=1) ve *P. mirabilis* (n=1). Pozitif örnekler vektöre ligasyonu yapılmış *E.coli* Dh5α hücrelerine transformasyonu gerçekleştirilmiştir (Şekil 11). Transformasyon sonrası izole edilen plazmitler sekans analizine gönderilmiştir. Dizi analizi biyoinformatik programlar kullanılarak yapılmış ve tüm örneklerin *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} olduğu tespit edilmiştir. Araştırılan diğer beta laktamaz genlerinin varlığı karbapenem dirençli suşlarda görülmemiştir.



Şekil 9. *bla*_{OXA-51} gen pozitif örnekler (M=Marker ve pozitif suş numaraları)



Şekil 10. Transformasyon sonucu mavi-beyaz koloni oluşumu

3.2.4. Biyofilm Oluşumunun Kantitatif Olarak Belirlenmesi

Klinik Gram negatif bakterilerin virölansla ilgili en önemli özelliklerinden biri biyofilm oluşturma yeteneğidir. Bu nedenle, izolatların biyofilm oluşturma kapasitesi belirlenmiştir. Biyofilm oluşturmalarının kantitatif değerinin OD620 de üç tekrarlı okuma ile elde edilen ortalama değerin 0.1272 olduğu tespit edildi. Bu sonuç doğrultusunda da suşların 71'i zayıf pozitif (%37.76), 13'ü orta derece pozitif (%6.91), 3 izolatta kuvvetli pozitif (%1.59) biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. 101 izolatın ise biyofilm oluşturma kabiliyetinin olmadığı görülmüştür (Tablo 5).

Tablo 5. Suşların biyofilm oluşturma kabiliyetleri

Biyofilm Oluşturma Kabiliyeti	Sayısı	Yüzde Değeri
NEGATİF	101	%53.72
ZAYIF POZİTİF	71	%37.76
ORTA DERECE POZİTİF	13	%6.91
KUVVETLİ POZİTİF	3	%1.59

E.coli izolatları arasında 46 suşun zayıf pozitif (%35.65), 5 suşun orta derece pozitif (%3.87) ve 1 suşun ise kuvvetli pozitif (%0.77) biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. 4 *Enterobacter spp.* suşunun zayıf pozitif (%33.33) biyofilm oluşturduğu görülmüştür. *A. baumannii* suşlarının elliüçü zayıf pozitif (%23.66), altısı orta derece pozitif (%5.2) ve bir izolatın kuvvetli pozitif (%0.2) biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir. *C. freundii* suşlarında 2'sinin zayıf pozitif (%66.66) biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir. *Klebsiella spp.* izolatlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri 3 zayıf pozitif (%27.27), 1 orta derece pozitif (%9.09) ve 1 kuvvetli pozitif (%9.09) olarak belirlenmiştir. *K. pneumoniae* suşlarının 1'nin orta derece pozitif (%20) ve 3'nün zayıf pozitif (%60) biyofilm oluşturduğu görülmüştür. 2 *K. oxytoca* suşunun zayıf pozitif (%100) biyofilm oluşturduğu tespit edildi. 2 zayıf pozitif (%66.66) biyofilm oluşturan *Proteus spp* suşu belirlendi. *Proteus mirabilis* suşları arasında ise 4 zayıf pozitif (%66.66) biyofilm oluşturan izolat tespit edilmiştir. Ayrıca *Pseudomonas spp.* suşlarının biyofilm oluşturmadağı görülmüştür. Tablo 6'da suşların biyofilm oluşturma kabiliyetleri gösterilmiştir.

Tablo 6. Farklı izolatların biyofilm oluşturma değerleri

NO	BAKTERİ ADI	NEGATİF BİYOFİLM	ZAYIF POZİTİF Biyofilm	ORTA DERECE POZİTİF Biyofilm	KUVVETLİ POZİTİF Biyofilm
1	<i>E.coli</i>	77(%59.68)	46	5(3.87)	1(%0.77)
2	<i>Enterobacter spp.</i>	8(%66.66)	4(%33.33)	0	0
3	<i>Acinetobacter baumannii</i>	3(%20.2)	5(%23.66)	6(%5.2)	1(%0.2)
4	<i>Citrobacter freundii</i>	1(%33.33)	2 %66.66	0	0
5	<i>Klepsiella spp.</i>	6(%54.54)	3(%27.27)	1(%9.09)	1(%9.09)
6	<i>Klepsiella pneumoniae</i>	1(%20)	3(%60)	1(%20)	0
7	<i>Klepsiella oxytoca</i>	0	2(%100)	0	0
8	<i>Proteus spp.</i>	1 (%33.33)	2(%66.66)	0	0
9	<i>Proteus mirabilis</i>	2 (%33.33)	4 %66.66	0	0
10	<i>Pseudomonas spp.</i>	2(%100)	0	0	0

3.2.5. Rumex Gümüş Nanoparçacıkların Biyofilm Oluşumuna Etkisi

Rumex gümüş NP'lerinin antibiyofilm aktivitesi, orta ve güçlü biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip beş izolata karşı araştırıldı. Öncelikle Rumex gümüş NP'lerinin bu beş izolata karşı MIC değeri 67.5 µg/ mL olarak bulundu. ½ MIC konsantrasyonundaki nanopartiküller, beş suşa karşı antibiyofilm ajanları olarak hareket etmek için kullanıldı. Kuvvetli pozitif (0.5492) biyofilm oluşturma kabiliyeti gösteren *A. baumannii* 2.65 kat azalarak zayıf pozitif (0.2071) biyofilm oluşturmıştır. Kuvvetli pozitif (0.5855) biyofilm oluşturma kabiliyeti gösteren *E.coli* 1.21 kat azalarak orta derece pozitif

(0.4830) biyofilm oluşturmuştur. Kuvvetli pozitif (0.5434) biyofilm oluşturma kabiliyeti gösteren *Klepsiella spp.* 3.23 kat azalarak zayıf pozitif (0.1678), biyofilm oluşturmuştur. Orta derece pozitif (0.4835) biyofilm oluşturma kabiliyeti gösteren *K. pneumonia* 3.58 kat azalarak zayıf pozitif 0.1347 biyofilm oluşturmuştur. Orta derece pozitif (0.3050) biyofilm oluşturma kabiliyeti gösteren *A. baumannii* 1.56 kat azalarak zayıf pozitif (0.1950) biyofilm kazandığı tespit edilmiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Rumex nanopartikülün antibiyofilm aktivitesi

NO	M.O. NO	M.O. ADI	BİYOFİLM DEğERİ	BİYOFİLM OLUşTURMA KABİLİYETİ	NANOPARTİKUL SONRASI BİYOFİLM DEğERİ	NANOPARTİKUL SONRASI BİYOFİLM OLUşTURMA KABİLİYETİ
1	30	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.5492	Kuvvetli Pozitif	0.2071	Zayıf Pozitif
2	94	<i>E.coli</i>	0.5855	Kuvvetli Pozitif	0.4830	Orta Derece Pozitif
3	130	<i>Klepsiella spp.</i>	0.5434	Kuvvetli Pozitif	0.1678	Zayıf Pozitif
4	151	<i>Klepsiella pneumoniae</i>	0.4835	Orta Derece Pozitif	0.1347	Zayıf Pozitif
5	186	<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.3050	Orta Derece Pozitif	0.1950	Zayıf Pozitif

4. TARTIŞMA

Bazı bakterilerin mevcut tüm antibiyotiklere karşı dirençli olması dünya çapında bir sağlık krizine neden olmaktadır. Dirençli patojenlere karşı olan bu sağlık krizine karşı yeni ajanlar ile ilgili devam eden çalışmalar bulunmaktadır (Breijyeh vd., 2020). Gram negatif bakteriler yapıları nedeniyle Gram pozitif bakterilere göre daha dirençlidir. Dünya çapında önemli morbidite ve mortaliteye yol açarlar ve özellikle bağışıklığı baskılanmış bireylerde ciddi hastalıklara neden olurlar (Breijyeh vd., 2020; Oliveira ve Reygaert 2019). Antibiyotiğe dirençli Gram-negatif bakteriler genellikle kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları (İYE) ve ventilatörle ilişkili pnömoni vakalarından sorumludur (Breijyeh vd., 2020). Gram-negatif bakterilerdeki antibiyotik direnç mekanizması, kromozomal genlerde, β -laktamazları kodlayan plazmitlerde ve aminoglikozitleri değiştiren enzimlerde mutasyonları indükleyebilir veya qnr dahil direnç genlerini taşıyan mobil genetik faktörleri transfer edebilir (Breijyeh vd., 2020; Rupe vd., 2015).

