



TC
AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Klebsiella pneumoniae*
İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN VE
VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÖZGE KULAÇ

HAZİRAN

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Klebsiella pneumoniae*
İZOLATLARININ ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN VE VİRÜLANS
FAKTÖRLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Özge KULAÇ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

HAZİRAN 2023

Yüksek Lisans Tezi Kabul ve Onay Sayfası

Özge KULAÇ tarafından hazırlanan “Klinik Örneklerden İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilinin v Virülans Faktörlerinin Araştırılması” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN

Biyoloji, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Başkan : Prof. Dr. Önder İDİL

Biyoloji, Amasya Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Üye : Prof. Dr. Cihan DARCAN

Moleküler Biyoloji ve Genetik, Bilecik Şeyh Edebali Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum

Tez savunma tarihi: 09/06/2023

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Doç. Dr. Ümit YILDIRIM

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Özge KULAÇ

09/06/2023

KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *Klebsiella pneumoniae* İZOLATLARININ
ANTİBİYOTİK DİRENÇ PROFİLİNİN VE VİRÜLANS FAKTÖRLERİNİN
ARAŞTIRILMASI
(Yüksek Lisans Tezi)

Özge KULAÇ

AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Haziran 2023

ÖZET

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) hastane kaynaklı enfeksiyonlarda rol oynayan Gram negatif fırsatçı bir patojendir. Beta laktamaz enzimi varlığıyla antibiyotiklere karşı direnç kazanması ve biyofilm oluşturabilmesi nedeniyle *K. pneumoniae* kaynaklı enfeksiyonların tedavisi zor mortalitesi yüksektir. Bu bilgiler ışığında çalışmamızda etik kurul onayı alındıktan sonra Tokat Devlet hastanesi, Tokat Erbaa Devlet hastanesi ve Samsun Bafra Devlet Hastanesine başvuran ayakta ve yatan hastalardan elde edilen *K. pneumoniae* (N=120) izolatlarının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç profillerinin disk difüzyon, fenotipik GSBL oluşumun kombine disk yöntemiyle, GSBL genlerinin (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* ve *bla_{CTX-M}*), tip 1 adezin (*fimH*) virülans faktörünün, Class 1 integron (*intI1*) varlığının PZR yöntemiyle, ve biyofilm oluşumları mikrotitrasyon yöntemiyle belirlenmesi amaçlanmıştır. Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre 120 izolatın 47'si (%39,1) meropenem'e, 43'ü (%35,8) imipenem'e, 72'si (%60) seftazidim'e, 48'i (%40) kloramfenikol'e, 107'si (%89,1) levofloksasin'e, 69'u (57,5) aztreonam'a, 71'i (%59,1) fosfomisin'e, 53'ü (%44,1) tobramisin'e, 47'si, (%39,1) gentamisin'e, 83'ü (69,1) amoksisilin klavunata'a, 65'i (%54,1) piperasilin tazobaktam'a, 68'i (%56,6) nalidiksik asit'e dirençli olduğu tespit edilmiştir. GSBL oluşumunu fenotipik olarak tespit etmek için yapılan kombine disk yöntemine göre; 120 izolatın 28 tanesi (%23,3) GSBL pozitif olarak belirlenmiştir. Biyofilm oluşumunu belirlemek için yapılan mikrotitrasyon plağı yöntemine göre 120 izolatın 58'i (%48,3) biyofilm pozitifdir. Klinik izolatların *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *int1*, *fimH* gen bölgesi varlığının tespiti için yapılan PZR değerlendirme sonuçları; 120 izolatın 10'u (%8,3) *bla_{TEM}*, 42'si, (%35) *bla_{SHV}*, 23' ü (%19,1) *bla_{CTX-M}*, 70'i (%58,3) *intI1*, 27'si (%22,5) *fimH* pozitif şeklindedir. Sonuç olarak; *Klebsiella* kaynaklı enfeksiyonların tedavisi için antiyotik direnç profilin bilinmesi önemlidir ve biyofilm oluşumunu engellemeye yönelik çalışmaların yapılmasıyla da *K. pneumoniae* kaynaklı enfeksiyonların önüne geçileceği düşünülmektedir.

Sayfa Adedi : 100
Anahtar Kelimeler : Antibiyotik duyarlılık, biyofilm, GSBL, *K. pneumoniae*, virülans faktör
Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN

INVESTIGATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE AND VIRULANCE FACTORS OF *Klebsiella pneumoniae* ISOLATES FROM CLINICAL SAMPLES

(M. Sc. Thesis)

Özge KULAÇ

AMASYA UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

June 2023

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) is a Gram-negative opportunistic pathogen that plays a role in hospital-acquired infections. Infections caused by *K. pneumoniae* are difficult to treat and have a high mortality because of the presence of beta-lactamase enzyme, resistance to antibiotics and biofilm formation. In the light of this information, in our study, the resistance profiles of *K. pneumoniae* (N=120) isolates obtained from outpatients and inpatients who applied to Tokat State Hospital, Tokat Erbaa State Hospital and Samsun Bafra State Hospital after obtaining ethics committee approval, showed that resistance profiles against various antibiotics were found to be associated with disc diffusion, phenotypic ESBL formation. It was aimed to determine the ESBL genes (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* and *bla_{CTX-M}*), type 1 adhesin (*fimH*) virulence factor, the presence of Class 1 integron (*intI1*) by PCR method, and biofilm formations by microtitration method. The resistance rates of clinical isolates according to the Kirby-Bauer disc diffusion method according to antibiotics; Of 120 isolates, 47 (39.1%) were treated with meropenem, 43 (35.8%) with imipenem, 72 (60%) with ceftazidime, 48 (40%) with chloramphenicol, 107 (89.1%) to levofloxacin, 69 (57.5%) to aztreonam, 71 (59.1%) to fosfomycin, 53 (44.1%) to tobramycin, 47 (39.1%) to gentamicin, 83 (69.1%) to amoxicillin clavunata, 65 (54.1%) to piperacillin tazobactam, 68 (56.6%) to It is resistant to nalidixic acid. According to the combined disk method to detect ESBL formation phenotypically; Of 120 isolates, 28 (23.3%) were ESBL positive. Biofilm formation results according to the microtitration plate method to detect biofilm formation; 58 (48.3%) of 120 isolates were biofilm positive. PCR evaluation results for the detection of clinical isolates *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *intI1*, *fimH* gene region; Of 120 isolates, 10 (8.3%) were *bla_{TEM}*, 42 (35%) *bla_{SHV}*, 23 (19.1%) *bla_{CTX-M}*, 70 (58.3%) *intI1*, 27 (22.5%) is *fimH* positive. In conclusion, It is important to know the antibiotic resistance profile for the treatment of infections caused by *Klebsiella*, and by conducting studies to prevent biofilm formation, infections caused by *K. pneumoniae* will be prevented.

Number of pages : 100

Keywords : Antibiotic susceptibility, biofilm, ESBL, *K. pneumoniae*, virulence factor

Supervisor : Asst. Prof. Dr. Ceren BAŞKAN

ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca öğrettiği bilgi ve erdemlerle her zaman yanımda olan değerli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN'a ve bu günlere gelmemi sağlayan beni yetiştiren sevgili aileme teşekkürlerimi sunarım.

Bakteri izolasyonlarında yardımlarını esirgemeyen Uzm. Dr. Nezahat KOŞAR'a, Uzm. Dr. Seda GÜDÜL HAVUZ'a ve Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı Pervin Özlem BALCI'ya teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması Amasya Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projesi Komisyonunca Kabul edilen FMB-BAP 22-0563 No'lu proje kapsamında desteklenmiştir. Projenin yürütülmesindeki desteklerinden dolayı Amasya Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
ÖN SÖZ ve TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xiii
RESİMLER DİZİNİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xv
1.GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Enterobacteriaceae Familyası	3
2.1.1. Enterobacteriaceae'nin genel özellikleri.....	3
2.1.2. Enterobacteriaceae'nin morfolojik özellikleri	3
2.2. <i>Klebsiella</i> Cinsi.....	5
2.3. <i>K. pneumoniae</i>	5
2.3.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin morfolojik, biyokimyasal ve üreme özellikleri.....	5
2.3.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin yaptığı hastalıklar.....	6
2.3.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> ve hastane enfeksiyonları	7
2.3.4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin virülans faktörleri.....	8
2.4. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları.....	12
2.4.1. Doğal (İntrinsik) direnç	12

	Sayfa
2.4.2. Kazanılmış (Kalıtsal) direnç	12
2.4.3. Beta-laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları.....	15
2.5. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması.....	20
2.5.1. Grup 1	20
2.5.2. Grup 2	21
2.5.3. Grup 3	21
2.5.4. Grup 4	22
2.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL'ler)	23
2.6.1. GSBL'lerin genel özellikleri.....	23
2.6.2. GSBL tipleri.....	24
2.6.3. GSBL'lerin klinik önemi	27
2.6.4. GSBL'lerin laboratuvar tanı yöntemleri	28
2.7. Biyofilm	32
2.7.1. Biyofilm tanımı ve tarihçesi.....	32
2.7.2. Biyofilm yapısı.....	33
2.7.3. Biyofilm oluşum basamakları	34
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
3.1. Materyal	37
3.1.1. Çalışmada kullanılan besi ortamları.....	37
3.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler	39
3.1.3. Çalışmada kullanılan primerler	40
3.1.4. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri	41
3.2. Yöntem.....	42

Sayfa

3.2.1. Mikrobiyal örneklerin izolasyonu ve laboratuvara getirilmesi	42
3.2.2. Antibiyotik duyarlılık testi	43
3.2.3. Kombine disk testi	44
3.2.4. Mikrotitrasyon plağı yöntemiyle biyofilm oluşumun değerlendirilmesi	44
3.2.5. DNA izolasyonu.....	45
4. BULGULAR.....	51
4.1. Klinik Örneklerin Elde Edildiği Hasta Cinsiyetine Göre Dağılımı	51
4.2. Klinik İzolatların İzole Edildiği Örneklerle Göre Dağılımı	51
4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	51
4.4. İzolatların GSBL Profili.....	53
4.5. Mikrotitrasyon Plağı Yöntemiyle İzolatların Biyofilm Oluşum Sonuçları.....	54
4.6. <i>intI1</i> Geninin PZR ile Belirlenmesi	55
4.7. Beta Laktamaz Genlerinin PZR ile belirlenmesi	56
4.7.1. <i>bla_{TEM}</i> gen bölgesi PZR sonuçları.....	56
4.7.2. <i>bla_{SHV}</i> gen bölgesi PZR sonuçları	57
4.7.3. <i>bla_{CTX-M}</i> gen bölgesi PZR sonuçları	58
4.8. Virülans Faktörlerin Belirlenmesi.....	59
4.8.1. PZR yöntemiyle <i>fimH</i> virülans faktör geninin belirlenmesi	59
4. TARTIŞMA.....	64
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	75
KAYNAKLAR.....	77
EKLER.....	95

Sayfa

EK-1: T.C. Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kurul Karar Formu.....	96
EK-2: T.C. Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Değişiklik Toplantı Formu.....	98
ÖZGEÇMİŞ.....	100



ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Enterobacteriaceae familyasında bulunan cinsler.....	4
Çizelge 2.2. <i>Klebsiella</i> cinsinde bulunan gruplar	5
Çizelge 2.3. <i>K. pneumoniae</i> 'nin biyokimyasal özellikleri	6
Çizelge 2.4. β -laktamazların klasifikasyonu.....	23
Çizelge 2.5. Metodların karşılaştırılması	32
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerler.....	41
Çizelge 3.2. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan antibiyotik diskleri.....	42
Çizelge 3.3. Disk difüzyon yönteminde kullanılacak antibiyotikler ve sınır değerleri	43
Çizelge 3.4. <i>intI1</i> gen PZR öğeleri.....	46
Çizelge 3.5. <i>intI1</i> gen Amplifikasyon programı	46
Çizelge 3.6. <i>bla_{TEM}</i> geni PZR öğeleri.....	47
Çizelge 3.7. <i>bla_{TEM}</i> geni amplifikasyon programı	47
Çizelge 3.8. <i>bla_{SHV}</i> geni PZR öğeleri.....	48
Çizelge 3.9. <i>bla_{SHV}</i> geni Amplifikasyon programı	48
Çizelge 3.10. <i>bla_{CTX-M}</i> geni PZR öğeleri.....	49
Çizelge 3.11. <i>bla_{CTX-M}</i> geni amplifikasyon programı	49
Çizelge 3.12. <i>fimH</i> geni PZR öğeleri.....	50
Çizelge 3.13. <i>fimH</i> geni amplifikasyon programı	50
Çizelge 4.1. İzolatların cinsiyete göre dağılımını	51
Çizelge 4.2. İzolatların izole edildiği örneklerle göre dağılımı	51
Çizelge 4.3. İzolatların antibiyotik sonuçları.....	53
Çizelge 4.4. İzolatların GSBL profili.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.5. Klinik izolatların cinsiyet, örnek, antibiyotik, GSBL, <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , <i>int1</i> , <i>fimH</i> ve biyofilm oluşum sonuçları.....	61



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Tip 1 fimbriae'nın şematik gösterimi	10
Şekil 2.2. Tip 3 fimbriae'nın şematik gösterimi	11
Şekil 2.3. İntegron yapısı	15
Şekil 2.4. Ana bakteriyel aktif pompa sistemleri	18
Şekil 2.5. Biyofilm oluşumunun beş aşamalı şematik gösterimi.....	35



RESİMLER DİZİNİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Antibiyotik duyarlılık testi.....	52
Resim 4.2. GSBL pozitif izolatlar.....	54
Resim 4.3. Biyofilm oluşumunun belirlendiği mikrotitrasyon plağı	55
Resim 4.4. Klinik izolatlarda <i>intI1</i> gen bölgesinin elektroforez görüntüsü	56
Resim 4.5. Klinik izolatlarda <i>bla_{TEM}</i> gen bölgesinin elektroforez görüntüsü	57
Resim 4.6. Klinik izolatlarda <i>bla_{SHV}</i> gen bölgesinin elektroforez görüntüsü	58
Resim 4.7. Klinik izolatlarda <i>bla_{CTX-M}</i> gen bölgesinin elektroforez görüntüsü	59
Resim 4.8. Klinik izolatlarda <i>fimH</i> gen bölgesinin elektroforez görüntüsü	60

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, yanda açıklamaları verilmek üzere aşağıda listelenmiştir.

Simgeler	Açıklama
-----------------	-----------------

%	yüzde
µm	mikromolar
β	Beta
°C	santigrat derece
mm	milimetre
mM	milimolar
mL	mililitre
g	gram

Kısaltmalar	Açıklama
--------------------	-----------------

WHO	Dünya sağlık örgütü
AMR	Antimikrobiyal direnç
ÇİD	Çoklu ilaca dirençli
PDR	Pan ilaç dirençli
GSBL	Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz
İYE	İdrar yolu enfeksiyonu
GİS	Gastrointestinal sistem
ECA	Enterobacterial common antigen
MDR	Çoklu ilaca dirençli
LPS	Lipopolisakkarit

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

MİK	Minimal inhibitör konsantrasyon
EPS	Ekzopolisakkarit matriks
TSA	Triptik soy agar
MHA	Mueller hinton agar
TSB	Triptik soy broth
BHI	Brain heart infusion
EMB	Eozin metilen blue
MCA	MacConkey agar

1. GİRİŞ

Enfeksiyonların tedavisinde, antimikrobiyal direnç (AMR) büyük bir problemdir. Dünya sağlık örgütü (DSÖ), AMR'nin insanlığın karşı karşıya olduğu en büyük 10 küresel halk sağlığı tehdidinden biri olduğunu bildirmiştir. İlaça dirençli patojenlerin gelişiminde, antimikrobiyallerin yanlış ve aşırı kullanımının rolü büyüktür. Antibiyotikler gibi mevcut antimikrobiyal ilaçlarla tedavi edilemeyen enfeksiyonlara sebep olan çoklu ilaca dirençli (ÇİD) ve pan ilaca dirençli (PDR) mikroorganizmaların ("süper mikroplar" olarak da bilinir) küresel hızla yayılması özellikle endişe vericidir (WHO, 2021). Dünya çapında en yaygın ÇİD patojenleri olan ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) patojenlerinden biri olan *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) halk sağlığı için büyük bir tehdittir (Wareth ve Neubauer, 2021).

K. pneumoniae, geniş hastalık spektrumlarına neden olan ve antibiyotiklere karşı giderek daha sık direnç kazanımı gösteren fırsatçı patojenlerden biri olarak kabul edilen Enterobacteriaceae ailesine ait önemli bir türdür (Effah, Sun, Liu ve Wu 2020). *K. pneumoniae*'de antibiyotik direnci esasen genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) varlığıyla ilişkilidir. GSBL'lerin en temel özelliği dar ve geniş spektrumlu sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları hidrolize uğratarak inaktive etmeleri ve sefamisinlerle karbapenemleri inaktive etmemeleridir. Bir klinik izolatta aynı anda çok sayıda GSBL enzimi yer alabilmektedir. GSBL'ler klonal yayılım ya da konjugatif plazmid transferiyle diğer mikroorganizmalara taşınabilmektedirler. Ayrıca, trimetoprim-sülfametoksazol, aminoglikozitler ve florokinolonlar gibi antibiyotikler sıklıkla bir direnç plazmidi üzerinde birlikte transfer edildiğinden bu durum çoklu ilaç direnci ile sonuçlanır (Akyar ve diğerleri, 2010; Ghafourian ve diğerleri, 2011). Bu nedenle, özellikle GSBL üreten organizmaların neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek için uygun olmayan antimikrobiyal tedavi kullanıldığında, klinik tedavi başarısızlığı sıklıkla ortaya çıkar. Bu durumu ortadan kaldırmak için, GSBL üreten organizmaların neden olduğu enfeksiyonlar, hastaların klinik özelliklerine göre tahmin edilebilirse, bu daha iyi bir antibiyotik seçimine yol açabilir ve enfeksiyonların sonucunu değiştirebilir (Ghafourian ve diğerleri, 2011).

Antibiyotik direnç sorununun yanı sıra bir diğer önemli problem ise hastane enfeksiyonlarıdır. Tüm hastane enfeksiyonlarının %8'inden sorumlu olan *K. pneumoniae*, hastane kaynaklı enfeksiyonların önde gelen nedenidir. İdrar yolu enfeksiyonları (İYE), pnömoni, sepsis ve yara enfeksiyonları gibi pek çok hastane kaynaklı enfeksiyonun etkeni olan *K. pneumoniae* suşları hastanede yatmakta olan hastaların gastrointestinal sisteminde (GİS) ve nazofarinksinde kolonizasyon göstererek, hastalarda ve hastane florasında kolaylıkla kolonize olarak uzun zaman canlılığını koruyabilir (Schembri, Blom, Krogfelt ve Klemm, 2005; Aşçıoğlu, 2007; Kırac, 2011; Murphy ve Clegg, 2012; Genovese ve diğerleri, 2020). Özellikle prematüre bebeklerde, immün sistemi zayıflamış kişilerde, diyabet ve alkol bağımlısı olan ve yoğun bakım ünitesinde tedavi gören hastalarda *K. pneumoniae* enfeksiyonları yaygındır (WHO, 2014).

Bakterilerin antibiyotik direnç profilleri ve virölans faktörleri hastaneler arasında, hatta aynı hastanenin farklı servislerinde bile farklılık göstermektedir. Bu sebepten dolayı; çalışmamızda, Tokat Devlet Hastanesi, Tokat Erbaa Devlet Hastanesi ve Samsun Bafra Devlet Hastanesi mikrobiyoloji laboratuvarlarına gönderilen ayaktan ve yatan hastalardan toplanan *K. pneumoniae* izolatlarının (N=120); Disk difüzyon yöntemiyle, izolatların antimikrobiyal direnç profilinin belirlenmesi, Kombine disk yöntemiyle, izolatların GSBL oluşumunun fenotipik olarak belirlenmesi, Mikrotitrasyon plağı yöntemiyle izolatların biyofilm oluşumunun belirlenmesi, PZR yöntemiyle izolatların GSBL gen bölgelerinin (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* ve *bla_{CTX-M}*), *intI-1* ve *fimH* gen bölgesinin belirlenmesi ve ülkemize ait epidemiyolojik verilere katkı sağlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Enterobacteriaceae Familyası

2.1.1. Enterobacteriaceae'nin genel özellikleri

Enterobacteriaceae familyası, tıbbi açıdan önemli olan Gram negatif basiller içerisinde en büyük ve heterojen ailedir. Bu ailede 40'dan fazla cins, 150'den fazla tür bulunmaktadır. Enterobacteriaceae familyasında yer alan türler biyokimyasal özelliklerine, antijenik yapılarına, nükleik asit hibridizasyonuna ve DNA dizi analizlerine bakılarak sınıflandırılmaktadır. Her geçen gün bu familyaya yeni üyeler eklenmekte veya genetik analizlerin sonucunda bulunan türlerin isimleri değişebilmektedir.

Enterobacteriaceae familyası üyelerinin çoğu, toprakta, sularda, bitkilerde ve bir bölümü de insan ve hayvanların bağırsak mikrobiyotasında bulunur. Bazı koşullarda Enterobacteriaceae elemanları insanda bağırsak dışında da kolonize olabilir. Alkol bağımlılarında, şeker hastalarında, antibiyotik tedavisi alanlarda ve hastanede yatan hastaların üst solunum yollarında kolonizasyon gösterebilirler. Ayrıca rahim içi cihaz kullanan kadınlarda ve post-menapozal dönemde vajinada kolonizasyon seviyesinde artış görülür. Enterobacteriaceae familyasında yer alan türlerin çoğu çevrede saprofit olarak ya da bitki patojeni şeklinde bulunmaktadır. Ayrıca pek çok cins ve tür de insana ait klinik örneklerden çok nadir izole edilmektedir. Familyanın kompleks yapısına rağmen yaklaşık 20 tür bu familyadan kaynaklanan enfeksiyonların %95'ini meydana getirmektedir (Özkuyumcu, 2009: 103). Enterobacteriaceae familyasında bulunan cinsler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

2.1.2. Enterobacteriaceae'nin morfolojik özellikleri

Gram negatif, genellikle homojen boyanan 2-3 µm uzunluğunda, 0,5-0,6 µm genişliğinde spor meydana getirmeyen basillerdir. Lipopolisakkarit tabakası 3 kısımdan meydana gelir; Lipid A, kor poligosakkarit ve tekrarlayan oligosakkarit yan zincirleri. Lipid A disakkarittir, endotoksin aktivitesinden görevlidir. Kor polisakkariti Enterobacteriaceae familyasında ortaktır, *Enterobacterial common antigen* (ECA) şeklinde isimlendirilir.

Tekrarlayan oligosakkarit yan zincirleriyse oldukça heterojendir. Türler arasında hatta aynı tür içerisinde bile farklılık gösterir. Lipopolisakkaritlerin bu bölümüne somatik antijen ya da O antijeni denir. O antijeni serogrup taksonomisinde kullanılır. Mikroorganizmaların O antijeni ısı, alkol ve aside dirençli, formaldehite duyarlıdır.

Bazı Enterobacteriaceae familyası üyelerinde polisakkarit yapıda belirgin bir kapsül bulunur. Kapsül kendine özgü genetik ve biyokimyasal özelliklere sahip K antijenine sahiptir. Bu antijen mikroorganizmaların serotiplendirilmesinde kullanılır. Kapsül antijeni O antijenine göre ısıya daha duyarlıdır. *Klebsiella* ve *Enterobacter*'de belirgin bir kapsül bulunmaktadır.

Enterobacteriaceae familyasının hareket edebilen üyelerinde protein yapıda flagel bulunur. Flageli meydana getiren proteine flagellin denir. Yapısında protein olması sebebiyle, ısıya, aside ve alkole karşı hassasiyet, formaldehite dirençlilik gösterir. Hareket edebilen mikroorganizmaların çoğunda flageller bakteri yüzeyinin tümünde yer alır (Özkuyumcu, 2009: 103-104).

Çizelge 2.1. Enterobacteriaceae familyasında bulunan cinsler (Özkuyumcu, 2009: 104).

<i>Averyella</i>	<i>Moellerella</i>	<i>Trabulsiella</i>
<i>Budvicia</i>	<i>Morganella</i> *	<i>Xenorhabdus</i>
<i>Buttiauxella</i>	<i>Obesumbacterium</i>	<i>Yersinia</i> *
<i>Cedecea</i>	<i>Pantoea</i>	<i>Yokenella</i>
<i>Citrobacter</i> *	<i>Photorhabdus</i>	<i>Shigella</i> *
<i>Edwardsiella</i>	<i>Plesiomonas</i>	<i>Salmonella</i> *
<i>Enterobacter</i> *	<i>Pragia</i>	<i>Serratia</i> *
<i>Escherichia</i> *	<i>Proteus</i> *	<i>Tatumella</i>
<i>Ewingella</i>	<i>Providencia</i> *	<i>Trabulsiella</i>
<i>Hafnia</i>	<i>Rahnella</i>	<i>Xenorhabdus</i>
<i>Klebsiella</i> *	<i>Shigella</i> *	<i>Yersinia</i> *
<i>Kluyvera</i>	<i>Salmonella</i> *	<i>Yokenella</i>
<i>Leclarcia</i>	<i>Serratia</i> *	<i>CDC Enterik grup</i>
<i>Leminorella</i>	<i>Tatumella</i>	

*Klinik örneklerden sıklıkla izolasyonu yapılan cinsler

2.2. *Klebsiella* Cinsi

Klebsiella cinsi adını Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'den almıştır. Bununla beraber, bu bakteriyi bağışıklığı baskılanmış hastalarda pnömoniye neden olan ajan olarak ilk kez tanımlayan Alman patolog Carl Friedlander'in onuruna uzun yıllar Friedlander basili olarak adlandırılmıştır (Arato, Raso, Gasperini, Berlanda-Scorza ve Micoli, 2021). Yapılan DNA analizlerine göre *Klebsiella* cinsi 3 gruba ayrılmaktadır Çizelge 2.2 (Özkuyumcu, 2009: 137).

Çizelge 2.2. *Klebsiella* cinsinde bulunan gruplar (Özkuyumcu, 2009: 137).

Grup	Tür
Grup 1	<i>K. pneumoniae</i> alttür <i>pneumoniae</i>
	<i>K. pneumoniae</i> alttür <i>rhinoscleromatis</i>
	<i>K. granulomatis</i>
Grup 2	<i>K. ornithinolytica</i>
	<i>K. planticola</i>
	<i>K. trevisanii</i>
	<i>K. terrigena</i>
Grup 3	<i>K. oxytoca</i>

2.3. *K. pneumoniae*

Tür sayısı sekiz olan *Klebsiella* cinsi içerisinde *K. pneumoniae* hastalık oluşturan tıbbi açıdan önemli bir türdür. Doğada sıklıkla bulunabilir ayrıca insanların ve hayvanların gastrointestinal sistem mikrobiyotasında bulunur. Üriner sistem enfeksiyonu, pnömoni, bakteriyemi gibi pek çok enfeksiyona sebep olur (Özkuyumcu, 2009:137; Albayrak, 2018).

2.3.1. *K. pneumoniae*'nin morfolojik, biyokimyasal ve üreme özellikleri

K. pneumoniae, 0,7-1,5 µm eninde, 2,5 µm boyunda Gram negatif, sporsuz, kapsüllü ve hareketsiz mikroorganizmalardır. Tek, ikili, ya da kısa zincir biçiminde görülebilir. *K. pneumoniae*'nin birçoğu ilk izolasyonda, karbonhidratça zengin ve nemli besi ortamlarında yapılan kültürlerde etrafında geniş bir kapsül meydana getirir (Albayrak, 2018).

İdentifikasyonu için MacConkey ve Eozin Metilen Blue (EMB) agar gibi selektif besiyerlerinden yararlanılır. Bu besiyerleri laktoz ve sükroz gibi bir ya da daha çok karbonhidrat bulundurur. Fermantasyon sonucunda pH'ın düşmesine bağlı olarak besiyerinde renk değişimi meydana gelir. *K. pneumoniae*'nin biyokimyasal özellikleri Çizelge 2.3'de gösterilmiştir (Güçlü-Üsküdar, 2017).

K. pneumoniae fakültatif anaerop bir mikroorganizmadır. Optimum 37 °C sıcaklıkta üreyebilir. Fakat *K. pneumoniae* dışındaki türler 4-44 °C aralığında da üreyebilmektedirler (Özkuyumcu, 2009: 137).

Çizelge 2.3. *K. pneumoniae*'nin biyokimyasal özellikleri (Güçlü-Üsküdar, 2017).

Biyokimyasal özellikler	<i>K. pneumoniae</i>
Laktoz	+
Glikoz	A, G
Simon Sitrat	+
Sükroz	+
Üreaz	+
İndol	-
H ₂ S (TSI)	-
VP	+
44 °C' de üreme	-
ONPG	+
Mac Conkey Agarda Koloni	P, M
EMB Agarda Koloni	P

VP: Voges-Proskauer; ONPG: o-nitrofenil-β-D-galaktopiranozid; P: pembe; M: mukoid; A: asit; G: gaz

2.3.2. *K. pneumoniae*'nin yaptığı hastalıklar

K. pneumoniae hayvanlarda mukozal yüzeyler ve çevre (su, toprak vb.) gibi farklı ortamlarda bulunabilen Gram negatif bir mikroorganizmadır. İnsanlarda *K. pneumoniae* gastrointestinal kanalda ve nazofarenkste kolonileşir, böylelikle mikroorganizmalar kan dolaşımıyla diğer dokulara girebilir ve enfeksiyona sebep olabilir. *K. pneumoniae* fırsatçı bir patojendir, septisemi, zatürre, idrar yolu ve yumuşak doku enfeksiyonları gibi ciddi rahatsızlıklara sebep olabilir (Podschun ve Ullmann 1998).

2.3.3. *K. pneumoniae* ve hastane enfeksiyonları

Hastaneye başvuru esnasında inkübasyon evresinde olmayan, hastaların hastaneye başvurularından sonra gelişim gösteren veya hastanede gelişim göstermesine rağmen bazen hasta taburcu olduktan sonra ortaya çıkan enfeksiyonlar hastane enfeksiyonu veya nozokomial enfeksiyon olarak adlandırılır. Hastane enfeksiyonlarının görülme sıklığı %3,1-%14,1 arasında değişebilir (Pekşen, 1993). Hastane enfeksiyon etmenleri ile direnç profili ülkeler arasında, hastaneler arasında ve hatta aynı hastanenin farklı bölümleri arasında bile farklılık gösterebilir (Akçam, Gönen, Kaya ve Yaylı, 2004). Bu enfeksiyonların kökeni kişinin kendi kolon mikrobiyotası (endojen) ve hastane çalışanlarının elleri (ekzojen) olabilir (Ulutürk ve diğerleri, 2000).

Nozokomial enfeksiyonlardan izole edilen mikroorganizmaların dağılımı zamanla değişmiş olsada, Gram negatif mikroorganizmalar hastanede problemli mikroorganizmalar içerisindeki yerini korumuştur (Öngen, b.t). Avrupa’da 1992 yılında 13 ülkede yoğun bakım ve hematoloji/onkoloji servislerinde elde edilen 8625 bakteriyel izolatların %47 sinin Gram negatif mikroorganizmalar olduğu tespit edilmiştir (Verbist, 1993). Ülkemizde 1996 yılında, yoğun bakım servislerinden izolasyonu yapılan Gram negatif mikroorganizmaların sıklığını belirlemek için dokuz merkezin katıldığı bir çalışmada, 981 Gram negatif mikroorganizma değerlendirmeye alınmış, bu mikroorganizmaların dağılımı incelendiğinde ise ilk sırada %30 oranıyla *Pseudomonas* spp, daha sonra %25 oranıyla *Klebsiella* spp ve %18 oranıyla *Escherichia coli* (*E. coli*) tespit edilmiştir (Gür ve Ünal, 1996).

K. pneumoniae, nozokomial enfeksiyonlardan sıklıkla izolasyonu yapılan ve morbidite ve mortaliteden en fazla sorumlu olan bir *Klebsiella* türüdür. Yetişkin ve pediatri yoğun bakım servislerinde yatmakta olan hastalar, şeker hastalığı ve kronik obstrüktif akciğer rahatsızlığı gibi rahatsızlıkların eşlik ettiği bağışıklık sistemi baskılanan hastalar, damar içi kateter ve idrar sondası kullanılan ve geniş spektrumlu antibiyotik tedavisi gören hastalar *K. pneumoniae* enfeksiyonları bakımından riskli gruptadırlar (Kuş, 2015). *K. pneumoniae*, hastane ortamlarında idrar yolu enfeksiyonları (İYE), pnömoni, sepsis ve yara ve yumuşak doku enfeksiyonları ile ilişkili fırsatçı bir bakteriyel patojendir (Gorrie ve

diğerleri, 2018). *K. pneumoniae*'nin fazla sayıda enfeksiyona sebep olması virölans faktörleri ve antibiyotik direnç profiliyle ilişkilidir (Kuş, 2015).

K. pneumoniae, genellikle kullanılan son basamak antibiyotiklerin çoğuna direnç özellikleriyle hızla tanınmaktadır. Özellikle bir dizi akut enfeksiyona sebep olduğu hastanelerde izolasyon oranlarının artması endişe uyandırır (Effah ve diğerleri, 2020). Çoklu antibiyotiklere dirençli *K. pneumoniae* suşlarının artan oranı küresel, halk sağlığı problemidir. Geçen yüzyılın sonunda GSBL suşlarının dolaşımıyla son savunma hattı antibiyotiği olan karbapenemlere dirençli suşların yayılış göstermesi tedavi seçenekleri ile difüzyon kontrolünü büyük oranda azaltmıştır (Vuotto ve diğerleri, 2017).

