

**GENİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN
Klebsiella pneumoniae İZOLATLARINDA ATIM POMPALARININ
DİRENÇ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

İbrahim TÜRKEK

DANIŞMAN

Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

Mayıs 2016

AMASYA

İbrahim TÜRKEK tarafından hazırlanan GENİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN *Klebsiella pneumoniae* İZOLATLARINDA ATIM POMPALARININ DİRENÇ GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ adlı bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

Biyoloji Anabilim Dalı, A. Ü.

Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, OMÜ

Yrd. Doç. Dr. Mustafa ÇAPRAZ

Dahili Tıp Bilimleri, A. Ü.

Tarih: 31/05/2016

Bu tez Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onamıştır.

Doç. Dr. Mehmet KARA

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

İbrahim TÜRKEK

**GENİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN
Klebsiella pneumoniae İZOLATLARINDA ATIM POMPALARININ DİRENÇ
GELİŞİMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN BELİRLENMESİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

İbrahim TÜRKEK

AMASYA ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2016

ÖZET

Klebsiella pneumoniae morbidite ve mortaliteden en çok sorumlu tutulan ve hastane enfeksiyonlarından en sık izole edilen *Klebsiella* türüdür. Beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta laktamaz enzim üretimi başta *Klebsiella pneumoniae* olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Enzimatik yolla oluşan bu direncin yanı sıra son yıllarda direnç gelişiminde atım pompa sistemleri önemli bir rol oynamaktadır. Bu çalışmada Eylül 2013-Temmuz 2015 tarihleri arasında 100 farklı hastanın çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 100 GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatının çoklu ilaç direncinde rol alan *acrA*, *ketM*, *kdeA*, *kexD* ve *kpnEF* pompa genlerinin antibiyotik direncindeki etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır. Otomatize sistemle tür tayini ve bu izolatların GSBL üretimi kombine disk testi ile doğrulanmıştır. Antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon testi ile incelenen izolatların %72'si seftazidime, %79'u aztreonama, %54'ü siprofloksasine, %32'si ertapeneme, %74'ü tobramisine, %65'i tetrasikline ve tamamı ampicilin, seftriakson ve sefotaksime dirençli bulunmuştur. *acrA*, *ketM*, *kdeA*, *kexD* ve *kpnEF* gen bölgelerinin ekspresyon seviyeleri gerçek zamanlı PZR yöntemi ile belirlendi. *acrA* gen ekspresyonu siprofloksasine duyarlı izolatlarda dirençliliklere göre anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. RND tip pompa proteini olan *kexD* gen ekspresyonu ise tobramisine ve aztreonama dirençli izolatlarda duyarlılara göre anlamlı bir şekilde artış göstermiştir.

Anahtar sözcükler: *Klebsiella pneumoniae*, Antibiyotik direnci, Atım pompaları

**DETERMINATION OF EFFECTS OF EFFLUX PUMPS ON
RESISTANCE IN EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE (ESBL)
PRODUCING *Klebsiella pneumoniae***

(MSc.Thesis)

İbrahim TÜRKEKEL

AMASYA UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

May 2016

ABSTRACT

***Klebsiella pneumoniae* is held the most responsible for morbidity and mortality and the most frequently isolated *Klebsiella* species from hospital infections. Beta lactamase enzyme production that inactivates beta lactam antibiotics by hydrolyzing them is one of the most important resistance mechanism among many types of bacteria especially in *Klebsiella pneumoniae*. Efflux pump systems plays an important role in recent years as well as resistance occurring by enzymatic pathway. In this study it is aimed to study the effectiveness of *acrA*, *ketM*, *kdeA*, *kexD* and *kpnEF* efflux pump genes that involved in multidrug resistance in various clinical samples of 100 ESBL producing *Klebsiella pneumoniae* isolated between September 2013-July 2015. Determination of identification of isolates was done by automated system and ESBL production was confirmed by combined disk test. Antibiotic susceptibility was done by disk diffusion test and 72% of these isolates resistant to ceftazidime, 79% to aztreonam, 54% to ciprofloxacin, 32% to ertapenem, 74% to tobramycin, 65% to tetracycline and all isolates resistant to ampicillin, ceftriaxone and cefotaxime. Expression levels of *acrA*, *ketM*, *kdeA*, *kexD* and *kpnEF* was determined by real time PCR. Expression level of *acrA* in ciprofloxacin susceptible strains is significantly increased as compared to resistant strains. Expression of RND type pump protein of *kexD* gene is significantly increased in tobramycin and aztreonam resistant strains as compared to susceptible strains.**

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, Antibiotic resistance, Efflux pump

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesinde, tezimin her aşamasında desteğini ve yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübesiyle bana rehberlik eden saygıdeğer hocam Doç. Dr. Tuba YILDIRIM'a en içten dileklerle teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ve hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen Uzman Dr. Burak YAZGAN'a teşekkür ederim.

Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı altyapı imkanlarını kullanımına sunan Yrd. Doç. Dr. Melek GÜL'e ve Uzman Ersin İNKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim boyunca ders aldığım hocalarım Doç. Dr. Birsen AYDIN KILIÇ'a, Yrd. Doç. Dr. Neslihan KARAVİN'e, Yrd. Doç. Dr. Önder İDİL'e ve Arş. Gör. Ceren YAVUZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Bakteri örneklerinin toplanmasında emek harcayan Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Uzman Dr. Melek BİLGİN ve Uzman Dr. Eşe BAŞBULUT'a teşekkürlerimi sunarım.

Her türlü konuda yardımlarını ve desteklerini hissettiğim arkadaşlarım; Hamdi ÖZKUL, Gülşah GÜNDOĞDU, Ali TOKATLI, İkbâl MACİT, Dilber ÖZGÜN ve diğer tüm arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimi almam konusunda desteklerini esirgemeyen Sayın Derya Gürel ALTÜRK'e teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan ve bana her zaman güvenen aileme tüm kalbimle teşekkür ederim.

Bu çalışma Amasya Üniversitesi BAP birimi tarafından FMB-BAP 14-079 numaralı proje ile desteklenmiştir ve Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi (AUMAULAB) imkanları kullanılarak yapılmıştır. Katkılarından dolayı Amasya Üniversitesi Rektörlüğü'ne teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLoların LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xii
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Hastane Enfeksiyonları.....	4
2.2. Hastane Enfeksiyonlarının Önemi.....	5
2.3. Hastane Enfeksiyonuna Neden Olan Mikroorganizmalar.....	6
2.3.1. Virüsler.....	8
2.3.2. Parazit ve mantarlar.....	8
2.3.3. Bakteriler.....	8
2.3.3.1. <i>Staphylococcus aureus</i>	9
2.3.3.2. Koagülaz negatif Stafilokok.....	10
2.3.3.3. <i>Escherichia coli</i>	10
2.3.3.4. Vankomisine dirençli Enterokok.....	11
2.3.3.5. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
2.3.3.6. <i>Acinetobacter baumannii</i>	13
2.4. <i>Enterobacteriaceae</i> Familyasının Genel Özellikleri.....	14
2.5. <i>Klebsiella</i> spp.'nin Genel Özellikleri.....	15
2.5.1. Mikrobiyolojik özellikleri.....	16
2.5.2. Biyokimyasal özellikleri.....	17
2.5.3. Antijen yapıları ve virülans faktörleri.....	18
2.5.4. Yaptığı hastalıklar.....	20
2.5.5. Epidemiyoloji ve korunma.....	21

2.5.6. Tedavi.....	21
2.6. Antibiyotiklere Karşı Direnç Gelişimi.....	21
2.6.1. Doğal (İntrinsik) direnç.....	23
2.6.2. Kazanılmış (Kalıtsal) direnç.....	24
2.6.2.1. Kromozomal direnç.....	24
2.6.2.2. Ekstrakromozomal direnç.....	25
2.6.2.2.1. Plazmidler.....	25
2.6.2.2.2. Transpozonlar ve insersiyon dizileri.....	26
2.6.2.2.3. İntegronlar.....	27
2.7. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları.....	27
2.7.1. Antibiyotik inaktivasyonu.....	28
2.7.2. Hedef molekülün değişmesi.....	30
2.7.3. Dış membran geçirgenliği.....	31
2.7.4. Atım pompaları.....	32
2.7.4.1. ATP Binding Casette (ABC) süper ailesi.....	36
2.7.4.2. Major Facilitator (MFS) süper ailesi.....	36
2.7.4.3. Small Multidrug Resistance (SMR) süper ailesi.....	37
2.7.4.4. Resistance-Nodulation-Division (RND) süper ailesi.....	37
2.7.4.5. Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) süper ailesi.....	37
2.8. Atım Pompalarının Fizyolojik Rollerini.....	38
2.8.1. Patojenite ve virülanstaki rolleri.....	38
2.8.2. Hücreler arası iletişim.....	39
2.8.3. Biofilm oluşumundaki rolü.....	39
2.9. Atım Pompaları ile Oluşan Direncin Önlenmesi.....	40
2.9.1. Pompa mekanizmasını atlama.....	40
2.9.2. Biyolojik inhibisyon.....	40
2.9.3. Farmakolojik inhibisyon.....	40
2.10. Pompa Aktivitesini Araştırma Yöntemleri.....	41
2.11. GSBL Doğrulama Testleri.....	42
2.11.1. Kombine disk testi.....	43
2.11.2. Çift disk sinerji testi.....	43

2.11.3. E-test yöntemi.....	44
2.11.4. Mikrodilüsyon testi.....	44
2.11.5. Üç boyutlu test.....	44
2.11.6. Otomatize sistemler.....	45
2.11.7. Moleküler teknikler.....	45
3. MATERYAL VE METOT.....	46
3.1. Materyal.....	46
3.1.1. Bakteri örnekleri.....	46
3.1.2. Cihazlar.....	46
3.1.3. Sarf malzemeler.....	47
3.1.4. Kimyasallar.....	47
3.1.5. Antibiyotik diskleri.....	47
3.1.6. Referans suşlar.....	48
3.1.7. Besiyeri ve çözeltiler.....	48
3.1.8. Primerler.....	53
3.2. Metot.....	53
3.2.1. Suşların saklanması.....	53
3.2.2. Antibiyotik duyarlılık testi.....	53
3.2.3. Kombine disk testi.....	54
3.2.4. Total RNA izolasyonu.....	55
3.2.5. Total RNA miktarının ve saflığının ölçülmesi.....	56
3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi.....	56
3.2.7. Primer dizileri.....	57
3.2.8. Primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu.....	58
3.2.9. PZR ürünlerinin elektroforezi.....	59
3.2.10. Gerçek zamanlı PZR ile gen ekspresyonlarının belirlenmesi.....	59
3.2.11. Erime eğrisi analizi ve agaroz jel elektroforezi.....	60
3.2.12. Gen ekspresyonunun kantitasyonu.....	61
3.2.13. İstatistiksel analiz.....	61
4. BULGULAR.....	62
4.1. İzolatların Genel Özellikleri.....	62
4.2. İzolatların Gönderildiği Servislere Göre Dağılımı.....	62

4.3. İzolatların Elde Edildiği Materyallerin Dağılımı.....	63
4.4. Hastaların Cinsiyet ve Yaş Özellikleri.....	63
4.5. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	64
4.6. Kombine Disk Testi ile GSBL Doğrulama.....	74
4.7. Total RNA Miktarı ve Saflığı.....	75
4.8. Primer Bağlanma Sıcaklığı Optimizasyon Sonuçları.....	77
4.8.1. 16S PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu.....	77
4.8.2. acrA PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu.....	77
4.8.3. kdeA PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu.....	78
4.8.4. ketM PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu.....	79
4.8.5. kpnEF PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu.....	79
4.8.6. kexD PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu.....	80
4.9. Gerçek Zamanlı PZR Amplifikasyon Eğrileri.....	81
4.10. Gen Ekspresyon Düzeyleri ve Kantitasyonu.....	88
4.11. Gen Ekspresyon Seviyesi ile Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişki.....	92
4.12. Erime Eğrisi Analizi ve Agaroz Jel Elektrofrez Sonuçları.....	101
4.12.1. 16S erime eğrisi analizi ve jel elektrofrez görüntüsü.....	101
4.12.2. acrA erime eğrisi analizi ve jel elektrofrez görüntüsü.....	103
4.12.3. kdeA erime eğrisi analizi ve jel elektrofrez görüntüsü.....	105
4.12.4. ketM erime eğrisi analizi ve jel elektrofrez görüntüsü.....	107
4.12.5. kpnEF erime eğrisi analizi ve jel elektrofrez görüntüsü.....	109
4.12.6. kexD erime eğrisi analizi ve jel elektrofrez görüntüsü.....	111
5. TARTIŞMA.....	114
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	131
KAYNAKLAR.....	133
EKLER.....	152
EK-1 Etik Kurulu Onay Formu.....	153
ÖZGEÇMİŞ.....	154

TABLOLARIN LİSTESİ

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Mikroorganizmalar ve yaptığı hastalıklar.....	7
Tablo 2.2. Farklı taksonomik sistemlerde <i>Klebsiella</i> genusunun sınıflandırılması...	16
Tablo 2.3. <i>Klebsiella</i> cinsine ait biyokimyasal reaksiyonlar.....	18
Tablo 2.4. Antibiyotiklerin ve direnç oluşumunun değişim süreci.....	22
Tablo 2.5. Bazı bakteri ve bakteri gruplarındaki doğal direnç.....	24
Tablo 2.6. Antibiyotiklerin hedef bölgeleri ve direnç mekanizmaları.....	28
Tablo 2.7. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'de atım pompa proteinleri.....	35
Tablo 2.8. Atım pompa ailelerine ait proteinlerin özellikleri.....	35
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, kodları, disk içeriği ve zon çapları.....	54
Tablo 3.2. Primer dizileri ve ampikon uzunlukları.....	57
Tablo 3.3. PZR karışımı.....	58
Tablo 3.4. PZR koşulları.....	58
Tablo 3.5. Gerçek zamanlı PZR karışımı.....	59
Tablo 3.6. Gerçek zamanlı PZR koşulları.....	60
Tablo 4.1. Servislere göre hastaların dağılımı.....	62
Tablo 4.2. Klinik materyallere göre dağılım.....	63
Tablo 4.3. Total RNA miktar ve saflığı.....	76
Tablo 4.4. Referans suş ve izolatlara ait Ct değerleri.....	89
Tablo 4.5. İzolatların <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700721 referans suşuna göre kat değişim değerler.....	91

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Mobil genetik elementler.....	25
Şekil 2.2. Atım pompa protein aileleri.....	33
Şekil 4.1. İzolatların seftazidime karşı duyarlılık oranları.....	65
Şekil 4.2. Seftazidime karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı.....	65
Şekil 4.3. İzolatların sefotaksime karşı duyarlılık oranları.....	66
Şekil 4.4. Sefotaksime karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı.....	66
Şekil 4.5. İzolatların seftriaksona karşı duyarlılık oranları.....	67
Şekil 4.6. Seftriaksona karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı.....	67
Şekil 4.7. İzolatların aztreonama duyarlılık oranları.....	68
Şekil 4.8. Aztreonama karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı.....	68
Şekil 4.9. İzolatların siprofloksasine duyarlılık oranları.....	69
Şekil 4.10. Siprofloksasine karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı.....	69
Şekil 4.11. İzolatların ertapeneme karşı duyarlılık oranları.....	70
Şekil 4.12. Ertapeneme karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı.....	70
Şekil 4.13. İzolatların tobramisine karşı duyarlılık oranları.....	71
Şekil 4.14. Tobramisine karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı.....	71
Şekil 4.15. İzolatların ampisiline karşı duyarlılık oranları.....	72
Şekil 4.16. Ampisiline karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı.....	72
Şekil 4.17. İzolatların tetrasikline karşı duyarlılık oranları.....	73
Şekil 4.18. Tetrasikline karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı.....	73
Şekil 4.19. İzolatların çoklu ilaca direnç profilleri.....	74

Şekil	Sayfa
Şekil 4.20. İzolatların GSBL profilleri.....	74
Şekil 4.21. 16S genine ait amplifikasyon eğrisi.....	82
Şekil 4.22. acrA genine ait amplifikasyon eğrisi.....	83
Şekil 4.23. kdeA genine ait amplifikasyon eğrisi.....	84
Şekil 4.24. ketM genine ait amplifikasyon eğrisi.....	85
Şekil 4.25. kpnEF genine ait amplifikasyon eğrisi.....	86
Şekil 4.26. kexD genine ait amplifikasyon eğrisi.....	87
Şekil 4.27. Seftazidime dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	93
Şekil 4.28. Aztreonama dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	94
Şekil 4.29. Siprofloksasine dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	95
Şekil 4.30. Ertapeneme dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	97
Şekil 4.31. Tobramisine dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	98
Şekil 4.32. Tetrasikline dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri.....	100
Şekil 4.33. 16S gen bölgesine ait erime eğrisi analizi.....	102
Şekil 4.34. acrA gen bölgesine ait erime eğrisi analizi.....	104
Şekil 4.35. kdeA gen bölgesine ait erime eğrisi analizi.....	106
Şekil 4.36. ketM gen bölgesine ait erime eğrisi analizi.....	108
Şekil 4.37. kpnEF gen bölgesine ait erime eğrisi analizi.....	110
Şekil 4.38. kexD gen bölgesine ait erime eğrisi analizi.....	112

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. MacConkey agarda mukoid ve laktoz pozitif <i>Klebsiella pneumoniae</i> görüntüsü.....	17
Resim 4.1. Farklı antibiyotiklere karşı oluşan zon çapları.....	64
Resim 4.2. GSBL üretimi doğrulanmış izolat.....	75
Resim 4.3. 16S gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü.....	77
Resim 4.4. <i>acrA</i> gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü.....	78
Resim 4.5. <i>kdeA</i> gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü.....	78
Resim 4.6. <i>ketM</i> gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü.....	79
Resim 4.7. <i>kpnEF</i> gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü.....	80
Resim 4.8. <i>kexD</i> gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü.....	80
Resim 4.9. 16S gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan amplikonların jel görüntüsü.....	103
Resim 4.10. <i>acrA</i> gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan amplikonların jel görüntüsü.....	105
Resim 4.11. <i>kdeA</i> gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan amplikonların jel görüntüsü.....	107
Resim 4.12. <i>ketM</i> gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan amplikonların jel görüntüsü.....	109
Resim 4.13. <i>kpnEF</i> gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan amplikonların jel görüntüsü.....	111
Resim 4.14. <i>kexD</i> gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan amplikonların jel görüntüsü.....	113

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
°C	Santigrat Derece
%	Yüzde
bp	Baz çifti
dH ₂ O	Distile Su
g	Gram
g/L	Gram/litre
HCl	Hidroklorik Asit
Kb	Kilobaz
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mg/ml	Miligram/mililitre
MgCl ₂	Magnezyum Klorür
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
ng	Nanogram
rpm	Dakikada Dönüş Hızı

Simgeler**Açıklama****U/ μ l**

Unite/mikrolitre

V

Volt

 β

Beta

 μ g/ml

Mikrogram/mililitre

 μ m

Mikrometre

 μ M

Mikromolar

 μ l

Mikrolitre

Kısaltmalar**Açıklama****ATCC**

Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

ABC

ATP Binding Cassette

ABD

Amerika Birleşik Devletleri

AIDS

Acquired Immune Deficiency Syndrome

AM

Ampisilin

ATM

Aztreonam

ATP

Adenozin Trifosfat

BHI

Brain Heart Infusion

CAZ

Seftazidim

CDC

Centers for Disease Control

cDNA

Komplementer DNA

CLSI

Clinical and Laboratory Standards Institute

CIP

Siprofloksasin

CRO

Seftriakson

CTX

Sefotaksim

CTC

Sefotaksim/klavulanik asit

Ct

Cycle Threshold

CZC

Seftazidim/klavulanik asit

EMB

Eosin Methylene Blue

ETP

Ertapenem

GSBL

Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz

MFS

Major Facilitator Superfamily

MATE

Multidrug and Toxic Compound Extrusion

Kısaltmalar**Açıklama****MRSA**Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus***MHA**

Mueller-Hinton Agar

MİK

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

NN

Tobramisin

OD

Optical Density

PBP

Penisilin Bağlayıcı Protein

PZR

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RND

Resistance-nodulation-cell division

siRNA

Small interfering RNA

SMR

Small Multidrug Resistance

T_m

Bağlanma Sıcaklığı

TSA

Tryptic Soy Agar

TSB

Tryptic Soy Broth

TE

Tetrasiklin

UV

Ultraviyole

VRE

Vankomisin Dirençli Enterokok

1. GİRİŞ

Günümüzde uygulanan enfeksiyon kontrol önlemlerindeki gelişmelere karşın hastane enfeksiyonları 19. asırdan beri önemli bir sağlık sorunu olma özelliğini korumaktadır. Gelişmiş ülkelerde yatarak tedavi gören hastaların %5-10'unda hastane enfeksiyonu görülürken bu oran gelişmekte olan ülkelerde %25'lere kadar çıkmaktadır [Koçulu, 2010].

Klebsiella pneumoniae insan sağlığı açısından önemli olan nozokomiyal enfeksiyonlar, üst solunum yolu enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları oluşmasında rol alan fırsatçı gram negatif bir patojendir. İnsan kalın barsağında ve %5-10 oranında da üst solunum yolları mikroflorasında yer almaktadır. Bakteriyemilerin %2'sinde, pnömonilerin %12'sinde ve cerrahi yaraların %3'ünde etken olarak bulunmaktadır. İdrar yolu enfeksiyonlarında ikinci en fazla görülen bakteri türüdür [Aladağ, 2006].

Son yıllarda birçok antibiyotik direnç mekanizmasının bir arada etki göstermesi ile klinikte kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli bakterilere rastlanılmaktadır. Özellikle direnç genlerinin plazmidler ile aktarılabilir olması ve bu plazmidler üzerinde çok sayıda antibiyotik direnç geninin bir arada bulunabilmesi direncin hızla yayılımının yanında birçok antibiyotiğin de klinik kullanımdan kaldırılmasına neden olmuştur. Beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getiren beta laktamaz enzimi üretimi başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Geniş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* suşları çoğunlukla birden fazla antibiyotiğe dirençli olduklarından bu mikroorganizmalar ile gelişen enfeksiyonlarda tedavi seçenekleri kısıtlıdır [Abiha, 2013].

Antibiyotiklerin enzimatik yolla hidrolizi ya da modifikasyonu ve ilacın hedefi olan molekülde mutasyon sonucu ortaya çıkan değişim en çok çalışılan ve en iyi bilinen antibiyotik direnç mekanizmalarıdır. Bu mekanizmalar genellikle yapısal olarak benzerlik gösteren antibiyotiklere karşı etkin olup substrat profilleri sınırlıdır.

Aminoglikozid modifiye edici enzimlerin aminoglikozid grubu antibiyotiklere, penisilin bağlayan proteinlerde ortaya çıkan bir mutasyonun beta laktam grubu antibiyotiklere, DNA giraz enziminde ortaya çıkan bir mutasyonun ise sadece kinolon grubu antibiyotiklere karşı dirence yol açması bu özgül direnç mekanizmalarının tipik örnekleridir [Çalgın, 2012].

İlk kez 1976'da memeli hücre membranında yer alan P-glikoproteininin kanser ilaçlarına, daha sonra bakteri hücre membranında yer alan Tet pompa proteininin tetrasiklin direncine yol açtığı belirlenmiştir. Bunu takiben yapılan çalışmalar çoklu ilaç direncine yol açan aktif pompa genlerinin bakterilerde ve diğer birçok patojen mikroorganizmada yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir [Hasdemir, 2007].

Prokaryotlarda en son keşfedilen direnç mekanizması olarak *Escherichia coli*'de tetrasiklin direncine neden olan plazmid kaynaklı Tet proteini bakterilerde keşfedilen ilk atım pompa mekanizmasıdır. Daha sonraki yıllarda plazmid veya kromozom kaynaklı, tek antibiyotiğe özel veya çoklu antibiyotik direncine sebep olan birçok farklı gen keşfedilmiştir. Amino asit dizilimlerindeki homoloji baz alınarak bu proteinler beş süper protein ailesinde toplanmaktadır: "ATP binding cassette" süper ailesi (ABC), "Major facilitator" süper ailesi (MFS), "Small multidrug resistance" süper ailesi (SMR), "Multidrug and toxic compound extrusion" (MATE) süper ailesi, "Resistance-nodulation-cell division" (RND) süper ailesi [Poole, 2005; Hasdemir, 2007].

Son yıllarda antibiyotiklere karşı direnç oluşturan klinik izolatın hızla artması, buna karşın yeni antibiyotiklerin düşük hızda geliştirilmesi ve piyasaya sürülmesi önemli bir problem olarak görülmektedir. Bu artış ve azalışa bağlı olarak tedavide sorunlar ortaya çıkmakta ve bir gün bakteri kaynaklı patojenlere karşı "silahsız" durumda kalılabileceği göz ardı edilmemelidir. Sonuç olarak enfeksiyon hastalıklarına karşı artan seviyede morbidite ve mortalite görüleceği unutulmamalıdır [Fernandez ve Hancock, 2012].

Bu çalışmada GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi ve atım pompalarının oluşumunda görev alan kpnEF, kdeA, kexD, acrA ve ketM genlerinin ekspresyonlarının gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak çalışılması amaçlanmıştır. Seftazidim, aztreonam, siprofloksasin, ertapenem, tobramisin ile tetrasikline dirençli ve duyarlı suşlar arasındaki ekspresyon miktarları kıyaslanarak iki grup arasındaki ekspresyon farklılıklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamızın *Klebsiella pneumoniae*'de bulunan atım pompalarının bir çok üyesinin aynı anda araştırılması ve klinik örneklerle çalışılması açısından bu konuda mevcut literatür bilgilerine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Hastane Enfeksiyonları

Hastane enfeksiyonu latince nosos (hastalık), komeion (tedavi) ve nosokomeion (hastane) sözcüklerinden türetilen “nozokomiyal enfeksiyon” olarak belirtilmektedir [Pearson, 2009]. Aynı zamanda “hastanede edinilen enfeksiyon” olarak belirtilse de 11.08.2005 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanarak yürürlüğe giren Yataklı Tedavi Kurumları Enfeksiyon Kontrol Yönetmeliğinde “yataklı tedavi kurumlarında sağlık hizmetleri ile ilişkili olarak gelişen tüm enfeksiyonlar” şeklinde tanımlanmıştır [T.C. Resmi Gazete, 2005]. Fakat literatürde ve uygulamada, farklı nedenlerle hastaneye yatan bir hastada, hastaneye başvurduğunda inkübasyon döneminde olmayan ve hastaneye yatıştan 48-72 saat geçtikten sonra veya hasta taburcu olduktan sonra 10 gün içinde ortaya çıkabilen enfeksiyonlar olarak tanımlanmaktadır [Aydın, 2013].

Bir enfeksiyonun hastane enfeksiyonu olup olmadığına; klinik gözlem, laboratuvar sonuçları, hasta kayıtlarının değerlendirilmesi ve diğer destekleyici bulgular dikkate alınarak karar verilmektedir. Hastaneye yatmadan önce gelişen enfeksiyonlar ve bu enfeksiyonların komplikasyonları, hastaneye yatıldığında kuluçka döneminde olan veya plasenta yoluyla geçen enfeksiyonlar hastane enfeksiyonu değildir [Doğanay, 2004].

1950’li yıllarda Amerika Birleşik Devletleri (ABD)’nde hastanelerde stafilokok enfeksiyonlarının ve bu bakterinin penisiline direncinin artması sağlık çalışanları için önemli bir sorun olmaya başlamıştır. Bunun üzerine 1958 yılında ABD’de her hastanede Hastane İnfeksiyonları Kontrol Komitesi (HİKK) oluşturulmasının gerekliliği belirtilmiştir. Daha sonra Centers for Disease Control (CDC) tarafından pilot çalışmalar başlatılmıştır. Bunu izleyen Comprehensive Hospital Infections Project (CHIP) ve National Nosocomial Infections Study (NNIS) ile temel kavramlar belirlenmiş, hastane enfeksiyonlarının önemi ortaya konulmuştur [Töreci, 1997; Akhan ve Hayran, 1997].

Hastane kaynaklı enfeksiyonlar hasta güvenliği ile ilgili işlemlerde değişikliğe neden olmaktadır. Birleşik Devletlerde hastane kaynaklı enfeksiyonlar ölüm nedenleri arasında 6. sırada yer almaktadır ve yaklaşık 99 000 ölümlle ilişkilidir [Peleg ve Hooper, 2010]. Çağımızın en önemli sorunlarından biri olmakla beraber hastaneye yatan her 100 kişiden servislere göre değişmek üzere 3 ile 10 arasında değişen kişinin iyileşmeyi beklerken hastalanması, hastanede kalış süresinin uzaması, tedavi maliyetinin artması, bir kısmının ölümlle yüz yüze gelmesi, hatta kaybedilmesi bile sorunun boyutlarını tam olarak görmeye yetebilir [Günaydın ve ark., 2002].

2.2. Hastane Enfeksiyonlarının Önemi

Hastane enfeksiyonları hastanede yatış süresini 20 kat, maliyeti ise 5 kat artırmaktadır. Fakat en önemlisi de mortaliteyi arttırmaktadır. Yapılan çalışmalarda hastane enfeksiyonlarının en az üçte birinin önlenemez olduğu belirtilmiştir. Yüksek morbidite, mortalite ve artan tedavi maliyetlerine sebep olan bu enfeksiyonlardan korunmaya yönelik tedbirlerin alınması ve her kurumun kendi içinde enfeksiyon kontrol programını oluşturması zorunlu olmaktadır. Özellikle immün sistemi zayıf olan hastalarda (yenidoğan, prematüre bebekler, kanser ve AIDS hastaları, yaşlı hastalar, vb.) ölümlere yol açabilmektedir. Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda yatan hastalarda %3,1-14,1 oranında değişen hastane enfeksiyonu geliştiği belirlenmiştir [Hancı, 2010].

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre hastanelerde yatan her on hastadan birinde hastane enfeksiyonu gelişmektedir. 1980'li yılların başlarından itibaren ABD'de yatan hastaların %5-6'sında ortaya çıkmakla beraber toplam hastane enfeksiyonu vaka sayısı yılda 2,1 milyondur. Hastane enfeksiyonuna bağlı ölüm sayısı ise yılda yaklaşık 90 000 civarındadır. İngiltere'de her yıl ortalama 100 000 hastane enfeksiyonu vakası görülmekle birlikte ölümlerin %1'inin (yaklaşık 5 000) doğrudan, %3'ünün ise dolaylı olarak hastane enfeksiyonları ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Ülkemizde ise hastane enfeksiyonu önemli bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır. Verilere ulaşım aşamasında sıkıntılar olmakla birlikte

Türkiye’de hastane enfeksiyonu oranının %5 ile %15 arasında olduğu kabul edilmektedir [Sayıştay Raporu, 2007].

2.3. Hastane Enfeksiyonuna Neden Olan Mikroorganizmalar

Nozokomiyal enfeksiyonlar birçok mikroorganizma tarafından oluşturulmakta ve her biri enfeksiyon oluşturabilme potansiyeline sahip olmaktadır. Bakteriler enfeksiyonların %90’ını oluştururken protoza, mantar, virüs ve mikobakterler geri kalan kısmı oluşturmaktadır [Gatermann ve ark., 2005]. Yaygın olarak görülen mikroorganizmalar, dirençli oldukları ilaçlar ve yaptığı hastalıklar Tablo 2.1’de verilmiştir.

Tablo 2.1. Mikroorganizmalar ve yaptığı hastalıklar [Tanwar ve ark., 2014]

	İlaça Direnci	Tipik Hastalık
Bakteri		
<i>Escherichia coli</i>	Sefalosporinler ve florokinolonlar	İdrar yolu enfeksiyonu ve kan dolaşımı enfeksiyonu
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Sefalosporinler ve karbapenemler	Pnömoni, kan dolaşımı ve üriner sistem enfeksiyonu
<i>Staphylococcus aureus</i>	Metisilin	Yara ve kan dolaşımı enfeksiyonu
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Penisilin	Pnömoni, menenjit ve kulak iltihabı
Tifoya yol açmayan <i>Salmonella</i>	Florokinolon	Gıda kaynaklı ishal ve kan dolaşımı enfeksiyonu
<i>Shigella</i> türleri	Florokinolon	İshal
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Sefalosporinler	Bel soğukluğu
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Rifampisin, izoniazid ve florokinolon	Tüberküloz
Mantar		
<i>Candida</i> spp.	Flukonazol ve ekinokandinler	Kandidiaz
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Flukonazol	Kriptokokkoz
<i>Aspergillus</i> spp.	Azoller	Aspergillozis
<i>Scopulariopsis</i> spp.	Amfoterisin B, flusitozin ve azoller	Onikomikoz
Virüs		
Sitomegalovirüs (CMV)	Gansiklovir ve foparnet	AIDS ve onkoloji hastalarında
Herpes simpleks virüs (HSV)	Asiklovir, famsiklovir ve valasiklovir	Herpes simpleks
İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü (HIV)	Antiretroviral ilaçlar	AIDS
Influenza virüsü	Adaman türevleri ve nöraminidaz inhibitörleri	İnfluenza
Varisella zoster virüs	Asiklovir ve valasiklovir	Suçiçeği
Hepatit B virüsü (HBV)	Lamivudin	Hepatit B
Parazit		
<i>Plasmodia</i> spp.	Klorokin, artemisinin ve atovakuon	Sıtma
<i>Leishmania</i> spp.	Beş değerli antimonaller, miltefosin, paromomisin, amfoterisin B	Leishmaniasis
<i>Schistosomes</i>	Prazikuantel ve oksamnigin	Şistozomiazis
<i>Entamoeba</i>	Metronidazol	Amebiasis
<i>Trichomonas vaginalis</i>	Nitroimidazoller	Trichomoniasis
<i>Toxoplasma gondii</i>	Artemisinin, atovakuon ve sülfadiazin	Toksoplazmosis

2.3.1. Virüsler

Genellikle parental (nakil, diyaliz, enjeksiyonlar veya endoskopi) ya da fekal-oral yolla yayılırlar. Hepatit A, B ve C, respiratuar sinsityal virüsü (RSV), rotavirüs ve enterovirüsler önemli virüslerdir. Norovirüs özellikle kış aylarında hastanede salgınların yaygın nedenidir [Ducel ve ark., 2002].

2.3.2. Parazit ve mantarlar

Çoğu mantar ve parazit fırsatçı patojen olarak uzun süreli antibiyotik tedavisi sırasında veya bağışıklığı ciddi olarak zayıflamış hastalarda enfeksiyona neden olurlar. *Giardia lamblia* hastanede yatan hastalar arasında kolaylıkla aktarılabilen bir parazit örneğidir. Aynı zamanda su kirliliği ile bağlantılıdır. Enfeksiyon asemptomatik veya semptomatik hastalığa neden olabilmektedir [Murray ve ark., 2015]. Dünya üzerinde yaklaşık dört milyar insanı etkilediği düşünülen parazitler etkenlerin özellikle gelişmekte olan ülkelerde ciddi halk sağlığı sorunu olmaya devam ettiği, kalabalık aile ortamları, temiz su ve gıdanın elde edilemediği ve çevre hijyeninin istenilen düzeyde olmadığı, alt yapı sistemlerinin yetersiz kaldığı bölgelerde bakteriyel patojenlere ek olarak parazitlerin de yaygınlığını ve çeşitliliğini artırdığı bildirilmektedir [Yula ve ark., 2011].

Mantar enfeksiyonları ise son yıllarda hastane enfeksiyonuna sebep olan ve 1 000 kişide ortalama 3,8 yatan hastada hastalığa neden olan fırsatçı patojendir. *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichosporon* ve *Malassezia* bunlara örnektir. Kandidiyaz hala en yaygın fungal hastane enfeksiyonu tipidir. İmmün sistemi baskılanmış konak, antibiyotik tedavisi, kemoterapi, intravasküler kateterler, nötropeni ve hemodiyaliz mantar enfeksiyonları için önemli risk faktörlerindedir [Weinstein, 1998].

2.3.3. Bakteriler

Hastane enfeksiyonlarında en fazla yer alan bakteriler *Streptococcus* spp., *Acinetobacter* spp., Enterokoklar, *Pseudomonas aeruginosa*, Koagülaz negatif

stafilokok, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Legionella* ve enterik bakteriler olan *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* ve *Serratia marcescens*'dir [Horan ve ark., 2008].

2.3.3.1. *Staphylococcus aureus*

Stafilokoklar *Micrococcaceae* ailesinde yer alan ve doğada geniş çapta bulunan gram pozitif koklardır [Bannerman, 2003]. *Staphylococcus aureus* için antibiyotik direnci ilk kez 1950'lerde bu bakteriye ait suşların penisilinleri parçalayan beta laktamaz enzimi üretmelerini sağlayan genler edinmeleriyle ortaya çıkmıştır [Cookson, 2000]. *Staphylococcus aureus*'a bağlı enfeksiyonlar 1940'larda penisilin ile tedavi edilirken bir zaman sonra bakterinin penisiline direnç kazanmasıyla tedavide başarısızlıklar görülmeye başlanmıştır. 1950'lerde eritromisin ve tetrasikline direnç geliştirmiş ve 1961'de Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) tanımlanmıştır [Kurutepe ve ark., 2007].

Staphylococcus aureus suşları hem hastane hem de toplumdaki bakteriyemi, pnömoni, endokardit, osteomyelit ve toksik şok sendromu gibi morbidite ve mortalitesi yüksek ciddi enfeksiyonların önemli bir nedeni olarak tanımlanmışlardır [Lowy, 1998]. Özellikle MRSA ve çoklu antibiyotik direnci gösteren suşların meydana getirdiği enfeksiyonların tedavisinde büyük sıkıntılar yaşanmaktadır [Maranan ve ark., 1997]. Bu bakterilere hastanelerde yatan hastalarda toplumdaki hastalara oranla daha sık rastlanılmaktadır. Uzun süren hastanede kalış, yaşlılık, altta yatan ciddi hastalıklar, yoğun antibiyotik kullanımı ve invazif işlemler bu bakterilerle gelişen enfeksiyonlar için başlıca risk faktörleridir [Derbentli, 2005]. European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS) verilerine göre MRSA oranları kuzey Avrupa ülkelerinde %5'in altında, İspanya, İngiltere, İtalya, Türkiye ve Yunanistan'da %25'in üzerinde, Malta ve Portekiz'de ise %50 civarında seyretmektedir [Kock ve ark., 2010].

2.3.3.2. Koagülaz negatif Stafilokok

Koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) insanların deri ve mukoza florasının önemli elemanlarından. Başta *Staphylococcus epidermidis* olmak üzere bütün türleri son yıllarda hastane enfeksiyonlarının önemli etkeni olmaktadır. *Staphylococcus haemolyticus* insanda doğal kapak endokarditi, septisemi, peritonit, üriner sistem enfeksiyonu, yara, kemik ve eklem enfeksiyonlarına yol açabilen ikinci en sık görülen KNS'dir [Bannerman, 2003]. KNS'ler göğüs ve kalp cerrahisi sonrası gelişen sternal osteomyelitler, protez eklem etrafındaki kemik enfeksiyonları ve enfekte hemodiyaliz şantlarından kaynaklanan hematogen osteomyelitlerin önemli etkenlerindedir. Bu grupta yer alan *Staphylococcus epidermidis* göz cerrahisi sonrasında gelişen enfeksiyonların en önemli nedenlerindedir. *Staphylococcus saprophyticus* ise özellikle doğurgan yaştaki sağlıklı kadınlarda komplike olmayan akut üriner sistem enfeksiyonu etkenleri arasında *Escherichia coli*'den sonra ikinci sırayı alır.

2.3.3.3. *Escherichia coli*

Enterobacteriaceae ailesine ait klinik örneklerden en sık izole edilen bakterilerin başında gelmektedir. İnsanda barsak flora konduğu olan *Escherichia coli* üriner sistem enfeksiyonları, hemolitik üremik sendrom (HÜS), pnömoni, sepsis, menenjit, ishal, apse, peritonit, sinüzit gibi önemli hastalıklara yol açmaktadır [Duman ve ark., 2010]. *Escherichia coli* hayvanların bağırsaklarına da yerleşebilmektedir. Dolayısıyla içme sularının ve gıdaların fekal kontaminasyonunun bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Aslında zararsızdır ancak toplumsal kaynaklı baktereminin en yaygın etkeni iken nozokomiyal baktereminin ise en yaygın görülen beşinci etkenini oluşturmaktadır [Friedman ve ark., 2002]. *Escherichia coli* tüm beta laktam antibiyotiklere hassas iken ilk defa 1987'de GSBL ürettiği bildirilen *Escherichia coli* suşları tespit edilmiştir [Bauernfeind ve Hörl, 1987].

Escherichia coli bakteri biyolojisinin anlaşılması nedeniyle üzerinde çok sık çalışılan ve mikrobiyolojik “rol model” olarak gösterilen bakteri türüdür [Leichert, 2011]. Bakterilerde gerçekleşen konjügasyon, genetik rekombinasyon, operon terimlerinin ortaya çıkarılmasında, DNA'nın çoğalması, klonlama ve protein sentezi gibi önemli olayların gözlenmesinde *Escherichia coli* bakterisi yaygın bir şekilde kullanılmıştır [Phornphisutthimas ve ark., 2007].

Hastane ortamında birçok farklı suşu görülmesinin yanı sıra *Escherichia coli* O157:H7 serovarı gıda kaynaklı patojen bakterilerin başında gelmektedir. EHEC (Enterohemorajik *Escherichia coli*) grubunda yer alan *Escherichia coli* O157:H7'nin neden olduğu hastalıklar hemorajik kolit (kanamalı diyare), hemolitik üremi sendromu (böbrek yetmezliği) ve trombotik trombositopenik purpuradır (trombosit eksikliğine bağlı kanama) [Coşansu ve Ayhan, 2000].

2.3.3.4. Vankomisine dirençli Enterokok

Enterokoklar sık izole edilmeleri, kuruluk, yüksek ısı gibi çevresel koşullara ve bazı antiseptiklere dayanıklı olmaları, cansız yüzeylerde canlılıklarını uzun süre koruyabilmeleri, çoklu antibiyotik direnci ve türe özgü direnç göstermelerinin yanı sıra yeni direnç geliştirme yeteneklerinden dolayı kolonizasyonları sonrasında özellikle bağışıklık sistemi bozuk olan hasta gruplarında nozokomiyal enfeksiyon etkenleri arasında sayılmaktadır [McGeer ve Low, 2000]. Bugüne kadar tanımlanan 35 tip enterokok içerisinde klinikte en önemlileri *Enterococcus faecalis* ve *Enterococcus faecium*'dur. Enterokok enfeksiyonlarının %80'inden bu iki mikroorganizma sorumludur [McGeer ve Low, 2000; Çelik ve Alhan, 2008].

Enterokokların antibiyotiklere direnç seviyelerindeki bu değişikliğin nedeni immünsüpre hastaların sayısının artması, yaşam ve hastanede yatış sürelerinin uzaması, sefalosporinler ve kinolonlar gibi enterokokların direnç gösterdiği antibiyotiklerin daha fazla oranda kullanılması, dirençli fenotiplerin görülmesi ve yeni direnç mekanizmalarının gelişebilmesi gibi faktörler önemli rol oynamaktadır [Tünger, 2012]. İlk Vankomisine Dirençli Enterokok (VRE) türleri 1986'da

Avrupa'da bildirilmiştir [Uttley ve ark., 1988]. ABD'de ise 1989'da New York kentinde saptanmış ve bu bildirimden sonra VRE hızla tüm ülkeye yayılmıştır [Frieden ve ark., 1993]. Ülkemizde ise ilk VRE suşu 1998 yılında Akdeniz Üniversitesi'nden bildirilmiş, bunu 1999 yılında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi ve Ankara Gülhane Askeri Tıp Akademisi'nden bildirilen diğer olgular takip etmiştir [Vural ve ark., 1999; Başustaoğlu ve ark., 2000].

2.3.3.5. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa doğa, toprak ve su gibi dış ortamlarda bulunan, nemli ortamlarda uzun süre canlı kalabilen ve insanlar için patojen olan bir bakteridir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında izole edilen gram negatif çomakların yaklaşık beşte birini oluşturmaktadır. Hastane kaynaklı enfeksiyonların %10-15'inden sorumludur [Köse ve ark., 2014]. İmmün sistemi zayıflamış olan hastalarda solunum sistemi, üriner sistem, yanık, dış kulak yolu, göz ve yara enfeksiyonlarına neden olan fırsatçı patojen olarak yer almaktadır. Hastanelerde solunum destek ünitelerinde, temizleme solüsyonlarında, ilaç ve dezenfektanlarda üreyebilmektedir [Akduman Alaşehir ve ark., 2013].

Pseudomonas aeruginosa ile oluşan enfeksiyon tedavilerinde sıkça karbapenemler, sefalosporinler, antipsödomonal penisilinler ve kinolon grubu antibiyotikler kullanılmaktadır. Aminoglikozidler enfeksiyonlarda kombinasyon tedavisinde önerilen fakat tek başlarına kullanılmaları tercih edilmeyen antibiyotiklerdendir [Paul ve ark., 2004]. Antibiyotiklere karşı gelişen direnç mekanizmalarının başında beta laktamaz enzimlerinin salgınması, dış membran geçirgenliğinin azalması ve aktif pompalama sistemlerinin bulunmasıyla oluşur. Aktif pompa sistemleri kromozomal beta laktamazlar ile beraber ya da ayrı olarak aktif hale gelirse karbapenemler de dahil birçok antibiyotiğe karşı tekli ya da çoklu dirence neden olur. Daha da önemlisi bu sistem tedavi sırasında aktif hale gelebilmekte ve böylece çoklu ilaca dirençli suşlar ortaya çıkabilmektedir [Gür, 1999].

2.3.3.6. *Acinetobacter baumannii*

Acinetobacter baumannii özellikle son yıllarda hastane ortamında yaygın olarak bulunan, önemi giderek artan ve çoklu ilaca karşı direnç geliştirmiş bir bakteri olup yeni antibiyotiklere karşı hızla direnç geliştirebilmesinden ötürü tedavide zorluklar yaşanmaktadır. Hastane kliniklerinde ve özellikle yoğun bakım ünitelerinde geniş çapta yayılım gösterip pnömoni, ventilatörle ilişkili pnömoni, üriner enfeksiyon, kateter enfeksiyonları, kan dolaşım yolu enfeksiyonları ve menenjitlere yol açabilir [Bergogne-Berezin ve Towner, 1996].

Genellikle yaygın olarak kullanılan aminopenisilinlere, birinci ve ikinci kuşak sefalosporinlere ve kloramfenikole karşı doğal direnç gösterir. Bununla birlikte geniş spektrumlu beta laktamlara, aminoglikozidlere, florokinolonlara ve tetrasiklinlere karşı kolaylıkla direnç geliştirme yeteneğine sahiptir [Dijkshoorn ve ark., 2007]. Karbapenemler *Acinetobacter baumannii* enfeksiyonlarının tedavisinde, bakteri tarafından üretilen beta laktamaz enzimlerinin hidrolizine karşı stabil olmaları nedeniyle iyi bir seçenek olmuştur [Marques ve ark., 1997; Fishbain ve Peleg, 2010]. Fakat imipenem direncinin görülmeye başlandığı zamandan bu yana bu bileşiklere direnç oranları da tüm dünyada hızla artmaktadır. Bu nedenle tedavisinde alternatif antibiyotik kombinasyonlarının kullanımı gündeme gelmektedir [Choi ve ark., 2004; Song ve ark., 2007].

Acinetobacter baumannii türleri hem antibiyotiklere karşı yüksek oranda direnç geliştirebilme hem de hastane ortamında uzun süre canlı kalabilme özellikleri nedeniyle hastalarda kolaylıkla kolonize olabilmekte, hastane personeli aracılığıyla ve solunum cihazları gibi ekipmanlar vasıtasıyla diğer hastalara yayılarak epidemilere neden olabilmektedirler. Antibiyotik direnç profilleri hastaneden hastaneye, hatta aynı hastanenin farklı klinikleri arasında bile değişiklik gösterebilmektedir [Gözütok ve ark., 2013].

2.4. *Enterobacteriaceae* Familyasının Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae içerisinde çok sayıda bakteri cinsini barındıran, aynı zamanda önemli hastane enfeksiyonlarının oluşmasına neden birçok türü içeren bakteri familyasıdır. Bu bakteriler sadece barsakta bulunmaz ya da barsakta bulunan bakterilerin hepsi *Enterobacteriaceae* familyasına ait olmayabilir. İnsan ve hayvanlarla daima ilişki içinde olan bu familya çeşitli hastalıkların oluşmasına yol açmakla birlikte barsak florasında sıklıkla bulunurlar fakat floranın küçük bir kısmını oluştururlar. Patojen bakteri olma potansiyeline sahip bu bakteriler insanlarda septisemi, menenjit, yara enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları, pnömoni gibi organ ve dokularda gelişebilen enfeksiyonlara neden olurlar [Kılıç, 2013].