Bakterilerin kinolonlara karşı direncini sağlayan çeşitli mekanizmalar vardır. Plazmit aracılı kinolon direnç genleri (qnrA, qnrB ve qnrS) florokinolonlara direnç gösteren mekanizmalar arasındadır (Kareem vd., 2021). İntegronlar gibi hareketli genetik elemanlar üzerinde qnr genlerinin varlığı, bunların Gram negatif bakteriler arasında hızla yayılmasına neden olabilir (Kareem vd., 2021; Karatoli, 2009). Yapılan bu tez çalışmasında qnr (qnrA, qnrB ve qnrS) genleri 67 izolatın 15'inde tanımlanmıştır. Bu çalışmadaki kinolon dirençli diğer izolatların siprofloksasin ve levofloksasine direncine PMQR belirteçleri aracılık etmeyebilir, ancak diğer kinolon direnç mekanizmaları (gyrA ve parC mutasyonları, DNA giraz /veya topoizomera IV ve bunların aktivitesini düzenleyen genler) aracılık edebilir (Carattoli, 2009; Ruiz, 2003); Martínez-Martínez vd., 1998).

Karbapenem dirençli Gram-negatif bakteriler de genellikle aminoglikozitler ve florokinolonlar gibi farklı antibiyotik gruplarına dirençlidir ve bu mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavi seçenekleri sınırlıdır (Davoudi-Monfared ve Halil 2018). Bu nedenle, karbapenem dirençli suşların varlığı, dünya çapında halk sağlığı için ciddi bir endişe kaynağıdır. Sağlığı tehdit eden bu izolatların prevalansının belirlenmesi ve direnç mekanizmalarının araştırılması önemlidir (Davoudi-Monfared ve Khalili 2018).

D Sınıfı β -laktamazlar, izoksazolilpenisilin oksalini penzilpenisilin'den çok daha hızlı hidrolize ettikleri için oksasilinazlar (OXA) olarak adlandırılırlar. (Jeong vd., 2009). OXA'ların bazıları karbapenem grubu antibiyotikleri hidrolize edebilir. (Perez vd., 2007). OXA-23, OXA-40/24, OXA-51 ve OXA-58 gibi karbapenemleri inaktive edebilen OXA'ların varlığı, *A. baumannii* izolatlarındaki ana karbapenem direnç mekanizmalarından biridir (Lin ve Lan 2014; Poirel vd., 2010). Dünya çapında yayılan *bla*_{OXA-23} geni, kromozomlar veya plazmitler üzerinde ve bazen de integronlarda bulunabilir (Navia vd., 2002). OXA tipi β -laktamaz grubu arasında şimdiye kadar tanımlanan en büyük grup, *A. baumannii*'ye özgü olan ve bu türün kromozomunda doğal olarak bulunan OXA-51 benzeri β -laktamazlardır (Brown vd., 2005; Heritier vd., 2005).

Sırbistanda 2020 yılında yapılan çalışmada karbapenem dirençli *A. baumannii*'nin (CRAB) izolatlarının prevalansı araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre, Sırbistan'da CRAB izolatları arasında *bla*_{OXA-72} geni, *bla*_{OXA-23} geni ve *bla*_{NDM-1} genlerinin varlığı görülmüştür. Bu genlerin klonal yayılımı nedeniyle *A. baumannii* klinik izolatları arasında son derece yüksek oranlarda karbapenem direnci olduğunu ortaya koymuştur (Lukovic vd., 2020).

2021 yılında Fasta Fez MUB'de yatan hastalardan izole edilen *Acinetobacter* suşlarında karbapenemaz varlığını araştırılmıştır. Bu çalışmada *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51} genleri araştırılmış ve tüm suşların OXA 51 geni, 53 suşun (%91) OXA 23 geni taşıdığı tespit edilmiştir (Massik vd., 2021).

Tayland' da 2020 yılında karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii* (CRAB) ile yapılan bir çalışmada intrinsik bir enzim belirteci olan *bla*_{OXA-51} benzeri gen tüm klinik izolatlarda saptanmış ve *bla*_{OXA-23} benzeri gen, izolatların çoğunda (%68.31) görülmüştür. Buna karşılık, CRAB izolatlarında *bla*_{OXA-40/24} benzeri ve *bla*_{OXA-58} benzeri gen oluşumlarının yaygınlık oranları sırasıyla yalnızca %4.92 ve %1.09 olarak belirlenmiştir. Tüm izolatlar karbapenemlere dirençli olup, imipenem %100 direnç göstermiş, bunu meropenem (%98.91) ve doripenem (%94.54) izlemiştir. (Thirapanmethee vd., 2020)

2022 yılında Fransa yapılan amoksisilin-klavulanata dirençli izolatlar arasında OXA-23 karbapenemaz üreten *Proteus mirabilis*'in yüksek prevalansı çalışmasında, amoksisilin-klavulanata dirençli *Proteus mirabilis* izolatlarının %26.9'unun (14/52) OXA-23 karbapenemaz ürettiği bildirilmiştir. (Lombes vd., 2021)

Karbapenem dirençli *Acinetobacter*'de OXA-23 ve OXA-51 varlığının ciddi sağlık sorunlarına neden olduğu gösterilmiştir (Manohar vd., 2021). Bu çalışmada hem OXA-23 hem de OXA-51 karbapenemaz üreten *K. oxytoca*, *E.coli* ve *A. baumannii*

izolatları tespit edildi. Bu çalışmanın en önemli bulguları arasında hem *bla*_{OXA-23} hem de *bla*_{OXA-51} genlerini taşıyan *E.coli*'nin tespiti yer almaktadır. *Bla*_{OXA-23} geninin varlığı daha önce Hindistan'da *E.coli*'de gösterilmişti (Manohar vd., 2021). Ayrıca bu çalışmanın bir diğer önemli bulgusu *K.oxytoca* izolatında *bla*_{OXA-23} ve *bla*_{OXA-51}'in ilk kez tespit edilmiş olmasıdır.

Direnç işaretleri taşıyan integronlar, gen kasetlerini entegre etme, ifade etme ve yayma yeteneğine sahiptir. Bu yetenek bakterilerde çoklu ilaç direnci oluşumunda önemli rol oynar. Integronlar hızla direnç fenotiplerini yaydığından, virülans veya antimikrobiyallere direncin halk sağlığını daha fazla etkileyebileceği düşünülmektedir (Sabbagh vd., 2021). Çalışmamızda integron içeren izolat sayısı çok yüksek bulunmuştur (%93.08). Suşlar arasında integronların yüksek prevalansı, antimikrobiyal direncin yayılmasına katkıda bulunur. Önlenmediği takdirde antimikrobiyal direnç salgısına yol açabilecek ve enfeksiyon tedavi protokollerini daha da karmaşık hale getirebilecek integronların yayılmasına karşı ek ihtiyati tedbirlere ihtiyaç vardır (Kargar vd., 2014).