Klebsiella'nın nozokomiyal yayılımını önlemek amacıyla bir dizi tedbir önerilmektedir. Üriner kateterlerin, intravenöz trakeostamilerin ve yaraların yönetimi için temel epidemiyolojik standartlara bağlı kalınması, ekipmanın bakımı ve iyi el yıkama uygulamaları, hastane *Klebsiella* enfeksiyonlarının yayılışının önlenmesinde yardımcıdır. *Klebsiella* enfeksiyonlarının kontrole alınması için bir diğer tedbir ise, antibiyotiklerin hatalı ve aşırı kullanımını önlemek için hastane antibiyotik kullanımının düzenlenmesidir. Aynı zamanda hastane enfeksiyonu sürveyansı, hastane *Klebsiella* enfeksiyon oranlarının önlenmesinde ve kontrolünde kullanılan verilerin toplanması için gereklidir (Podschun ve Ullmann 1998).

2.3.4. *K. pneumoniae*'nin virölans faktörleri

Patojenite terimi, bir mikroorganizmanın hastalığa neden olma yeteneğini tanımlarken, virölans herhangi bir mikroorganizma türünün patojenitesinin ölçümü veya derecesidir (Podschun ve Ullmann 1998).

K. pneumoniae patojenitesinin, doğuştan gelen konak bağışıklığının üstesinden gelmesi ve bir memeli konakçıda enfeksiyonu sürdürmesi çeşitli virölans faktörlerine bağlıdır (Chung ve diğerleri, 2015). Aynı tür iki mikroorganizmanın virölans faktörleri bile hastalığa sebep olduğu bölgeye göre değişebilir. Örneğin; nozokomiyal *Klebsiella* enfeksiyonları en sık idrar ve solunum yollarında kolonize olur. Bu iki vucüt bölgesi konakçı savunma mekanizmalarına göre önemli ölçüde farklılık gösterdiğinden, *Klebsiella*'nın idrar yolu

enfeksiyonuna neden olan suşlarındaki virülans faktörlerinin paterninin, pnömonili hastaların pulmoner kaynaklarından izole edilen suşlarda gözlenenden farklı olması beklenir (Podschun ve Ullmann 1998).

In vitro ve *in vivo* araştırmalarda mikroorganizma ve konakçı etkileşimleri araştırılarak, *Klebsiella* enfeksiyonlarında bu mikroorganizmanın patogeneze katkıda bulunan bir dizi virülans faktör tespit edilmiştir (Podschun ve Ullmann 1998).

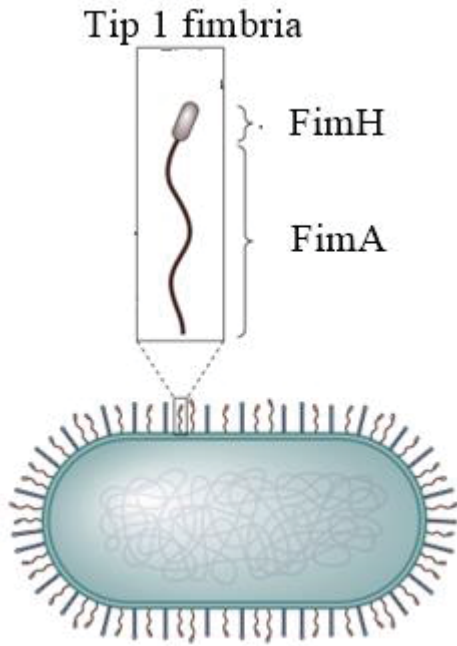
Pilus (Fimbriae)

Mikroorganizmalar enfeksiyon sürecinin kritik bir ilk adımı olarak, mukozal yüzeylere mümkün olduğunca yaklaşmalı ve konakçı hücreye bağlanarak (aderans) bu mesafeyi korumalıdır. Enterobacteriaceae'deki adeziv özellikler genellikle farklı pilus tipleri tarafından sağlanır. Pilus (diğer adıyla fimbriae olarakda bilinir), mikroorganizmanın yüzeyinde kamçılı olmayan, filamentli projeksiyonlardır (Podschun ve Ullmann 1998). Çoğu klinik *K. pneumoniae* izolatu tip 1 fimbria ve tip 3 fimbria olmak üzere iki fimbrial adezin üretebilir (Struve, Bojer ve Krogfelt, 2008).

Tip 1 fimbria

Tip 1 fimbria Enterobacteriaceae'de en yaygın yapışkan organeldir ve en kapsamlı *E. coli*'de çalışılmıştır (Stahlhut, 2009). *K. pneumoniae* tip 1 fimbria yapısı, genetik açıdan *E. coli*'deki tip 1 fimbria yapısına yüksek düzeyde benzerlik gösterir (Struve ve diğerleri, 2008). Tip 1 fimbria'da fimbrial yapı fim gen kümesi tarafından kodlanır, FimH alt birimi uçta olmak üzere, başlıca FimA alt birimlerinden oluşan filamentli, zara bağlı, yapışkan yapılardır Şekil 2.1 (Murphy, Mortensen, Krogfelt ve Clegg, 2013; Paczosa ve Mecsas, 2016). Bu pililerin bakteriyal virülansla ilişkisinin mukosa, ürogenital sisteme, solunum ve bağırsak yollarının epitel hücrelerine bağlanmasıyla kaynaklandığı düşünülmektedir (Ofek ve Beachey, 1978; Balish, Jensen ve Uehling, 1982; Venegas ve diğerleri, 1995). Tip 1 pilusun idrar yolu enfeksiyonlarının (İYE) patogeneziindeki rolleri çoğunlukla *E. coli* üzerinde yapılan araştırmalarda ortaya çıkarılmış, fakat hayvan modellerinde *K. pneumoniae* için tanımlanmıştır (Fader ve Davis, 1980; Fader ve Davis, 1982; Maayan, ve diğerleri, 1985). Tip 1 piluslar, öncelikle alt İYE patogeneziyle ilişkili olmakla beraber,

piyelonefrit patogenezinde rol oynayabilir (Fader ve Davis, 1982; Matsumoto, Mizunoe, Sakamoto, Tanaka ve Kumazawa, 1990). Bu yapıların, piyelonefrit vakalarında proksimal tübülüs hücrelerine etkili bir şekilde bağlandığı gösterilmiştir (Virkola ve diğerleri, 1988). Ayrıca Tip 1 fimbriaların idrarda ya da tükürükteki Tamm-Horsfall proteini gibi mannozil bulunduran glikoproteinlere bağlanma yetenekleri vardır (Babu, Abraham, Dabbous ve Beachey, 1986; Reinhart, Obedeanu ve Sobel, 1990). Bu veriler tip 1 pilinin idrar ve solunum yollarındaki bakteriyel kolonizasyona aracılık ettiğini doğrulamaktadır (Clegg ve Gerlach, 1987). Mikroorganizmaların solunum yolu hücrelerine yapışması, üst solunum yollarında kolonizasyon direncinin bozulmasına ve ardından fakültatif patojenik mikroorganizmaların çoğalmasına yol açar. Bu bozukluk uzun süreli mekanik ventilasyon uygulanan hastalarda pnömoni gelişimine neden olabilir (Ayars, Altman ve Fretwell, 1982; Podschunve Ullmann 1998).

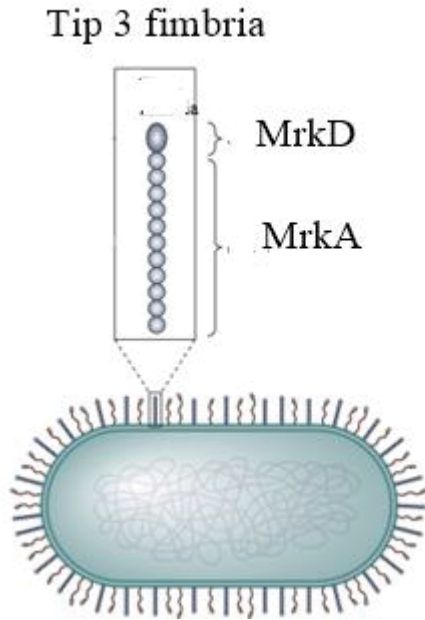


Şekil 2. 1. Tip 1 fimbriae'nin şematik gösterimi (Paczosa ve Mecsas, 2016).

Tip 3 fimbria

Tip 3 fimbrialar, *K. pneumoniae*'nin yüzeyindeki sarmal benzeri, zara bağlı, yapışkan yapılardır. Bu fimbrialar *mrk* operon tarafından kodlanır, ucunda MrkD alt birimi olmak üzere, öncelikle MrkA alt birimlerinden oluşur Şekil 2.2 (Murphy ve diğerleri, 2013; Paczosa ve Mecsas, 2016). Tip 3 fimbrialar, eritrositlerin mannoz varlığında veya

yokluğunda tanik asitle muamele edilmesini takiben, eritrositleri *in vitro* aglutine etme yetenekleriyle karakterize edilir (Murphy ve Clegg, 2012). Yapılan *İn vitro* çalışmalar, tip 3 fimbriaların insan böbrek ve akciğer dokusundaki farklı yapılara ve insan idrar çökeltilerinden epitel hücrelerine, endotel ve mesane epitel hücre hatlarına yapışmaya aracılık ettiğini ortaya koymuştur (Tarkkanen ve diğerleri, 1990; Hornick, Allen, Horn ve Clegg, 1992; Tarkkanen ve diğerleri, 1992; Tarkkanen, Virkola, Clegg ve Korhonen, 1997). Ayrıca tip 3 fimbriaların *K. pneumoniae*'de biyofilm oluşumu ve tıbbi cihazlara (örneğin; üretral kateterler) bağlanması için gerekli olduğu bulunmuştur (Stahlhut, Struve, Krogfelt ve Reisner, 2012; Paczosa ve Mecsas, 2016).



Şekil 2.2. Tip 3 fimbriae'nin şematik gösterimi (Paczosa ve Mecsas, 2016).

Hipermukoviskozite

1980'lerin ortalarında ve 1990'lı yıllarda, Tayvan'dan gelen raporlar, toplum kaynaklı *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının benzersiz bir klinik sendromunu tanımladı (Shon, Bajwa ve Russo, 2013). Hepatobiliyer hastalık öyküsü olmayan hastalar, toplum kaynaklı piyojenik karaciğer apseleri ve uzak bölgelere metastatik yayılma eğilimiyle başvurdu (Cheng, Yung-Ching Liu, Yen, Cheng-Yi Liu ve Wang, 1991; Wang ve diğerleri, 1998). Konakçıların genç ve sağlıklı olması, endoftalmit ve menenjit dahil olmak üzere olağan

dışı enfeksiyon bölgelerinde gözlenmesi ve son olarak bir agar plakasında yetişen kolonilerin hipermukoviskoz fenotipte olması gibi özellikleriyle klasik *K. pneumoniae*’den ayrılan bu yeni varyant hipermukoviskoz *K. pneumoniae* olarak adlandırılmıştır (Cheng ve diğerleri, 1991; Pomakova ve diğerleri, 2012; Shon ve diğerleri, 2013). Hipermukoviskoz fenotipinde olan *K. pneumoniae* suşları, erken dönemde hipervirülansla ilişkilendirilmiştir; hvKp (Hipervirülant *K. pneumoniae*) suşları cKp (Klasik *K. pneumoniae*) suşlarından daha fazla kapsül üretme eğilimindedir ve yapılan çalışmalar RmpA ve RmpA2’nin kapsül ekspresyonunu arttığını ortaya koymuştur (Chen ve diğerleri, 2004; Hsu, Lin, Chen, Chou ve Wang, 2011; Walker ve Miller, 2020). Ayrıca, hipermukoviskoz fenotipinin tipik özelliği olan aşırı yüksek viskozite, suşları nötrofiller tarafından fagositozdan ve kompleman ile serum öldürmesinden koruyabilir (Vuotto ve diğerleri, 2017).

2.4. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

Antibiyotiğe maruz kalan mikroorganizmalar, antimikrobiyal etkinin üstünden gelebilmek amacıyla birçok mekanizma geliştirmiştir. Bir mikroorganizma türü birçok direnç mekanizması bulundurabilir. Ancak temelde, doğal ve kazanılmış direnç mekanizmaları olmak üzere iki mekanizma mikroorganizmaları antibiyotiklere dirençli hale getirir. Bu mekanizmalar spesifik mikroorganizma türlerinde antibiyotiğin yapısına, konak canlıdaki hedef bölüme, mikroorganizmanın türüne ve plazmit veya kromozomal mutasyonla ilişkili olup olmadığına bakarak etki eder (Meral ve Korukoğlu, 2014).

2.4.1. Doğal (İntrinsik) direnç

Antimikrobiyal ajanlardan bazıları, mikroorganizmanın genetik yapısı nedeniyle mikroorganizmayı etkilemez; bu özellik mikroorganizmanın doğal direnci şeklinde adlandırılır (Kayaş, 2009).

2.4.2. Kazanılmış (Kalıtsal) direnç

Mikroorganizmalardaki genetik özelliklerin değişimi transpozon ya da plazmid DNA’sında oluşan mutasyonlarla meydana gelir. Dirençli mikroorganizma tarafından konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyonla direnç geninin aktarılmasıyla oluşan dirençtir (Kayaş,

2009). Kalıtsal kökenli direnç kromozomal ya da kromozom dışındaki elemanlara bağlı olabilir (Yüce, 2001).

Kromozomal direnç

Bu direnç çeşidi kromozomda spontan bir mutasyon sonucunda meydana gelmektedir. Her hücre bölünmesinde mutasyon frekansı 10^{-5} ve 10^{-10} aralığındadır. Bu direnç farklı türden mikroorganizmalara yayılmaması ve mutasyona uğramış mikroorganizmanın metabolizmasının değişebilip, çoğalmasının engellenebileceğinden ötürü plazmidlere bağlı dirençten daha az görülmektedir (Işık, 2007).

Plazmidlere bağlı direnç

Plazmidler, mikroorganizmalarda antimikrobiyal ajanların kullanımından önce de bulunan ve kromozomdan bağımsız şekilde eşlenebilen ekstrakromozomal DNA parçacıklarıdır. R (rezistans) etmenleri bir veya birkaç antimikrobiyal ajanlara, ağır metallerle karşı direnç genlerini bulunduran plazmidlerdir. Genellikle antimikrobiyal ajanları yok eden enzimlerin üretiminden plazmid genleri sorumludur (Yüce, 2001).

Transpozonlara bağlı direnç

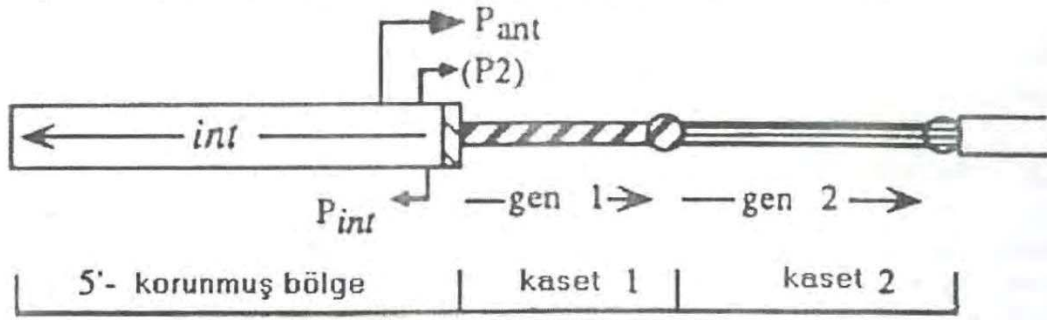
Transpozonlar mikroorganizmanın kromozomunun farklı kısımlarında yerleşebilen, kromozomdan plazmide, plazmiden plazmide, plazmiden DNA ya da bakteriyofaja aktarılan; kendiliğinden eşlenemeyen, bu sebeple de kromozom, plazmid ya da bakteriyofaj gibi bir replikon üstünde bulunan DNA dizileridir. Transdüksiyon, transformasyon, konjugasyon ve transpozisyon benzeri mekanizmalarla direnç genlerini bulunduran genetik materyal ve plazmidler mikroorganizmalar arasında aktarılabilir (Yüce, 2001).

İntegronlara bağlı direnç

Bakterilerde antibiyotik direnci küresel bir sorundur ve bu direnci sağlayan genler büyük ilgi görmüştür. Özellikle Gram-negatif bakterilerde, bu genlerin çoğu, farklı DNA

molekülleri (örneğin bir bakteri kromozomu ve bir plazmid) arasında hareket sağlayan ve böylece farklı cinslerden olanlar da dahil olmak üzere hücreler arasında transfer sağlayan mobil genetik elementlerle ilişkilidir. Son zamanlarda, klinik suşlardan izole edilen *Enterobacteriaceae* familyasına ait mikroorganizmalarda, pek çok direnç genleri taşıyan ve integron şeklinde adlandırılan yeni hareketli elementlerin (mobil element) varlığı tespit edilmiştir. Bu elementlere ya bağımsız olarak plazmidlerde ya da Transposon (Tn21) ailesinin bir bölümü olarak rastlanmaktadır (Partridge, Tsafnat, Coiera and Iredell, 2009; Mikrobiyoloji. Org, b.t). İntegronlar, bölgeye özgü bir rekombinasyonel mekanizma ile antibiyotik direnç genlerinin eklenmesine izin veren doğal ifade vektörleridir (Levesque, Piche, Larose ve Roy, 1995). İntegraz kodlayan *intI1* geni, bir kaset promotörü (Pc) ve bir birincil rekombinasyon bölgesi (*attI*) olmak üzere integronlar 3 temel unsurdan meydana gelirler. Şekil 2.3 Kodlanmış integrallerin dizilişine bakılarak bugüne kadar beş farklı mobil integron sınıfı tespit edilmiştir (Cambray, Guerout ve Mazel, 2010). Bu sınıfların içerisinde, sınıf 1 integronlar, klinik izolatlarda yaygın olarak bulunur ve bilinen antibiyotik dirençli gen kasetlerinin çoğu bu sınıfa aittir. Bugüne kadar ve sadece nükleotid sekansında %5'ten fazla farklılık gösteren kasetler dikkate alındığında, sınıf 1 integronlardan 80'den fazla farklı gen kaseti tarif edilmiştir (Mazel, 2006). Birçok farklı antibiyotik sınıfına ve dezenfektanlara direnç kazandıran genler, toplu olarak önemli bir gen havuzu oluşturan belirli 'gen kasetleri' şeklinde bulunur (Partridge ve diğerleri, 2009). Tanımlanan tüm integronlara yerleştirilmiş gen kasetleri, belirli yapısal özellikleri paylaşır ve genellikle tek bir promotörsüz gen ve bir rekombinasyon bölgesinin (*attC* veya 59-bazlı eleman) biraz fazlasından oluşur. *attC* siteleri, bölgeye özgü integras için tanıma siteleri olarak işlev gören çeşitli bir nükleotid dizileri ailesidir, uzunluk ve sıra bakımından farklılık gösterir fakat uçlarında korunmuş bölgeleri paylaşır ve genellikle gövde-döngü yapıları oluşturduğu tahmin edilen 3' ucunda kusurlu bir ters çevrilmiş tekrar içerir (Mazel, 2006; Partridge ve diğerleri, 2009). Gen kasetleri promotörsüz olduğundan, sadece ilk birkaç kaset Pc ile ifade edilir. Bir veya daha fazla kaset içeren replikatif olmayan dairesel ara ürünler oluşturmak için kaset dizisi boyunca rastgele eksizyonlar meydana gelse, entegrasyonlar tercihen *attI* bölgesinde meydana gelir. Bu gözlemler, yeni entegre edilmiş kasetlerin hemen eksprese edildiği ve böylece önceden entegre edilmiş kasetleri kademeli olarak ekspresyondan uzaklaştırdığı bir modeli destekler. Entegrasyon olayları bu nedenle seçime tabidir. Dizideki eksprese edilmemiş kasetler, *attI*'de eksizyon ve yeniden entegrasyon yoluyla harekete geçirilebilen, kalıcı bir genetik değişkenlik rezervuarı

oluşturur. Yeni kasetler de yatay gen transferi aracılığıyla elde edilebilir ve çoğu olasılık lokusları yalnızca dar bir fenotip aralığına erişebilsede, integronlar potansiyel olarak çok çeşitli farklı fonksiyonları potansiyel olarak kodlayan gen kasetlerinin devasa bir metagenomik repertuarına erişebilir. Ayrıca, en azından bazı türler (büyük olasılıkla bir süperintegron taşıyanlar), sistemin genişletilmiş bir versiyonu, mevcut havuzu zenginleştirmek için zorunlu olarak yeni kasetler üretebilir (Cambray ve diğerleri, 2010).



Şekil 2.3. İntegron yapısı. İnt: İntegraz geni. P ant: İntegronların tümünde yer alan ortak promotor, P2: İntegronların bazılarında yer alan sekonder promotor. P int: İntegraz geninin promotoru. Gen1 ve Gen2 eklenmiş gen kasetleri. İşaretli halkalar; gen kasetlerinin her birinin sonunda yer alan 59 baz çiftlik eleman. İşaretli dikdörtgen: attL (Köseoğlu, 2004).

2.4.3. Beta-laktam antibiyotiklere direnç mekanizmaları

β -laktamlar, bakteri hücresinin hücre duvarına etki eden bir grup antibiyotiktir. Penisilinleri, sefalosporinleri, karbapenemler ve monobaktamları içerir (Rawat ve Nair, 2010). İşlevsel olarak β -laktam direnci, β -laktamaz (β -laktamaz) üretimi, hedef modifikasyonu değişikliği, aktif pompa sistemleri ve dış zar geçirgenliğinin bir sonucu olabilir. Bu modaliteler tek başına veya farklı kombinasyonlarda ortaya çıkabilir (Rawat ve Nair, 2010; Çiftçi ve Aksoy, 2015).

β -laktamaz enzimleriyle ilacın inaktivasyonu

Aktif antimikrobiyal ajanın doğrudan inaktivasyonu grubunda araştırılan savunma mekanizması, antimikrobiyal ajanı değiştiren veya bozan enzim oluşturulmasına bağlı olarak meydana gelmektedir. Antimikrobiyal ajanın inaktivasyonu; hidrolitik enzimler, grup aktarımı ve redoks mekanizmasıyla meydana gelmektedir (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

Antimikrobiyal ajanlardan bazıları, ester ve amidler gibi hidrolize karşı hassas kimyasal bağlar bulundurmaktadır. Pek çok enzim de bu bağları hedefleyip, yıkarak etki göstermektedir. Bu enzimler sıklıkla bakteri tarafından oluşturulmakta ve antimikrobiyal ajanları bakteri hücreindeki hedef moleküle bağlanmadan önce inaktive etmektedir. Bu hidrolitik amidazlar “beta laktamaz” (β -laktamazlar) şeklinde isimlendirilmektedir. β -laktamazlar etkilerini penisilin ve sefalosporin antibiyotiklerinin beta laktam halkasını bozarak gerçekleştirmektedirler. Bir mikroorganizmanın enzimatik aktivitesi sonucunda antibiyotiği inaktive edip direnç elde etmesi ilk kez *Staphylococcus aureus*’da tespit edilmiştir ve bu bakterinin penisilinin aktivasyonunu engelleyen enzimi meydana getirdiği tespit edilmiştir. Bir süre sonra benzer etkiler gösteren enzimler diğer bakterilerde de tespit edilmiştir. Yapılan çalışmaların sonunda penisilinleri parçalayan enzimlere “penisilnaz”, sefalosporinleri parçalayan enzimlere “sefalosporinaz”, her iki grup β -laktam antibiyotiği parçalayan enzimlere ise “geniş spektrumlu beta laktamaz” (GSBL) şeklinde isimlendirilmiştir. Fakat, bu enzimler ortak şekilde β -laktam halkasını parçaladıkları için günümüzde “beta-laktamaz” şeklinde tanımlanmıştır. β -laktamazlar, klinik olarak önemli olan pek çok mikroorganizma tarafından üretilirler. Günümüzde sayıları 200’den fazla farklı β -laktamaz tespit edilmiştir. Bu enzimler hem kromozomlar hem de farklı mikroorganizmalardan taşınan plazmidler tarafından kodlanabilirler. GSBL’ler penisilinlerin tümüne, 3. Nesil sefalosporinler ile aztreonam’a orta seviyede direnç sağlarken, sefamisin ve karbapeneme direnç sağlamazlar. Bu enzimler sıklıkla *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Proteus mirabilis*’te tespit edilmiştir aynı zamanda diğer enterobakterilerde de bulunmaktadır (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

Hedef modifikasyonu

Antimikrobiyal ajanlar için hedef bölgelerin önemli bir özelliği, mikrobiyal büyüme ve hayatta kalmadaki hayati rolleridir. İşlevlerine müdahale, hücreler için öldürücüdür veya hücre büyümesini inhibe eder. Seçici antimikrobiyal etki için, hedef aynı zamanda memeli hücrelerinde bulunmamalı veya varsa, bakteriyel hedefin seçici inhibisyonuna izin vermek için memeli muadilinden yeterince farklı olmalıdır. Bakteriyel hücre duvarının peptidoglikan bileşeni, seçici hedef için mükemmel bir örnek sağlar. Çoğu bakterinin büyümesi ve hayatta kalması için gereklidir ve herhangi bir memeli makromolekülünün aksine kimyasal bir yapıya ve bileşime sahiptir. Sonuç olarak, sentezinde ve

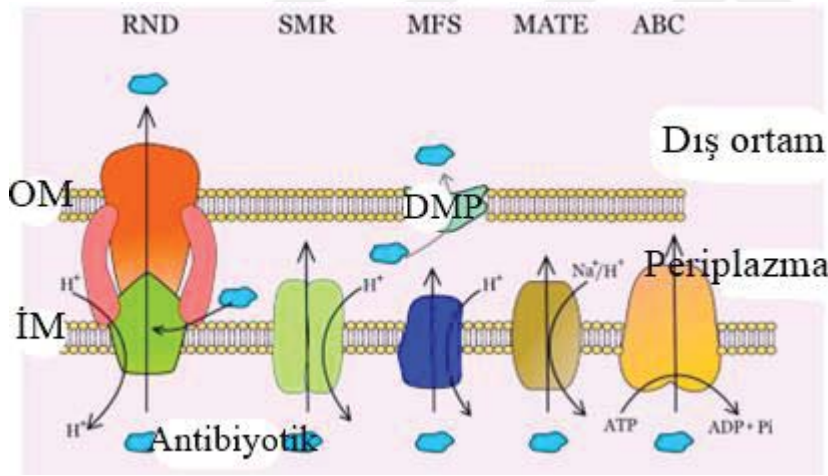
birleştirilmesinde yer alan enzimler, seçici inhibisyon için mükemmel hedefler sağlar (Lambert, 2005). Bu enzimlerden bir tanesinde Penisilin bağlayıcı protein'ler (PBP) olarak da adlandırılan hücre duvarı sentezleyici enzimlerdir (Amyes, 2003). PBP'ler, murein birimlerinin peptid yan zincirlerinin transpeptidasyonu ile hücre duvarı peptidoglikanının montajını katalize eden hücre duvarı transpeptidazlarıdır (Nagai, Davies, Jacobs ve Appelbaum, 2002). PBP'ler, biri sitoplazmik membrana sabitlenmiş, diğeryse periplazmik boşluğa uzanan iki kısımdan meydana gelirler (Medeiros, 2000). Periplazmik boşlukta bulunan kısımda enzimin aktif bölgesi yer almaktadır. β -laktam antibiyotikler PBP'lerin substrat analoglarıdır ve bu sebeple, PBP'ler aynen β -laktamazlar gibi beta-laktam antibiyotiklere bağlanarak hidrolize sebep olmaktadır. Fakat hidroliz hızının çok yavaş olması sebebiyle, geri dönüşemeyen bir açıl-enzim bileşiği meydana getirmektedirler. Bu bileşikten ayrılamayan enzim, hücre duvarının sentezindeki işlevini yerine getiremez, süreç hücre duvarının sentezinin durmasıyla ve hücre duvarının yıkımıyla sonuçlanır. PBP'lerin penisilin bağlayan halkalarında mutasyonların meydana gelmesi, beta laktam antibiyotik bağlanmalarında afinitenin azalışıyla sonuçlanmaktadır. PBP mutasyonlarıyla oluşan direnç Gram pozitif mikroorganizmalarda daha çok meydana gelmektedir ve günümüzde özellikle *Enterococcus faecium*, *Streptococcus pneumoniae* ve *S. aureus* gibi türlerin β -laktam antibiyotiklerle tedavisinde probleme neden olmaktadır (Çiftçi ve Aksoy, 2015). PBP'lerdeki mutasyonlar *E. faecium*'da ampiciline karşı dirence ve *S. pneumoniae*'de penisiline karşı dirence sebep olmaktadır (Nagai ve diğerleri, 2002). *S. aureus*'da ise metisiline karşı direnç *mecA* gen ürünü olan PBP 2a'nın oluşumuna bağlıdır. Bu yeni tip proteini meydana getiren bakteriler beta-laktam antibiyotik varlığında da peptidoglikan sentezini sürdürürler. Metisiline duyarlı suşlarda genellikle *mecA* geni yer almamaktadır. *mecA* geni transpozon kaynaklıdır ve sıklıkla diğer direnç genleriyle beraber bulunması sebebiyle, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) suşları genellikle makrolidler ve kinolonlar gibi diğer antibiyotik sınıflarına da direnç göstermektedirler (Çiftçi ve Aksoy, 2015).

Aktif pompa sistemleri

Son yıllarda yapılan araştırmalar, mikroorganizmalarda doğal ve kazanılmış çoklu ilaç direncinde etkili olan yeni bir mekanizmayı ortaya çıkarmışlardır. İlk defa 1976 yılında memeli hücre zarında bulunan P-glikoproteininin kanser ilaçlarına, daha sonra bakteri

hücre zarında bulunan Tet pompa proteininin tetrasiklin direncine neden olan aktif pompa genlerinin bakterilerde ve pek çok patojen mikroorganizmada sık olarak bulunduğunu göstermektedir (Hasdemir, 2007).

Bakterilerde sitoplazmik membranda bulunan ve proteinlerden oluşan aktif pompa sistemleri, temel besin maddelerinin ve iyonların alımında, metabolik son ürünlerin ve zararlı maddelerin atılımında ve hücreler ile çevre arasındaki iletişimde rol oynayan büyük taşıyıcı sınıflarının örnekleridir. Bakteriyel aktif pompa sistemleri, enerji kaynağı, filogenik ilişki ve substrat özgüllüğü olmak üzere üç ana kriter temelinde 5 gruba ayrılırlar. Şekil 2.3 Bunlar; direnç-nodülasyon-bölünme (RND) süper ailesi, küçük çoklu ilaç direnci (SMR) süper ailesi, majör kolaylaştırıcı (MFS) süper ailesi, çoklu ilaç ve toksik bileşik çıkarım (MATE) süper ailesi ve adenosin trifosfat (ATP) bağlayıcı kaset (ABC) süper ailesi gruplarıdır (Van Bambeke, Balzi ve Tulkens, 2000; Li ve Nikaido, 2004; Blair ve Piddock, 2009; Blanco ve diğerleri, 2016).



Şekil 2.4. Ana bakteriyel aktif pompa sistemlerinin şematik gösterimi (Blanco ve diğerleri, 2016). DM: Dış membran, İM: İç membran, DMP: Dış membran proteini

Bakteriyel aktif pompa sistemleri, birçok antibiyotiği aktif olarak hücrenin dışına taşır ve Gram-negatif bakterilerin, Gram-pozitif bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılabilecek birçok ilaca karşı içsel direncinde önemli katkı sağlar. Aktif pompa sistemleri bütün antibiyotik gruplarını etkilemesinin yanı sıra özellikle makrolidler, tetrasiklinler ve florokinolonları etkilemektedir. Çünkü bu antibiyotikler protein ile DNA sentezini farklı kademelerde etkisiz hale getirmektedir ve bu sebeple de etkilerini gösterebilmeleri için hücrenin içerisinde bulunmaları gerekmektedir. Aşırı eksprese

edildiğinde, aktif pompa sistemleri ayrıca daha önce klinik olarak yararlı olan antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde direnç sağlayabilir. Bazı aktif pompa sistemleri, dar substrat özgüllüğüne sahiptir (örneğin, Tet pompaları), fakat çoğu, yapıcı benzer olmayan çok çeşitli substratları taşır ve çoklu ilaç dirençli (MDR) aktif pompa sistemleri olarak bilinir. Tüm bakteriler, kromozomlarında MDR aktif pompa sistemlerini kodlayan çoklu genler taşımasına rağmen, bazıları bakteriler arasında transfer olabilen plazmidler üzerinde mobilize edilmiştir. Bakteriler arasında MDR aktif pompa genlerinin yayılması ve aktarılabilir olması antibiyotiklere karşı direnç probleminin büyüklüğünü arttırmaktadır (Blair, Webber, Baylay, Ogbolu ve Piddock, 2015; Çiftçi ve Aksoy, 2015).