Enterobacteriaceae familyası spor oluşturmeyen, fakültatif anerobik çomak yapısında gram negatif bakterilerin oluşturduğu familyadır. Genellikle homojen boyanan, endospor oluşturmeyen, 2-3 µm boyunda, 0,3-1,0 µm eninde, uçları yuvarlak görümlü, çomak şekilli (basil) bakterilerdir. Glikozu karbon kaynağı olarak kullanırlar. Şeker fermente ederek asit ve gaz oluşturabilirler, nitratı nitrite indirgerler, oksidaz negatif ve katalaz pozitifdir. 25-37°C arası sıcaklıkta kolaylıkla gelişebilmektedirler. Birçoğu epitelyum hücrelere adhezyonu sağlayan tip 1 fimbriaya ve bazıları ise hareket kabiliyeti sağlayan flagellalara sahiptir [Abbott, 2011]. Zenginleştirici madde içermeyen besiyerlerinde kolaylıkla üreyebilirler. 37°C'de 8-12 saat arasında buyyon besiyerinde bulanıklık oluştururlar. Merkezi kabarık düzgün kenarlı "S" tipi koloni oluştururlar. Bazıları "R" tipi koloni oluşturabilirler. *Klebsiella* cinsi ise belirgin bir kapsül oluşumu ve "M" tipi koloni oluşturur [Töreci, 2002; Farmer ve ark., 2009]. Laboratuvara gönderilen bir örneğin kültürü için kanlı agara ekiminin yapılması yeterli olmakla birlikte MacConkey agar ya da EMB agar gibi seçici besiyerleri de kullanılıp sonraki aşamalarda bakterinin identifikasyonunda kolaylık sağlanabilmektedir [Kılıç, 2013].

Aile içerisindeki bakteri türlerinin böcek, bitki, hayvan ve insanlar olmak üzere geniş bir yayılım alanı vardır. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarına enfeksiyon etkeni ile gelen mikroorganizmaların %50'sini, gram negatif çomakların ise %80'ini

oluşturmaktadır. %70'i üriner sistem enfeksiyonlarına, %50'si septisemiye ve barsak enfeksiyonlarının ciddi bir kısmından sorumludur. *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Serratia*, *Providencia*, *Morganella*, *Hafnia*, *Edwardsiella*, *Yersinia*, *Shigella* ve *Salmonella* klinik açıdan önemli başlıca patojenlerdir [Kılıç, 2013].

Birçok *Enterobacteriaceae* üyesinde belirli antibiyotiklere karşı doğal direnç vardır. Antibiyotik direnci intrinsik ve kazanılmış olmak üzere iki başlık altında toplanmıştır. İntrinsik tip bakterinin doğal yapısı gereği bulunan kromozomal dirençtir. Bu aile içerisindeki birçok türün ampisiline, sefazoline ve polimiksine doğal dirençli olduğu bilinmektedir. Kazanılmış dirençte ise yoğun antibiyotik kullanımının selektif baskısı sonucu suşların çoğunun sonradan kazandığı direnç tipidir. Bu aşamada antibiyotiklere karşı oluşan direncin yayılımı plazmid aracılığı ile olmaktadır. Bu ve bunun gibi direnç genlerinin aktarım mekanizmaları *Enterobacteriaceae* ailesinde çok yaygındır ve direnç kolaylıkla yayılıp tehlikeli boyutlara ulaşabilmektedir. Özellikle yoğun antibiyotik kullanılan hastane ortamında enfeksiyonlarda sıklıkla rastlanan bakteriler olan *Enterobacteriaceae* üyelerinde dirençli bakterilerin seleksiyonu hızla artan bir problem haline gelmiştir. Bu bakterilere karşı antibiyotiklerin duyarlılığının belirlenmesinde kolay uygulanabilen, düşük maliyetli ve doğru sonuç veren disk difüzyon testi kullanılmaktadır [Kılıç, 2013].

2.5. *Klebsiella* spp.'nin Genel Özellikleri

19. yüzyıl sonlarında Alman mikrobiyolog Edwin Klebs tarafından isimlendirilmiştir. Genusun önemli bir türü olan *Klebsiella pneumoniae* 1882 yılında Carl Friedlander tarafından bronkopnömonili hastanın balgamından izole edilmiştir. Ayrıca pnömoninin Friedlander tarafından tanımlanması nedeniyle *Klebsiella pneumoniae* uzun zaman "Friedlander basili" adıyla anılmıştır [Gouby ve ark., 1994; Aydoğan ve Başustaoğlu, 2000]. Nozokomiyal *Klebsiella* enfeksiyonlarının çoğu genusun en önemli türleri olan *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* kaynaklıdır [Podschun ve Ullmann, 1998]. *Klebsiella pneumoniae* dışında *Klebsiella*

genusu *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella terrigena* olmak üzere toplamda 7 türü içerisinde barındırmaktadır (Tablo 2.2) [Alves ve ark., 2006].

Tablo 2.2. Farklı taksonomik sistemlerde *Klebsiella* genusunun sınıflandırılması [Podschun ve Ullmann, 1998]

Cowan	Bascomb	Qrskov
<i>Klebsiella aerogenes</i>	<i>Klebsiella aerogenes/oxytoca/edwardsii</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>subsp. pneumoniae</i> <i>subsp. ozaenae</i> <i>subsp. rhinoscleromatis</i>
<i>Klebsiella edwardsii</i> <i>subsp. edwardsii</i> <i>subsp. atlantae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> sensu stricto sensu lato	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Klebsiella ozaenae</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>
<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	<i>Klebsiella rhinoscleromatis</i> <i>Klebsiella "isimlendirilmeyen grup"</i> <i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Klebsiella planticola</i> <i>Klebsiella ornithinolytica</i>

2.5.1. Mikrobiyolojik özellikleri

Enterobacteriaceae familyası içerisinde yer alan bu bakteriler 0,3-1,0 µm çapında ve 0,6-6 µm uzunluğunda tekli, ikili ya da kısa zincir halinde bulunurlar. Etrafında geniş bir kapsül bulunmakla birlikte gram negatif, fakültatif anaerob ve boyalarla iyi boyanırlar. Optimal 37°C ve pH 7’de ürerler. Hareketlilik özelliklerinin olmaması nedeniyle diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinden ayrılırlar. Kuruluğa karşı oldukça dirençli olup özellikle organik maddeler içerisinde uzun süre canlı kalabilme özelliğindedirler. Isıya karşı dayanıksız olup 55°C’de yarım saatte ölürlar. Buna karşın oda sıcaklığında haftalarca, +4°C soğukta aylarca canlı kalabilirler. Kemoterapik ajanlara karşı dirençleri oldukça gelişmiştir [Koçulu, 2010].



Resim 2.1. MacConkey agarda mukoid ve laktoz pozitif *Klebsiella pneumoniae* görüntüsü [İnternet-1]

2.5.2. Biyokimyasal özellikleri

Birçoğu şekeri fermente etmelerine rağmen kökenler arasında bu konuda bir uyum yoktur. Özellikle nişastayı en geç 4 gün içerisinde parçalayarak gaz oluşturmaları diğer barsak florasındaki bakterilerden ayrılmasına neden olur. Malonat ve sitratı karbon kaynağı olarak kullanırlar. *Klebsiella rhinoscleromatis* ise sitratı kullanamaz. Oksidaz negatiftirler. Deoksiribonükleaz (DNase) enzim aktivitesi yoktur. *Enterobacter*, *Hafnia* ve *Serratia* cinsi bakterilerden ayırımında hareket yetenekleri ve DNase aktiviteleri önemli belirteçlerdir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında genel besiyerlerinde kolaylıkla gelişirler. Çoğaldıkları ortama bol miktarda kapsül maddesi bırakırlar. Katı besiyerindeki kolonileri tipik mukoid nitelikte büyük, sarımsak gri renkte ve akıcı kolonilerdir. Uygun olmayan ortam şartlarında S ve R kolonilerine dönüşebilirler. Örneğin MacConkey agarda tipik olarak büyük, mukoid ve kırmızı renkte görülür. Sıvı besiyerlerinde homojen bir bulanıklık ve dipte müköz bir çökelti yaparak üremektedirler. *Klebsiella pneumoniae* indol negatif ve *Klebsiella oxytoca* indol pozitifdir. *Klebsiella pneumoniae*'nin IMVIC testleri (--++)'dir (Tablo 2.3) [Yılmaz, 2009; Aydoğan ve Başustaoglu, 2000].

Tablo 2.3. *Klebsiella* cinsine ait biyokimyasal reaksiyonlar [Farmer, 1999]

	<i>Klebsiella pneumone</i>			<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Klebsiella terrigena</i>	<i>Klebsiella planticola</i>	<i>Klebsiella ornithinolytica</i>
	<i>subsp. pneumoniae</i>	<i>subsp. ozaenae</i>	<i>subsp. rhinoscleromatis</i>				
Özellikler							
İndol	-	-	-	+	-	D	+
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	+
Lizin dekarboksilaz	+	D	-	+	+	+	+
Pektat degranülasyonu	-	-	-	+	-	-	-
Laktozdan gaz oluşumu	+	-	-	-	-	-	-
10°C'de üreme	-	-	-	+	+	+	+
D-melezitozdan asit oluşumu	-	-	-	D	+	-	-
L-sorbozdan asit oluşumu	D			+	+	+	
m-hidroksibenzoat oluşumu	-	-	-	+	+	-	-
Hidroksi-L-proline oluşumu	D			D	D	+	
Malonat oluşumu	+	-	+	+	+	+	+
Metil kırmızısı testi	-	+	+	-	+	D	+
Voges-Proskauer Reaksiyonu	-	-	-	+	+	+	+

(D) Değişken (+) Pozitif (-) Negatif

2.5.3. Antijen yapıları ve virülans faktörleri

Polisakkarit yapıda hücre yüzeyinde 2 tip antijen bulunur. Bunlar O ve K antijenleridir. Günümüzde K antijenine bağlı tiplendirme; tiplendirmenin kolay olması, K antijenlerinin O antijenlerinin tepkimelerini inhibe etmesi ve K antijen sayısının O antijenine göre sayıca fazla olmasıdır. 82 tip K antijenine karşılık sadece 12 tip O antijeni tanımlanmasının nedeni olarak K antijenlerinin O antijenlerinin

üstünü kaplayarak O antijenlerinin tayininin zor olması gösterilmektedir. O ve K antijenine karşı oluşturulmuş antiserumlarla lam ve tüp aglütinasyonları, kültür süzöntüsü ile presipitasyon ve Neufeld'in kapsül şişme reaksiyonu ile *Klebsiella* cinsi tiplendirebilir [Bilgehan, 2000; Yılmaz, 2009]. *Klebsiella* patojenitesinde hayvan modellerinin kullanımını *in vitro* çalışmalardan elde edilemeyen temel bilgilerin elde edilmesini sağlamaktadır. Özellikle hayvan modelleri üriner sistem enfeksiyonlarını oluşturan *Klebsiella* cinsinde virulans çalışmalarının ortaya konmasını sağlamıştır [Aydoğan ve Başustaoğlu, 2000].

Kapsüler yapı *Klebsiella* cinsinin virülansında temel teşkil etmektedir. Kapsüler form bakterinin yüzeyini kalın bir tabaka halinde kaplayan fibrilöz yapıdan oluşmuştur [Aydoğan ve Başustaoğlu, 2000]. Bakterilerin geniş polisakkarit kapsülü bakteri hücrelerini fagositozdan koruyan önemli bir virülans faktördür [Kıraç, 2011]. Kapsül polisakkaritlerinin makrofajların fonksiyonel kapasitelerini ve farklılaşmalarını engelledikleri ayrıca enfeksiyon oluşmuş bölgeye lökosit göçünü geciktirdikleri rapor edilmiştir [Işık, 2007].

Fimbrianın "adhezyon" denen yapışma yeteneği de virulans ile ilgilidir. Genellikle gram negatif bakterilerde bulunmasına karşın gram pozitif bakterilerde de görülebilirler. Bakterinin yüzeylerde ve tıbbi ekipmanlar üzerinde biyofilm oluşturabilmesinde ilk aşama olan adhezyon *Klebsiella* türlerinde fimbrialar ile gerçekleşir. *Klebsiella* cinsi genel olarak 2 tip fimbria oluştururlar. Tip 1 fimbria en yaygın olanı ve *Enterobacteriaceae* familyasında bulunan birçok klinik suşta görülmektedir. Tip 3 daha az yaygınlıkta görülmektedir [Podschun ve Ullmann, 1998; Yılmaz, 2009]. Tip 3 piliye sahip suşlar endotelial hücrelere, solunum sisteminin epiteline ve üroepitelial hücrelere yapışır [Gouby ve ark., 1994]. Kırılgan bir yapıya sahip olan fimbrialar bir döngü içerisinde kaybedilir ve yenileri yapılır. Fakat idrar yolu enfeksiyonuna yol açan bazı bakteriler buna rağmen yeni fimbrialar yaparak konağın immun yanıtını aşabilirler. Çoğu *Klebsiella pneumoniae*'de tip 1 fimbrialar bulunur [Podschun ve Ullmann, 1998; Yılmaz, 2009].

Demir bakterilerin büyümesi, çoğalması ve konakta kalıcı enfeksiyon oluşumunda temel rol alır. Patojen bakteriler konaktaki proteinlere bağlı demiri kullanabilmek için çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir. Bunların içinde en bilineni sideroforlardır. Sideroforlar demir bağlama yeteneği olan düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Bağırsak bakterilerinde enterobaktin (fenolat) ve aerobaktin (hidroksamat) olmak üzere iki tip siderofor tanımlanmıştır. *Klebsiella* türlerinin her iki tip sideroforu sentezledikleri gösterilmiştir [Kaleli ve ark., 2006].

2.5.4. Yaptığı hastalıklar

Sağlıklı bireylerin solunum yolunda ve dışkıda %5-10 oranında bulunurlar. Hem hastane ortamından hem de toplumdaki kazanılan bir bakteri olmasına karşın fırsatçı bir enfeksiyon etkeni olarak değerlendirilebilir ve pnömoniden başka üriner yol, yara enfeksiyonu ve bakteremilere yol açar. Yeni doğan ünitelerinde plazmid aracılı çoklu ilaca dirençli *Klebsiella* cinsine bağlı hastane enfeksiyonları sık görülür. GSBL üretmeleri ve çoklu antibiyotik direncine sahip olmaları klinik açıdan önemlidir. *Klebsiella pneumoniae* dışındaki *Klebsiella* türleri daha az oranda hastane enfeksiyonlarına yol açar. Ülkemizde ise *Klebsiella* suşlarının GSBL üretiminin %80 seviyesini aştığı gözlenmektedir [Işık, 2007].

İnsanda boğazda, balgamda ve dışkıda bulunmaktadır. Bu bakteri özellikle vücut direncinin düşük olduğu durumlarda, şeker hastalarında, alkoliklerde, akciğerinde süregelen enfeksiyon bulunanlarda başta pnömoni olmak üzere çeşitli enfeksiyonlara sebep olmaktadır. Bu bakteri anjin, menenjit, sepsis, endokardit, idrar ve üreme yolu enfeksiyonları, seyrek olarak hepatit, kolesistit, peritonit, osteomyelit, artrit, beyin apsesi etkeni de olabilmektedir. Bu bakterinin termolabil ve termostabil enterotoksin yapan kökenleri de bulunmuştur [Unat, 1987].

Gram negatif bakteri pnömonileri içerisinde seyrek olarak *Klebsiella* pnömonisi görülür fakat ölüm oranı diğer gram negatif pnömonilerden iki kat fazladır. Genellikle akciğer enfeksiyonlarında K1, K3, K4 ve K5 antijenine sahip K tipleri izole edilmektedir [Bilgin, 2006].

2.5.5. Epidemiyoloji ve korunma

Hastane ortamında oluşan dirençli suşlar epidemiyolojik olarak önemli bir yer teşkil etmektedir. 1970 ve 1980 yıllarında aminoglikozid direnci gösteren suşların yerine GSBL ve florokinolonlara karşı direnç gelişmiştir. Günümüzde ise ilk seçenek olarak kullanılan karbapenem direnci yaygındır. Bu suşların yayılımının önüne geçilebilmesi için risk faktörlerinin ortadan kaldırılması, hastanelerde temas noktalarının önlemlerinin alınması, hastaların izolasyonu, antibiyotik kullanımına sınır konulması, el hijyenine dikkat edilmesi, çevresel yüzeylerin temizliği ve sağlık personelinin eğitimi gibi enfeksiyonun dağılımı ve kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir [Çiftçi, 2015].

2.5.6. Tedavi

Klebsiella pneumoniae'nin ürettiği ve salgıladığı beta laktamaz enzimi nedeniyle beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişmektedir. En sık geniş spektrumlu beta laktamaz üreten bakteri olup penisilinler ve sefalosporinlerin kullanımına sınır getirmektedir. Enfeksiyon tedavilerinde GSBL'den etkilenmeyen karbapenem grubu antibiyotikler kullanılmalıdır. Fakat son yıllarda bu antibiyotik grubuna karşı da direnç gelişmektedir ve karbapenem dirençli suşlar ortaya çıkmaktadır. Karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* enfeksiyonlarının tedavisinde en etkili antibiyotikler kolistin, tigesiklin ve fosfomisin'dir. Bunlara ek olarak aminoglikozidler de etkin olabilmektedir. Bu organizmalara karşı farklı antibiyotiklerin kombinasyon çalışmaları sonucu tigesiklin, karbapenemler, rifampisin ve doksisisiklin gibi antibiyotiklerin kolistin ile kombinasyonunun karbapenemaz üreten *Klebsiella pneumoniae*'ye karşı sinerjistik etkisi olduğu gösterilmiştir [Çiftçi, 2015].

2.6. Antibiyotiklere Karşı Direnç Gelişimi

Bir mikroorganizmanın antibiyotiklerin öldürücü veya üremeyi engelleyici etkisine direnç denir. Genel olarak gereksiz ve uygunsuz antibiyotik kullanımı direncin yayılımında önemli bir faktördür. Fakat 1940'lı yıllarda antibiyotiklerin

kullanılmadığı bazı adalarda bulunan toprak ve dışkı örneklerinde streptomisin ve tetrasiklin direnci oluşmuş bakterilerin izole edildiği belirtilmiştir. Bu sebeple direncin yayılımı sadece yoğun antibiyotik kullanımı ile değil, mikroorganizmanın elverişsiz şartlarda kendi yaşamını sürdürebilmesi ve savunma sürecinin bir parçası olarak da değerlendirilmektedir. Ancak antibiyotiklerin yoğun şekilde kullanıma girmesi ile birlikte yıllar içinde çoklu ilaca dirençli mikroorganizmalar ortaya çıkmış ve bunlarla oluşan enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar yaşanmaya başlanmıştır (Tablo 2.4) [Tenover ve Hugles, 1996; Cohen, 1992].

Tablo 2.4. Antibiyotiklerin ve direnç oluşumunun değişim süreci
[Kumar ve Singh, 2013]

Süre	Antibiyotiklerin Girişi	Tespit Edilen Direnç
1930'dan önce	Penisilinin keşfi (1929)	Antibiyotik çağından önce Murray koleksiyonundaki suşlar bazı antibiyotiklere karşı direnç gösterdi
1930-1940	Sülfonamidlerin girişi	İnsanlarda penisilinin etkinliği görüldü
1941-1950	Streptomisin, kloramfenikol ve klortetrasiklin'in girişi	Penisilin kullanımı uygun hale geldi
1951-1960	Eritromisin, vankomisin ve metisilinin girişi	Penisilin direnciden kaynaklanan enfeksiyonlar görülmeye başlandı
1961-1970	Gentamisin, ampisilin, sefazolin ve amikasinin girişi	Gentamisin dirençli <i>Pseudomonas</i> , metisilin dirençli stafilokokkal enfeksiyonalar ortaya çıktı
1971-1980	Karbenisilin, sefoksitin ve sefaklorun girişi	Ampisilin direncinden kaynaklanan enfeksiyonlar sıklaştı. Fırsatçı patojen enfeksiyonları artmaya başladı
1981-1990	Sefotaksim, klavulanik asit, amoksisilin, imipenem, norfloksasin ve aztreonamın girişi	Metisilin dirençli stafilokokkal enfeksiyonunun dağılımı görüldü
1991-2000	Oral geniş spektrumlu sefalosporinlerin girişi	Vankomisin dirençli enterokok ve çoklu ilaca dirençli <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ortaya çıktı
2001-2010	Florokinolonlar, telitromisin ve tigesiklinin girişi	Vankomisin dirençli stafilokokkal enfeksiyonlar, GSBL ve metallo beta laktamaz üreten gram negatif bakteriler tespit edildi

Bir antibiyotiğe veya birden fazla antibiyotiğe dirençlilik gelişimi özellikle bakteriler arasında geçiş yapabilen plazmid ve transpozon gibi ekstrakromozomal genetik yapılar ile yaygınlaşmıştır. Özellikle son 20 yılda insan ve hayvanlardaki bakteri enfeksiyonlarının tedavisi ile tarım ve hayvancılık alanında antibiyotik kullanımının hızla yaygınlaşması bakteriler arasındaki antibiyotik dirençliliğini artırmıştır [Levy, 1998; Guardabassi ve ark, 1998]. Bakterilerde farklı direnç mekanizmaları keşfedilmiş olup bu mekanizmaların tek birine sahip olabileceği gibi birden fazla mekanizmaya da sahip olabilirler. Direnç mekanizması iki ana başlık altında incelendiğinde [Davies ve Davies, 2010];

1. Doğal direnç
2. Kazınmış direnç

2.6.1. Doğal (İntrinsik) direnç

Bir bakteri türünün bazı antibiyotiklerden etkilenmemesi durumuna “intrinsik direnç”, “doğal direnç” veya “duyarsızlık” denmektedir. Bu şekilde gözlenen direnç bakterinin temel özelliği olup ilaç kullanımı ve kalıtsal ilişkisi yoktur. Bu tip direnç özelliğini gösteren bakteriler ilacın hedefi olan yapıyı taşımayabilir veya ilacın hedefine ulaşmasını engelleyecek doğal engellere sahip olabilir. Örneğin gram negatif mikroorganizmalarda vankomisin dış membrandan geçememektedir. *Klebsiella* cinsi için ise ampisilin, amoksisilin, karbesilin ve tikarsilin antibiyotiklerine karşı doğal direnç sözkonusudur (Tablo 2.5) [Yüce, 2001].

Tablo 2.5. Bazı bakteri ve bakteri gruplarındaki doğal direnç [Kumar ve Singh, 2013]

Organizma	Antibiyotik	Mekanizma
Gram pozitif bakteri	Aztreonam	Penisilin bağlayıcı proteinlerin olmaması
Gram negatif bakteri	Vankomisin	Büyük molekül olan vankomisinin dış membrandan geçememesi
<i>Klebsiella</i> spp.	Ampisilin	Penisilin bağlayıcı proteinlere ulaşmadan beta laktamaz enzimleri tarafından yok edilmesi
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	İmipenem	Penisilin bağlayıcı proteinlere ulaşmadan beta laktamaz enzimleri tarafından yok edilmesi
<i>Lactobacillus</i> spp. <i>Leuconostoc</i> spp.	Vankomisin	Hücre duvarı prekürsörüne bağlanamaması
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sulfonamid, trimetoprim, tetrasiklin ve kloramfenikol	Antibiyotiğin yetersiz alınımı sonucu hücre içinde sınırlı konsantrasyonda olması
<i>Enterococcus</i> spp.	Aminoglikozidler	Elektron taşıma zinciri ile aminoglikozidın sınırlı alınması
	Penisilin, sefalosporin ve monobaktam gibi beta laktamlar	Penisilin bağlayıcı proteinlerin olmaması

2.6.2. Kazanılmış (Kalıtsal) direnç

Bakterilerin sonradan kazandığı bir direnç tipidir. Popülasyon antibiyotik ile ilk defa karşı karşıya geldiğinde ilaç mikroorganizma üzerine etkilidir ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antibiyotiğe karşı direnç gelişmektedir. Gelişen direnç esas olarak bu yolla olmakta ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli kökenler ortaya çıkıp yayılmaktadır [Öztürk, 2002]. Söz konusu direnç tipi kromozomal veya ekstrakromozomal kaynaklı olabilmektedir [Yüce, 2001].

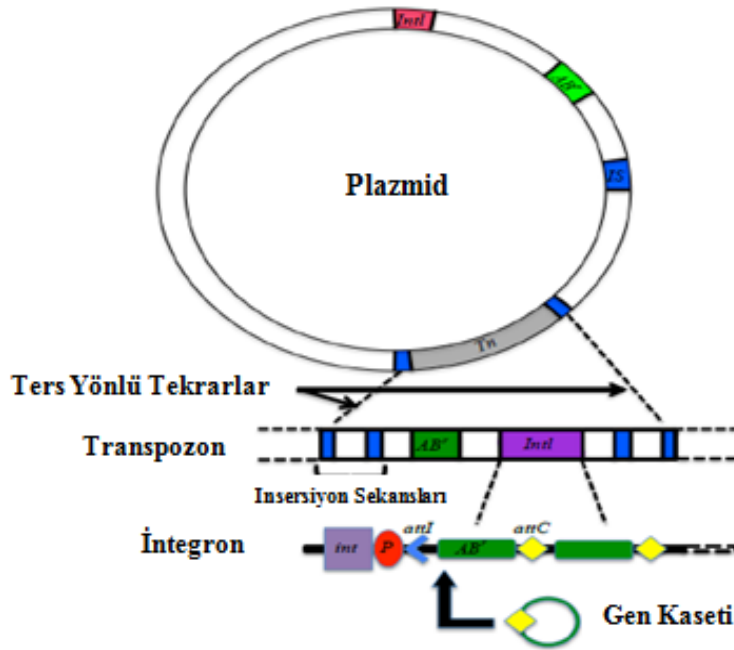
2.6.2.1. Kromozomal direnç

Bakteride kendiliğinden (spontan) oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkan direnç tipidir. Bu mutasyonlar fiziksel veya kimyasal faktörlerle oluşabilir ve sonuçta bakteride yapısal değişiklikler gözlemlenebilir. Bu sebeple ilaca karşı hücrenin

geçirgenliği azalabilir veya ilacın hücre içindeki hedefinde değişiklikler olabilir. Streptomisin, aminoglikozidler, eritromisin ve linkomisine karşı bu tür direnç görülebilir. Spontan kromozomal mutasyon oranı 10^{-7} - 10^{-12} 'dir. Bu nedenle klinikte bu tip direnç tipine az rastlanılır ve nadiren sorun yaratır [Yüce, 2001].

2.6.2.2. Ekstrakromozomal direnç

Ekstrakromozomal direnç çeşitli yollarla aktarılan plazmid ve transpozon gibi hareketli genetik yapılar aracılığı ile ortaya çıkmaktadır (Şekil 2.1.) [Yüce, 2001].



Şekil 2.1. Mobil genetik elementler [Gonçalves, 2015]

IntI: integron AB^r: antibiyotik direnç geni IS: insersiyon sekansı

Tn: transpozon int: integraz P: promoter attI: yerleşme bölgesi

attC: rekombinasyon bölgesi

2.6.2.2.1. Plazmidler

Plazmidler kendi kendine replike olabilen, genellikle 1 500 ile 400 000 baz çifti arası büyüklüğünde olan, sirküler ve çift sarmal yapıda olan ekstrakromozomal yapılardır. Replikasyon orjininin olması ve hayatını devam ettirebilmesi için gerekli olan

genlere sahip olması nedeniyle konak içerisinde rahatlıkla kalabilmektedir. Çoğunlukla antibiyotik direnç genleri, virulans genler ile plazmidin kendi replikasyonu ve aktarımı için gerekli proteinler kodlanır. Klinik açıdan bakıldığında genellikle enzimatik olarak ilaçların parçalanmasına neden olan genleri içerirler. Bir mikroorganizmada plazmidin bir kopyası bulunabileceği gibi farklı özelliklere sahip plazmidlerde bulunabilir. Genellikle içinde bulunduğu bakteriye kazandırmış oldukları özellikler göz önüne alınarak adlandırılırlar (F plazmidi, R plazmidi vs.) [Kuyucu, 2007; Yüce, 2001].

2.6.2.2.2. Transpozonlar ve insersiyon dizileri

Transpozonlar bakteri kromozomunda farklı yerlere yerleşebilen veya kromozomdan plazmide, plazmiden plazmide, plazmiden DNA'ya veya bakteriyofaja aktarılabilen hareketli genetik elementlerdir. 2-30 kilobaz büyüklüklerinde olan transpozonlar plazmidler gibi kendi kendilerine replike olamazlar fakat aktarıldığı kromozom veya plazmidlerle birlikte replike olabilirler [Uysal, 2013]. Transpozonlar insersiyon dizi elemanlarından daha büyüktür ve transpozisyon için gerekli olan genlerin yanı sıra antibiyotik direnç genlerini de taşırlar [Rice ve ark., 2003]. Direnç genleri arasında plazmid kökenli beta laktamazlar, tetrasiklin direnç genleri ve aminoglikozid yapısını değiştiren enzimler gibi birçoğu aslında transpozonlar içinde bulunmaktadır. Konak özgüllüklerinin geniş olması nedeniyle direnç genlerinin değişik türler arasında aktarımında da önemlidir [Gülay, 1999].

İnsersiyon dizileri ise iki ucunda tekrarlanan ve birbirinin komplementeri olan kısa diziler ile ortasında yer değiştirmeyi sağlayan (transpozisyonu) diziler bulunur. Yer değiştirmede etkili olan faktör ortada bulunan ve transpozaz olarak adlandırılan enzimin sentezini kodlayan DNA dizileridir. Uzunlukları yaklaşık 2 500 baz çiftinden daha az civardadır [Mahillon ve Chandler, 1998].

Transpozonlar ve IS elemanları genom üzerinde farklı bölgelere yerleşebilmelerinden dolayı gen ekspresyonunda değişikliğe neden olabilirler. Gen

bölgesine bağlanarak geçici bir süre genin inaktif olmasını sağlarlar ya da buldukları bölgede bulunan genleri aktive edebilirler [Madigan ve ark., 2000].

2.6.2.2.3. İntegronlar

İntegronlar gen ifade elementleri olarak tanımlanmıştır. Direnç genlerinin kazanılmasından sorumlu özel genetik elemanlardır. Halkasal formdaki gen kasetlerinin eklenip kazılması için bölge spesifik rekombinasyon kullanma yeteneği ile diğer bütün genetik elemanlardan ayrılmaktadır [Collis ve Hall, 1992]. Ayrıca gen kasetlerinin ekspresyonu için bir promotor olarak iş görürler ve bu nedenle doğal klonlama sistemi ve ekspresyon vektörleri olarak davranırlar [Hall ve Collis, 1995]. İki korunmuş bölge (5'-3' korunmuş bölge) ve bunların arasında yer alan ve genelde antibiyotik direnç genlerini içeren gen kasetlerinden oluşur [Collis ve Hall, 1995]. Genel olarak integras (intI1) genini ve antibiyotik direnç gen kasetlerini barındıran, integrasyon kaset alanlarını (attI) içeren ve açık okuma kapıları (ORF) ile birleşerek onları fonksiyonel hale getiren genler olarak tanımlanmaktadır [Lapierre ve ark., 2008]. Bir bölgeden diğer bir bölgeye kendini transfer etmek için gerekli mekanizmaya sahip değildir. İnsersiyon dizileri, birleşik transpozonlar veya plazmidlerle bağlantılı bulunmaktadır. Bu bağlantı integronların hareketini sağlar ve böylece sıklıkla gen kasetleri üzerinde bulunan antibiyotik direnç genlerinin tür içi ve türler arasında transferi gerçekleşebilir [Boucher ve ark., 2007].

2.7. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Antibiyotiklerin enzimatik yolla hidrolizi ya da modifikasyonu ve ilacın hedefi olan molekülde mutasyon sonucu ortaya çıkan değişim bugüne değin üzerinde en çok çalışılan ve en iyi bilinen antibiyotik direnç mekanizmalarıdır. Bunlardan bir kısmı intrinsik olarak bakterinin doğal direncine katkıda bulunurken önemli bir bölümü mutasyon sonucu ya da direnç determinantlarının ekzojen yolla kazanılması sonucu ortaya çıkmakta ve bugün klinikte sorun oluşturan antibiyotiklere karşı dirençte önemli rol oynamaktadır (Tablo 2.6) [Hasdemir, 2007].

Tablo 2.6. Antibiyotiklerin hedef bölgeleri ve direnç mekanizmaları
[Li ve Nikaido, 2004]

Antibiyotik	Bakterideki Hedefi	Direnç Mekanizması
Beta laktamlar	Hücre duvar sentezi (PBP'ler)	Beta laktamazlar, PBP'lerin değişimi, geçirgenlik bariyeri, atım pompaları
Aminoglikozidler	Protein sentezi (30S ribozom inhibitörleri)	Aminoglikozid modifiye eden enzimler, ribozomların değişikliği, geçirgenlik bariyeri, atım pompaları
Katyonik Peptidler	Hücre membranı	Hedef değişikliği, atım pompaları
Kumarinler	DNA sentezi (DNA giraz B)	Hedef değişikliği, atım pompaları
Kloramfenikol	Protein sentezi (50S ribozom inhibitörleri)	Asetiltransferaz, atım pompaları
İzoniazid	Yağ asit sentezi	İlaç aktivasyonunun kaybı, hedef değişikliği, atım pompaları
Glikopeptidler	Hücre duvarı sentezi	Hedef değişikliği
Makrolidler	Protein sentezi (50S ribozom inhibitörleri)	Hedef değişikliği, atım pompaları
Oksazolidinon	Protein sentezi (50S ribozom inhibitörleri)	Hedef değişikliği, atım pompaları
Polimiksinler	Hücre membranı	Lipolisakkaritlerde değişiklik
Kinolonlar	DNA sentezi (DNA giraz ve topoizomeraz IV)	DNA giraz ve topoizomeraz'daki değişim, atım pompaları
Rifamisinler	RNA sentezi (DNA'ya bağımlı RNA polimeraz)	RNA polimeraz β alt ünitesinin değişimi, atım pompaları
Streptograminler	Protein sentezi (50S ribozom inhibitörleri)	Hedef değişimi
Sulfonamidler	Folik asit metabolizması	Hedef modifikasyonu, hedef atlama, atım pompaları
Tetrasiklinler	Protein sentezi (30S ribozom inhibitörleri)	Aktif efluks, ribozomların değişikliği, ilaç modifikasyonu
Trimetoprim	Folik asit metabolizması	Hedef atlama, atım pompaları

2.7.1. Antibiyotik inaktivasyonu

Aktif antibiyotik molekülünün direkt olarak inaktivasyonu kategorisinde incelenen bu savunma mekanizması antibiyotiğin kendisini değiştiren ya da bozan enzimin üretimini içermesine bağlı olarak gelişmektedir. Antibiyotik inaktivasyonu; hidrolitik enzimler, grup transferi ve redoks mekanizması ile gerçekleşmektedir [Çiftçi ve Aksoy, 2015].

Antibiyotiklerin bir kısmı hidrolize duyarlı ester ve amidler gibi kimyasal bağlar içermektedir. Birçok enzim ise bu bağları hedef alıp yıkıma neden olmaktadır. Bu enzimler sıklıkla bakteri tarafından üretilerek antibiyotiklerin hedeflerine bağlanmadan önce inaktive edilirler. Beta laktamazlar etkilerini penisilin ve sefalosporin antibiyotiklerinin beta laktam halkalarını hidroliz ederek gerçekleştirirler. Enzimatik aktivite sonucu bir antibiyotiğin ilk defa hidroliz edilmesi *Staphylococcus aureus* bakterisinde belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda penisilinleri hidrolize edenler “penisilinaz”, sefolasporinleri hidrolize edenlere ise “geniş spektrumlu beta laktamaz” denmiştir. Fakat günümüzde ortak isim olan “beta laktamaz” adı ile tanımlanmaktadır [Çiftçi ve Aksoy, 2015]. Günümüzde 200’den fazla beta laktamaz geni tanımlanmıştır ve bunlar kromozomal olabileceği gibi plazmidler tarafından da kodlanmaktadır. Geniş spektrumlu beta laktamazlar tüm penisilinlere, üçüncü nesil sefalosporinlere (seftazidim, sefotaksim, seftriakson) ve aztreonam’a orta seviyede direnç sağlamakta iken, sefamisin (sefoksitin ve sefotetan) ve karbapenem etki etmemektedir. Bunlar genellikle *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Proteus mirabilis*’te saptanmıştır ve ayrıca diğer enterobakterlerde de bulunmaktadır [Çiftçi ve Aksoy, 2015].

Antibiyotiklerin hidrolizi aynı zamanda esterazlar ile gerçekleşebilir. *Escherichia coli*’deki ereB eritromisin esteraz II’yi kodlayarak eritromisin A ve oleandomisindeki lakton halkasını parçalar. *Enterobacteriaceae* türlerinde yaygındır [Kim ve ark., 2002].

Aminoglikozidler, kloramfenikol, streptogramin, makrolidler ve rifampisin gibi antibiyotikleri fosforil, adenil ya da asetil gruplarını antibiyotik molekülünün yüzeyine eklemek suretiyle kimyasal yapısını inaktive ederek etki gösteren enzim grupları transferazlardır. Aminoglikozid modifiye eden enzimler modifiye edilmiş molekülün affinitesini düşürerek 30S ribozomal alt birime bağlanmasını engeller, aminoglikozidlere ve florokinolonlara dirence sebep olur [Giedraitienė ve ark., 2011]. Bu enzimlerle inaktive edilen kloramfenikol, asetil transferaz enzimiyle hidroksil grubunun asetillenmesi sonucunda 50S ribozoma bağlanmaz. Dolayısıyla

bakterinin protein sentezi kloramfenikole rağmen devam eder [Çiftçi ve Aksoy, 2015].

Oksidasyon ve indirgenme reaksiyonları da patojen bakteriler için antibiyotik direncinin oluşmasına neden olmaktadır. *Streptomyces virginiae* virginiensis M olarak adlandırılan kendi ürettiği antibiyotikten bu mekanizma ile korunmaktadır ve bu direnç 16. pozisyondaki keton grubunun alkole indirgenmesi sonucunda oluşmaktadır [Giedraitienė ve ark., 2011].

2.7.2. Hedef molekülün değişmesi

Antibiyotik ile hedef molekülün birleşmesi çok spesifik bir olaydır ve hedef molekülde oluşacak küçük değişimler antibiyotiğin hedefine bağlanamamasına neden olmaktadır. Hücre duvarı sentezinin inhibisyonunda beta laktam antibiyotikleri (penisilin, sefalosporin, karbapenem, monobaktam, vankomisin, teikoplanin) yer almaktadır [Giedraitienė ve ark., 2011]. Bakteriye hücre duvarının peptidoglikan yapısı antibiyotikler için çok uygun hedefleri içermektedir. Bu hedef bölgelerin en önemlilerinden birisi olarak bakteri hücre duvarı yapısında bulunan penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) gösterilmektedir [Ghuysen, 1994]. PBP'ler biri sitoplazmik membrana gömülü, diğeri ise periplazmik boşluğa uzanan iki bölümden oluşurlar. Beta laktam antibiyotikler PBP'lerin substrat analoglarıdır ve bu nedenle PBP'ler beta laktamazlar gibi beta laktam antibiyotiklere bağlanmak suretiyle hidrolize neden olmaktadır. Ancak hidroliz hızlarının çok yavaş olması nedeniyle geri dönüşemeyen bir açil-enzim bileşiği oluşmaktadır. Bu bileşikten ayrılamayan enzim hücre duvarı sentezindeki görevini yapamaz duruma gelir ve süreç hücre duvarı sentezinin durması ve hücre duvarı yıkımının meydana gelmesi ile sonuçlanır. PBP'lerin penisilin bağlayan halkalarında mutasyonların oluşması beta laktam antibiyotik bağlanmalarında affinitenin azalması ile sonuçlanmaktadır [Çiftçi ve Aksoy, 2015]. PBP'lerdeki değişimler *Enterococcus faecium*'da ampisilin direnci ve *Streptococcus pneumoniae*'de penisilin direnci ile sonuçlanmaktadır [Nagai ve ark., 2002]. mecA penisilin bağlayıcı protein olan PBP2a'yı kodlar ve beta laktam antibiyotiklerine yüksek oranda direnç oluşturur. Ayrıca öldürücü seviyede beta

laktam konsantrasyonuna karşı hücre duvarının oluşmasını sağlamaktadır. Metisiline dirençli olan *Staphylococcus aureus* suşları çapraz direnç ile tüm beta laktam antibiyotiklere, streptomisine ve tekrasikline direnç göstermektedir [Grudmann ve ark., 2006].

Birçok antibiyotik protein sentezini çeşitli seviyelerde engelleyerek etki etmektedirler. Aminoglikozidler, tetrasiklinler, makrolidler, kloramfenikol, fusidik asit, mupirosin, streptogramin ve oksazolidinonlara karşı protein sentezinin engellenmesi ile direnç sağlanırken, rifamisinlerde ise RNA polimeraz yolu ile transkripsiyon sonucu spesifik hedefin modifikasyonu ile direnç gelişmektedir [Walsh, 2000]. Makrolid, linkozamid ve streptogramin B grubu antibiyotikler bakterilerin 50S ribozomal alt ünitesine bağlanarak protein sentezini bloke ederler. Daha sonra 50S alt ünite transkripsiyon sonrası modifikasyona uğrar (metilasyon), RNA metiltransferaz bağlanma bölgesine veya yakına bir yere yerleşir ve 23S rRNA mutasyonu ile bu antibiyotiklere karşı direnç oluşur [Dzidic ve ark., 2008]. DNA giraz (topoizomeraz II) ve topoizomeraz IV (parC ve parE) ezimlerinin modifikasyonu ile de direnç sağlanmaktadır. gyrA ve parC genlerinde oluşan mutasyon kinolon/florokinolonların bağlanmasına engel olur [Kim ve ark., 2002]. Genellikle kinolonlara karşı oluşan direnç kromozomda meydana gelen mutasyon ile meydana gelmektedir. Fakat plazmid aracılı ve gyrA ve parC genlerinde gerçekleşen nokta mutasyonlar kinolonlara karşı direncin oluşumunda rol aldığı belirlenmiştir [Martinez-Martinez ve ark., 2003; Anderson, 2005].

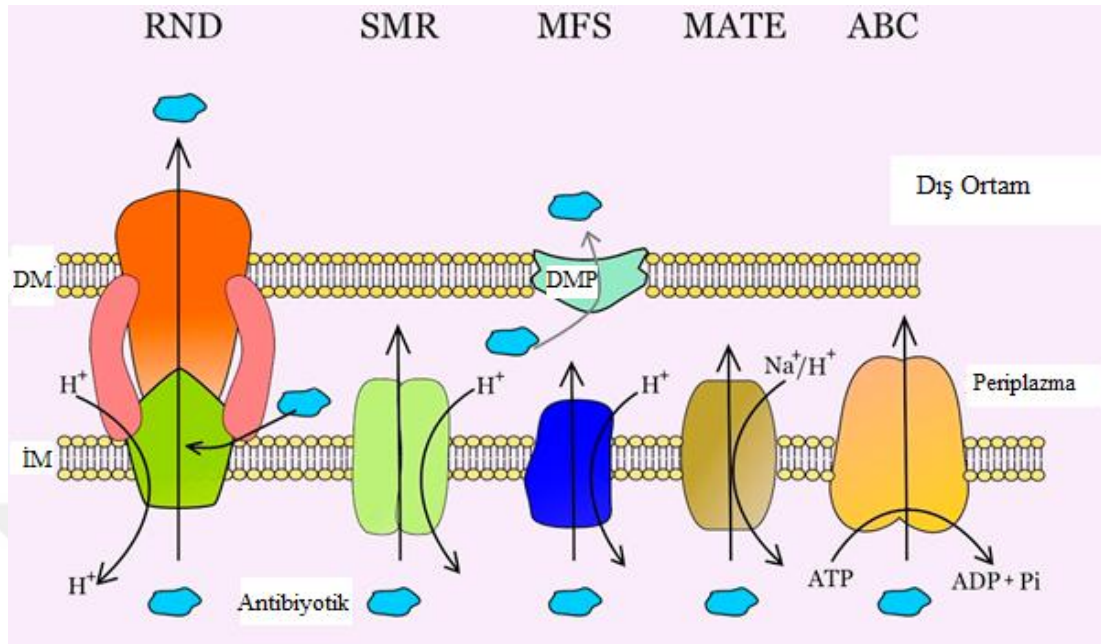
2.7.3. Dış membran geçirgenliği

Gram negatif bakterilerde dış membran iç tarafta fosfolipitler, dış tarafta ise lipid A'dan oluşmaktadır. Dış membran kompozisyonu ilaçların alınmasını yavaşlatmaktadır [Dzidic ve ark., 2008]. Peptidoglikan tabaka geniş aralıkları nedeniyle antibiyotiklerin bakteri hücrelerine girişine engel oluşturmaz. Ancak gram negatif bakterilerin dış zarı antibiyotikler ve ortamdan alınacak diğer moleküller için yarı geçirgen bir engel oluşturmaktadır. Bu nedenle dış zar yapısı tüm gram negatif bakterilere gram pozitiflerden farklı bir avantaj sağlar [Nikaido, 2000].

Antibiyotiklerin porinlerden geçişi; şekli, büyüklüğü, yükü ve hidrofilik özelliklerine bağlı olarak belirlenir. Antibiyotiklerin dış membrana penetrasyonu porinler boyunca difüzyon, iki tabaka boyunca difüzyon ya da kendilerince geliştirilen alım yollarından birisi ile gerçekleşebilir [Dzidic ve ark., 2008]. Küçük hidrofobik moleküller (beta laktam ve kinolonlar) dış membrandan sadece porinler ile geçebilir. Aminogikozidler ve kolistin hücrede bulunan porinler vasıtasıyla değil, dış membranda bulunan lipopolisakkaritlere bağlanarak alınımı gerçekleşir [Lambert, 2002]. Beta laktam antibiyotiklerin çoğu hidrofilik yan zincirler içerdikleri için porin proteinlerdeki değişimlerden etkilenmektedir. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa* suşlarında karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybı sonucunda bu antibiyotik sınıfına karşı direnç gelişmektedir. *Escherichia coli* suşlarında dış membran porinlerinden OmpF ve OmpC'nin kaybı sonucunda beta laktam MİK değerlerinde 8-16 kat artış görülmektedir [ifti ve Aksoy, 2015].

2.7.4. Atım pompaları

Günümüze kadar yapılan çalışmalar bakterilerin doğal ve kazanılmış çoklu ilaç direncinde önemli bir yere sahip olan bir başka mekanizmanın varlığını açıkça ortaya koymaktadır. İlk kez 1976'da memeli hücre membranında yer alan P-glikoproteininin kanser ilaçlarına, daha sonra bakteri hücre membranında yer alan Tet atım pompa proteininin tetrasiklin direncine yol atığının gösterilmesini takiben yapılan çalışmalar çoklu ilaç direncine yol açan aktif pompa genlerinin bakterilerde ve diğer bir çok patojen mikroorganizmada yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir (şekil 2.2.) [Hasdemir, 2007].



Şekil 2.2. Atım pompa protein aileleri [Blanco ve ark., 2016]

DM: Dış membran İM: İç Membran DMP: Dış membran proteini
 ABC: ATP binding cassette SMR: Small multidrug resistance
 MFS: Major facilitator RND: Resistance nodulation cell division
 MATE: Multidrug and toxic compound extrusion

Bakterilerde sitoplazmik membranda bulunan atım pompaları proteinlerden oluşmaktadır. Bu pompaların birincil görevi farklı metabolit ve kimyasalların sitoplazma içindeki seviyelerini normalin altında tutmak veya molekülleri hücre yüzeyine transfer etmek veya hücre dışı ortamın fonksiyonlarını yürütmektir. Sitoplazmik atım pompa proteinleri birlikte çalışabildikleri gibi gram negatif bakterilerde olduğu gibi üçlü yapıda dış membran porin proteini ve periplazmik adaptör proteinleri ile birlikte çalışabilir. Bazı atım pompa sistemleri hücreden antibiyotikleri dışarı atar ve hücre içi antibiyotik konsantrasyonunu öldürücü seviyenin altında tutar. Eğer atım pompa sistemleri üç veya daha fazla antibiyotik grubuna karşı düşük düzeyde direnç kazandırıyorsa bunlara çoklu ilaca dirençli pompa sistemi denir [Blair ve Piddock, 2009]. Aşırı eksprese olma durumunda klinik açıdan kullanışlı olan antibiyotiklere karşı yüksek derecede direnç geliştirebilirler. Bazıları kısıtlı substrat özgüllüğüne sahip olabildikleri gibi (Tet pompaları) bazıları ise geniş çapta substrat özgüllüğüne sahiptir [Blair ve ark., 2015]. Bakteri çoklu ilaç direncine sebep olan bu proteinleri kromozomal olarak kodlansa da bazıları plazmidler

ile de aktarılabilmektedir ve bakteriden bakteriye geçiş yapabilmektedir. Bu tarz direncin yayılması kaygı verici bir gelişme olmasının yanı sıra direncin aktarılabılır olması diğer patojenlere geçişle birlikte sorun yaratmaktadır [Blair ve ark., 2015].