E. coli'de en dikkate değer virülans genleri: aerobaktin (aer), nekrotizan faktör 1 (cnf 1), P fimbriae (pap), S fimbriae sfa), afimbrial adhesin I (afal) ve hemolizindir (hly). Bunlar özellikle İYE'lerle ilişkilidir ve organizmaların konak yüzeylerini kolonize etmesine, konak savunma mekanizmalarından kaçmasına ve klinik hastalığa neden olmasına yardımcı olur (Tajbakhsh vd., 2016; Johnson, 1991). *E. coli*'de bu virülans genlerinin varlığı birçok çalışmada bildirilmiştir (Özad Düzgün vd., 2019; Tajbakhsh vd., 2016; Akyıldız vd., 2020). Türkiye'de daha önce yapılan bir çalışmada *E. coli* izolatlarının %16.6'sında afa ve cnf genleri saptanmış ve 11 farklı virülans gen paterni belirlenmiştir (Özad Düzgün vd., 2019). Türkiye'de yapılan bir başka çalışmada ise 40/83 suşta aer geni görülmüş, *E. coli* izolatlarında 10 virülans faktör gen paterni gözlenmiştir (Akyıldız vd., 2020). Bu çalışmada en yüksek afa gen yüzdesi (%34.88) *E. coli* izolatlarında bulunmuştur. 2020 yılında Katongole ve Nalubega tarafından Üropatojenik *E. coli* izolatlarının biyofilm oluşturma kabiliyetini, virülans genlerinin varlığını ve antimikrobiyal duyarlılık paterni belirlenmiştir. Bu çalışmada, izolatların %62.5'i (125/200) biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir ve bu suşların %78'inin (156/200) çoklu ilaca dirençli (ÇİD) olduğu görülmüştür. İzolatların en çok trimetoprim sülfametoksazol ve amoksisiline (%93), ardından gentamisin (%87) ve en az ise imipenem (%0.5) dirençli olduğu tespit edilmiştir. Araştırılan virulans faktör genleri arasında en yaygın fim (%53.5) bulunmuştur, bunu Pap (%21), Sfa (%13), Afa (%8), Cnf (%5.5) ve Hyl (%0) virulans genleri takip etmiştir. (Katongole ve ark, 2020). Bu tez

çalışmasında izolatların %46.27'sinin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirlenmiştir. 188 suşun 121'inde virülans faktör gen görülmüş ve en fazla aer 56 (%29.78) olmak üzere 53 sfa (%28.19), 51 afa (%27.12), 40 cnf (%21.27), 24 pap (%12.76) ve 24 hly (%12.76) tespit edilmiştir.

Bu virülans faktör genlerinin varlığı, *E. coli* izolatlarının yanı sıra *Enterobacter* spp., *Klebsiella*, *Pseudomonas* spp., *A. baumannii* ve *Proteus* spp. gibi diğer Gram negatif bakterilerde de araştırıldı. Önceki çalışmalar, bu virülans faktör genlerinin birçoğunun *P. mirabilis*, *Enterobacter*'deki varlığı araştırılmamıştır. Bir çalışmada, *K. pneumoniae*'de papC geni tespit edilmiştir (Iseppi vd., 2020). Bu tez çalışmasında araştırılan *Klebsiella* izolatlarında sfa, cnf, aer, pap, hly ve afa'nın virülans genleri gözlemlendi. Ayrıca tez kapsamında İYE hastalarından izole edilen *Proteus*'ta bulunan virülans genlerini ve antimikrobiyal duyarlılığı belirlemek için analizler yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre *Proteus* izolatlarının hly, aer, sfa, afa, pap ve cnf virülans genlerini taşıdığı belirlendi. Yapılan farklı çalışmada *Proteus* izolatları arasında hlyA geninin varlığı (%23.8) saptanmıştır (Hussein vd., 2020). Başka bir çalışmada ise izolatların hiçbirinde hlyA geni bulunmamıştır (Cestari vd., 2013).

Patojenik suşlar, antimikrobiyal dirençleri ve virülans faktörleri nedeniyle potansiyel olarak daha tehlikelidir ve bu nedenle enfeksiyon tedavi seçeneklerini sınırlar. Bu nedenle çalışmalar, diğer virülans ve direnç ile ilgili genlerin yayılma mekanizmaları ve direnç belirteçleri hakkında daha fazla araştırma yapılması gerektiğini düşündürmektedir (Ahmed vd., 2016). Virülans genlerinin varlığının antimikrobiyal ajanlara karşı direncin artmasına yol açtığı düşünülmekte ve bu da onların direnç fenotipleri ile önemli bir ilişkisi olduğunu göstermektedir (Hussein vd., 2020).

Gümüş nanopartiküllerin çeşitli mikroorganizmalara karşı aktif olduğu rapor edilmiş ve bu özellik çoklu antimikrobiyal aktivite mekanizmalarına atfedilmiştir (Pelgrift ve Friedman, 2013; Jain ve Mehata ,2017; Çalışkan vd., 2019; Garibo vd., 2020). Son zamanlarda, Singh vd. (2021), yeşil sentez ile üretilen gümüş nanopartiküllerin, mevcut çalışmada benzer şekilde gözlemlendiği gibi *E.coli* ve *S. aureus*'a karşı inhibisyon gösterdiğini bildirmiştir. Aynı çalışmada araştırmacılar, Ampisilin ve Siprofloksasin antibiyotiklerinin nanopartiküllerle kombinasyonunu da test ettiler ve nanopartikül-antibiyotik formülasyonlarının tek başına antibiyotiklerden daha etkili olduğunu gösterdiler (Singh vd., 2021). Başka bir çalışmada, gümüş nanopartiküllerin antibiyotiğe dirençli *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. pyogenes* bakterisidal aktiviteye sahip olduğunu gösterdi. Bu bulgu direnç proteinlerinin gümüş nanopartiküller üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığını ve bakterilerin

nanopartiküllere duyarlılığında herhangi bir değişikliğe neden olmadığını ortaya koymuştur (Lara vd., 2010). Ayrıca gümüş nanopartikül ve antibiyotik konjugatlarının çoklu ilaca dirençli ve biyofilm oluşturan mikroorganizmalara karşı da biyoaktiviteye sahip olduğu kanıtlanmıştır (Thomas vd., 2020). Başka bir çalışma, nanopartiküller ve antibiyotikler arasında sinerjik bir ilişki olduğunu göstermiş, böylece antibiyotiklerin ve nanopartiküllerin farklı antibakteriyel mekanizmalar kullandığını kanıtlamıştır (Slavin vd., 2017).

Biyofilm oluşumu orta kulak iltihabı, diş eti iltihabı ve akciğer enfeksiyonları gibi birçok hastalığın gelişiminde rol oynar ve bakterilerin birden fazla antibiyotiğe direnç göstermesine neden olabilir. NP'lerin üretimi ve kullanımı, biyofilm oluşumu gibi ilaca direnç mekanizmalarının üstesinden gelmek için umut verici stratejiler arasındadır (Pelgrift ve Friedman, 2013). Bu çalışmada, Rumex gümüş NP'lerinin orta ve güçlü biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip farklı antibiyotiğe dirençli patojenik bakterilere karşı antibiyofilm etkisini araştırıldı. Skora vd. (2021), gümüş NP'lerin antibiyofilm etkisini araştırmış ve farklı biyofilm indirgeme yüzdeleri belirlenmiştir. Her iki *E. coli* (4.69 kat) izolatu için en iyi biyofilm azalmasını 2 mg/mL konsantrasyonda bulmuşlardır (Skora vd., 2021). AgNP'lerin hastane tedavisinde sorun yaratan *A. baumannii* gibi klinik olarak önemli birçok bakteri suşu üzerindeki olumsuz etkileri tartışılmıştır (Martinez-Gutierrez vd., 2013). Farklı bir çalışmada düşük AgNP dozlarında canlı çoklu ilaca dirençli (MDR) *A. baumannii*'nin %90'dan fazla inhibisyonu görülmüş ve bunun *A. baumannii*'nin insan akciğer epitel yüzeyine bağlanmasını ve ardından biyofilm oluşumunu engellediği bildirilmiştir (McNeilly vd., 2021; Wintachai vd., 2019). 2019 yılında yapılan bir çalışmada, triptofan gümüş NP'lerin statik koşullar altında *E. coli* ve *K. pneumonia*'nın oluşturduğu biyofilm üzerindeki antibiyofilm aktivitesi araştırılmıştır. Sonuçlar, NP'lerin *E. coli* ve *K. pneumonia* biyofilm oluşumu üzerinde %50'yi aşan bir antibiyofilm etkisine sahip olduğunu göstermiştir (Courrol vd., 2019). Bu çalışmada, Rumex gümüş NP'leri *A. baumannii* ve *K. pneumoniae* suşlarının biyofilm oluşturma kapasitesini 2.66 kat ve 3.25 kat azaltırken, *E.coli*'ninkini 1.25 kat azalttığı tespit edilmiştir. Bu tz kapsamında, incelenen NP'ler, bakteriyel biyofilm oluşumu üzerindeki yüksek antibiyofilm etkileri ile karakterize edilmiştir. Birçok farklı çalışmada gösterildiği gibi, AgNP'ler, MDR izolatlarının önemli halk sağlığı sorununu ele almak için umut verici bir antimikrobiyal ajan olarak görülmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