Dış membran geçirgenliği

Gram negatif bakterilerde dış membran fosfolipitler içeren bir iç tabaka ve lipopolisakkaritlerin (LPS) lipit A kısmını içeren bir dış tabakadan meydana gelmektedir. Dış membranın (OM) bu bileşimi, antibiyotik penetrasyonunu yavaşlatır. Dış membranda bulunan LPS'nin hidrofobik moleküllere karşı bariyer görevi görmesi ve dış membranın fosfolipid içermemesi, eritromisin, nafsilin gibi hidrofobik moleküllerin bakteriye girişine engel olur. LPS'de oluşan mutasyonların antibiyotiklere duyarlılığı arttırdığı bildirilmiştir. *E. coli* ve *Salmonella typhimurium*'un LPS mutasyonların roksitromisin, klaritromisin ve azitromisin MİK'lerini azalttığı bulunmuştur (Vaara, 1993; Çiftçi ve Aksoy, 2015). Antibiyotiklerin dış membrandan geçişi büyük ölçüde antibiyotiklerin kimyasal bileşimine bağlıdır. Örneğin hidrofilik bileşikler (örn; β -laktamlar, kloramfenikol ve florokinolonlar gibi antibiyotikler) periplazmaya porinler aracılığıyla girerler. Bu nedenle, porin sayısı, boyutu veya seçiciliğindeki değişiklikler, bu antibiyotiklerin difüzyon hızını değiştirecektir. *P. aureginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir protein olan OprD'nin kaybıyla karbapenemlere direnç gelişimi sağlanmakta iken, *E. coli* suşlarındaki dış membran porinlerinden OmpC ve OmpF'nin kaybıyla da β -laktam minimal inhibitör konsantrasyon (MİK)'larında 8-16 kat artış meydana gelmektedir (Dzidic, Suskovic ve Kos, 2008; Çiftçi ve Aksoy, 2015).

2.5. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması

Kullanılan β -laktam antibiyotikleriyle beraber β -laktamazların sayıca artış göstermesi, bunlar için farklı sınıflandırmaların yapılmasına neden olmuştur (Gür, 1996). İnhibisyon özelliklerine, moleküler yapılarına ve substrat profiline göre sınıflandırılan β -laktamazların sınıflandırılmasında günümüzde sıklıkla Ambler moleküler sınıflandırılması ve Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırılması kullanılır (Ambler, 1980; Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995). β -laktamazlar, Ambler sınıflandırmasına göre enzimleri kodlayan nükleotid dizilişine bakılarak 4 sınıftan oluşur;

- Sınıf A: Penisilinazlar,
- Sınıf B: Metallo- β laktamazlar,
- Sınıf C: Sefalosporinazlar,
- Sınıf D: Oksasilin hidrolize edici enzimler (Bush ve diğerleri, 1995; Dağlar ve Öngüt, 2012).

Sınıf A, C ve D enzimleri aktif bölgelerinde serin, Sınıf B ise aktif bölgesinde çinko bulundurmaktadır. Sınıf A, B ve D genellikle plazmid, Sınıf C ise çoğu zaman kromozom kontrolünde olan enzim gruplarıdır (Budak, Aktaş ve Erdem, 2012).

β -laktamazların en güncel sınıflandırması olan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırılmasında ise β -laktamazlar, biyokimyasal etmenleriyle, substrat çeşidine bakılarak 4 gruba ayrılmıştır Çizelge 2.4 (Dağlar ve Öngüt, 2012).

2.5.1. Grup 1

Klavulanik asitle inhibe olmayan sefalosporinazlar bu sınıftadır. Çoğu kromozomal enzimlerdir, indüklenebilen ya da 20eprşe β -laktamazlardır. Sefaloridin ile sefalotini penisilinden daha çabuk parçalarlar. Bu grubu klavulanik asit ile sulbaktam etkilemez fakat aztreonam ve kloksasilin ile inhibe edilir. Moleküler sınıf olarak Sınıf C'de yer alırlar. İzoelektrik noktaları 7'nin üstündedir. Plazmid kontrolündeki FOX-1, LAT-1, MIR-1, MOX-1, BIL-1 β -laktamazları ve kromozomal AmpC enzimleri bu gruptadır (Gür, 1996).

2.5.2. Grup 2

Moleküler sınıflar A ve D de dahil olmak üzere fonksiyonel grup 2 β -laktamazları, öncelikle son 20 yılda GSBL'lerin artan tanımlanması nedeniyle en büyük β -laktamaz grubunu temsil etmektedir (Bush ve Jacoby, 2010). Substrat çeşidindeki farklılıklar sebebiyle bu sınıf birkaç alt sınıfa bölünmüştür (Gür, 1996). Alt grup 2a penisilinazlar, nispeten sınırlı bir hidrolitik aktivite spektrumuna sahip küçük bir β -laktamaz grubunu temsil eder ve Gram pozitif bakterilerde baskındır. Bu enzimler tercihen benzilpenisilin ve birçok penisilin türevini hidrolize eder. Alt grup 2b β -laktamazları, penisilinleri, sefaloridin ve sefalotin gibi erken sefalosporinleri kolayca hidrolize eder, klavulanik asit ve tazobaktam tarafından güçlü bir şekilde inhibe edilir. Alt grup 2be, GSBL'leri içerir. Bu geniş spektrumlu enzimler, alt grup 2b β -laktamazların penisilinlerine ve sefalosporinlerine karşı aktivitesini korur ve buna ek olarak sefotaksim, seftazidim ve aztreonam gibi bir veya daha fazla oksimino- β -laktamı, benzilpenisilin için olandan $>\%10$ oranında hidrolize eder. Alt grup 2br enzimleri, alt grup 2b aktivite spektrumunu korurken klavulanik asit ve inhibitörlere karşı direnç kazanmış geniş spektrumlu β -laktamazlardır (Bush ve Jacoby, 2010). Alt grup 2c penisilinazlar, karbenisilin veya tikarsilin'i benzilpenisilin'den en az $\%60$ daha hızlı hidrolize etme yetenekleriyle işlevsel olarak karakterize edilir; kloksasilin veya oksasilin, benzilpenisilin için olanların yarısından daha az oranlarda hidrolize edilir (Bush ve diğerleri, 1995). Alt grup 2d, kloksasilin veya oksasilin'i benzilpenisilin için olandan $>\%50$ oranında hidrolize etme yetenekleriyle ayırt edilen ve dolayısıyla OXA enzimleri olarak bilinen β -laktamazları içerir. Alt grup 2e sefalosporinazların özellikleri, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etme ve klavulanik asit veya tazobaktam tarafından inhibe edilme yeteneğini içerir. *Proteae*'deki indüklenebilir, kromozomal sefalosporinazlar genellikle bu alt gruba aittir. Alt grup 2f, serin karbapenemazları içerir. Karbapenemler, bu enzimler için ayırt edici substratlardır ve tazobaktam tarafından klavulanik asitten daha iyi inhibe edilebilir (Bush ve Jacoby, 2010).

2.5.3. Grup 3

Moleküler sınıflandırmada B sınıfında olan bu β -laktamazlar, monobaktamlar dışında bütün β -laktamları ve karbapenemleri hidroliz ederler. Genellikle etki spektrumlarını genişletecek bir başka enzimle beraber üretilirler. Diğer enzimlerden farklı olarak aktif

bölgelerinde serin yerine Zn^{+2} iyonu bulundurulur. B-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez fakat EDTA'yla inhibe edilirler. 3 alt gruba ayrılırlar; 3a'da sıklıkla penisilinleri, karbapenemlerden daha hızlı hidroliz eden IMP-1-8 ile VIM-1-3 enzimleri, 3b'de *Aeromonas*'ın gerçek karbapenemazları, 3c'de sadece *Legionella gormanii*'nin yüksek sefalosporinaz aktivitesi olan metalloenzimler bulunur (Kıraç, 2011).

2.5.4. Grup 4

Bu sınıfta klavulanik asitle inhibe olmayan penisilinazlar bulunur. Bu sınıfın molekül grubu henüz belirlenmiş değildir. Bu sınıfta yer alan enzimler içerisinde *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus fragilis*, *Campylobacter jejuni*'den izolasyonu yapılan enzimler, *Clostridium butyricum*'un indüklenebilen enzimi, *E. coli*'nin plazmid kontrolundaki SAR-2 β -laktamazı yer alır (Gür, 1996).

Çizelge 2.4. β -laktamazların klasifikasyonu (Bush ve diğerleri, 1995).

Bush Jacoby Medeiros	Molekül grubu	Seçilen substrat	CA	EDTA	Enzimler
1	C	Sefalosporinler	-	-	Gram negatif bakterilerin AmpC; MIR-1
2a	A	Penisilinler	+	-	Gram pozitif bakterilerin penisilinazları
2b	A	Penisilinler, Sefalosporinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, dar ve geniş spektrum sefalosporinler, monobaktamlar	+	-	TEM-3, TEM-26, SHV-2, SHV-6, <i>Klebsiella osxytoca</i> K1.
2br	A	Penisilinler	+/-	-	TEM-30, TEM-36 K1
2c	A	Penisilinler, Karbenasilin	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilinler, Kloksasilin	+/-	-	OXA-1, OXA-11, PSE-2 (OXA-10)
2e	A	Sefalosporinler	+	-	<i>Proteus vulgaris</i> 'in indüklenebilir sefalosporinazları
2f	A	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	+	-	<i>Enterobacter cloacae</i> 'nin NMC-A'sı, <i>Serratia marcescens</i> 'in Sme-1'i
3	B	Birçok β -laktam, Karbapenemler dahil	-	+	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> 'nın L1'i, <i>Bacteroides fragilis</i> 'in Ccra'sı
4	ND	Penisilinler	-	?	<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nın penisilinazı

CA: Klavulonik asit ND: Belirlenmemiş

2.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL'ler)

2.6.1. GSBL'lerin genel özellikleri

1980'lerin ortalarından itibaren *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de 3. kuşak sefalosporinler ile aztreonama karşı direnç ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu direncin TEM-1'in mutant formlarının, yeni sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilen TEM-2 ve SHV-1 β -

laktamazların ortaya çıkmasından kaynaklandığı bulundu. Bu yeni mutant formlar mobil genetik unsurlara kodlanmış olduğundan yayılması hızlıydı ve klinik olarak çok daha önemliydi. Bu mutant formlara, oksiiimino-sefalosporinlere karşı aktivite spektrumları nedeniyle GSBL adı verilmiştir (Rupp ve Fey, 2003; Shah, Hasan, Ahmed ve Hameed, 2004; Perez, Endimiani, Hujer ve Bonomo, 2007). GSBL'ler Ambler moleküler sınıf A'da bulunan grup 2be, 2e ve sınıf D'de bulunan grup 2d β -laktamazlardan meydana gelir. GSBL'ler; geniş spektrumlu penisilinlere, 1., 2., ve 3. kuşak sefalosporinler ile kısmen sefepime etki ederken, karbapenemler, sefamisinler ve β -laktamaz inhibitörlerine etki etmezler, özellikle TEM ve SHV ailesi türevleri olanlar, ticari olarak temin edilebilen beta-laktamaz inhibitörleri olan klavulanik asit, tazobaktam veya sulbaktam tarafından kolayca inhibe edilir (Perez ve diğerleri, 2007; Dağlar ve Öngüt, 2012).

2.6.2. GSBL tipleri

TEM ve SHV tipi GSBL'ler

GSBL'ler, penisilinlere, birinci, ikinci ve üçüncü nesil sefalosporinlere ve aztreonama (ancak sefamisinler veya karbapenemler değil) bakteriyel direnç kazandıran ve klavulanik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilen β -laktamazlardır (Paterson ve Bonomo, 2005). TEM, SHV, CTX-M, OXA AmpC vb. gibi pek çok GSBL türü vardır, fakat GSBL'lerin çoğu TEM ve SHV enzimlerinin türevleridir. Bu enzim gruplarının her ikisinde, TEM-1 TEM-2 ve SHV-1 gen içindeki seçilmiş lokuslardaki birkaç nokta mutasyonu, genişletilmiş spektrumlu fenotipe yol açar. TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 (Ebeveyn enzimleri), penisilinleri, sefalotin, sefaklor ve sefazolin gibi erken sefalosporinleri hidrolize eder, fakat daha kararlı sefalosporinleri (sefuroksim, sefiksim, sefotaksim, seftriakson, seftazidim, sefepim ve monobaktam, aztreonam) hidrolize etmez. Bu ebeveyn enzimlerinde meydana gelen mutasyonlarla, yukarıda listelenen daha kararlı ilaçların en azından bazılarının hidrolizine izin vererek substrat profillerini genişletir. Şu anda 160'ın üzerinde TEM ve yaklaşık 100 SHV kaynaklı β -laktamaz vardır. TEM ve SHV tipi GSBL'ler en sık *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de bulunmaktadır; Bununla birlikte, *Proteus* spp., *Providencia* spp. ve diğer Enterobacteriaceae familyasına ait cinslerde de bulunmuştur (Bush, 1995; Bradford, 2001; Moland, Kim, Hong ve Thomson, 2008; Al-Agamy, Shibl ve Tawfik, 2009; Sharma J., Sharma M., ve Ray, 2010).

Diğer GSBL'ler

CTX-M

Genişletilmiş spekturumlu sefalosporinlerin 1980'lerin başında klinik uygulamaya girmesi Enterobacteriaceae ve diğer Gram-negatif patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisi için büyük bir atılımı temsil etti. Fakat, geniş spektrumlu sefalosporinlerin yoğun kullanımı, seçici bir baskı yarattı ve bunu, GSBL'ler olarak adlandırılan bu bileşikler bozundurabilen ve bunlara karşı direnç kazandırabilen yeni β -laktamazların hızlıca ortaya çıkması izledi. *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica* ve Enterobacteriaceae familyasının diğer üyeleri tarafından GSBL evriminin 2 ana stratejisinden yararlanılmıştır; birincisi, 1970'lerden beri Enterobacteriaceae arasında zaten yaygın olan plazmit aracılı TEM ve SHV'den genişletilmiş substrat özgüllüğü olan mutantların seçilimi idi, ikincisiyse doğal olarak GSBL aktivitesine sahip enzimleri kodlayan, çevresel metagenomdan yeni β -laktamaz genlerinin yakalanmasıydı. İkinci enzimler arasında olan CTX-M tipi β -laktamazlar yayılmada açık ara en başarılı olanlardı. Klinik ortamlarda ve genel olarak dünya çapında en yaygın GSBL'ler haline dönüşmüştür (D' Andrea, Arena, Pallecchi ve Rossolini, 2013). Klinik suşlarda, CTX-M-kodlayan genler genellikle plazmidler üzerinde bulunur ve CTX-M-kodlama plazmidleri genellikle in vitro konjugasyon ile bulaşabilir (Bonnet, 2004).

CTX-M tipi β -laktamazlar en az altı alt dizi ya da grup (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 ve KLUC) içeren moleküler sınıf A aktif bölge serin β -laktamazların oldukça heterojen bir soyuna aittir. Her grup sırasıyla bir ya da birkaç aminoasit ikamesi ile birbirinden farklı olan bir dizi minör alelik varyantı bulundurur. Ayrıca, hibrid bir yapı sergileyen en az dört CTX-M varyantı vardır: CTX-M-45'in bilinmeyen bir proteine sahip bir melezi olan CTX-M-2 (eski adıyla Toho-14) ve CTX-M-64, CTX-M-123 ve CTX-M-132, CTX-M-15'in farklı segmentlerine sahip CTX-M-14'in melezleridir. Varyantların çoğunluğu CTX-M grup 1 ve 9'da bulunur (D'Andrea ve diğerleri, 2013).

CTX-M β -laktamazların çoğu, TEM ve SHV türevi GSBL'lerin aksine sefotaksim ve seftriaksonu, seftazidime göre daha iyi hidrolize uğratar. En yüksek hidrolitik aktiviteyi

sefalosporinlere karşı elde eder, sefepime ve sefpiroma karşı da önemli hidrolitik aktivite gösterir fakat penisilinlere karşı TEM ve SHV penisilinazlardan daha az etkilidir. Çoğu A sınıfı GSBL'de olduğu gibi, sefoksitin ve imipenemlere karşı hidrolitik aktiviteleri yoktur. β -laktamaz inhibitörlerine karşı da daha fazla duyarlılık gösterir. Ayrıca tazobaktam tarafından klavulanik asite göre daha kolay inhibe edildiği görülmektedir (Bonnet, 2004; Perez ve diğerleri, 2007).

OXA

Ambler moleküler sınıflandırmasına göre Sınıf D'de, Bush fonksiyonel sınıflandırılmasına göre ise grup 2d içerisinde yer alan OXA β -laktamazları, oksasilin ve kloksasilini hidrolize edebilen ve klavulanik asit ve EDTA tarafından zayıf bir şekilde inhibe edilen penisilinazlar olarak karakterize edilir (Bush ve diğerleri, 1995; Moquet ve diğerleri, 2011). OXA enzim ailesi, oksasilin ve kloksasilin'i hidrolize ettikleri için oksasilinazlar adını almıştır. Bu GSBL'ler esas olarak *P. aeruginosa*'da görülür (Moland ve diğerleri, 2008). Çoğu OXA tipi β -laktamaz, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinleri önemli ölçüde hidrolize uğratmaz ve GSBL olarak kabul edilmez. Bununla beraber, OXA-10 sefotaksim, seftriakson ve aztreonamı hidrolize eder ve çoğu organizmaya bu antibiyotiklere duyarlılığı azaltır. Diğer OXA GSBL'leri ise şunları içerir: OXA-11, -14, -16, -17, -19, -15, -18, -28, -31, -32, -35 ve -45 (Paterson ve Bonomo, 2005). Bunların yanı sıra klinik olarak anlamlı altı karbapenem-hidrolize edici sınıf D β -laktamaz (CHDL) alt grubu vardır: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58 ve OXA-143 (Antunes ve diğerleri, 2014).

IMP

Metallo- β -laktamazlar (MBL) moleküler olarak en çeşitli karbapenemazlardır ve en büyük klinik tehdittir (Walsh, 2010). En sık görülen MBL türleri VIM, IMP, SIM ve GIM enzim aileleridir. Bu enzimlerin içerisinde VIM ve IMP tipi enzimler dünya çapında sıklıkla tespit edilen MBL ailesi elemanlarıdır (Queenan ve Bush, 2007). İlk IMP-tipi MBL enzimi 1991 yılında Japonya'da tanımlanmıştır (Watanabe, Iyobe, Inobe ve Mitsuhashi, 1991). O zamandan beri, 18 IMP-varyant enzim bildirilmiştir (Walsh, Toleman, Poriel ve Nordmann, 2005). Ambler moleküler sınıflandırmasına göre sınıf B'de, Bush fonksiyonel

sınıflandırılmasına göre grup 3 de yer alan IMP'ler penisilini, birinci kuşak sefalosporinleri, geniş spektrumlu sefalosporinleri ve karbapenemleri hidrolize edip, aztreonama karşı etkisizdir ve klavulanik asitle inhibe olmazken EDTA tarafından inhibisyona uğrarlar (Budak ve diğerleri, 2012). IMP tipi enzimler bir integrona yerleştirilmiş, mobil gen kaseti üzerinde yer alır, kromozomal çevrenin parçası olan genler tarafından veya yatay gen transferiyle kazanılan heterolog genlerle kodlanırlar (Laraki ve diğerleri, 1999; Cornaglia, Giamarellou ve Rossolini, 2011).

2.6.3. GSBL'lerin klinik önemi

Uygun olmayan antibiyotik alınımları ile hastane ortamlarındaki kolay yayılım ülkemizde ve dünyada GSBL oranının son zamanlarda hızla artış göstermesine sebep vermiştir (Duman, Güçlüer, Serindağ ve Tekeroğlu, 2010). Bu artış büyük bir direnç sorununu da beraberinde getirmektedir. Enterobacteriaceae familyasındaki birçok tür GSBL üretebilmektedir. Gram negatif mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı gelişen direnç büyük bir problem olarak karşımızdadır. Bu direncin oluşmasındaysa plazmidler tarafından kodlanan GSBL ile kromozom kökenli tip 1 β -laktamaz direnci rol oynamaktadır. Özellikle çoklu ilaca dirençli bu suşlar ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlerin fazla miktarda kullanımı olan hastanelerde hızlıca yayılım yönelimindedir (Yetkin, Kuzucu, Çalışkan ve Ay, 2006).

Hastaların kolonizasyonu ve laboratuvarında GSBL tespiti, karşılaşılan diğer sorunlar arasındadır. Uzun süreli antibiyotiğe maruz kalma, uzun süreli yoğun bakım ünitesinde yatış, hastalarda altta yatan önemli ve ağır hastalık durumu, invaziv işlemlere maruz kalınması GSBL oluşturan mikroorganizmaların sayısının artmasına sebep olmaktadır. Ayrıca GSBL oluşturan mikroorganizmalar, oluşturduğu enzimin farklı sefalosporinlere çekim gücünün değişiklik göstermesi ile inokulum etkisi gibi sebeplerle üçüncü kuşak sefalosporinlere ve aztreonama dirençli olduğu halde duyarlı gibi görünebilir. (Dağlar ve Öngüt, 2012). Bu durum tedavide yanlış antibiyotik seçimine sebep olabilir.

2.6.4. GSBL'lerin laboratuvar tanı yöntemleri

GSBL enzimlerinin dünyanın tamamında hızla artış göstermesi ve önemli klinik problemlere sebep vermelerin den dolayı, sürekli araştırılması ve doğru tanımlanması zorunlu hale gelmiştir (Ermertcan, Hoşgör-Limoncu, Taşlı, 2008). GSBL oluşturan mikroorganizmalar, geniş spektrumlu sefalosporinler ile aztreonama direnç gösterdikleri halde rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde duyarlı şeklinde görülebilirler bu da tedavi esnasında problemlere sebep olabilir (Duman ve Güçlüer, 2010). *K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* ile *K. oxytoca*'da, GSBL enzimlerinin tespiti için CLSI, fenotipik tarama ve doğrulama testlerinden yararlanılması önerisinde bulunmuştur Çizelge 2.5 (Dağlar ve Öngüt, 2012).

GSBL tarama testleri

CLSI'nin önerilerine göre GSBL tarama testleri disk difüzyon ve dilüsyon metodlarıyla yapılır.

Disk difüzyon testi

Bu metod uygulanırken Müller Hinton Agar (MHA) besiyerine sefpodoksim (10 µg), seftazidim (30 µg), aztreonam (30 µg), sefotaksim (30 µg) ve seftriakson (30 µg) içeren antibiyotik diskleri yerleştirilir. Tarama için birden fazla antimikrobiyal ajanın kullanılması, GSBL tespitinin hassasiyetini artırır. 35 +/- 2 °C' de 16-18 saat inkübasyondan sonra sefpodoksim ≤17 mm, seftazidim ≤22 mm, sefotaksim ≤27 mm, aztreonam ≤27 mm, seftriakson ≤25 mm inhibisyon zon çapı meydana getirmişse mikroorganizmanın GSBL oluşturduğundan şüphe duyulur (CLSI, 2014).

Dilüsyon metodu

Bu metod uygulanırken Mueller Hinton Broth (MHB) yapılan dilüsyon testlerinde ulaşılan MİK değerlerinin seftazidim (1 µg/mL), seftriakson (1 µg/mL), aztreonam (1 µg/mL) ve sefotaksim (1 µg/mL) için ≥2 µg/ml, sefpodoksim (4 µg/mL) için ise ≥8 µg/ml (*Proteus* için ≥2 µg/ml) olarak saptanması GSBL üretiminin olduğunu düşündürür (CLSI, 2014).

GSBL doğrulama testleri

Doğrulama testlerinde GSBL'lerin beta-laktamaz inhibitörlerine karşı duyarlılıklarından yararlanılır. Kombine disk metodu, Çift disk sinerji metodu, E test metodu, Mikrodilüsyon metodu, Üç boyutlu test, Boranik asit metodu ve Otomatize sistemler sıklıkla kullanılan metodlar arasındadır (Dağlar ve Öngüt, 2012).

Kombine disk metodu

CLSI, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* ve *P. mirabilis* türlerinde GSBL'lerin varlığının fenotipik olarak doğrulanması için klavulanat (10 µg) olan veya olmayan sefotaksim (30 µg) veya seftazidim (30 µg) disklerinin kullanılmasını savunmaktadır. CLSI, disk testlerinin MHA üzerine yerleştirilmesini önerir. Sefalosporin disklerinden herhangi birinin bölge çapları ile bunların sefalosporin/klavulanat diskleri arasındaki ≥ 5 mm'lik fark, GSBL üretiminin fenotipik teyidi olarak kabul edilir (CLSL, 2014).

Çift disk sinerji metodu

Bu testte klavulanat, genellikle amoksisilin/klavulanat içeren bir disk, inoküle edilmiş MHA duyarlılık plakasına stratejik olarak, indikatör ilaçlar içeren disklerden tipik olarak 30 mm veya daha kısa bir mesafede yerleştirilir. Optimum disk aralığı, suştan suşa değişir. Bir inhibisyon merceği veya anahtar deliği etkisi olarak görülen, bir indikatör ilacın aktivitesinde klavulanat aracılı artış, GSBL üretiminin göstergesidir. Doğrulayıcı testin yorumlanması nicel değil öznelidir. Bu test zorluklar gösterebilir, çünkü ilk testte optimum disk aralığına her zaman ulaşılamaz ve bazı sonuçların doğru şekilde yorumlanması önemli ölçüde deneyim gerektirir (Moland ve diğerleri, 2008).

E test metodu

E-test GSBL şeritleri (AB Biodisk, İsveç), bir ucunda seftazidim (TZ), öteki ucunda seftazidim ve klavulanik asit (TZL) bulunacak biçimde hazırlanmıştır. Disk difüzyon için belirtilen standartlara göre hazırlanmış plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun şeriti kestiği değer MİK değerini oluşturur. TZ ile TZL MİK değerlerinin

birbirlerine oranı yapıldığında MİK değerinde ≥ 8 kat fazla azalışın meydana gelmesi GSBL varlığını belirtir. Benzer olarak sefotaksim ile sefotaksim-klavulanik asit (CT-CTL) bulunduran E-test şeritleri de bulunur (Dağlar ve Öngüt, 2012).

Mikrodilüsyon metodu

GSBL tarama testinin pozitif çıkması halinde sefotaksim ve seftazidim tek başına ve klavulanik asit (4 µg/ml) ile beraber test edilmelidir. Klavulanik asitle beraber meydana gelen MİK değerleri ≥ 8 kat azalma gösteriyorsa GSBL meydana getirdiği fenotipik şekilde doğrulanmış olmaktadır (CLSI, 2014).

Üç boyutlu test

Bu testte, duyarlılık plakasının yüzeyi, disk-difüzyon testi için standart yöntemlerle aşılır, ancak ek olarak, plakanın kenarı ile agar konsantrik içinde dairesel bir yarık kesilir. Test organizmasının ağır bir inokulumu (10^9 10^{10} CFU'ya kadar) yarığa pipetlenir. β -laktam-empreye edilmiş diskler daha sonra aşılınmış dairesel yarığın 3 mm dışındaki agar yüzeyine yerleştirilir. Her bir test antibiyotiğinin β -laktamaz kaynaklı inaktivasyonu, dairesel üç boyutlu aşılama ile kesiştiği yerin yakınında inhibisyon bölgesinin marjının incelenmesiyle tespit edilir. β -laktamaz kaynaklı ilaç inaktivasyonunun varlığı, genellikle dairesel inhibisyon bölgesinde bir bozulma veya süreksizlik veya aşılınmış yarığın yakınında ayırık kolonilerin üretimi olarak görselleştirilir (Rawat ve Nair, 2010).

Boronik asit metodu

Bu metotta, boronik asidin AmpC beta-laktamaz aktivitesini inhibisyon özelliğinden faydalanılır. *K. pneumoniae* karbapenamaz pozitif suşlarının tespitinde gayet başarılı olduğu tespit edilmiştir (Dağlar ve Öngüt, 2012). Bu yöntemin ticari olarak kullanılmaması ve sonuçların tespiti için ek bir gün gerekmesi yöntemin olumsuz yanlarıdır (Endimiani ve diğerleri, 2010).

Otomatize sistemler

Bakteriyolojide yararlanılan VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) ve Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD/ABD), Mikro-scan panel test benzeri otomatize sistemler GSBL oluşturan suşları tespit etmekte kullanılır. Bu sistemler GSBL oluşumunu çeşitli kuralları işleterek, penisilinlerin tümünü, sefalosporinler ile aztreonamı dirençli olarak tespit ederler (Dağlar ve Öngüt, 2012). Karbapeneme direnç gösteren *K. pneumoniae* suşlarındaki direnç varlığını tespit etmekte yetersiz kalmaları bu sistemlerin olumsuz yanıdır (Tenover ve diğerleri, 2006).

Moleküler tanı metodları

Fenotipik testler GSBL'nin varlığını sadece varsayımsal olarak tanımlamaktadır. Bir klinik izolatta hangi spesifik GSBL'nin mevcut olduğunu belirleme görevi daha karmaşıktır. GSBL'lerin incelenmesinin ilk zamanlarında, izoelektrik noktanın belirlenmesi genellikle mevcut olan GSBL'yi tanımlamak için yeterliydi. Bununla birlikte, çoğu aynı izoelektrik noktalara sahip olan >90 TEM tipi β -laktamazla, GSBL'nin izoelektrik nokta ile belirlenmesi artık mümkün değildir. Benzer bir durum GSBL'lerin SHV, CTX-M ve OXA aileleri için de geçerlidir.

β -laktamaz genlerinin erken saptanması, TEM ve SHV enzimlerine özgü DNA problemleri kullanılarak gerçekleştirilir. Bununla birlikte, DNA problemlerini kullanmak bazen oldukça emek ister ve yoğun olabilir. Bir enzim ailesine ait bir β -laktamaz varlığını tespit etmek için kullanılan en kolay ve en yaygın moleküler yöntem, bir β -laktamaz genine özgü oligonükleotid primerleri olan Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) dur. Oligonükleotid primerler, Genbank (GenBank, Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) gibi halka açık veritabanlarında bulunan diziler arasından seçilebilir. Bu primerler genellikle çeşitli nokta mutasyonlarının oluştuğunun bilinmediği bölgelere bağlanmak üzere seçilir. Fakat PZR, TEM veya SHV'nin varyantları arasında ayırım yapamaz (Bradford, 2001).

Çizelge 2.5. Metodların karşılaştırılması (Dağlar ve Öngüt, 2012).

Metod	Olumlu yanı	Olumsuz yanı
CLSI GSBL tarama testleri	Uygulaması ve yorumlaması kolay	GSBL'ler her zaman dirençli olmayabilir
Çift disk sinerji	Uygulaması ve yorumlaması kolay	Diskler arasındaki uzaklıklar halen standart değil
Üç boyutlu test	Uygulaması ve yorumlaması kolay	GSBL'ye spesifik değil
E test	Uygulaması kolay	Çift disk sinerji testinden daha az duyarlılığa sahip
Otomatize sistemler	Uygulaması kolay	Karbapeneme direnç gösteren <i>K. pneumoniae</i> suşlarını tespit etmede duyarlılığı düşük
İzoelektrik odaklama	Enzim sınıflarını kategorize ederek PCR yöntemine öncül olma özelliğinde	Uygulaması zor, izoelektrik noktaları benzer enzimlerin ayrımını yapmada yetersiz
PCR	Uygulaması kolay, gen ailesine özgü	TEM ve SHV varyantlarının ayrımını yapmada yeterli değil
Oligotiplendirme	Spesifik TEM varyantlarını tespit edebilir	Yeni varyantları tespit etmede yetersiz
PCR-RFLP	Uygulaması kolay, özgül nükleotid değişimleri tespit edilebilir	Saptanabilmesi için özgül nükleotid değişiklikleri tespit edilmelidir
Nükleotid dizi analizi	Altın standart. Yeni enzimleri tespit edebilir	Uygulaması zor, maliyeti yüksek

2.7. Biyofilm

2.7.1. Biyofilm tanımı ve tarihçesi

Biyofilm yapısı ilk kez Antoni Van Leeuwenhoek'in dışındaki plağı kazıyarak, ilkel mikroskopunda mikrobiyal topluluk üreten canlıları gözlemlemesiyle ortaya çıkmıştır (Costerton, Stewart ve Greenberg, 1999). Heukelekian ve Heller, bakterilerin substratlarda gelişmesi için yüzeylerin gerekli olduğunu ve yüzeylerde biyolojik olarak aktif bir slime oluşturulduktan sonra biyolojik reaksiyonların büyük ölçüde hızlandığını ortaya çıkarmışlardır (Heukelekian ve Heller, 1940). Zobell, katı yüzeylerdeki adsorpsiyonun mikroorganizmaların aktivitesini arttırdığı gözlemlemiştir (Zobell, 1943). Jones ve diğerleri, bir atık su damlama filtreleri üzerindeki biyofilmleri incelemek için Rutenyum kırmızısı adı verilen spesifik bir polisakkarit boyasıyla, tarama ve iletim elektron mikroskobu kullanmış ve biyofilmlerdeki mikroorganizmaları çevreleyen matris

mataryelinin polisakkarit olduğunu göstermişlerdir (Jones, Roth ve Sandres, 1969). Costerton ve diğerleri, mikroorganizmaların canlı ve cansız yüzeylere yapışabildiğini ve oluşan ekolojik nişin faydalarını açıklayan bir biyofilm teorisi ortaya koymuşlardır (Costerton, Geesey ve Cheng, 1978).