Antibiyotiğin hücre dışına atılmasını sağlayan atım pompa sistemlerinin varlığı 20 yıl kadar önce tetrasiklinler için belirlenmiştir. Günümüzde ise bu mekanizmanın beta laktamların da aralarında bulunduğu birçok antibiyotik sınıfına karşı dirençte önemli olduğu anlaşılmıştır. Hatta gram negatif bakterilerde çeşitli antibiyotiklere karşı doğal dirence önceden sanıldığı gibi dış membran değil aktif pompa sistemlerinin neden olduğu belirlenmiştir [Van Bambeke ve ark., 2000].

Aktif pompa sistemleri özellikle makrolidler, tetrasiklinler ve florokinolonlar olmak üzere tüm antibiyotik sınıflarını etkilemektedir. Çünkü bu antibiyotikler protein ve DNA biyosentezini farklı aşamalarda engellemektedirler ve bu nedenle de etkilerini göstermek için hücre içinde olmaları gerekmektedir [Webber ve Piddock, 2003; Çiftçi ve Aksoy, 2015].

Pompa proteinlerinin regülasyonundan sorumlu elemanların mutasyona uğraması sonucunda ise artan bir gelişim söz konusu olabilmektedir. Buna örnek olarak *Pseudomonas aeruginosa*'daki MexAB-OprM pompa sistemi örnek verilebilir. MexR regülör gende meydana gelen mutasyon MexAB-OprM'in aşırı eksprese olmasına ve beta laktam gibi antibiyotiklere karşı direncin artmasına sebep olmaktadır [Poole, 2001].

Klebsiella pneumoniae türünde günümüze kadar tanımlanan atım pompa sistemleri acrAB, kexD, kdeA, kmrA, kpnEF, kpnGH ve ketM olmak üzere karakterize edilmiştir (Tablo 2.7).

Tablo 2.7. *Klebsiella pneumoniae*'de atım pompa proteinleri

Protein Adı	Ailesi	Referans
acrAB	RND	[Li ve ark., 2008]
kexD	RND	[Ogawa ve ark., 2012]
kdeA	MATE	[Ping ve ark., 2007]
kmrA	MFS	[Ogawa ve ark., 2006]
kpnEF	SMR	[Srinivasan ve Rajamohan, 2013]
kpnGH	MFS	[Srinivasan ve ark., 2014]
ketM	MATE	[Ogawa ve ark., 2015]

Bakterilerde atım pompaları kullandıkları enerji kaynağı, yapısal özellikleri ve substrat profillerine göre 5 sınıfa ayrılırlar (Tablo 2.8). Bunlar;

- Major facilitator (MFS) süper ailesi
- ATP binding cassette (ABC) süper ailesi
- Resistance nodulation division (RND) süper ailesi
- Small multidrug resistance (SMR) süper ailesi
- Multidrug and toxic compound extrusion (MATE) süper ailesi

Tablo 2.8. Atım pompa ailelerine ait proteinlerin özellikleri [Hasdemir, 2007]

Protein Ailesi	Enerji Kaynağı	Membran Topolojisi	Tipik Protein	Bakteri Türü
ABC Süper Ailesi	ATP	12 transmembran segmenti	LmrA	<i>Lactococcus lactis</i>
MFS Süper Ailesi	PMF	12 veya 14 transmembran segmenti	NorA EmrB	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>
MATE Süper Ailesi	Sodyum gradienti	12 transmembran segmenti	YdhE	<i>Escherichia coli</i>
SMR Süper Ailesi	PMF	4 transmembran segmenti	Smr EmrE	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>
RND Süper Ailesi	PMF	12 transmembran segmenti	AcrB MexB	<i>Escherichia coli</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i>

PMF: Proton hareket kuvveti

2.7.4.1. ATP Binding Cassette (ABC) süper ailesi

ABC transport proteinleri en geniş protein ailesi olması, prokaryot ve ökaryotlarda bulunması ve çok geniş substrat genişliğine sahip olmasıyla bilinmektedir. Bu primer taşıyıcı sistemler diğer atım pompa sistemlerinden farklı olarak moleküllerin hücreye alınması veya atılmasında gerekli olan enerjiyi ATP hidrolizinden elde ederler. Her biri altı helikaz içeren iki transmembran segmentine sahiptir. Bu pompalar homodimer veya heterodimer olarak görev yapabilirler. *Lactococcus lactis*'te LmrA bu sınıfa örnek olarak verilebilir. ABC taşıyıcılar prokarotlarda aktiviteleri için Mg iyonuna ihtiyaç duyarlar [Van Bambeke ve ark., 2000]. Primer taşıyıcı proteinler besinlerin alınmasında, hücrel metabolitlerin atılmasında, ksenebiotiklere, ozmotik stres ve lipit taşınmasında koruyucu olarak görev alırlar. Bu taşıyıcıların substratları arasında küçük iyon ve moleküllerden (amino asit, şeker, vitamin, vb.) büyük yapıdaki bileşiklere (peptidler, protein ve polisakkaritler) kadar geniş bir spektrum bulunmaktadır [Köhler ve ark., 1999].

2.7.4.2. Major Facilitator (MFS) süper ailesi

MFS ailesi sekonder taşıyıcılar kategorisi altında bulunurlar. Bilinen prokaryot membran proteinlerinin yaklaşık %25'ini oluştururlar. Günümüze kadar yaklaşık olarak 15 000 MFS pompası tanımlanmıştır [Saier ve ark., 1999]. MFS ailesine ait membran taşıyıcı proteinler bakteriden yüksek ökaryotlara kadar birçok canlıda bulunmaktadır. Çok geniş substrat profiline sahip olmakla birlikte şekerler, krebs döngüsü ara basamaklarına, organofosfatlar, oligosakkaritler ve antibiyotiklerin taşınması görevinde yer alırlar [Pao ve ark., 1998]. MFS pompaları RND ailesine benzemekle birlikte proton hareket kuvvetini kullanırlar ve bir hidrojen iyonu için bir substrat değiştirirler. 12 transmembran segmentine sahiptirler [Piddock, 2006]. Bu sınıfa ait bilinen en iyi örnek *Staphylococcus aureus*'a ait NorA proteindir. 388 amino asitten oluşan membran proteini hidrofilik bileşiklere direnç göstermesinin yanı sıra az veya yok derecede hidrofobik kısımlara direnç göstermektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda ise NorA'nın gerçek anlamda çoklu ilaca direnç gösteren taşıyıcı bir protein olduğunu göstermektedir. Yapısal olarak farklı türlere ait

proteinlerin homolojileri birbirine benzemektedir. Örneğin *Bacillus subtilis*'e ait Bmr, *Lactococcus lactis*'e ait lmrP, *Escherichia coli*'deki MdfA ve *Streptococcus pneumoniae*'deki PmrA örnek gösterilebilir [Putman ve ark., 2000].

2.7.4.3. Small Multidrug Resistance (SMR) süper ailesi

SMR atım pompaları yaklaşık 110 aminoasitten oluşan ve 4 alfa helix transmembran segmentinden oluşmaktadır. Bu familyaya ait ilk pompa *Staphylococcus aureus*'da taşıyıcı görevi olan Smr ile keşfedilmiştir [Paulsen ve ark., 1996]. Gram negatif bakterilerde ise bu familyaya ait pompalar bakteri kromozomunda kodlanmaktadır. Örnek olarak *Escherichia coli*'deki EmrE [Nikaido, 2009], *Bacillus subtilis*'ten EbrA ile EbrB ve *Mycobacterium tuberculosis*'e ait Mmr verilebilir [Putman ve ark., 2000].

2.7.4.4. Resistance-Nodulation-Division (RND) süper ailesi

RND ailesine ait pompalar sekonder taşıyıcılar olmakla birlikte üçlü bir yapıya sahiptir. İç membran pompa proteini, periplazmik protein ve dış membran porin proteini olmak üzere 3 kısımda incelenirler. RND sistemi proton hareketi ile antiport olarak görev yapar ve bir hidrojen ile bir molekülün yer değiştirmesiyle taşınmayı gerçekleştirirler. Çok geniş substrat özgüllükleri vardır. 12 transmembran segmenti içerirler. Birçok *Enterobacteriaceae* üyesinde bulunan AcrAB pompa geni en iyi *Escherichia coli*'de aydınlatılmıştır ve aşırı ekspresyon durumunda çoklu ilaca direnç fenotipi göstermektedir [Yang ve ark., 2003]. Fırsatçı patojen olan *Pseudomonas aeruginosa*'ya ait MexAB-OprM, MexCD-OprJ, MexEF-OprN proteinleri, *Neisseria gonorrhoeae*'ya ait MtrRCDE örnek verilebilir [Putman ve ark., 2000].

2.7.4.5. Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE) süper ailesi

MATE pompaları da RND ve MFS pompaları gibi sekonder taşıyıcılardır ve 12 veya 14 transmembran segmentine sahiptirler. Enerji kaynağı olarak proton hareket kuvvetini kullanırlar. Fakat bazı MATE pompaları sodyum iyon gradientini

kullanabilmektedir [Nishino ve ark., 2006]. İlk açıklanan MATE familyasına ait taşıyıcı *Vibro parahaemolyticus* bakterisinde görülen NorM taşıyıcısıdır [Omote ve ark., 2006].

2.8. Atım Pompalarının Fizyolojik Rollerini

Gerçekten de atım pompa genlerini içeren bütün bakteriler, lokal veya global regülatörler ile kontrollü bir ekspresyon seviyelerine sahip olsalar da, özellikle stres durumunda adaptasyonları, gelişim, patogenezi ve virülansta önemli bir yer teşkil etmektedir. Yapılan çalışmalar ve kanıtlarla atım pompaları bakterinin fizyolojik sürecinde detoksifikasyona neden olmaktadır [Sun ve ark., 2014].

2.8.1. Patojenite ve virülanstaki rollerini

Escherichia coli'de çoklu ilaca dirençli ve antibiyotik direnç determinantı olarak AcrAB-TolC atım pompa geninin tanınması ile atım pompaları sadece antibiyotikler üzerinde değil, zehirli safra tuzlarını hücre dışına atarak bakterinin hayvan barsağında yaşamını devam ettirdiği rapor edilmiştir. Aynı rol bu pompa ile benzer homoloji gösteren *Pseudomonas aureginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Salmonella Typhimurium*'da görülmüştür. Aynı zamanda pompaların konak tarafından üretilen antimikrobiyal bileşiklere dışa pompalayarak bakterinin yaşadığı ortamda gelişmesini sağlamaktadır. Bu bilgilere dayanarak atım pompalarındaki meydana gelen kusurlu mutasyonlar bazı patojenlerde virülansın azalmasına neden olmaktadır [Sun ve ark., 2014]. Örneğin *Klebsiella pneumoniae*'de *acrB* geninin susturulması ve *Enterobacter cloacae*'de *acrA* ve *tolC* genlerinin susturulması bu patojenlerin hayvan modellerinde enfeksiyon yapma seviyesini düşürmektedir ve böylece AcrAB-TolC pompa sisteminin bu iki bakteri türünde virülans oluşumunda özel bir yapı olduğu belirlenmiştir [Padilla ve ark., 2010; Perez ve ark., 2012].

Pseudomonas aureginosa'da ise en fazla çalışılan atım pompalarından MexAB–OprM, MexCD–OprJ, MexEF–OprM ve MexXY–OprM ile yapılan çalışmada

MexCD–OprJ hariç diğer genlerin delesyonu bakterinin MDCK hücrelerini istila yeteneklerinde belirgin bir düşüş görüldüğü belirtilmiştir [Hirakata ve ark., 2002].

2.8.2. Hücreler arası iletişim

Hücrelerarası iletişim bakterilerde stres cevabında ve topluluk içinde davranışta önemli bir rol oynamaktadır. Hücrelerarası iletişimde ise en önemli mekanizmadan biri de quorum sensing sistemidir. Bakteri otoindüser olarak bilinen sinyal moleküllerini üretir ve ortama bırakır. Eşik değeri seviyesine ulaştığı zaman bu moleküller transkripsiyon düzenleyicisi olarak özel reseptörlere bağlanır ve gen ekspresyon profilinin değişmesini sağlar. Quorum sensing hücrede antimikrobiyal peptidlerin üretiminde, metabolitlerin değişiminde, motilitede, polisakkarit sentezinde ve birçok virülans faktörün aktivasyonunda görev alır. Diğer bakteriler tarafından bu moleküllerin algılanması için hücre dışı alana bırakılmaları gerekir. Otoindüserler arasında difüze olabilmeye farklılıkları olsa da *Vibrio fischeri*'e ait N-açıl homoserin laktan (AHL), *Pseudomonas aeruginosa*'ya ait 3-oksoheksanoil homoserin lakton (3OC₆-HSL) ve N-butyryl homoserin lakton (C₄-HSL) kolaylıkla difüze olabilirler. Fakat N-(3-oxododecanoil) homoserin lakton (3OC₁₂-HSL) ve 2-heptyl-3-hydroxy-4-quinolone (PQS) yüksek molekül ağırlıkları ve hidrofobik yapılarından dolayı kolaylıkla geçemezler. Dolayısıyla membrandan geçişte atım pompaları önemli bir rol üstlenmektedir [Sun ve ark., 2014].

2.8.3. Biofilm oluşumundaki rolü

Birçok kronik ve kalıcı enfeksiyon biofilm ile ilişkilidir ve çoklu ilaca direncin yayılımında önemli bir faktördür. Planktonik hücrelere göre biofilm üreten bakterilerin bakterisidal antibiyotiklerle yok edilmeleri daha zordur [Sun ve ark., 2014]. Atım pompa inhibitörleri ile yapılan çalışmalarda pompa inhibitörlerinin kullanılması ile inaktive olan pompalar *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'de biofilm oluşumunu azalttığı belirtilmektedir [Kvist ve ark., 2008].

2.9. Atım Pompaları ile Oluşan Direncin Önlenmesi

2.9.1. Pompa mekanizmasını atlama

Atım pompaları vasıtasıyla antibiyotiklerin tanınmasından sorumlu moleküler etkenler tam olarak aydınlatılmamış olsa da antibiyotik gruplarında antibiyotiklerin transportunda bir farklılık söz konusudur. Öncül antibiyotik yapısından yeni moleküllerin sentezlenmesiyle eskiye göre daha az tanınmakta ve bakteride duyarlılık oluşturmaktadır. Örneğin 3. ve 4. kuşak kinolonların 1. ve 2. kuşağa göre, ketolidlerin makrolidlere ve glisinlerin tetrasiklinlere oranla daha az oranda hedef olmaları örnek verilebilir. Bir molekülün yapısının bakterinin duyarlılığını dikkate alarak optimize edilmesi element dizaynında önemli görülmektedir [Van Bambeke ve ark., 2006; Aygül, 2015].

2.9.2. Biyolojik inhibisyon

Atım pompa aktivitesinin inhibisyonu aşamasında uygulanan strateji proteinlerin antikör kullanılarak inhibe edilmesi veya antisense yaklaşımlardır. Antisense oligonükleotidler (pompayı kodlayan genlerin transkripsiyonunu engelleyerek) veya siRNA'lar kullanılarak (pompa genini transkripsiyonunu veya translasyonunu engelleyerek) veya geleneksel olmayan antisense moleküller ile olabilmektedir. Fakat bu strateji patojenlerde atım pompalarının rolünü araştırmak için *in vitro* olarak kullanılmakta olup terapötik olarak kullanılmamaktadır [Van Bambeke ve ark., 2006; Aygül, 2015].

2.9.3. Farmakolojik inhibisyon

Geniş çapta kullanılan yöntemlerden biri de atım pompalarının inhibitörler geliştirilerek özel antibiyotik ile birleşik tedavide kullanılmasıdır. Farmakolojik olarak atım pompalarının inhibisyonunda farklı mekanizmalar kullanılmaktadır. Atım pompasını yönlendiren enerjinin gradientinin dağılımı özel olmayan bir stratejidir [Van Bambeke ve ark., 2006; Aygül, 2015]. Phenyl-arginine beta-

naphthylamide (PA β N) [MC-207,110] ilk tanımlanan atım pompa inhibitörü olmakla birlikte *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* ve *Klebsiella pneumoniae*'de bulunan AcrAB-TolC üzerinde inhibitör bir etkiye sahiptir. İnhibitörler yardımıyla pompaların inhibisyonu;

- 1.Pompa ekspresyonu için gereken düzenleyici kısımlarla etkileşime girerek
- 2.Antibiyotik yapısında değişiklik oluşturarak ve dolayısıyla pompa ile etkileşimini engelleyerek
- 3.Pompa bileşenlerinin bir arada olmasını bozarak
- 4.Farklı bileşikler kullanarak yarışmalı veya yarışmasız olarak antibiyotiğin hedefe bağlanmasını engelleyerek
- 5.Hücre membranındaki porları bloke ederek
- 6.Pompa aktivitesi için gerekli olan enerjiyle mücadele ederek gerçekleştirirler [Van Bambeke ve ark., 2006; Aygül, 2015].

2.10. Pompa Aktivitesini Araştırma Yöntemleri

Antibiyotiklerin etkileri atım pompalarının çoklu ilaca dirençli fenotipler oluşturmasıyla tehlikeli boyutlara ulaşmaktadır. Bu bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonlar sağlık alanında önemli bir sorun oluşturmaktadır ve bazı terapötik problemlere neden olmaktadır. Bu sorunları önlemek için çoklu ilaca dirençli bakterileri erken teshiş etmek önemlidir [Lomovskaya ve ark., 2007]. Bununla birlikte bu mekanizmayı daha iyi anlayabilmek için metotlar geliştirmek önemlidir. “Genomik çağ” denilen süre boyunca transport proteinlerin varlığını belirlemek için kullanılan en yaygın metot bakteri genomunu sekanslamak ve homolog bakteri genomlarıyla karşılaştırıp muhtemel pompa kodlayan sekansları belirlemektir. Ayrıca gen susturma işlemi de alternatif bir yöntem olarak görülmektedir [Ryan ve ark., 2001; Smith ve ark., 2007].

Farklı bir metot olarak agar plakaları kullanarak bakterilerin davranışlarını ve duyarlılığını belirleyerek atım pompa aktivitesinin belirlenmesi sağlanmaktadır. Ethidium Bromide-agar Cartwheel metodu denilen bu yöntemde agar plağa etidyum bromür'ün farklı konsantrasyonları hazırlanarak bakteri inokule edilir. Ardından bir gecelik inkübasyondan sonra UV ışık altında görüntülenir ve en az konsantrasyonda ışığa yayan plaka kaydedilir [Martins ve ark., 2006].

Bir başka atım pompa aktivitesini belirleme yöntemi ise flow sitometridir. Bu metot ile hücre içi hedeflere bağlanabilen floresan boyalar kullanarak gerçekleştirilmektedir. Bu aşama identifikasyonu kolaylaştırmakla beraber hücrenin farklı kısımlarından ayırt edilmesini sağlamaktadır. Aynı zamanda bu teknik bakterilerin belirlenmesinde ve sayılmasında, aynı zamanda antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesinde kullanılmaktadır [Jernae ve ark., 1994; Paixão ve ark., 2009].

Farklı bir metot ise başarıyla geliştirilmiş yarı otomatik florometrik metottur. Bu yöntemde etidyum bromür gibi floresan madde kullanılmaktadır. Etidyum bromür taşınma kinetiği atım pompa aktivitesini belirlemede kullanılır. Sıvı solüsyonlarda düşük floresan yayar, gram negatif bakterilerin periplazmik boşluklarında ve gram pozitiflerin sitoplazmasında hücresel bileşiklere bağlanarak kuvvetli floresan yayarlar. Florometri yardımıyla floresan substratın hücre membran boyunca transportu sürekli takip edilir. Bilgisayar yardımıyla kolay takip edilebilmesi, kusursuz ve tekrarlanabilir olması nedeniyle bu metot yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntem ile ayrıca atım pompa inhibitörlerin etkinliği ve aşırı ekspresyon yapan çoklu ilaca dirençli bakterilerin atım pompa aktivitelerinin ölçülmesinde kullanılabilir [Viveiros ve ark., 2008].

2.11. GSBL Doğrulama Testleri

GSBL doğrulama testleri klavulanik asit ve indikatör sefalosporin veya monobaktam arasındaki sinerjinin gösterilmesini temel almaktadır. Aynı zamanda bu testler GSBL'leri beta laktamaz inhibitörlerinden etkilenmeyen AmpC tipi enzimlerden ayırmaktadır [Özsoy ve ark., 2001].

Sık kullanılan yöntemler arasında;

- Kombine disk testi
- Çift disk sinerji testi
- E-test yöntemi
- Mikrodilüsyon testi
- Üç boyutlu test
- Otomatize sistemler
- Moleküler teknikler gibi yöntemler bulunmaktadır.

2.11.1. Kombine disk testi

Kombine disk yönteminde klavulanik içeren ve içermeyen seftazidim ve seftotaksim antibiyotik diskleri kullanılır. Standart 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton Agar (MHA) besiyerine yayılır. Ardından klavulanik asit içeren ve içermeyen seftazidim ve seftotaksim antibiyotik diskleri yerleştirilir. 35°C’de bir gece inkübasyondan sonra kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla 5 mm veya daha fazla ise izolat GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilmektedir [CLSI, 2014].

2.11.2. Çift disk sinerji testi

Temeli disk difüzyon yöntemine dayanır. Aynı şekilde 0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA plağına yayılır. Plağın tam ortasına amoksisilin-klavulanik asit diski, etrafına ise merkeze uzaklıkları 25-30 mm olacak şekilde seftazidim, seftotaksim, seftotaksim, aztreonam veya seftodoksime diskleri yerleştirilir. 35°C’de bir gece inkübasyondan sonra antibiyotiklere ait inhibisyon zonlarının klavulanik aside doğru genişlemesi veya arada bakteri üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL pozitif olarak yorumlanır [Gülşay, 2004].

2.11.3. E-test yöntemi

Bir ucunda seftazidim, diğer ucunda ise seftazidim/klavulanik asit gradienti içerecek şekilde hazırlanan stripler kullanılır. Stripler disk difüzyon prosedürlerine uygun olarak ekim yapılan petrilere yerleştirilir. İnkubasyon sonucunda elips bir şekilde zon elde edilir ve zonun stripi kestiği noktada okunan değer antibiyotik için MİK değerini verir. Seftazidim ve seftazidim/klavulanik asit değerleri birbirine oranlandığında seftazidimin MİK değeri seftazidim/klavulanik asit MİK değerine oranla 8 kat veya daha fazla olması GSBL varlığını işaret eder [Cormican ve ark., 1996].

2.11.4. Mikrodilüsyon testi

Pratikte pek uygulanan bir test olmamasına karşın bu testle GSBL varlığı beta laktamaz inhibitörleri varlığında sefalosporinlerin MİK değerlerindeki azalma sıvı mikrodilüsyon tekniği ile de belirlenebilir. Buna göre seftazidim veya sefotaksim MİK değerleri hem tek başlarına hem de klavulanik asit varlığında saptanır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde 8 kat ve üzeri azalma GSBL pozitif olarak kabul edilir [Thomson ve ark., 1999].

2.11.5. Üç boyutlu test

0,5 McFarland yoğunluğunda hazırlanan bakteri süspansiyonu MHA plağına yayılır. Petrinin orta kısmına yarık açılır ve antibiyotik diskleri 3 mm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirilir. Yarığın içerisine de hazırlanan bakteri süspansiyonundan konulur. Seftazidim, sefotaksim, seftriakson ve aztreonam diskleri yarık etrafına yerleştirildikten sonra inkübasyona bırakılır. Bu disklere ait inhibisyon zonlarının dairesel biçiminde bozulma, kesintiye uğrama veya bakterinin inoküle edildiği kesi çizgisi yakınında birbirinden ayrı kolonilerin üremesi GSBL pozitif olarak değerlendirilir [Gülay, 2004].

2.11.6. Otomatize sistemler

Çeşitli firmalar tarafından (VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) ve Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD/ABD)) geliştirilen otomatize sistemler yardımı ile GSBL üreten suşlar saptanabilmektedir. Bunların bir kısmı spektrofotometrik ve/veya başka bir dizi ölçüm yöntemini kullanarak mikroorganizmaların tiplendirilmesini de sağlamaktadır. Bu iki parametre dışında bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç profillerini de görüntülemek için kullanılmaktadır. Üreticinin firmanın önerilerine göre uygulamalar yapılmaktadır [Drieux, 2008].

2.11.7. Moleküler teknikler

Moleküler yöntemler enzimlerin tanımlanmasında araştırma amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu amaçla DNA probları, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), oligotiplendirme, ligaz zincir reaksiyonu (LCR), izoelektrik odaklama gibi yöntemler kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemlerin çoğunda sadece enzim ailesi gösterilebilmektedir. Enzimin kesin olarak tanımlanması bu konuda altın standart yöntem olarak kabul edilen nükleik asit dizi analizi ile mümkün olmaktadır [Bradford, 2001; Stürenburg ve Mack, 2003].

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Bakteri örnekleri

Çalışma kapsamında GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* suşları Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi servislerinde yatan veya ayakta tedavi olan hastaların farklı kültür örneklerinden (kan, idrar, balgam vs.) izole edildi. GSBL üretimi ve tür tayini Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesin Mikrobiyoloji Laboratuvarı bünyesinde bulunan BD Phoenix (Becton Dickinson, USA) otomatize sistem tarafından belirlenen 100 *Klebsiella pneumoniae* izolatu çalışmaya dahil edildi.

3.1.2. Cihazlar

Otoklav (Hiclave Hv-110L, Hirayama), Etüv (UN160, Memmert), Gerçek Zamanlı PZR Cihazı (Piko Real 96, Thermo Scientific), PZR kabini (UVP), Buz makinası (FM-150KE, Hoshizaki), Spektrofotometre (UV-Visible Evolution 201, Thermo Scientific), Mikroplaka okuyucu (Multiscan GO, Thermo Scientific), -20°C derin dondurucu (Vestel), -80°C derin dondurucu (Forma 8800 Series, Thermo Scientific), Masa üstü soğutmalı santrifüj (Z216 MK, Hermle), Hassas terazi (UW1020H, Shimadzu), Kaba terazi (TXB6201L, Shimadzu), Ultra saf su cihazı (Direct-Q 8UV, Merck), pH Metre (Orion Star AL11, Thermo Scientific), Kuru blok ısıtıcı (Dri-Block DB-4D, Techne), Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (C-MAG HS7, IKA), Vorteks (Vortex 4, IKA), Densimetre (DEN-1, Biosan), Mini santrifüj (mini G, IKA), Thermal cycler (Techne Prime), Çalkalamalı su banyosu (BS-06, Jeio Tech), Otomatik pipetler (Thermo Scientific), Mikrodalga fırın (Vestel), Görüntleme cihazı (Fusion FX, Vilber Lourmat), Güç kaynağı (EC1000XL, Thermo), Elektroferez tankı (OWL Easycast B1, Thermo)

3.1.3. Sarf malzemeler

Steril 2 ml santrifüj tüp (Axygen), Steril PZR tüpü 0,2 ml (Axygen), Steril 5 ml pipet (Corning), Pipet uçları (Axygen), Steril eküvyon çubuklar (Lp İtaliana), Steril öze (Isolab), Steril petri kutusu (100-150 mm) (Lp İtaliana), Saklama kutusu (Thermo Scientific), Falcon tüp (Isolab), Vinil eldiven (Isolab), Otoklav poşeti (Lp İtaliana), Cam tüp, Beher, Cam şişe (Isolab)

3.1.4. Kimyasallar

Gliserol (Sigma), Lizozim (Sigma), B-mercaptoethanol (Amresco), Etanol (Merck), Tris HCL (Sigma), EDTA (Sigma), Trisma Base (Sigma), Boric Acid (Sigma), EDTA (Sigma), Agaroz (Prona), dNTP Mix (Thermo), 50 bp DNA Ladder (Thermo), Taq DNA Polymerase (Thermo), Ethidium Bromür (Sigma), Primer (Integrated DNA Technologies), Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific), Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific), Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) (Thermo Scientific)

3.1.5. Antibiyotik diskleri

Ampisilin (AM) (10 µg) (Bioanalyse), Seftazidim (CAZ) (30µg) (Bioanalyse), Sefotaksim (CTX) (30µg) (Bioanalyse) , Seftriakson (CRO) (30µg) (Bioanalyse), Aztreonam (ATM) (30µg) (Oxoid), Siprofloksasin (CIP) (5 µg) (Bioanalyse), Ertapenem (ETP) (10 µg) (Bioanalyse), Tobramisin (NN) (10 µg) (Bioanalyse), Tetrasiklin (TE) (30µg) (Bioanalyse), Seftazidim/klavulanik asit (CZC) (30µg/10µg) (Bioanalyse), Sefotaksim/klavulanik asit (CTC) (30µg/10µg) (Bioanalyse)

3.1.6. Referans suşlar

KWIK-STIK 2 Pack *Escherichia coli* ATCC 25922 (Microbiologics)

KWIK-STIK 2 Pack *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Microbiologics)

Klebsiella pneumoniae ATCC 700721 (MGH 78578) (ATCC)

3.1.7. Besiyeri ve çözeltiler

Tryptic Soy Agar (TSA) (Oxoid)

İçerik (g/L)

Pancreatic digest of casein	15,0
Enzymatic digest of soya bean	5,0
Sodium chloride	5,0
Agar	15,0

pH: 25°C'de $7,3 \pm 0,2$

Hazırlanışı: 40 g toz besiyeri 1 litre distile su içerisinde tamamen çözününceye kadar kaynatıldı. 1M NaOH ve HCl çözeltileri ile pH ayarlaması yapıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. 50°C'lik su banyosunda 30 dakika soğumaya bırakıldı. Daha sonra steril petrilere yaklaşık 20 ml olacak şekilde dağıtıldı ve +4°C'de saklamaya alındı.

Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck)

İçerik (g/L)

Peptone from casein 17,0

Peptone from soymeal 3,0

D(+) glucose monohydrate 2,5

Sodium chloride 5,0

Di-potassium hydrogen phosphate 2,5

pH: 25°C'de $7,3 \pm 0,2$

Hazırlanışı: 30 g toz besiyeri 1 litre distile su içerisinde tamamen çözünene kadar karıştırıldı. 1M NaOH ve HCl çözeltileri ile pH ayarlaması yapıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. 50°C'lik su banyosunda 30 dakika soğumaya bırakıldı. Daha sonra steril 15 cm'lik tüplere 5'er ml olacak şekilde dağıtıldı ve +4°C'de saklamaya alındı.

Mueller-Hinton Agar (MHA) (Merck)

İçerik (g/L)

Meat infusion 2,0

Casein hydrolysate 17,5

Starch 1,5

Agar-agar 13,0

pH: 25°C'de $7,4 \pm 0,2$

Hazırlanışı: 34 g toz besiyeri 1 litre distile su içerisinde tamamen çözünene dek kaynatıldı. 1M NaOH ve HCl çözeltileri ile pH ayarlaması yapıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. 50°C'lik su banyosunda 30 dakika soğumaya bırakıldı. Daha sonra steril petrilere yaklaşık 4 mm yükseklikte olacak şekilde dağıtıldı ve +4°C'de saklamaya alındı.

Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Merck)

İçerik (g/L)

Nutrient substrate	27,5
D(+) glucose	2,0
Sodium chloride	5,0
Di-potassium hydrogen phosphate	2,5

pH: 25°C'de $7,4 \pm 0,2$

Hazırlanışı: 37 g toz besiyeri 1 litre distile su içerisinde tamamen çözünene kadar karıştırıldı. 1M NaOH ve HCl çözeltileri ile pH ayarlaması yapıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. 50°C'lik su banyosunda 30 dakika soğumaya bırakıldı. Stok besiyeri olarak kullanılacak şekilde 2 ml'lik ependorf tüplere dağıtıldı ve +4°C'de saklamaya alındı.

Serum fizyolojik

İçerik (g/L)

NaCl 9

Hazırlanışı: 9 gr NaCl 1 litre distile su içerisinde tamamen çözünene dek karıştırıldı. Her bir tüpe 5'er ml dağıtıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edildi. Soğuduktan sonra +4°C' de saklamaya alındı.

1M NaOH

İçerik (g/L)

NaOH 40

Hazırlanışı: 40 g NaOH 1 litre distile su içerisinde tamamen çözünene kadar karıştırıldı. Oda sıcaklığında saklamaya alındı.

1M HCl

İçerik (g/L)

HCL 36,46

Hazırlanışı: 36,46 g HCl 1 litre distile su içerisinde tamamen çözünene dek karıştırıldı. Oda sıcaklığında saklamaya alındı.

Tris-EDTA (TE) Tamponu

İçerik (g/L)

Tris HCl (10 mM, pH:8,0) 1,57

EDTA (1mM) 0,3

Hazırlanışı: 1,57 g Tris HCl bir miktar saf suda çözüldü. pH:8,0'a ayarlandıktan sonra 0,3 g EDTA eklenip 1000 ml'ye saf su ile tamamlandı.

10X TBE Tamponu

İçerik (g/L)

Trisma base 107,81

Borik asit 55,02

EDTA 7,444

Hazırlanışı: Kimyasal maddelerin hepsi tartılıp bir şişeye konulduktan sonra 1 litre distile su içinde çözüldü. İyice çözünen karışımın pH'sı 8,4'e ayarlanarak çözelti hazır hale getirildi.

1X TBE Tamponu

Hazırlanışı: 10X TBE çözeltisinden 100 ml alınıp saf suyla 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.

3.1.8. Primerler

Integrated DNA Technologies firması tarafından sentezlenen primerler 1000 μM olacak şekilde sulandırıldı. Hazırlanan stok çözeltilerden 1:990 seyreltme yapılarak 10 μM 'lık primer stoğu elde edildi ve çalışmalarda kullanılmak üzere -20°C 'de saklamaya alındı.

3.2. Metot

Çalışma kapsamında GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* suşları, Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi servislerinde yatan veya ayakta tedavi olan hastaların farklı kültür örneklerinden (kan, idrar, balgam vs.) izole edildi. GSBL üretimi ve tür tayini Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesinin Mikrobiyoloji Laboratuvarı bünyesinde bulunan BD Phoenix (Becton Dickinson, USA) otomatize sistem tarafından belirlenen 100 *Klebsiella pneumoniae* izolatu çalışmada kullanıldı. Cihaz tarafından tanımlanan izotlar tek koloni pasajı yapılarak TSA (Triptik Soy Agar)'da çoğaltıldıktan sonra %20 gliserol içeren Brain Heart Infusion (BHI) sıvı besiyeri içinde -20°C 'de depolandı.

3.2.1. Suşların saklanması

Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden temin edilen suşları saklamak için % 20 gliserol içeren Brain Heart Infusion Broth hazırlanıp 2 ml'lik steril ependorf tüplerine 1,5 ml olacak şekilde aktarıldı. Üç kopya olacak şekilde hazırlanan suşların iki kopyası -20°C 'de, bir kopyası ise -80°C 'de saklandı.

3.2.2. Antibiyotik duyarlılık testi

Tanımlanan suşların antibiyotik duyarlılıkları Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) kriterlerine göre Kirby Bauer disk difüzyon yöntemi ile ticari antibiyotik diskleri kullanılarak yapıldı. *Klebsiella pneumoniae* olarak tanımlanan suşlar TSA besiyerinde 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. Taze bakteri kültürlerinden

%0,9'luk steril fizyolojik tuzlu su içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığında süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyona steril pamuklu eküvyon batırıldı ve eküvyon tüpün kenarına bastırılarak fazla sıvı uzaklaştırıldı. Önceden hazırlanmış 4 mm kalınlığında dökülmüş MHA besiyeri yüzeyine yayma ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri uygun bir şekilde steril pens ile besiyeri yüzeyine yerleştirildi. Tüm plaklar 35°C'de 18 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası inhibisyon zon çapları ölçüldü. Sonuçlar CLSI'nin önerdiği zon çaplarına göre dirençli (R), ara duyarlı (I) ve duyarlı (S) olarak değerlendirildi (Tablo 3.1). Kalite kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 kullanıldı [CLSI, 2014].

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan antibiyotikler, kodları, disk içeriği ve zon çapları

Antibiyotik	Kısaltması	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)		
			Duyarlı (S)	Ara duyarlı (I)	Dirençli (R)
Ampisilin	(AM)	(10 µg)	≥17	14-16	≤13
Seftazidim	(CAZ)	(30µg)	≥21	18-20	≤17
Sefotaksim	(CTX)	(30µg)	≥26	23-25	≤22
Seftriakson	(CRO)	(30µg)	≥23	20-22	≤19
Aztreonam	(ATM)	(30µg)	≥21	18-20	≤17
Siprofloksasin	(CIP)	(5 µg)	≥21	16-20	≤15
Ertapenem	(ETP)	(10 µg)	≥ 22	19-21	≤18
Tobramisin	(NN)	(10 µg)	≥15	13-14	≤12
Tetrasiklin	(TE)	(30µg)	≥15	12-14	≤11

3.2.3. Kombine disk testi

GSBL tespitinde kullanılan yöntemlerden biride fenotipik doğrulama testlerinden kombine disk testidir. TSA besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübe edilen ve üremiş olan bakteri kolonilerinden bir miktar alınarak %0,9'luk steril serum fizyolojik içerisinde 0,5 McFarland standart bulanıklıkta olacak şekilde hazırlandı. Bu süspansiyon steril eküvyon yardımıyla MHA besiyeri yüzeyine inoküle edildi. Bu besiyeri üzerine seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim/klavulanik asit (30 µg/10 µg) ve sefotaksim/klavulanik asit (30 µg/10 µg) diskleri yerleştirildi. 35°C'de 18 saat inkübasyondan sonra sefotaksim ve seftazidim diskinin inhibisyon zon çapının CLSI önerileri doğrultusunda klavulanik asit ile test edildiğinde tek başına test edilmesine

göre ≥ 5 mm artması GSBL pozitif olarak değerlendirildi. Kalite kontrol suşu olarak *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 kullanıldı [CLSI, 2014].

3.2.4. Total RNA izolasyonu

Total RNA izolasyonu için -20°C 'de stok halde bulunan bakteriler TSA besiyerine ekimi yapıldı ve 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. Bakteriler daha sonra 5 ml'lik TSB besiyerine inoküle edilerek 37°C 'de logaritmik faza ($\text{OD}_{600}:0,5-1$) ulaşmaları sağlandı ve izole edildi. Total RNA izolasyonu Thermo Scientific GeneJET RNA Purification Kiti protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi.

Ön Hazırlık:

- İzolasyona başlamadan önce Wash Buffer 1'e 10 ml %100'lük etanol eklenerek son hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Wash Buffer 2'ye ise 39 ml etanol eklenerek son hacmi 62 ml'ye tamamlandı.
- 0,4 mg/ml içeren TE (10 mM Tris HCl, pH:8,0, 1 mM EDTA) tamponu hazırlandı.
- Her 1ml Lysis Buffer'ı için 20 μl beta-mercaptoethanol eklendi ve çalışmada kullanıldı.

Protokole göre;

- 1,5 ml bakteri kültürü 1,5 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 12 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atılıp pellet kullanıldı.
- 100 μl taze hazırlanmış 0,4 mg/ml lizozim içeren TE tamponu eklendi. Tüp ters düz edilerek karıştırıldı.
- Süspansiyon edilen hücreler 25°C 'de 5 dakika inkübe edildi.
- β -mercaptoethanol eklenmiş Lysis Buffer'dan 300 μl eklendi ve homojen bir karışım görülene kadar 15 saniye vortekslendi.
- %100'lük 180 μl etanol eklendi ve pipetaj yapıldı.

- Tüp içindeki karışımdan 700 µl alınarak Genejet RNA Purification Colomn'a aktarıldı ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan akan sıvının bulunduğu tüp atılarak kolon yeni steril 2 ml'lik toplama tüpüne yerleştirildi.
- Wash Buffer 1'den 700 µl kolonun içene aktarıldı ve kolon içeren tüp 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan toplama tüpüne akan sıvı atıldı ve kolon tekrar tüpe yerleştirildi.
- Wash Buffer 2'den kolona 600 µl eklendi ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolondan akan sıvı atıldı ve kolon tüpe yerleştirildi.
- Tekrar Wash Buffer 2'den 250 µl kolona eklendi ve 12 000 rpm'de 2 dakika santrifüj edildi. Kolon steril yeni bir 1,5 ml'lik tüpe aktarıldı.
- Son olarak 100 µl Water nuclease free eklendi ve 12 000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi. Kolon atılarak kalan sıvı PZR çalışmaları için -20°C'de saklandı.

3.2.5. Total RNA miktarının ve saflığının ölçülmesi

RNA miktarı ve saflığı spektrofotometre cihazı kullanılarak 260/280 nm dalga boyunda izolasyon kitinde bulunan water nuclease free blank (kör) okutularak ölçüldü.

3.2.6. Komplementer DNA (cDNA) sentezi

İzolasyon sonunda elde edilen ve miktarları belirlenen bakteri total RNA örnekleri cDNA sentezi için Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Total RNA'dan cDNA sentezlenmesi için kit içeriğinde bulunan Oligo (dT)₁₈ primer kullanılması tercih edildi. Ayrıca 100 ng total RNA her bir örnek için farklı hacimlerde kullanıldı.

Protokole göre;

- İlk aşamada aşağıdaki reaksiyon karışımı 0,2 ml'lik PZR tüpünde hazırlandı.

- Herbir örnek için 100 ng total RNA olacak şekilde hesaplanarak uygun hacimde alındı.
- Oligo (dT)₁₈ primerlerinden her bir tüpe 1 µl eklendi toplam hacim 12 µl olacak şekilde nuclease free water ile tamamlandı.
- Nazikçe karıştırıldı ve 3-5 saniye santrifüjlendi.
- 5X Reaction Buffer'dan 4 µl, RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)'den 1 µl, 10 mM dNTP karışımından 2 µl ve RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl) enziminden 2 µl eklendi.
- Toplam hacim 20 µl olacak şekilde santrifüj edilerek bileşenler çöktürüldü.
- Karışım PZR cihazında 42°C'de 60 dakika ardından 70°C'de 10 dakika işleme tabi tutuldu. Elde edilen cDNA örnekleri -20°C'de saklandı.

3.2.7. Primer dizileri

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda sulandırılan primerler hazırlanan 10 µM'lik stoklardan kullanıldı. Kullanılan primerler ve büyüklükleri Tablo 3.2'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Primer dizileri ve amplicon uzunlukları

Primer	Sekans (5'- 3')	Amplicon Uzunluğu	Referans
kdeA-F	GTTGTTCCCGTTATGTCTGGTGC	170 bp	[Ping ve ark., 2007]
kdeA-R	CCAGCAGCCACTGTAAAAACATGC		
kexD-F	ACCGGTTGCGCAATACCCTGA	184 bp	[Ogawa ve ark., 2012]
kexD-R	CGTAATTGACGCCATCCCTG		
kpnE-F	ATTGCTGAAATTACCGGCAC	172 bp	[Srinivasan ve Rajamohan, 2013]
kpnE-R	AAATACCGATCCCTTCCCAC		
ketM-F	TTGGCAGAGAAGGCGGTTGG	123 bp	[Ogawa ve ark., 2015]
ketM-R	CATGACCATCCCGGGCTTG		
16S-F	AGGCTAACACATGCAAGTC	326 bp	[Ping ve ark., 2007]
16S-R	TGCAATATTCCCCACTGCTG		
acrA-F	GTCCTCAGGTCAAGTGGCATT	257 bp	[Li ve ark., 2008]
acrA-R	ATTGCTCTGCTGCGCCGTT		

3.2.8. Primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu

PZR çalışmalarında 16S, kpnEF, kdeA, kexD, acrA ve ketM gen bölgelerine ait spesifik primerlerin bağlanma sıcaklıklarının tespiti için farklı sıcaklık optimizasyon denemeleri yapıldı. Bu bağlamda toplam hacim 25 µl olacak şekilde karışım hazırlandı. Her bir gen için aynı karışım ve aynı PZR programı uygulandı. 16S gen ve kdeA bölgesi için 49-57°C, ketM için 50-58°C, acrA için 48-56 °C, kpnEF için 46-54 °C ve kexD için 50-58 °C sıcaklık derecesi gradientli PZR cihazında çalışıldı. Optimizasyonda kontrol suşu olarak atım pompa genlerini eksprese ettiğini bildiğimiz *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700721 suşu kullanıldı. Gen bölgelerine ait PZR karışım Tablo 3.3’de, PZR koşulları Tablo 3.4’de verildi.

Tablo 3.3. PZR karışımı

Kullanılan Malzeme	Stok Konsantrasyonu	Hacim	Son Konsantrasyon
10X Taq DNA buffer	10X	2,5 µl	1X
MgCl ₂	25 mM	1 µl	1 mM
dNTP mix	10 mM	0,5 µl	200 nM
Forward primer	10 mM	1,2 µl	0,5 mM
Reverse primer	10 mM	1,2 µl	0,5 mM
Taq DNA Polimeraz	5U/µl	0,2 µl	1U
cDNA	-	2 µl	5 ng
dH ₂ O	-	16,3 µl	-
Toplam Hacim:		25 µl	

Tablo 3.4. PZR koşulları

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95 °C	3 dk	1
Denatürasyon	95 °C	30 saniye	
Primer Bağlanması	49-57 °C arası (16S için) 49-57 °C arası (kdeA için) 50-58 °C arası (ketM için) 48-56 °C arası (acrA için) 46-54 °C arası (kpnEF için) 50-58 °C arası (kexD için)	30 saniye	35
Primer Uzaması	72 °C	30 saniye	
Son Uzama	72 °C	5 dakika	1

3.2.9. PZR ürünlerinin elektroforezi

PZR reaksiyonu sonrası oluşan amplifikasyon ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütüldü. 100 ml 1X TBE tamponu ile 2 g agarozun mikrodalga fırında eritilmesi ile hazırlanan jelle 25 µl ürün ile 5 µl 6X yükleme solüsyonu karıştırılarak toplamda 25 µl kuyucuklara yüklendi. 100 V 90 dakika süreyle bantlar yürütüldü. Yürütme işleminin ardından %10'luk etidyum bromür ile 20 dakika boyandı. Oluşan bantların moleküler büyüklükleri görüntüleme cihazında 50 bp DNA Ladder Plus kullanılarak belirlendi.

3.2.10. Gerçek zamanlı PZR ile gen ekspresyonlarının belirlenmesi

İzolatların 16S, kpnEF, kdeA, kexD, acrA ve ketM transkripsiyon düzeyleri Thermo Scientific Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X) ticari kiti kullanılarak gerçekleştirildi. Toplam hacim 10 µl olacak şekilde karışım hazırlandı. Her bir gen bölgesi için farklı sıcaklık değeri kullanılıp aynı karışım ve PZR programı kullanıldı. Gerçek zamanlı PZR karışımı Tablo 3.5'de, gerçek zamanlı PZR koşulları Tablo 3.6'da verildi.

Tablo 3.5. Gerçek zamanlı PZR karışımı

Kullanılan Malzeme	Stok Konsantrasyonu	Hacim	Son Konsantrasyon
SYBR Green qPCR Master Mix	2X	5 µl	1X
Forward Primer	10 mM	0,5 µl	0,5 mM
Reverse Primer	10 mM	0,5 µl	0,5 mM
cDNA	-	1 µl	5 ng
dH ₂ O	-	3 µl	-
	Toplam Hacim	10 µl	

Tablo 3.6. Gerçek zamanlı PZR koşulları

Reaksiyon Basamağı	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön Denatürasyon	95 °C	10 dakika	1
Denatürasyon	95 °C	15 saniye	
Primer Bağlanması	52 °C (16S için) 53°C (kdeA için) 51°C (ketM için) 50°C (acrA için) 51°C (kpnEF için) 53°C (kexD için)	30 saniye	40
Primer Uzaması	72 °C	30 saniye	

3.2.11. Erime eğrisi analizi ve agaroz jel elektroforezi

PZR reaksiyonu sonrası ürünlerin özgülüğünü doğrulamak için gerçek zamanlı PZR cihazında erime eğrisi analizi yapıldı. Her 1 saniyede 0,2°C'lik sıcaklık artışı 90°C'ye kadar yavaş yavaş yükselir, artan sıcaklığa bağlı olarak çift sarmal zincirler ayrılmaya başlar ve floresans ışımada azalma olur. Bu aşamada belirli aralıklarla tüpteki floresans miktarı ölçülür. Erime eğrisi analizi ile her ampikonun Tm derecesi saptanır ve primer dimer oluşup oluşmadığı izlenebilir.