5.1. Tez Çalışması Sonuçları

1. 129 *E.coli* (%67.55) , 15 *Acinetobacter baumannii* (%7.97), 12 *Enterobacter spp.* (%6.38), 11 *Klepsiella spp.* (%5.85), 6 *Proteus mirabilis* (%3.19), 5 *Klepsiella pneumoniae* (%2.65), 3 *Citrobacter freundii* (%1.59), 3 *Proteus spp.* (%1.59), 2 *Klepsiella oxytoca* (%1.06) ve 2 *Pseudomonas spp.* (%1.06) olmak üzere 188 Gram negatif bakteri suşu izole edildi ve antibiyotik duyarlılık değerleri belirlendi.

2. 188 suşta sınıf 1 integron, virülans faktör ve antibiyotik direnç genlerinin varlığı araştırıldı. 121 suşun virülans faktör geni taşıdığı belirlendi. Sınıf 1 integron 167 izolatta görüldü

Araştırılan antibiyotik direnç genleri arasında; 15 suşta plazmit aracılı kinolon direnç genleri, 16 suşta (%39.02) *bla*_{OXA-23} geni ve 19 izolatta *bla*_{OXA-51} geni bulundu.

3. OXA-23 ve OXA-51 üreten suşların *K. oxytoca*, *A. baumannii*, *E.coli* ve *P.mirabilis* olduğu görüldü. Bu çalışmada Türkiye'den ilk kez hem *bla*_{OXA-23} hem de *bla*_{OXA-51} genlerini taşıyan klinik izolat *K. oxytoca* tanımlanmıştır.

4. Suşların biyofilm oluşturma kapasiteleri araştırılmış ve izolatların %46.27'sinin biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olduğu görülmüştür.

5. Rumex gümüş NP'lerinin antibiyofilm aktivitesi değerlendirilmiştir. Daha önce belirlenen orta ve güçlü biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip izolatların biyofilm oluşturma kabiliyetlerini Rumex naopartükülerinin önemli derece de azalttığı görülmüştür.

5.2. Öneriler

Karbapenem dirençli Gram negatif bakteriler acil olarak müdahale edilmesi gereken bir halk sağlığı tehdididir. Son yıllarda karbapenem direnci patojen bakteriler arasında yayılım göstermektedir. Bu da yüksek mortalite oranı ile tedavisi zor olan çoklu ilaç direncine neden olmaktadır. Bu nedenle direncin önlenmesi için bu suşların izlenmesi önerilmektedir.

Farklı hastalardan, farklı numunelerden veya farklı hastanelerden Gram negatif bakteriler alınarak yeni çalışmalar yapılabilir. Farklı direnç genleri veya farklı virülans genlerinin varlığı araştırılabilir. Antibiyotik direncinin plazmit mi kromozom aracılı olduğu araştırılabilir. Farklı bitki kullanarak yine gümüş nanopartüküllerin veya

Rumex bitkisinin farklı metallerle nanopartikülleri elde edilerek antibiyofilm aktivitesi araştırılabilir. Yine Rumex gümüş nanopartikülünün antimikrobiyal veya antibiyofilm etkisi farklı izolatlar üzerinde araştırılabilir.



KAYNAKÇA

- Ak, O., Batirel, A., Ozer, S. ve Çolakoğlu, S. (2011). Nosocomial infections and risk factors in the intensive care unit of a teaching and research hospital: A prospective cohort study. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 17, PH29-34. <https://doi.org/10.12659/MSM.881750>.
- Akyıldız, E., Saral, A., Köse, T. ve Düzgün, A. Ö. (2020). Klinik E. coli izolatlarında virulans faktor genlerinin ve geniş spektrumlu beta laktamazların araştırılması. *Gümüşhane Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 1, 122-127. <https://doi.org/10.17714/gumusfenbil.571958>.
- Aminov, R. I. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 1, 134. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2010.00134>.
- Aminov, R. I. ve Mackie, R. I. (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 2, 147-161. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00757.x>.
- AshaRani, P. V., Low Kah Mun, G., Hande, M. P. ve Valiyaveetil, S. (2009). Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in human cells. *ACS Nano*, 2, 279-290. <https://doi.org/10.1021/nn800596w>.
- Batoni, G., Maisetta, G., Lisa Brancatisano, F., Esin, S. ve Campa, M. (2011). Use of antimicrobial peptides against microbial biofilms: advantages and limits. *Current Medicinal Chemistry*, 12, 256-279. <https://doi.org/10.2174/092986711794088399>.
- Breijyeh, Z., Jubeh, B. ve Karaman, R. (2020). Resistance of gram-negative bacteria to current antibacterial agents and approaches to resolve it. *Molecules*, 6, 1340. <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>.
- Brown, S., Young, H. K. ve Amyes, S. G. B. (2005). Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clinical Microbiology and Infection*, 1, 15-23. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.01016.x>.
- Bush, K. (2015). A resurgence of β -lactamase inhibitor combinations effective against multidrug-resistant Gram-negative pathogens. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 5, 483-493. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.08.011>

- Carattoli, A. (2009). Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6, 2227-2238. <https://doi.org/10.1128/AAC.01707-08>.
- Carlson, C., Hussain, S. M., Schrand, A. M., K. Braydich-Stolle, L., Hess, K. L., Jones, R. L. ve Schlager, J. J. (2008). Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. *The Journal of Physical Chemistry B*, 43, 13608-13619. <https://doi.org/10.1021/jp712087m>.
- Cestari, S. E., Ludovico, M. S., Martins, F. H., da Rocha, S. P. D., Elias, W. P. ve Pelayo, J. S. (2013). Molecular detection of HpmA and HlyA hemolysin of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Current Microbiology*, 67(6), 703-707. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0423-5>.
- Chadwick, D. J. ve Goode, J. A. (Eds.). (2008). *Antibiotic resistance: origins, evolution, selection and spread*. John Wiley ve Sons.
- Choi, O. ve Hu, Z. (2008). Size dependent and reactive oxygen species related nanosilver toxicity to nitrifying bacteria. *Environmental Science & Technology*, 42(12), 4583-4588. <https://doi.org/10.1021/es703238h>
- Chopra, R., Alderborn, G., Podczek, F. ve Newton, J. M. (2002). The influence of pellet shape and surface properties on the drug release from uncoated and coated pellets. *International Journal of Pharmaceutics*, 239(1-2), 171-178. [https://doi.org/10.1016/S0378-5173\(02\)00104-7](https://doi.org/10.1016/S0378-5173(02)00104-7)
- Costerton J.W. Bacterial attachment to surfaces. In: Eckey D.C., editor. *The Biofilm primer*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2007. pp. 36–43.
- Costerton, J. W., Cheng, K. J., Geesey, G. G., Ladd, T. I., Nickel, J. C., Dasgupta, M. ve Marrie, T. J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology*, 41(1), 435-464.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. ve Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711-745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. ve Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>.
- Courrol, D. D. S., Lopes, C. R. B., Pereira, C. B. P., Franzolin, M. R., Silva, F. R. D. O. ve Courrol, L. C. (2019). Tryptophan silver nanoparticles synthesized by photoreduction method: Characterization and determination of bactericidal and anti-biofilm activities on resistant and susceptible bacteria. *International Journal of Tryptophan Research*, 12, 1178646919831677.