Biyofilm terimi, yoğun yakın ilişki içinde olan bakteri topluluklarının genellikle katı olan bir zemine tutunması ve bu zeminin etrafının ekzopolisakkarit matriks (EPS) ile çevrilmesi sonucu oluşan yapı olarak tanımlanır (Leone ve diğerleri, 2006). En güncel biyofilm tanımıysa; canlı veya cansız bir zemine tutunarak kendi oluşturdukları organik bir madde olan EPS içerisine gömülü ve hareketsiz şekilde katı bir zemine ya da bir ara zemine geri dönüşümsüz şekilde yapışık olarak yaşayan mikroorganizmaların meydana getirdiği çoğunluktur (Donlan ve Costerton, 2002).

2.7.2. Biyofilm yapısı

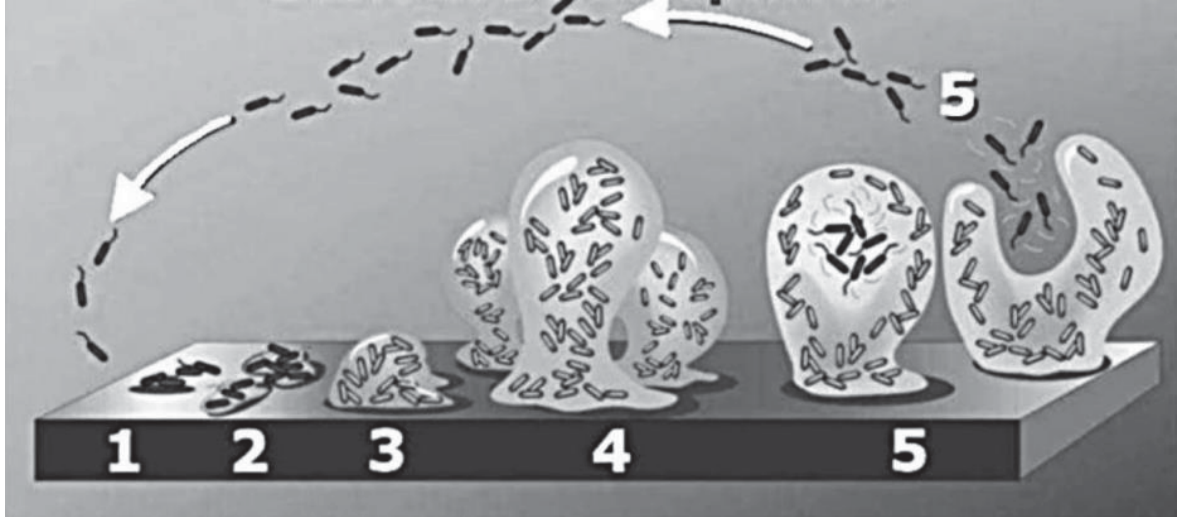
Biyofilm yapısı öncelikle mikrobiyal hücrelerden ve EPS'den meydana gelir. EPS, biyofilmlerin toplam organik karbonunun %50 ile %90'ını oluşturabilir ve biyofilmin birincil matris malzemesi olarak kabul edilir (Donlan, 2002). Bu biyofilm matrisi yaygın olarak glikokaliks şeklinde adlandırılır; hücre dışı maddeler tipik olarak polimerik maddelerdir ve genellikle karmaşık polisakkaritler, proteinli maddeler, glikopeptitler, lipidler, lipopolisakkaritler ve biyofilm yapısını bir arada tutan bir iskele görevi gören diğer malzemelerden oluşan bir matris içerir (Cortes, Bonilla ve Sinisterra, 2011). Biyofilm içindeki EPS sentezinin miktarı, büyük ölçüde hücrenin içindeki ve dışındaki karbon substratların mevcudiyetine ve karbon ile diğer sınırlayıcı besinler arasındaki dengeye bağlıdır. Fazla miktarda mevcut karbon substratının varlığı ve nitrojen, potasyum veya fosfat gibi diğer besinlerdeki sınırlamalar, EPS sentezini teşvik eder (Sutherland, 2001). Biyofilm yapısındaki EPS, biyofilm içerisindeki mikroorganizmaları rekabetçi mikroorganizmalardan, sıcaklık değişimlerinden, konak bağışıklık sistemi elemanlarından, antimikrobiyal ajanlardan ve kurumadan korur (Çalı, 2021).

Mikroorganizmalar etrafın zararlı etkilerinden korunmak, gıda elde etmek ve yeni genetik özelliklere sahip olmak gibi pek çok nedenden dolayı biyofilm oluşturma eğilimine girmektedir (Dıanı, Arıfar ve Akçelik, 2015). Biyofilmler mikroorganizmaları nem,

sıcaklık ve pH değişimleri gibi çevresel şartlardaki değişimlerden ve ultraviyole ışıkla karşılaştığında meydana gelebilecek zararlardan korur. Mikroorganizmaların kümeler şeklinde ve EPS içinde yer almaları sonucu fagositoza uğramaları zorlaşır ve hümmoral bağışıklık elamanlarının mikroorganizmalara erişmesi engellenir. Ayrıca biyofilm yapısı antibiyotiklere karşı direncin de artmasını sağlar. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalarda dirençli olan mikroorganizmalar, aynı mikroorganizmanın biyofilm meydana getirmeyen formundan 1000 kat daha dirençli haldedir. Besinlerin saklanması ve atık maddelerin atılmasının kolay hale getirilmesi de biyofilm yapısının meydana getirdiği diğer avantajlardır (Köksal, 2014). Bunların dışın da doğal mikrobiyal popölasyonlar da mikroorganizmalar arasındaki horizontal gen aktarımı, DNA dizilerinin geniş çapta dağılmasına izin veren her yerde yer alan bir süreçtir. Yapılan çalışmalarda biyofilm içerisindeki mikroorganizma popölasyonlarının, planktonik popölasyonlara göre daha fazla transkonjugant yüzdesine sahip olduğu görölmüşür bu da zeminin konjugasyon için uygun olduğuna dair kanıt oluşturur (Ehlers ve Bouwer, 1999). Pek çok farklı yerden bakıldığında, mikroorganizmaların çevre şartlarına uyum göstermelerine katkıda bulunan biyofilm oluşumu içerisinde gelişme, mikroorganizmalar için bir üstünlük kazandırır (Donlan, 2000; Öztürk, Darcan ve Kariptaş, 2023).

2.7.3. Biyofilm oluşum basamakları

Bir biyofilm tabakası çok farklı ortamlarda meydana gelebilirken, en basitinde bile komplike bir dinamiklik görölür (Gün ve Ekinci, 2009). Biyofilm mimarisi; hücrelerin yüzeye ilk bağlanmasıyla oluşan “dönüşümlü tutunma”, EPS üretimiyle sıkı bir şekilde yapıştırılan “geri dönüşümsüz tutunma”, biyofilm mimarisinin erken gelişimi, biyofilm mimarisin olgunlaşması ve biyofilmden hücrelerin dağılması şeklinde 5 aşamadan meydana gelmektedir Şekil 2.5 (Stoodley, Sauer, Davies ve Costerton, 2002).



Şekil 2.5. Biyofilm oluşumunun beş aşamasının şematik gösterimi. 1.Dönüşümlü tutunma, 2. Dönüşümsüz tutunma, 3. Koloni gelişimi, 4. Olgunlaşma ve 5.Kopma-ayrılma (Stoodley ve diğerleri, 2002).

Biyofilm oluşum basamaklarından ilki olan dönüşümlü tutunma evresinde mikroorganizma, zemin ile tam anlamıyla temasta bulunmamakta fakat mikroorganizmayla zemin arasında uzun mesafeli etkileşimler oluşmaktadır. Zemine dönüşümlü olarak tutunan mikroorganizmalar, zeminde yaşamalarını sağlayacak besin varlığının bulunup bulunmadığını araştırırlar. Zeminin özellikleri mikroorganizmaların tutunmasında önemli bir yere sahiptir (Akan ve Kınık, 2014). Zeminin yükü, hidrofobiklik, zemin pürüzlülüğü ve zemin mikro-topografyası gibi çok sayıda faktör mikroorganizmaların zemine tutunmasında rol oynamaktadır (Palmer, Flint ve Brooks, 2007). Mikroorganizmalar bu evrede, durulama benzeri basit yıkama yöntemleriyle kolaylıkla zeminden uzaklaştırılabilir (Akan ve Kınık, 2014).

Biyofilm oluşumunun ikinci basamağı olan dönüşümsüz tutunma evresinde mikroorganizmalar, zeminle kısa mesafeli etkileşimler olan dipol-dipol etkileşimi, hidrofobik etkileşimler, iyon-dipol etkileşimi, iyonik ile kovalent bağlar ve hidrojen etkileşimleriyle hücre organelleriyle zemine dönüşümsüz şekilde tutunma eylemini gerçekleştirir (Akan ve Kınık, 2014). Mikroorganizmaların zeminlere dönüşümsüz olarak bağlanmasında flagella ve pili gibi organeller etkilidir (Poulsen, 1999). Katyonlar, farklı makromoleküller ile koloidal yapılar boru hattında tutulduğunda, mikroorganizmalar önce organik yapıya dönüşümlü şekilde, daha sonra da flagella ve fimbriayla dönüşümsüz şekilde tutunma eylemini gerçekleştirir. Zemine tutunan mikroorganizmalar, membrana

bağlı olan protein moleküllerinden EPS'yi meydana getirir (Duran, 2011). Mikroorganizmalar bu evrede, dezenfektan ve enzimatik kimyasal maddelerle zeminden uzaklaştırılabilir (Sinde ve Carbolla, 2000; Augustin, Ali-Vehmas ve Atroshi, 2004).

Uygun büyüme koşulları sağlandığında geri dönüşümsüz bağlanmadan sonra mikrokoloni oluşumu meydana gelecektir. Mikroorganizmaların eşzamanlı olarak toplanması, büyümesi ve EPS üretimi, çevresel sinyaller mikrokoloni oluşumunu teşvik eder (Chmielewski ve Frank, 2003). Biyofilm büyüdükçe, polimer matrikste kapsüllenen mikroorganizmalarda bir artış olur (Poulsen, 1999). Yeterli büyüme ve aglomerasyon için koşullar uygunsa, doğada biyofilm organize bir yapı geliştirebilir bu sürece olgunlaşma denir (Chmielewski ve Frank, 2003). Besin maddelerinin etkisiyle hücreden hücreye sinyalleşme gerektiren olgunlaşma sürecin de sapsız mantar şeklinde çok hücreli yapılar oluşur ve bu yapılar substrat üzerine yayılır (Klausen ve diğerleri, 2003). Olgun biyofilm EPS ile bir arada tutulan ve su kanallarıyla serpiştirilmiş, gözenekli hücre dışı polimer ya da çok katmanlı gevşek paketlenmiş mikrokolonilerdeki tek hücre katmanından oluşabilir. Biyofilm yapısı olgunlaştıkça besin, oksijen ve nüfus değişikliklerine uyum sağlar ve su kanallarıyla ayrılmış ayrı mikrokoloniler oluşturur (Chmielewski ve Frank, 2003).

Biyofilm gelişiminin son evresi olan kopma veya ayrılma evresinde tek bir bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır (Akan ve Kınık, 2014). Akış kuvvetinin artması, enzim etkinliğinin EPS matrisini bozması biyofilm hücrelerinin ayrılmasında etkilidir (Stoodley ve diğerleri, 2002; Kaplan, Ragunath, Velliyagounder, Fine ve Ramasubbu, 2004). Koparak ayrılan biyofilm hücreleri planktonik fazlarına geri dönerler (Sauer, Camper, Ehrlich, Costerton ve Davies, 2002).

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

Bu tez çalışması Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Sağlık MYO biyolojik aktivite laboratuvarında gerçekleşmiştir. Çalışmamızda kullanılan 120 izolatın; 31 tanesi Tokat Erbaa Devlet Hastanesinden, 39 tanesi Tokat Devlet Hastanesinden kalan 50 tanesiye Samsun Bafra Devlet Hastanesindeki ayaktan ve yatan hastalardan alınan klinik örneklerden elde edilmiştir. Çalışmamızda izolatların Kirby-Bauer Disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik direnç profiline bakılmıştır daha sonra kombine disk yöntemiyle fenotipik olarak genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) direnç profiline ve genotipik olarakta *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* ve *bla_{CTX-M}* gen bölgelerine polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile bakılmıştır. Ayrıca izolatların *intI1* ve *fimH* gen bölgelerine de PZR ile bakılarak, Mikrotitrasyon plak yöntemiyle izolatların biyofilm oluşumu değerlendirilmiştir.

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmada kullanılan besi ortamları

Triptik Soy Agar (TSA, Merck, Germany, 105458) besiyerinin hazırlanışı

Ticari besiyerinden hassas terazide 40,0 g olacak biçimde tartılıp, 1 L deiyozine su içerisinde çözünmesi için karıştırılmıştır. pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak, otoklavda 121 °C sıcaklığında 15 dakika sterilize edilerek ve steril petri kaplarına dökülüp ve donmaları için beklenmiştir.

Mueller Hinton Agar (MHA, Biolife, Milan, Italy, 4017402500) besiyerinin hazırlanışı

Ticari besiyerinden hassas terazide 34,0 g olacak şekilde tartılıp, 1 L deiyozine su içerisinde çözünmesi için karıştırılmıştır. pH 7,2±0,2'ye ayarlanarak, otoklavda 121 °C sıcaklığında 15 dakika sterilize edilerek ve steril petri kaplarına dökülüp ve donmaları için beklenmiştir.

Triptik Soy Broth (TSB, Merck, Germany 105459) besiyerinin hazırlanışı

Ticari besiyerinden, hassas terazide 30,0 g olacak biçimde tartılıp, 1 L deiyozine su içerisinde çözünmesi amacıyla karıştırılmıştır. pH $7,2\pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, otoklavda 121 °C sıcaklığında 15 dakika steril edilmiştir.

%0,25 glikoz içeren Triptik Soy Broth

Biyofilm oluşturmak amacıyla kullanılmıştır. Hazırlanan TSB içerisine %0,25 konsantrasyonunda glikoz ilave edilerek tam olarak çözününceye kadar karıştırılmıştır. 121 °C sıcaklığında 15 dakika steril edilmiştir.

%15 gliserol içeren Brain Heart Infusion (BHI, Biolife, Milan, Italy, 4012302)

Ticari besiyeri olarak satın alınan BHI, hassas terazide 30,0 g olacak şekilde tartılıp, 1 L deiyozine su içerisinde çözünmesi amacıyla karıştırılmıştır. pH $7,4\pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, otoklavda 121 °C sıcaklığında 15 dakika steril edilmiştir.

Eozin Metilen Blue (EMB, Merck, Germany, 103858)

Ticari besiyerinden, hassas terazide 36,0 g olacak biçimde tartılıp, 1 L deiyozine su içerisinde çözünmesi için karıştırılmıştır. pH $7,1\pm 0,2$ 'ye ayarlanarak, otoklavda 121 °C sıcaklığında 15 dakika sterilize edilerek ve steril petri kaplarına dökülüp donmaları için beklenmiştir.

MacConkey Agar (MCA, Merck, Germany, 100205)

Ticari besiyerinden, hassas terazide 50,0 g olacak şekilde tartılıp, 1 L deiyozine su içerisinde çözünmesi için karıştırılmıştır. pH 6,9-7,3'ye ayarlanarak, otoklavda 121 °C sıcaklığında 15 dakika sterilize edilerek ve steril petri kaplarına dökülüp donmaları için beklenmiştir.

3.1.2. Çalışmada kullanılan çözeltiler

Serum Fizyolojik hazırlanışı

Mikroorganizmaları %0,1 steril tuz çözeltisinde inokülüm yoğunluğu 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) bulanıklık seviyesine ayarlamak için seyreltme çözeltisi olarak kullanılmıştır. Hassas terazide 9 g NaCl tartılmıştır. Üzerine 1 L saf su eklenmiş ve karıştırılmıştır. Deney tüplerine dağıtılıp ve otoklovda 121 °C sıcaklığında 15 dakika sterilize edilmiştir.

Kristal viyole çözeltisi

Kristal viyolenin (0,25 g), alkol (%95) yardımıyla tümünün çözünmesini sağladıktan sonra toplam hacim 100 mL olacak biçimde deiyozine su konulmuştur. Bir gece bekletildikten sonra filtre kağıdıyla süzülerek hazır hale getirilmiştir.

10X TBE buffer (10x Tris-borate-EDTA)

- 108 g Trisma Base (SİGMA)
- 55 g H₃BO₃ (MERCK)
- 20 ml 7,5 M [CH₂N(CH₂COOH)₂]₂
- Deiyozine su ile 1 litreye tamamlanmıştır.
- pH: 8
- Manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojenize edilmiştir (Boutte, Grubisic, Balthasarat ve Wilmotte, 2006).

1X TBE buffer (1x Tris-borate-EDTA)

- 10X TBE'den 100 ml alınıp,
- 900 ml Deiyozine su eklenmiştir.
- Manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojenize edilmiştir (Boutte ve diğerleri, 2006).

Fosfat Tamponu

- 0,1 g KCl
- 4 g NaCl
- 0,1 g KH₂PO₄
- 0,57 g Na₂HPO₄
- Deiyozine su ile 500 ml'ye tamamlanmıştır.
- Manyetik karıştırıcı ile karıştırılarak homojenize edilmiştir.

%1' lik Agoroz jel

Hassas terazide 1 g Agorose (Prono, Basica Le, Burgos, İspanya) tartılıp, 100 ml 1X TBE buffer ile karıştırılarak mikrodalga fırında tam olarak çözünmesi sağlanmıştır. Yaklaşık olarak 50-55 °C'ye kadar soğuyunca elektroforez kasetine dökülerek polimerizasyona bırakılmıştır.

3.1.3. Çalışmada kullanılan primerler

Çalışmada kullanılan primerler Oligomer, Biotechnology (Türkiye) firması tarafından sentezlenerek satın alınmıştır. Primerler 100 µM olacak şekilde sulandırılmış ardından çalışmada kullanılan konsantrasyonu elde edebilmek için 1/10 oranında seyreltilerek kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır. Çizelge 3.1' de belirtilen primerler kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerler

Primer adı	Primer dizisi (5'-3')	Amplikon buckling (bp)	Kaynak
<i>bla_{CTX-M}-F</i> <i>bla_{CTX-M}-R</i>	TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCCATA	544	Edelstein ve diğerleri, 2003
<i>bla_{TEM}-F</i> <i>bla_{TEM}-R</i>	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	800	Estaji ve diğerleri, 2019
<i>bla_{SHV} F</i> <i>bla_{SHV} R</i>	AAGATCCACTATCGCCAGCAG ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG	231	Estaji ve diğerleri, 2019
<i>intI1-F</i> <i>intI1-R</i>	CCTCCCGCACGATGATC TCCACGCACTGTCAGGC	280	Bass ve diğerleri, 1999
<i>fimH-F</i> <i>fimH-R</i>	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	Ebrahim-Saraie, 2018

3.1.4. Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri

Çalışmada gerçekleştirilen antimikrobiyal aktivite ve kombine test yöntemi için Çizelge 3.2’de belirtilen antibiyotik diskleri kullanılmıştır.

Çizelge 3.2. Antimikrobiyal aktivite testlerinde kullanılan antibiyotik diskleri

Antimikrobiyal Ajan	Disk içeriği (µg)
Aztreonam ATM, (Bioanalyse, ASD00700)	30
Seftazidim CAZ, (Bioanalyse, ASD02100)	30
Kloramfenikol C, (Bioanalyse, ASD02800)	30
Fosfomisin FF, (Bioanalyse, ASD04000)	50
Amoksasilin / Klavulank asit AMC, (Bioanalyse, ASD00420)	30
Gentamisin CN, (Bioanalyse, ASD04300)	10
İmipenem IPM, (Bioanalyse, ASD04500)	10
Meropenem MEM, (Bioanalyse, ASD06000)	10
Nalidiksik asit NA, (Bioanalyse, ASD06000)	30
Piperasilin tazobaktam TPZ, (Bioanalyse, ASD07620)	100/10
Tobramisin TOB, (Bioanalyse, ASD09200)	10
Levoflaksosin LEV, (Bioanalyse, ASD04800)	5
Sefotaksim CTX, (Bioanalyse, ASD01800)	30
Seftazidim-klavulanik asit (CCA), (Bioanalyse, ASD02111)	30/10
Sefotaksim-klavulanik asit (CCT), (Bioanalyse, ASD01820)	30/10

3.2. Yöntem

3.2.1. Mikrobiyal örneklerin izolasyonu ve laboratuvara getirilmesi

Tokat Erbaa Devlet Hastanesi, Tokat Devlet Hastanesi ve Samsun Bafra Devlet Hastanesinden çeşitli klinik örneklerden cinsiyet ve yaş ayrımı yapılmadan toplanan *K. pneumoniae* izolatları (N:120) mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilerek klasik kültür yöntemleri kullanılarak izole edilmiştir. Öncelikle kültür işleminde EMB agar ve kanlı agara ekim yapılarak fenotipik olarak doğrulanmıştır. İkinci olarak tür tayini Erbaa Devlet Hastanesinde manuel, Tokat Devlet Hastanesinde BD Phoenix (Becton Dickinson, USA), Bafra Devlet Hastanesinde Vitek 2 GN Compact bioMerieux otomatize sistem tarafından gerçekleştirilmiştir. Tür düzeyinde *K. pneumoniae* olduğu doğrulanan izolatlar TSA'da subkültür edildikten sonra %15 gliserol içeren BHI broth içerisinde diğer fenotipik ve genotipik çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C'de stoklanmıştır. Alınan örnekler aseptik

şartlarda laboratuvara getirilerek çalışmalarda daha sonra kullanılmak üzere etiketleme yapılarak -20°C’de stoklanmıştır.

3.2.2. Antibiyotik duyarlılık testi

İzolatların antibiyotik direnç profilleri Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre belirlenmiştir (CLSI, 2016). TSA’ya 24 saat önceden ekimi yapılmış izolatlardan oluşan taze kültürdeki koloniler, %0,1 steril tuz çözeltisinde inokülüm miktarı 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) bulanıklık seviyesine eşit olacak biçimde hazırlanmış ve sterilize edilmiş eküvyon yardımıyla MHA besi ortamının tüm alanına eşit bir biçimde dağıtılmıştır. Meropenem (MEM, 10 µg), seftazidim (CAZ, 30 µg), levofloksasin (LEV, 5 µg), kloramfenikol (C, 30 µg), aztreonam (A, 30 µg), fosfomisin (FF, 30 µg), tobramisin (TOB, 10 µg), gentamisin (CN, 30 µg), imipenem (IPM, 10 µg), nalidiksik asit (NA, 30 µg), pirerasillin-tazobaktam (TPZ, 100/10 µg) ve amoksisilin klavunat (AMC, 20/10 µg) antibiyotik diskleri steril bir pensle plağın üzerine konulmuştur. Kontrol suşu olarak *K. pneumoniae* 700603 suşundan yararlanılmıştır. Disklerin inhibisyon zon çapları, 35 °C sıcaklığında 18 saat inkübasyonun sonunda kumpasla milimetre cinsinden ölçülüp CLSI kriterleri tarafından önerilen sınır değerlerine bakılarak Çizelge 3.3 değerlendirilmiştir. Ara dirençli suşlarda dirençli suşlar grubuna alınmıştır.

Çizelge 3.3. Disk difüzyon yönteminde kullanılacak antibiyotikler ve sınır değerleri (CLSI, 2016).

Antibiyotikler	Disk içeriği (µg)	Zon çapları (mm)		
		S	I	R
MEM	10	≥23	20-22	≤19
CAZ	30	≥21	18-20	≤17
LEV	5	≥17	14-16	≤13
C	30	≥18	13-17	≤12
ATM	30	≥21	18-20	≤17
FF	30	≥16	13-15	≤12
TOB	10	≥15	13-14	≤12
CN	30	≥15	13-14	≤12
IPM	10	≥23	20-22	≤19
NA	30	≥19	14-18	≤13
TPZ	100/10	≥21	18-20	≤17
AMC	20/10	≥18	14-17	≤13

S: Duyarlı, I: Orta derecede duyarlı, R: Dirençli grup.

3.2.3. Kombine disk testi

Bu test ile izolatların Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz üretip üretmedikleri fenotipik olarak test edilmiştir. Bu metotta seftazidim (CAZ) (30 µg), seftazidim-klavulanik asit (CCA) (30/10 µg), seftotaksim (CTX) (30 µg), seftotaksim-klavulanik asit (CCT) (30/10 µg) diskleri kullanılmıştır. MHA besi ortamına 0.5 MacFarland bulanıklık seviyesine göre hazırlanan bakteri süspansiyonu sterilize edilmiş eküvyon yardımıyla yayılmıştır. CAZ ve CCA diskleri arasındaki mesafe 30 mm olacak biçimde petri kabına yerleştirilmiş, yapılan işlemlerin aynısı CTX ve CCT diskleri için de uygulanmıştır. Petri kapları 35 °C sıcaklıkta 18 saat inkübasyona bırakılmış. Sonuçlar CLSI kriterlerine bakılarak değerlendirilmiştir (CLSI, 2016).

3.2.4. Mikrotitrasyon plağı yöntemiyle biyofilm oluşumun değerlendirilmesi

- Klinik suşlardan TSA’da 24 saat sonunda üreme gösteren kolonilerden %0,1 serum fizyolojik çözeltisinde inokülüm yoğunluk miktarı 0,5 McFarland (yaklaşık 10^8 CFU/mL) yoğunluğunda olacak biçimde ayarlanmıştır.
- Diğer aşamada polistren deney tüplerine (12x75 mm) 5 mL %0,25 glikoz bulunduran TSB besiyerinden konulmuştur.
- Aynı deney tüplerine daha önce yoğunluk miktarı 0,5 McFarland ayarlanmış karışımları 1/50 oranında olacak biçimde konulmuş ve deney tüpleri vorteks edilmiştir.
- Hazırlanan bakteri karışımlarından 150 µl alınarak 96 kuyucuklu düz tabanlı polistren mikrotitrasyon plağı kuyularına 3’lü tekrar şeklinde konulmuş, 37 °C sıcaklığında 24 saat inkübasyona bırakılmıştır.
- Örneklerin tümü tekrar eden 3 kuyu şeklinde çalışılmıştır. İnkübasyondan sonra sıvı besiyeri dökülmüş plaklar 3 defa nazik bir şekilde steril fosfat tamponuyla (PBS, pH 7,2) yıkanmış ve kurutma kağıdının üstüne tersine çevrilerek kuruması sağlanmıştır. Bu işlem sayesinde zemine tutunmayan mikroorganizmaların uzaklaşması sağlanmıştır.
- Kuyucuklarda meydana gelen biyofilm katmanının fiksasyonunu sağlamak için %99’luk metil alkol eklenerek 15 dk bekletilmiştir.

- Kuyucuklardan metil alkol boşaltılmış ve kurutulması sağlanmıştır. Daha sonraki basamakta 150 µL %0,1 kristal viyole eklenerek 15 dk 25 °C’de inkübasyona bırakılmış, biyofilm meydana getiren hücrelerin boyanması sağlanmıştır.
- İnkübasyonun sonunda kuyucuklardaki boyanın, meydana gelen biyofilm katmanını zarara uğratmadan boşaltılması sağlanmış, 3 kez distile suyla yıkanmış ve kurutma kağıdına ters çevrilip kurutulmaya bırakılmıştır.
- Bir sonraki basamakta kuyucuklara 150 µL etanol/aseton (80:20) eklenerek 15 dakika beklenmiş, boyanmış biyofilm katmanının çözünmesi sağlanmıştır.
- Plakların dalga boyu 570 nm olan mikroparka ölçüm cihazında (Multiscan GO, Thermo Scientific) okutulması sağlanarak, optik dansite (OD) verilerine bakılarak biyofilm oluşumu pozitif ve negatif şekilde yorumlama yapılmıştır.
- Bakteri örneklerinin her biri için 3 kuyucuğun absorbans verilerinin ortalaması alınarak, sonuçlarımız biyofilm oluşturan *Pseudomonas aureginosa* ATCC 15692 suşlarından elde edilen absorbans değerleriyle karşılaştırılma yapılarak yorumlanmıştır (Stepanovic, Vukovic, Dakic, Savic ve Svabic-Vlahovic. 2000).

3.2.5. DNA izolasyonu

Daha önceden –20 °C’de stokladığımız *K. pneumoniae* izolatları TSA’da subkültür edilerek 37 °C’de 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun tamamlanmasının ardından 1 öze dolusu bakteri örneği alınarak 500 uL deiyonize su içinde homojen bir şekilde çözülecek 12 dakika boyunca 95 °C sıcaklıkta ısıtılarak lizis edilmiştir. Ardından 14000 x g de 10 dakika santrifüj edilip ve genomik DNA içeren süpernatantlar PCR reaksiyonlarında kullanılmak üzere ayrılmıştır (Yang ve diğerleri, 2019).

intI1 gen PZR karışımı ve amplifikasyon programı

intI1 geninin amplifikasyon işleminin sonucunda, DNA bantlarını iyi bir şekilde görüntüleyebilmek amacıyla MgCl₂, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun gelen konsantrasyonlar *intI1* geni için PZR öğeleri Çizelge 3.4’de belirtildiği

üzere, toplam hacim 25 μL (son konsantrasyonları 1X/ μL Taq tamponu, 2,5 mM/ μL MgCl_2 , 5 mM/ μL dNTP mix, 5 pmol/ μL primer, 0,05 U/ μL Taq DNA polimeraz ve 1,2 ng/ μL kalıp DNA) olacak biçimde hazırlanacak, reaksiyonsa Çizelge 3.5'te yer alan koşullar ile yapılmıştır.

Çizelge 3.4. *intI1* gen PZR öğeleri

Öğelerin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (μL)	Son konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ μL
MgCl_2 (25 mM)	2,5	2,5 mM/ μL
dNTP mix (10 mM)	0,5	5 mM/ μL
Primer Forward (10 pmol/ μL)	0,5	5 pmol/ μL
Primer Reverse (10 pmol/ μL)	0,5	5 pmol/ μL
Taq DNA polimeraz (5U/ μL)	0,25	0,05 U/ μL
Kalıp DNA 30 (ng/ μL)	1	1,2 ng/ μL
dH_2O	17,25	-
TOPLAM	25	-

Çizelge 3.5. *intI1* gen Amplifikasyon programı

Basamak	Sıcaklık ($^{\circ}\text{C}$)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94	5 dk	1
Denatürasyon	94	1 dk	30
Bağlanma	55	1,5 dk	
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	7 dk	1

bla_{TEM} geni PZR karışımı ve amplifikasyon programı

bla_{TEM} geninin amplifikasyon işleminin sonucunda, DNA bantlarını iyi bir şekilde görüntüleyebilmek amacıyla MgCl_2 , dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun gelen konsantrasyonlar TEM geni için PZR öğeleri Çizelge 3.6'da belirtildiği gibi, toplam hacim 25 μL (son konsantrasyonları 1X/ μL Taq tamponu, 2,5 mM/ μL MgCl_2 , 5 mM/ μL dNTP mix, 5 pmol/ μL primer, 0,05 U/ μL Taq DNA polimeraz ve 1,2 ng/ μL kalıp DNA) olacak biçimde hazırlanacak, reaksiyonsa Çizelge 3.7'de yer alan koşullar ile yapılmıştır.

Çizelge 3.6. *bla_{TEM}* geni PZR öğeleri

Öğelerin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (µL)	Son konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM/ µL
dNTP mix (10 mM)	0,5	5 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5	5 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5	5 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,25	0,05 U/ µL
Kalıp DNA 30 (ng/µL)	1	1,2 ng/ µL
dH ₂ O	17,25	-
TOPLAM	25	-

Çizelge 3.7. *bla_{TEM}* geni amplifikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	40
Bağlanma	56	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	5 dk	1

bla_{SHV} geni PZR karışımı ve amplifikasyon programı

bla_{SHV} geninin amplifikasyon işleminin sonucunda, DNA bantlarını iyi bir şekilde görüntüleyebilmek amacıyla MgCl₂, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun gelen konsantrasyonlar SHV geni için PZR öğeleri Çizelge 3.8’de belirtildiği gibi, toplam hacim 25 µL (son konsantrasyonları 1X/µL Taq tamponu, 0,5 mM/µL MgCl₂, 5 mM/µL dNTP mix, 5 pmol/µL primer, 0,05 U/µL Taq DNA polimeraz ve 1,2 ng/µL kalıp DNA) olacak biçimde hazırlanacak reaksiyonsa Çizelge 3.9’da yer alan koşullarda yapılmıştır.

Çizelge 3.8. *bla_{SHV}* geni PZR öğeleri

Öğelerin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (µL)	Son konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	0,5	0,5 mM/ µL
dNTP mix (10 mM)	0,5	5 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5	5 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5	5 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,25	0,05 U/ µL
Kalıp DNA 30 (ng/µL)	1	1,2 ng/ µL
dH ₂ O	19,25	-
TOPLAM	25	-

Çizelge 3.9. *bla_{SHV}* geni Amplifikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	} 40
Bağlanma	58	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	5 dk	1

bla_{CTX-M} geni PZR karışımı ve amplifikasyon programı

bla_{CTX-M} geninin amplifikasyon işleminin sonucunda, DNA bantlarını iyi bir şekilde görüntüleyebilmek amacıyla MgCl₂, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun gelen konsantrasyonlar CTX-M geni için PZR öğeleri Çizelge 3.10’da belirtildiği gibi, toplam hacim 25 µL (son konsantrasyonları 1X/µL Taq tamponu, 0,5 mM/µL MgCl₂, 5 mM/µL dNTP mix, 2,5 pmol/µL primer, 0,05 U/µL Taq DNA polimeraz ve 2,4 ng/µL kalıp DNA) olacak biçimde hazırlanacak reaksiyonsa Çizelge 3.11’de yer alan koşullarda yapılmıştır.