Erime eğrisi analizi sonrası 100 ml 1X TBE tamponu ile 2 gr agarozun mikrodalga fırında eritilmesi ile hazırlanan jelle 9 µl ürün ile 2 µl 6X yükleme solüsyonu karıştırılarak toplamda 9 µl kuyucuklara yüklendi. 100 V 90 dakika süreyle bantlar yürütüldü. Yürütme işleminin ardından %10'luk etidyum bromür ile 20 dakika boyandı. Oluşan bantların moleküler büyüklükleri görüntüleme cihazında 50 bp DNA Ladder Plus kullanılarak görüntülendi.

3.2.12. Gen ekspresyonunun kantitasyonu

İzolatlara ait kpnEF, kdeA, kexD, acrA ve ketM genleri gerçek zamanlı PZR cihazında çalışılarak gen ifade düzeyleri yani Ct değerleri elde edildi. Ct değeri her örneğin ışımaya değerinin artmaya başladığı döngüyü belirtmektedir. Ct değeri gen anlatım seviyesi ile ters orantılıdır ve küçük Ct değerleri çoğalmanın erken döngülerde başladığını göstermektedir. Her bir gen için her bir örnekte belirlenen o gene ait Ct değeri aynı örneğe ait referans gen Ct değerinden çıkarıldı ve ΔCt^{hedef} hesaplandı. Aynı şekilde referans suşta hedef genin referans gen ile arasındaki fark $\Delta Ct^{\text{kontrol}}$ olarak hesaplandı. Sonraki aşamada $\Delta\Delta Ct$ değerini elde etmek için $\Delta Ct^{\text{hedef}} - \Delta Ct^{\text{kontrol}}$ formülü kullanıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ile klinik izolatlarda eksprese olan genlerin referans suşa göre kaç kat arttığı veya azaldığı, diğer bir ifadeyle genler için rölatif katsayı (fold change) hesaplandı [Livak ve Schmittgen, 2001].

Normalizasyon için referans gen olarak 16S rRNA geni kullanıldı. Referans suşta her bir genin ekspresyon oranı 1 kabul edildi. Normalizasyon sonucu izolatların görece gen ekspresyonları teorik olarak bu hedef genleri normal seviyede eksprese ettiği bilinen *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700721 suşu ile karşılaştırıldı.

3.2.13. İstatistiksel analiz

Gen ekspresyon verileri GraphPad (Prism 7 for Windows) bilgisayar yazılımı kullanılarak istatistiksel olarak analiz edildi. Student's t Testi testi ile gruplar arasında gen ekspresyonları açısından anlamlı fark olup olmadığı değerlendirildi. Tüm veriler ortalama \pm standart hata olarak ifade edildi. $p < 0.05$ ise fark anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. İzolatların Genel Özellikleri

Bu çalışmada Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Eylül 2013-Temmuz 2015 tarihleri arasında yatan veya ayakta tedavi gören 100 farklı hastanın çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 100 GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* suşu kullanıldı.

4.2. İzolatların Gönderildiği Servislere Göre Dağılımı

İzolatların izole edildiği servislere göre dağılımı sayı ve yüzde olarak; acil yoğun bakım 4 (%4), beyin ve sinir cerrahi 1 (%1), cerrahi yoğun bakım 9 (%9), çocuk cerrahi 1 (%1), dahiliye yoğun bakım 26 (%26), enfeksiyon 13 (%13), genel cerrahi 5 (%5), genel yoğun bakım 4 (%4), göğüs cerrahisi 1 (%1), göğüs hastalıkları 5 (%5), hematoloji 1 (%1), hemodiyaliz 2 (%2), iç hastalıkları 6 (%6), koroner yoğun bakım 1 (%1), nefroloji 6 (%6), radyasyon onkolojisi 1 (%1), tıbbi onkoloji 1 (%1), üroloji 12 (%12) ve yanık 1 (%1) servisinden izole edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Servislere göre hastaların dağılımı

Servisler	Hasta Sayısı	Yüzde (%)
Acil Yoğun Bakım	4	4
Beyin ve Sinir Cerrahi	1	1
Cerrahi Yoğun Bakım	9	9
Çocuk Cerrahi	1	1
Dahiliye Yoğun Bakım	26	26
Enfeksiyon	13	13
Genel Cerrahi	5	5
Genel Yoğun Bakım	4	4
Göğüs Cerrahisi	1	1
Göğüs Hastalıkları	5	5
Hematoloji	1	1
Hemodiyaliz	2	2
İç Hastalıkları	6	6
Koroner Yoğun Bakım	1	1
Nefroloji	6	6
Radyasyon Onkoloji	1	1
Tıbbi Onkoloji	1	1
Üroloji	12	12
Yanık	1	1

4.3. İzolatların Elde Edildiği Materyallerin Dağılımı

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 100 GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının materyallere göre dağılımı ise; abse 3 (%3), balgam 8 (%8), dren 1 (%1), idrar 55 (%55), kan 12 (%12), katater 5 (%5), plevra 1 (%1), trakeal aspirat 6 (%6) ve yara 9 (%9) şeklindedir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Klinik materyallere göre dağılım

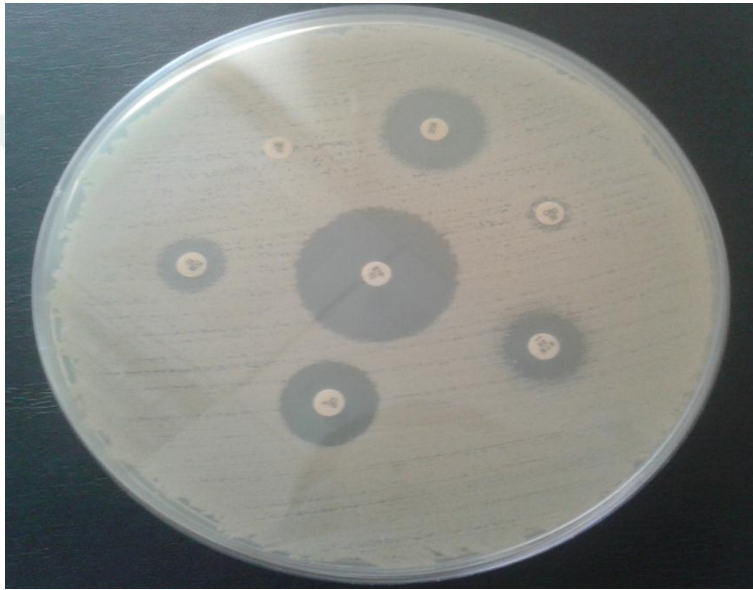
Klinik Materyal	Sayı	Yüzde
Abse	3	3
Balgam	8	8
Dren	1	1
İdrar	55	55
Kan	12	12
Katater	5	5
Plevra	1	1
Trakeal Aspirat	6	6
Yara	9	9

4.4. Hastaların Cinsiyet ve Yaş Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarının izole edildiği hastaların 55 (%55)'i erkek, 45 (%45)'i ise bayandır. Tüm hastaların yaş ortalaması 66,40, bayanların yaş ortalaması 65,85 ve erkeklerin yaş ortalaması 66,87'dir. Bayanlarda en küçük yaş 16, en büyük yaş 90; erkeklerde en küçük yaş 1, en büyük yaş 96; toplam hastalarda ise en küçük yaş 1, en büyük yaş 96'dır.

4.5. İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

Çalışmaya alınan suşların seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX), seftriakson (CRO), aztreonam (ATM), siprofloksasin (CIP), ertapenem (ETP), tobramisin (NN), ampisilin (AM) ve tetrasiklin (TE)'e duyarlılıkları Kirby Bauer disk difüzyon yöntemiyle elde edilen zon çaplarına göre değerlendirilmiştir.

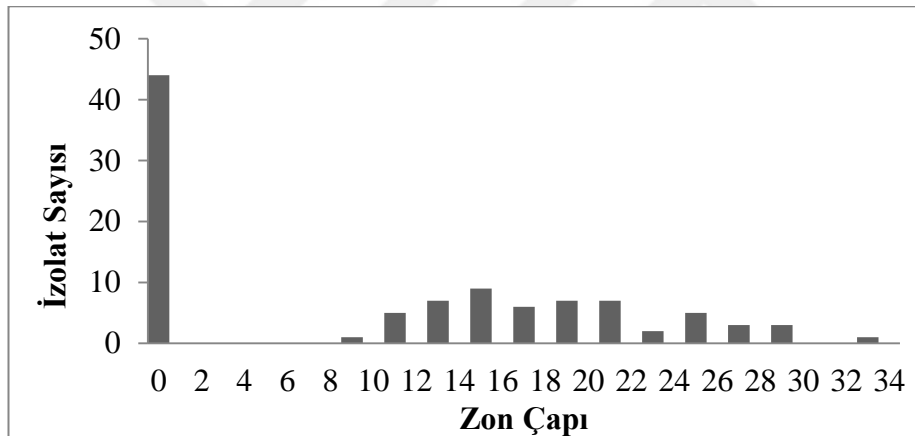


Resim 4.1. Farklı antibiyotiklere karşı oluşan zon çapları

Yapılan antibiyogram test sonuçlarına göre izolatların seftazidime 72 (%72)'si dirençli, 10 (%10)'u ara duyarlı ve 18 (%18)'i ise duyarlıdır (Şekil 4.1). 100 izolatın 44'ünde zon oluşumu görülmezken 1 tanesi 8-10 mm arası, 5 tanesi 10-12 mm arası, 7 tanesi 12-14 mm arası, 9 tanesi 14-16 mm arası, 6 tanesi 16-18 mm arası, 7 tanesi 18-20 mm arası, 7 tanesi 20-22 mm arası, 2 tanesi 22-24 mm arası, 5 tanesi 24-26 mm arası, 3 tanesi 26-28 mm arası, 3 tanesi 28-30 mm arası ve 1 tanesi 32-34 mm arası zon değeri gösterdi (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. İzolatların seftazidime karşı duyarlılık oranları

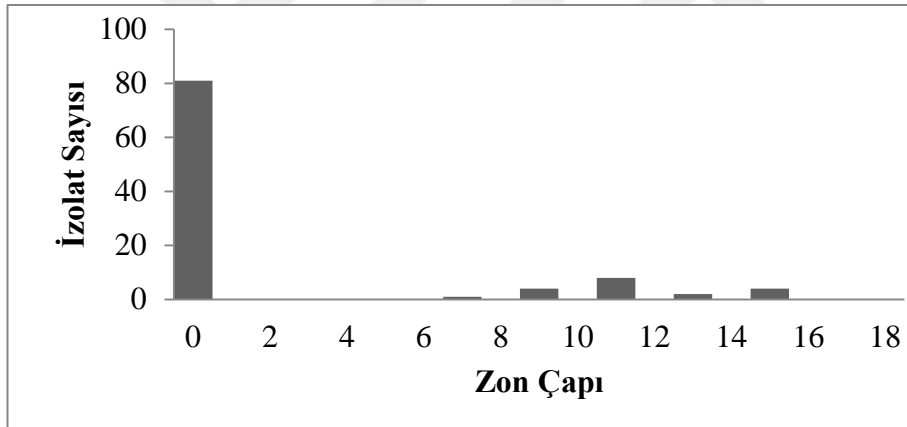


Şekil 4.2. Seftazidime karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı

Diğer bir sefalosporin olan sefotaksime ise 100 (%100)'ü dirençlidir (Şekil 4.3). 100 izolatın 81'inde zon oluşumu görülmezken 1 tanesi 6-8 mm arası, 4 tanesi 8-10 mm arası, 8 tanesi 10-12 mm arası, 2 tanesi 12-14 mm arası ve 4 tanesi 14-16 mm arası zon değeri gösterdi (Şekil 4.4).



Şekil 4.3. İzolatların sefotaksime karşı duyarlılık oranları

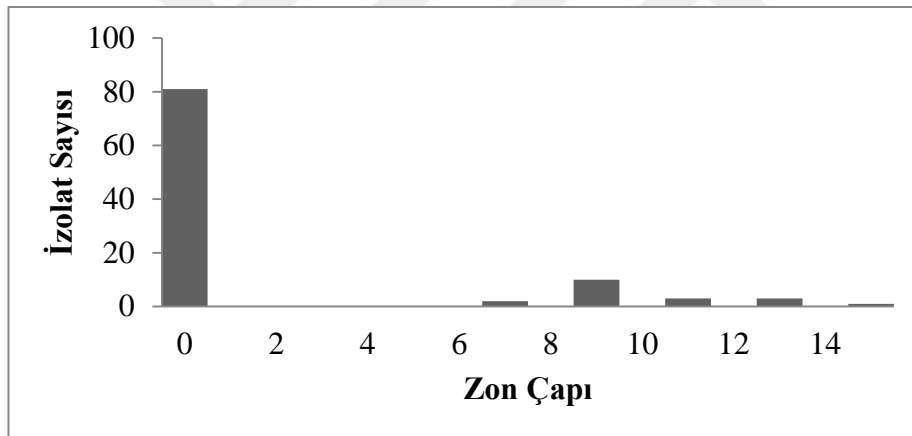


Şekil 4.4. Sefotaksime karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı

Aynı şekilde sefalosporin grubundan olan seftriaksona da 100 (%100)'ü dirençlidir (Şekil 4.5). 100 izolatın 81'inde zon oluşumu görülmezken 2 tanesi 6-8 mm arası, 10 tanesi 8-10 mm arası, 3 tanesi 10-12 mm arası, 3 tanesi 12-14 mm arası ve 1 tanesi 14-16 mm arası zon değeri gösterdi (Şekil 4.6).

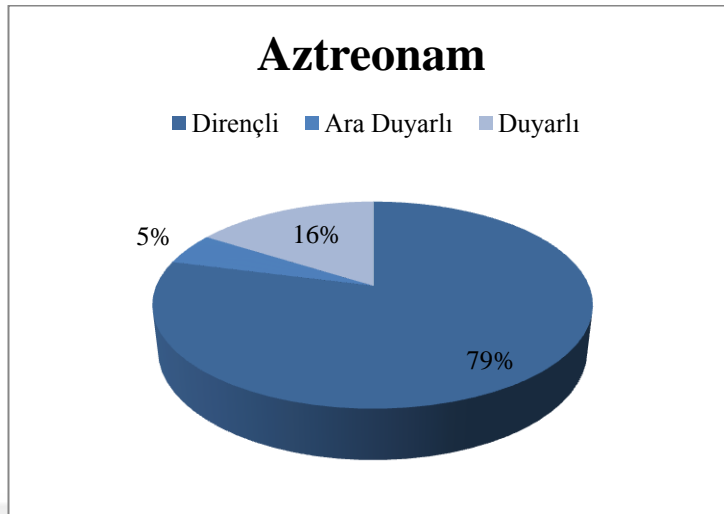


Şekil 4.5. İzolatların seftriaksona karşı duyarlılık oranları

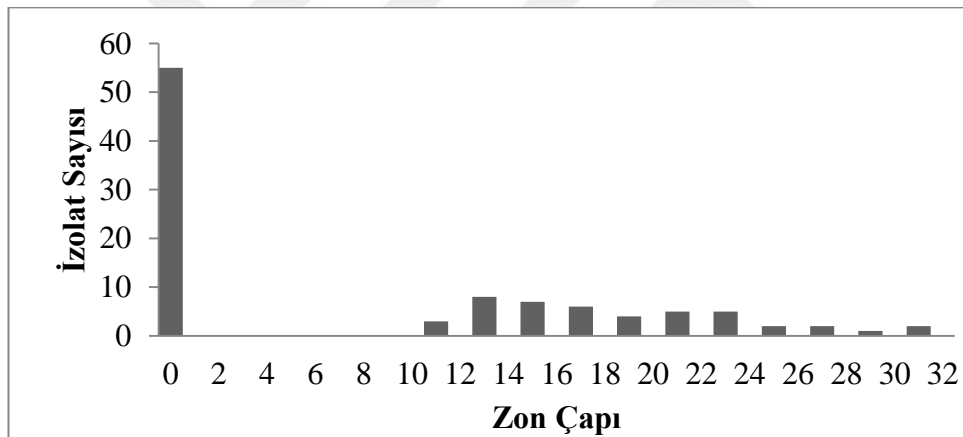


Şekil 4.6. Seftriaksona karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı

Monobaktam antibiyotik grubundan olan aztreonama karşı izolatların 79 (%79)'u dirençli, 5 (%5)'i ara duyarlı ve 16 (%16)'sı ise duyarlıdır (Şekil 4.7). 100 izolatın 55'inde zon oluşumu görülmezken 3 tanesi 10-12 mm arası, 8 tanesi 12-14 mm arası, 7 tanesi 14-16 mm arası, 6 tanesi 16-18 mm arası, 4 tanesi 18-20 mm arası, 5 tanesi 20-22 mm arası, 5 tanesi 22-24 mm arası, 2 tanesi 24-26 mm arası, 2 tanesi 26-28 mm arası, 1 tanesi 28-30 mm arası ve 2 tanesi 30-32 mm arası zon değeri gösterdi (Şekil 4.8).

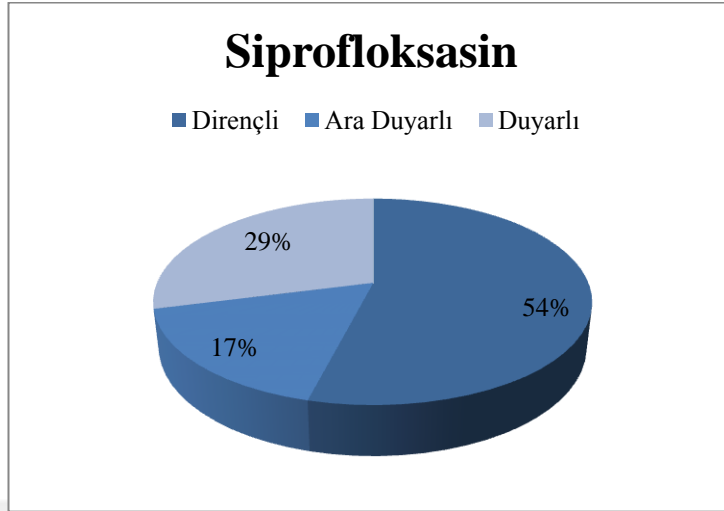


Şekil 4.7. İzolatların aztreonama duyarlılık oranları

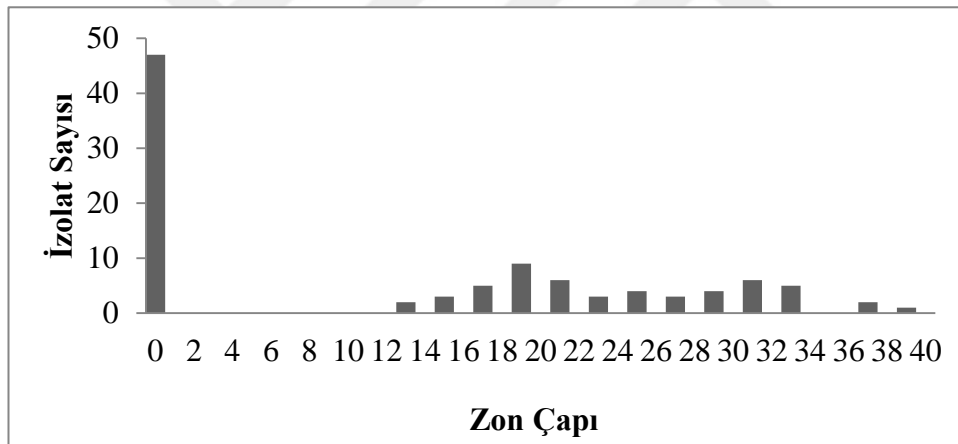


Şekil 4.8. Aztreonama karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı

Florokinolon grubundan olan siprofloksasine karşı izolatların 54 (%54)'ü dirençli, 17 (%17)'si ara duyarlı ve 29 (%29)'u duyarlıdır (Şeki 4.9). 100 izolatın 47'sinde zon oluşumu görülmezken 2 tanesi 12-14 mm arası, 3 tanesi 14-16 mm arası, 5 tanesi 16-18 mm arası, 9 tanesi 18-20 mm arası, 6 tanesi 20-22 mm arası, 3 tanesi 22-24 mm arası, 4 tanesi 24-26 mm arası, 3 tanesi 26-28 mm arası, 4 tanesi 28-30 mm arası, 6 tanesi 30-32 mm arası, 5 tanesi 32-34 mm arası, 2 tanesi 36-38 mm arası ve 1 tanesi 38-40 mm arası zon değeri gösterdi (Şekil 4.10).

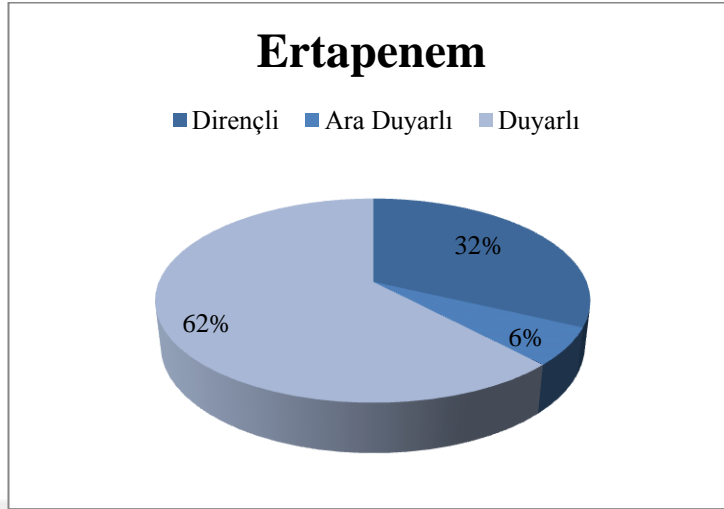


Şekil 4.9. İzolatların siprofloksasine duyarlılık oranları

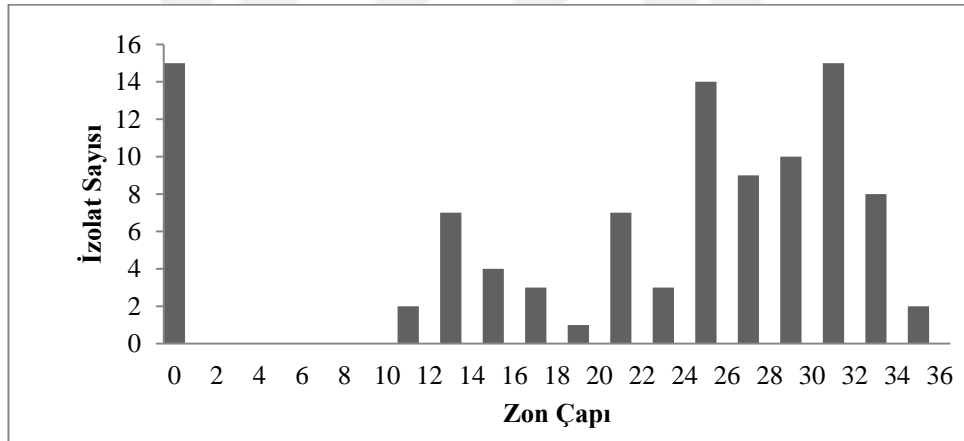


Şekil 4.10. Siprofloksasine karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı

Karbapenem grubu antibiyotik olan ertapeneme ise 32 (%32)'si dirençli, (%6)'sı ara duyarlı ve 62 (%62)'si duyarlıdır (Şekil 4.11). 100 izolatın 15'inde zon oluşumu görülmezken 2 tanesi 10-12 mm arası, 7 tanesi 12-14 mm arası, 4 tanesi 14-16 mm arası, 3 tanesi 16-18 mm arası, 1 tanesi 18-20 mm arası, 7 tanesi 20-22 mm arası, 3 tanesi 22-24 mm arası, 14 tanesi 24-26 mm arası, 9 tanesi 26-28 mm arası, 10 tanesi 28-30 mm arası, 15 tanesi 30-32 mm arası, 8 tanesi 32-34 mm arası, 2 tanesi 34-36 mm arası zon değeri gösterdi (Şekil 4.12).

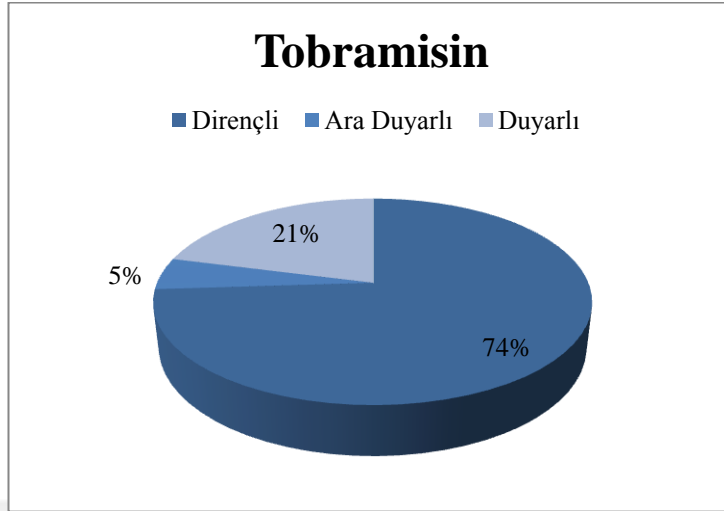


Şekil 4.11. İzolatların ertapeneme karşı duyarlılık oranları

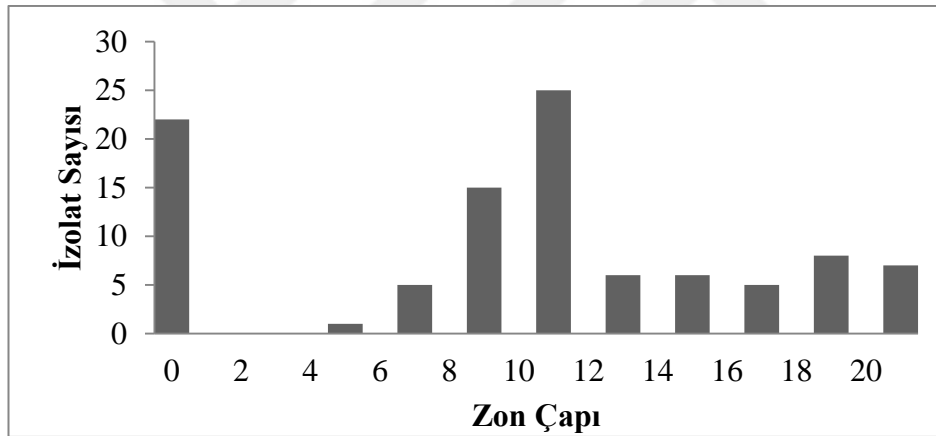


Şekil 4.12. Ertapeneme karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı

Aminoglikozidlerden tobramisine karşı izolatların 74 (%74)'ü dirençli, 5 (%5)'i ara duyarlı ve 21 (%21)'i duyarlıdır (Şekil 4.13). 100 izolatın 22'sinde zon oluşumu görülmezken 1 tanesi 4-6 mm arası, 5 tanesi 6-8 mm arası, 15 tanesi 8-10 mm arası, 25 tanesi 10-12 mm arası, 6 tanesi 12-14 mm arası, 6 tanesi 14-16 mm arası, 5 tanesi 16-18 mm arası, 8 tanesi 18-20 mm arası, 7 tanesi 20-22 mm arası zon değeri gösterdi (Şekil 4.14).

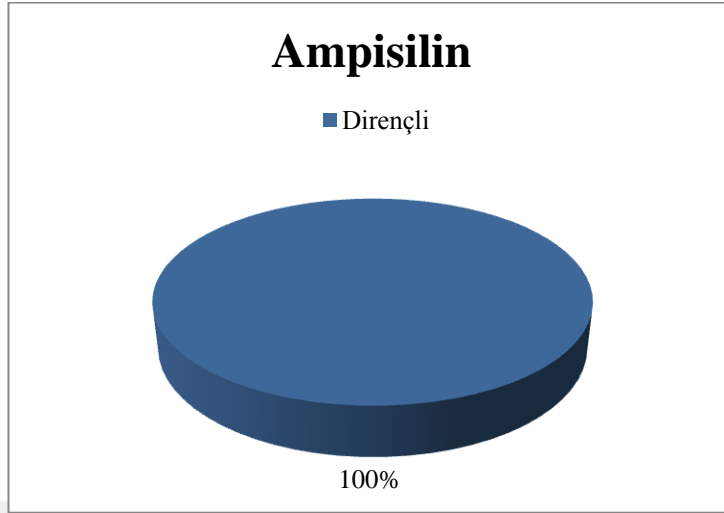


Şekil 4.13. İzolatların tobramisine karşı duyarlılık oranları

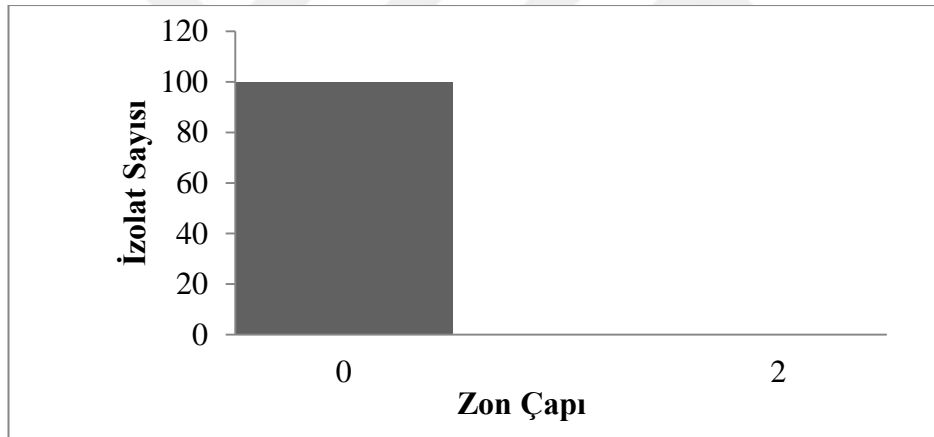


Şekil 4.14. Tobramisine karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı

Klebsiella pneumoniae'de doğal olarak dirence sahip olan ampisiline ise 100 (%100)'ü dirençlidir (Şekil 4.15). 100 izolatın hiçbirinde zon oluşumu görülmedi (Şekil 4.16).

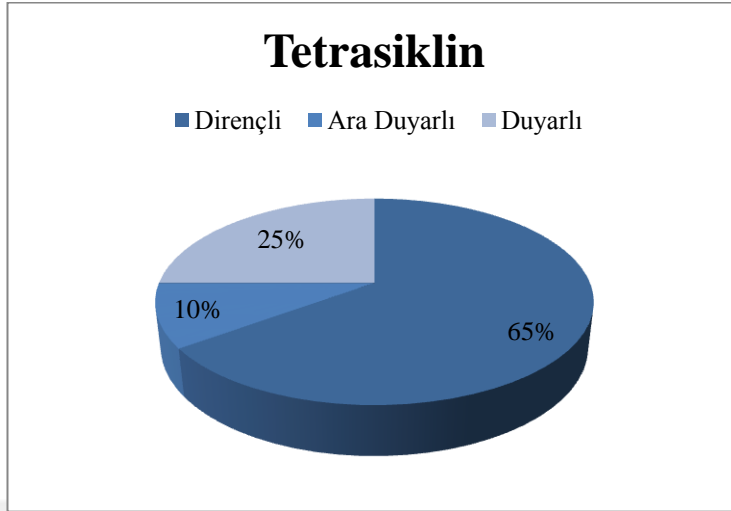


Şekil 4.15. İzolatların ampisiline karşı duyarlılık oranları

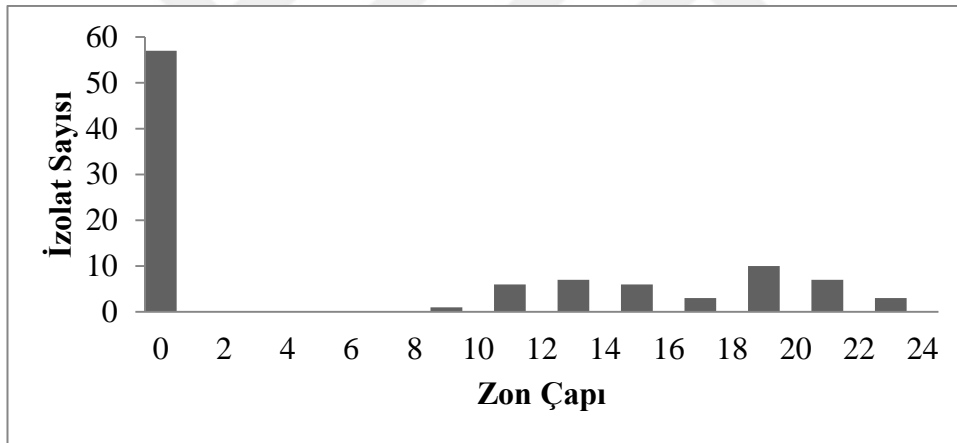


Şekil 4.16. Ampisiline karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı

Son olarak tetrasikline izolatların 65 (%65)'i dirençli, 10 (%10)'u ara duyarlı ve 25 (%25)'i duyarlıdır (Şekil 4.17). 100 izolatın 57'sinde zon oluşumu görülmezken 1 tanesi 8-10 mm arası, 6 tanesi 10-12 mm arası, 7 tanesi 12-14 mm arası, 6 tanesi 14-16 mm arası, 3 tanesi 16-18 mm arası, 10 tanesi 18-20 mm arası, 7 tanesi 20-22 mm arası ve 3 tanesi 22-24 mm arası zon değeri gösterdi (Şekil 4.18).

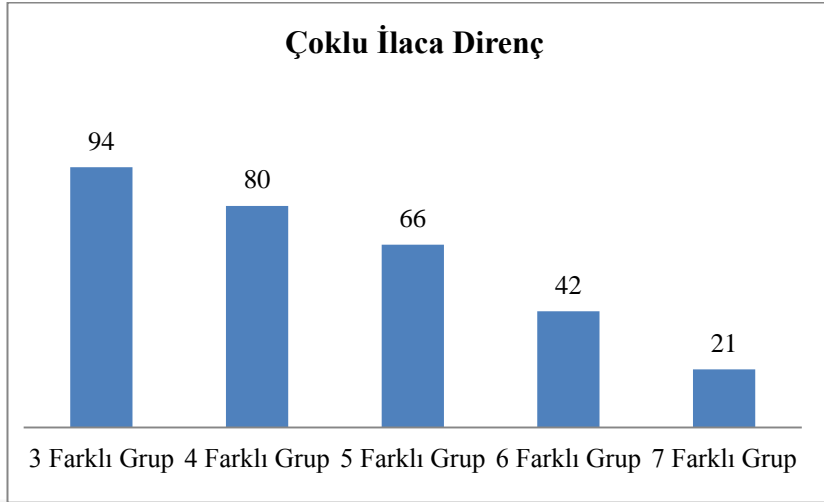


Şekil 4.17. İzolatların tetrasikline karşı duyarlılık oranları



Şekil 4.18. Tetrasikline karşı oluşan zon değerlerinin dağılımı

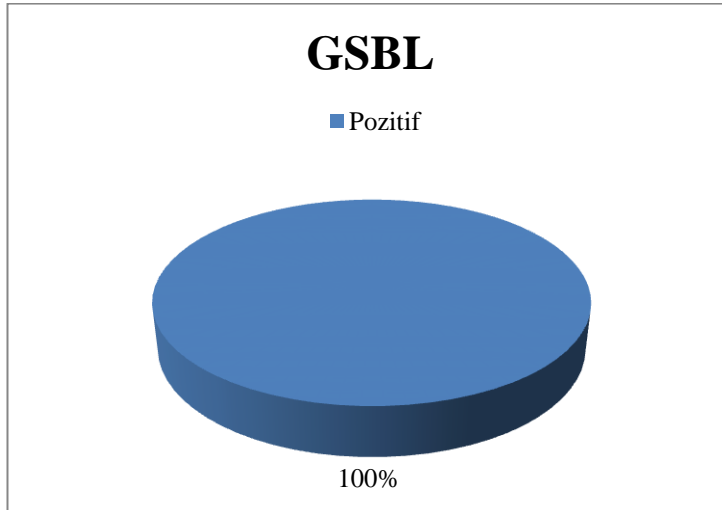
İzolatların çoklu ilaca dirençlilik profilleri göz önüne alındığında 94 izolat 3 farklı grup antibiyotiğe, 80 izolat 4 farklı grup antibiyotiğe, 66 izolat 5 farklı grup antibiyotiğe, 42 izolat 6 farklı grup antibiyotiğe, 21 izolat ise 7 farklı grup antibiyotiğe karşı direnç göstermektedir. 3 veya daha fazla antibiyotik grubuna direnç gösteren izolatlar çoklu ilaca dirençli olarak kabul edildi [Magiorakos ve ark., 2012] (Şekil 4.19).



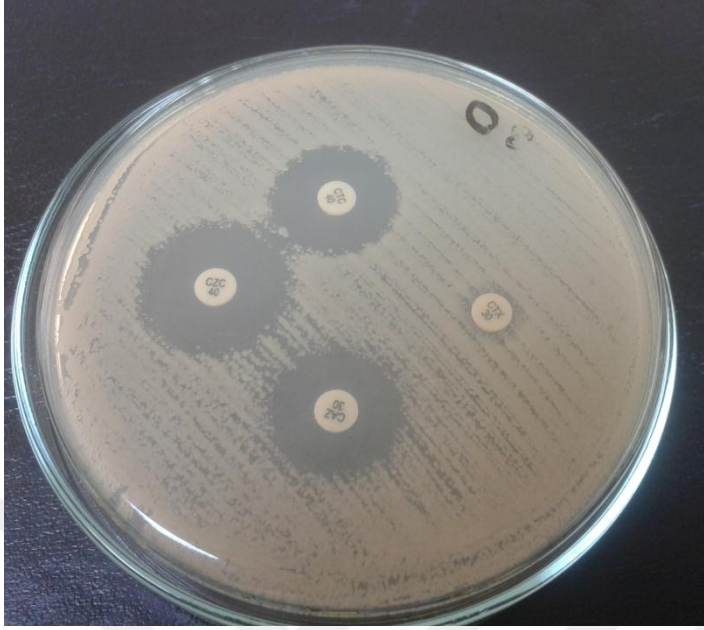
Şekil 4.19. İzolatların çoklu ilaca direnç profilleri

4.6. Kombine Disk Testi ile GSBL Doğrulama

Otomatize sistem ile GSBL ürettiği belirlenen 100 *Klebsiella pneumoniae* suşu CLSI tarafından önerilen kombine disk difüzyon testi ile doğrulanmıştır (Şekil 4.20).



Şekil 4.20. İzolatların GSBL profilleri



Resim 4.2. GSBL üretimi doğrulananan izolat

4.7. Total RNA Miktarı ve Saflığı

Total RNA'lara ait nükleik asit/protein oranını gösteren $\lambda 260/\lambda 280$ oranı genel olarak 1,8-2,1 arasındadır. Bu aralık yüksek kalitede total RNA izole edildiğini göstermektedir. Düşük total RNA miktarı olan ve yeterli saflık oranını göstermeyen izolatlardan tekrar total RNA izole edildi. İzole edilen suşlara ait total RNA miktarı ve saflıkları Tablo 4.3'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Total RNA miktar ve saflığı

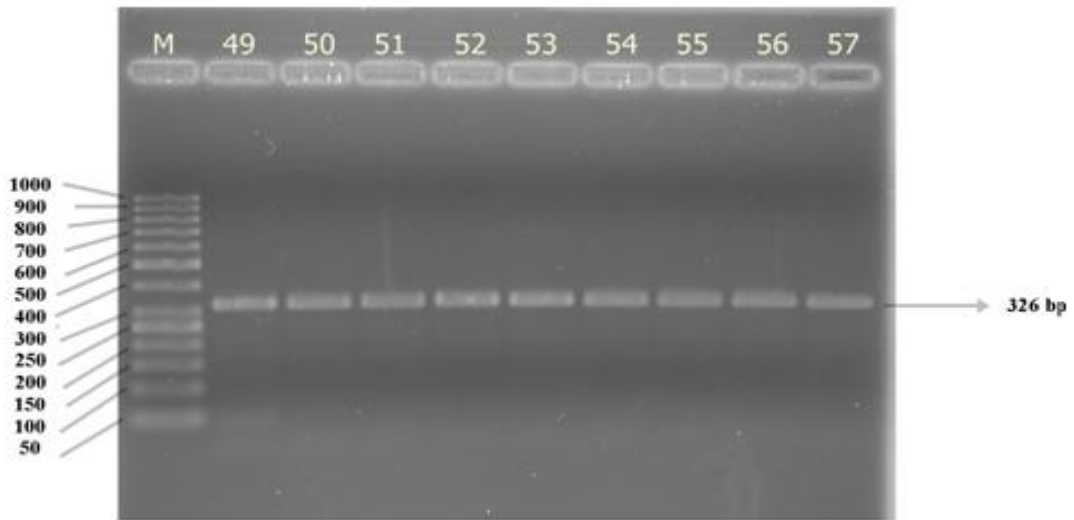
İzolat	Miktar (µg/ml)	Saflık	İzolat	Miktar (µg/ml)	Saflık
1	14,82	1,8	51	172,6	2,05
2	19,29	2,05	52	126,7	2,04
3	19,14	1,8	53	10,27	1,9
4	24,78	1,84	54	119,6	2,03
5	34,59	1,84	55	13,1	1,93
6	34,35	1,85	56	73,96	2,03
7	14,43	1,79	57	13,65	1,9
8	14,59	1,8	58	33,25	1,95
9	63,69	1,86	59	127,8	2,06
10	135,2	1,81	60	100,9	2,05
11	9,1	1,73	61	192,8	2,07
12	26,75	1,88	62	262,5	2,04
13	16,08	1,79	63	189,1	2,04
14	58,71	1,96	64	255,5	2,03
15	28,71	1,89	65	248,2	2,04
16	25,1	1,74	66	36,78	1,9
17	23,06	1,9	67	46,75	2,01
18	27,61	1,89	68	132,9	2,04
19	144,4	2,01	69	13,02	1,8
20	129,6	2,02	70	103,8	2,05
21	135	2,04	71	81,49	2,02
22	96,1	2,08	72	106,6	2,01
23	25,57	1,89	73	101,3	2,06
24	44,08	1,88	74	268	2,05
25	10,43	1,82	75	188,7	2,06
26	94,98	1,91	76	303,6	2,05
27	42,2	1,94	77	10,67	1,81
28	45,25	1,96	78	44,16	1,97
29	26,9	1,85	79	325,5	2,05
30	29,18	1,93	80	103,4	2,03
31	15,53	1,85	81	120,8	2,05
32	12,55	1,88	82	17,57	1,96
33	11,53	1,8	83	9,61	1,75
34	12	1,77	84	285	2,08
35	49,8	2,01	85	132	2,06
36	13,25	1,8	86	307	2,07
37	22,82	2,02	87	260	2,06
38	48,63	1,97	88	285	2,06
39	347,3	2,08	89	11,53	1,87
40	12,71	1,81	90	351	2,05
41	12,16	1,87	91	280	2,04
42	9,5	1,85	92	10,35	2,01
43	10,5	1,78	93	364,5	2,07
44	9,5	1,87	94	259,6	2,05
45	89,73	2,02	95	320,3	2,06
46	11,29	1,82	96	374,9	2,05
47	11,29	1,81	97	28,94	2,01
48	273,9	2,08	98	25,18	1,91
49	45,02	2,04	99	12,78	1,87
50	209,2	2,05	100	192,3	2,02

4.8. Primer Bağlanma Sıcaklığı Optimizasyon Sonuçları

Yapılan literatür çalışmaları sonucunda primer dizilerine ait sadece sekans dizileri dışında başka bir veriye rastlanılmadı. Primerlerin bağlanma sıcaklığı primer sentezleyen firmanın her bir sekans için verdiği Tm değeri baz alınarak belirlendi.

4.8.1. 16S PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu

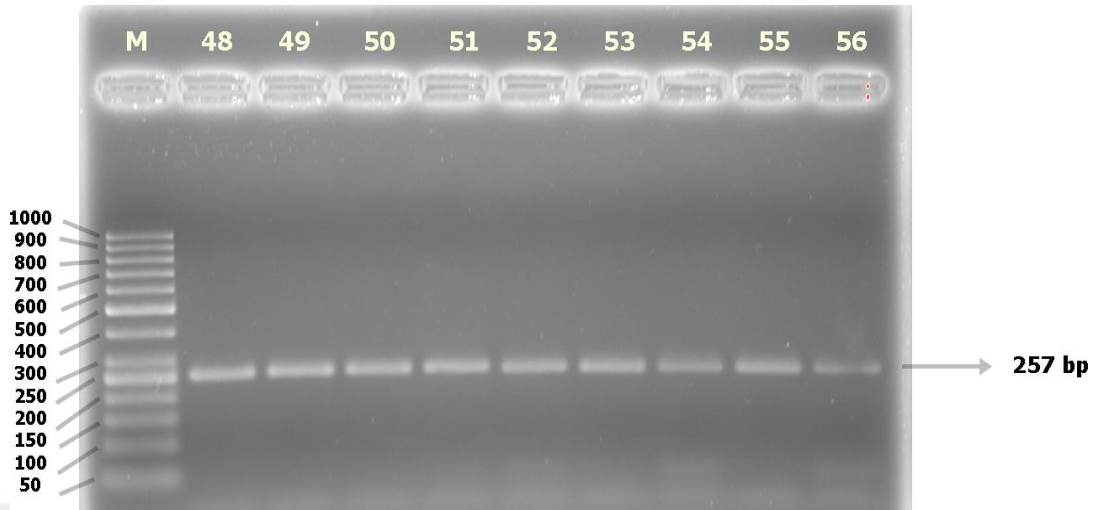
16S gen bölgesi için kullanılan 16S-F ve 16S-R primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesinde 49-57°C arası ısı değerleri denenmiş olup ısı değerleri arasında belirgin bir fark görülmedi. Bu sonuçlara göre bağlanma sıcaklığı 52°C olarak belirlendi. Bant profili Resim 4.3’de gösterilmiştir.



Resim 4.3. 16S gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker bp: baz çifti)

4.8.2. *acrA* PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu

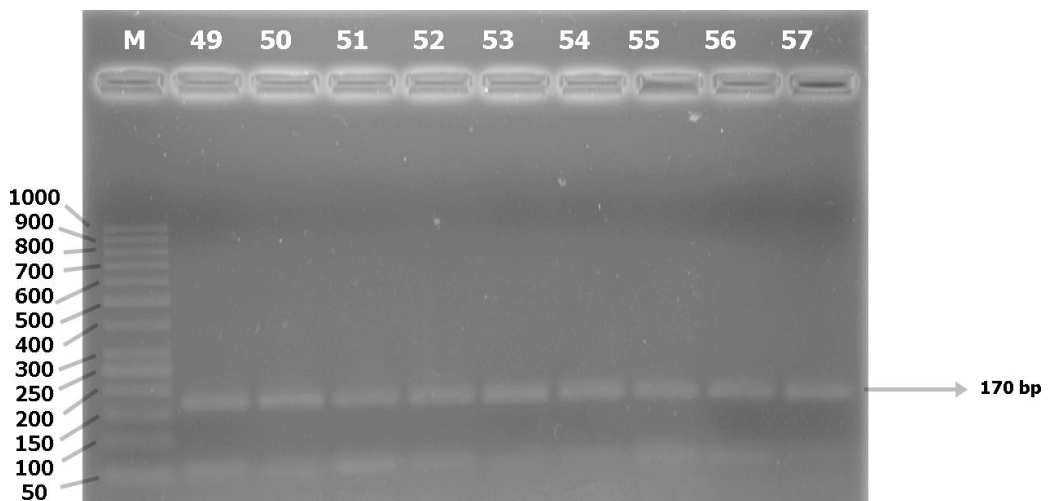
acrA gen bölgesi için kullanılan *acrA*-F ve *acrA*-R primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesinde 48-56°C arası ısı değerleri denenmiş olup ısı değerleri arasında belirgin bir fark görülmedi. Bu sonuçlara göre bağlanma sıcaklığı 50°C olarak belirlendi. Bant profili Resim 4.4’de gösterilmiştir.