- Crump, J. A. ve Heyderman, R. S. (2015). A perspective on invasive Salmonella disease in Africa. *Clinical Infectious Diseases*, 61,235-240. <https://doi.org/10.1093/cid/civ709>
- Cicek, A. C., Duzgun, A. O., Saral, A. ve Sandalli, C. (2014). Determination of a novel integron- located variant (*bla*_{OXA-320}) of Class D β - lactamase in *Proteus mirabilis*. *Journal of Basic Microbiology*, 5, 1030-1035.
- Çimen, M ve Düzgün, A. Ö. (2021). Antibiotic induced biofilm formation of novel multidrug resistant Acinetobacter baumannii ST2121 clone. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 68(2), 80-86. <https://doi.org/10.1556/030.2020.01240>.
- Davoudi-Monfared, E ve Khalili, H. (2018). The threat of carbapenem-resistant gram-negative bacteria in a Middle East region. *Infection and Drug Resistance*, 11, 1831. <https://doi.org/10.2147/IDR.S176049>.
- De la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L. ve Hancock, R. E. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580-589. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2013.06.013>.
- De Nys, R., Steinberg, P. D., Willemsen, P., Dworjanyn, S. A., Gabelish, C. L. ve King, R. J. (1995). Broad spectrum effects of secondary metabolites from the red alga *Delisea pulchra* in antifouling assays. *Biofouling*, 8,259-271. <https://doi.org/10.1080/08927019509378279>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>.
- Dusane, D. H., Pawar, V. S., Nancharaiah, Y. V., Venugopalan, V. P., Kumar, A. R. ve Zinjarde, S. S. (2011). Anti-biofilm potential of a glycolipid surfactant produced by a tropical marine strain of *Serratia marcescens*. *Biofouling*, 27(6), 645-654. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.594883>
- Düzgün, A.Ö., Okumuş, F., Saral, A., Çiçek, A.Ç. ve Cinemre, S. (2019). Determination of antibiotic resistance genes and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from Turkish patients with urinary tract infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 52:e20180499. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0499-2018>.
- Elechiguerra, J. L., Burt, J. L., Morones, J. R., Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, H. H. ve Yacaman, M. J. (2005). Interaction of silver nanoparticles with HIV-1. *Journal of Nanobiotechnology*, 3(1), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1477-3155->

- Falagas, M. E., Skolidis, T., Vardakas, K. Z., Legakis, N. J. ve Hellenic Cefiderocol Study Group. (2017). Activity of cefiderocol (S-649266) against carbapenem-resistant Gram-negative bacteria collected from inpatients in Greek hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72,1704-1708. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx049>
- Franci, G., Falanga, A., Galdiero, S., Palomba, L., Rai, M., Morelli, G. ve Galdiero, M. (2015). Silver nanoparticles as potential antibacterial agents. *Molecules*, 20(5), 8856-8874. <https://doi.org/10.3390/molecules20058856>
- Fruci, M. ve Poole, K. (2018). Aminoglycoside-inducible expression of the mexAB-oprM multidrug efflux operon in *Pseudomonas aeruginosa*: Involvement of the envelope stress-responsive AmgRS two-component system. *PloS One*, 13(10), e0205036. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205036>
- Garibo, D., Borbón-Núñez, H. A., de León, J. N. D., García Mendoza, E., Estrada, I., Toledano-Magaña, Y., Susarrey-Arce, A. (2020). Green synthesis of silver nanoparticles using *Lysiloma acapulcensis* exhibit high-antimicrobial activity. *Scientific Reports*, 10, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-69606-7>.
- Goller, C.C. ve Romeo, T. (2008). Environmental influences on biofilm development. *Bacterial Biofilms*, 37-66. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_3.
- Gurunathan, S., Han, J. W., Kwon, D. N. ve Kim, J. H. (2014). Enhanced antibacterial and anti-biofilm activities of silver nanoparticles against Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Nanoscale Research Letters*, 9, 1-17. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-9-373>
- Hayes, F. (2003). Toxins-antitoxins: plasmid maintenance, programmed cell death, and cell cycle arrest. *Science*, 301,1496-1499. <https://doi.org/10.1126/science.1088157>
- Héritier, C., Poirel, L., Fournier, P. E., Claverie, J. M., Raoult, D. ve Nordmann, P. (2005). Characterization of the naturally occurring oxacillinase of *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(10), 4174-4179. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.10.4174-4179.2005>
- Høiby, N. (1977). *Acta Pathologica Et Microbiologica Scandinavica. Supplement. Section A.: Diagnostic and Prognostic Significance of Pseudomonas Aeruginosa Precipitins Determined by Means of Crossed Immunelectrophoresis: C Survey. Pseudomonas Aeruginosa Infection in Cystic Fibrosis* 58, 65–79.
- Holt, K. B. ve Bard, A. J. (2005). Interaction of silver (I) ions with the respiratory chain

- of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag⁺. *Biochemistry*, 44(39), 13214-13223. <https://doi.org/10.1021/bi0508542>
- Hong, B., Kai, J., Ren, Y., Han, J., Zou, Z., Ahn, C. H. ve Kang, K. A. (2008). Highly sensitive rapid, reliable, and automatic cardiovascular disease diagnosis with nanoparticle fluorescence enhancer and mems. *In Oxygen Transport to Tissue XXIX* (pp. 265-273). Springer, Boston, MA. https://doi.org/10.1007/978-0-387-74911-2_30.
- Hsu, L. Y., Apisarnthanarak, A., Khan, E., Suwantararat, N., Ghafur, A. ve Tambyah, P. A. (2017). Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and Enterobacteriaceae in south and southeast Asia. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(1), 1-22. <https://doi.org/10.1128/CMR.00042-16>
- Hussein, E. I., Al-Batayneh, K., Masadeh, M. M., Dahadhah, F. W., Al Zoubi, M. S., Aljabali, A. A. ve Alzoubi, K. H. (2020). Assessment of pathogenic potential, virulent genes profile, and antibiotic susceptibility of *Proteus mirabilis* from urinary tract infection. *International Journal of Microbiology*, 2020,1231807. <https://doi.org/10.1155/2020/1231807>.
- Hwang E, Lee J, Chae Y, Kim Y, Kim B, Sang B. ve Gu M. (2008). Analysis of the toxic mode of action of silver nanoparticles using stress-specific bioluminescent bacteria. *Small*, 4,746–750. <https://doi.org/10.1002/sml.200700954>
- Iraz, M., Düzgün, A. Ö., Sandallı, C., Doymaz, M. Z., Akkoyunlu, Y., Saral, A., ... Çiçek, A. Ç. (2015). Distribution of β -lactamase genes among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from patients in Turkey. *Annals of Laboratory Medicine*, 35(6), 595-601. <https://doi.org/10.3343/alm.2015.35.6.595>
- Iseppi, R., Di Cerbo, A., Messi, P. ve Sabia, C. (2020). Antibiotic resistance and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci (Vre) and extended-spectrum β -lactamase/ampc-producing (ESBL/ampc) enterobacteriaceae from humans and pets. *Antibiotics*, 9(4), 152. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9040152>.
- Ito-Horiyama, T., Ishii, Y., Ito, A., Sato, T., Nakamura, R., Fukuhara, N. ve Tateda, K. (2016). Stability of novel siderophore cephalosporin S-649266 against clinically relevant carbapenemases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(7), 4384-4386. <https://doi.org/10.1128/AAC.03098-15>
- Jain, S. ve Mehata, M. S. (2017). Medicinal plant leaf extract and pure flavonoid mediated green synthesis of silver nanoparticles and their enhanced antibacterial property. *Scientific Reports*, 7, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15724-8>