Çizelge 3.10. *bla_{CTX-M}* geni PZR öğeleri

Öğelerin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (µL)	Son konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	0,5	0,5 mM/ µL
dNTP mix (10 mM)	0,5	5 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	1	2,5 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	1	2,5 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,25	0,05 U/ µL
Kalıp DNA 30 (ng/µL)	2	2,4 ng/ µL
dH ₂ O	17,25	-
TOPLAM	25	-

Çizelge 3.11. *bla_{CTX-M}* geni amplifikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94	1 dk	1
Denatürasyon	94	60 sn	} 35
Bağlanma	56	60 sn	
Uzama	72	55 sn	
Son uzama	72	10 dk	1

fimH geni PZR karışımı ve amplifikasyon programı

fimH geninin amplifikasyon işleminin sonucunda DNA bantlarını iyi bir şekilde görüntüleyebilmek amacıyla MgCl₂, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun gelen konsantrasyonlar *fimH* geni için PZR öğeleri Çizelge 3.12’de belirtildiği gibi, toplam hacim 25 µL (son konsantrasyonları 1X/µL Taq tamponu, 0,5 mM/µL MgCl₂, 5 mM/µL dNTP mix, 2,5 pmol/µL primer, 0,05 U/µL Taq DNA polimeraz ve 2,4 ng/µL kalıp DNA) olacak biçimde hazırlanacak reaksiyonsa Çizelge 3.13’ te yer alan koşullarda yapılmıştır.

Çizelge 3.12. *fimH* geni PZR öğeleri

Öğelerin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (µL)	Son konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	0,5 mM/ µL
dNTP mix (10 mM)	0,5	5 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5	2,5 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5	2,5 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,25	0,05 U/ µL
Kalıp DNA 30 (ng/µL)	1	2,4 ng/ µL
dH ₂ O	18,25	-
TOPLAM	25	-

Çizelge 3.13. *fimH* geni amplifikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	60 sn	30
Bağlanma	58	45 sn	
Uzama	72	50 sn	
Son uzama	72	5 dk	1

Agaroz jel elektroforezi

%1'lik (w/v) agaroz jel hazırlanmıştır. Çalışmadaki bütün gen bölgelerine ait olan ampikonlardan, 10 µL ile 2 µL 6X yükleme tamponuyla beraber agaroz jele yüklenmiş, 90 volt elektrik akımında 90 dk süre ile yürütülmesi sağlanmıştır. Jelin 5 µg/mL etidyum bromür çözeltisi içerisinde orbital karıştırıcı yardımıyla 50 rpm'de 30 dakika boyanması sağlanmıştır. DNA bantlarının molekül büyüklüğü 100 bç DNA belirteciyle karşılaştırılıp UV transilluminatörle görüntülenip değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Klinik Örneklerin Elde Edildiği Hasta Cinsiyetine Göre Dağılımı

Tokat Erbaa Devlet Hastanesi, Tokat Devlet Hastanesi ve Samsun Bafra Devlet Hastanesinden elde edilen 120 klinik izolatın hastaların cinsiyetine göre dağılımı 77 kadın (%64,1), 43 erkek (%35,9) şeklindedir. Çizelge 4.1’de izolatların cinsiyete göre dağılımı verilmiştir.

Çizelge 4.1. İzolatların cinsiyete göre dağılımını

Klinik izolatların hastaların cinsiyetine göre dağılımı	Klinik izolatların hastaların cinsiyetine göre sayı ve yüzdelik oran dağılımı
Kadın	77 (% 64,1)
Erkek	43 (% 35,9)
Toplam izolat sayısı	120

4.2. Klinik İzolatların İzole Edildiği Örneklerle Göre Dağılımı

K. pneumoniae’nin (N=120) izole edildiği örneklerle göre dağılımı; 110 idrar kültürü (%91,6), 7 balgam kültürü (%5,83), 2 kan kültürü (%1,66), ve 1 kateter kültürü (%0,83) şeklindedir. Çizelge 4.2’de izolatların izole edildiği örneklerle göre dağılımı verilmiştir.

Çizelge 4.2. İzolatların izole edildiği örneklerle göre dağılımı

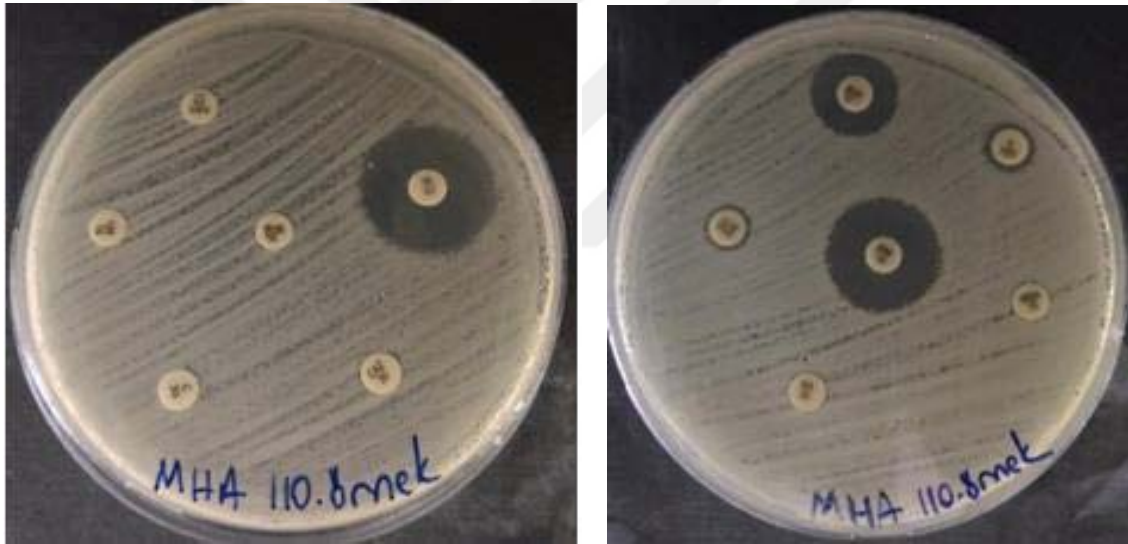
Klinik izolatların elde edilen örneklerle göre dağılımı	Klinik izolatların elde edilen örneklerle göre sayı ve yüzdelik oran dağılımı
İdrar	110 (%91,6)
Balgam	7 (%5,83)
Kan	2 (%1,66)
Kateter	1 (%0,83)
Toplam izolat sayısı	120

4.3. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Klinik izolatlara, yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre antibiyotik duyarlılık sonuçları CLSI kriterlerine göre değerlendirilmiş Resim 4.1. TSA besiyerine 24 saat önce ekimi yapılan izolatlardan meydana gelen taze kültürdeki koloniler, %0,1 steril tuz

  zeltisinde inokülüm yoğunluk miktarı 0,5 McFarland ($\sim 10^8$ CFU/mL) bulanıklık değerine eşit olacak şekilde hazırlanarak, sterilize edilmiş bir eküvyonla MHA besi ortamının tamamına eşit bir şekilde dağıtılmıştır. Sterilize edilmiş bir pensle koyulan antibiyotik diskleri 35  C sıcaklıkta 18 saat inkübasyonun sonunda kumpasla milimetre cinsinden ölçülen veriler CLSI kriterleri tarafından önerilen sınır değerlerine bakılarak değerlendirmeye alınmıştır.

Elde edilen sonuçlara göre; 120 izolatın 47'si (%39,1) MEM'e, 43'  (%35,8) IPM'ye, 72'si (%60) CAZ'a, 48'i (%40) C'ye, 107'si (%89,1) LEV'e, 69'u (%57,5) ATM'ye, 71'i (%59,1) FF'e, 53'  (%44,1) TOB'a, 47'si, (%39,1) CN'ye, 83'  (%69,1) AMC'ye, 65'i (%54,1) TPZ'ye, 68'i (%56,6) NA'ya, karşı dirençlidir. Çizelge 4.3'de izolatların antibiyotik sonuçları verilmiştir.



Resim 4.1. Antibiyotik duyarlılık testi (12 antibiyotiğe karşı disk difüzyon testi).

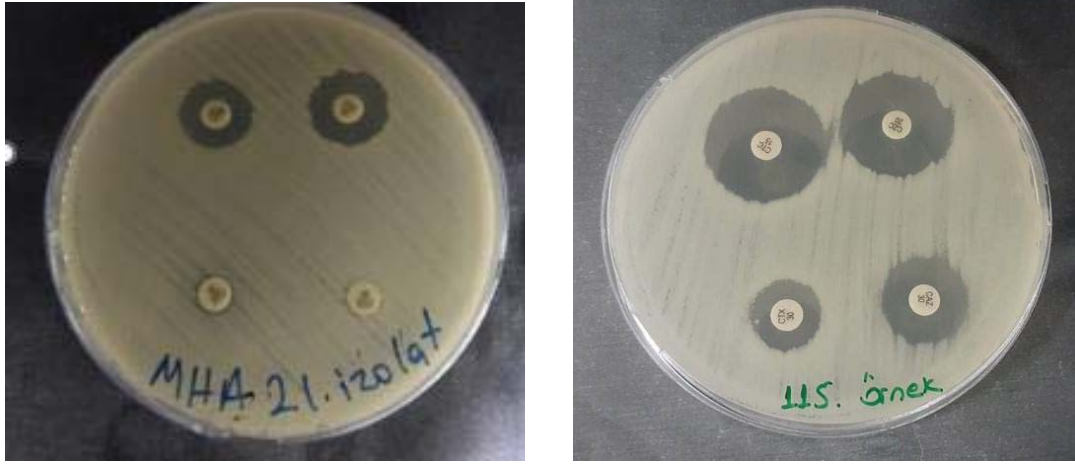
Çizelge 4.3. İzolatların antibiyotik sonuçları

Antibiyotik çeşidi	Toplam izolat sayısı/ Dirençli izolat sayısı/ yüzdelik oran	Toplam izolat sayısı/ Duyarlı izolat sayısı/ yüzdelik oran
MEM	120 / 47 / (%39,1)	120 / 73 / (%60,9)
IPM	120 / 43 / (%35,8)	120 / 77 / (%64,2)
CAZ	120 / 72 / (%60)	120 / 28 / (%40)
C	120 / 48 / (%40)	120 / 72 / (%60)
LEV	120 / 107 / (%89,1)	120 / 13 / (%10,9)
ATM	120 / 69 / (%57,5)	120 / 51 / (%42,5)
FF	120 / 71 / (%59,1)	120 / 29 / (%40,9)
TOB	120 / 53 / (%44,1)	120 / 67 / (%55,9)
CN	120 / 47 / (%39,1)	120 / 73 / (%60,9)
AMC	120 / 83 / (%69,1)	120 / 37 / (%30,9)
TPZ	120 / 65 / (%54,1)	120 / 55 / (%45,9)
NA	120 / 68 / (%56,6)	120 / 52 / (%43,4)

MEM: Meropenem, IPM: İmipenem, CAZ: Seftazidim, C: Kloramfenikol, LEV: Levoflaksasin, ATM: Aztreonam, FF: Fosfomisin, TOB: Tobramisin, CN: Gentamisin, AMC: Amoksisilin klavunat, TPZ: Piperasilin-tazobaktam, NA: Nalidiksik asit.

4.4. İzolatların GSBL Profili

Kombine disk metoduyla izolatların Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz üretip üretmedikleri fenotipik olarak test edilmiştir Resim 4.2. Bu metotta seftazidim (CAZ) (30 µg), seftazidim-klavulanik asit (CCA) (30/10 µg), sefotaksim (CTX) (30 µg), sefotaksim-klavulanik asit (CCT) (30/10 µg) disklerinden yararlanılmıştır. MHA besi ortamına 0.5 MacFarland bulanıklık değerine göre ayarlanan bakteri süspansiyonu sterilize edilmiş bir eküvyonla dağıtılmıştır. CAZ ve CCA antibiyotik diskleri arasında 30 mm olacak biçimde petri kabına yerleştirilmiş, işlemlerin aynısı CTX ve CCT antibiyotik diskleri için de tekrarlanmıştır. Petri kapları 35 °C sıcaklıkta 18 saat inkübasyona bırakılmış. Sonuçlar CLSI kriterlerine bakılarak değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre; 120 izolatın 28 tanesi (%23,3) GSBL pozitif, kalan 92 izolat ise (%76,7) GSBL negatif olarak tespit edilmiştir Çizelge 4.4.



Resim 4.2. GSBL pozitif izolatlar

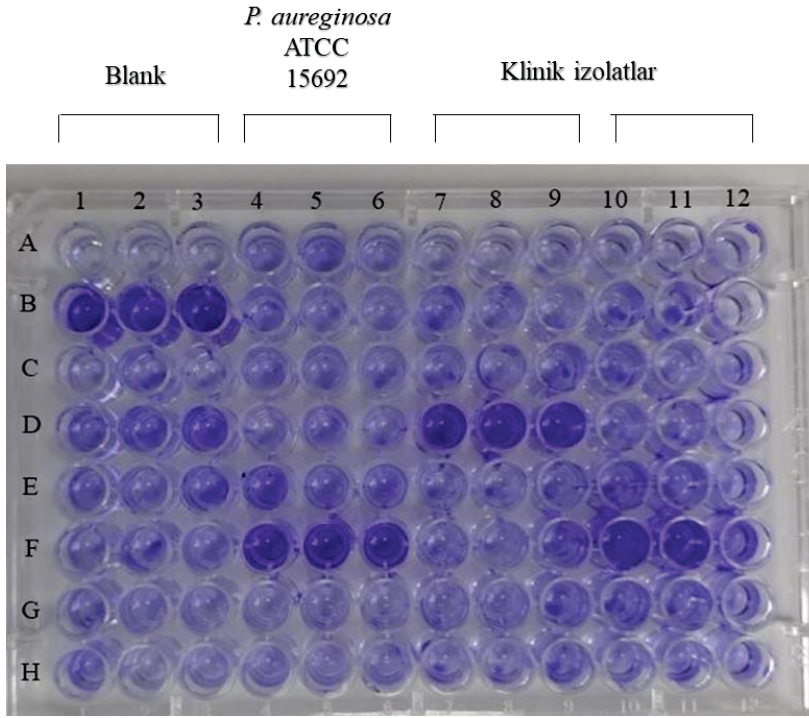
Çizelge 4.4. İzolatların GSBL profili

GSBL durumu	Toplam izolat sayısı / GSBL pozitif izolat sayısı / yüzdelik oran	Toplam izolat sayısı / GSBL negatif izolat sayısı / yüzdelik oran
	120 / 28 / (%23,3)	120 / 92 / (%76,7)

4.5. Mikrotitrasyon Plağı Yöntemiyle İzolatların Biyofilm Oluşum Sonuçları

Klinik suşlardan TSA'da 24 saat sonunda üreme gösteren kolonilerden %0,1 serum fizyolojik çözeltisinde inokülüm yoğunluk miktarı 0,5 McFarland (yaklaşık 10^8 CFU/mL) yoğunluğunda olacak biçimde ayarlanmış. Sonraki evrede polistren deney tüplerine (12x75 mm) 5 mL %0,25 glikoz içeren TSB besiyerinden ilave edilmiştir. Aynı deney tüplerine daha önceden yoğunluğu 0,5 McFarland bulanıklık derecesine ayarlanan karışımlardan 1/50 oranında olacak biçimde konulmuş ve tüplerin vortekslenmesi sağlanmıştır. Hazırlanan bakteri karışımlarından 150 μ l alınmış, 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plağı kuyularına 3' lü tekrar şeklinde konulmuş, 37 °C sıcaklıkta 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun sonunda sıvı besiyeri dökülmüş plaklar 3 defa nazik bir şekilde steril fosfat yıkanmış ve kurutma kâğıdı üzerine ters konularak kuruması sağlanmıştır. Kuyucularda oluşan biyofilm katmanının fiksasyonunu sağlamak için %99'luk metil alkol eklenerek 15 dk bekletilmiştir. Kuyucuklardan metil alkol boşaltılmış ve kuruması sağlanmıştır. Bir sonraki basamakta 150 μ L %0,1 kristal viyole eklenerek 15 dk 25 °C'de inkübasyona bırakılmış, biyofilm meydana getiren hücreler boyanmıştır. İnkübasyonun sonunda kuyucuklardaki boya, meydana gelen biyofilm katmanını zarara uğratmadan boşaltılıp, 3 defa distile suyla yıkanarak kurutma kâğıdı üzerine ters çevrilip

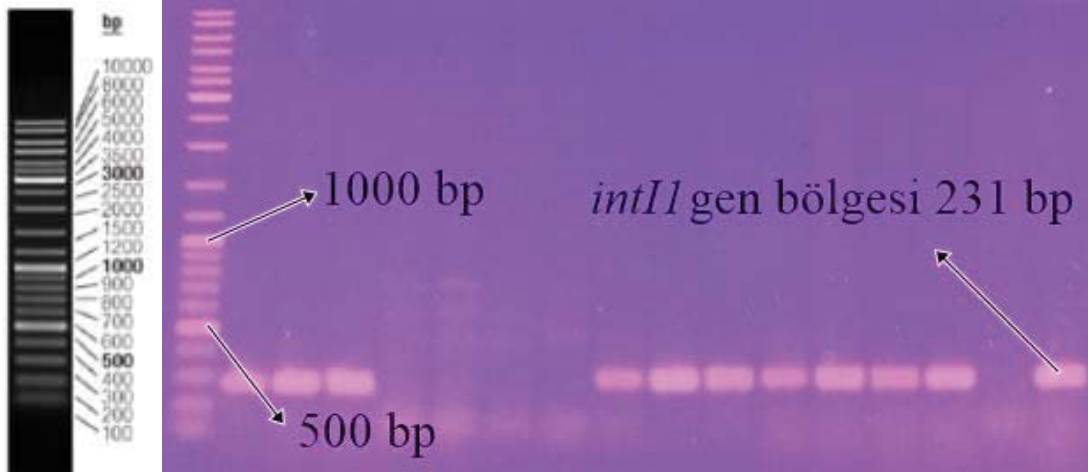
kuruması sağlanmıştır. Bir sonraki basamakta kuyucuklara 150 μ L etanol/aseton (80:20) eklenerek 15 dakika beklenmiş, boyanmış biyofilm katmanının çözünmesi sağlanmıştır Resim 4.3. Plakların her biri dalga boyu 570 nm olan mikropilaka ölçüm cihazında (Multiscan GO, Thermo Scientific) okutularak, elde edilen sonuçlara göre; 120 izolatın 58'sinde (%48,3) biyofilm oluşumu tespit edilmiştir Çizelge 4.5.



Resim 4.3. Biyofilm oluşumunun belirlendiği mikrotitrasyon plağı (Çalışmamızdan).

4.6. *intI1* Geninin PZR ile Belirlenmesi

intI1 geninin amplikasyon işleminin sonunda DNA bantlarının iyi bir şekilde görüntülenebilmesi amacıyla $MgCl_2$, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun olan konsantrasyonlar *intI-1* geni için PZR öğeleri hazırlanmıştır. Çalışmadaki bütün gen bölgelerine ait olan ampikonlardan 10 μ L ile 2 μ L 6X yükleme tamponuyla beraber %1'lik (w/v) agoroz jele yüklenmiş, 90 voltluk elektrik akımında 90 dk süreyle yürütülmüştür. Jel 5 μ g/mL etidyum bromürün içerisinde orbital karıştırıcı yardımıyla 50 rpm'de 30 dakika boyandıktan sonra, DNA bantlarının molekül büyüklüğü 100 bp DNA belirteciyle karşılaştırılıp UV transilluminatör ile görüntülenerek değerlendirilmiştir Resim 4.4. Yapılan değerlendirme sonucunda; 120 izolatın 70'inde (%58,3) *intI1* gen bölgesi varlığı tespit edilmiştir Çizelge 4.5

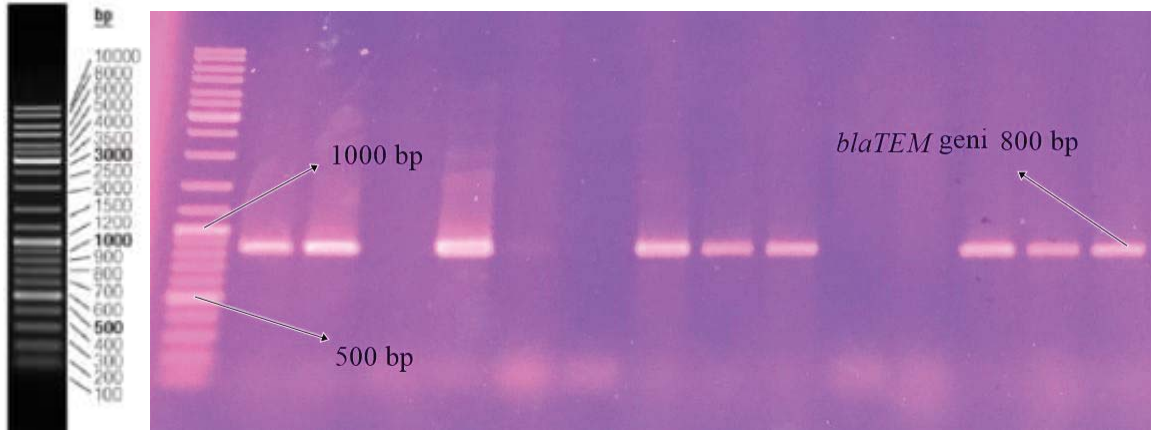


Resim 4.4. Klinik izolatlarda *intI1* gen bölgesinin elektroforez görüntüsü (Çalışmamızdan).

4.7. Beta Laktamaz Genlerinin PZR ile belirlenmesi

4.7.1. *bla_{TEM}* gen bölgesi PZR sonuçları

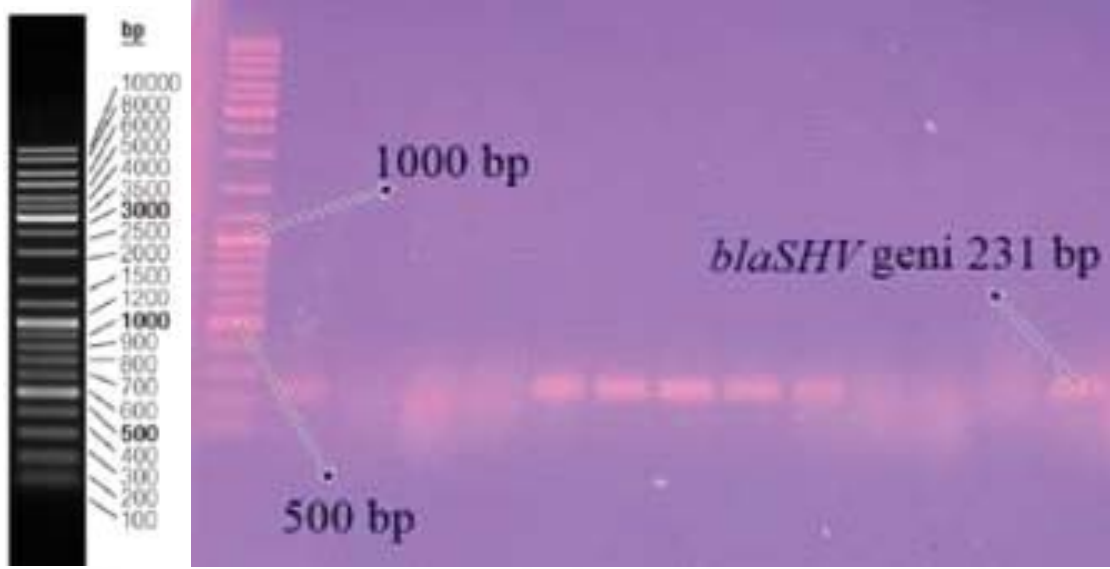
bla_{TEM} geninin amplikasyon işleminin sonunda DNA bantlarının iyi bir şekilde görüntülenebilmesi amacıyla $MgCl_2$, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun olan konsantrasyonlar *bla_{TEM}* geni için PZR öğeleri hazırlanmıştır. Çalışmadaki bütün gen bölgelerine ait olan ampikonlardan, 10 μ L ile 2 μ L 6X yükleme tamponuyla beraber %1'lik (w/v) agaroz jele yüklenmiş, 90 voltluk elektrik akımında 90 dk süreyle yürütülmüştür. Jel 5 μ g/mL etidyum bromürün içerisinde orbital karıştırıcı yardımıyla 50 rpm'de 30 dakika boyandıktan sonra, DNA bantlarının molekül büyüklüğü 100 bç DNA belirteciyle karşılaştırılıp UV transilluminatör ile görüntülenerek değerlendirilmiştir (Resim 4.5). Yapılan değerlendirme sonucunda; 120 izolatın 10'unda (%8,3) *bla_{TEM}* gen bölgesi varlığı tespit edildi Çizelge 4.5.



Resim 4.5. Klinik izolatlarda *bla_{TEM}* gen bölgesinin elektroforez görüntüsü (Çalışmamızdan).

4.7.2. *bla_{SHV}* gen bölgesi PZR sonuçları

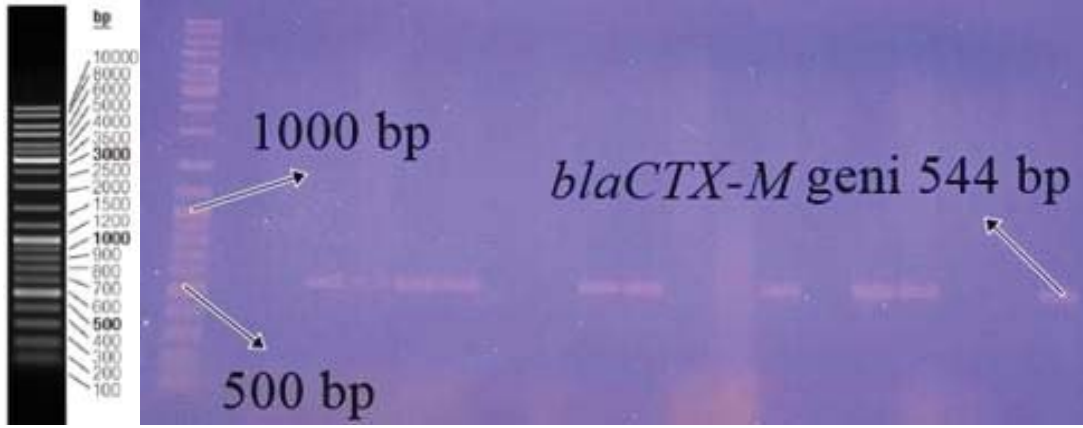
bla_{SHV} geninin amplikasyon işleminin sonunda DNA bantlarının iyi bir şekilde görüntülenebilmesi amacıyla $MgCl_2$, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun olan konsantrasyonlar *bla_{SHV}* geni için PZR öğeleri hazırlanmıştır. Çalışmadaki bütün gen bölgelerine ait olan ampikonlardan, 10 μ L ile 2 μ L 6X yükleme tamponuyla beraber %1'lik (w/v) agaroz jele yüklenmiş, 90 voltluk elektrik akımında 90 dk süreyle yürütülmüştür. Jel 5 μ g/mL etidyum bromürün içerisinde orbital karıştırıcı yardımıyla 50 rpm'de 30 dakika boyandıktan sonra, DNA bantlarının molekül büyüklüğü 100 bp DNA belirteciyle karşılaştırılıp UV transilluminatör ile görüntülenerek değerlendirilmiştir Resim 4.6. Yapılan değerlendirme sonucunda; 120 izolatın 42'sinde (%35) *bla_{SHV}* gen bölgesi varlığı tespit edildi Çizelge 4.5.



Resim 4.6. Klinik izolatlarda *bla_{SHV}* gen bölgesinin elektroforez görüntüsü (Çalışmamızdan).

4.7.3. *bla_{CTX-M}* gen bölgesi PZR sonuçları

bla_{CTX-M} geninin amplikasyon işleminin sonunda DNA bantlarının iyi bir şekilde görüntülenebilmesi amacıyla $MgCl_2$, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun olan konsantrasyonlar *bla_{CTX-M}* geni için PZR öğeleri hazırlanmıştır. Çalışmadaki bütün gen bölgelerine ait olan amplikonlardan, 10 μ L ile 2 μ L 6X yükleme tamponuyla beraber %1'lik (w/v) agaroz jele yüklenmiş, 90 voltluk elektrik akımında 90 dk süreyle yürütülmüştür. Jel 5 μ g/mL etidyum bromürün içerisinde orbital karıştırıcı yardımıyla 50 rpm'de 30 dakika boyandıktan sonra, DNA bantlarının molekül büyüklüğü 100 bç DNA belirteciyle karşılaştırılıp UV transilluminatör ile görüntülenerek değerlendirilmiştir. Resim 4.7. Yapılan değerlendirme sonucunda; 120 izolatın 23'ünde (%19,1) *bla_{CTX-M}* gen bölgesi varlığı tespit edildi Çizelge 4.5.

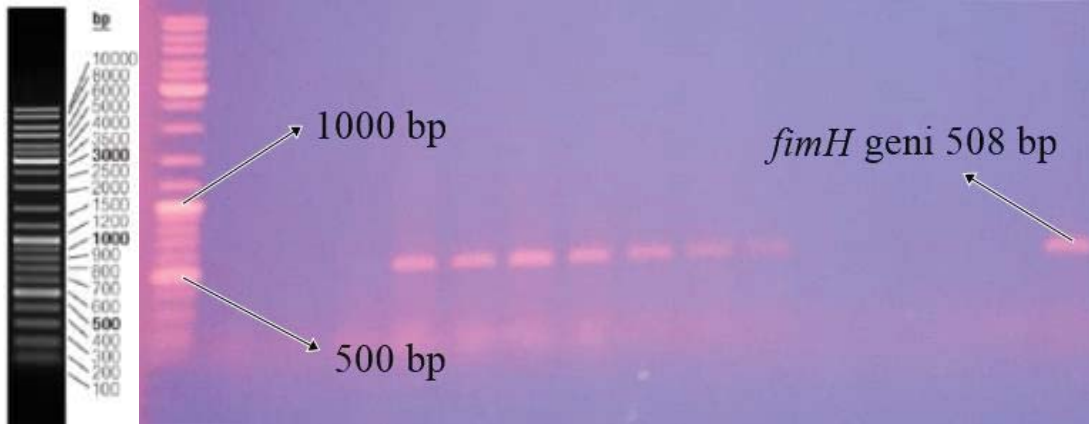


Resim 4.7. Klinik izolatlarda *bla_{CTX-M}* gen bölgesinin elektroforez görüntüsü (Çalışmamızdan).

4.8. Virülans Faktörlerin Belirlenmesi

4.8.1. PZR yöntemiyle *fimH* virülans faktör geninin belirlenmesi

fimH geninin amplikasyon işleminin sonunda DNA bantlarının iyi bir şekilde görüntülenebilmesi amacıyla $MgCl_2$, dNTP ve bağlanma sıcaklığı optimize edildikten sonra uygun olan konsantrasyonlar *fimH* geni için PZR öğeleri hazırlanmıştır. Çalışmadaki bütün gen bölgelerine ait olan ampikonlardan, 10 μ L ile 2 μ L 6X yükleme tamponuyla beraber %1'lik (w/v) agaroz jele yüklenmiş, 90 voltluk elektrik akımında 90 dk süreyle yürütülmüştür. Jel 5 μ g/mL etidyum bromürün içerisinde orbital karıştırıcı yardımıyla 50 rpm'de 30 dakika boyandıktan sonra, DNA bantlarının molekül büyüklüğü 100 bç DNA belirteciyle karşılaştırılıp UV transilluminatör ile görüntülenerek değerlendirilmiştir Resim 4.8. Yapılan değerlendirme sonucunda; 120 izolatın 27'sinde (%22,5) *fimH* gen bölgesi varlığı tespit edildi Çizelge 4.5.



Resim 4.8. Klinik izolatlarda *fimH* gen bölgesinin elektroforez görüntüsü (Çalışmamızdan).

Çizelge 4.5. Klinik izolatların cinsiyet, örnek, antibiyotik, GSBL, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *int1*, *fimH* ve biyofilm oluşum sonuçları.