Resim 4.4. *acrA* gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker bp: baz çifti)

4.8.3. *kdeA* PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu

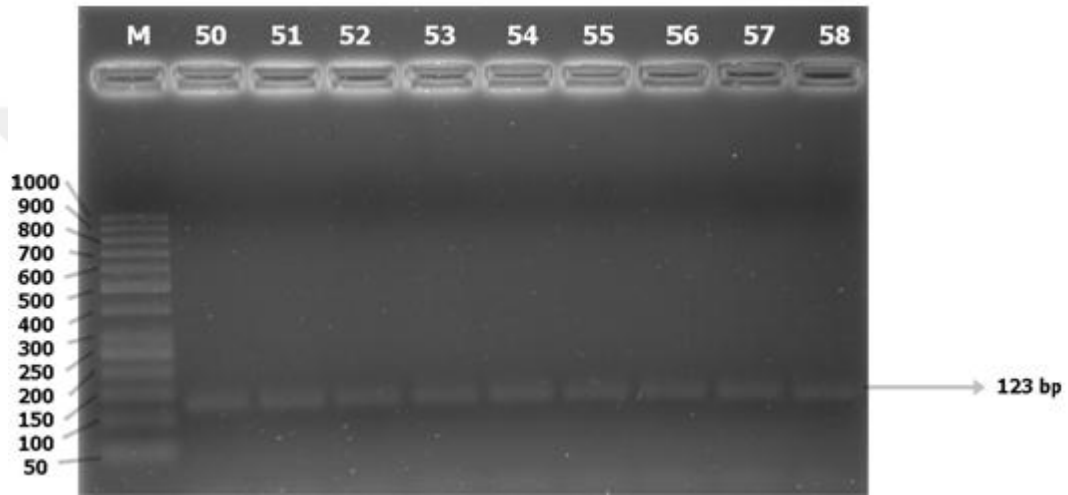
kdeA gen bölgesi için kullanılan *kdeA*-F ve *kdeA*-R primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesinde 49-57°C arası ısı değerleri denenmiş olup ısı değerleri arasında belirgin bir fark görülmedi. Bu sonuçlara göre bağlanma sıcaklığı 53°C olarak belirlendi. Bant profili Resim 4.5’de gösterilmiştir.



Resim 4.5. *kdeA* gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker bp: baz çifti)

4.8.4. ketM PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu

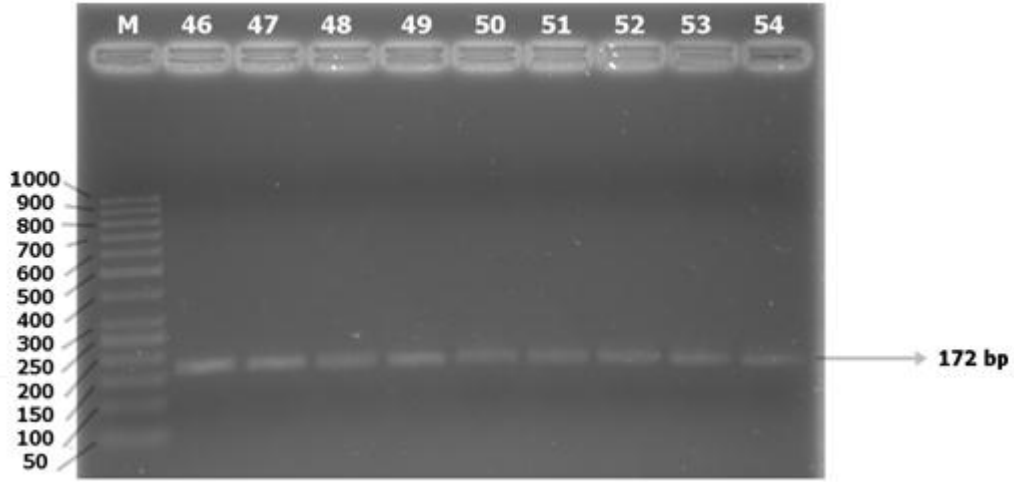
ketM gen bölgesi için kullanılan ketM-F ve ketM-R primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesinde 50-58°C arası ısı değerleri denenmiş olup ısı değerleri arasında belirgin bir fark görülmedi. Bu sonuçlara göre bağlanma sıcaklığı 51°C olarak belirlendi. Bant profili Resim 4.6'da gösterilmiştir.



Resim 4.6. ketM gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker bp: baz çifti)

4.8.5. kpnEF PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu

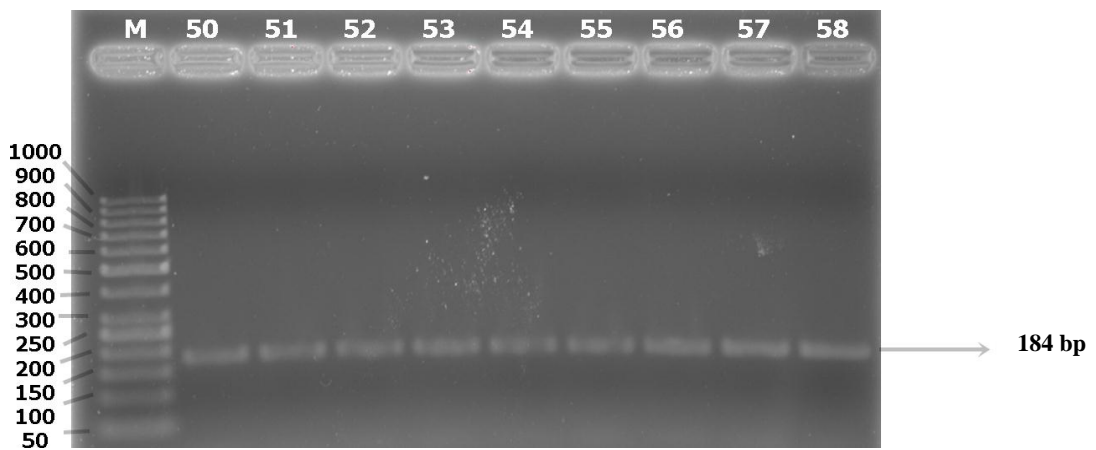
kpnEF gen bölgesi için kullanılan kpnE-F ve kpnE-R primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesinde 46-54°C arası ısı değerleri denenmiş olup ısı değerleri arasında belirgin bir fark görülmedi. Bu sonuçlara göre bağlanma sıcaklığı 51°C olarak belirlendi. Bant profili Resim 4.7'de gösterilmiştir.



Resim 4.7. *kpnEF* gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker bp: baz çifti)

4.8.6. *kexD* PZR primer bağlanma sıcaklık optimizasyonu

kexD gen bölgesi için kullanılan *kexD*-F ve *kexD*-R primerlerinin bağlanma sıcaklığının belirlenmesinde 50-58°C arası ısı değerleri denenmiş olup ısı değerleri arasında belirgin bir fark görülmedi. Bu sonuçlara göre bağlanma sıcaklığı 53°C olarak belirlendi. Bant profili Resim 4.8’de gösterilmiştir.



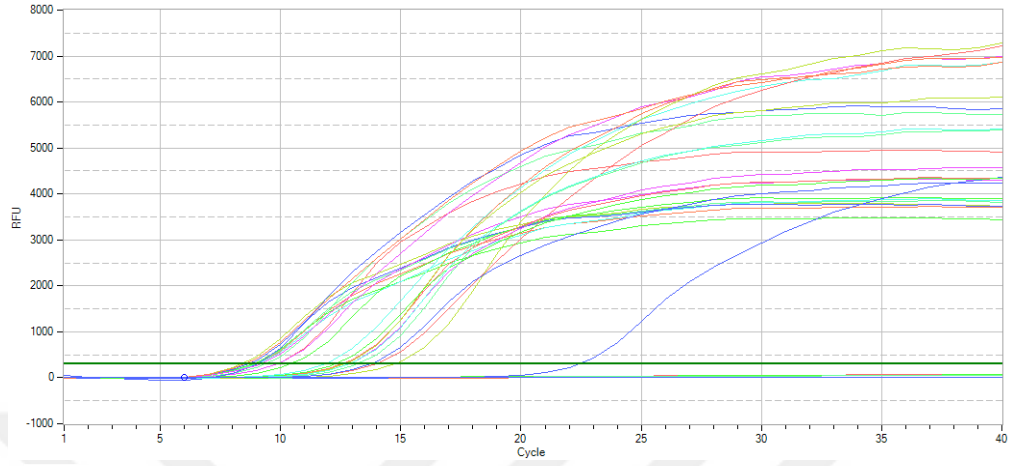
Resim 4.8. *kexD* gen bölgesi için primer bağlanma sıcaklığı optimizasyonu jel görüntüsü (M: Marker bp: baz çifti)

4.9. Gerçek Zamanlı PZR Amplifikasyon Eğrileri

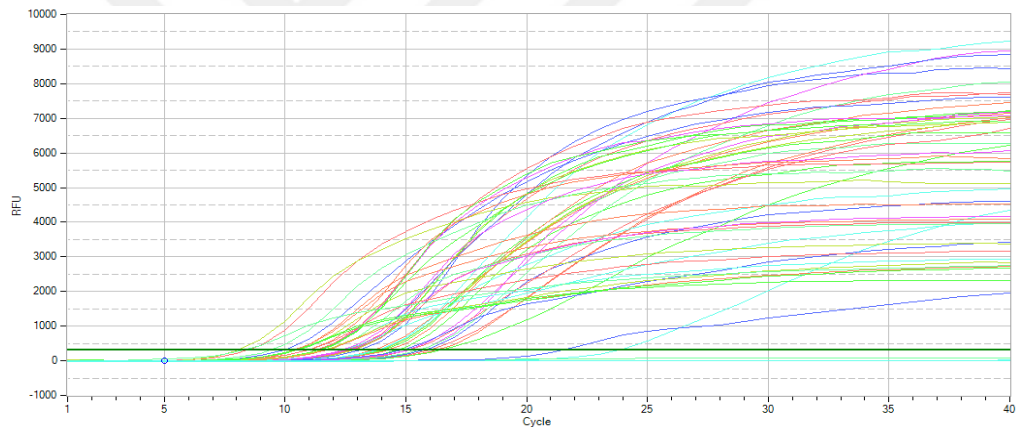
Klebsiella pneumoniae izolatlarına ait 16S, kpnEF, kdeA, kexD, acrA ve ketM atım pompa genleri gerçek zamanlı PZR kullanılarak analiz edildi. Gerçek zamanlı PZR sonrası her bir gen için elde edilen eğriler 16S için Şekil 4.21'de, acrA için Şekil 4.22'de, kdeA için Şekil 4.23'de, ketM için Şekil 4.24'de, kpnEF için Şekil 4.25'de ve kexD için Şekil 4.26'da verildi. x ekseninde Ct değeri, y ekseninde ise ışınma miktarı gösterilmektedir.



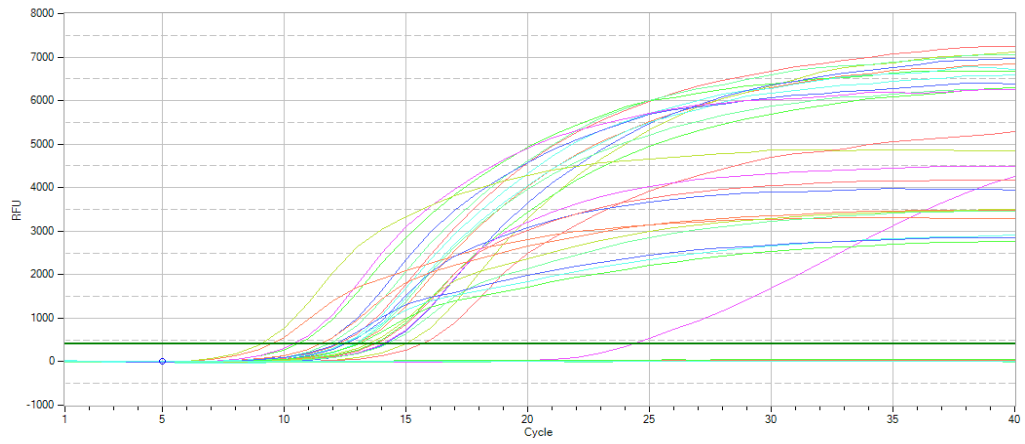
a)



b)



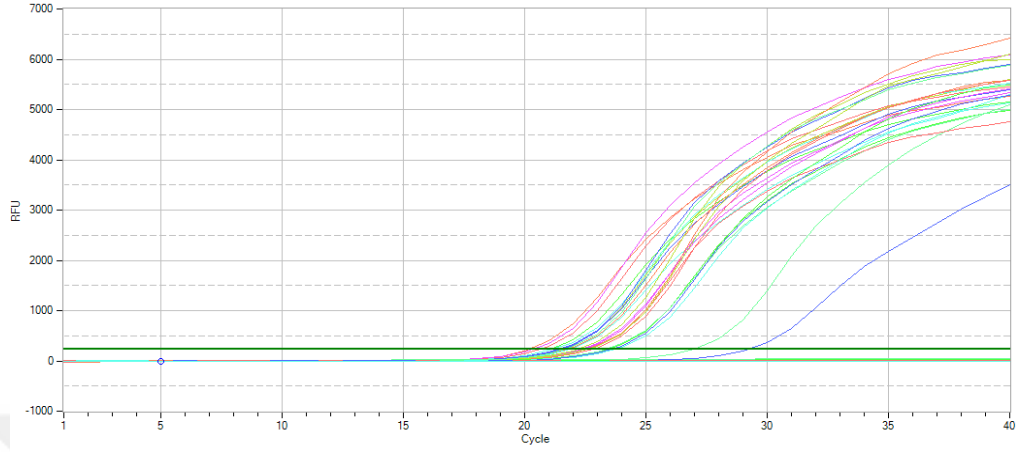
c)



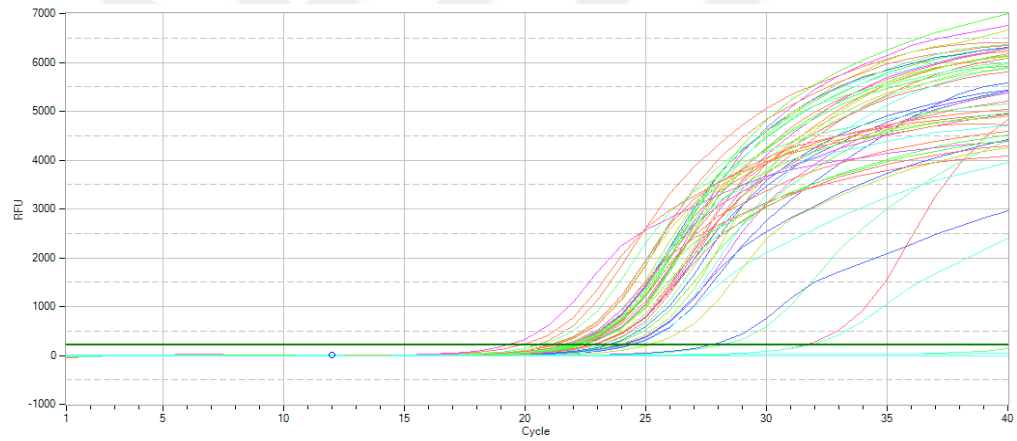
Şekil 4.21. 16S genine ait amplifikasyon eğrisi

a) 1-25. örnekler b) 26-75. örnekler c) 76-100. örnekler

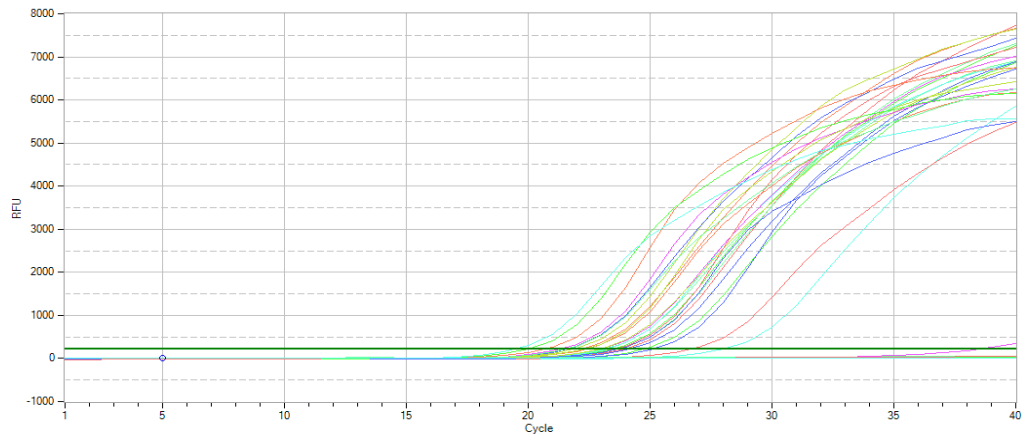
a)



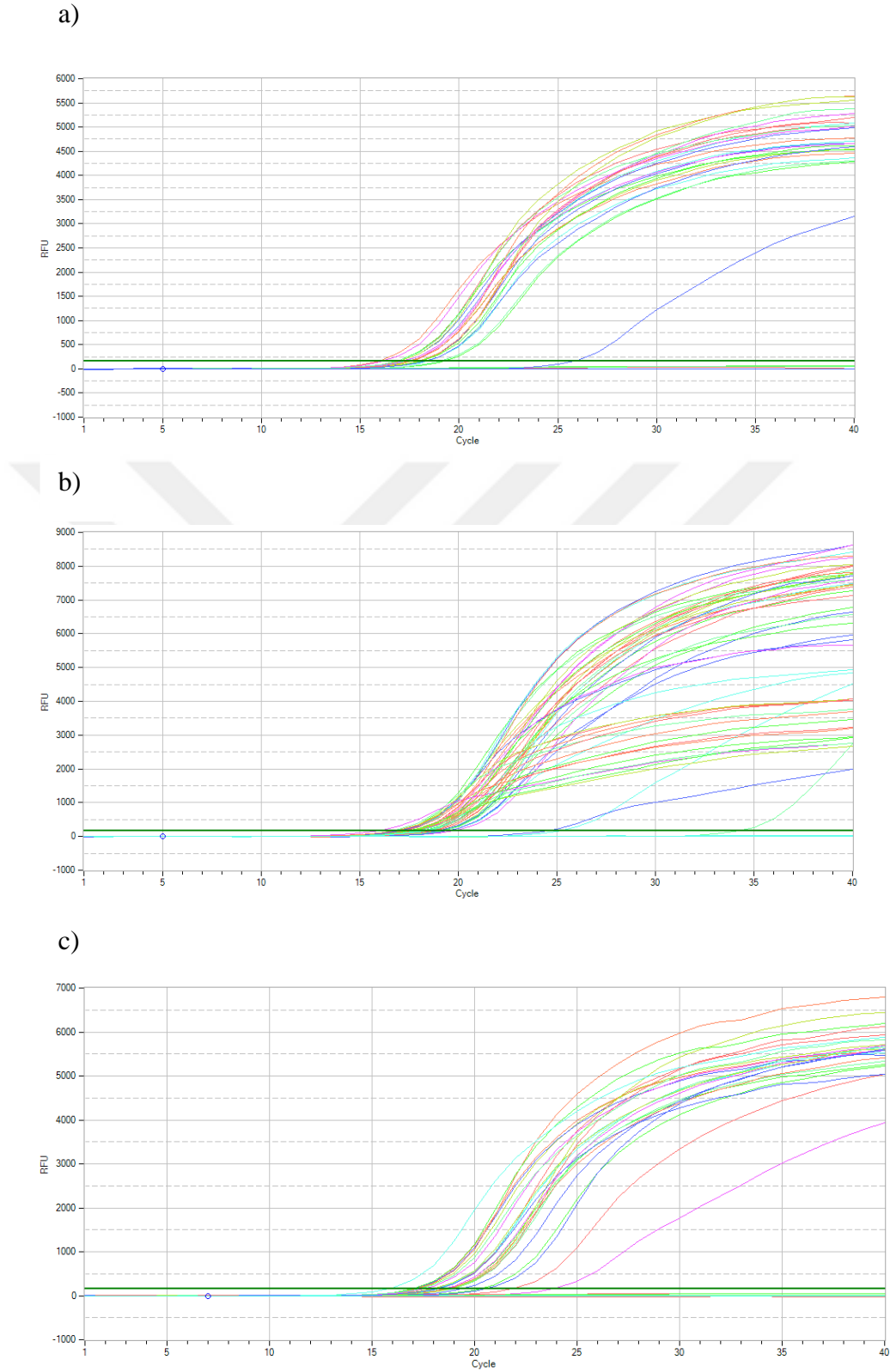
b)



c)

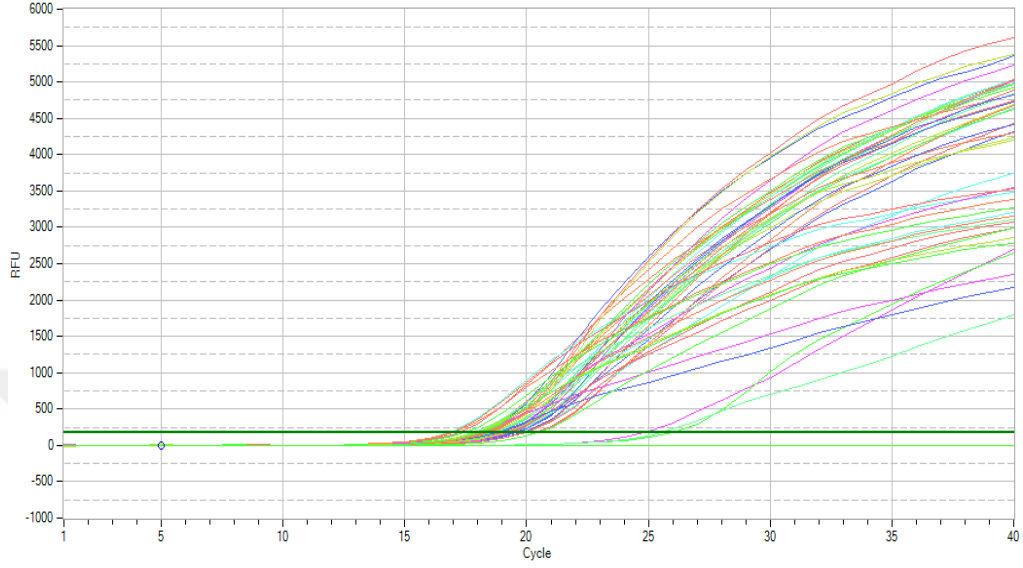


Şekil 4.22. *acrA* genine ait amplifikasyon eğrisi
a) 1-25. örnekler b) 26-75. örnekler c) 76-100. örnekler

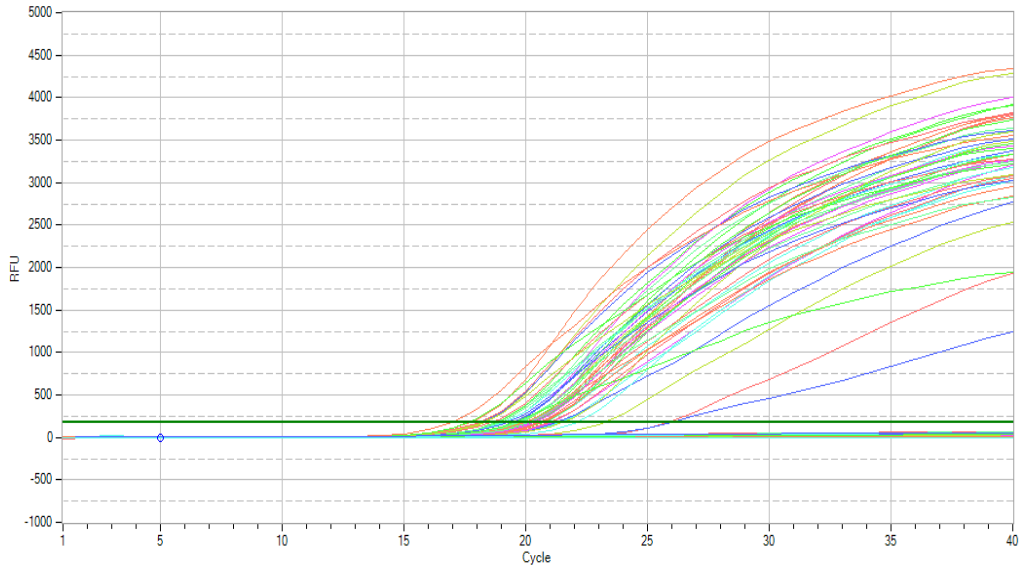


Şekil 4.23. kdeA genine ait amplifikasyon eğrisi
a) 1-25. örnekler b) 26-75. örnekler c) 76-100. örnekler

a)

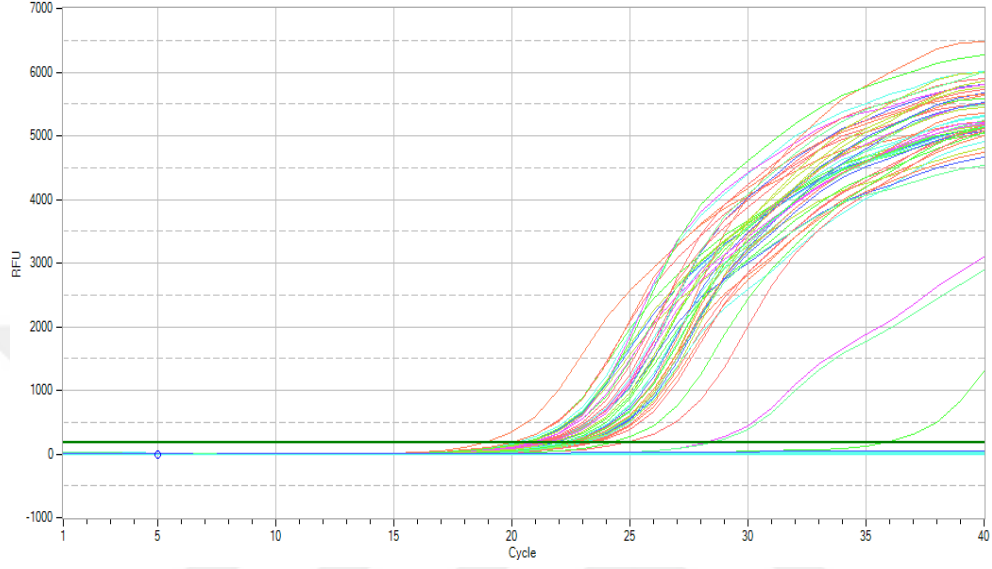


b)

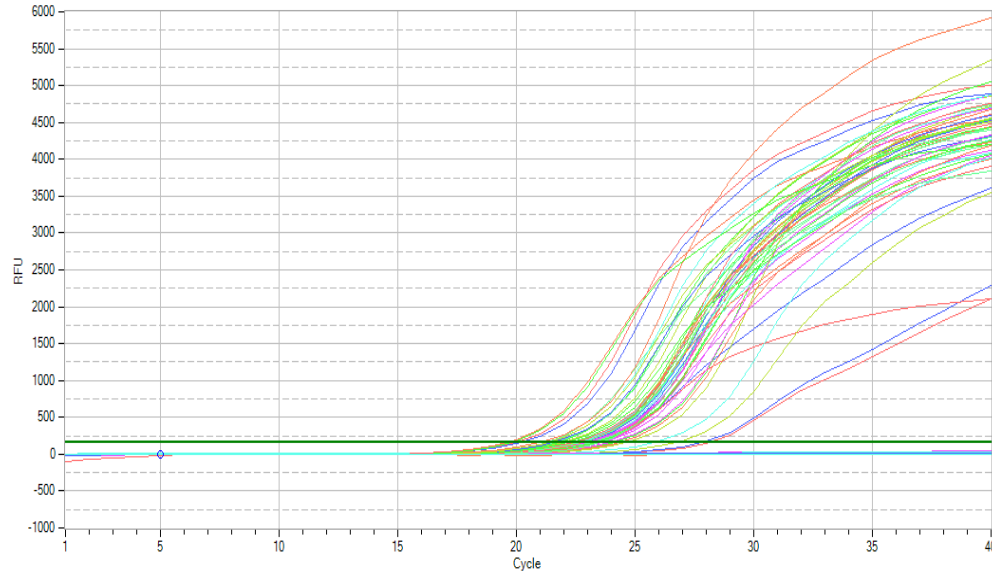


Şekil 4.24. ketM genine ait amplifikasyon eğrisi
a) 1-50. örnekler b) 51-100. örnekler

a)

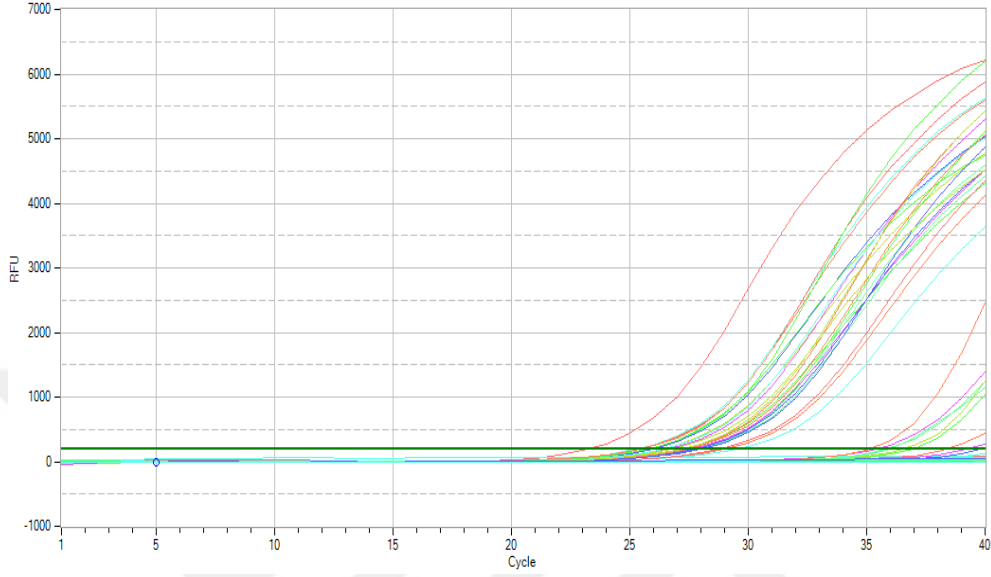


b)

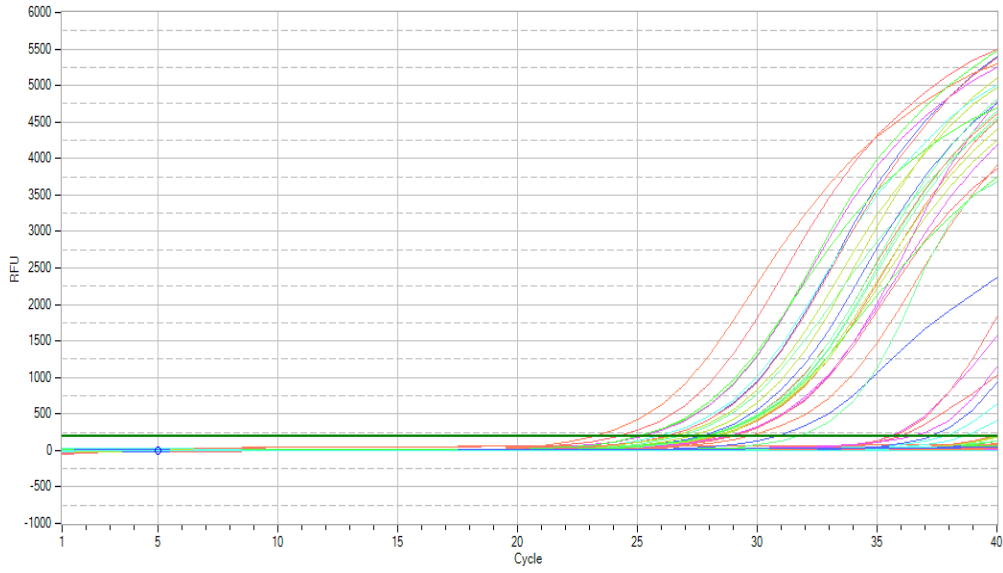


Şekil 4.25. kpnEF genine ait amplifikasyon eğrisi
a) 1-50. örnekler b) 51-100. örnekler

a)



b)



Şekil 4.26. kexD genine ait amplifikasyon eğrisi
a) 1-50. örnekler, b) 51-100. örnekler

4.10. Gen Ekspresyon Düzeyleri ve Kantitasyonu

İzolatlara ait 16S, kpnEF, kdeA, kexD, acrA ve ketM ve atım pompa genlerinin Ct düzeylerine bakıldığında 16S, kpnEF, kdeA, acrA ve ketM genlerini bütün izolatların eksprese ettiği belirlendi. kexD genini ise 2, 4, 6, 9, 18, 24, 25, 29, 31, 37, 39, 41, 42, 44, 45, 48, 49, 51, 52, 54, 56, 62, 63, 64, 78, 79, 83, 87, 89, 90, 92 ve 93 no'lu örneklerin eksprese etmediği görüldü. İzolatlara ait Ct değerleri Tablo 4.4'de verildi. Her bir gene ait Ct değerleri ortalama±standart hata alındığında 16S için $12,60\pm0,29$, acrA için $23,14\pm0,28$, ketM için $19,56\pm0,18$, kdeA için $18,14\pm0,23$, kpnEF için $22,66\pm0,22$ ve kexD için ise $29,89\pm0,57$ olarak belirlendi.

Tablo 4.4. Referans suş ve izolatlara ait Ct değerleri *ND: Ekspresyon yok

İzolat	16S	acrA	ketM	kdeA	kpnEF	kexD	İzolat	16S	acrA	ketM	kdeA	kpnEF	kexD
Referans Suş	11,1	19,1	18,5	19,15	22,05	30,01							
1	9,89	20,6	18	16,86	20,04	23,22	51	11,3	24,1	20,6	19,8	23,34	ND
2	9,04	20,2	16,9	15,95	18,87	ND	52	8,44	22,9	20,2	18,6	23,28	ND
3	8,43	21,5	18,7	17,55	20,58	26,33	53	10,4	21,3	18,3	17,6	22,09	27,2
4	8,95	21,1	18	16,81	20,08	ND	54	8,09	22,7	19,8	18,1	22,82	ND
5	9,05	27	19,6	18,31	22,3	35,84	55	11,4	22,4	18,7	17,8	21,27	26,7
6	9,09	21,9	18,2	17,29	20,63	ND	56	9,38	28,2	21,3	19,2	23,18	ND
7	8,71	21,5	19,5	17,05	20,66	25,93	57	12,4	24,3	21,2	19,5	23,65	30,7
8	9,99	22,4	19	17,38	21,49	26,6	58	14,9	24,1	21	19,4	23,63	35,5
9	10,5	23,5	20,4	19,25	23,17	ND	59	12,4	21,7	20,2	17,5	22,66	35,6
10	9,41	23,4	20,4	19,08	23,31	29,04	60	12,7	22,8	20,3	18,3	22,97	28,3
11	11,9	21,2	18	17,25	20,73	36,45	61	10,4	22,1	19,8	17,7	23	28,3
12	9,11	21,4	19,2	17,94	22,12	27,24	62	11,3	21,1	18,8	17,3	21,74	ND
13	9,19	20,4	18,2	16,16	20,97	25,68	63	11	21,8	20	17,6	23,43	ND
14	14,1	22,6	19,5	17,99	22,74	27,66	64	10,5	21,1	19,1	16,9	21,62	ND
15	8,57	21,8	18,9	17,5	21,32	26,37	65	11,4	22	20,6	18,2	22,57	37,8
16	14,8	22,2	18,1	17,04	21,49	39,79	66	11,8	20,6	18,1	16,7	20,27	26,1
17	22,4	29,3	24,9	25,82	28,24	39,24	67	11,7	21,6	19,4	18,3	23,13	28,9
18	12,9	22,4	18,8	17,2	21,07	ND	68	21,5	27,8	25,8	24,6	28,12	36
19	12,6	22,8	18,4	17,97	22,59	27,26	69	12,6	19,3	17	16,1	19,61	23,2
20	12,7	22,6	18,3	17,48	21,88	27,11	70	11	21,5	19,6	18	22,58	28,2
21	12,7	22,6	18,8	18,04	21,9	27,62	71	11,7	19,9	19,4	16,9	22,31	25,1
22	12,3	23,6	19,4	18,13	22,46	27,89	72	11,5	25,2	19,6	17,6	23,23	28
23	13,3	21,7	16,8	16,82	20,26	25,25	73	10,4	22	20,7	18	22,88	38,6
24	12,9	23,8	19,1	18,37	22,24	ND	74	10,4	22,2	19,4	17,6	23,07	37,2
25	13,8	23,6	19,9	18,27	22,83	ND	75	8,28	22	19,5	18	23	27,6
26	16	31,6	19,3	18,85	21,06	35,38	76	12,2	24	19,7	18,2	23,03	25,2
27	13,6	20,5	18,4	17,34	21,36	32,1	77	13	22,2	18,1	16,9	20,01	24,1
28	13,9	22,4	18,3	18,64	22,34	38,35	78	15	21,9	17,7	17,2	21,09	ND
29	14,6	22,4	18,6	18,46	22,63	ND	79	10,5	24,8	21,4	20,2	24,57	ND
30	13,8	32,2	25,9	34,28	35,89	36,89	80	11,9	23,8	20,6	18,9	24,14	39,9
31	23,9	31,9	25,5	25,24	28,47	ND	81	12,4	28,1	19,7	18,2	22,74	27,9
32	15,7	24,4	20	19,45	23,06	29,51	82	14,1	21,6	19,1	17	21,33	25,9
33	15,5	22,4	19,5	18,1	22,88	27,95	83	24,4	38,6	25,9	23,8	27,84	ND
34	15,2	22,7	18,4	18,23	20,92	27,46	84	13,6	23,5	20,1	18,5	23,57	28,8
35	16,3	23,1	19,2	18,84	23,44	28,76	85	13	23,2	21	18,7	23,34	29
36	14	21,6	17	17,09	20,03	25,35	86	12,9	23,2	19,9	18	22,8	39,8
37	14,1	21,9	17,2	17,01	21,23	ND	87	11,5	24,2	20,5	19,3	23,43	ND
38	16,5	23,6	20	19,17	22,68	35,09	88	10,4	23,1	20,1	18,4	22,48	27,9
39	15,5	23,2	19,1	18,49	22,92	ND	89	15,7	26,7	23,2	21,7	26,77	ND
40	13,8	22,1	17,4	17,19	20,42	25,67	90	9,44	22,4	20,2	18,5	23,36	ND
41	13,1	21,8	17,8	17,26	21,45	ND	91	9,07	23	18,9	18	22,75	27,9
42	15,1	22,9	18,7	17,99	22,17	ND	92	12,5	25,1	22,1	20,5	25,92	ND
43	12,5	22,2	18,7	18,04	21,76	27,72	93	14,1	21,4	19,2	17,5	21,56	ND
44	14,3	22,1	18	17,46	21,48	ND	94	13,8	23,6	20,3	18,7	24,02	36,4
45	12,8	24	20,1	19,02	24,87	ND	95	11,5	20,7	18,5	17,1	22,45	26,2
46	12,8	22,4	18,4	18,04	22,65	27,34	96	13,5	22,4	20,6	18,7	24,3	29,6
47	12,1	21,1	17,9	17,26	21,72	26,76	97	13,1	20,1	18,2	16,9	21,33	26,4
48	13,8	24,1	20,4	19,03	24,21	ND	98	14,2	21,6	19,5	17,3	22,2	27,9
49	12,4	22,9	18,1	17,08	22,46	ND	99	12,4	19,5	17,6	15,7	19,77	25,1
50	9,94	23,4	19,5	19,11	22,74	35,9	100	12,1	23,7	20	18,1	23,59	31,7

Her bir gen için her bir örnekte belirlenen o gene ait Ct değeri referans gen Ct değerinden çıkarıldı ve ΔCt^{hedef} hesaplandı. Aynı şekilde referans suşta hedef genin referans gen ile arasındaki fark $\Delta Ct^{\text{kontrol}}$ olarak hesaplanır. Sonraki aşamada $\Delta\Delta Ct$ değerinin elde etmek için $\Delta Ct^{\text{hedef}} - \Delta Ct^{\text{kontrol}}$ formülü kullanıldı. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ değeri ile klinik izolatlarda eksprese olan genlerin referans suşa göre kaç kat arttığı veya azaldığı hesaplandı. Referans suşta her bir genin ekspresyon oranı 1 kabul edildi. Referans suş olarak *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700721 kullanıldı.

Elde edilen rölatif kantifikasyon değerlerine göre; *acrA* genini 22 izolat referans suşa göre fazla eksprese etmekte olup artış seviyesi 1,04 ile 3,25 kat arasındadır. Diğer 78 izolatta aynı seviyede veya düşük düzeyde *acrA* geni ekspresyonu görüldü. *ketM* geni 54 izolatta referans suşa göre fazla eksprese olmakta olup artış seviyesi 1,01 ile 58,49 kat arasındadır. 56 izolatta ise aynı seviyede veya düşük düzeyde *ketM* geni ekspresyonu görüldü. *kdeA* geni 100 izolattan 82'sinde referans suşa göre 1,01 ile 404,50 kat arasında değişen seviyede artış görüldü. 18 izolatta ise aynı seviyede veya düşük seviyede ekspresyon görüldü. *kpnEF* genini 60 izolat referans suşa göre fazla eksprese etmekte ve artış seviyesi 1,08 ile 179,77 kat arasındadır. 40 izolatta ise aynı seviyede veya düşük seviyede ekspresyon görüldü. *kexD* geninde ise 50 izolat referans suşa göre 1,08 ile 313 kat arası değişen seviyede artış görüldü. 32 izolatta herhangi bir ekspresyon görülmedi. Geri kalan 18 izolatta referans suşa göre aynı seviyede veya düşük seviyede ekspresyon görüldü (Tablo 4.5).

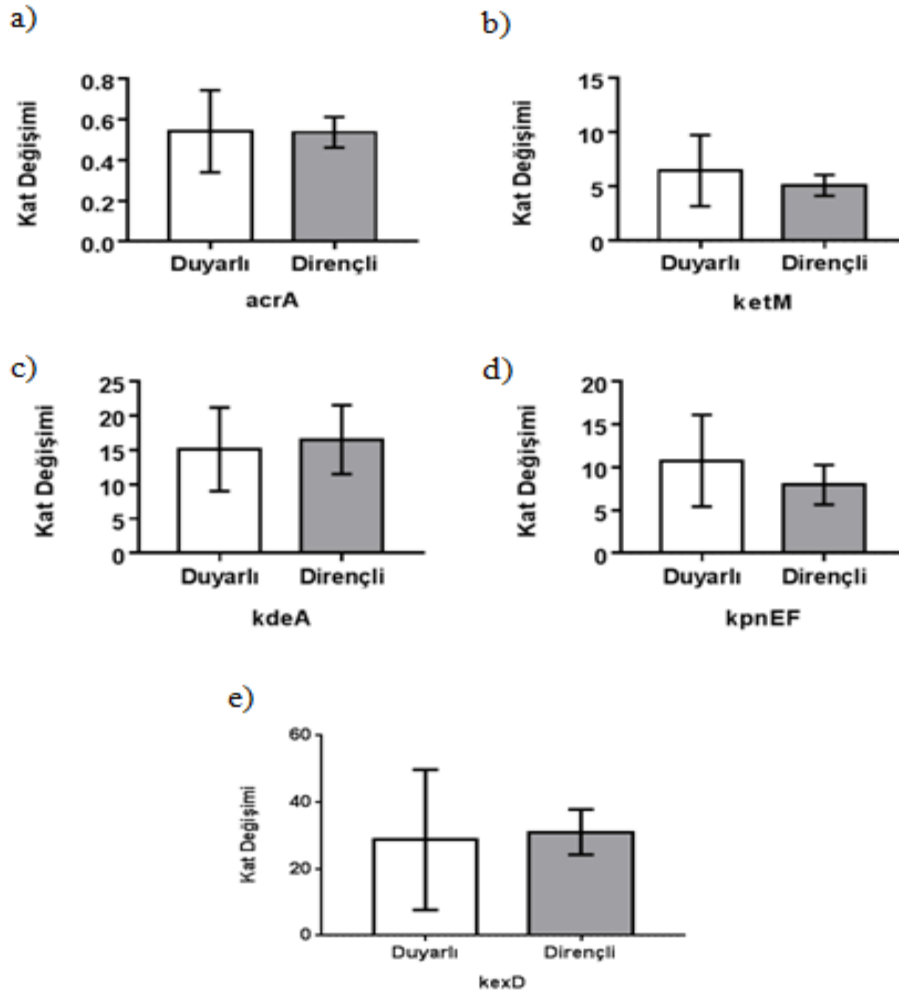
Tablo 4.5. İzolatların *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700721 referans suşuna göre kat değişim değerleri *ND: Ekspresyon yok

İzolat	acrA	ketM	kdeA	kpnEF	KexD	İzolat	acrA	ketM	kdeA	kpnEF	KexD
Referans Suş	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1
1	0,15	0,6	2,11	1,74	47,84	51	0,04	0,26	0,73	0,47	ND
2	0,11	0,71	2,2	2,17	ND	52	0,01	0,05	0,23	0,07	ND
3	0,03	0,13	0,48	0,44	2,01	53	0,14	0,74	1,91	0,61	4,56
4	0,06	0,31	1,14	0,88	ND	54	0,01	0,05	0,26	0,07	ND
5	0	0,12	0,43	0,2	0	55	0,12	1,01	3,03	2,04	11,63
6	0,04	0,3	0,9	0,66	ND	56	0	0,04	0,29	0,14	ND
7	0,04	0,09	0,82	0,5	3,23	57	0,07	0,37	1,92	0,81	1,48
8	0,05	0,32	1,58	0,68	4,92	58	0,44	2,36	11,16	4,56	0,31
9	0,03	0,18	0,6	0,3	ND	59	0,38	0,75	7,26	1,56	0,05
10	0,02	0,08	0,33	0,13	0,61	60	0,24	0,9	5,7	1,62	9,92
11	0,41	2,39	6,5	4,35	0,02	61	0,07	0,25	1,62	0,31	2,01
12	0,05	0,15	0,58	0,24	1,72	62	0,29	0,95	4,17	1,42	ND
13	0,11	0,32	2,11	0,56	5,35	63	0,15	0,32	2,81	0,36	ND
14	0,7	3,97	17,39	4,82	39,67	64	0,16	0,44	3,2	0,88	ND
15	0,03	0,13	0,54	0,29	2,16	65	0,17	0,29	2,31	0,85	0,01
16	1,51	16,8	55,72	19,03	0,01	66	0,56	2,04	8,82	5,46	23,43
17	2,19	30,7	25,11	35,02	4,26	67	0,26	0,82	2,73	0,72	3,25
18	0,34	2,79	13,27	6,77	ND	68	3,25	8,4	31,56	19,97	21,71
19	0,22	3,01	6,54	1,99	19,43	69	2,5	8,06	23,1	15,24	313
20	0,26	3,36	9,51	3,36	22,32	70	0,17	0,43	2,01	0,64	3,34
21	0,26	2,39	6,54	3,36	15,89	71	0,82	0,78	6,82	1,22	43,71
22	0,1	1,24	4,66	1,73	9,99	72	0,02	0,65	3,94	0,59	5,58
23	0,73	14,52	22,32	15,35	120,26	73	0,08	0,14	1,38	0,35	0
24	0,14	2,35	6,11	3,12	ND	74	0,07	0,34	1,87	0,31	0
25	0,29	2,46	11,96	3,78	ND	75	0,02	0,07	0,31	0,07	0,77
26	0,01	16,22	35,75	57,68	0,7	76	0,07	0,95	4,32	1,1	60,97
27	2,23	6,32	20,11	9,25	1,35	77	0,44	5,21	18	15,78	224,41
28	0,7	8,34	9,99	5,74	0,02	78	2,07	25,81	57,28	28,44	ND
29	1,15	10,78	18,25	7,57	ND	79	0,01	0,09	0,33	0,12	ND
30	0	0,04	0	0	0,06	80	0,07	0,39	2,1	0,4	0
31	1,04	56,49	104,69	83,29	ND	81	0	1,05	4,82	1,52	10,27
32	0,61	8,75	19,43	11,88	33,82	82	1,46	5,46	35,26	13,27	144,01
33	2,19	10,56	43,41	11,79	87,43	83	0,01	58,49	404,5	179,77	ND
34	1,35	18,25	31,34	36,25	97,01	84	0,27	1,85	9,25	2	13,45
35	2,25	21,71	44,32	13,64	85,04	85	0,22	0,67	5,28	1,53	7,52
36	1,25	20,82	30,27	29,45	183,55	86	0,2	1,28	7,57	2,06	0
37	1,15	19,84	34,78	13,93	ND	87	0,04	0,34	1,16	0,51	ND
38	1,87	14,93	40,5	26,54	1,21	88	0,04	0,21	1,01	0,45	2,68
39	1,22	13,36	32,67	11,31	ND	89	0,12	0,9	3,92	0,89	ND
40	0,85	14,32	25,99	20,68	135,3	90	0,03	0,1	0,5	0,13	ND
41	0,61	6,32	14,72	6,02	ND	91	0,02	0,18	0,56	0,15	1,08
42	1,16	13,83	34,78	14,32	ND	92	0,04	0,23	1,06	0,18	ND
43	0,31	2,25	5,7	3,23	12,91	93	1,64	4,92	25,28	11,08	ND
44	1,15	13	28,84	13,27	ND	94	0,28	1,87	8,51	1,62	0,07
45	0,11	1,13	3,63	0,47	ND	95	0,42	1,27	5,46	0,98	18,77
46	0,33	3,53	6,87	2,1	20,25	96	0,54	1,21	7,16	1,08	6,68
47	0,5	3,01	7,46	2,53	19,16	97	1,97	4,82	18,64	6,41	48,17
48	0,21	1,78	7,26	1,49	ND	98	1,52	4,47	32	7,78	37,53
49	0,18	3,25	10,06	1,8	ND	99	1,87	4,69	28,25	12,21	76,64
50	0,02	0,22	0,46	0,28	0,01	100	0,08	0,7	4,2	0,7	0,63

4.11. Gen Ekspresyon Seviyesi ile Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişki

İzolatların test edilen antibiyotiklerin büyük bir kısmına, özellikle beta laktam antibiyotiklerine direnç göstermesi nedeniyle çalışmaya seftazidim, aztreonam, siprofloksasin, ertapenem, tobramisin ve tetrasiklin antibiyotik duyarlılık profilleri göz önüne alınarak bu antibiyotikler ile devam edildi. Ara duyarlı izolatlar dirençli olarak kabul edildi. Kat artışındaki fark grupların kat değişimi ortalamalarını birbirine oranlayarak elde edildi. Her bir antibiyotiğe ait dirençli ve duyarlı izolatlar arasındaki pompa genleri ekspresyon farkınının anlamlı olup olmadığını belirlemek için gruplar arası karşılaştırma analizi olan t testi kullanıldı.