- Jeong, H. W., Cheong, H. J., Kim, W. J., Kim, M. J., Song, K. J., Song, J. W. ve Roh, K. H. (2009). Loss of the 29-Kilodalton Outer Membrane Protein in the Presence of OXA-51-Like Enzymes in *Acinetobacter baumannii* Is Associated with Decreased Imipenem Susceptibility. *Microbial Drug Resistance*, 15(3), 151-158. <https://doi.org/10.1089/mdr.2009.0828>
- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80-128.
- Jung, W. K., Koo, H. C., Kim, K. W., Shin, S., Kim, S. H. ve Park, Y. H. (2008). Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(7), 2171-2178. <https://doi.org/10.1128/AEM.02001-07>
- Kamaruzzaman, N. F., Tan, L. P., Mat Yazid, K. A., Saeed, S. I., Hamdan, R. H., Choong, S. S., ... Gibson, A. J. (2018). Targeting the bacterial protective armour; challenges and novel strategies in the treatment of microbial biofilm. *Materials*, 11(9), 1705. <https://doi.org/10.3390/ma11091705>
- Kareem, S.M., Al-Kadmy, I.M.S, Kazaal, S.S., Ali, A.N.M., Aziz, S.N., Makharita, R.R., Algammal, A.M., Al-Rejaie, S., Behl, T., Batiha, G.E., El-Mokhtar, M.A. ve Hetta, H.F. (2021). Detection of *gyrA* and *parC* Mutations and Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Drug Resistance*, 12,555-563. <https://doi.org/10.2147/IDR.S275852>.
- Kargar, M., Mohammadalipour, Z., Doosti, A., Lorzadeh, S. ve Japoni-Nejad, A. (2014). High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health and Research Perspectives*, 5(4),193-198. <https://doi.org/10.1016/j.phrp.2014.06.003>
- Katongole, P., Nalubega, F., Florence, N. C., Asimwe, B. ve Andia, I. (2020). Biofilm formation, antimicrobial susceptibility and virulence genes of Uropathogenic *Escherichia coli* isolated from clinical isolates in Uganda. *BMC Infectious Diseases*, 20(1), 1-6. <https://doi.org/10.1186/s12879-020-05186-1>
- Kaye, K. S ve Pogue, J. M. (2015). Infections caused by resistant gram- negative bacteria: epidemiology and management. *Pharmacotherapy: The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy*, 35(10), 949-962. <https://doi.org/10.1002/phar.1636>
- Kim, E. S., Chong, Y. P., Park, S. J., Kim, M. N., Kim, S. H., Lee, S. O., Kim, Y. S. (2017). Detection and genetic features of MCR-1-producing plasmid in human *Escherichia coli* infection in South Korea. *Diagnostic Microbiology and Infectious*

- Disease*, 89(2), 158-160. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.020>
- Kirstein, J. ve Turgay, K. (2005). A new tyrosine phosphorylation mechanism involved in signal transduction in *Bacillus subtilis*. *Microbial Physiology*, 9(3-4), 182-188. <https://doi.org/10.1159/000089646>
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. ve Hultgren, S. J. (2013). Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 3, a010306. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a010306>
- Kyriacou, S. V., Brownlow, W. J. ve Xu, X. H. N. (2004). Using nanoparticle optics assay for direct observation of the function of antimicrobial agents in single live bacterial cells. *Biochemistry*, 43(1), 140-147. <https://doi.org/10.1021/bi0351110>
- Lapuebla, A., Abdallah, M., Olafisoye, O., Cortes, C., Urban, C., Landman, D. ve Quale, J. (2015). Activity of imipenem with relebactam against Gram-negative pathogens from New York City. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 5029-5031. <https://doi.org/10.1128/AAC.00830-15>
- Lara HH, Ayala-Núñez N V., del Turrent LCI. ve Padilla CR. (2010). Bactericidal effect of silver nanoparticles against multidrug-resistant bacteria. *World J Microbiol Biotechnology*, 26,615–621. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0211-3>
- Le Pape, H., Solano-Serena, F., Contini, P., Devillers, C., Maftah, A. ve Leprat, P. (2004). Involvement of reactive oxygen species in the bactericidal activity of activated carbon fibre supporting silver: Bactericidal activity of ACF (Ag) mediated by ROS. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 98(6), 1054-1060. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2004.02.025>
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O. ve Beloin, C. (2013). From in vitro to in vivo models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens*, 2, 288–356. <https://doi.org/10.3390/pathogens2020288>
- Lee, Y. C., Hsiao, C. Y., Hung, M. C., Hung, S. C., Wang, H. P., Huang, Y. J. ve Wang, J. T. (2016). Bacteremic urinary tract infection caused by multidrug-resistant Enterobacteriaceae are associated with severe sepsis at admission: implication for empirical therapy. *Medicine*, 95(20), e3694.
- Levin, B. R. ve Rozen, D. E. (2006). Non-inherited antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*, 4(7), 556-562. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1445>
- Levy, S.B. ve Marshall, B. (2004). Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine*, 10,122–129.

- Levy, S.B. (1997). Antibiotic Resistance an Ecological Imbalance. In: Chandwick, D.J. and Goode, J., Eds., *Antibiotic Resistance: Origins, Evolution Selection and Spread*, Wiley, London, (*Ciba Foundation Symposium 207*), 1-14.
- Lewis, K. (2008). Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 322, 107-131. https://doi.org/10.1007/978-3-540-75418-3_6
- Lewis, K. (2010). Persister cells. *Annual Review of Microbiology*, 64, 357-372. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134306>
- Li, X. Z., Plésiat, P. ve Nikaido, H. (2015). The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(2), 337-418. <https://doi.org/10.1128/CMR.00117-14>
- Lin, M.F. ve Lan CY. (2014). Antimicrobial resistance in *Acinetobacter baumannii*: from bench to bedside. *World Journal of Clinical Cases*, 2, 787–814. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v2.i12.787>.
- Lipp, E. K., Huq, A. ve Colwell, R. R. (2002). Effects of global climate on infectious disease: the cholera model. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(4), 757-770. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.4.757-770.2002>
- Livermore, D. M. (2012). Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 27(2), 128. <https://doi.org/10.3904/kjim.2012.27.2.128>
- Livorsi, D. J., Chorazy, M. L., Schweizer, M. L., Balkenende, E. C., Blevins, A. E., Nair, R., Perencevich, E. N. (2018). A systematic review of the epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the United States. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 7(1), 1-9. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0346-9>
- Lok C, Ho C, Chen R, He Q, Yu W, Sun H, Che C. (2006). Proteomic analysis of the mode of antibacterial action of silver nanoparticles. *Journal of Proteome Research*, 5, 916–924. <https://doi.org/10.1021/pr0504079>
- Lombes, A., Bonnin, R. A., Laurent, F., Guet-Revillet, H., Bille, E., Cattoir, V., ... Dortet, L. (2022). High prevalence of OXA-23 carbapenemase-producing *Proteus mirabilis* among amoxicillin-clavulanate-resistant isolates in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 66(2), e01983-21. <https://doi.org/10.1128/aac.01983-21>
- Lukovic, B., Gajic, I., Dimkic, I., Kekic, D., Zornic, S., Pozder, T., ... Ranin, L. (2020). The first nationwide multicenter study of *Acinetobacter baumannii* recovered in