No	Cinsiyet	Örnek	ATM	CAZ	C	FF	AMC	CN	IPM	MEM	NA	TPZ	TOB	LEV	GSBL	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>int1</i> -1	<i>fimH</i>	Biyofilm
1	Kadın	İdrar	S	R	S	R	R	R	S	S	I	R	S	I	+	-	-	-	+	-	-
2	Kadın	İdrar	R	R	R	S	I	S	S	S	R	S	S	R	-	-	-	-	+	-	+
3	Erkek	İdrar	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	-
4	Kadın	İdrar	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	-	-	+
5	Kadın	İdrar	S	S	S	I	S	S	S	S	I	S	S	I	-	-	-	-	-	-	+
6	Kadın	İdrar	S	S	I	I	S	S	S	S	I	S	S	I	-	-	-	-	-	-	+
7	Kadın	İdrar	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	-	-	+
8	Erkek	İdrar	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	+	-	+
9	Erkek	İdrar	R	R	S	I	R	S	I	S	I	I	R	R	+	-	-	+	+	+	-
10	Erkek	İdrar	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	+	+	+	+
11	Kadın	İdrar	S	R	S	R	R	S	S	S	I	R	S	I	+	-	-	-	+	-	-
12	Erkek	İdrar	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	I	+	-	-	+	+	-	-
13	Kadın	İdrar	R	R	S	R	R	R	S	S	I	S	S	I	-	-	-	-	+	-	+
14	Erkek	İdrar	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	R	S	+	-	-	-	+	-	+
15	Kadın	İdrar	R	R	S	I	R	S	S	S	S	I	S	S	-	-	-	-	-	-	-
16	Kadın	İdrar	R	R	R	S	R	S	S	S	R	S	R	R	+	-	-	-	+	+	-
17	Kadın	İdrar	S	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	-	-	+
18	Kadın	İdrar	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	+	-	+	+	+
19	Kadın	İdrar	S	S	S	I	R	R	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	+	-	-
20	Kadın	İdrar	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-	-	+
21	Kadın	İdrar	R	R	S	I	R	S	S	S	S	R	S	I	+	-	-	-	-	-	+
22	Kadın	İdrar	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
23	Erkek	İdrar	R	R	S	I	R	R	S	S	S	I	R	I	+	-	-	-	-	-	-
24	Kadın	İdrar	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	I	I	-	-	+	-	-	+	-
25	Erkek	İdrar	S	R	S	S	R	S	S	S	I	I	S	I	+	-	+	-	+	-	+
26	Kadın	İdrar	R	R	R	R	R	S	S	S	I	I	S	R	-	-	+	-	+	-	+
27	Kadın	İdrar	S	R	S	I	R	S	S	S	R	S	S	R	-	-	+	-	-	-	+
28	Kadın	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	+	-	-	-	+
29	Kadın	İdrar	S	S	S	I	S	R	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	+	-	-
30	Kadın	Balgam	S	R	S	I	R	S	S	S	I	I	S	I	-	-	-	-	-	-	-
31	Kadın	İdrar	S	S	S	S	R	S	S	S	S	I	S	I	-	-	-	-	-	-	+
32	Erkek	Kan	R	R	S	S	R	S	R	S	R	R	S	R	-	-	+	-	-	-	+
33	Kadın	İdrar	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	-	-	-
34	Erkek	İdrar	R	R	S	S	R	R	S	S	I	S	R	I	+	-	+	-	+	-	-
35	Kadın	İdrar	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	-	-	+	+	+	+	+
36	Kadın	İdrar	R	S	S	S	R	S	I	S	S	R	S	I	-	-	+	-	+	-	-
37	Kadın	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	+	-	-	-	-
38	Erkek	Balgam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	+	-	+	+	+
39	Kadın	İdrar	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	+	+	-	-	+
40	Kadın	Balgam	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	+	+
41	Kadın	İdrar	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	+	+	+	-	-

Çizelge 4.5 (devamı)

42	Kadın	İdrar	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	+	-	+	-	-	-	-
43	Kadın	İdrar	S	S	S	I	R	S	S	S	I	R	S	I	-	-	+	-	-	-	-
44	Kadın	İdrar	S	S	S	R	R	S	I	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-	-	-
45	Kadın	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	+	-	-	-	-
46	Erkek	Kateter	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	-	+	-	-	-
47	Kadın	İdrar	R	R	S	I	S	R	R	R	R	R	R	R	+	-	+	+	-	+	-
48	Kadın	İdrar	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	+	+	+	+	+
49	Erkek	Balgam	R	R	S	I	R	R	S	S	R	I	R	R	+	-	+	-	-	-	-
50	Erkek	İdrar	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	-	-	+	-	-	-	-
51	Kadın	İdrar	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	+
52	Kadın	İdrar	S	S	S	I	R	S	S	S	S	I	S	I	-	-	+	+	+	-	+
53	Erkek	İdrar	R	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R	R	-	-	-	-	-	-	-
54	Erkek	İdrar	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	+	-	+	-	-
55	Kadın	İdrar	R	R	R	S	I	S	S	S	R	S	S	I	+	-	-	+	+	-	-
56	Kadın	Balgam	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	+	-	+	+	-	+
57	Erkek	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	+
58	Erkek	İdrar	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	-	-	+
59	Erkek	İdrar	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	S	I	-	-	-	-	+	-	-
60	Kadın	İdrar	S	S	S	S	R	S	I	S	S	S	S	I	-	-	-	-	-	-	-
61	Erkek	İdrar	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	R	I	+	-	-	+	-	+	+
62	Erkek	İdrar	S	S	S	S	R	S	S	S	S	I	R	S	-	-	-	-	+	+	+
63	Erkek	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	-	+	-
64	Kadın	İdrar	R	R	R	I	S	S	S	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+	+	+
65	Kadın	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+	+	-
66	Kadın	Kan	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	+	-
67	Erkek	Balgam	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	+	-
68	Erkek	Balgam	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	+
69	Kadın	İdrar	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	+
70	Erkek	İdrar	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	+	-	+
71	Erkek	İdrar	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	+
72	Erkek	İdrar	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+	+	+
73	Kadın	İdrar	R	R	S	R	I	R	S	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+	-	+
74	Kadın	İdrar	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	-
75	Kadın	İdrar	R	R	R	S	R	S	I	R	R	R	R	I	R	-	-	-	-	-	+
76	Kadın	İdrar	R	R	I	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-
77	Erkek	İdrar	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	+	-	-	-	-	-	-
78	Erkek	İdrar	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	-
79	Kadın	İdrar	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	+
80	Erkek	İdrar	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	-
81	Erkek	İdrar	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	-
82	Erkek	İdrar	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	-
83	Kadın	İdrar	S	S	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	-	-	-	-	-	-	-
84	Kadın	İdrar	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	+	-	+
85	Erkek	İdrar	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	-
86	Kadın	İdrar	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	+

Çizelge 4.5 (devamı)

87	Kadın	İdrar	R	R	I	R	R	R	S	I	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	-
88	Erkek	İdrar	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	+	-	+	+	+	-	-
89	Erkek	İdrar	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	-	-	-	-	+	-	-
90	Kadın	İdrar	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	I	R	-	-	-	-	+	-	-
91	Kadın	İdrar	S	S	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	-	-	+	-	+	-	-
92	Kadın	İdrar	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	+	-	+	-	-
93	Kadın	İdrar	S	S	R	S	I	S	S	S	R	S	S	R	-	-	+	-	+	-	+
94	Erkek	İdrar	R	R	R	S	R	I	S	S	R	R	R	R	+	-	-	-	+	-	+
95	Erkek	İdrar	R	R	R	S	R	S	I	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	+	-
96	Erkek	İdrar	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	-	-	+	+	+	-	-
97	Kadın	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	+	-	-	-	+
98	Kadın	İdrar	I	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	+	-	+	-	+	+	+
99	Erkek	İdrar	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	+	+	-	+	-	+
100	Erkek	İdrar	R	R	R	I	R	I	S	I	R	R	R	R	+	+	+	-	+	+	+
101	Kadın	İdrar	R	R	S	R	R	R	I	R	R	R	R	R	-	-	-	-	+	-	-
102	Kadın	İdrar	R	R	I	R	R	R	I	R	R	R	R	R	-	+	+	-	+	+	+
103	Kadın	İdrar	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	I	+	-	-	-	-	-	+
104	Kadın	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	+	-	+	-	-	-	-
105	Kadın	İdrar	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	-
106	Kadın	İdrar	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	-	+	+	+	-	-	+
107	Kadın	İdrar	R	R	S	I	R	R	S	R	R	R	R	R	-	+	+	+	+	+	+
108	Kadın	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	S	I	-	-	+	+	-	-	+
109	Kadın	İdrar	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	+	-	-	-	-
110	Kadın	İdrar	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	-	+	-	+	+	-	-
111	Erkek	İdrar	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	-	+	-	+	+	+	+
112	Erkek	İdrar	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	-	+	-	+	+	+	+
113	Kadın	İdrar	R	R	R	I	R	R	S	I	R	R	R	R	-	-	-	+	+	-	+
114	Kadın	İdrar	R	R	S	I	S	S	S	S	R	S	S	I	-	-	-	-	+	-	-
115	Kadın	İdrar	R	R	S	S	I	S	S	S	S	S	S	I	+	-	-	-	+	+	-
116	Kadın	İdrar	S	S	S	I	R	I	I	I	S	R	S	I	-	-	-	-	-	-	-
117	Erkek	İdrar	S	S	I	I	S	S	S	S	S	S	S	I	-	-	-	-	-	-	+
118	Kadın	İdrar	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	-	-	-	-	+	-	+
119	Kadın	İdrar	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	I	-	-	-	-	-	-	-
120	Kadın	İdrar	R	R	R	S	R	S	S	I	R	R	S	R	+	-	+	-	+	-	-
Toplam	120	120	69	72	48	71	83	47	43	47	68	65	53	107	28	10	42	23	70	27	58
(%)	-	-	%57,5	%60	%40	%59	%69,1	%39,1	%35,8	%39,1	%56,6	%54,1	%44,1	%89,1	%23,3	%8,3	%35	%19,1	%58,3	%22,5	%48,3

4. TARTIŞMA

Doğada yaygın olarak bulunabilen *K. pneumoniae* suşları toplum kökenli enfeksiyonların yanı sıra pek çok hastane kökenli enfeksiyonun etkenidir. Fırsatçı patojen olan *K. pneumoniae* suşları özellikle hastaneye yatırılan ve şeker hastalığı ya da kronik obstrüktif akciğer rahatsızlığı gibi ciddi altta yatan hastalıklardan şikayetçi bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde enfeksiyona sebep olur (Podschun ve Ullmann, 1998). *K. pneumoniae* suşlarının neden olduğu enfeksiyonlar, bu mikroorganizmanın farklı virülans faktörleri üretme ve antibiyotik direnci geliştirme konusundaki büyük yeteneği nedeniyle dünya çapında insan sağlığı için ciddi tehdit oluşturmaktadır (Delarampour, Ghalehnoo, Khademi ve Vaez, 2020). Bu nedenle çalışmamızda, klinik *K. pneumoniae* izolatları arasında antibiyotik direnç paternlerinin, sınıf I integronların ve virülans faktörlerinin prevalansının araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda kullanılan karbapenemler, GSBL üreticilerinin sebep olduğu ciddi enfeksiyonlarda reçete edilen ilaçlar olarak kabul edilmektedir (Aktaş ve diğerleri, 2012). Fakat karbapenem grubu antibiyotiklerin sık kullanılması sonucu imipenem ve meropenem gibi karbapenemlere dirençli olan Enterobacteriaceae'lerin hızla ortaya çıkması ve yaygınlaşması, klinik hasta bakımı ve halk sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmuştur (Stuart ve Leverstein-Van Hall, 2010). Karbapenemaz oluşturan *K. pneumoniae*'nin neden olduğu enfeksiyonların tedavisiye oldukça zordur, çünkü izolatların çoğu tüm β -laktam antibiyotiklerine, florokinolonlara ve aminoglikozitlere dirençlidir (Bratu ve diğerleri, 2005). Karbapenemaz oluşturan *K. pneumoniae* izolatlarının güç eradike edilmeleri ve mobil genetik elementler yoluyla hızla yayıldıkları belirtilmektedir (Gür ve diğerleri, 2008). Bu sebeple, bu enzimleri oluşturan izolatların erken tespiti karbapenemaz oluşturan mikroorganizmaların yayılmasının önlenmesinde fayda gösterecektir (Yiş, Bayram ve Ergin, 2020).

K. pneumoniae'de karbapenem direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda; Yiş ve diğerleri, meropenem direncini %40, imipenem direncini %22 oranında tespit etmişlerdir (Yiş, Bayram ve Ergin, 2020). Tekintaş ve diğerleriye meropenem direncini %74, imipenem direncini %88 oranında tespit etmiştir (Tekintaş ve diğerleri, 2017). Bizim çalışmamızdaysa izolatların meropenem direncinin %39, imipenem direncinin ise %35

olduğu görülmektedir. Öte yandan Korten ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmadaysa meropenem direncini %1, imipenem direncini %3 şeklinde tespit etmişlerdir (Korten, Ulusoy, Zarakolu, Mete ve Turkish MYSTIC Study Group, 2007). Ayrıca Bektaş ve diğerlerinin yaptığı bir çalışmadaysa *K. pneumoniae* izolatlarında meropenem ve imipeneme karşı direnç tespit edilememiştir (Bektaş ve diğerleri, 2018).

Geniş spektrumlu üçüncü nesil sefalosporinlerin 1980'lerin başlarında klinik olarak kullanılan antibiyotikler arasına girmesi, antibiyotiklere karşı β laktamaz aracılı bakteriyel dirençle mücadelede büyük bir atılım olarak müjdelendi. Bu sefalosporinler, bazı organizmalarda β -laktamazların artan prevalansına (örneğin, *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de ampisilin hidrolize edici TEM-1 ve SHV-1 β -laktamazlar) ve bu β -laktamazların yeni konakçılara yayılmasına (örneğin, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*) yanıt olarak gelişmiştir. Üçüncü kuşak sefalosporinler çoğu β -laktamaz üreten organizmaya karşı etkili olmanın yanı sıra, aminoglikozidler ve polimiksinlere kıyasla daha az nefrotoksik etki sağlama avantajına da sahipti (Paterson ve Bonomo, 2005). Öte yandan Gram negatif mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde geniş spektrumlu sefalosporinlerin aşırı kullanımı sonucunda ortaya çıkan antibiyotik direnci büyük bir problem şeklinde karşımıza çıkmıştır. Ayrıca Enterobacteriaceae familyasındaki birçok türün de GSBL oluşturduğu bilinmektedir. Bu direncin meydana gelmesinde ise plazmidlerle kodlanan GSBL ile kromozom kökenli tip 1 β -laktamaz direncinin rolü büyüktür. Özellikle çoklu direnç gösteren bu mikroorganizmalar ikinci ve üçüncü kuşak sefalosporinleri sıklıkla kullanan hastanelerde hızlıca yayılma yönelimindedirler (Yetkin, Kuzucu, Çalışkan ve Ay, 2006).

K. pneumoniae'da seftazidim direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda; Kahraman ve diğerleri %61 oranında, Moghadas ve diğerleri %42 oranında, Eghbalpoor ve diğerleri %65 oranında, Demirdöğen ve diğerleri %74 oranında seftazidim direnci tespit etmişlerdir (Demirdöğen, Şihça, Dığrak, 2012; Kahraman ve diğerleri, 2017; Moghadas, Kalantari, Sarfi, Shalhoseini ve Mirkalantari, 2018; Eghbalpoor, Habibi, Azizi, Asadi-Karam ve Bouzari, 2019). Bizim çalışmamızda da izolatların seftazidim direncinin %60 olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan fenikol grubu bir antibiyotik olan kloramfenikol, peptit bağlarının oluşumu için gerekli olan ribozom üzerindeki bağlanma yerleri için mesajcı RNA ile rekabet ederek duyarlı organizmalarda protein sentezinin inhibasyonuna sebep olur. Kloramfenikol, 70S ribozomun 50S alt birimine geri dönüşümlü şekilde bağlanır ve aminoasil-tRNA'nın amino asit içeren ucunun bağlanma bölgesine bağlanmasını önler, böylece peptidil transferazı inhibe eder. Bu etki mekanizması genellikle bakteriyostatiktir (Balbi, 2004).

K. pneumoniae'da kloramfenikol direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda; Karbasizaed ve diğerleri %30 oranında, Manchanda ve diğerleri %49 oranında, Demirdöğen ve diğerleri %43,4 oranında kloramfenikol direnci tespit etmişleridir (Karbasizaed, Badami ve Emtiazi, 2003; Manchanda, Singh, Goyal, Kumar, ve Thukral, 2005; Demirdöğen ve diğerleri, 2012). Bizim çalışmamızdaysa izolatların kloramfenikol direncine bakıldığında %40 oranında olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan bir diğer antibiyotik grubu olan florokinolonlar hem toplum hem de hastane kaynaklı bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek için kullanılan başlıca antibiyotiklerdir. Bu ilaçlar Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmalara karşı geniş antibakteriyel spektruma, yüksek hücre içi ve doku penetrasyonuna sahiptir, birkaç yan etki ve mükemmel bir oral biyoyararlanım ile duyarlı bakterilere karşı oldukça bakterisidaldır (De Lastours ve Fantin, 2015). Bu özelliklerinin bir sonucu olarak florokinolonlar, dünya çapında en fazla reçete edilen 4. antibiyotiktir ve 2000 yılından 2010'a kadar tüketim oranı %64 artış göstermiştir, fakat son zamanlarda, klinik izolatlarda florokinolonlara karşı bakteriyel direnç artmıştır (Van Boeckel ve diğerleri, 2014; Geetha, Aishwarya, Marippan ve Sekar, 2020).

K. pneumoniae'da levofloksasin direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda; Ruh ve diğerleri %16,8 oranında, Moghadas ve diğerleri %17,3 oranında, Behçet ve diğerleri %36 oranında, Köse ve diğerleri %49 oranında levofloksosin direnci tespit etmişlerdir (Ruh, Gazi, Güvenir, Süer ve Çakır, 2016; Moghadas ve diğerleri, 2018; Behçet, Avcıoğlu, Özşarı, Tuncer ve Kurtoglu, 2020; Köse, Çalışkan, Memiş, Dönmez ve Duran, 2021). Bizim çalışmamızdaysa izolatların levofloksosin direncinin %89 olduğu görülmektedir.

Çalışmamızda kullanılan β -laktam grubu bir antibiyotik olan aztreonam, monobaktam sınıfının klinik olarak mevcut tek üyesidir. Gram negatif mikroorganizmalara karşı klinik olarak yararlı bir potansiyele sahiptir, fakat Gram pozitif ve anaerobik bakterilere karşı hiçbir aktivitesi yoktur. Aztreonama karşı mikroorganizmalarda görülen en ciddi direnç mekanizması betalaktamaz aktivitesine bağlı enzimatik inaktivasyondur. Ayrıca, penisilin bağlayan protein 3'deki modifikasyon ve bazı *P. aureginosa* suşlarında meydana gelen dış membran geçirgenliğinin azalışı da aztreonama karşı görülen diğer direnç mekanizmalarıdır (Rifaioğlu ve diğerleri, 2009; Ramsey ve MacGowan, 2016).

K. pneumoniae'da aztreonam direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda; Bektaş ve diğerleri, %94 oranında, Parlak ve diğerleri %72 oranında direnç tespit ederken; Balıkcı ve Keskin %26 oranında, Moghadas ve diğerleri, %39 oranında direnç tespit etmişlerdir (Balıkcı ve Keskin, 2011; Parlak, Çıkman, Bektaş ve Berktaş, 2012; Bektaş ve diğerleri, 2018; Moghadas ve diğerleri, 2018). Bizim çalışmamızdaysa izolatların aztreonam direnç oranı %57,5 şeklinde tespit edilmiştir.

Çalışmamızdaki bir başka antibiyotik olan fosfomisin, öncelikle bakteriyel hücre çeperinin (peptidoglikan) sentezlenmesini engelleyerek etki gösteren bakterisidal bir fosfonik asit türevidir. Çok sayıda patojenik ve fırsatçı Gram-pozitif (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*) ile Gram-negatif (*E. coli*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Enterobacter spp*) bakteriye karşı iyi antibakteriyel aktiviteye sahiptir. Literatürdeki direnç oranları ve aktarılabılır direnç mekanizmalarından dolayı fosfomisin yakından takip edilmesi gereken bir antibiyotiktir (Patel, Balfour ve Bryson, 1997; Hazırolan, 2020).

K. pneumoniae'de fosfomisin direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda; Kürklü ve diğerleri hiç direnç tespit edemezken, Aşgın ve diğerleri %17, Temoçin ve Köse %23,1, Doğanay ve diğerleri, %47, Akpınar ve diğerleriyse %75 oranında direnç tespit etmişlerdir (Aşgın, Eroğlu ve Çakmaklıoğulları, 2018; Temoçin ve Köse, 2018; Akpınar, Kancak ve Aksaray, 2021; Kürklü-Bozkır, Çelik ve Sönmez-Yıldırım, 2021; Doğanay, Aydın ve Avşar, 2023). Bizim çalışmamızdaysa izolatların fosfomisin direnç oranı %59,1 şeklinde tespit edilmiştir.

Çalışmamızdaki bir başka antibiyotik grubu olan aminoglikozidler, bakterisidal etkilerinin hızlı olması, klinik etkilerinin iyi olması, tedavi esnasında direnç gelişim oranının nadir

görülmesi, maliyetlerinin düşük ve kullanımlarının kolay olması gibi nedenlerden dolayı sıklıkla kullanılan önemli bir antibiyotik sınıfıdır. Gram negatif ya da fakültatif aneorop mikroorganizmalara karşı bakterisidal etki gösterir. (Mıstık, 2000).

Aminoglikozitlere karşı bazı türlerde, hücre içi ilaç konsantrasyonu azaltılarak geniş spektrumlu ve düşük seviyeli direnç elde edilebilir. Bununla birlikte, ilacın veya ribozomun modifikasyonu ile ilacın hedefi olan bakteriyel ribozoma afinitesinin azalması, aminoglikozid direncinin ana nedenidir ve bu mekanizmalar arasında ilacın enzimatik inaktivasyonu, klinik olarak açık ara en önemli olanıdır (Magnet ve Blanchard 2005).

K. pneumoniae'de gentamisin direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda; Eghbalpoor ve diğerleri %75,7, Aşgın ve diğerleri %4, Demirdöğen ve diğerleri %67,65, Kahraman ve diğerleri %37, Yiş ve diğerleri %49, Duran ve diğerleri %39,2, Temoçin ve Köse %10,2 oranında direnç tespit etmişlerken, bizim çalışmamızdaki gentamisin direnç oranı %39,1 şeklinde bulunmuştur (Kahraman ve diğerleri, 2017; Aşgın ve diğerleri, 2018; Demirdöğen ve diğerleri, 2018; Temoçin ve Köse, 2018; Eghbalpoor ve diğerleri, 2019; Duran ve diğerleri, 2020; Yiş ve diğerleri, 2020). *K. pneumoniae*'de tobramisin direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda ise; Eghbalpoor ve diğerleri %75,7, Adam ve diğerleri %69, Türkmen ise %16,7 oranında direnç tespit ederken, bizim çalışmamızda tobramisin direnci %44,1 şeklinde tespit edilmiştir (Adam ve diğerleri, 2000; Türkmen, 2002; Eghbalpoor ve diğerleri, 2019).

Çalışmamızda kullandığımız bir başka antibiyotik grubu olan β -laktamaz inhibitörleri, güçsüz antibakteriyel aktivitelerine rağmen, özellikle Ambler sınıf A β -laktamazları etkisizleştiren antimikrobiyal ajanlarla kombine edilip, bu antimikrobiyal ajanların parçalanmasını engeller. Klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam klinikte kullanılan β -laktamaz inhibitörlerdir. Bu üç β -laktamaz inhibitörü, β -laktam grubu antibiyotiklerle belli bir oranda kombine edilirler. Ampisilin-sulbaktam, sefoperazon-sulbaktam, amoksasilin-klavulanat ve piperasilin-tazobaktam bu kombinasyonlar arasındadır (Sili ve Mert, 2010).

K. pneumoniae'de amoksasilin klavulanat direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda; Aşgın ve diğerleri %33, Duran ve diğerleri % 64,7, Moghadas ve diğerleri %30, Kahraman ve diğerleri %63, Parlak ve diğerleri %73, Türkmen %83,3 şeklinde direnç tespit ederken, Yiş

ve diğerleri %4, Balıkçı ve Keskin %7 şeklinde direnç tespit etmişlerdir (Türkmen 2002; Balıkçı ve Keskin, 2011; Parlak ve diğerleri, 2012; Kahraman ve diğerleri, 2017; Aşgın ve diğerleri, 2018; Moghadas ve diğerleri, 2018; Duran, Çeken ve Atik, 2020; Yiş, Bayram ve Ergin, 2020). Bizim çalışmamızdaki amoksisilin klavulanat direnci %69,1 şeklinde tespit edilmiştir.

K. pneumoniae'de piperasilin tazobaktam direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda; Kahraman ve diğerleri %53, Duran, Çeken ve Atik %49,7, şeklinde direnç tespit ederken Temoçin ve Köse %14,7, Yiş, Bayram ve Ergin %12 şeklinde direnç tespit etmişlerdir (Kahraman ve diğerleri, 2017; Temoçin ve Köse, 2018; Duran ve diğerleri, 2020; Yiş, Bayram ve Ergin, 2020). Bizim çalışmamızdaki piperasilin tazobaktam direnci %54,1 şeklinde tespit edilmiştir.

Çalışmamızda kullanılan bir başka antibiyotik grubu olan kinolonlar, geniş spektrumlu, dokulara dağılımı ve oral biyoyararlanımı fazla olan bakterisidal sentetik antimikrobiyal bileşiklerdir. Sıklıkla Gram negatif mikroorganizmaları etkilerler, bazılarıysa kısmen Gram pozitif mikroorganizmalar üzerinde etkilidirler (Ödemiş, 2023: 107). Kullanılmış birinci kinolon, nalidiksik asittir (Ödemiş, 2023: 114). Kinolonların yaygın kullanımı sebebiyle kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç oranı da hızla artış göstermiştir (Çoban ve diğerleri, 2012). Kinolonlara karşı bakteriyel direnç temel olarak iki ana mekanizma yoluyla gelişmektedir. Bunlardan biri ilacın intrabakteriyel konsantrasyonunda azalma diğeryse ilacın hedef enzimde meydana gelen değişikliklerdir (Van Bambeke, Michot, Van Eldere ve Tulkens, 2005).

K. pneumoniae'de nalidiksik asit direnciyle ilgili yapılan çalışmalarda 2011 yılında Tel, hiç direnç tespit edemezken, 2019 yılında, Eghbalpoor ve diğerleri %75 oranında direnç tespit etmişlerdir (Tel, 2011; Eghbalpoor ve diğerleri, 2019). Bizim çalışmamızda ise nalidiksik asit direnci %56,6 şeklinde tespit edilmiştir.

Çalışmamızda 12 antibiyotiğe karşı yapılan disk difüzyon testindeki direnç oranlarının, literatürdeki çalışmalarla karşılaştırılması yapıldığında, benzer ve farklı oranlar karşımıza çıkmıştır. Direnç oranlarında meydana gelen artışın sebebini, yıllar içerisinde antibiyotiklerin aşırı kullanımına bağlamaktayız. Bunun yanı sıra; hastane ortamında

genişlemiş spektrumlu sefalosporinlerin aşırı kullanımının sefalosporin direncini arttırdığını, kinolonlar arasındaki çapraz dirençten dolayı levoflaksosin direnç oranlarının yüksek seviyede olduğunu, aminoglikozitlerin kullanımına bağlı olarak, aminoglikozitleri modifiye edici enzimleri bulunduran suşların seçiliminin, aminoglikozit direncini arttırdığını ve oral yoldan alınması nedeniyle ampirik tedavide seçilmesinin amoksasiilin klavulanat direnç oranlarını arttırdığını düşünmekteyiz. Ayrıca veriler arasında yorumlama yapılırken farklılıkların nedeninin bölgelere göre antibiyotiklerin kullanımının ve çalışılan izolat sayısının farklılığından kaynaklanabileceğini de unutmamak gerekir (Leblebicioğlu, 1998; Bradford, 2001; Taşbakan, Pullukçu, Yamazhan, Arda ve Ulusoy, 2004; Çelikkalek, Gözalan, Kırca ve Açıkgöz, 2014).

Çalışmamızdaki antibiyotiklerin yanı sıra, son 20 yılda, β -laktamazların hidrolitik etkisine dirençli olacak şekilde özel olarak tasarlanan pek çok yeni β -laktam antibiyotik meydana getirilmiştir. Bununla birlikte, hastaları tedavi etmek için kullanılan her yeni sınıfla, bu ilaç sınıfına direnç gösteren yeni β -laktamazlar ortaya çıkmıştır. Muhtemelen, hastaların tedavisinde yeni antibiyotiklerin kullanımının ve aşırı kullanımının seçici baskısı, β -laktamazların yeni varyantlarını seçmiştir. Bu yeni sınıflardan birisi de, 1980'lerde Gram-negatif bakterilere bağlı ciddi enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan oksiminino-sefalosporinlerdi. Şaşırtıcı olmayan bir şekilde, β -laktamazlara bağlı bu genişlemiş spektrumlu β -laktam antibiyotiklere direnç hızla ortaya çıkmıştır. Özellikle oksiminino-sefalosporinlere karşı artan aktivite spektrumları nedeniyle, bu enzimlere genişletilmiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) adı verildi. Bugün, 150'den fazla farklı GSBL tanımlanmıştır. Bu GSBL'ler dünya çapında birçok farklı Enterobacteriaceae ve *P. aeruginosa* cinsinde bulunmuştur (Bradford, 2001). Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençleri nedeniyle GSBL bulunduran suşların tedavi sırasında meydana getirdikleri, problemler önemlidir (Akyar ve diğerleri, 2010). Bu sebeple hastanelerde GSBL taşıyan mikroorganizmaların yoğunluğunun sistemli şekilde takip edilmesi ve yayılışlarının engellenmesi gereklidir (Baykal, Çöplü, Şimşek, Esen ve Gür, 2012).

K. pneumoniae GSBL direnciyle ilgili yapılan çalışmalar da; Parlak ve diğerleri %67 oranında, Baykal ve diğerleri %61,4 oranında, Uyanık ve diğerleri %44 oranında, Eghbalpoor ve diğerleri %34,3 oranında, Balıkcı ve Keskin %29,7 oranında GSBL pozitifliği tespit etmişlerdir (Uyanık, Hancı, Yazgı ve Karamişe, 2010; Balıkcı ve Keskin,

2011; Baykal ve diğerleri, 2012; Parlak ve diğerleri, 2012; Eghbalpoor ve diğerleri, 2019). Bizim çalışmamızdaki izolatların GSBL pozitifliği ise %23,3 şeklinde tespit edilmiştir. Yapılan çalışmalardaki GSBL üretiminin prevalansının farklı olmasını epidemiyolojik etmenlere, enfeksiyon kontrol tedbirlerine ve antibiyotiklerin kullanım politikalarına bağlamaktayız (Koçoğlu, Karabay, İnce, Özkardeş ve Yıldırım, 2007).

Laboratuvarlarda GSBL üreten bakterilerin saptanması, hastaların uygun şekilde yönetilmesi için çok önemli bir adımdır. GSBL'lerin tespit edilmesi için metotlar genel olarak iki sınıfa ayrılabilir: GSBL enzimlerinin farklı sefalosporinleri hidrolize etme yeteneğini tespit eden moleküler olmayan teknikleri kullanan fenotipik yöntemler ve GSBL'nin üretiminden sorumlu geni tespit etmek için moleküler teknikler kullanan genotipik yöntemler. Klinik tanı laboratuvarları çoğunlukla fenotipik yöntemler kullanır, çünkü bu testlerin yapılması kolaydır, uygun maliyetlidir ve çoğu otomatik duyarlılık sistemine dahil edilmiştir ve bu da onları yaygın olarak erişilebilir hale getirir. Bununla birlikte, fenotipik yöntemler GSBL üretiminden sorumlu (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* ve *bla_{CTX-M}* vs) spesifik enzimler arasında ayrım yapamaz. Bu yüzden GSBL enzim tiplerinin tanısında moleküler yöntemlerin kullanılması gereklidir. Bu enzimlerin genotipik olarak tanımlanması, enfeksiyon önleme ve kontrol çabalarının yanı sıra bu organizmaların süveyans sistemlerinde izlenmesi için gerekli bilgileri sağlar (Pitout ve Laupland, 2008).

Gram-negatif bakteriler, yaygın plazmid aracılı β -laktamazların substrat spektrumunu değiştirerek ve direnci teşvik eden kromozomal β -laktamaz genlerini plazmitlere mobilize ederek, yeni konakçılara yayılmalarına izin verip geniş spektrumlu β -laktam antibiyotiklere adapte olmuşlardır. Şu anda en yaygın yeni β -laktamazlar TEM, SHV ve CTX-M ailelerindeki GSBL'lerdir. Bu enzimler seftazidime, sefotaksim, seftriakson, aztreonam ile diğer oksimino- β -laktamlara karşı direnç sağlar ve diğer birçok Gram-negatif patojende de tespit edilmiş olmalarına rağmen en sık olarak *E. coli*'de ve *Klebsiella* türlerinde bulunur (Jacoby ve Munoz-Price, 2005).