Seftazidime duyarlı ve dirençli suşlarda pompa genlerinin ekspresyonu göz önüne alındığında; *acrA* gen ekspresyonunda gruplar arasında herhangi bir değişim görülmedi (duyarlı: $0,5417 \pm 0,2023$, dirençli: $0,5371 \pm 0,07526$, $p=0,9804$). *ketM* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,26 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $6,478 \pm 3,277$, dirençli: $5,116 \pm 0,9713$, $p=0,5973$). *kdeA* geninin ekspresyonu dirençli izolatlarda duyarlılara kıyasla 1,09 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $15,12 \pm 6,087$, dirençli: $16,51 \pm 5,019$, $p=0,9007$). *kpnEF* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,34 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $10,75 \pm 5,345$, dirençli: $7,964 \pm 2,315$, $p=0,6162$). *kexD* geninin ekspresyonu dirençli izolatlarda duyarlılara kıyasla 1,08 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $28,72 \pm 21,04$, dirençli: $31,02 \pm 6,815$, $p=0,8922$) (Şekil 4.27).

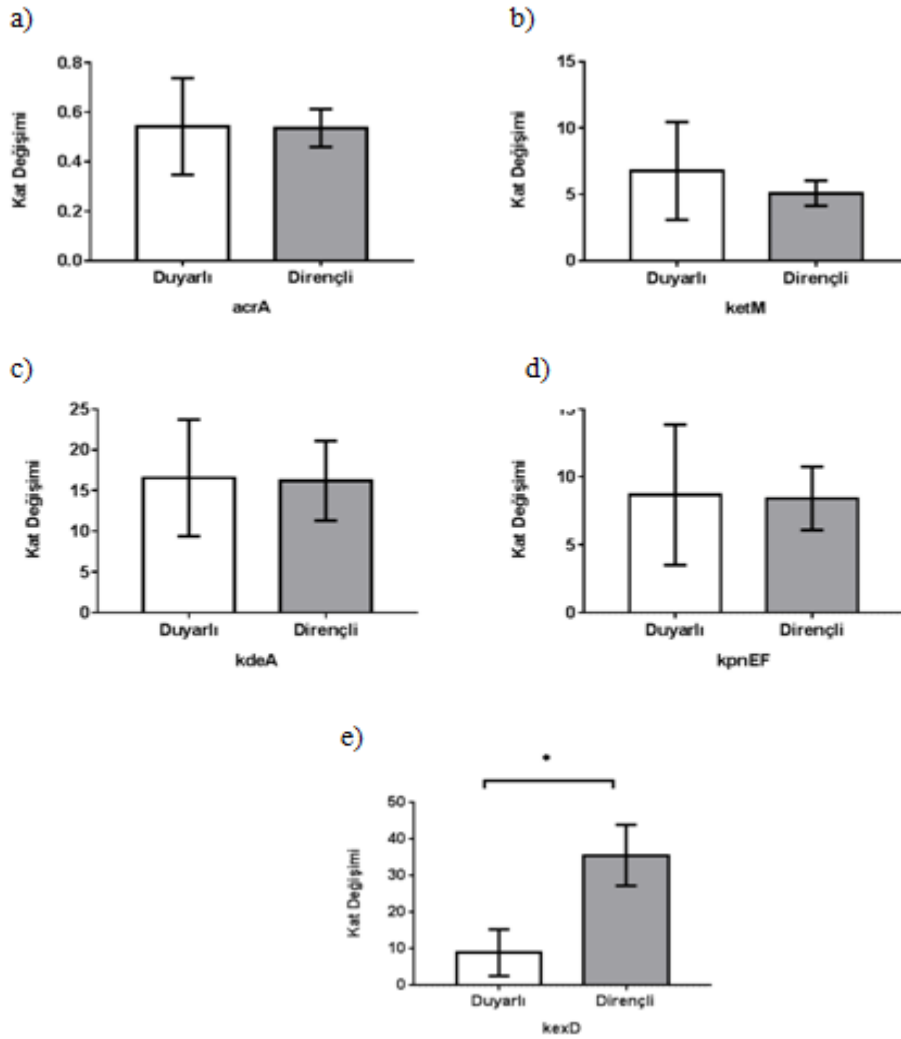


Şekil 4.27. Seftazidime dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri

a) *acrA* gen ekspresyonu kat değişimi b) *ketM* gen ekspresyonu kat değişimi c) *kdeA* gen ekspresyonu kat değişimi d) *kpnEF* gen ekspresyonu kat değişimi e) *kexD* gen ekspresyonu kat değişimi

Aztreonama duyarlı ve dirençli suşlarda pompa genlerinin ekspresyonu göz önüne alındığında; *acrA* gen ekspresyonunda gruplar arasında herhangi bir değişim görülmedi (duyarlı: $0,5425 \pm 0,195$, dirençli: $0,5364 \pm 0,076$, $p=0,9753$). *ketM* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,33 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $6,775 \pm 3,686$, dirençli: $5,092 \pm 0,9491$, $p=0,5332$). *kdeA* gen ekspresyonunda gruplar arasında herhangi bir değişim görülmedi (duyarlı: $16,55 \pm 7,172$ dirençli: $16,21 \pm 4885$, $p=0,9763$). *kpnEF* gen ekspresyonunda gruplar arasında herhangi bir değişim görülmedi (duyarlı: $8,679 \pm 5,171$, dirençli:

8,424±2,335, p=0,9651). *kexD* geninin ekspresyonu dirençli izolatlarda duyarlılara kıyasla 3,97 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (duyarlı: 8,962±6,386, dirençli: 35,61±8,353, p= 0,0142) (Şekil 4.28).

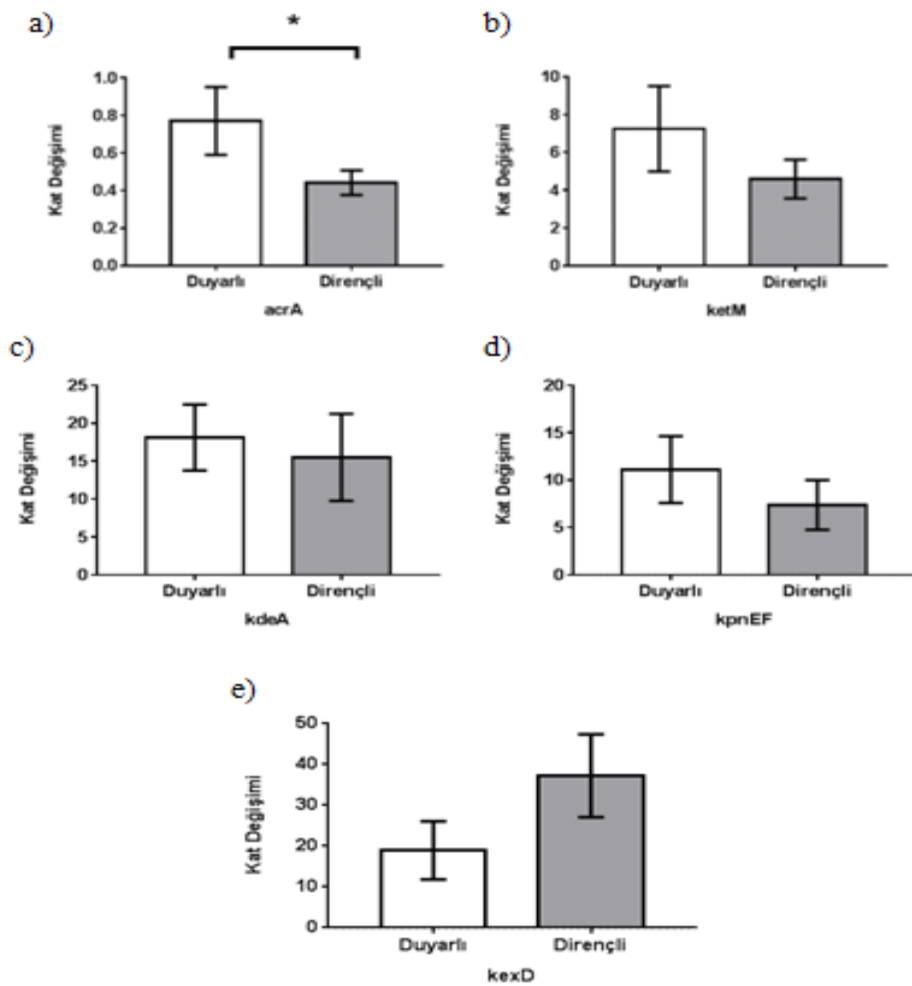


Şekil 4.28. Aztreonama dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri

a) *acrA* gen ekspresyonu kat değişimi b) *ketM* gen ekspresyonu kat değişimi c) *kdeA* gen ekspresyonu kat değişimi d) *kpnEF* gen ekspresyonu kat değişimi e) *kexD* gen ekspresyonu kat değişimi

Siprofloksasine duyarlı ve dirençli suşlarda pompa genlerinin ekspresyonu göz önüne alındığında; *acrA* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,74 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (duyarlı: 0,7707±0,1804, dirençli: 0,4428±0,6579, p=0,0359). *ketM* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere

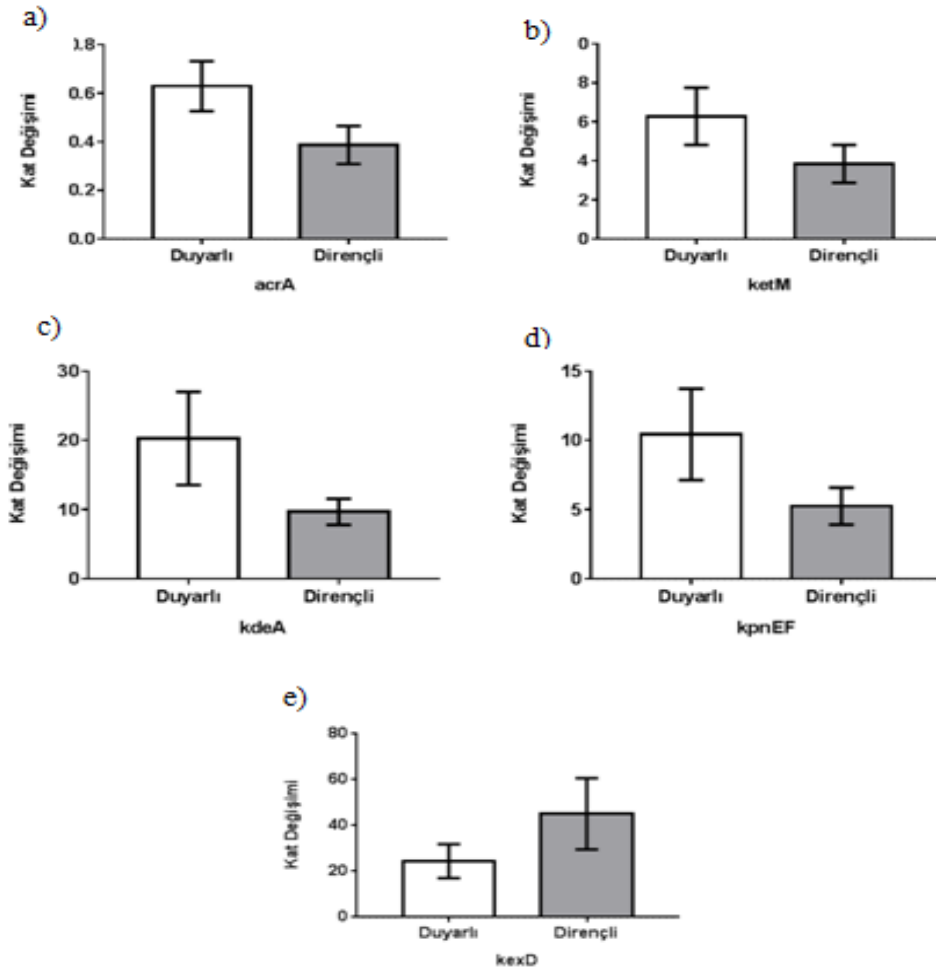
kıyasla 1,57 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $7,249 \pm 2,263$ dirençli: $4,59 \pm 1,03$, $p=0,2218$). *kdeA* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,16 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $18,12 \pm 4,358$ dirençli: $15,5 \pm 5,729$, $p=0,7817$). *kpnEF* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,5 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $11,11 \pm 3,525$ dirençli: $7,384 \pm 2,618$, $p=0,4276$). *kexD* geninin ekspresyonu dirençli izolatlarda duyarlılara kıyasla 1,96 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $37,25 \pm 10,13$, dirençli: $18,93 \pm 7,122$, $p=0,2072$) (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Siprofloksasine dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri

a) *acrA* gen ekspresyonu kat değişimi b) *ketM* gen ekspresyonu kat değişimi c) *kdeA* gen ekspresyonu kat değişimi d) *kpnEF* gen ekspresyonu kat değişimi e) *kexD* gen ekspresyonu kat değişimi

Ertapeneme duyarlı ve dirençli suşlarda pompa genlerinin ekspresyonu göz önüne alındığında; *acrA* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,62 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $0,6295 \pm 0,1029$, dirençli: $0,3871 \pm 0,7837$, $p=0,0984$). *ketM* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,63 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $6,287 \pm 1,465$ dirençli: $3,851 \pm 0,9694$, $p=0,2311$). *kdeA* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 2,09 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $20,29 \pm 6,726$ dirençli: $9,685 \pm 1,876$, $p=0,2272$). *kpnEF* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,98 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $10,43 \pm 3,304$ dirençli: $5,256 \pm 1,342$, $p=0,2376$). *kexD* geninin ekspresyonu dirençli izolatlarda duyarlılara kıyasla 1,84 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $24,45 \pm 7,394$, dirençli: $24,45 \pm 7,394$, $p=0,1793$) (Şekil 4.30).

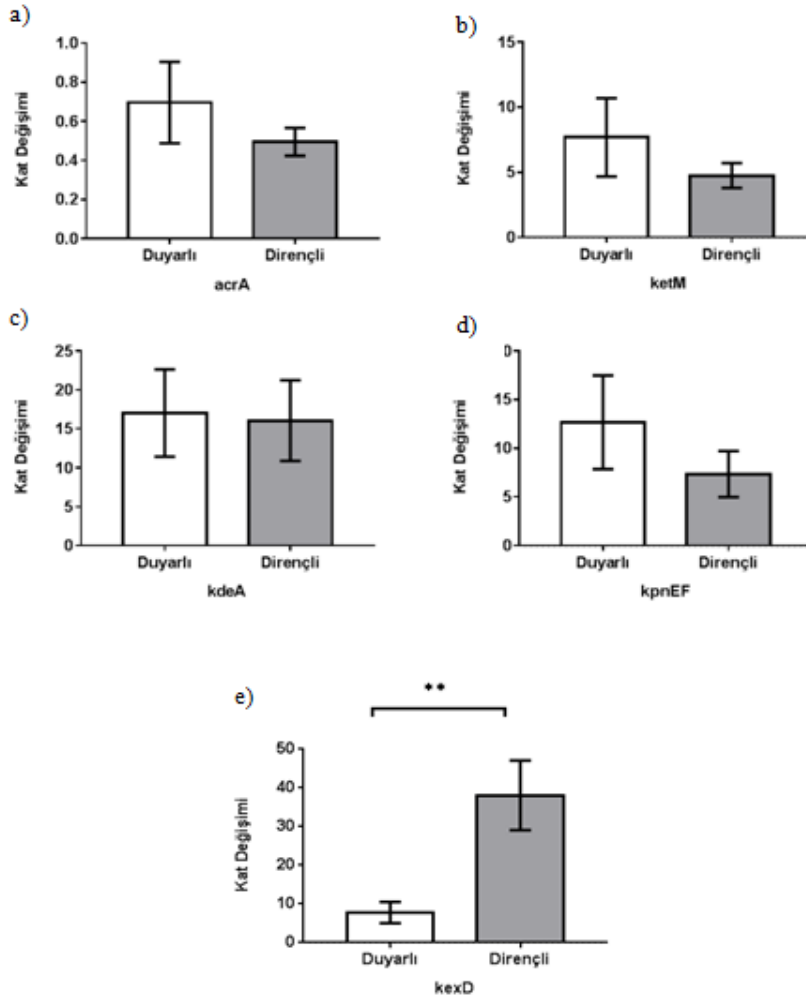


Şekil 4.30. Ertapeneme dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri

a) *acrA* gen ekspresyonu kat değişimi b) *ketM* gen ekspresyonu kat değişimi c) *kdeA* gen ekspresyonu kat değişimi d) *kpnEF* gen ekspresyonu kat değişimi e) *kexD* gen ekspresyonu kat değişimi

Tobramisine duyarlı ve dirençli suşlarda pompa genlerinin ekspresyonu göz önüne alındığında; *acrA* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,40 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $0,6962 \pm 0,208$, dirençli: $0,4958 \pm 0,071$, $p=0,2535$). *ketM* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,61 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $7,683 \pm 3,005$ dirençli: $4,744 \pm 0,9571$, $p=0,2255$). *kdeA* gen ekspresyonunda gruplar arasında herhangi bir değişim görülmedi (duyarlı: $17,02 \pm 5,594$ dirençli: $16,06 \pm 5,183$, $p=0,9273$). *kpnEF* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,72 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $12,66 \pm 4,807$ dirençli:

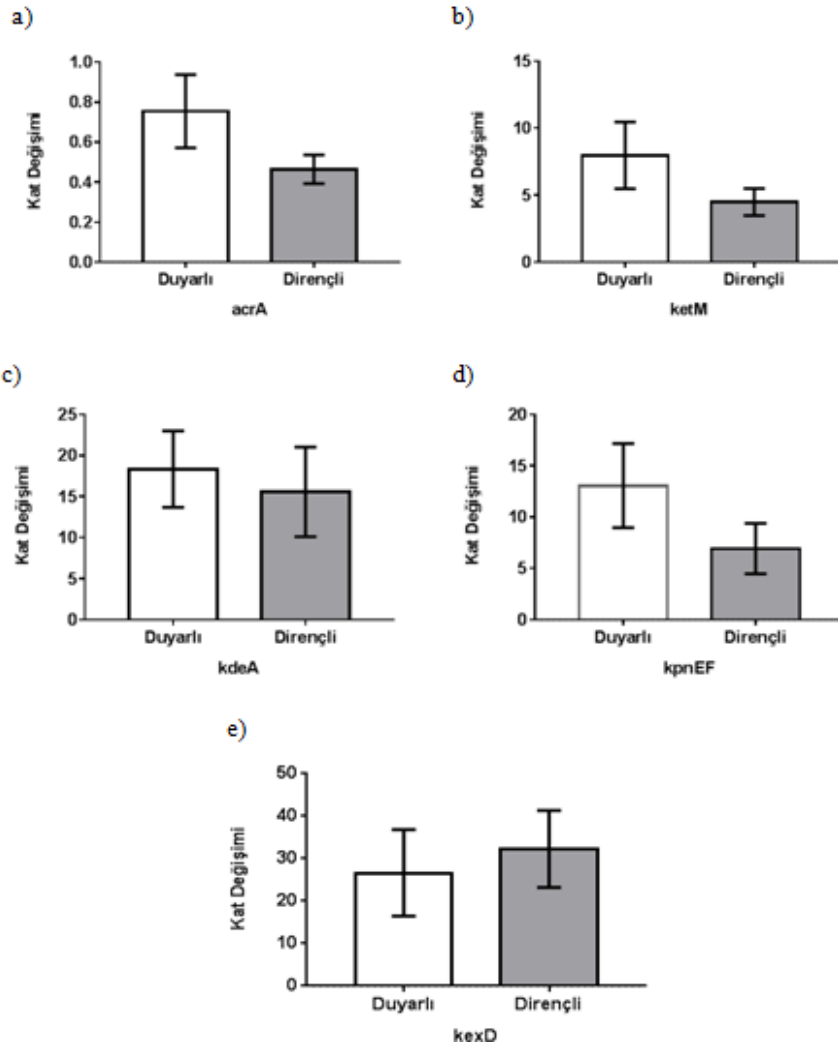
7,349±2,358, p=0,3096). *kexD* geninin ekspresyonu dirençli izolatlarda duyarlılara kıyasla 4,9 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulundu (duyarlı: 7,766±2,762, dirençli: 38,1±9,016, p=0,0021) (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Tobramisine dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri

a) *acrA* gen ekspresyonu kat değişimi b) *ketM* gen ekspresyonu kat değişimi c) *kdeA* gen ekspresyonu kat değişimi d) *kpnEF* gen ekspresyonu kat değişimi e) *kexD* gen ekspresyonu kat değişimi

Tetrasikline duyarlı ve dirençli suşlarda pompa genlerinin ekspresyonu göz önüne alındığında; *acrA* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,62 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $0,755 \pm 0,1829$, dirençli: $0,4648 \pm 0,07161$, $p=0,0772$). *ketM* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,77 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $7,973 \pm 2,489$ dirençli: $4,491 \pm 1,008$, $p=0,1260$). *kdeA* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,17 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $18,35 \pm 4,649$ dirençli: $15,57 \pm 5,462$, $p=0,7787$). *kpnEF* geninin ekspresyonu duyarlı izolatlarda dirençlilere kıyasla 1,88 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $13,06 \pm 4,091$ dirençli: $6,933 \pm 2,464$, $p=0,2120$). *kexD* geninin ekspresyonu dirençli izolatlarda duyarlılara kıyasla 1,21 katlık artış istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (duyarlı: $26,62 \pm 10,17$ dirençli: $32,26 \pm 9,051$, $p=0,7114$) (Şekil 4.32).



Şekil 4.32. Tetrasikline dirençli ve duyarlı suşlarda pompa genlerinin ekspresyon seviyeleri

a) *acrA* gen ekspresyonu kat değişimi b) *ketM* gen ekspresyonu kat değişimi c) *kdeA* gen ekspresyonu kat değişimi d) *kpnEF* gen ekspresyonu kat değişimi e) *kexD* gen ekspresyonu kat değişimi

4.12. Erime Eğrisi Analizi ve Agaroz Jel Elektrofrezisi Sonuçları

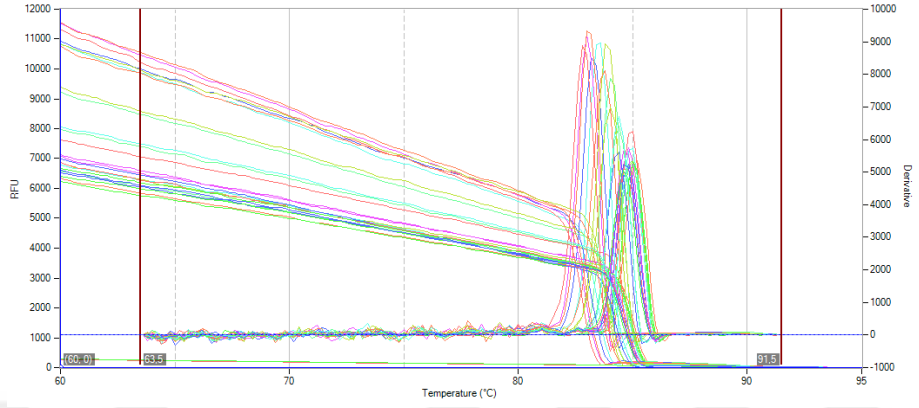
Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu SYBR Green I boyasını kullanarak ürünün amplifikasyonu sırasında çift zincirli DNA'ya bağlanır ve detektör yardımıyla ışımının miktarı ölçülür. Erime eğrisi analizi gerçek zamanlı PZR reaksiyonunun önemli bir aşaması olup reaksiyonunun özgülüğünü gösterir. Genel anlamda erime eğrisi analizi sonucunda her bir örneğe ait tek bir pik görülmesi beklenir. Beklenenin dışında farklı bir pikin görülmesi spesifik olmayan bağlanma veya primer-dimer oluştuğunun göstergesidir. Bu nedenle her bir gerçek zamanlı PZR reaksiyonunda reaksiyonun özgülüğü için erime eğrisi analizi yapılması gerekmektedir.

Erime eğrisi analizi sonrası ürünlerin agaroz jel elektrofrezisi ile görüntülenmesi sonucunda beklenen büyüklüklerde tek bir bant varlığının saptanması gerçek zamanlı PZR'ın özgülüğünü doğrulamaktadır. Çalışmamızda her bir reaksiyonda ve her bir ürün için tek bir pik görüntülenmiştir. Gerçek zamanlı PZR sonrası ürünlerin jelde görüntülenmesi ile de tek bir bant görüntüsü elde edilmiş olup spesifik olmayan bağlanma veya primer-dimer oluşumu gözlenmemiştir.

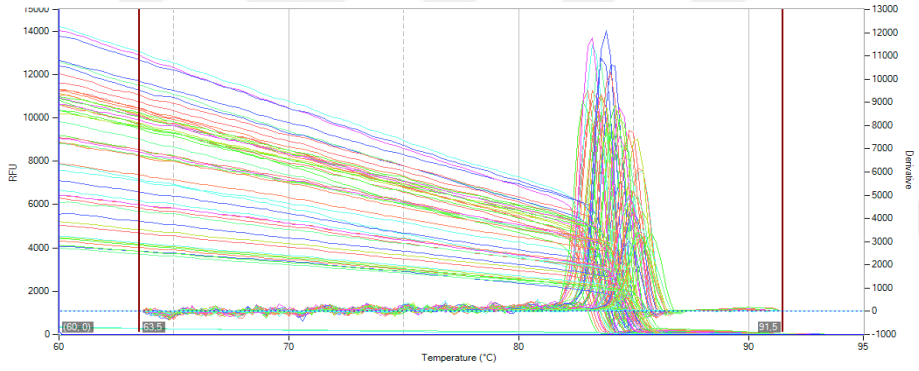
4.12.1. 16S erime eğrisi analizi ve jel elektrofrezis görüntüsü

Klebsiella pneumoniae izolatlarının 16S gen bölgesine ait erime eğrileri Şekil 4.33'de verilmiştir.

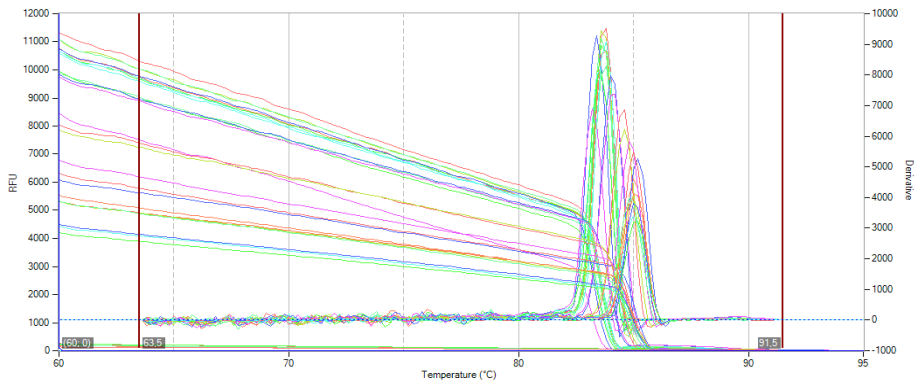
a)



b)

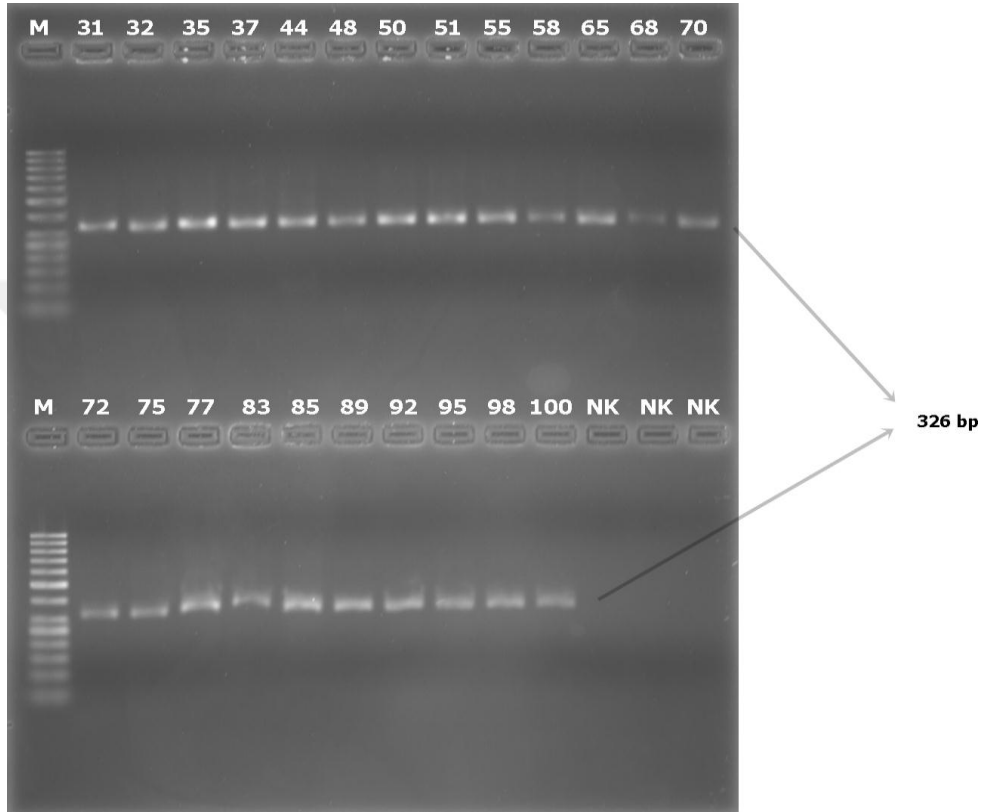


c)



Şekil 4.33. 16S gen bölgesine ait erime eğrisi analizi
a) 1-25. örnekler b) 26-75. örnekler c) 76-100. örnekler

Erime eğrisi analizi sonrası rastgele seçilen örneklere ait ürünlerin özgünlüğü jel elektroforezi sonucu ile doğrulandı. Buna göre yaklaşık 326 bp büyüklüğündeki 16S gen bölgesine ait ampliconların jel görüntüsü Resim 4.9'da verilmiştir.

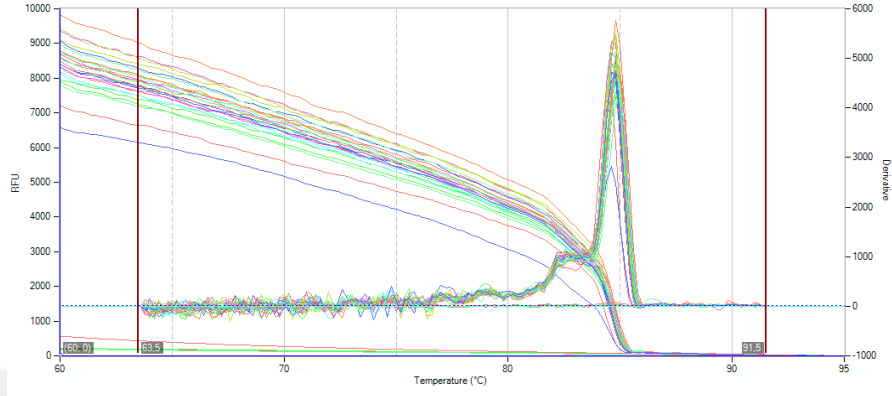


Resim 4.9. 16S gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan ampliconların jel görüntüsü (M: Marker (50 bp) bp: baz çifti NK: Negatif kontrol)

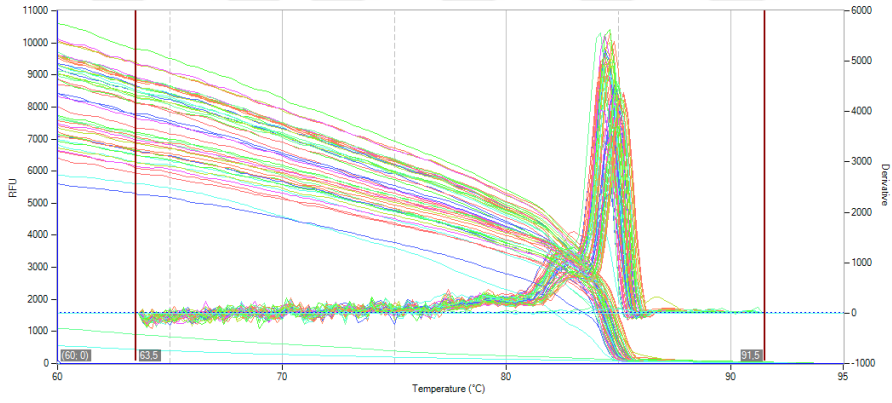
4.12.2. *acrA* erime eğrisi analizi ve jel elektroforez görüntüsü

Klebsiella pneumoniae izolatlarının *acrA* gen bölgesine ait erime eğrileri Şekil 4.34'de verilmiştir.

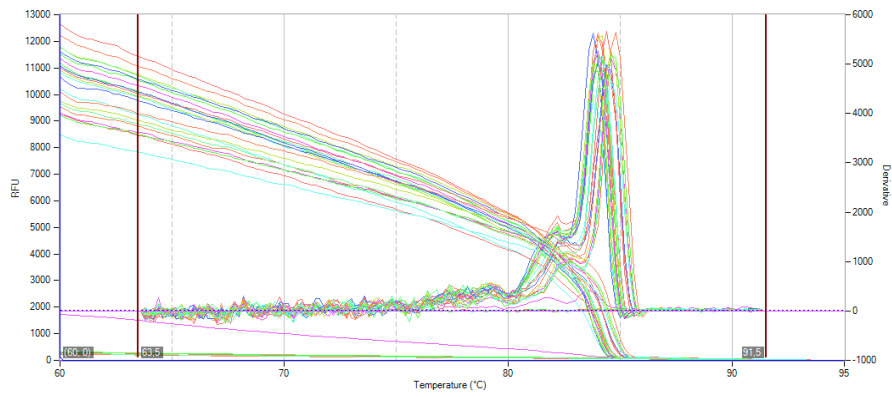
a)



b)

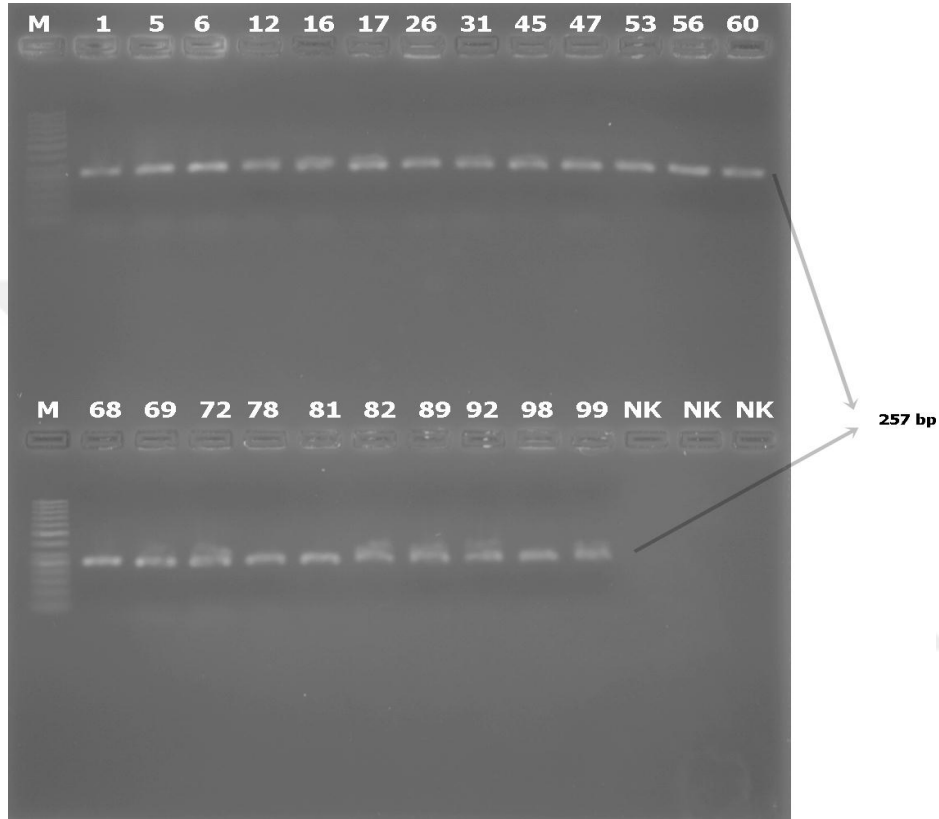


c)



Şekil 4.34. *acrA* gen bölgesine ait erime eğrisi analizi
a) 1-25. örnekler b) 26-75. örnekler c) 76-100. örnekler

Erime eğrisi analizi sonrası rastgele seçilen örneklere ait ürünlerin özgünlüğü jel elektroforezi sonucu ile doğrulandı. Buna göre yaklaşık 257 bp büyüklüğündeki *acrA* gen bölgesine ait ampliconların jel görüntüsü Resim 4.10'da verilmiştir.

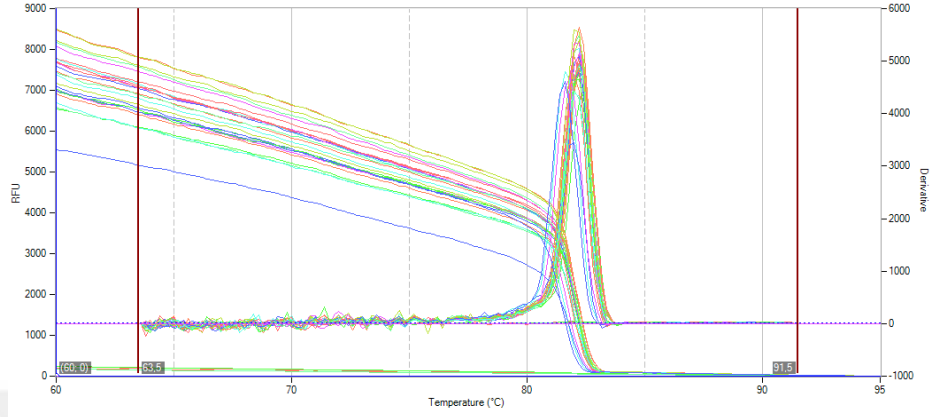


Resim 4.10. *acrA* gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan ampliconların jel görüntüsü (M: Marker (50 bp) bp: baz çifti NK: Negatif kontrol)

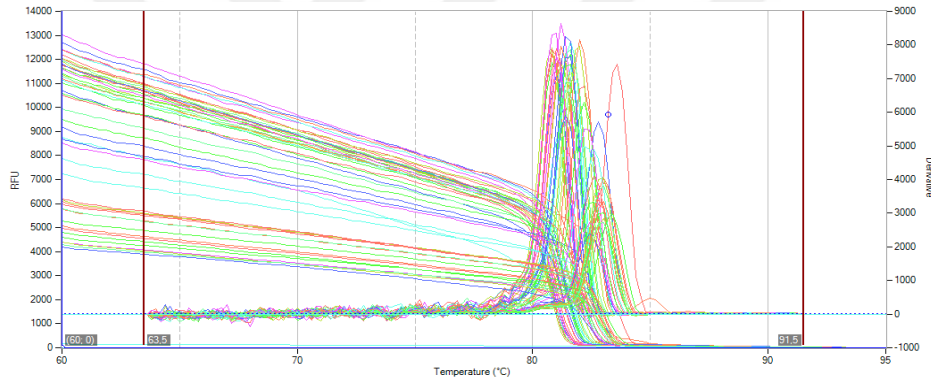
4.12.3. *kdeA* erime eğrisi analizi ve jel elektroforez görüntüsü

Klebsiella pneumoniae izolatlarının *kdeA* gen bölgesine ait erime eğrileri Şekil 4.35'de verilmiştir.

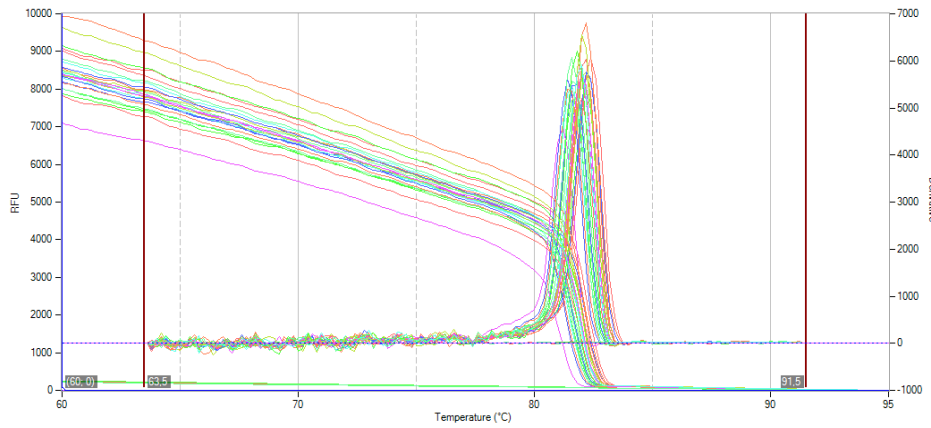
a)



b)

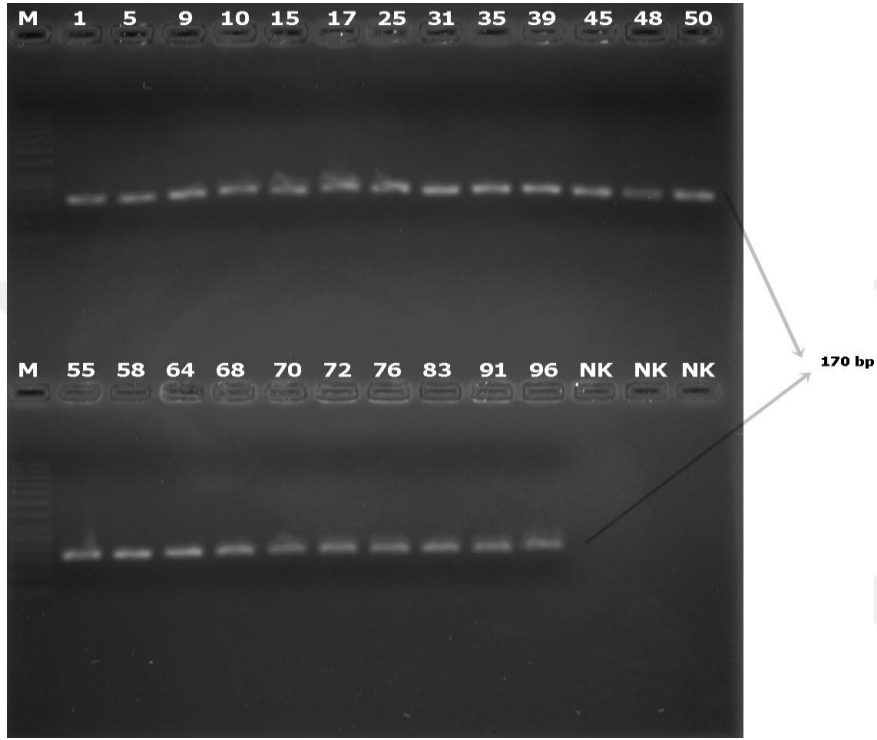


c)



Şekil 4.35. kdeA gen bölgesine ait erime eğrisi analizi
a) 1-25. örnekler b) 26-75. örnekler c) 76-100. örnekler

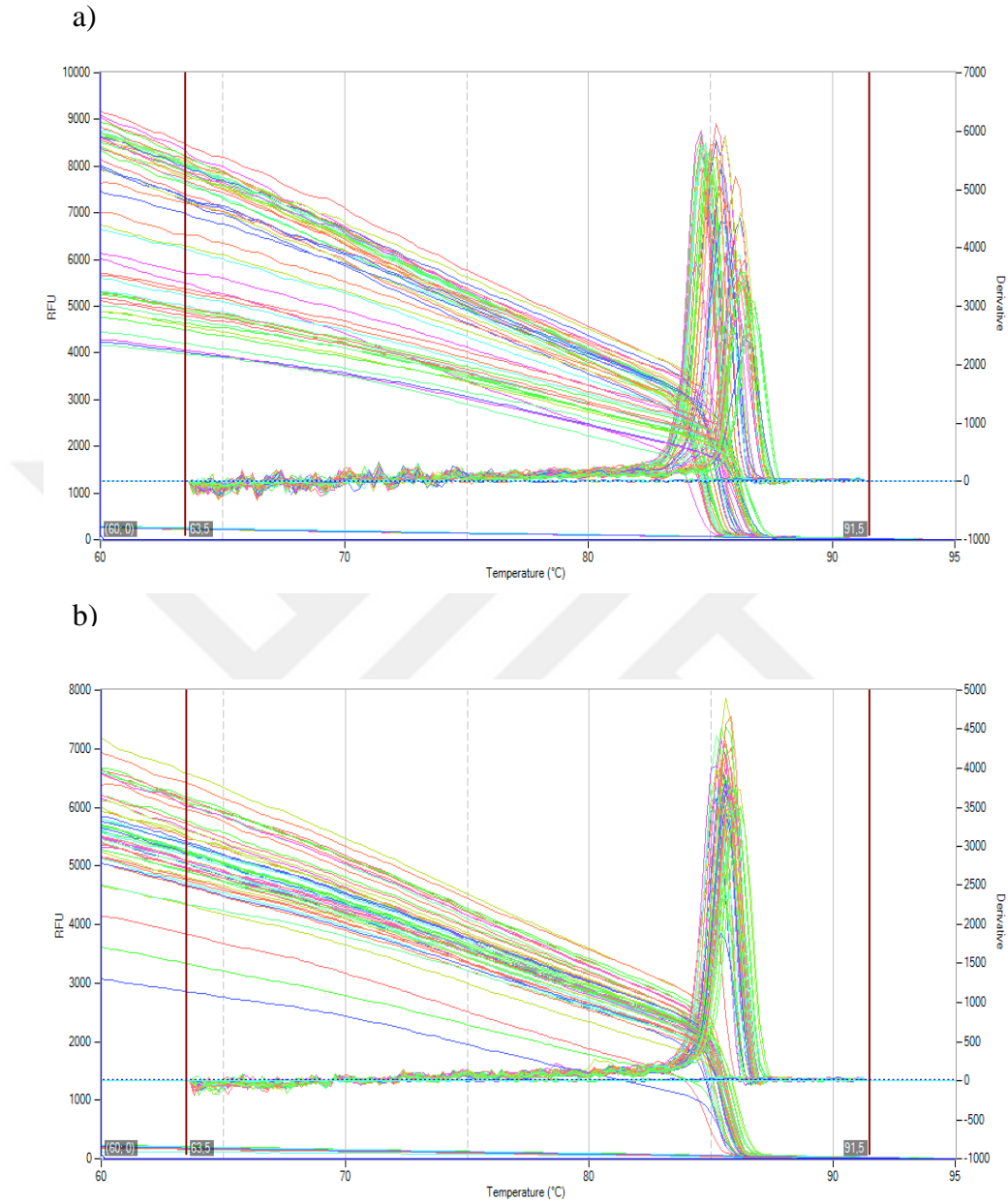
Erime eğrisi analizi sonrası rastgele seçilen örneklere ait ürünlerin özgünlüğü jel elektroforezi sonucu ile doğrulandı. Buna göre yaklaşık 170 bp büyüklüğündeki kdeA gen bölgesine ait ampliconların jel görüntüleri Resim 4.11’de verilmiştir.