- Serbia: emergence of OXA-72, OXA-23 and NDM-1-producing isolates. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9(1), 1-12. <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00769-8>
- Maha ,T.F. ve O'Toole, G.A. (2001). Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in Microbiology*, 9,34–39. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(00\)01913-2](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(00)01913-2)
- Manohar, P., Leptihn, S., Lopes, B.S. ve Nachimuthu, R. (2021). Dissemination of carbapenem resistance and plasmids encoding carbapenemases in Gram-negative bacteria isolated in India. *JAC Antimicrobial Resistance*, 3, dlab015. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab015>
- Marambio-Jones, C. ve Hoek, E. (2010). A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *Journal of Nanoparticle Research*, 12(5), 1531-1551. <https://doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>
- Marrie, T. J., Nelligan, J. ve Costerton, J. W. (1982). A scanning and transmission electron microscopic study of an infected endocardial pacemaker lead. *Circulation*, 66, 1339–1341. <https://doi.org/10.1161/01.cir.66.6.1339>
- Martinez-Gutierrez F, Boegli L, Agostinho A, Sánchez EM, Bach H, Ruiz F. ve James G (2013). Anti-biofilm activity of silver nanoparticles against different microorganisms. *Biofouling*, 29, 651-60.
- Martínez-Martínez L, Pascual A. ve Jacoby GA. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet*, 351,797–799. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07322-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07322-4).
- Massik, A., Hibaoui, L., Arhoune, B., Yahyaoui, G., Oumokhtar, B. ve Mahmoud, M. (2021). Detection of metallo-beta lactamases and oxacillinase genes in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Morocco. *The Pan African Medical Journal*, 40, 210.
- Mayer, C., Moritz, R., Kirschner, C., Borchard, W., Maibaum, R., Wingender, J., vd. (1999). The role of intermolecular interactions: studies on model systems for bacterial biofilms. *International Journal of Biological Macromolecules*, 26, 3–16. [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(99\)00057-4](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(99)00057-4)
- McNeilly, O., Mann, R., Hamidian, M. ve Gunawan, C. (2021). Emerging concern for silver nanoparticle resistance in *Acinetobacter baumannii* and other bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 12, 652863.
- Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G. ve Kim, S. K. (2005). Investigation of jumbo

- squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. *Life Sciences*, 77(17), 2166-2178.
- Mitchell, K. F., Zarnowski, R. ve Andes, D. R. (2016). Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. *PLoS Pathogens*, 12(9), e1005828. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005828>
- Mohanty, S., Mishra, S., Jena, P., Jacob, B., Sarkar, B. ve Sonawane, A. (2012). An investigation on the antibacterial, cytotoxic, and antibiofilm efficacy of starch-stabilized silver nanoparticles. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 8(6), 916-924. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2011.11.007>
- Morones, J. R., Elechiguerra, J. L., Camacho, A., Holt, K., Kouri, J. B., Ramírez, J. T. ve Yacaman, M. J. (2005). The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16,2346.<https://doi.org/10.1088/09574484/16/10/059>
- Murugan, K., Sanoopa, C. P., Madhiyazhagan, P., Dinesh, D., Subramaniam, J., Panneerselvam, C. ve Benelli, G. (2016). Rapid biosynthesis of silver nanoparticles using *Crotalaria verrucosa* leaves against the dengue vector *Aedes aegypti*: what happens around? An analysis of dragonfly predatory behaviour after exposure at ultra-low doses. *Natural Product Research*, 30(7), 826-833. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1074230>
- Naas, T., Dortet, L. ve I Iorga, B. (2016). Structural and functional aspects of class A carbapenemases. *Current Drug Targets*, 17(9), 1006-1028.
- Navia, M.M., Ruiz J. ve Vila, J. (2002). Characterization of an integron carrying a new class D beta-lactamase (OXA-37) in *Acinetobacter baumannii*. *Microbial Drug Resistance*, 8,261-265. <https://doi.org/10.1089/10766290260469516>.
- Nazir, R., Zaffar, M. R. ve Amin, I. (2019). Bacterial biofilms: the remarkable heterogeneous biological communities and nitrogen fixing microorganisms in lakes. *Freshwater Microbiology*, 2019, 307–340. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817495-1.00008-6>
- Neal, A.L. (2008). What can be inferred from bacterium-nanoparticle interactions about the potential consequences of environmental exposure to nanoparticles? *Ecotoxicology*, 17,362–371. <https://doi.org/10.1007/s10646-008-0217-x>
- Nel, A.E., Madler, L., Velegol, D., Xia, T., Hoek, E.M.V., Somasundaran, P., Klaessig, F., Castranova, V. ve Thompson, M. (2009). Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature Materials*, 8, 543–557. <https://doi.org/10.1038/nmat2442>

- Ocampo-Sosa, A. A., Cabot, G., Rodríguez, C., Roman, E., Tubau, F., Macia, M. D., ... Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI). (2012). Alterations of OprD in carbapenem-intermediate and-susceptible strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bacteremia in a Spanish multicenter study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56,1703-1713. <https://doi.org/10.1128/AAC.05451-11>
- Oliveira, J. ve Reygaert, W. C. (2019). Gram negative bacteria In StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL).
- Pal, S., Tak, Y. ve Song, J. (2007). Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73,1712–1720. <https://doi.org/10.1128/AEM.02218-06>
- Panacek, A., Kvitek, L., Prucek, R., Kolar, M., Vecerova, R., Pizurova, N., Sharma, V., Nevecna, T. ve Zboril, R. (2006). Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *The Journal of Physical Chemistry B*, 110,16248-16253. <https://doi.org/10.1021/jp063826h>
- Park, H., Kim, J., Kim, J., Lee, J., Hahn, J., Gu, M. ve Yoon, J. (2009). Silver-ion-mediated reactive oxygen species generation affecting bactericidal activity. *Water Research*, 43,1027–1032. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2008.12.002>
- Park, M.V., Neigh, A.M., Vermeulen, J.P., de la Fonteyne, L.J., Verharen, H.W., Briedé, J.J., van Loveren, H. ve de Jong, W.H. (2011). The effect of particle size on the cytotoxicity, inflammation, developmental toxicity and genotoxicity of silver nanoparticles. *Biomaterials*, 32,9810–9817.
- Parsek, M. R., Val, D. L., Hanzelka, B. L., Cronan, J. E. ve Greenberg, E. P. (1999). Acyl homoserine-lactone quorum-sensing signal generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96, 4360-4365.
- Parsek, M. R ve Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 27-33. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.007>
- Pelgrift, R. Y. ve Friedman, A. J. (2013). Nanotechnology as a therapeutic tool to combat microbial resistance. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13-14), 1803-1815. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.07.011>
- Perez, F., Hujer, A.M., Hujer, .KM., Decker, B.K., Rather, P.N. ve Bonom,o R.A. (2007). Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*, 51, 3471-3484.

- Perez, F., El Chakhtoura, N. G., Papp-Wallace, K. M., Wilson, B. M. ve Bonomo, R. A. (2016). Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: can we apply “precision medicine” to antimicrobial chemotherapy?. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 17(6), 761-781. <https://doi.org/10.1517/14656566.2016.1145658>
- Perry, J. D. (2017). A decade of development of chromogenic culture media for clinical microbiology in an era of molecular diagnostics. *Clinical Microbiology Reviews*, 30(2), 449-479. <https://doi.org/10.1128/CMR.00097-16>
- Pitout, J. D., Nordmann, P. ve Poirel, L. (2015). Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59, 5873-5884. <https://doi.org/10.1128/AAC.01019-15>
- Raffi, M., Hussain, F., Bhatti, T. M., Akhter, J. I., Hameed, A. ve Hasan, M. M. (2008). Antibacterial characterization of silver nanoparticles against *E. coli* ATCC-15224. *Journal of Materials Science and Technology*, 24(2), 192-196.
- Ruppé, É., Woerther, P. L. ve Barbier, F. (2015). Mechanisms of antimicrobial resistance in Gram-negative bacilli. *Annals of Intensive Care*, 5(1), 1-15. <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0061-0>.
- Sabbagh, P., Rajabnia, M., Maali, A. ve Ferdosi-Shahandashti, E. (2021). Integron and its role in antimicrobial resistance: A literature review on some bacterial pathogens. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 24(2), 136-142. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2020.48905.11208>
- Santoro, C. M., Duchsherer, N. L. ve Grainger, D. W. (2007). Minimal in vitro antimicrobial efficacy and ocular cell toxicity from silver nanoparticles. *Nanobiotechnology*, 3(2), 55-65. <https://doi.org/10.1007/s12030-008-9007-z>
- Schreurs, W. J. ve Rosenberg, H. (1982). Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 152(1), 7-13. <https://doi.org/10.1128/jb.152.1.7-13.1982>
- Seil, J. T. ve Webster, T. J. (2011). Reduced *Staphylococcus aureus* proliferation and biofilm formation on zinc oxide nanoparticle PVC composite surfaces. *Acta Biomaterialia*, 7(6), 2579-2584. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.018>
- Shockman, G. D. ve Barren, J. F. (1983). Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 37(1), 501-527. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.37.100183.002441>
- Singh, M., Renu, V. K., Upadhyay, S. K., Singh, R., Yadav, M., Seema, S. K., ...