K. pneumoniae'de *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* ve *bla_{CTX-M}* genlerinin tespitine ilişkin yapılan çalışmalarda *bla_{TEM}* ve *bla_{SHV}* geni sıklığı Esen ve diğerleri tarafından %69,8 ve %59 oranlarında, Öksüz ve Gürler tarafından %64,3 ve %92,9 oranlarında, Moosavian ve Deiham, tarafından %77 ve %51,5 oranlarında, Moghadas ve diğerleri tarafından %33,5 ve

%46,8 oranlarında, Ghafourian ve diğerleri tarafından %16 ve %94 oranlarında tespit edilmiştir (Esen, Eroğlu, Sünbül ve Leblebicioğlu, 2001; Öksüz ve Gürler, 2009; Ghafourian ve diğerleri, 2011; Moosavian ve Deiham, 2012; Moghadas ve diğerleri, 2018). Bizim çalışmamızdaysa izolatların *bla_{TEM}* ve *bla_{SHV}* geni oranları %8,3 ve %35 şeklinde tespit edilmiştir. *K. pneumoniae*'de *bla_{CTX-M}* geni sıklığı ise Öksüz ve Gürler tarafından %64,3 oranında, Gelmez-Altınkanat ve diğerleri tarafından %58,3 oranında, Deniz ve diğerleri tarafından %7,7 oranında, Ghafourian ve diğerleri tarafından %23,9 oranında tespit edilmiştir (Öksüz ve Gürler, 2009; Ghafourian ve diğerleri, 2011; Deniz, Büyük ve Murat, 2021; Gelmez-Altınkanat, Hasdemir ve Söyletir, 2021). Bizim çalışmamızdaysa izolatların *bla_{CTX-M}* geni oranı %19,1 şeklinde tespit edilmiştir. Çalışmamızdaki GSBL genlerinin oranlarının diğer çalışmalarla farklılık göstermesinin sebeplerini, antimikrobiyal ajanların kullanım biçimine, miktarının farklı olmasına ve izolatların toplanış zamanlarının farklı olmasına bağlamaktayız (Al-Agamy ve diğerleri, 2009).

Çalışmamızda araştırdığımız değişkenlerden bir başkası olan integronlar, mikrobiyal popülasyonlar içerisinde antimikrobiyal direnç genlerinin yayılmasında önemli bir rol oynamaktadır (Odumosu, Adeniyi ve Chandra, 2013). Bir integron, integras kodlayan *intI* geni, bir kaset promotörü (*P_c*) ve bir birincil rekombinasyon bölgesi (*attI*) olmak üzere 3 temel bileşenden meydana gelir. Kodlanmış integrallerin sırasına göre günümüze kadar beş farklı mobil integron sınıfı tespit edilmiştir (Cambray ve diğerleri, 2010). Bu integron sınıflarından biri olan sınıf 1 integronlar, klinik suşlarda sıklıkla bulunur ve bilinen antibiyotik direnç gen kasetlerinin çoğunluğu bu sınıfın içerisinde (Mazel, 2006). *K. pneumoniae* popülasyonundaki integron gen kasetlerindeki değişikliklerin izlenmesi, hastanelerde antibiyotik direnç faktörlerinin yayılmasını önleyebilir. Bu elementlerin periyodik olarak izlenmesi ve tanımlanması, hastalık yükünü azaltmaya, maliyetleri düşürmeye ve hastanede kalış sürelerini kısaltmaya yardımcı olabilir (Asghari, Goodarzi, Mohammadi, Nouri ve Taheri, 2021).

K. pneumoniae'de *intI1* geni sıklığıyla ilgili yapılan çalışmalarda; Asghari ve diğerleri, %81,6 oranında, Delarampour ve diğerleri, %45,8 oranında, Mokhtari ve diğerleri ise %90 oranında *intI1* geni sıklığı bildirmişlerdir (Mokhtari, Eslami, Zandi, Dehghan-Banadkouki ve Vakili, 2018; Delarampour, Ghalehnoo, Khademi ve Vaez, 2020; Asghari ve diğerleri, 2021). Bizim çalışmamızdaysa *intI1* geni sıklığı %58,3 şeklinde tespit edilmiştir. *IntI1* gen

kaset frekansı hakkında yapılan literatür taramasına ve sonuçlarımıza bakıldığında *int11* gen kaset oranlarının yüksek olmasının sebebinin, gereksiz antibiyotik reçetesinin sonucu olduğunu düşünmekteyiz (Mokhtari ve diğerleri, 2018).

Çalışmamızda araştırdığımız bir başka değişken ise biyofilm oluşumudur. Biyofilm yapısı, hücre dışında bir polimerik madde matrisinin içine alınan, zeminle ilişkili mikrobiyal hücrelerin bir birleşimidir (Donlan, 2002). Klinik olarak en önemli *K. pneumoniae* biyofilmleri, kateterlerin ve diğer kalıcı cihazlarının iç yüzeylerinde oluşanlardır (Piperaki ve diğerleri, 2017). *K. pneumoniae* biyofilmleri, solunum, gastrointestinal ve idrar yollarında kolonizasyona ve özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda invaziv enfeksiyonların gelişmesine yol açabilir (Wang, G., Zhao, Chao, Xie ve Wang, H. 2020). Biyofilm büyüme modu, bakterilerinin konak savunmasından korunmasında önemli bir rol oynar ayrıca bakterileri antibiyotik tedavisine karşı 1000 kat daha dirençli hale getirir (Fux, Costerton, Stewart, ve Stoodley, 2005; Vuotto, Longo, Balice, Donelli ve Varaldo, 2014). Günümüzde de antibiyotik tedavisinde, ilacın dozu tespit edilirken biyofilm yapısı ihmal edilip, planktonik mikroorganizmalara göre düzenleme yapılmaktadır. Bu nedenle birçok hastalığının tedavisinde etken tümüyle yok edilememekte ve hastalık devam etmektedir. Bütün bu problemlerin yok edilmesi veya azalması için biyofilmin yapısıyla, moleküler mekanizmalarının her yönden anlaşılması gerekmektedir (Dıanı ve diğerleri, 2015).

K. pneumoniae'de biyofilm oluşumuyla ilgili yapılan çalışmalarda Kuş ve diğerleri %81,1 oranında, El Fertas-Aissani ve diğerleri %88,8 oranında, Nirwati ve diğerleri %85,63 oranında, Kelishomi ve diğerleri %100 oranında, biyofilm oluşumu tespit etmişlerdir (El Fertas-Aissani, Messai, Alouache ve Bakour, 2013; Kuş, Arslan, Dağı ve Fındık, 2017; Nirwati ve diğerleri, 2019; Kelishomi ve diğerleri, 2022). Bizim çalışmamızda biyofilm oluşumu %48,3 şeklinde tespit edilmiştir. Değişen biyofilm oranlarının, coğrafi alan ve örneklem büyüklüğündeki farklılıklardan kaynaklanıyor olabileceğini düşünmekteyiz (Seifi, 2016).

Son olarak çalışmamızda Tip 1 fimbriaları kodlayan *fimH* gen bölgesine bakılmıştır. Bu fimbrialar, *K. pneumoniae* tarafından mesane hücresi invazyonunda, mesanede ve abiyotik yüzeylerde biyofilm oluşumunda rol oynamaktadır (Paczosa ve Mecsas, 2016). Patojenik

K. pneumoniae, çok sayıda virölans geni barındırır. *K. pneumoniae* barındıran tek bir virölans geninin bile bulunduğu invaziv enfeksiyon kötü sonuçlara yol açabilir. *EntB* ve ardından *FimH*, çeşitli enfeksiyon türlerinin patogeneze katkıda bulunan en yaygın genlerdir. Virölans genlerinin PCR ile saptanması, bunların karakterize edilmesine ve farklı konak ortamlarında nasıl çalıştıklarının anlaşılmasına yardımcı olacaktır (Remya, Shanthi ve Sekar, 2019).

K. pneumoniae' de *fimH* virölans gen sıklığıyla ilgili yapılan çalışmalarda; Kuş ve diğerleri %64,2 oranında, El Fertas-Aissani ve diğerleri %100 oranında, Fu ve diğerleri %88,37 oranında, Remya ve diğerleriyse %89,1 oranında direnç tespit etmişlerdir (El Fertas-Aissani ve diğerleri, 2013; Fu ve diğerleri, 2018; Remya ve diğerleri, 2019). Bizim çalışmamızda ise *fimH* gen sıklığı %22,5 şeklinde tespit edilmiştir. Aynı tür mikroorganizmaların virölans faktörleri enfeksiyona sebep olduğu bölgeye göre değişebilmektedir (Podschun ve Ullmann, 1998). Çalışmalardaki oranların farklılığının sebebini, izolatların izole edildiği enfeksiyon bölgelerinin farklılıklarına bağlamaktayız (Kelishomi ve diğerleri, 2022).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada klinik örneklerden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarının antibiyotik direnç profillerinin, virülans faktörleriyle, biyofilm oluşum kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla ilk olarak Tokat Devlet Hastanesi, Tokat Erbaa Devlet Hastanesi ve Samsun Bafra Devlet Hastanesine başvuran 120 farklı hastanın klinik örneklerinden *K. pneumoniae* izole edilmiştir. Çalışma sonucunda;

- Klinik izolatın hastaların cinsiyetine göre dağılımı 77 kadın (%64,1), 43 erkek (%35,9) şeklinde bulunmuştur.
- Klinik izolatların izole edildiği örneklerle göre dağılımı; 110 idrar kültürü (%91,6), 7 balgam kültürü (%5,83), 2 kan kültürü (%1,66), ve 1 kateter kültürü (%0,83) şeklinde bulunmuştur.
- Klinik izolatların yapılan Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine antibiyotiklere göre direnç oranları; 120 izolatın 47'si (%39,1) MEM'e, 43'ü (%35,8) IPM'ye, 72'si (%60) CAZ'a, 48'i (%40) C'ye, 107'si (%89,1) LEV'e, 69'u (%57,5) ATM'ye, 71'i (%59,1) FF'e, 53'ü (%44,1) TOB'a, 47'si, (%39,1) CN' ye, 83'ü (%69,1) AMC'ye, 65'i (%54,1) TPZ'ye, 68'i (%56,6) NA'ya, karşı dirençli şeklinde bulunmuştur.
- Klinik izolatların yapılan kombine disk yöntemiyle GSBL direnç profili; 120 izolatın 28 tanesi (%23,3) GSBL pozitif, kalan 92 izolat ise (%76,7) GSBL negatif şeklinde bulunmuştur.
- Klinik izolatların yapılan mikrotitrasyon plağı yöntemiyle biyofilm oluşum sonuçları; 120 izolatın 58'si (%48,3) biyofilm pozitif şeklinde bulunmuştur.
- Klinik izolatların *intI1* gen bölgesi varlığının tespiti için yapılan PZR değerlendirme sonucunda; 120 izolatın 70'i (%58,3) *intI1* pozitif şeklinde bulunmuştur.
- Klinik izolatların GSBL genlerinin (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* ve *bla_{CTX-M}*) genotipik olarak tespiti için yapılan PZR değerlendirme sonuçları; 120 izolatın 10'unda (%8,3) *bla_{TEM}* gen bölgesi, 120 izolatın 42'sinde (%35) *bla_{SHV}* gen bölgesi ve 120 izolatın 23'ünde (%19,1) *bla_{CTX-M}* gen bölgesi pozitif şeklinde bulunmuştur.

- Klinik izolatların *fimH* gen bölgesinin 120 izolatın varlığının tespiti için yapılan PZR değerlendirme sonucunda; 120 izolatın 27'si (%22,5) *fimH* pozitif şeklinde bulunmuştur.

Bakteriler arasındaki antimikrobiyal direnç, enfeksiyonların tedavisinde büyük bir problemdir. Bu problemin büyümesinde antibiyotik direnç genlerinin, integronların, virülans genlerin ve biyofilm oluşumunun rolü oldukça büyüktür. Çalışmamızda literatürdeki diğer çalışmalarla benzer şekilde β -laktam ve diğer antibiyotik sınıflarına direnç oranları, klinik izolatların biyofilm oluşum oranı, *intI1* ve *bla_{SHV}* gen oranları yüksek şekilde tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra çalışmamızda *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}*, *fimH* gen oranları ve fenotipik olarak GSBL oluşum oranı literatürdeki çalışmalara göre düşük tespit edilmiştir. Çalışmamız sonucunda ülkemizdeki epidemiyolojik verilere katkı sağlanmıştır. Bu bilgilerden yola çıkarak, hastanelerde dirençli türlerle mücadele edilebilmesi için her hastane kendi enfeksiyon etkenlerinin dağılımını, antibiyotik direnç oranlarını düzenli bir şekilde takip etmeli ve bireysel bazlı antibiyotik uygulamasına geçerek tedavi şekillerini güncellemelidir. Bunlara ek olarak antimikrobiyal direncin yayılmasını önlemek için hijyen ve sanitasyon önlemleri arttırılmalı, sağlık çalışanları bu konuda bilgilendirilmelidir.

KAYNAKLAR

- Adam, E., Özkan, M., Dizer, U., Beşirbellioğlu, B., Haznedaroğlu, T. ve Özgüven, V. (2000). Ventilatöre Bağlı Pnömonilerden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Direnç Paternleri. *Flora*, 5(3), 189-194.
- Akan, E. ve Kınık, Ö. (2014). Biofilm Oluşum Mekanizması ve Gıda Güvenliğine Etkisi. *Gıda ve Yem Bilimi-Teknolojisi Dergisi*, 14, 42-51.
- Akçam, F., Gönen, İ., Kaya, O. ve Yaylı, G. (2004). Hastane Enfeksiyonu Etkeni Enterobakterilerde Beta-Laktam Antibiyotiklere Duyarlılık ve ESBL Sıklığının Araştırılması. *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 11(1), 6-9.
- Akpınar, E., Kansak, N. ve Aksaray, S. (2021). Üriner Sistem Enfeksiyon Etkeni *E. coli* ve *K. pneumoniae* İzolatlarında Fosfomisin Duyarlılığının Saptanmasında Otomatize Sıvı Mikrodilüsyon Sistemi (Vitek-2) ile Agar Dilüsyon Yönteminin Karşılaştırılması. *Mediterranean Journal of Infection Microbes and Antimicrobials*, 10(26), 1-6.
- Aktas, Z., Satana, D., Kayacan, C., Ozbek, B., Gurler, N., Somer, A., Salman, N. and Aydın, A. E. (2012). Carbapenem Resistance in Turkey: Repeat Report on OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* and First Report on IMP-1 Beta-Lactamase in *Escherichia coli*. *African Journal of Microbiology Research*, 6(17), 3874-3878.
- Akyar, I., Kocagöz, S., Kocagöz, T., Sar-Sarıgüz, N., Gültekin, M., Ercis, S. et al. (2010). Beş Yılda İzole Edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella* Spp. Suşunda Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üretiminin Yıllara, Kliniklere ve Örnek Türlerine Dağılımı. *ANKEM Dergisi*, 24(1), 34-41.
- Al-Agamy, M. H., Shibl, A. M. and Tawfik, A. F. (2009). Prevalence and Molecular Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine*, 29(4), 253-257.
- Albayrak, Ö. (2018). *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenem Direnci ve Dirençten Sorumlu Enzimlerin Araştırılması. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Antunes, N. T., Lamoureaux, T. L., Toth, M., Stewart, N. K., Frase, H. and Vakulenko, P. B. (2014). Class D β -Lactamase: are They all Carbapenemas?. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(4), 2119-2125.
- Ambler, R. P. (1980). The Structure of β -Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B Biological Sciences*, 289(1036), 321-331.
- Amyes, S. G. (2003). Resistance to Beta-Lactams - Permutations. *Journal of Chemotherapy*, 15(6), 525-535.

- Augustin, M., Ali-Vehmas, T. and Atroshi, F. (2004). Assessment of Enzymatic Cleaning Agents and Disinfectants Against Bacterial Biofilms. *Journal Pharma & Pharmaceutical Science*, 7(1), 55-64.
- Arato, V., Raso, M. M., Gasperini, G., Berlanda Scorza, F. and Micoli, F. (2021). Prophylaxis and Treatment Against *Klebsiella pneumoniae*: Current Insights on This Emerging Anti-Microbial Resistant Global Threat. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4042.
- Asghari, B., Goodarzi, R., Mohammadi, M., Nouri, F. and Taheri, M. (2021). Detection of Mobile Genetic Elements in Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Different Infection Sites in Hamadan, Western Iran. *BMC Research Notes*, 14(230), 1-6.
- Aşçıoğlu, S. (2007). Hastane Enfeksiyonları. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 64(1), 1-3.
- Aşgın, N., Eroğlu, S. ve Çakmaklıoğulları, E. K. (2018). Gebelikte Üriner Sistem Enfeksiyonlarının Ampirik Tedavisinde Hangi Antibiyotikler İlk Seçenek Olmalıdır?. *ANKEM Dergisi*, 32(3), 94-102.
- Ayars, G. H., Altman, L. C. and Fretwell, M. D. (1982). The Effect of Decreased Salivation and Ph on the Attachment of *Klebsiella* Species to Human Buccal Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 38(1), 179-182.
- Babu, J. P., Abraham, S. N., Dabbous, M. K. and Beachey, E. H. (1986). Interaction of A 60-Kilodalton D-Mannose-Containing Salivary Glycoprotein With Type 1 Fimbriae of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 54(1), 104-108.
- Balıkçı, E. ve Keskin, C. (2011). Çeşitli Nozokomiyal Enfeksiyonlara Neden Olan *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Enzimlerinin Sıklığının Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 41(2), 79-85.
- Balbi, H. J. (2004). Chloramphenicol: A Review. *Pediatrics in Review*, 25(8), 284-288.
- Balish, M. J., Jensen, J. and Uehling, D. T. (1982). Bladder Mucin: A Scanning Electron Microscopy Study in Experimental Cystitis. *The Journal of Urology*, 128(5), 1060-1063.
- Bass, L., Liebert, C. A., Lee, M. D., Summers, A. O., White, D. G., Thayer, S. G. and Maurer, J.J. (1999). Incidence and Characterization of Integrations, Genetic Elements Mediating Multiple-Drug Resistance, in Avian *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(12), 2925-2929.
- Baykal, A., Çöplü, N., Şimşek, H., Esen, B. and Gür, D. (2012). Kan İzolatı *E. coli* ve *K. pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz, KPC Tip Karbapenemaz ve Plazmid Aracılı AmpC Betalaktamaz Varlığının Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(2), 159-169.

- Behçet, M., Avcıoğlu, F., Özşarı, E., Tuğ, T. ve Kurtoğlu, M. G. (2020). KOAH Akut Atak Nedeniyle Yatan Hastalarda Bakteriyel Enfeksiyon Etkenleri, Antibiyotik Direnci ve Komorbiditenin Araştırılması. *Düzce Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10(1), 6-11.
- Bektaş, A., Güdücüoğlu, H., Gürsoy, N. C., Berktaş, M., Gültepe, B. S., Parlak, M. ve Tekerekoğlu, M. S. (2018). Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının GSBL Genlerinin Araştırılması. *Flora*, 23(3), 116-123.
- Blair, J. M. and Piddock, L. J. (2009). Structure, Function and İnhibition of RND Efflux Pumps in Gram-Negative Bacteria: an Update. *Current Opinion in Microbiology*, 12(5), 512-519.
- Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., and Piddock, L. J. (2015). Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Nature Reviews. Microbiology*, 13(1), 42–51.
- Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Bernardini, A., Sanchez, M. B. and Martinez, J. L. (2016). Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms*, 4(1), 1-19.
- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: The CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1-14.
- Boutte, C., Grubisic, S., Balthasarat, P. and Wilmotte, A. (2006). Testing of Primers for Study of Cyanobacterial Molecular Diversity by DGGE. *Journal of Microbiological Methods*, 65(3), 542-550.
- Bradford, P. A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933-951.
- Bratu, S., Landman, D., Haag, R., Recco, R., Eramo, A., Alam, M. and Quale, J. (2005). Rapid Spread of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: A New Threat to Our Antibiotic Armamentarium. *Archives of Internal Medicine*, 165(12), 1430-1435.
- Budak, S., Aktaş, Z. ve Erdem, H. (2012). Enterik Gram-Negatif Bakterilerde Laboratuvarıdan Kliniğe Karbapenemazlar. *Mediterr Journal Infection Microbes Antimicrobials*, 1(1), 8-11.
- Bush, K. and Jacoby, G. A. (2010). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969-976.
- Bush, K. (1989). Classification of Beta-Lactamases: Groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33(3), 271-276.

- Bush, K., Jacoby, G. A. and Medeiros, A. A. (1995). A Functional Classification Scheme for Beta-Lactamases and its Correlation With Molecular Structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(6), 1211-1233.
- Cambray G, Guerout A. and Mazel D. (2010). Integrons. *Annual Review of Genetics*. 44(1), 141–166.
- Chen, Y. T., Chang, H. Y., Lai, Y. C., Pan, C. C., Tsai, S. F. and Peng, H. L. (2004). Sequencing and Analysis of The Large Virulence Plasmid Plvpk of *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Gene*, 337, 189-198.
- Cheng, D. L., Liu, Y. C., Yen, M. Y., Liu, C. Y. and Wang, R. S. (1991). Septic Metastatic Lesions of Pyogenic Liver Abscess: Their Association With *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia in Diabetic Patients. *Archives of Internal Medicine*, 151(8), 1557-1559.
- Chmielewski, R. and Frank, J. F. (2003). Biofilm Formation and Control in Food Processing Facilities. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2(1), 22-32.
- Chung T. H., Karkey A., Pham T. D., Boinett C.J., Cain A. K. and Ellington M. (2015). A High-Resolution Genomic Analysis of Multidrug Resistant Hospital Outbreaks of *Klebsiella pneumoniae*. *EMBO Molecular Medicine*. 7(3), 227-239.
- Clegg, S. and Gerlach, G. F. (1987). Enterobacterial Fimbriae. *Journal of Bacteriology*, 169(3), 934-938.
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth Edition, Informational Supplement M100-S20, Wayne, PA, 2016.
- CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24, Wayne, PA, 2014
- Costerton, J. W., Geesey, G. G. and Cheng, K. J. (1978). How Bacteria Stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Greenberg, E. P. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322.
- Cornaglia, G., Giamarellou, H. and Rossolini, G. M. (2011). Metallo- β -Lactamase: A Final Frontier For B-Lactams?. *Lancet Infectious Diseases*, 11(5), 381–393.
- Cortes, M. E., Bonilla, J. C. and Sinisterra, R. D. (2011). Biofilm Formation, Control and Novel Strategies for Eradication. *Science Against Microbial Pathogens: Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*, 2, 896-905.
- Çalı, A. (2021). Bakteriyel Biyofilm: Biyofilm ile İlişkili Enfeksiyonların Önlenmesi. *Journal of Social and Analytical Health*, 1(1), 22-28.

- Çiftçi, A. ve Aksoy, A. (2015). Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences*, 1(2), 1-10.
- Çelikkalek, N., Gözalan, A., Özdem, B., Kırca, F. ve Açıkgöz, Z. C. (2015). Ayaktan Başvuran Hastaların İdrar Kültürlerinde Üretilen Enterobacteriaceae İzolatlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üretimi: Yedi Yıllık İzlem Sonuçları. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(2), 259-265.
- Çoban, A. Y., Nohut, O. K., Tanrıverdi-Çaycı, Y., Bayramoğlu, G., Pirinççiler, M., Çetinkaya, E., Cihan-Çekiç, Ç., Bozdoğan, B. ve Durupınar, B. (2012). Enterobacteriaceae Üyelerinde Plazmid Aracılı Kinolon Direnç Determinantlarının Araştırılması: Çok Merkezli Bir Çalışma. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46(3), 366-374.
- Dağlar, D. ve Öngüt, G. (2012). Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar GSBL ve Tanı Yöntemleri. *Annals of Health Sciences Research*, 1(1), 1-9.
- D'Andrea, M. M., Arena, F., Pallecchi, L. and Rossolini, G. M. (2013). CTX-M-Type B-Lactamases: A Successful Story of Antibiotic Resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 305-317.
- De Lastours, V. and Fantin, B. (2015). Impact of Fluoroquinolones on Human Microbiota. Focus on The Emergence of Antibiotic Resistance. *Future Microbiology*, 10(7), 1241-1255.
- Delarampour, A., Ghalehnoo, Z. R., Khademi, F. and Vaez, H. (2020). Antibiotic Resistance Patterns and Prevalence of Class I, II and III Integrons Among Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Le Infezioni in Medicina*, 28(1), 64-69.
- Deniz, S., Büyük, F. ve Murat, K. (2021). Üriner Sistem Enfeksiyonlu Bireylerden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında CTX-M, TEM ve SHV Tipi Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Aktivitesinin Otomatize Sistem ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. *Kafkas Tıp Bilimleri Dergisi*, 11(2), 307-317.
- Demirdöğen, E., Şihça, S. ve Dığrak, M. (2012). Kahramanmaraş' ta Kliniklere Başvuran Hastalardan İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1), 47-52.
- Dıranı, M., Arıfar, M. ve Akçelik, N. (2015). İnsan ve Hayvan Sağlığı Açısından Risk Oluşturan Enterokokal Biyofilm Yapısının Doğası. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73(1), 71-80.
- Doğanay, D., Aydın, M. ve Avşar, İ. (2023). Farklı Klinik Örneklerden İzole Edilmiş *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilinin İncelenmesi: Covid-19 Pandemisi Sürecindeki Bir Yıllık Veriler. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi*, 47(1), 185-195.
- Duman, Y., Güçlüer, N., Serindağ, A. ve Tekerekoğlu, M. S. (2010). *Escherichia coli* Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılık ve Genişlemiş Spektrumlu-Beta Laktamaz (GSBL) Varlığı. *Fırat Tıp Dergisi*, 15(4), 197-200.

- Duran, H., Çeken, N. ve Atik, T. K. (2020). İdrar Kültüründen İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Antibiyotik Direnç Oranları: Dört Yıllık Analiz. *ANKEM Dergisi*, 34(2), 41-47.
- Duran, T. (2011). *Midye Kabuğu Tozunun Paslanmaz Çelik Yüzeylerde Oluşan Biyofilm Temizleme Etkisinin Araştırılması*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Sakarya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Sakarya.
- Donlan, R. M. and Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881-890.
- Donlan, R. M. (2000). Role of Biofilms in Antimicrobial Resistance. *ASAIJ Journal*, 46(6), 46-52.
- Dzidic, S., Suskovic, J. and Kos, B. (2008). Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 11-21.
- Ebrahim-Saraie, H. S., Nezhad, N. Z., Heidari, H., Motamedifar, A. and Motamedifar, M. (2018). Detection of Antimicrobial Susceptibility and Integrins Among Extended-spectrum β -lactamase Producing Uropathogenic *Escherichia coli* Isolates in Southwestern Iran. *Oman Medical Journal*. 33(3), 218-223.
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. (2003). Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extendedspectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 47(12), 3724–3732
- Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S. and Wu, Y. (2020). *Klebsiella pneumoniae*: An Increasing Threat to Public Health. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 19(1), 1-9.
- Eghbalpoor, F., Habibi, M., Azizi, O., Asadi Karam, M. R. and Bouzari, S. (2019). Antibiotic Resistance, Virulence and Genetic Diversity of *Klebsiella pneumoniae* in Community-and Hospital-Acquired Urinary Tract Infections in Iran. *Acta Microbiologica Et Immunologica Hungarica*, 66(3), 349-366.
- Ehlers, L. J. and Bouwer, E. J. (1999). RP4 Plasmid Transfer Among Species of *Pseudomonas* in A Biofilm Reactor. *Water Science and Technology*, 39(7), 163–171.
- El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S. and Bakour, R. (2013). Virulence Profiles and Antibiotic Susceptibility Patterns of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Different Clinical Specimens. *Pathologie Biologie*, 61(5), 209-216.

- Endimiani, A., Perez, F., Bajaksouzian, S., Windau, A. R., Good, C. E., Choudhary, Y. and Jacobs, M. R. (2010). Evaluation of Updated Interpretative Criteria for Categorizing *Klebsiella pneumoniae* With Reduced Carbapenem Susceptibility. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(12), 4417-4425.
- Ermertcan, Ş., Hoşgör-Limoncu, M. ve Taşlı, H. (2008). Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması ve Tiplendirilmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 42(1), 9-15.
- Esen, Ş., Eroğlu, C., Sünbül, M. ve Leblebicioğlu, H. (2001). *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında TEM ve SHV Türü Beta-Laktamazların Sıklığı. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 35(1), 37-43.
- Estaji, M., Tabasi, M., Sadeghpour, H. F., Khezerloo, J. K., Radmanesh, A., Raheb, J., Ghadirzadeh, M. R. and Tabatabaei, A. (2019). Genotypic Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Patients With Urinary Tract Infection. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Disease*, 65, 1-20.
- Geetha, P. V., Aishwarya, K. V. L., Mariappan, S. and Sekar, U. (2020). Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Laboratory Physicians*, 12(2), 121-125.
- Gelmez-Altınkanat G., Hasdemir, U., and Söyletir, G. (2021). Enterobacterales Üyelerinde Nadir Bir Plazmid Aracılı A Sınıfı Beta Laktamaz Olan IBC-1'in Araştırılması. *Experimed*, 11(2), 81-87.
- Genovese, C., La Fauci, V., D'Amato, S., Squeri, A., Anzalone, C., Costa, G. B., Fedele, F. and Squeri, R. (2020). Molecular Epidemiology of Antimicrobial Resistant Microorganisms in The 21th Century: A Review of The Literature. *Acta Biomedica Atenei Parmensis*, 91(2), 256-273.
- Ghafourian, S., Bin Sekawi, Z., Sadeghifard, N., Mohebi, R., Kumari Neela, V., Maleki, A., Hematian, A., Rhabar, M., Rahbar, M., Raftari, M. and Ranjbar, R. (2011). The Prevalence of ESBLs Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Some Major Hospitals, Iran. *The Open Microbiology Journal*, 5, 91-95.
- Gorrie, C. L., Mirceta, M., Wick, R. R., Judd, L. M., Wyres, K. L., Thomson, N. R. and Holt, K. E. (2018). Antimicrobial-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Carriage and Infection in Specialized Geriatric Care Wards Linked to Acquisition in The Referring Hospital. *Clinical Infectious Diseases*, 67(2), 161-170.
- Güçlü-Üsküdar, A. (2017). *Karbapenem Dirençli Klebsiella pneumoniae ve Escherichia coli Suşlarında Bla_{OXA-48}, Bla_{KPC}, Bla_{IMP}, Bla_{VIM} ve Bla_{NDM} Direnç Genlerinin Araştırılması*. Yayınlanmamış Doktora Tezi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü, Ankara.
- Gün, İ. ve Ekinci, F. Y. (2009). Biyofilmler : Yüzeylerdeki Mikrobiyal Yaşam, *Gıda*, 34(3), 165-173.
- Gür, D. (1996). β -Laktamazların Sınıflandırılması. *Flora*, 2, 80-86.

- Gür, D., Gülay, Z., Akan, Ö. A., Aktaş, Z., Kayacan, B. Ç., Çakıcı, Ö. ve Eraç, B. (2008). Türkiye’de Hastane İzolatı Gram-Negatif Bakterilerde Yeni Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç ve GSBL Tipleri: Çok Merkezli HİTİT Sürveyansının Sonuçları. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 42, 537-544.
- Gür, D. ve Ünal, S. (1996). Yoğun Bakım Ünitelerinden İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerin Çeşitli Antibiyotiklere İn Vitro Duyarlılıkları. *Flora Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Dergisi*, 1(3), 153-159.
- Fader, R. C. and Davis, C. P. (1980). Effect of Piliation on *Klebsiella pneumoniae* Infection in Rat Bladders. *Infection and Immunity*, 30(2), 554-561.
- Fader, R. C. and Davis, C. P. (1982). *Klebsiella pneumoniae*-Induced Experimental Pyelitis: Effect of Filiation on Infection. *Journal of Urology*, 128(1), 197-201.
- Fu, L., Huang, M., Zhang, X., Yang, X., Liu, Y., Zhang, L., Zhang, Z., Wang, G. and Zhou, Y. (2018). Frequency of Virulence Factors in High Biofilm Formation *Bla_{KPC}-2* Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains From Hospitals. *Microbial Pathogenesis*, 116, 168-172.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. and Stoodley, P. (2005). Survival Strategies of Infectious Biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 34-40.
- Hasdemir, U. (2007). Çoklu İlaç Direncinde Bakteri Hücre Duvarı Organizasyonu ve Aktif Pompa Sistemlerinin Rolü. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 41(2), 309-327.
- Hazırolan, G. (2020). Fosfomisin: Geçmişe Dönüş. *Klinik Dergisi*, 33(3), 213-222.
- Heukelekian, H. and Heller, A. (1940). Relation Between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *Journal of Bacteriology*, 40(4), 547-558.
- Hornick, D. B., Allen, B. L., Horn, M. A. and Clegg, S. (1992). Adherence to Respiratory Epithelia by Recombinant *Escherichia coli* Expressing *Klebsiella pneumoniae* Type 3 Fimbrial Gene Products. *Infection and Immunity*, 60(4), 1577-1588.
- Hsu, C. R., Lin, T. L., Chen, Y. C., Chou, H. C. and Wang, J. T. (2011). The Role of *Klebsiella pneumoniae* *RmpA* in Capsular Polysaccharide Synthesis and Virulence Revisited. *Microbiology*, 157(12), 3446-3457.
- Işık, F. (2007). *Kan Kültürlerinden İzole Edilen Klebsiella pneumoniae Suşlarında Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz Varlığının Saptanmasında Üç Yöntemin (Çift Disk Sinerji, Kombine Disk ve E-Test) Karşılaştırılması ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Araştırılması*, Yayımlanmamış Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- İnternet : Mikrobiyoloji. Org. (b.t). Yer Değiştirebilen Genetik Elementler, URL: http://www.mikrobiyoloji.org/TR/Genel/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFFAA_F6AA849816B2EF19ACA6182CE79FED#:~:text=Bakteri%2C%20mantar%2C%20maya%2C%20m%2C%20B1s%2C%20B1r,ve%20%2C%20A7ift%20iplik%2C%20A7ikli%20DNA%20sekanslar%2C%20B1d%2C%20B1r, Son Erişim Tarihi: 11.01.2023.