Resim 4.11. kdeA gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan ampliconların jel görüntüsü (M: Marker (50 bp) bp: baz çifti NK: Negatif kontrol)

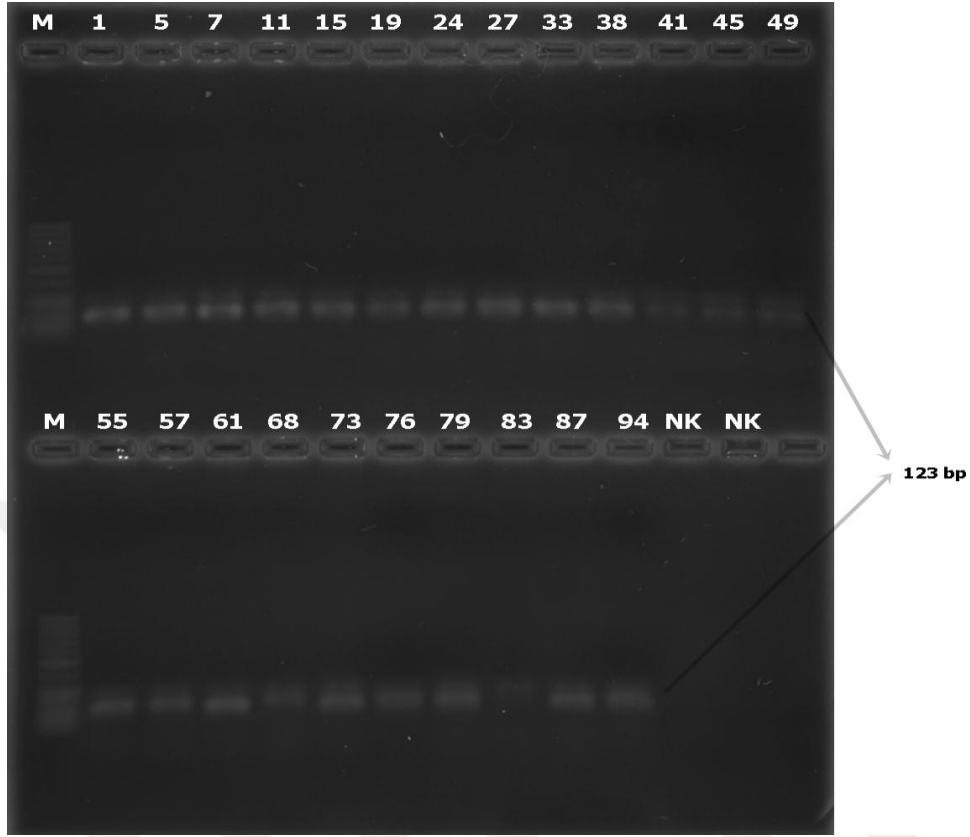
4.12.4. ketM erime eğrisi analizi ve jel elektroforez görüntüsü

Klebsiella pneumoniae izolatlarının ketM gen bölgesine ait erime eğrileri Şekil 4.36’da verilmiştir.



Şekil 4.36. ketM gen bölgesine ait erime eğrisi analizi
a) 1-50. örnekler b) 51-100. örnekler

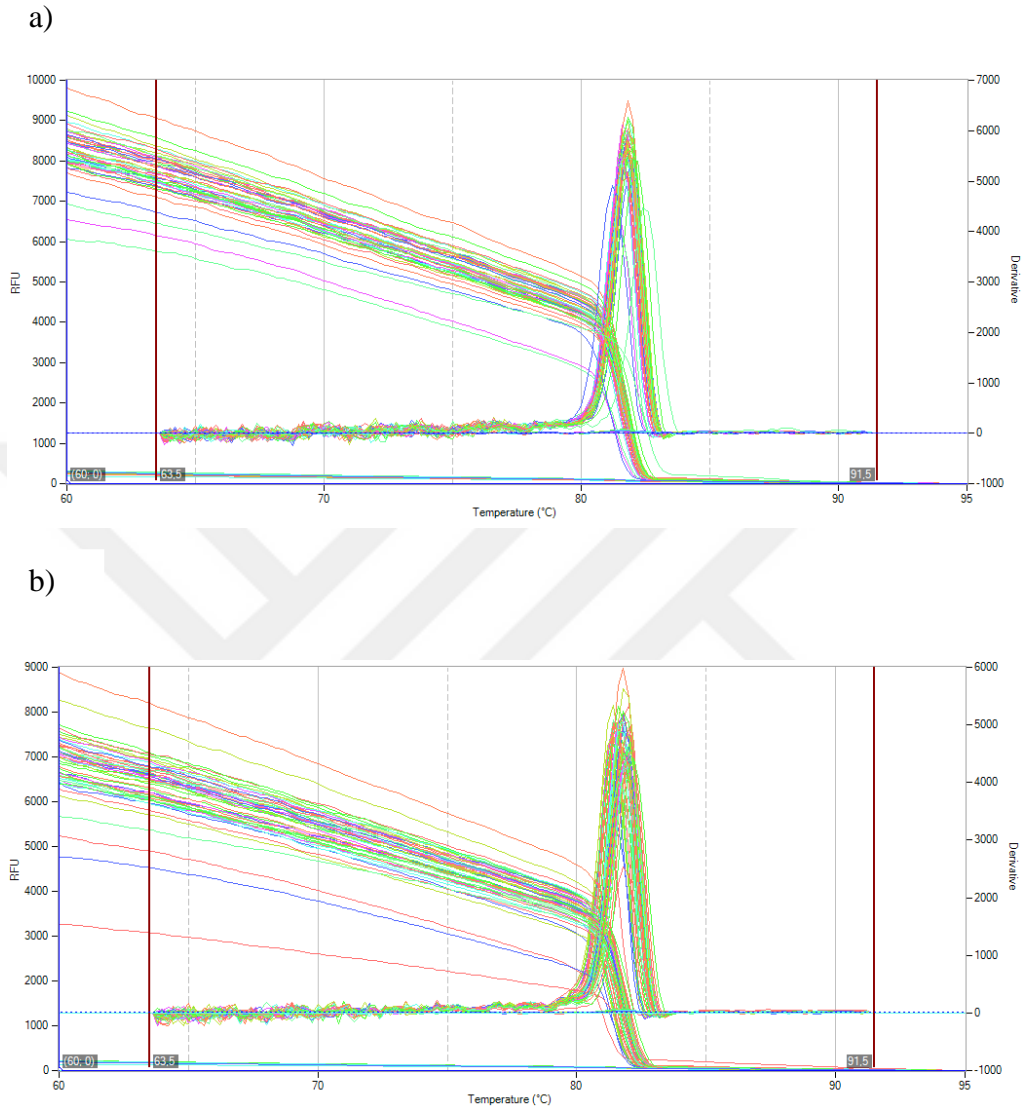
Erime eğrisi analizi sonrası rastgele seçilen örneklere ait ürünlerin özgülüğü jel elektroforezi sonucu ile doğrulandı. Buna göre yaklaşık 123 bp büyüklüğündeki ketM gen bölgesine ait ampliconların jel görüntüleri Resim 4.12’de verilmiştir.



Resim 4.12. *ketM* gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan ampliconların jel görüntüsü (M: Marker (50 bp) bp: baz çifti NK: Negatif kontrol)

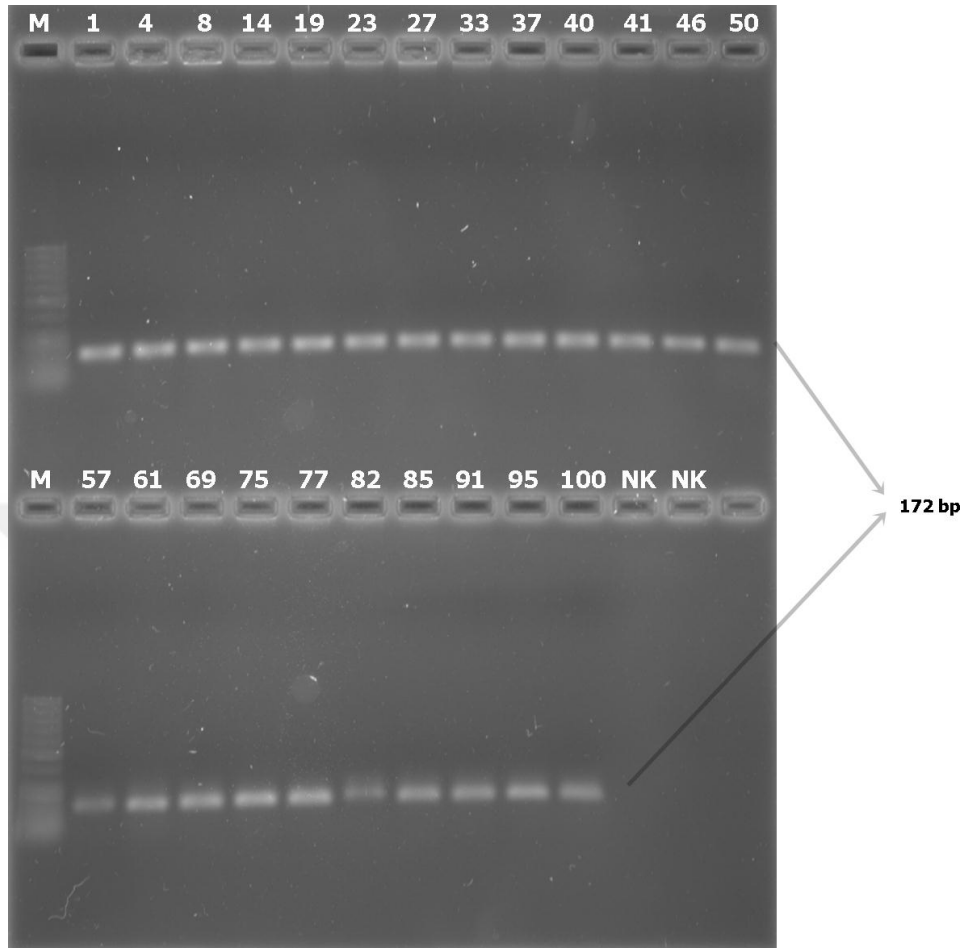
4.12.5. *kpnEF* erime eğrisi analizi ve jel elektroforez görüntüsü

Klebsiella pneumoniae izolatlarının *kpnEF* gen bölgesine ait erime eğrileri Şekil 4.37'de verilmiştir.



Şekil 4.37. kpnEF gen bölgesine ait erime eğrisi analizi
a) 1-50. örnekler b) 51-100. örnekler

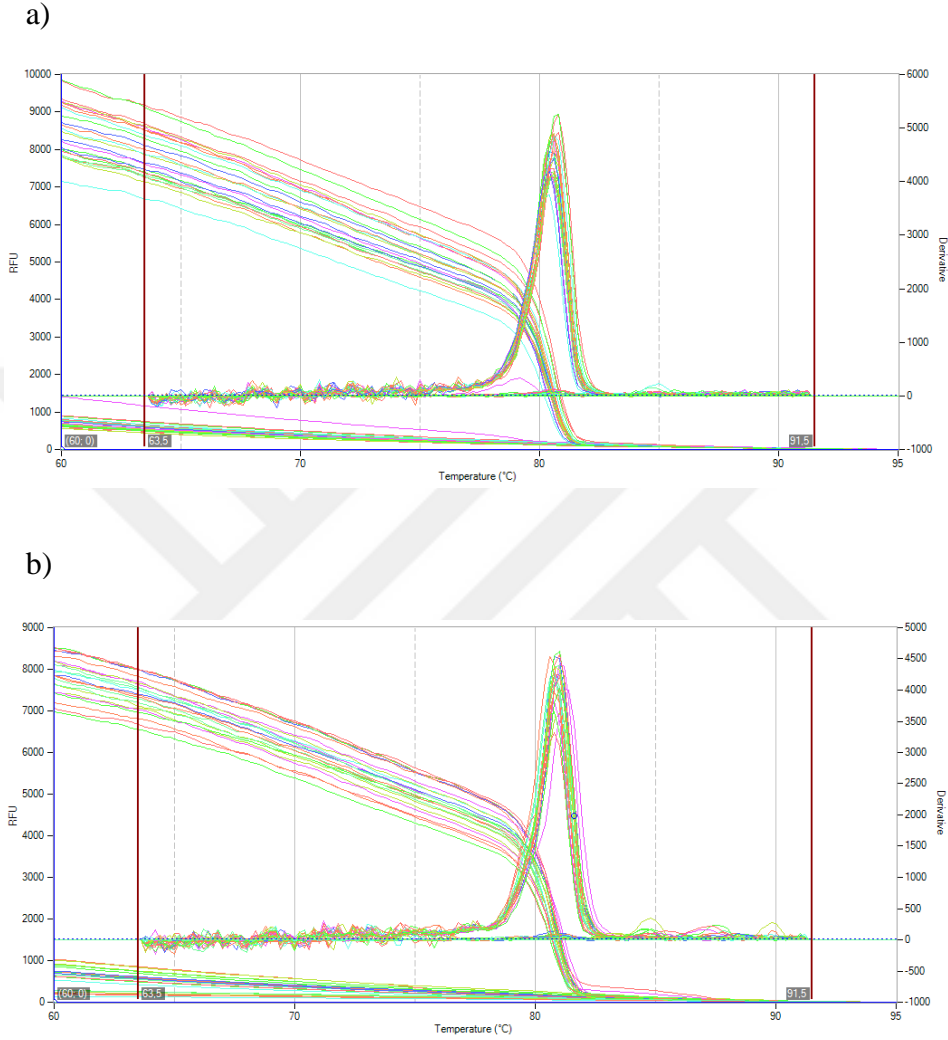
Erime eğrisi analizi sonrası rastgele seçilen örneklere ait ürünlerin özgünlüğü jel elektroforezi sonucu ile doğrulandı. Buna göre yaklaşık 172 bp büyüklüğündeki kpnEF gen bölgesine ait ampliconların jel görüntüleri Resim 4.13’de verilmiştir.



Resim 4.13. *kpnEF* gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan ampikonların jel görüntüsü (M: Marker (50 bp) bp: baz çifti NK: Negatif kontrol)

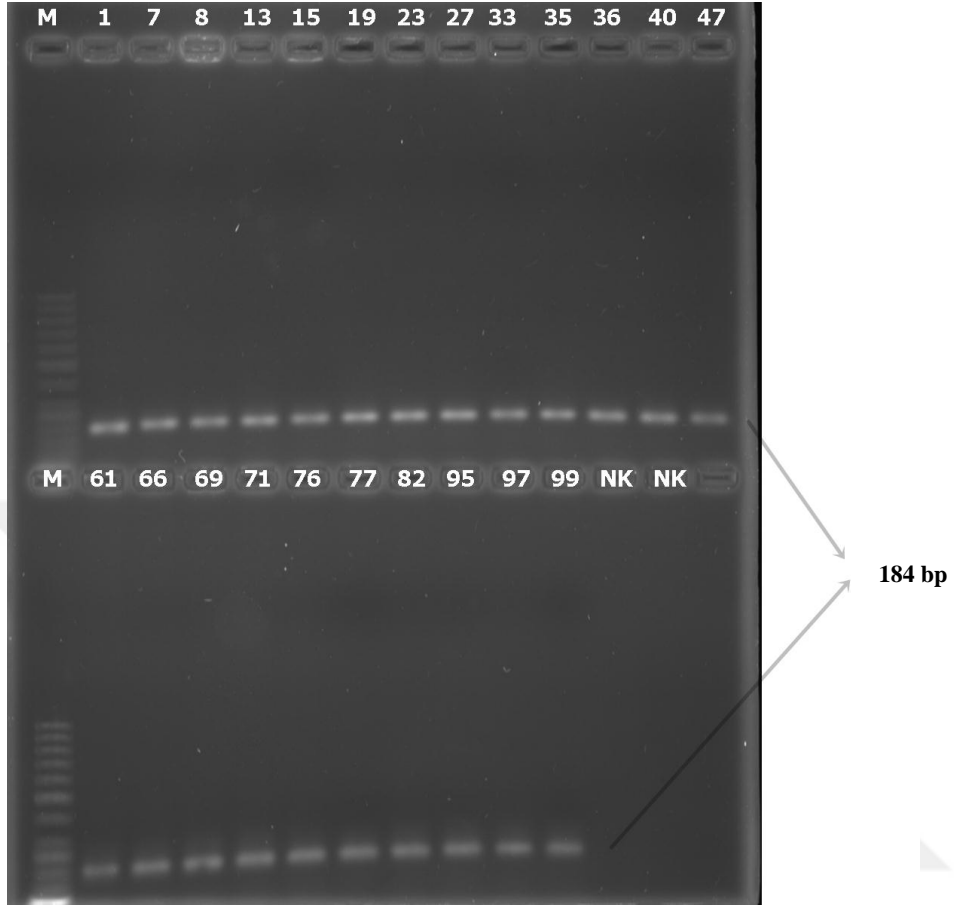
4.12.6. *kexD* erime eğrisi analizi ve jel elektroforez görüntüsü

Klebsiella pneumoniae izolatlarının *kexD* gen bölgesine ait erime eğrileri Şekil 4.38'de verilmiştir.



Şekil 4.38. kexD gen bölgesine ait erime eğrisi analizi
a) 1-50. örnekler b) 51-100. örnekler

Erime eğrisi analizi sonrası rastgele seçilen örneklere ait ürünlerin özgülüğü jel elektroforezi sonucu ile doğrulandı. Buna göre yaklaşık 184 bp büyüklüğündeki kexD gen bölgesine ait ampliconların jel görüntüleri Resim 4.14’de verilmiştir.



Resim 4.14. kexD gen bölgesine ait erime eğrisi sonucu oluşan ampliconların jel görüntüsü (M: Marker (50 bp) bp: baz çifti NK: Negatif kontrol)

5. TARTIŞMA

Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi gün geçtikçe artmakta ve dirençli bakterilerce oluşturulan enfeksiyonlar morbidite ve mortalite oranlarında ciddi derecede artışa yol açmaktadır. Bakterilerin antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç için en sık kullandıkları mekanizmalardan biri sentezlenen enzimler ile antibiyotiğin inaktive edilmesidir. Beta laktam antibiyotikleri hidrolize eden beta laktamaz enzimleri bu tip dirence en iyi örneği teşkil eder [Sirot, 1995; Jacoby ve Medeiros, 1991].

1980’li yıllardan başlayarak geniş spektrumlu beta laktam ajanların klinik tedavide yaygın kullanımları sonucunda bu ana enzimleri kodlayan genlerdeki nokta mutasyonlarına bağlı olarak yeni enzimler gelişmiştir. Bu enzimler geniş spektrumlu beta laktam ajanları inaktive edebildikleri için “geniş spektrumlu beta laktamazlar” olarak adlandırılmışlardır.

GSBL’ler ilk olarak Avrupa’da, daha sonra artan oranda dünyada diğer bölgelerden bildirilmiştir. Pek çok patojen gram negatif bakterilerde tespit edilse de GSBL enzimleri en yüksek oranda *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında görülmektedir [Jacoby ve Medeiros, 1991]. *Klebsiella pneumoniae* suşlarında GSBL’lerin sık görülmesinin sebebi deri ve yüzeylede diğer enterik bakterilere göre daha uzun süre canlı kalabilmeleri, plazmid ile aktarılabilmeleri ve spontan mutasyonların daha sık görülmesidir [Işık, 2007].

Hastane enfeksiyonu etmeni olan *Klebsiella pneumoniae* Amerika ve Avrupa’da hastanelerde yaygın olarak görülmektedir. CDC verilerine göre enfeksiyonların %6’sından sorumludur ve vücutta farklı bölgelerde enfeksiyon yapmasına karşın en çok idrar yolları enfeksiyonlarından izole edilmektedir [Nicolle, 2008].

Tayland’da yapılan bir çalışmada toplamda 22 178 klinik izolatın 400 tanesi *Klebsiella pneumoniae* olarak bulunmuştur. Bu izolatların ise %26’sının GSBL ürettiğini tespit etmişlerdir [Kusum ve ark., 2004].

Ülkemizde 2003 yılında yapılan MYSTIC adlı çok merkezli bir çalışmada hastane kaynaklı *Klebsiella pneumoniae* suşlarında %48 oranında GSBL üretimi saptanmıştır [Gülay, 2005].

Delialioğlu ve ark. yaptığı çalışmada toplamda 175 *Klebsiella pneumoniae* izolatının %29,7'si GSBL üreten izolatlar olarak belirlemişlerdir [Delialioğlu ve ark., 2005].

Kaçmaz ve ark. yaptığı çalışmada *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının %77'sinin GSBL ürettiği belirtilmiştir [Kaçmaz ve ark., 2005].

Ülkemizde altı merkezin katılımı ile gerçekleştirilen HİTİT çalışmasına göre kan örneklerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında GSBL oranı %33.3 olarak bulunmuştur [Gür ve ark., 2008].

Fransa'da 88 hastanede yapılan bir çalışmada 10872 *Enterobacteriaceae* izolatında %1,7 oranında GSBL üretimi saptanmıştır. Bu izolatların ise %14,8'i *Klebsiella pneumoniae* olarak belirlenmekle birlikte bunların %3,71'inin GSBL ürettiği belirlenmiştir [Galas ve ark., 2008].

Khanfar ve ark. yaptığı çalışmada yatan hastalardan elde edilen 225 *Klebsiella pneumoniae* izolatının %13,7'si, ayakta tedavi olanlardan elde edilen 955 izolatın ise %3,1'inin GSBL ürettiğini belirlemişlerdir [Khanfar ve ark., 2009].

Peirano ve ark. Kanada'da yaptığı 10 yıllık sürveyans çalışmasında 2000 yılında %0,1 olan GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* oranı 2009 yılında %1,1 seviyesine ilerlemiştir [Peirano ve ark., 2012].

Japonya'da 2003 ile 2011 yılları arasını kapsayan 9 yıllık çalışmada 2003 yılında ayakta tedavi gören hastalardan izole edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının hiç biri GSBL üretmezken 2011 yılında bu oran %10'a çıkmıştır [Chong ve ark., 2013].

Yapılan çalışmalar neticesinde GSBL'ler tüm dünyada saptanmalarına rağmen bu enzimi üreten mikroorganizmaların sıklığı bölgeden bölgeye, ülkeden ülkeye hatta hastaneden hastaneye farklılık göstermektedir [Bell ve ark., 2002].

GSBL üreten bakteriler hastanelerde, özellikle yoğun bakım, hematoloji, onkoloji, üroloji, gastrointestinal cerrahi, transplantasyon ve yenidoğan servislerinde yatan hastalardan izole edilmektedir.

Yoğun bakım üniteleri (YBÜ), solunum ve dolaşım yetmezliği gibi kritik durumlarda hastalara yaşamsal fonksiyon desteğinin verildiği birimlerdir. YBÜ'nde enfeksiyon gelişme oranları diğer kliniklere göre 5-10 kat daha yüksektir. Yaygın antibiyotik kullanımının en önemli sonucu ise dirençli mikroorganizmaların neden olduğu hastane enfeksiyonlarıdır [Mızrakçı ve ark., 2013].

Yakupogulları ve ark. çalışmasına göre GSBL üreten 35 *Klebsiella pneumoniae* suşunun 13'ü yoğun bakım, 9'u çeşitli cerrahi klinikler, 8'i pediatri kliniği ve geri kalanı çeşitli dahili kliniklerdeki hastaların kan kültürlerinden izole edilmiştir [Yakupogulları ve ark., 2004].

Bilgin tarafından yapılan çalışmada izole edilen 30 *Klebsiella pneumoniae* izolatının 9'u çocuk, 7'si yoğun bakım kliniğinden ve bunu diğer klinik servisler takip etmiştir. Buna ek olarak izolatların %33'ü idrar, %30'u kan, %17'si sürüntü, %10'u balgam ve abseden izole edilmiştir [Bilgin, 2006].

Yurtsever ve ark. yaptığı çalışmada izolatların %22'sini yoğun bakım ünitelerinden, %18'ini genel cerrahi servisinden ve geri kalanını diğer servislerden izole etmişlerdir [Yurtsever ve ark., 2009].

2008 ile 2009 yılları arasında İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan bir çalışmada, GSBL üreten 140 *Klebsiella pneumoniae* izole edildi. Bu izolatların %25,8'i genel cerrahi servislerinden, %17,2'si acil cerrahi yoğun bakım birimi ve servisinden, %14,7'si üroloji servisinden ve geri kalanının farklı servislerden olduğu belirlenmiştir. Ayrıca izolatların %25,7'si idrardan, %17,1'i trakeal aspirat, %12,8'i kandan ve diğer servislerden izole edilmiştir [Koçulu, 2010].

Parlak ve ark. 5 yıl süren çalışmasında *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının servislere göre dağılımı göz önüne alındığında %54,1'i pediatri, %11,1'i yoğun bakım, %6,8'i göğüs hastalıkları ve bunu diğer servisler takip etmektedir [Parlak ve ark., 2011].

Sağlam tarafından yapılan farklı bir çalışmada kardiyoloji ve kalp cerrahi yoğun bakım ünitelerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının hepsi GSBL üretirken dahiliye yoğun bakım ünitesinde izolatların %60'ı, pediatri yoğun bakım ünitesinde ise izolatların %80'inin GSBL ürettiği saptanmıştır [Sağlam, 2012].

Abiha tarafından yapılan başka bir çalışmada Mersin Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda izole edilen 24 *Klebsiella pneumoniae* izolatının 11'i pediatri ve 5'i üroloji servisinden izole edilmiştir. Enfeksiyon servisinden ise herhangi bir izolat elde edilmemiştir [Abiha, 2013].

Çalışmamızda GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının en fazla sırasıyla acil yoğun bakım servisi, enfeksiyon, cerrahi yoğun bakım ve üroloji servislerinden izole edildiği görülmüştür. Yaptığımız çalışmada farklı ülke ve senelerde yapılan çalışmalarla paralellik gösterdiği ve *Klebsiella pneumoniae* türünün yoğun bakım servislerinde daha fazla izole edildiği görülmektedir.

Bunun en önemli nedenleri hastanelerdeki en ağır hastaların yoğun bakım birimlerinde tedavi görmeleri, diğer hastalara göre daha fazla antibiyotik tedavisi uygulanıyor olması ve genelde hastanede daha uzun süresi kalması gösterilmektedir [Çakar ve Tütüncü, 1996].

Özellikle yoğun bakım servislerinde kullanılan geniş spektrumlu penisilin veya sefalosporinlerin kullanımı ile doğru orantılıdır [Romero ve ark., 2005].

Akman yaptığı çalışmada Gazi Üniversitesi Biyoloji Anabilim Dalı'nda izole edilen 167 *Klebsiella pneumoniae* izolatının 146'si idrardan, 7'si kandan, 6'sı boğaz kültüründen ve geri kalanı farklı kültürlerden izole edilmiştir [Akman, 2008].

İnci tarafından Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde yapılan bir çalışmada izole edilen 100 *Klebsiella pneumoniae* örneğinin %65'i idrardan, %16,2'si trakeal aspirattan, %8'i yaradan ve geri kalanı farklı örneklerden izole edilmiştir [İnci, 2008].

Farklı mikrobiyoloji laboratuvarlarından elde edilen ve *Klebsiella pneumoniae* olduğu identifiye edilen 103 izolatın 86 tanesi idrardan, 7 tanesi yaradan, 5 tanesi kandan, 3 tanesi balgamdan ve 2 tanesi trakeal aspirattan izole edilmiştir [Yılmaz, 2009].

Khosravi ve ark. yaptıkları çalışmada, 550 *Enterobacteriaceae* klinik izolatından 55 tanesini *Klebsiella pneumoniae* olarak identifiye etmişlerdir. Bu suşların %70,9'unu idrardan, geri kalan %29,1'ini yaradan izole etmişlerdir [Khosravi ve ark., 2013].

Barakzahi ve ark. İran'da yaptıkları çalışmada GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* suşlarının %50'si idrardan, %17,85'i balgamdan, %17,85'i irinden, %7,14'ü kandan ve yine %7,14'ü beyin omurilik sıvısından izole edilmiştir [Barakzahi ve ark., 2014].

Çalışmamızda izole edilen servislerin yanı sıra izole edilen materyal göz önüne alındığında ise izolatların %55'i idrardan, %12'si kandan, %9'u yaradan, %8'i balgamdan, %6'sı trakeal aspirattan, %5'i kataterden, %3'ü apsedan, %1'i dren ve plevra kültürlerinden izole edilmiştir. Elde ettiğimiz veriler ve farklı çalışmalarla karşılaştırma yaptığımızda *Klebsiella pneumoniae* türünün en çok idrardan izole edilmekte olduğu görüldü.

Çalışmamızın ilk kısmında Samsun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na farklı servislerden gelen materyallerden elde edilen, tür tespiti ve GSBL üretimi otomatize sistemle belirlenen 100 *Klebsiella pneumoniae* türünün disk difüzyon testi ile antibiyotik duyarlılıkları belirlendi.

Kendi çalışmamızda elde ettiğimiz antibiyogram test sonuçlarına göre izolatların seftazidime 72 (%72)'si dirençli, 10 (%10)'u ara duyarlı ve 18 (%18)'i ise duyarlıdır. Üçüncü kuşak sefalosporinler olan sefotaksim ve seftriaksona hepsi (%100) dirençlidir. Monobaktam antibiyotik grubundan olan aztreonama karşı izolatların 79 (%79)'u dirençli, 5 (%5)'i ara duyarlı ve 16 (%16)'sı ise duyarlıdır. Florokinolon grubundan olan siprofloksasine karşı izolatların 54 (%54)'ü dirençli, 17 (%17)'si ara duyarlı ve 29 (%29)'u duyarlıdır. Karbapenem grubu antibiyotik olan ertapeneme ise 32 (%32)'si dirençli, 6 (%6)'sı ara duyarlı ve 62 (%62)'si duyarlıdır. Aminoglikozidlerden tobramisine izolatların 74 (%74)'ü dirençli, 5 (%5)'i ara duyarlı ve 21 (%21)'i duyarlıdır. *Klebsiella pneumoniae*'de doğal dirence sahip olan ampisiline ise 100 (%100)'ü dirençlidir. Son olarak tetrasikline izolatların 65 (%65)'i dirençli, 10 (%10)'u ara duyarlı ve 25 (%25)'i duyarlıdır.

Delialioğlu ve ark. yaptığı çalışmada, GSBL üreten suşlarda tobramisine direnci %48 iken üretmeyenlerde herhangi bir direnç görülmemiştir. Siprofloksasine ise GSBL üreten suşlarda rastlanılmamasına karşın GSBL üretmeyen suşların %4'ünde görülmüştür [Delialioğlu ve ark., 2005].

Ullah ve ark. idrar kültüründen elde ettikleri *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında GSBL üreten izolatlarda siprofloksasine %74,07 oranında direnç görülürken üretmeyen suşlarda bu oran %21,05 civarındadır [Ullah ve ark., 2009].

Köksal ve ark. yaptıkları çalışmada kan kültürlerinden izole edilen ve GSBL üreten 168 izolatın hepsi seftazidim, sefotaksim ve ampisiline, %33'ü ise siprofloksasine dirençli görülmüştür [Köksal ve ark., 2009].

Amerika’da 1998-2010 yılları arasında yapılan bir sürveyans çalışmasında 1998 yılında tetrasikline direnç %14,2 civarında iken, 2010 yılında %16,7 seviyesine ulaşmıştır. Benzer şekilde tobramisin direnci 1998 yılında %4,6 seviyesinde iken 2010 yılında %13,8 seviyesine ulaşmıştır. Seftriakson direnci ise %1,8 seviyesinden %12,1 seviyesine kadar artmıştır. Aztreonam direnci ise 1998 yılında %7,7 seviyesinde iken 2010 yılında %22,2 seviyesine ulaşmıştır. Siprofloksasin seviyesi 1998 yılında %5,5 iken 2010 yılında %16,8 seviyesine gelmiştir. Seftazidim ise 1998 yılında %5,5 iken 2010 yılında %17,2 seviyesine ulaşmıştır [Sanchez ve ark., 2013].

Ocak-Aralık 2011 yılları arasında yapılan bir çalışmada GSBL reten 39 *Klebsiella pneumoniae* izolatının hepsi seftriaksona, seftazidime ve aztreonam dirençli bulunmuştur. Siprofloksasin direnci ise %92 olarak bulunmuştur. GSBL üretmeyen suşlarda ise seftriaksona %50, seftazidime ve aztreonama %56, siprofloksasine %38 oranında direnç grlmştir [Karaayak Uzun ve ark., 2012].

Khosravi ve ark. yaptıkları çalışmada 55 *Klebsiella pneumoniae* izolatının 26 tanesi GSBL pozitif olarak değerlendirmiştir. Bu izolatların %96,3’sı ampiciline, %45,4’sı aztreonama, %61,8’si sefotaksime, %87,2’si seftazidime, %45,6’sı seftriaksona ve %32,73’ siprofloksasine direnç göstermektedir [Khosravi ve ark., 2013].

Ahmed ve ark. Mısır’da yaptıkları çalışmada farklı örneklerden izole edilen 138 *Klebsiella pneumoniae* izolatının 30 tanesini GSBL pozitif olarak belirlemiş ve bu izolatların %63,3’ sefotaksime ve seftazidime, %46,7’si seftriaksona, %6,7’si siprofloksasine ve %20’si ertapeneme dirençli bulunmuştur [Ahmed ve ark., 2013].

Güney Kore’de yapılan bir çalışmada GSBL ürettiği çift disk sinerji testi ile belirlenen ve CTX-M genini taşıyan 33 izolatın tamamı ampiciline dirençli olup %93,9’u seftazidime, %84,8’i sefotaksime, %81,8’i aztreonama ve %60,6’sı siprofloksasine dirençli bulunmuştur. retmeyen izolatlarda ise ampiciline direnç %99, seftazidime direnç %51, sefotaksime direnç %48, aztreonama %42,9 ve siprofloksasine %43,9 oranında direnç grlmştir [Shin ve Ko, 2014].

Barakzahi ve ark. İran'da yaptıkları çalışmada, GSBL üreten izolatların hepsi sefotaksime dirençli olup seftazidime %89, seftriaksona %93, siprofloksasine %57 ve tetrasikline %79 dirençli bulunmuştur [Barakzahi ve ark., 2014].

Rahim ve Mohamed yaptıkları çalışmada izolatların hepsi ampisiline, %76,9'u sefotaksime, %76,9'u siprofloksasine, %46,16'sı ertapeneme, %30,8'i tetrasikline ve %61,53'ü tobramisine dirençli bulunmuştur [Rahim ve Mohamed, 2014].

Hacıseyitoğlu ve ark. yaptıkları çalışmada, GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının tamamı seftrikasona dirençli bulunmuştur. Seftazidime karşı %97,6, siprofloksasine karşı %66,2, ertapeneme karşı ise %11,6 oranında direnç görülmüştür. Üretmeyen izolatlarda ise seftriakson ve seftazidime karşı %1,4, siprofloksasine karşı %8,8 ve ertapeneme karşı ise direnç görülmemiştir [Hacıseyitoğlu ve ark., 2014].

Hindistan'da yapılan bir çalışmada GSBL üreten suşlardan %90,54'ü ampisiline, %93,24'ü aztreonama, %78,38'i sefotaksime, %67,57'si seftazidime, %79,73'ü seftriaksona ve %72,97'si siprofloksasine dirençli bulunmuştur [Shaikh ve ark., 2015].

Malezyada bir hastanede yapılan çalışmada beta laktam antibiyotiklerinden olan sefotaksime izolatların %35,5'i, seftazidime %34,5'i, ertapeneme %4,5'i dirençli bulunmuştur. Beta laktam antibiyotikleri dışında ise siprofloksasine karşı %20'si dirençli bulunmuştur [Mohsen ve ark., 2016].

Çalışmamızdaki antibiyotiklerin direnç seviyeleri göz önüne alındığında seftazidim, sefotaksim ve seftriaksona karşı yüksek düzeyde direnç görülmektedir. Bu antibiyotiklerin direnç seviyeleri beta laktam üretmeyen izolatlarda daha az seviyede görülmektedir. Fakat yapılan çalışmalarda GSBL üreten suşlarda da sefalosporinlere karşı duyarlılık göze çarpmaktadır. Bunun sebebi GSBL enzimleri dışında farklı direnç mekanizmalarının sefalosporin direncinde rol aldığı söylenebilir.

Aztreonama karşı direnç GSBL üreten suşlarda üretmeyenlere göre daha fazladır. Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerle diğer yapılan çalışmaları karşılaştırdığımızda benzer sonuçlar görmekteyiz.

Ertapenem direnci %32 olarak bulunması bu antibiyotiğin tedavilerde kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Son yıllarda karbapenemlere dirençte önemli bir artış olsa da GSBL üreten bakterilerin tedavisinde ilk sırada kullanılmaktadır. Ertapenem metallo-beta laktamaz ve bazı diğer karbapenemazlar hariç geniş spektrumlu beta laktamaz ve ampC tipi beta laktamaz üretenler de dahil olmak üzere beta laktamaz üreten gram negatif bakterilere oldukça etkili bulunmuştur [Lee ve ark., 2007].

Siprofloksasine karşı GSBL üreten suşlarda üretmeyenlere göre yüksek oranda direnç görülmektedir. Literatürde yapılan diğer çalışmalarla karşılaştırdığımızda benzer sonuçlar görülmektedir.

Çalışmamızda tobramisine karşı yüksek seviyede direnç görülmektedir. Yapılan sürveyans çalışmaları bize artan GSBL oranının aminoglikozidlerle paralel olduğunu göstermektedir. Bunun nedeni GSBL taşıyan plazmid genleri aminoglikozid direnç genlerini de taşıyabildiklerinden sıklıkla GSBL pozitif suşlar aminoglikozidlere dirençlidir [Tükenmez-Tigen ve Mülazımoğlu, 2012].

Tetrasiklin direnci çalışmada kullandığımız izolatlarda oldukça yüksek seviyede görülmektedir. GSBL üreten suşlarda aynı zamanda tetrasiklin direnci de görülebilir. GSBL pozitif suşlarının beta laktam olmayan antibiyotik direncinin GSBL üretmeyen suşlara göre anlamlı derecede yüksek olduğu bulunmuştur [Spanu ve ark., 2002]. GSBL üretiminden sorumlu genlerle diğer direnç genlerinin aynı plazmidlerle taşınmasına bağlı olarak GSBL üreten suşlar aynı zamanda aminoglikozidler, trimetoprim-sülfametoksazol, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere de dirençli bulunabilmektedir [Dağlar ve Öngüt, 2012].

Çalışmaların sonuçları arasındaki bu farklılık merkezler arasındaki antibiyotik kullanım politikalarının farklı olması sebebine dayandırılabilir. Ayrıca çalışmada yer alan numune sayısının farklılığı ile de ilişkilendirilebilir. Yine geniş spektrumlu antibiyotiklerin reçetesiz olarak toplumumuz tarafından gelişigüzel kullanımına bağlı olabileceği düşünülmektedir.

Direncin plazmidler ve farklı mekanizmlar ile yayılmasının yanı sıra uluslararası seyahatin de çoklu ilaca dirençli patojenlerin ve direncin yayılımında önemli bir rol oynadığı belirtilmektedir [Lübbert ve ark., 2015].

Geniş spektrumlu beta laktamazların saptanmasında en çok kullanılan fenotipik yöntemler arasında kombine disk testi, E-test, çift disk sinerji testi, üç boyutlu test, dilüsyon yöntemleri ve otomatize sistemler bulunmaktadır [Vercauteren ve ark., 1997].

Toplam 24 adet *Klebsiella pneumoniae* izolatında kombine disk difüzyon testiyle 23, çift disk sinerji testiyle 23 ve E-test ile 22 suшта GSBL pozitifliği saptanmıştır. Bu suşların PZR yöntemiyle GSBL enzimleri 23 suшта tespit edilmiştir [Abiha, 2013].

Yapılan başka bir çalışmada ise çift disk sinerji yöntemiyle 103 *Klebsiella pneumoniae*'de %66 oranında GSBL pozitiflik gözlemlenmiştir. Klavulanik asit kombinasyonu içeren disklerin kullanımı yöntemiyle %59,37'si GSBL pozitif olarak belirlenmiştir [Yılmaz, 2009].

Işık yaptığı çalışmada, CLSI'nin fenotipik doğrulama testi olarak önerdiği kombine disk sinerji testi ile izole edilen 102 *Klebsiella pneumoniae* suşunun 65'inde (%63,7) GSBL varlığı belirlenmiştir. Bu suşların 63'ünde çift disk sinerji ile GSBL varlığı, E-test ile 61'inde GSBL varlığı saptamıştır [Işık, 2007].

Sturm ve ark. Phoenix otomatize sistemde belirlenen GSBL pozitifliğin diğer GSBL belirleme yöntemleriyle doğrulanması gerektiğini bildirmişlerdir [Sturm ve ark., 2010].

GSBL varlığı belirlemek için kullanılan fenotipik testlerin yapılan diğer çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir. Kullanım kolaylığı ve ucuz olması sebebiyle çift disk sinerji testi veya kombine disk difüzyon testleri kullanılabilir.

Çift disk sinerji testinin güvenilirliğini azaltan çeşitli faktörler bulunmaktadır. Çift disk sinerji testinde kullanılan amoksisilin-klavulonat ve sefalosporin diskleri arasındaki uzaklık ve enzim substrat profili testin duyarlılığını önemli ölçüde etkileyebilmektedir [Sirot, 1996].

Çalışmamızda GSBL tespiti için fenotipik tarama testi olarak CLSI tarafından GSBL doğrulanması için önerilen kombine disk testi kullanıldı. Kombine disk testi temelde disk difüzyon yöntemiyle bire bir benzerlik göstermektedir ve kolay uygulanabilmektedir. Aynı zamanda ek bir maliyet ve zaman gerektirmemektedir. Yöntemde kullanılan sefotaksim/klavulanik ve seftazidim/klavulanik diskleri ticari olarak satın alınabilmektedir. E-test stripi ise fiyat açısından kombine disk yöntemine göre 60 kat daha pahalıdır [Göker, 2007].

1976 yılında ilk kez memeli hücre membranında yer alan P-glikoproteininin kanser ilaçlarına ve daha sonra bakteri hücre membranında yer alan Tet pompa proteininin tetrasiklin direncine yol açtığı gösterilmiştir. Ardından yapılan çalışmalar çoklu ilaç direncine yol açan aktif pompa genlerinin bakterilerde ve diğer birçok patojen mikroorganizmada yaygın olarak bulunduğunu göstermektedir [Hasdemir, 2007].

Atım pompaları bakterilerin hemen hepsinde bulunan ve antibiyotik direncinin oluşmasını sağlayan ve bununla beraber antibiyotik geliştirme çalışmalarında çokça mücadele edilen bir mekanizmadır. Bu mekanizma sadece doğal ve kazanılmış çoklu ilaç direnci oluşmasına değil, aynı zamanda bakteriyel stres cevabında ve patojenitede görev almaktadır. Aynı zamanda atım pompaları diğer mekanizmalarla sinerji yaratarak direnç seviyesini arttırmaktadır. 1990 yılların başlarından bu zamana dikkat çekici bilimsel ve teknolojik gelişmeler bu pompaların yapısal ve biyokimyasal yapısını, substrat özelliklerini, moleküler regülasyonunu ayrıntılı bir şekilde aydınlatmaya olanak tanımaktadır. Fakat geliştirilen yeni antibiyotikler ve

inhibitörler hala bu mekanizma ile mücadelede yetersiz kalmaktadır [Li ve ark., 2015].

Klebsiella pneumoniae'de yaygın olarak bulunan direnç mekanizması beta laktamaz, geniş spektrumlu beta laktamaz ve karbapenemaz enzimleri aracılığıyla gerçekleşen mekanizmalardır. Buna karşın *Klebsiella pneumoniae* genomu birçok atım pompa sistemini kodlayan operonu barındırmaktadır. Bu pompalar sadece antibiyotikleri değil, bunlardan farklı olarak boya ve deterjan gibi bileşikleri hücre dışına pompalamaktadır. En temel tanımlanan üçlü yapıya sahip AcrAB atım pompası, siprofloksasin, sefoksitin, eritromisin, nalidiksik asit ve tigesiklin gibi birçok antibiyotiğe karşı direncin oluşmasında görev almaktadır [Hennequin ve Robin, 2015].

Çalışmamızda incelediğimiz 100 izolatta siprofloksasine duyarlı suşlar *acrA* atım pompasını dirençlilere göre anlamlı şekilde fazla eksprese etmişlerdir. Bu sonuç literatürde yapılan diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir ve dirençli suşlarda siprofloksasin direncinin farklı mekanizmalarla gerçekleştiğini düşünmekteyiz.

AcrAB atım pompa sisteminde periplazmik boşlukta yer alan *acrA* proteini kromozomal olarak kodlanmaktadır. Li ve ark. yaptıkları çalışmada, pETV62 vektör sistemine klonlanan gen bölgesinin alıcı suшта ampisilin, sefotaksim, oksasilin, eritromisin, tetrasiklin ve etidyum bromür MİK değerlerinde bir artışa neden olduğunu belirlemişlerdir [Li ve ark., 2008].

Çoban ve ark., NMP pompa inhibitörünün siprofloksasin MİK değeri üzerine yaptıkları çalışmada *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının 10 (%76,9)'unda 4 kat ve üzeri azalmaya, 3 (%23,1)'ünde ise 2 kat azalmaya neden olduğunu belirlemişlerdir [Çoban ve ark., 2009].

Yedekçi ve ark. PAβN pompa inhibitörü ile yaptıkları çalışmada 21 GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatının 4 tanesinde sadece siprofloksasin, 5 tanesinde sadece nalidiksik asit, 2 tanesinde hem nalidiksik asit hem de siprofloksasin MİK

değerlerinde inhibitör yardımıyla en az 4 katlık azalma görüldüğünü belirtmişlerdir [Yedekçi ve ark., 2012].

Klebsiella pneumoniae izolatlarında siprofloksasine karşı direnç *gyrA*, *parC* ve *ompK35*'de meydana gelen mutasyonlar neden olmaktadır. Yüksek seviyede atım pompa aktivitesinin görülmesi hedef değişimi veya mutasyonu olmayan izolatlarda florokinolonlara karşı ana direnç mekanizması olarak görülmektedir [Aathithan ve French, 2011].

Mazzariol ve ark. yaptıkları çalışmada, florokinolon direncinin oluşmasında rol oynayan *gyrA* ve *parC* gen bölgelerinde mutasyonların oluşmaması yüksek seviyede *acrA* geninin ekspresyonuna neden olduğunu belirtmişlerdir [Mazzariol ve ark., 2002].

Pakzad ve ark. yaptıkları çalışmada siprofloksasine dirençli buldukları izolatların hepsinde *acrA* genine rastladıkları fakat izolatların atım pompa inhibitörü kullanarak siprofloksasin MİK değerlerinde sadece %47,5'inde anlamlı düşüş tespit etmişlerdir ve direncin kaynağının DNA giraz, topoizomeraz IV enzimi veya *qnr* genleri aracılığıyla olabileceğini belirtmişlerdir. Florokinolonlar, hedef genlerindeki değişimin yanı sıra farklı mekanizmalarda direnç oluşumunda görev almaktadır [Pakzad ve ark., 2013].

Atım pompalarının aşırı eksprese olmasının nedenleri arasında lokal reseptörde oluşan mutasyon, global regülatör gende oluşan mutasyon, genin promotor bölgesinde oluşan mutasyon ve genin yukarı bölgesine insersiyon elemanlarının yerleşmesini göstermektedir [Piddock ve ark., 2000].

Yapılan başka bir çalışmada, kinolonlara direncin porinlerde meydana gelen değişimle olmadığı belirtilmiştir [Bialek, 2010].

Son yıllarda atım pompa mekanizması üzerine yapılan çalışmalar bu mekanizmaların biyolojik ve kimyasal yönlerinin aydınlatılmasının yanı sıra yeni genlerin

bulunmasıyla da hız kazanmıştır. *Klebsiella pneumoniae*'de yeni keşfedilen kexD geni, AcrAB gibi RND tip pompa familyasındandır. *Escherichia coli* KAM32'ye plazmid aracılığıyla aktarılan bu gen eritromisin, oleandomisin, novobiosin, tetrasiklin ve etidyum bromür gibi birçok bileşiğin alıcı suşta MİK seviyesinin artmasını sağlamıştır. Fakat kexD geni aminoglikozid ve kinolonları substrat olarak algılayamamaktadır [Ogawa ve ark., 2012].

Literatürde verilen bilginin aksine aminoglikozid grubu antibiyotiklerinden olan tobramisine dirençli suşlarda gen ekspresyonu duyarlı suşlara göre anlamlı derecede artmaktadır.

Ogawa ve ark. yaptıkları çalışmada aminoglikozid olarak gentamisini kullanmışlardır [Ogawa ve ark., 2012]. Bu açıdan aynı grupta yer almalarına karşın kimyasal yapı olarak bu iki antibiyotik arasında bir fark olabilir ve pompa proteinlerine bağlanma noktasında farklılıklar olabilir. Hidrofilik aminoglikozidler bazı çoklu ilaca dirençli pompalar için substrat olabilmektedirler [Weinstein ve Hooper, 2005].

Aminoglikozid antibiyotiklerine karşı direnç ribozomal, permeabiliteye bağlı ve modifiye edici enzimlere bağlı olarak 3 yolla olmaktadır. Fakat aminoglikozidlere karşı en yaygın olan direnç türü enzim vasıtasıyla olmaktadır. Aminoglikozidleri modifiye eden enzimler sıklıkla plazmid veya transpozon kökenli olup çoğu transpozonlar ile taşınır. Aminoglikozidin hidroksil veya amino gruplarına özgül olarak bağlanan bu enzimler aminoglikozid yapısını asetilasyon, adenilasyon veya fosforilasyon reaksiyonları ile inaktive ederler ve bu genel reaksiyonların her biri için çeşitli enzim grupları mevcuttur [Kılıç, 2013]. Fakat bu enzimler tek başlarına etkili olamazlar çünkü dar bir substrat özgüllüğüne sahiptirler [Ma ve ark., 2009].