- Manikandan, S. (2021). Biomimetic synthesis of silver nanoparticles from aqueous extract of *Saraca indica* and its profound antibacterial activity. *Biointerface Research in Applied Chemistry*, 11,8110-8120. <https://doi.org/10.33263/BRIAC111.81108120>
- Singh, M., Singh, S., Prasad, S. ve Gambhir, I. S. (2008). Nanotechnology in medicine and antibacterial effect of silver nanoparticles. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 3(3), 115-122.
- Singh, P., Pandit, S., Jers, C., Joshi, A. S., Garnæs, J. ve Mijakovic, I. (2021). Silver nanoparticles produced from *Cedecea* sp. exhibit antibiofilm activity and remarkable stability. *Scientific Reports*, 11(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92006-4>
- Skóra B, Krajewska U, Nowak A, Dziedzi A, Barylyak A. ve Kus- Liśkiewicz M. (2021). Noncytotoxic silver nanoparticles as a new antimicrobial strategy. *Scientific Reports*. 11,13451. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92812-w>.
- Slavin, Y. N., Asnis, J., Häfeli, U. O. ve Bach, H. (2017). Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity. *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), 1-20. <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>
- Smetana, A. B., Klabunde, K. J. ve Sorensen, C. M. (2005). Synthesis of spherical silver nanoparticles by digestive ripening, stabilization with various agents, and their 3-D and 2-D superlattice formation. *Journal of Colloid and Interface Science*, 284(2), 521-526. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.10.038>
- Sondi, I. ve Salopek-Sondi, B. (2004). Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. *Journal of Colloid and Interface Science*, 275(1), 177-182. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.02.012>.
- Stewart, P. S. (2003). Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology*, 185(5), 1485-1491. <https://doi.org/10.1128/JB.185.5.1485-1491.2003>
- Stewart, P. S. ve Costerton, J. W. (2001). Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet*, 358(9276), 135-138. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(01\)05321-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(01)05321-1)
- Stohs, S. J ve Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*, 18(2), 321-336. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. ve Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.56.012302.160705>

- Subhadra, B., Kim, D. H., Woo, K., Surendran, S. ve Choi, C. H. (2018). Control of biofilm formation in healthcare: Recent advances exploiting quorum-sensing interference strategies and multidrug efflux pump inhibitors. *Materials*, 11,1676. <https://doi.org/10.3390/ma11091676>
- Tajbakhsh E, Ahmadi P, Abedpour-Dehkordi E, Arbab-Soleimani N. ve Khamesipour F. (2016). Biofilm formation, antimicrobial susceptibility, serogroups and virulence genes of uropathogenic E. coli isolated from clinical samples in Iran. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 1(5),11. <https://doi.org/10.1186/s13756-016-0109-4>.
- Theuretzbacher, U. (2017). Global antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens and clinical need. *Current Opinion in Microbiology*, 39, 106-112. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.10.028>
- Thirapanmethee, K., Srisiri-A-Nun, T., Houngsaitong, J., Montakantikul, P., Khuntayaporn, P. ve Chomnawang, M. T. (2020). Prevalence of OXA-type β -lactamase genes among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Thailand. *Antibiotics*, 9(12),864.
- Thirumurugan, G., Seshagiri Rao, J. V. L. N. ve Dhanaraju, M. D. (2016). Elucidating pharmacodynamic interaction of silver nanoparticle-topical deliverable antibiotics. *Scientific Reports*, 6(1), 1-11. <https://doi.org/10.1038/srep29982>
- Thomas, R., Jishma, P., Snigdha, S., Soumya, K. R., Mathew, J. ve Radhakrishnan, E. K. (2020). Enhanced antimicrobial efficacy of biosynthesized silver nanoparticle based antibiotic conjugates. *Inorganic Chemistry Communications*, 117, 107978. <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2020.107978>
- Vertelov, G. K., Krutyakov, Y. A., Efremenkova, O. V., Olenin, A. Y. ve Lisichkin, G. V. (2008). A versatile synthesis of highly bactericidal Myramistin® stabilized silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 19(35), 355707.
- Weiner, L. M., Webb, A. K., Limbago, B., Dudeck, M. A., Patel, J., Kallen, A. J., Sievert, D. M. (2016). 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, 2011–2014. *Infection Control ve Hospital Epidemiology*, 37(11), 1288-1301.
- Weingarten, R. A., Johnson, R. C., Conlan, S., Ramsburg, A. M., Dekker, J. P., Lau, A. F., Frank, K. M. (2018). Genomic analysis of hospital plumbing reveals diverse reservoir of bacterial plasmids conferring carbapenem resistance. *MBio*, 9(1), e02011-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.02011-17>

- Welte, T. ve Pletz, M. W. (2010). Antimicrobial treatment of nosocomial meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) pneumonia: current and future options. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, 391-400. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.045>
- Wenzler, E., Fraidenburg, D. R., Scardina, T. ve Danziger, L. H. (2016). Inhaled antibiotics for Gram-negative respiratory infections. *Clinical Microbiology Reviews*, 29(3), 581-632. <https://doi.org/10.1128/CMR.00101-15>
- Wintachai, P., Paosen, S., Yupanqui, C. T. ve Voravuthikunchai, S. P. (2019). Silver nanoparticles synthesized with *Eucalyptus critriodora* ethanol leaf extract stimulate antibacterial activity against clinically multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from pneumonia patients. *Microbial Pathogenesis*, 126, 245-257. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.11.018>.
- Witte, W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science*, 279(5353), 996-997.
- Xu, K. D., Stewart, P. S., Xia, F., Huang, C. T. ve McFeters, G. A. (1998). Spatial physiological heterogeneity in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is determined by oxygen availability. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(10), 4035-4039. <https://doi.org/10.1128/AEM.64.10.4035-4039.1998>
- Xu, L., Sun, X. ve Ma, X. (2017). Systematic review and meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16, 1-12. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0191-3>
- Xu, X. H. N., Brownlow, W. J., Kyriacou, S. V., Wan, Q. ve Viola, J. J. (2004). Real-time probing of membrane transport in living microbial cells using single nanoparticle optics and living cell imaging. *Biochemistry*, 43(32), 10400-10413. <https://doi.org/10.1021/bi036231a>
- Yang, Z., Liu, W., Cui, Q., Niu, W., Li, H., Zhao, X., Yuan, J. (2014). Prevalence and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* carrying metallo- β -lactamase bla L1 in Beijing, China. *Frontiers in Microbiology*, 5, 692.
- Zhang, Y., Peng, H., Huang, W., Zhou, Y. ve Yan, D. (2008). Facile preparation and characterization of highly antimicrobial colloid Ag or Au nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 325(2), 371-376.

ÖZGEÇMİŞ

İlköğretimini Samsun Atatürk İlköğretim Okulu'nda 2002 yılında tamamladı. 2016 yılında Samsun 19 Mayıs lisesinde lise eğitimini tamamladı. 2008 yılında Samsun 19 Mayıs Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde lisans eğitimine başladı. Lisans eğitimini 2013 yılında tamamlayarak mezun oldu. 2021 yılında Gümüşhane Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimine başladı.

2018 yılında Bayburt Devlet Hastanesine biyolog olarak atandı. Halen de Bayburt Devlet Hastanesinde görev yapmaktadır.