- İnternet : Öngen, B. (b.t) Hastanede Sorunlu Mikroorganizmalar: Gram Negatif Bakteriler, URL: <https://www.das.org.tr/kitaplar/kitap2003/41.htm>, Son Erişim Tarihi: 10.08.2022.
- İnternet : World Health Organization. (2021). Antimicrobial resistance. URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, Son Erişim Tarihi: 2.05.2023.
- Jacoby, G. A. and Munoz-Price, L. S. (2005). The New Betalactamases. *The New England Journal of Medicine*. 352 (4), 380-391.
- Jones, H. C., Roth, I. L. and Sanders III, W. M. (1969). Electron Microscopic Study of A Slime Layer. *Journal of Bacteriology*, 99(1), 316-325.
- Kahraman, E. P., Karakeçe, E., Erdoğan, F., Uluyurt, H., Köroğlu, M. ve Çiftci, İ. H. (2017). *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Antibiyotiklere Direnç Durumlarının Değerlendirilmesi. *Ortadoğu Tıp Dergisi*, 9(1), 12-18.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H. and Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic Detachment of *Staphylococcus epidermidis* Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2633-2636.
- Karbasizaed, V., Badami, N. and Emtiazi, G. (2003). Antimicrobial, Heavy Metal Resistance and Plasmid Profile of Coliforms Isolated From Nosocomial Infections in A Hospital in Isfahan, Iran. *African Journal Biotechnology*, 2(10), 379-383.
- Kayış, U. (2019). Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi*, 5(1), 1-12.
- Kelishomi, F. Z., Amereh, S., Ghayyaz, F., Javadi, A., Anari, R. K. and Nikkhahi, F. (2022). Frequency of Virulence Genes and Their Association With Biofilm Formation Ability in *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Wound Infections. *Research Square*, Önbaskı (Sürüm 1), 1-14.
- Kıraç, E. (2011). *Klinik Örneklerden İzole Edilen Klebsiella İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları*. Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Afyon.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jorgensen, A., Molin, S. and Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* Wild Type, Flagella and Type IV Pili Mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511-1524.
- Koçoğlu, E., Karabay, O., İnce N. K., Özkardeş, F. ve Yıldırım, R. (2007). Toplum Kaynaklı Üriner Sistem Enfeksiyonlarından İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ve Bazı Antibiyotiklere Direnç Sıklığının Araştırılması. *ANKEM Dergisi*, 21(1), 5-9.

- Korten, V., Ulusoy, S., Zarakolu, P., Mete, B. and Turkish MYSTIC Study Group. (2007). Antibiotic Resistance Surveillance Over a 4-Year Period (2000–2003) In Turkey: Results of the MYSTIC Program. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59(4), 453-457.
- Köksal, İ. (2014, 18-20 Nisan). *Biyofilm Oluşturan Bakteri Enfeksiyonları*. 11. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul.
- Köse, E., Çalışkan, E., Memiş, N., Dönmez, B. ve Duran, P. (2021). Yara Yeri Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Direnç Oranları. *ANKEM Dergisi*, 35(1), 14-21.
- Köseoğlu, Ö. (2004). İntegronlar. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 38(3), 305-312.
- Kuş, H., Arslan, U., Dağı, H. T. ve Fındık, D. (2017). Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 51(4), 329-339.
- Kuş, H. (2015). *Hastane Enfeksiyonu Etkeni Klebsiella pneumoniae Suşlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması*, Yayımlanmamış Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Konya.
- Kürklü-Bozkır, F., Çelik, İ. ve Sönmez-Yıldırım, S. (2021). Erişkinlerde Üriner Sistem Enfeksiyonları Gelişiminde Altta Yatan Risk Faktörler, Etkenlerin Dağılımı ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması. *Aksaray Üniversitesi Tıp Bilimleri Dergisi*, 2(2), 4-8.
- Lambert, P. A. (2005). Bacterial Resistance to Antibiotics: Modified Target Sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1471-1485.
- Laraki, N., Galleni, M., Thamm, I., Riccio, M. L., Amicosante, G., Frere, J. M. and Rossolini, G. M. (1999). Structure of In31, A *Bla_{IMP}*-Containing *Pseudomonas aeruginosa* Integron Phyletically Related to In5, Which Carries an Unusual Array of Gene Cassettes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 890-901.
- Leblebicioğlu, H., Şencan, İ., Eroğlu, C., Sünbül, M., Esen, Ş. ve Günaydın M. (1998). Gram Negatif Bakterilerde Aminoglikozid Direnç Mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 11(2), 50-52.
- Leone, S., Molinaro, A., Alfieri, F., Cafaro, V., Lanzetta, R., Di Donato, A. and Parrilli, M. (2006). The Biofilm Matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 Grown on Phenol is Mainly Constituted by Alginate Oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 341(14), 2456-2461.
- Levesque, C., Piche, L., Larose, C. and Roy, P. H. (1995). PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1), 185-191.
- Li, X. Z. and Nikaido, H. (2004). Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria. *Drugs*, 64(2), 159–204.

- Maayan, M. C., Ofek, I., Medalia, O. and Aronson, M. (1985). Population Shift in Mannose-Specific Fimbriated Phase of *Klebsiella pneumoniae* During Experimental Urinary Tract Infection in Mice. *Infection and Immunity*, 49(3), 785-789.
- Magnet, S. and Blanchard, J. S. (2005). Molecular Information on Aminoglycoside Action and Resistance. *Chemical Studies*, 105(2), 477-498.
- Manchanda, V., Singh, N. P., Goyal, R., Kumar, A. and Thukral, S. S. (2005). Phenotypic Characteristics of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* & Evaluation of Available Phenotypic Techniques for Detection of Extended Spectrum Beta-lactamases. *Indian Journal of Medical Research*, 122(4), 330-337.
- Matsumoto, T., Mizunoe, Y., Sakamoto, N., Tanaka, M. and Kumazawa, J. (1990). Increased Kidney Scarring By Bacteria With Mannose-Sensitive Pili. *Urological Studies*, 18(5), 299-303.
- Mazel, D. (2006). Integrons: Agents of Bacterial Evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 4(8), 608-620.
- Medeiros, A. A. (2000). Cooperative Evolution of Mechanisms of β -Lactam Resistance. *Clinical Microbiology and Infection*, 6(3), 27-33.
- Meral, H. ve Korukluoğlu, M. (2014). Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 28(2), 71-82.
- Mistik, R. (2000). Aminoglikozid Antibiyotikler ve Günde Tek Doz Kullanımları. *Klimik Dergisi*, 13(2), 43-45.
- Moghadas, A. J., Kalantari, F., Sarfi, M., Shahhoseini, S. and Mirkalantari, S. (2018). Evaluation of Virulence Factors and Antibiotic Resistance Patterns in Clinical Urine Isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Semnan, Iran. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 11(7), e63637.
- Mokhtari, H., Eslami, G., Zandi, H., Dehghan-Banadkouki, A. and Vakili, M. (2018). Evaluating The Frequency of *aac* (6')-Ia, *ant* (2 ")-I, *intl1*, and *intl2* Genes in Aminoglycosides Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Obtained From Hospitalized Patients in Yazd, Iran. *Avicenna Journal of Medical Biotechnology*, 10(2), 115-119.
- Moland, E. S., Kim, S. Y., Hong, S. G. and Thomson, K. S. (2008). Newer β -Lactamases: Clinical and Laboratory Implications, Part I. *Clinical Microbiology Newsletter*, 30(10), 71-77.
- Moosavian, M. and Deiham, B. (2012). Distribution of TEM, SHV and CTX-M Genes among ESBL-producing Enterobacteriaceae Isolates in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 6(26), 5433-5439.
- Moquet, O., Bouchiat, C., Kinana, A., Seck, A., Arouna, O., Bercion, R., Breurec, S. and Garin, B. (2011). Class D OXA-48 Carbapenemase in Multidrug-Resistant Enterobacteria, Senegal. *Emerging Infectious Diseases*, 17(1), 143-144.

- Murphy, C. N. and Clegg, S. (2012). *Klebsiella pneumoniae* and Type 3 Fimbriae: Nosocomial Infection, Regulation and Biofilm Formation. *Future Microbiology*, 7(8), 991-1002.
- Murphy, C. N., Mortensen, M. S., Krogfelt, K. A. and Clegg, S. (2013). Role of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 and Type 3 Fimbriae in Colonizing Silicone Tubes Implanted Into The Bladders of Mice as A Model of Catheter-Associated Urinary Tract Infections. *Infection and Immunity*, 81(8), 3009-3017.
- Nagai, K., Davies, T. A., Jacobs, M. R. and Appelbaum, P. C. (2002). Effects of Amino Acid Alterations in Penicillin-Binding Proteins (Pbps) 1a, 2b, and 2x on PBP Affinities of Penicillin, Ampicillin, Amoxicillin, Cefditoren, Cefuroxime, Cefprozil, and Cefaclor in 18 Clinical Isolates of Penicillin-Susceptible, -Intermediate, and-Resistant Pneumococci. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1273-1280.
- Nirwati, H., Sinanjung, K., Fahrurissa, F., Wijaya, F., Napitupulu, S., Hati, V. P., Hakim, M. S., Meliala, A., Aman, E. and Nuryastuti, T. (2019). Biofilm Formation and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Clinical Samples in A Tertiary Care Hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proceedings*, 13(11), 1-8.
- Odumosu, B. T., Adeniyi, B. A. and Chandra, R. (2013). Analysis of Integrins and Associated Gene Cassettes in Clinical Isolates of Multidrug Resistant *Pseudomonas aeruginosa* From Southwest Nigeria. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12(29), 2-7.
- Ofek, I. and Beachey, E. H. (1978). Mannose Binding and Epithelial Cell Adherence of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 22(1), 247-254.
- Ödemiş, İ. (Editör). (2023). *Antibiyotiklere güncel ve çok yönlü yaklaşım*. Ankara: Akademisyen Kitabevi.
- Öksüz, L. ve Gürler, N. (2009). *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Tiplendirilmesi ve Plazmid Profil Analizi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 43(2), 183-194.
- Özkuyumcu, C. (Editör). (2009). *Hacettepe mikrobiyoloji serisi-1 klinik bakteriyoloji el kitabı*. Ankara: Güneş tıp kitabevleri.
- Öztürk, F. Y., Darcan, C., and Kariptaş, E. (2023). The Determination, Monitoring, Molecular Mechanisms and Formation of Biofilm in *E. Coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 54(1), 259-277.
- Paczosa, M. K. and Mecsas, J. (2016). *Klebsiella pneumoniae*: to Attack With A Strong Defense. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 629-661.
- Palmer, J., Flint, S. and Brooks, J. (2007). Bacterial Cell Attachment, the Beginning of A Biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 577-588.

- Parlak, M., Çıkman, A., Bektaş, A. ve Berktaş, M. (2012). *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üretimi ve Antibiyotiklere Direnç: Beş Yıllık İzlem. *Sakarya Tıp Dergisi*, 2(1), 11-15.
- Patel, S. P., Balfour, A. J. and Bryson, M. H. (1997). Fosfomycin Tromethamine A Review of its Antibacterial Activity, Pharmacokinetic Properties and Therapeutic Efficacy as A Single-Dose Oral Treatment for Acute Uncomplicated Lower Urinary Tract Infections. *Adis Drug Evaluation*, 53(4), 537-656.
- Paterson, D. L. and Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: A Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686.
- Partridge, S. R., Tsafnat, G., Coiera, E. and Iredell, J. R. (2009). Gene Cassettes and Cassette Arrays in Mobile Resistance Integrins. *FEMS Microbiology Reviews*, 33(4), 757-784.
- Pekşen Y. (1993). Hastane İnfeksiyonlarının Epidemiyolojisi. *Klinik Dergisi*, 6(3), 100-101.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M. and Bonomo, R. A. (2007). The Continuing Challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*, 7(5), 459-469.
- Piperaki, E. T., Syrogiannopoulos, G. A., Tzouvelekis, L. S., and Daikos, G. L. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(10), 1002-1005.
- Pitout, J. D. and Laupland, K. B. (2008). Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: An Emerging Public-Health Concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3), 159-166.
- Podschun, R. and Ullmann, U. (1998). *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603.
- Pomakova, D. K., Hsiao, C. B., Beanan, J. M., Olson, R., MacDonald, U., Keynan, Y. and Russo, T. A. (2012). Clinical and Phenotypic Differences Between Classic and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: An Emerging and Under-Recognized Pathogenic Variant. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 31(6), 981-989.
- Poulsen, L. V. (1999). Microbial Biofilm in Food Processing. *LWT-Food Science and Technology*, 32(6), 321-326.
- Queenan, A. M. and Bush, K. (2007). Carbapenemases: The Versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 20(3), 440-458.
- Ramsey, C., and MacGowan, A. P. (2016). A Review of The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Aztreonam. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(10), 2704-2712.

- Rawat, D. and Nair, D. (2010). Extended-spectrum β -lactamases in Gram Negative Bacteria. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(3), 263-274.
- Reinhart, H. H., Obedianu, N. and Sobel, J. D. (1990). Quantitation of Thmm-Horsfall Protein Binding to Uropathogenic *Escherichia coli* and Lectins. *Journal of Infectious Diseases*, 162(6), 1335-1340.
- Remya, P. A., Shanthi, M. and Sekar, U. (2019). Characterisation of Virulence Genes Associated With Pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 37(2), 210-218.
- Rifaioğlu, M. M., Yıldırım, A., Başok, E. K., Keskin, S. K., Özgüneş, N. ve Tokuç, R. (2009). Son Dört Yıl İçerisinde İdrar Kültürlerinden İzole Edilen Bakterilere Karşı Gelişen Antibiyotik Direncindeki Değişim. *Türk Üroloji Dergisi*, 35(3), 201-209.
- Rowe-Magnus, D. A., Guerout, A. M. and Mazel, D. (2002). Bacterial Resistance Evolution By Recruitment of Super-Integron Gene Cassettes. *Molecular Microbiology*, 43(6), 1657-1669.
- Ruh, E., Gazi, U., Güvenir, M., Süer, K. and Çakır, N. (2016). Antibiotic Resistance Rates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated From a University-Affiliated Hospital in North Cyprus. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 73(4), 333-344.
- Rupp, M. E. and Fey, P. D. (2003). Extended Spectrum β -lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae. *Drugs*, 63(4), 353-365.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W. and Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes During Development As A Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1140–1154.
- Seifi, K., Kazemian, H., Heidari, H., Rezagholizadeh, F., Saeed, Y., Shirvani, F., and Hourii, H. (2016). Evaluation of Biofilm Formation Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates and Molecular Characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1), e30682.
- Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A. and Klemm, P. (2005). Capsule and Fimbria Interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 73(8), 4626-4633.
- Sili, U. ve Mert, A. (2010). 1986'dan 2010'a Beta-Laktamaz İnhibitörleri. *ANKEM Dergisi*, 24(Ek 2), 28-32.
- Sinde, E. and Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel, Rubber and Polytetrafluorethylene: The Influence of Free Energy and The Effect of Commercial Sanitizers. *Food Microbiology*, 17(4), 439-447.
- Shah, A. A., Hasan, F., Ahmed, S. and Hameed, A. (2004). Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): Characterization, Epidemiology and Detection. *Critical reviews in microbiology*, 30(1), 25-32.

- Sharma, J., Sharma, M. and Ray, P. (2010). Detection of TEM & SHV Genes in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* Isolates in A Tertiary Care Hospital From India. *Indian Journal of Medical Research*, 132(3), 332-337.
- Shon, A. S., Bajwa, R. P. and Russo, T. A. (2013). Hypervirulent (Hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: A New and Dangerous Breed. *Virulence*, 4(2), 107-118.
- Stahlhut, S. G., Chattopadhyay, S., Struve, C., Weissman, S. J., Aprikian, P., Libby, S. J., Fang, F. C., Krogfelt, K. A. and Sokurenko, E. V. (2009). Population Variability of The Fimh Type 1 Fimbrial Adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1941-1950.
- Stahlhut, S. G., Struve, C., Krogfelt, K. A. and Reisner, A. (2012). Biofilm Formation of *Klebsiella pneumoniae* on Urethral Catheters Requires Either Type 1 or Type 3 Fimbriae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 350-359.
- Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. A. (2000). Modified Microtiter-Plate Test for Quantification of *Staphylococcal* Biofilm Formation. *Journal Microbiological Methods*, 40(2), 175-179.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. and Costerton, J. W. (2002). Biofilms as Complex Differentiated Communities. *Annual Review of Microbiology*, 56(1), 187-209.
- Struve, C., Bojer, M. and Krogfelt, K. A. (2008). Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Type 1 Fimbriae By Detection of Phase Variation During Colonization and Infection and Impact on Virulence. *Infection and Immunity*, 76(9), 4055-4065.
- Stuart, J. C. and Leverstein-Van Hall, M. A. (2010). Guideline for Phenotypic Screening and Confirmation of Carbapenemases in Enterobacteriaceae. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(3), 205-210.
- Sutherland, I. W. (2001). Biofilm Exopolysaccharides: A Strong and Sticky Framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
- Tarkkanen, A. M., Allen, B. L., Westerlund, B., Holthöfer, H., Kuusela, P., Risteli, L. and Korhonen, T. K. (1990). Type V Collagen as The Target for Type - 3 Fimbriae, Enterobacterial Adherence Organelles. *Molecular Microbiology*, 4(8), 1353-1361.
- Tarkkanen, A. M., Allen, B. L., Williams, P. H., Kauppi, M., Haahtela, K., Siitonen, A. and Korhonen, T. K. (1992). Fimbriation, Capsulation, and Iron-Scavenging Systems of *Klebsiella* Strains Associated With Human Urinary Tract Infection. *Infection and Immunity*, 60(3), 1187-1192.
- Tarkkanen, A. M., Virkola, R., Clegg, S. and Korhonen, T. K. (1997). Binding of The Type 3 Fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to Human Endothelial and Urinary Bladder Cells. *Infection and Immunity*, 65(4), 1546-1549.

- Taşbakan, M. I., Pullukçu, H., Yamazhan, T., Arda, B. ve Ulusoy, S. (2004). Toplum Kökenli Üriner Sistem Enfeksiyonlarından Soyutlanan *Escherichia coli* Suşlarına Fosfomisinin İn-Vitro Etkinliğinin Diğer Antibiyotiklerle Karşılaştırılması. *ANKEM dergisi*, 18(4), 216-219.
- Tekintaş, Y., Çilli, F., Eraç, B., Yaşar, M., Aydemir, S. S. ve Hoşgör-Limoncu, M. (2017). Klinik *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Üretiminin Saptanmasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Fenotipik Yöntemlerin Karşılaştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 51(3), 269-76.
- Tel, O. Y. (2011). Koyunlarda İntravajinal Sünger Uygulamasına Bağlı Vajinitis Olgularından İzole Edilen Aerobik Bakteriler ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 22(1), 7-10.
- Temoçin, F. ve Köse, H. (2018). Poliklinik Hastalarının İdrar Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarının Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üretim Oranları ve Antibiyotik Duyarlılıklarının Değerlendirilmesi. *ANKEM Dergisi*, 32(3), 79-86.
- Tenover, F. C., Kalsi, R. K., Williams, P. P., Carey, R. B., Stocker, S., Lonsway, D. and Hanna, B. (2006). Carbapenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Not Detected by Automated Susceptibility Testing. *Emerging Infectious Diseases*, 12(8), 1209-1213.
- Türkmen, L. (2002). İdrar Örneklerinden İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerin Değişik Antibiyotiklere Duyarlılığı. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 9(3), 185-189.
- Ulutürk, R., Soysal, H. F., Boztaş, Z., Ünlüer, E., Toktaş, G. ve Gürbüz, C. (2000). Multirezistan *Klebsiella pneumoniae* Suşunun Neden Olduğu Hastane Enfeksiyonu. *Klinik Dergisi*, 13(3), 91-93.
- Uyanık, M. H., Hancı, H., Yazgı, H. and Karameşe, M. (2010). Kan Kültürlerinden Soyutlanan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında GSBL Sıklığı ve Ertapenem Dahil Çeşitli Antibiyotiklere İn-Vitro Duyarlılıkları. *ANKEM Dergisi*, 24(2), 86-91.
- Vaara, M. (1993). Outer Membrane Permeability Barrier to Azithromycin, Clarithromycin, and Roxithromycin in Gram-Negative Enteric Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(2), 354-356.
- Van Bambeke, F., Balzi, E. and Tulkens, P. M. (2000). Antibiotic Efflux Pumps. *Biochemical Pharmacology*, 60(4), 457-470.
- Van Bambeke, F., Michot, J. M., Van Eldere, J. and Tulkens, P. M. (2005). Quinolones in 2005: an Update. *Clinical Microbiology and Infection*, 11(4), 256-280.
- Van Boeckel, T. P., Gandra, S., Ashok, A., Caudron, Q., Grenfell, B. T., Levin, S. A. and Laxminarayan, R. (2014). Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: An Analysis of National Pharmaceutical Sales Data. *The Lancet Infectious Diseases*, 14(8), 742-750.

- Venegas, M. F., Navas, E. L., Gaffney, R. A., Duncan, J. L., Anderson, B. E. and Schaeffer, A. J. (1995). Binding of Type 1-Piliated *Escherichia coli* to Vaginal Mucus. *Infection and Immunity*, 63(2), 416-422.
- Verbist, L. (1993). Epidemiology and Sensitivity of 8625 ICU and Hematology/Oncology Bacterial Isolates in Europe. International Study Group. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*. Supplementum (91), 14-24.
- Virkola R., Westerlund B., Holthöfer H., Parkkinen J., Kekomäki M. and Korhonen T K. (1988). Binding Properties of *Escherichia coli* Adhesins in The Human Urinary Bladder. *Infected Immunity*. 56(10), 2615–2622.
- Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G. and Varaldo, P. E. (2014). Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, 3(3), 743-758.
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F. and Varaldo, P. E. (2017). Biofilm Formation and Antibiotic Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Urinary Strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1003-1018.
- Walker, K. A. and Miller, V. L. (2020). The Intersection of Capsule Gene Expression, Hypermucoviscosity and Hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Current Opinion in Microbiology*, 54, 95-102.
- Walsh, T. R. (2010). Emerging Carbapenemases: A Global Perspective. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(3), 8-14.
- Walsh, T. R., Toleman, M. A., Poirel, L. and Nordmann, P. (2005). Metallo- β -Lactamases: The Quiet Before The Storm?. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 306-325.
- Wang, G., Zhao, G., Chao, X., Xie, L. and Wang, H. (2020). The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(17), 6278-6294.
- Wang, J. H., Liu, Y. C., Lee, S. S. J., Yen, M. Y., Chen, Y. S., Wang, J. H., Wann, S. H. and Lin, H. H. (1998). Primary Liver Abscess Due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clinical Infectious Diseases*, 26(6), 1434-1438.
- Wareth, G. and Neubauer, H. (2021). The Animal-Foods-Environment Interface of *Klebsiella pneumoniae* in Germany: An Observational Study on Pathogenicity, Resistance Development and The Current Situation. *Veterinary Research*, 52(16), 1-14.
- Watanabe, M., Iyobe, S., Inoue, M. and Mitsushashi, S. (1991). Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35(1), 147-151.
- World Health Organization. (2014). Antimicrobial resistance: global report on surveillance; WHO, France, 37.

- Yang, F., Shen, C., Zheng, X., Liu, Y., Ahmed, M. A. E., Zhao, Z., Liao, K., Shi, Y., Guo, X., Xhong, R., Xu, Z. and Tion, G. B. (2019). Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated From Market Retail Fruits in Guangzhou, China. *Infection and Drug Resistance*, 12(2), 385-389.
- Yetkin, G., Kuzucu, Ç., Çalışkan, A. ve Ay, S. (2006). Kan Kültürlerinde Üreyen *Escherichia coli*’lerin Antibiyotik Duyarlılıkları, GSBL Oranları ve Hastane Birimlerine Göre Dağılımı. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 13(3), 147-150.
- Yiş, R., Bayram, E. D. ve Ergin, Ö. Y. (2020). *bla_{OXA-48}* Pozitif *K. pneumoniae* İzolatlarında Fenotipik Karbapenemaz Üretiminin Modifiye Hodge ve Karbapenemaz İnaktivasyon Testleri ile Değerlendirilmesi. *Namık Kemal Tıp Dergisi*, 8(1), 1-10.
- Yüce, A. (2001). Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.
- Zobell, C. E. (1943). The Effect of Solid Surfaces Upon Bacterial Activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1), 39-56.



EKLER

Ek 1: T.C. Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kurul Karar Formu

Evrak Tarih ve Sayısı: 07.01.2022-51218



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-30640013-050.01.04-51218
Konu : Etik Kurul Onayı

07.01.2022

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN
Dr. Öğretim Üyesi

İlgi : 29.12.2021 tarihli ve 49899 sayılı dilekçeniz.

Tokat Erbaa Devlet Hastanesi'nde görev yapan Uzman Doktor Nezahat KOŞAR, Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde öğrenim gören Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi ve Tokat Erbaa Anadolu İmam Hatip Lisesi'nde görev yapan Biyoloji Öğretmeni Özge KULAÇ ile işbirliğinizde, Tokat Erbaa Devlet Hastanesi'nde yapılması planlanan "Klinik Örneklerden İzole Edilen Klebsiella Pneumoniae İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilinin ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması" konulu tez çalışması, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulumuz tarafından incelenmiştir.

Söz konusu tez çalışmasının yürütülmesinin ve uygulanmasının etik olarak uygun olduğu kanaatine varılmış olup, Kurul Kararının bir örneği ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerini rica ederim.

Doç.Dr. Güzide ŞENEL
Etik Kurul Başkanı

Ek:Kurul Kararı (1 Sayfa)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSD41S4DKC Pin Kodu :08162

Belge Takip Adresi :

<https://turkiye.gov.tr/ebd/ek-5544&eD=BSD41S4DKC&eS=51218>

Adres: Akbük Mah. Hakimiyet Cad. No:4/3 P.K. :05100 Merkez/Amasya
Telefon:0 (358) 211 5005 Faks:0 (358) 218 01 04
e-Posta:amasyauni@amasya.edu.tr Web: <http://www.amasya.edu.tr/>
Kep Adresi:amasyauniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Ebru GÜÇYETMEZ
Unvan: Bilgisayar İşletmeni
Tel No: 2115015



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ek 1 (devamı)

	T.C. AMASYA ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KURUL KARAR FORMU

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Karar No
06 Ocak 2022	1	01

KARAR NO 01:

Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Terapi ve Rehabilitasyon Bölümü Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN'ın yürütücülüğünde olan ve Yardımcı Araştırmacı olarak yer alan Tokat Erbaa Devlet Hastanesi'nde görev yapan Uzman Doktor Nezahat KOŞAR ile Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nde öğrenim gören Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi ve Tokat Erbaa Anadolu İmam Hatip Lisesi'nde görev yapan Biyoloji Öğretmeni Özge KULAÇ'ın işbirliğinde, Tokat Erbaa Devlet Hastanesi'nde yapılması öngörülen *"Klinik Örneklerden İzole Edilen Klebsiella Pneumoniae İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilinin ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması"* konulu tez çalışması, Kurul tarafından proje araştırma etiği yönünden değerlendirildi ve incelendi.

Söz konusu tez çalışmasının yürütülmesinin ve uygulanmasının etik olarak uygun olduğuna katılanların oybirliğiyle karar verildi.

		KABUL	RED
BAŞKAN	Doç. Dr. Güzide ŞENEL	İMZA	
BAŞKAN YARDIMCISI	Dr. Öğr. Üyesi Safiye ÖZKAN	İMZA	
RAPORTÖR	Dr. Öğr. Üyesi Ece AVUĞLU YILMAZ	İMZA	
ÜYELER	Doç. Dr. Levent SEMİZ	İMZA	
	Dr. Öğr. Üyesi Burak YAZGAN	İMZA	
	Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN	OY KULLANMADI	
	Dr. Öğr. Üyesi Kenan GÜMÜŞ	İMZA	
	Dr. Öğr. Üyesi Hüsnâ KAYA KAÇAR	İMZA	
	Dr. Öğr. Üyesi Serkan ZENGİN	İMZA	

Ek 2: T.C. Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Değişiklik Toplantı Formu

Evrak Tarih ve Sayısı: 12.04.2023-125736



T.C.
AMASYA ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : E-76988455-044-125736
Konu : Etik Kurul Değişiklik Onayı

12.04.2023

Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN
Dr. Öğretim Üyesi

İlgi : 29.03.2023 tarihli ve 3980 sayılı dilekçeniz.

İlgi'de kayıtlı dilekçenize istinaden; Kurulumuzun 06/01/2022 tarihli ve 01 sayılı kararı ile uygun görülen "*Klinik Örneklerden İzole Edilen Klebsiella Pneumoniae İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilinin ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması*" konulu tez çalışması ile ilgili tarafınızca istenilen eklemeler, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulumuz tarafından incelenmiştir.

Söz konusu tez çalışması ile ilgili istenilen eklemelerin uygun olduğu kanaatine varılmış olup, Değişiklik Toplantı Formu'nun bir örneği ilişikte gönderilmiştir.
Bilgilerini rica ederim.

Doç. Dr. Güzide ŞENEL
Etik Kurul Başkanı

Ek:Değişiklik Toplantı Formu (1 Sayfa)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSRBP30EKS Pin Kodu :11572

Belge Takip Adresi :

<https://turkiye.gov.tr/cbd/cK-55446eD-BSRBP30EKS&eS-125736>

Adres: Akbük Mah. Hükümet Cad. No:4/3 P.K. :05100 Merkez/Amasya
Telefon:0 (358) 211 5005 Faks:0 (358) 218 01 04
e-Posta:genclerlekterlik@amasya.edu.tr Web: <http://www.amasya.edu.tr/>
Kep Adresi:amasyauniversitesi@hs01.kep.tr

Bilgi için: Ebru GÜÇYETMEZ
Unvanı: Bilgiyayın İletmeni
Tel No: 2115015



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Ek 2 (devamı)

	T.C.
	AMASYA ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
DEĞİŞİKLİK TOPLANTI FORMU	

Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Toplantısı	
Toplantı Tarihi/Saati	06/04/2023 – 13.00
Toplantı Konusu	Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN'ın Yardımcı Araştırmacı ve Merkez Ekleme Talebi Hk.

Toplantıda Alınan Karar
Amasya Üniversitesi Sabuncuoğlu Şerefeddin Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN'ın yürüttüğü çalışmaya, yardımcı araştırmacı ve merkez eklemeleri yapılması talebini içeren 29/03/2023 tarihli ve 3980 sayılı dilekçesi görüşüldü. Amasya Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulumuzun 06/01/2022 tarihli ve 01 sayılı kararı ile uygun görülen "<i>Klinik Örneklerden İzole Edilen Klebsiella Pneumoniae İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilinin ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması</i>" konulu tez çalışması için istenilen; - Yardımcı araştırmacı olarak Tokat Devlet Hastanesi'nde görev yapan Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Uzmanı Pervin Özlem BALCI ile Samsun Bafra Devlet Hastanesi'nde görev yapan Uzman Doktor Seda GÜDÜL HAVUZ'un eklenmesi, -Laboratuvarlarda gelişen bazı problemlerden dolayı gerekli olan izolat sayısına ulaşılamadığından dolayı Tokat Devlet Hastanesi ve Samsun Bafra Devlet Hastanesinin eklenmesi ile ilgili talebin uygun olduğuna katılanların oy birliğiyle karar verilmiştir.

Görevi	Unvanı-Adı-Soyadı	İmza
BAŞKAN	Doç. Dr. Güzide ŞENEL	İMZA
BAŞKAN YARDIMCISI	Dr. Öğr. Üyesi Safiye TEMEL	İMZA
RAPORTÖR	Dr. Öğr. Üyesi Ece AVULOĞLU YILMAZ	İMZA
ÜYELER	Doç. Dr. Kenan GÜMÜŞ	KATILMADI
	Doç. Dr. Banuhan ŞAHİN	İMZA
	Doç. Dr. Burak YAZGAN	KATILMADI
	Dr. Öğr. Üyesi Nurdan KARPUZ	İMZA
	Dr. Öğr. Üyesi Ceren BAŞKAN	OY KULLANMADI (İZİNLİ)
	Dr. Öğr. Üyesi Aslı KURTGÖZ	İMZA
	Dr. Öğr. Üyesi Neşe YAKŞI	İMZA
	Dr. Öğr. Üyesi Hanife KARA	İMZA

KYT-FRM-392

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : Özge KULAÇ

Bilimsel Faaliyetler

- 1-) Kulaç, Ö., Başkan, C., and G. İ., Tanrıkulu. (2022). Evaluation of Antibacterial Activities and DNA Interaction of Methanol Extract of *Mentha Pulegium*, 9th International Conference on Applied Sciences, June 11-12, Oral Presentation, Proceedings Book, Page: 116, Diyarbakır, Türkiye.
- 2-) Başkan, C., Kulaç, Ö., ve Koşar, N. “Klinik Örneklerden İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profilinin ve Virülans Faktörlerinin Araştırılması”. Amasya Üniversitesi BAP, Proje No: FMB-BAP 22-0563. Yardımcı Araştırmacı, Bütçe: 9.999,20. 2022-2023 (Devam ediyor)