Günümüze kadar tanımlanmış olan 16S metilaz genleri armA, rmtA, rmtB, rmtC, rmtD, rmtE and npmA [Liang ve ark., 2015]. Galimand ve ark. tarafından ArmA geni ilk defa *Klebsiella pneumoniae*'de tespit edilmiştir [Galimand ve ark., 2003].

Zacharczuk ve ark. yaptıkları çalışmada, 17 klinik *Klebsiella pneumoniae* izolatının hepsinde ArmA geni tespit etmişlerdir [Zacharczuk ve ark., 2011].

Ma ve ark. yapmış olduğu çalışmada, izolatların %43'ünün ArmA ve %36'sının rmtB genini taşıdığını tespit etmişlerdir [Ma ve ark., 2009].

Yan ve ark. yaptığı çalışma, 81 amikasin dirençli izolattan 14 *Escherichia coli*'nin 12'sinde ve 21 *Klebsiella pneumoniae*'nin 16'sında armA, iki *Escherichia coli* ve beş *Klebsiella pneumoniae*'da ise rmtB varlığı saptanmıştır [Yan ve ark., 2004].

Domenech-Sanchez ve ark. yaptıkları çalışmada, Ompk35 porininin delesyonu gentamisin direncinde herhangi bir değişiklik yaratmamıştır. Porin kaybının veya ekspresyon miktarındaki azalmanın aminoglikozid direncine herhangi bir katkısı olduğunu düşünmemekteyiz. Dolayısıyla tobramisine karşı oluşan bu direnç ya pompa kaynaklı ya da modifiye edici enzimler vasıtasıyla olabilir [Domenech-Sanchez ve ark., 2003]. Aynı zamanda pompa genini kontrol eden regülör gende meydana gelen mutasyon veya insersiyon elementlerinin eklenmesi ile bu genin aşırı eksprese olmasına sebep olabileceğini düşünmekteyiz.

GSBL'ler gram negatif çomaklarda bulunan geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir [Falagas ve Karageorgopoulos, 2009]. Mima ve ark. yaptıkları çalışmada, *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 suşundan aşırı duyarlı *Pseudomonas aeruginosa* YM6'a klonladıkları RND tip muxABC-opmB pompa sisteminin, bu suşta aztreonam direncinde artışa sebep olduğunu belirlemişlerdir ve aztreonamın bu atım pompası için substrat olduğunu belirlemişlerdir [Mima ve ark., 2009].

Yamasaki ve ark. yaptığı çalışmada, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium bakterisinde bulunan AcrD atım pompasının aztreonam, karbesilin ve oksasilin gibi beta laktam antibiyotiklerine karşı direnç gelişimde rol oynadığını belirtmiştir [Yamasaki ve ark., 2011]. *Pseudomonas aeruginosa*'da RND tipi pompa proteinleri olan MexAB-OprM ve MexCD-OprJ aynı zamanda aztreonam ve florokinolonları substrat olarak kullanmaktadır [Vaez ve ark., 2016]. *Pseudomonas aureginosa*'da mexR genine IS21 insersiyon dizisinin yerleşmesi tikarsilin ve aztreonama karşı direncin oluşmasına neden olmaktadır [Boutoille ve ark., 2004].

Escherichia coli'de bulunan AcrAB-TolC'nin substrat profilinde beta laktam antibiyotiklere karşı ilginin olduğu belirtilmiştir. Aynı zamanda hidrofilik yapıda olan beta laktam antibiyotikleri porinlerde meydana gelen değişimler sonucu veya ekspresyon seviyelerinin azalması ile porinlerden geçemez ve bakteri bu antibiyotiklere karşı direnç oluşturur [Hasdemir, 2007].

Yabanıl tip suşta sefuroksim MİK değeri 800µg/ml iken MexAB-OprM delesyonu ile sefuroksim MİK değerinde 2 kat azalma (400µg/ml) görülmesine karşın ampC genini inaktivasyonu ile MİK değerinde bir değişikliğe neden olmamıştır (400 µg/ml). Fakat ikisinin delesyonu sonucu MİK değeri 0,2 µg/ml seviyesinde görülmüştür [Masuda ve ark., 1999]. Benzer başka bir çalışmada ise sefuroksim dirençli *Escherichia coli* izolatlarında atım pompa inhibitörü kullanılarak yapılan çalışmada, sefuroksim direncinin bu suşlarda direnç seviyesini azalttığı ve atım pompalarının bu dirençte önemli bir faktör olduğu belirtilmiştir [Kallman ve ark., 2003].

Çalışmamızda RND tip bir atım pompa proteini olan kexD ekspresyonunun aztreonama karşı dirençte anlamlı bir şekilde arttığı belirlenmiştir. Direncin oluşmasında beta laktamazların ve diğer direnç mekanizmalarının yanı sıra bu atım pompasının da etkisinin olduğunu düşünmekteyiz.

Çalışmamızda tekli yapıda olan kdeA, ketM ve kpnEF gen bölgelerinin dirençli ve duyarlı suşlarda ekspresyon oranlarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Tekli yapıdaki bu pompaların GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* suşlarında direnç gelişiminde bir etkisi olmadığı belirlendi.

MATE süperfamilya ailesinden olan kdeA geni taşıyan pESK32 vektörü alıcı *Escherichia coli* KAM32 suşunda siprofloksasin MİK değerinde 2 kat, kloramfenikol MİK değerinde 8 kat, norfloksasin MİK değerinde ise 2 kat artış tespit etmişlerdir [Ping ve ark., 2007].

Srinivasan ve ark. yaptıkları çalışmada, kpnEF geni susturulan mutant suşta seftazidim, siprofloksasin, tetrasiklin antibiyotiklerine karşı MİK değerlerinde azalma olup kloramfenikol, tobramisin ve vankomisin antibiyotiklerine karşı ise MİK değerlerinde herhangi bir değişikliğe rastlanılmamıştır [Srinivasan ve ark., 2013].

Ogawa ve ark. yaptıkları çalışmada, *Klebsiella pneumoniae*'de en son keşfedilen ketM pompa geninin alıcı *Escherichia coli* KAM32 vektör aracılığı ile aktarılmasıyla siprofloksasin, aztreonam ve sefotaksim MİK değerlerinde herhangi bir değişiklik görülmemiştir [Ogawa ve ark., 2015].

Tek komponentli atım pompaları iç membranda görev aldığından direncin oluşumunda daha az etkilidirler. Çünkü moleküller tek komponentli sistemde sadece periplazmik boşluğa atılabilir ve birçok antibiyotik lipofilik olduğundan iç membran tabakasından kolaylıkla tekrar hücre içine geçebilirler. Fakat RND tipi pompalar hücre içinde bulunana antibiyotiği tek bir yol ile direk hücre dışına pompalayabilirler. Buna karşın bazı çalışmalarda, tek pompa sistemlerinin sitoplazmadan antibiyotik yakalama özelliklerinin üçlü yapıdaki sistemlere göre daha iyi olduğu belirtilmiştir [Li ve ark., 2015].

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Son yıllarda artan antibiyotik kullanımı ile birlikte bilim insanlarının karşılaştığı en önemli sorunlardan birisi bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirmiş oldukları direnç mekanizmalarıdır. Enzimatik inaktivasyon en çok çalışılan direnç mekanizması olmasına karşın son yıllarda önemi gittikçe artan direnç mekanizmalarından birisi de bakterilerdeki atım pompa sistemleridir.

Bu çalışmada Eylül 2013-Temmuz 2015 tarihleri arasında 100 farklı hastanın çeşitli klinik örneklerinden izole edilen 100 GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatının çoklu ilaç direncinde rol alan *acrA*, *ketM*, *kdeA*, *kexD* ve *kpnEF* pompa genlerinin antibiyotik direncindeki etkinliklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

- Antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon testi ile incelenen izolatların %72'si seftazidime, %79'u aztreonama, %54'ü siprofloksasine, %32'si ertapeneme, %74'ü tobramisine, %65'i tetrasikline ve tamamı ampisilin, seftriakson ile sefotaksime dirençli bulunmuştur.
- *acrA*, *ketM*, *kdeA*, *kexD* ve *kpnEF* bölgelerinin transkripsiyon ürün seviyeleri gerçek zamanlı PZR ile belirlenmiştir. *acrA* gen ekspresyonu siprofloksasine duyarlı izolatlarda dirençlilere göre anlamlı bir şekilde artış göstermiştir. RND tip pompa proteini olan *kexD* gen ekspresyonunda tobramisine ve aztreonama dirençli izolatlarda duyarlılara göre anlamlı bir şekilde artışın olduğu belirlenmiştir.

Escherichia coli ve *Pseudomonas aureginosa* bu mekanizmanın araştırıldığı “rol model” organizmalar olsalar da atım pompalarının işleyişi ve antibiyotiklere karşı gösterdikleri etkiler sınırlı düzeyde araştırılmaktadır. Fakat gelişen yeni nesil sekanslama teknolojileri ve genom haritalamanın önceki yıllara göre daha az maliyetle gerçekleştirilmesi, atım pompalarının varlığının incelenmesinde önem taşımaktadır.

Klebsiella pneumoniae türünde son yıllarda yapılan genomik çalışmalar sonucunda yeni pompa genleri tespit edilmiştir. Fakat bu pompaların substrat özgüllüğü net olarak bilinmemektedir. Yapılacak gen susturma çalışmaları ile bu pompaların aktivitelerinin geniş çapta araştırılması sağlanabilir.

Beta laktam/inhibitör kombinasyonları kullanılarak beta laktamaz üreten bakterilerle mücadele edildiği gibi atım pompaları inhibisyonunda alternatif moleküler teknikler yardımıyla direncin önlenmesine hız kazandırılmalıdır. Ayrıca klinik anlamda direncin bu mekanizma ile oluştuğunun belirlenmesinde hızlı tanı kitlerinin geliştirilmesiyle, gelecekte daha etkin ilaç tedavilerine yönelik kullanılması beklenmektedir.

Günümüzde toksik etkilerinden dolayı klinik kullanımı olan bir pompa inhibitörünün olmaması, atım pompa inhibitörlerinin toksik etkisinin azaltılmış türevleri, yeni sentetik veya doğal maddelerin geliştirilmesine olanak sağlamaktadır ve bu yönde çalışmaların artmasının atım pompaları ile mücadelede fayda sağlayabilir.

Bakterilere özgü monoklonal antikorların geniş bir kısmının ticari olarak sağlanamaması, taşıyıcı proteinler olan atım pompalarının proteomik düzeyde çalışmasını sınırlandırmaktadır. Multidisipliner çalışmalarla, bu mekanizmanın aydınlatılması ve önlebilir hale gelmesinin son yıllarda artan antibiyotik direncinin önüne geçilmesine yardımcı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aathithan, S., French, G. L., “Prevalence and role of efflux pump activity in ciprofloxacin resistance in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*”, ***European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases***, 30 (6): 745-752 (2011).

Abbott, S. L., “*Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas* and other *Enterobacteriaceae*”, Manual of Clinical Microbiology 10th ed., edited by Versalovic, J., Carroll, K. and Funke, G., ***ASM Press***, Washington DC, 639-57 (2011).

Abiha, G. B., “*Enterobacteriaceae* klinik izolatlarında beta laktamaz aktivitesinin fenotipik ve genotipik yöntemlerle araştırılması”, Doktora Tezi, ***Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü***, Mersin, 1-2, 67, 69 (2013).

Ahmed, O. I., El-Hady, S. A., Ahmed, T. M., Ahmed, I. Z. “Detection of *bla*SHV and *bla*CTX-M genes in *Esbl* producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Egyptian patients with suspected nosocomial infections”, ***Egyptian Journal of Medical Human Genetics***, 14 (3): 277-283 (2013).

Akduman Alaşehir, E., Karadeniz, A., Balıkçı, A., Eren Topkaya, A., “Klinik örneklerinden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları”, ***Maltepe Tıp Dergisi***, 5 (3): 12-6 (2013).

Akhan, S., Hayran, M., “Hastane İnfeksiyonlarına Epidemiyolojik Bakış”, ***Hastane İnfeksiyonları Dergisi***, 1: 13-37 (1997).

Akman, S., “Klinik Örneklerden İzole Edilen *Klebsiella* Bakterilerinin İdentifikasyonu ve Enzimatik Aktivitesi”, Yüksek Lisans Tezi, ***Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Ankara, 50 (2008).

Aladağ, M. O., “Üriner Sistem Enfeksiyonlarından İzole Edilen *Klebsiella pneumoniae*’ların Bazı Antibiyotik Duyarlılıkları, Plazmid Profilleri ve ESBL Özelliğinin Araştırılması”, Doktora Tezi, ***Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü***, Konya, 12 (2006).

Alves, M. S., Dias, R. C., Dias de Castro, A. C., Riley, L. W., Moreira, B. M., “Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp”, ***Journal of clinical microbiology***, 44 (10): 3640-3646 (2006).

Anderson, K. L., “Is bacterial resistance to antibiotics an appropriate example of evolutionary change?”, ***Creation Research Society Quarterly***, 41 (4): 318-26 (2005).

Aydoğan, H., Başustaoğlu, A., “Nozokomiyal patojen olarak *Klebsiella* türlerinin mikrobiyolojik, klinik ve epidemiyolojik özellikleri”, ***Hastane İnfeksiyonları Dergisi***, 4: 135-143 (2000).

Aydın, R., “Hastane Enfeksiyonlarının Oluşumu, Önlenmesi ve El Hijyeni”, Yüksek Lisans Tezi, *Beypkent Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü*, İstanbul, 3 (2013).

Aygül, A., "Antibiyotik Direncinde Dışa Atım Sistemlerinin ve Dirençle Mücadelede Dışa Atım Pompa İnhibitörlerinin Önemi", *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(2): 278-291 (2015).

Bannerman, T.L., “Staphylococci and other catalase positive cocci that grow aerobically”, Manual of Clinical Microbiology 8th ed., edited by Murray, P. R., Baron, E. J., Jørgensen, J.H., *ASM Press*, Washington D.C., 384-404 (2003).

Barakzahi, M., Hormozi, B., Rashki, A., Rashki Ghalehnoo, Z., “Prevalence of extended spectrum β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* isolates in a teaching hospital of Zahedan City, Iran”, *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 1 (3): 22934 (2014).

Başustaoğlu, A., Özyurt, M., Beyan, C., Altun B., Aydoğan, H., Haznedaroğlu, T., Ünal, S. Yalçın, A., “Kan kültürlerinden izole edilen glikopeptid dirençli *Enterococcus faecium*”, *Flora Dergisi*, 5 (2): 142-147 (2000).

Bauernfeind, A., Hörl, G., “Novel R-factor borne β -lactamase of *Escherichia coli* conferring resistance to cephalosporins”, *Infection*, 15 (4): 257-259 (1987).

Bell, J. M., Turnidge, J. D., Gales, A. C., Pfaller, M. A., Jones, R. N. and Sentry APAC Study Group, “Prevalence of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998–99)”, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 42 (3): 193-198 (2002).

Bergogne-Berezin, E., Towner, K. J., “*Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features”, *Clinical Microbiology Reviews*, 9 (2): 148 (1996).

Bialek, S., Lavigne, J. P., Chevalier, J., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Davin, A., Nicolas-Chanoine, M. H., “Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (10): 4373-4378 (2010).

Bilgehan, H., “Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları 10th ed.”, *Barış Yayınları*, İzmir, 56-64 (2000).

Bilgin, Y., “*Escherichiae coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ve *Staphylococcus aureus* Suşlarında Çeşitli Aminoglikozidlerin Duyarlılıklarının Araştırılması”, Uzmanlık Tezi, *Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Bölümü*, İstanbul, 19 (2006).

Blair, J. M., Piddock, L. J., “Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in gram-negative bacteria: an update”, *Current Opinion in Microbiology*, 12 (5): 512-9 (2009).

Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., Martinez, J. L., “Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants”, *Microorganisms*, 4 (1): 14 (2016).

Blair, J. M., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., Piddock, L. J., “Molecular mechanisms of antibiotic resistance”, *Nature Reviews Microbiology*, 13 (1): 42-51 (2015).

Boucher, Y., Labbate, M., Koenig, J., Stokes, H. “Integrins: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria”, *Trends in Microbiology*, 15: 301-309 (2007).

Boutoille, D., Corvec, S., Caroff, N., Giraudeau, C., Espaze, E., Caillon, J., Reynaud, A., “Detection of an IS21 insertion sequence in the mexR gene of *Pseudomonas aeruginosa* increasing β -lactam resistance”, *FEMS Microbiology Letters*, 230 (1): 143-146 (2004).

Bradford, P., “Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat”, *Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4): 933-51 (2001).

Choi, J. Y., Soo Park, Y., Cho, C. H., Seon Park, Y., Shin, S. Y., Song, Y. G., Kim, J. M., “Synergic in-vitro activity of imipenem and sulbactam against *Acinetobacter baumannii*”, *Clinical Microbiology and Infection*, 10 (12): 1098-1101 (2004).

Chong, Y., Shimoda, S., Yakushiji, H., Ito, Y., Miyamoto, T., Kamimura, T., Akashi, K., “Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan”, *Journal of Medical Microbiology*, 62 (7): 1038-1043 (2013).

CLSI, “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement”, *Clinical and Laboratory Standards Institute*, M100-S24. Wayne, PA, USA, (2014).

Cohen, M. L., “Epidemiology of drug resistance: implications for a post-antimicrobial era”, *Science*, 257 (5073): 1050-1055 (1992).

Collis, C. M., Hall, R. M., “Gene cassettes from the insert region of integrins are excised as covalently closed circles”, *Molecular Microbiology*, 6: 2875-2885 (1992).

Collis, C. M., Hall RM., “Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrins”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 155-162 (1995).

Cookson, B. D., “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community: new battlefronts, or are the battles lost?”, *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 21 (06): 398-403 (2000).

Cormican, M. G., Marshall, S. A., Jones, R. N. “Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen”, *Journal of Clinical Microbiology*, 34 (8): 1880-1884 (1996).

Coşansu, S., Ayhan, K., “Enterohemorajik *Escherichia coli* O157: H7 ve fermente et ürünlerindeki önemi”, *Gıda Dergisi*, 25 (1): 33-38 (2000).

Çalgın, M. K., “*Mycobacterium tuberculosis* Suşlarında Eflüks Pompasını Oluşturan Gen Ekspresyonlarının Çoklu İlaç Direnç Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması”, Tıpta Uzmanlık Tezi, *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Ankara, 102 (2012).

Çakar, N., Tütüncü, A., “Yoğun bakım biriminde yatış sebepleri, invazif girişimler ve infeksiyon sorunu”, *Klinik Dergisi*, 9 (1): 3-5 (1996).

Çelik, Ü., Alhan, E., “Pediatrik enfeksiyonlarda zorlu patojen: Enterokoklar”, *Journal of Pediatric Infection*, 3 : 58-66 (2008).

Çiftçi, A., Aksoy, A., “Antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları”, *Türkiye Klinikleri Journal of Veterinary Sciences-Pharmacology and Toxicology-Special Topics*, 1 (2): 1-10 (2015).

Çiftçi, E., “Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi mikrobiyoloji laboratuvarında çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarındaki karbapenemaz varlığının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Isparta, 1, 5 (2015).

Çoban, A. Y., Bayram, Z., Sezgin, F. M., Durupinar, B., “Effect of efflux pump inhibitor 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine to MIC values of ciprofloxacin in ciprofloxacin resistant gram-negative bacteria”. *Mikrobiyoloji bulteni*, 43 (3): 457-461 (2009).

Dağlar, D., Öngüt, G., “Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve Tanı Yöntemleri”, *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1: 1-9 (2012).

Davies, J., Davies, D., “Origins and evolution of antibiotic resistance”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74 (3): 417-33 (2010).

Delialioğlu, N., Öcal, N. D., Emekdaş, G., “Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Türlerinde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Oranları”, *ANKEM Derg*, 19(2):84-87, (2005).

Derbentli, Ş., “Stafilokoklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası”, *ANKEM Dergisi*, 19 (2): 54-60 (2005).

Dijkshoorn, L., Nemec, A., Seifert, H., “An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*”, *Nature Reviews Microbiology*, 5 (12): 939-951 (2007).

Domenech-Sanchez, A., Martínez-Martínez, L., Hernández-Allés, S., del Carmen Conejo, M., Pascual, Á., Tomás, J. M., Benedí, V. J., “Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47 (10): 3332-3335 (2003).

Doğanay, M., “Hastane Enfeksiyonları El Kitabı”, Ankara, s:13-14 (2004).

Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., Jarlier, V., “Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide”, *Clinical Microbiology and Infection*, 14 (1): 90-103 (2008).

Duman, Y., Güçlüer, N., Serindağ, A., Tekerekoğlu, M. S., “*Escherichia coli* suşlarında antimikrobiyal duyarlılık ve genişlemiş spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) varlığı”, *Firat Tıp Dergisi*, 15 (4): 197-200 (2010).

Ducel, G., Fabry, J., Nicolle, L., “Prevention of hospital acquired infections: a practical guide 2th ed.”, *World Health Organization*, Geneva, (2002).

Dzidic, S., Suskovic J., Kos, B., “Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: biochemical and genetic aspect”, *Food Technol Biotechnol*, 46: 11-21 (2008).

Falagas, M. E., Karageorgopoulos, D. E., “Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms”, *Journal of Hospital Infection*, 73 (4): 345-354 (2009).

Farmer, J. J., “*Enterobacteriaceae*: Introduction and identification”, Manual of Clinical Microbiology 7th ed., edited by Murray, P. R., Baron, E. J., Tenover, F. C. and Tenover, R. H., *ASM Press*, Washington DC, 442-58 (1999).

Farmer, J. J., Boatwright, K. D., Janda, J. M., “*Enterobacteriaceae*: introduction and identification”, Manual of Clinical Microbiology 9th ed., edited by Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, H. J., Landry, M. L. and Tenover, F. C., *ASM Press*, Washington DC, 649–669 (2009).

Fernández, L., Hancock, R. E., “Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance”, *Clinical Microbiology Reviews*, 25 (4): 661-681 (2012).

Fishbain, J., Peleg, A. Y., “Treatment of acinetobacter infection”, *Clinical Infectious Diseases*, 51(1): 79-84 (2010).

Frieden, T. R., Munsiff, S. S., Williams, G., Faur, Y., Kreiswirth, B., Low, D. E., Eisner, W., “Emergence of vancomycin-resistant enterococci in New York City”, *The Lancet*, 342 (8863) :76-79 (1993).

Friedman, N. D., Kaye, K. S., Stout, J. E., McGarry, S. A., Trivette, S. L., Briggs, J. P., Lamm, W., Clark, C., MacFarquhar, J., Walton, A. L., Reller, L. B., Sexton, D. J., “Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections”, *Annals of Internal Medicine*, 137: 791-797 (2002).

Galas, M., Decousser, J. W., Breton, N., Godard, T., Allouch, P. Y., Pina, P. and Collège de Bactériologie Virologie Hygiène (ColBVH) Study Group, “Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in France”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52 (2): 786-789 (2008).

Galimand, M., Courvalin, P., Lambert, T., “Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in *Enterobacteriaceae* due to 16S rRNA methylation”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 2565–257 (2003).

Gatermann, S., Fünfstück, R., Handrick, W., Leitritz, L., Naber, K. G., Podbielski, A., “MIQ 02: Urinary Tract infections: quality standards for microbiological infections”, *München: Urban & Fischer*, 8-21 (2005).

Ghuysen, J.M., “Molecular structures of penicillin-binding proteins and betalactamases”, *Trends in Microbiology*, 2 (10): 372-80 (1994).

Giedraitiene, A., Vitkauskienė, A., Naginiene, R., Pavilonis, A., “Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria”, *Medicina (kaunas)*, 47 (3): 137-146 (2011).

Gonçalves, A. F., “Antibiotic resistance in gastrointestinal bacteria isolated from the Iberian lynx and Iberian wolf: species conservation and public health concerns”, PhD Thesis, *University of Trás-os-Montes and Alto Douro*, Íspanya, 23 (2015).

Gouby, A., Neuwirth, C., Bourg, G., Bouziges, N., Carles-Nurit, M. J., Despaux, E., Ramuz, M., “Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a geriatric hospital”, *Journal of Clinical Microbiology*, 32 (2): 301-305 (1994).

Göker, G., “Poliklinik Hastalarının Çeşitli Klinik Örneklerinden Etken Olarak İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Cinsi Bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması”, Uzmanlık Tezi, *İstanbul Üniversitesi Tıp Fakültesi*, İstanbul, 38 (2007).

Gözütok, F., Çelik, İ., Berk, E., Aydın, B., Güzel, D., “Hastane infeksiyonu etkeni *Acinetobacter baumannii* suşlarının antimikrobiyal direnç oranlarının araştırılması”, *Ankem Dergisi*, 27 (1): 7-12 (2013).

Grudmann, H., Aires-de-Sousa, M., Boyce, J., Tiemersma, E., “Emergence and resurgence of meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* as a public-health threat”, *The Lancet*, 368: 874-85 (2006).

Guardabassi, L., Peterson, A., Olsen, J., Dalsgaard, A., “Antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp. Isolated from sewers receiving waste effluent from hospital and a pharmaceutical plant”, *Applied and environmental Microbiology*, 64 (9): 3499-3502 (1998).

Gülay, Z., “Antimikrobiyal ilaçlara direnç”, Temel ve Klinik Mikrobiyoloji first ed., edited by Ustaçelebi, Ş., *Güneş Kitabevi*, Ankara, 91-112, (1999).

Gülay, Z., “ESBL’lerin tanı yöntemleri”, Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar: Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar, edited by Ünal, S., Vahaboğlu, H., Leblebicioğlu, H., Öztürk, R., and Köksal, İ., *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara, 13-26 (2004).

Gülay, Z., “Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci 2003-2004 Türkiye haritası”, *Ankem Dergisi*, 19 (2): 66-77 (2005).

Günaydın, M., Esen, Ş., Saniç, A., Leblebicioğlu, H., “Sterilizasyon Dezenfeksiyon ve Hastane İnfeksiyonları”, *Simad Yayınları*, Samsun, 193-198 (2002).

Gür, D., “Hastane infeksiyonu etkeni Gram negatif nonfermentatif basiller ve antibiyotiklere direnç sorunu”, *Hastane İnfeksiyon Dergisi*, 3 (1): 33-9 (1999).

Gür, D., Gülay, Z., Akan, A. Ö., Aktas, Z., Kayacan, Ç. B., Çakıcı, Ö., Eraç, B., Gültekin, M., Ögünç, D., Söyletir, G., Ünal, N., Uysal, S., “Türkiye’de hastane izolatu gram-negatif bakterilerde yeni beta-laktam antibiyotiklere direnç ve Gsbl tipleri: çok merkezli hitit surveyansının sonuçları”, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 42 (4): 537- 44 (2008).

Hacıseyitoğlu, D., Çağ, Y., Başgönül, S., Özer, S., “Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının antibiyotiklere direnç durumu”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 44 (3): 101-106 (2014).

Hall, M. R., Collis, M. C., “Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination”, *Molecular Microbiology*, 15 (4): 593-600 (1995).

Hancı, H., “Hasta Ziyaretleri için Hastaneye Gelen Kişilerin Ziyaret Öncesi ve Sonrası El Floralarının Karşılaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Erzurum, 22 (2010).

Hasdemir, U., “Çoklu ilaç direncinde bakteri hücre duvarı organizasyonunun ve aktif pompa sistemlerinin rolü”, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 41 (2): 309-327 (2007).

Hennequin, C., Robin, F., “Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*”, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 1-9 (2015).

Hirakata, Y., Srikumar, R., Poole, K., Gotoh, N., Suematsu, T., Kohno, S., Speert, D. P., “Multidrug efflux systems play an important role in the invasiveness of *Pseudomonas aeruginosa*”, *The Journal of Experimental Medicine*, 196 (1): 109-118 (2002).

Horan, T. C., Andrus, M., Dudeck, M. A., “CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting”, *American Journal of Infection Control*, 36 (5): 309-332 (2008).

Işık, F., “Kan kültürlerinden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz saptanmasında üç yöntemin karşılaştırılması ve antimikrobiyal duyarlılıklarının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi*, Konya, 6-7, 34, 38 (2007).

İnci, A. N., “Hastanemizde İzole Edilen *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta - Laktamazların Genotipik Tiplendirmesi”, Uzmanlık Tezi, *Firat Üniversitesi Tıp Fakültesi*, Elazığ, 49 (2008).

İnternet-1. http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Klebsiella_pneumoniae_mucoid.jpg Erişim Tarihi: 01 Mayıs 2016

Jacoby, G. A., Medeiros, A. A., “More extended spectrum beta-lactamases”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 35: 1697-1704 (1991).

Jernaes, M. W., Steen, H. B., “Staining of *Escherichia coli* for flow cytometry: influx and efflux of ethidium bromide”, *Cytometry*, 17(4), 302-309, (1994).

Kaçmaz, B., Çakır, Ö. F., Aksoy, A., “Hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* türlerinde genişlemiş spektrumlu betalaktamaz saptanması”, *Ankem Dergisi*, 19: 125-129 (2005).

Kaleli, İ., Demir, M., Cevahir, N., Yıldırım, U., “*Klebsiella* suşlarında siderefor ve serum direncinin araştırılması”, *İnfeksiyon Dergisi*, 20 (2): 97-101 (2006).

Karaayak Uzun, B., Güngör, S., Şerifhan İlgün, M., Özdemir, R., Baran, N., Yüksel Ergin, Ö., “Kan kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve in-vitro antibiyotiklere direnç paternleri”, *Ankem Dergisi*, 26 (4): 181-6 (2012).

Kallman, O., Fendukly, F., Karlsson, I., Kronvall, G., “Contribution of efflux to cefuroxime resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*”, *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 35 (8): 464-470 (2003).

Khanfar, H. S., Bindayna, K. M., Senok, A. C., Botta, G. A., “Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings”, *The Journal of Infection in Developing Countries*, 3 (04): 295-299 (2009).

Khosravi, A. D., Hoveizavi, H., Mehdinejad, M., “Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* Encoding Genes for Ctx-M-1, Tem-1 and Shv-1 Extended-Spectrum Beta Lactamases (ESBL) Enzymes in Clinical Specimens”, *Jundishapur Journal of Microbiology*, 6 (10): 8256 (2013).

Kılıç, E., “*Enterobacteriaceae* ailesinden gram negatif çomaklarda aminoglikozid direncinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniveritesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 3, 6-7, 18 (2013).

Kim, Y. H., Cha, C. J., Cerniglia, C. E., “Purification and characterization of an erythromycin esterase from an erythromycin-resistant *Pseudomonas* spp.”, *FEMS Microbiology Letters*, 210 (2): 239-244 (2002).

Kıraç, E., “Klinik Örneklerden İzole Edilen *Klebsiella* İzolatlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları”, Yüksek Lisans Tezi, *Afyon Kocatepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Afyon, 8 (2011).

Koçulu, S., “Esbl-Pozitif *Klebsiella pneumoniae* İnfeksiyonu Olan Hastaların Epidemiyolojik Özellikleri, Mortaliteye Etki Eden Risk Faktörleri Ve Uygulanan Tedavilerin Karşılaştırılması”, Uzmanlık Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, 1-2, 32 (2010).

Kock, R., Becker, K., Cookson, B., Van Gemert-Pijnen, J. E., Harbarth, S., Kluytmans, J., Tacconelli, E., “Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe”, *Eurosurveillance*, 15(41): 1-9. (2010).

Köhler, T., Pechère, J. C., Plesiat, P., “Bacterial antibiotic efflux systems of medical importance”, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 56 (9-10): 771-778 (1999).

Köksal, F., Sirekbasan, S., Ak, K., Küçükbasmacı, Ö., Samastı, M., “Kan kültürlerinden izole edilen genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz oluşturan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin prevalansı ve antimikrobiyal direnç patternleri”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 39 (1-2): 31-5 (2009).

Köse, Ş., Atalay, S., Ödemiş, İ., Adar, P., “Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları”, *ANKEM Dergisi*, 28 (3): 100-4 (2014).

Kumar, S., Singh, B. R., “An overview of mechanisms and emergence of antimicrobials drug resistance”, *Adv. Anim. Vet. Sci.*, 1 (2S): 7-14 (2013).

Kurutepe, S., Sürücüoğlu, S., Gazi, H., Teker, A., Özbakkaloğlu, B., “Metisiline dirençli ve duyarlı *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotiklere direnç oranları”, *İnfeksiyon Dergisi*, 21 (4): 187-91 (2007).

Kusum, M., Wongwanich, S., Dhiraputra, C., Pongpech, P., Naenna, P., “Occurrence of extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital, Thailand”, *Journal Medical Association of Thailand*, 87(9): 1029-1033 (2004).

Kuyucu, N., “Antibiyotik Direnci”, *Çocuk Enfeksiyon Dergisi Özel sayısı*, 1: 33-8 (2007).

Kvist, M., Hancock, V., Klemm, P., “Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation”, *Applied and Environmental Microbiology*, 74 (23): 7376-7382 (2008).

Lambert, P. A., “Mechanisms of antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95 (41): 22-6 (2002).

Lapierre, L., Cornejo, J., Borie, C., Toro, C., San Martín, B., “Genetic characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and class 2 integrons in commensal strains of *Escherichia coli* isolated from poultry and swine”, *Microbial Drug Resistance*, 14 (4): 265-272 (2008).

Lee, S. C., Huang, S. S., Lee, C. W., Fung, C. P., Lee, N., Shieh, W. B., Siu, L. K., “Comparative antimicrobial susceptibility of aerobic and facultative bacteria from community-acquired bacteremia to ertapenem in Taiwan”, *BMC Infectious Disease*, 7 (1): 79 (2007).

Leichert, L. I., “Proteomic methods unravel the protein quality control in *Escherichia coli*”, *Proteomics*, 11 (15): 3023-3035 (2011).

Levy, S. B., “The challenge of antibiotic resistance”, *Scientific American*, 278 (3): 46-53 (1998).

Li, D. W., Onishi, M., Kishino, T., Matsuo, T., Ogawa, W., Kuroda, T., Tsuchiya, T., “Properties and expression of a multidrug efflux pump AcrAB-KocC from *Klebsiella pneumoniae*”, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31(4), 577-582 (2008).

Li, X. Z., Nikaido, H., “Efflux-mediated drug resistance in bacteria”, *Drugs*, 64 (2): 159-204 (2004).

Liang, C., Xing, B., Yang, X., Fu, Y., Feng, Y., Zhang, Y., “Molecular epidemiology of aminoglycosides resistance on *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in China”, *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8 (1): 1381 (2015).

Livak, K. J., Schmittgen, T. D., “Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method”, *Methods*, 25(4): 402-408 (2001).

Lomovskaya, O., Zgurskaya, H. I., Totrov, M., Watkins, W. J., “Waltzing transporters and the dance macabre between humans and bacteria”, *Nature Reviews Drug Discovery*, 6 (1): 56-65 (2007).

Lowy, F. D., “*Staphylococcus aureus* infections”, *New England Journal of Medicine*, 33 (8): 520-532 (1998).

Lübbert, C., Straube, L., Stein, C., Makarewicz, O., Schubert, S., Mössner, J., Rodloff, A. C., “Colonization with extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in international travelers returning to Germany”, *International Journal of Medical Microbiology*, 305: (1), 148-156 (2015).

Ma, L., Lin, C. J., Chen, J. H., Fung, C. P., Chang, F. Y., Lai, Y. K., Taiwan Surveillance of Antimicrobial Resistance Project, “Widespread dissemination of aminoglycoside resistance genes *armA* and *rmtB* in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Taiwan producing CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53 (1): 104-111 (2009).

Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J., “Brock Biology of Microorganism. 9th ed.”, *Prentice Hall*, New Jersey, 290-337 (2000).

Magiorakos, AP., Srinivasan, A., Carey, RB., Carmeli, Y., Falagas, ME., Giske, CG., Harbarth, S., Hindler, JF., Kahlmeter, G., Olsson-Liljequist, B., Paterson, DL., Rice, LB., Stelling, J., Struelens, MJ., Vatopoulos, A., Weber, JT., Monnet, DL., “Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance”, *Clin Microbiol Infect*, 18: 268–81 (2012).

Mahillon, J., Chandler, M., “Insertion sequences”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 725-774 (1998).

Maranan, M. C., Moreira, B., Boyle-Vavra, S., Daum, R. S., “Antimicrobial resistance in staphylococci: epidemiology, molecular mechanisms and clinical relevance”, *Infectious Disease Clinics of North America*, 11 (4): 813-849 (1997).

Martinez-Martinez, L., Pascual, A., Garcia, I., Tran, J., Jacoby, G. A., “Interaction of plasmid and host quinolone resistance”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 1037-9 (2003).

Martins, M., Santos, B., Martins, A., Viveiros, M., Couto, I., Cruz, A., Amaral, L., “An instrument-free method for the demonstration of efflux pump activity of bacteria”, *In Vivo*, 20 (5): 657-664 (2006).

Marques, M. B., Brookings, E. S., Moser, S. A., Sonke, P. B., Waites, K. B., “Comparative in vitro antimicrobial susceptibilities of nosocomial isolates of *Acinetobacter baumannii* and synergistic activities of nine antimicrobial combinations”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41 (5): 881-885 (1997).

Masuda, N., Gotoh, N., Ishii, C., Sakagawa, E., Ohya, S., Nishino, T., “Interplay between Chromosomal β -Lactamase and the MexAB-OprM Efflux System in Intrinsic Resistance to β -Lactams in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (2): 400-402 (1999).

Mazzariol, A., Zuliani, J., Cornaglia, G., Rossolini, G. M., Fontana, R., “AcrAB efflux system: expression and contribution to fluoroquinolone resistance in *Klebsiella* spp”, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(12): 3984-3986 (2002).

McGeer, A. J., Low, D. E., “Vancomycin-resistant enterococci”, *Seminars in Respiratory Infections*, 15 (4): 314-26 (2000).

Mızrakçı, S. O., Arda, B., Erdem, H. A., Uyar, M., Tünger, A., Sipahi, O. R., Ulusoy, S., “Anesteziyoloji ve reanimasyon yoğun bakım ünitesinde GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* kolonizasyonu için risk faktörleri”, *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47 (2): 223-229 (2013).

Mima, T., Kohira, N., Li, Y., Sekiya, H., Ogawa, W., Kuroda, T., Tsuchiya, T., “Gene cloning and characteristics of the RND-type multidrug efflux pump MuxABC-OpmB possessing two RND components in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Microbiology*, 155 (11): 3509-3517 (2009).

Mohsen, S. M. Y., Hamzah, H. A., Al- Deen, M. M. I., Baharudin, R., “Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamase associated genes in Hospital Tengku Ampuan Afzan, Kuantan, Pahang”, *Malaysian Journal of Medical Sciences*, 23 (2): 14-20 (2016).

Murray, P. R., Rosenthal, K. S., Pfaller, M. A., “Medical microbiology”, *Elsevier Health Sciences*, 586-789 (2015).

Nagai, K., Davies, T. A., Jacobs, M. R., Appelbaum, P. C., “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 (2002).

Nicolle, L. E., “Uncomplicated urinary tract infection in adults including uncomplicated pyelonephritis”, *Urologic Clinics of North America*, 35: 1-12 (2008).

Nikaido, H., “Crossing the envelope; how cephalosporins reach their targets”, *Clinical Microbiology and Infection*, 6 (3): 22-6 (2000).

Nikaido, H., "Multidrug Resistance in Bacteria", *Annual Review of Biochemistry*, 78: 119-146 (2009).

Nishino, K., Latifi, T., Groisman, E. A., "Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium", *Molecular Microbiology*, 59 (1): 126-141 (2006).

Ogawa, W., Koterasawa, M., Kuroda, T., Tsuchiya, T., "KmrA multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29 (3): 550-553 (2006).

Ogawa, W., Onishi, M., Ni, R., Tsuchiya, T., Kuroda, T., "Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*", *Gene*, 498 (2): 177-182 (2012).

Ogawa, W., Minato, Y., Dodan, H., Onishi, M., Tsuchiya, T., Kuroda, T., "Characterization of MATE-type multidrug efflux pumps from *Klebsiella pneumoniae* MGH78578", *PloS One*, 10 (3): e0121619 (2015).

Omote, H., Hiasa, M., Matsumoto, T., Otsuka, M., Moriyama, Y., "The MATE proteins as fundamental transporters of metabolic and xenobiotic organic cations", *Trends in Pharmacological Sciences*, 27 (11): 587-593 (2006).

Özsoy, M. F., Öncül, O., Yıldırım, A., Pahsa, A., "Genişlemiş spektrumlu betalaktamazlar: Klinik önemi ve getirdiği sorunlar", *Flora*, 6 (Ek 1): 3-23 (2001).

Öztürk, R., "Antimikrobik ilaçlara karşı direnç gelişme mekanizmaları ve günümüzde direnç durumu: Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar", edited by Tabak, F., Öztürk, R. and Aktuğlu, Y., *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Sempozyum Dizisi*, İstanbul, 31: 83-100 (2002).

Padilla, E., Llobet, E., Domenech-Sanchez, A., Martinez-Martinez, L., Bengoechea, J. A., Alberti, S., "*Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump contributes to antimicrobial resistance and virulence", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54: 177-183 (2010).

Paixão, L., Rodrigues, L., Couto, I., Martins, M., Fernandes, P., De Carvalho, C. C., Viveiros, M., "Fluorometric determination of ethidium bromide efflux kinetics in *Escherichia coli*", *Journal of Biological Engineering*, 3 (1): 1 (2009).

Pakzad, I., Karin, M. Z., Taherikalani, M., Boustanshenas, M., Lari, A. R., "Contribution of AcrAB efflux pump to ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolated from burn patients", *GMS Hygiene and Infection Control*, 8(2) (2013).

Pao, S. S., Paulsen, I. T., Saier, M. H., “Major facilitator superfamily”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (1): 1-34 (1998).

Parlak, M., Çıkman, A., Bektaş, A., Berktaş, M., “*Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimi ve antibiyotiklere direnç: beş yıllık izlem”, *Sakarya Tıp Dergisi*, 2 (1): 11-15 (2012).

Paul, M., Benuri-Silbiger, I., Soares-Weiser, K., Leibovici, L., “ β lactam monotherapy versus β lactam-aminoglycoside combination therapy for sepsis in immunocompetent patients: systematic review and meta-analysis of randomised trials”, *British Medical Journal*, 328 (7441): 668 (2004).

Paulsen, I. T., Skurray, R. A., Tam, R., Saier, M. H., Turner, R. J., Weiner, J. H., Grinius, L. L., “The SMR family: a novel family of multidrug efflux proteins involved with the efflux of lipophilic drugs”, *Molecular Microbiology*, 19 (6): 1167-1175 (1996).

Pearson, A., “Historical and epidemiology of healthcare associated infection”, *Journal of Hospital Infection*, 73 (4): 296-304 (2009).

Peirano, G., Sang, J. H. K., Pitondo-Silva, A., Laupland, K. B., Pitout, J. D., “Molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* over a 10 year period in Calgary, Canada”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67 (5):1114-20 (2012).

Peleg, A. Y., Hooper, D. C., “Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria”, *New England Journal of Medicine*, 362 (19): 1804-1813 (2010).

Piddock, L. J., White, D. G., Gensberg, K., Pumbwe, L., Griggs, D. J., “Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44 (11): 3118-3121 (2000).

Perez, A., Poza, M., Fernández, A., del Carmen Fernández, M., Mallo, S., Merino, M., Bou, G., “Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (4): 2084-2090 (2012).

Phornphisutthimas, S., Thamchaipenet, A., Panijpan, B., “Conjugation in *Escherichia coli*”, *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 35 (6): 440-445 (2007).

Piddock, L. J., “Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria”, *Clinical Microbiology Reviews*, 19 (2): 382-402 (2006).

Ping, Y., Ogawa, W., Kuroda, T., Tsuchiya, T., "Gene cloning and characterization of KdeA, a multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*", *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30 (10): 1962-1964 (2007).

Podschun, R., Ullmann, U., "*Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors", *Clinical Microbiology Reviews*, 11 (4): 589-603 (1998).

Poole, K., "Multidrug efflux pumps and antimicrobial resistance in *P. aeruginosa* and related organisms", *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 3 (2): 255-64 (2001).

Poole, K., "Efflux-mediated antimicrobial resistance", *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56 (1): 20-51 (2005).

Putman, M., van Veen, H. W., Konings, W. N., "Molecular properties of bacterial multidrug transporters", *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64 (4): 672-693 (2000).

Rahim, K. A. A. A., Mohamed, A. M. A., "Prevalence of extended spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in clinical isolates", *Jundishapur journal of Microbiology*, 7 (11), (2014).

Rice, L. B., Sahm, D., Bonomo, R. A., "Mechanisms of resistance to antibacterial agents", edited by Murray, P. R., Baron, E. J., Jorgensen, J. H., Tenover, M. C. and Tenover, R. H., *Manual of Clinical Microbiology* 8th ed., *ASM Press*, Washington DC, 1074-1102 (2003).

Romero, L., Lopez, L., Rodríguez-Baño, J., Ramón Hernández, J., Martínez-Martínez, L., Pascual, A., "Long-term study of the frequency of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases", *Clinical Microbiology and Infection*, 11 (8): 625-631 (2005).

Ryan, B. M., Dougherty, T. J., Beaulieu, D., Chuang, J., Dougherty, B. A., Barrett, J. F., "Efflux in bacteria: what do we really know about it?", *Expert opinion on investigational drugs*, 10 (8): 1409-1422 (2001).

Saier Jr, M. H., Beatty, J. T., Goffeau, A., Harley, K. T., Heijne, W. H., Huang, S. C. and Pao, S. S., "The major facilitator superfamily", *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 1 (2): 257-279 (1999).

Sanchez, G. V., Master, R. N., Clark, R. B., Fyyaz, M., Duvvuri, P., Ekta, G., Bordon, J., "*Klebsiella pneumoniae* antimicrobial drug resistance, United States, 1998–2010", *Emerging Infectious Diseases Journal*, 19 (1): 133-6 (2013).

Sayıştay Raporu., "Hastane Enfeksiyonları ile Mücadele. Performans Denetim Raporu", *T.C. Sayıştay Başkanlığı*, Ankara, 31 (2007).

Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S. M. D., Kamal, M. A., “Risk factors for acquisition of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in North-Indian hospitals”, *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22 (1): 37-41 (2015).

Shin, J., Ko, K. S., “Comparative study of genotype and virulence in CTX-M-producing and non-extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (4): 2463-2467 (2014).

Sirot, D., “Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36 Suppl A : 19-34 (1995).

Smith, P. A., Romesberg, F. E., “Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation”, *Nature Chemical Biology*, 3 (9): 549-556 (2007).

Song, J. Y., Kee, S. Y., Hwang, I. S., Seo, Y. B., Jeong, H. W., Kim, W. J., Cheong, H. J., “In vitro activities of carbapenem/sulbactam combination, colistin, colistin/rifampicin combination and tigecycline against carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 60 (2): 317-322 (2007).

Spanu, T., Luzzaro, F., Perili, M., Amicosante, G., Toniolo, A., Fadda, G. and The Italian ESBL Study Group, “Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* in Italy implications for resistance to β -lactams and other antimicrobial drugs”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (1): 196-202 (2002).

Srinivasan, V. B., Rajamohan, G., “KpnEF, a new member of the *Klebsiella pneumoniae* cell envelope stress response regulon, is an SMR-type efflux pump involved in broad-spectrum antimicrobial resistance”, *Antimicrob Agents Chemother*, 57: 4449–4462 (2013).

Srinivasan, V. B., Singh, B. B., Priyadarshi, N., Chauhan, N. K., Rajamohan, G., “Role of novel multidrug efflux pump involved in drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*”, *PloS One*, 13:9 (5), e96288 (2014).

Sturm, P.D.J., Bochum, E.T.M., Mook Vermulst, S.V.M., Handgraaf, C., Klaassen, T., Melchers, W.J.G., “Prevalence, Molecular Characterization and Phenotypic Confirmation of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* at the Radboud University Nijmegen Medical Centre in The Netherlands”, *Microbial Drug Resistance*, 16 (1): 55-60 (2010).

Stürenburg, E., Mack, D., “Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control”, *Journal of Infection*, 47 (4): 273-95 (2003).

Sun, J., Deng, Z., Yan, A., “Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations”, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 453 (2): 254-267 (2014).

T.C. Resmi Gazete, “Yataklı Tedavi Kurumları Enfeksiyon Kontrol Yönetmeliği”, *T.C. Sağlık Bakanlığı*, 25903, 1 (2005).

Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., Hameed, S., “Multidrug resistance: an emerging crisis”, *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, 2014: 541340 (2014).

Tenover, F. C., Hughes, J. M., “The challenges of emerging infectious diseases: development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens”, *The Journal of the American Medical Association*, 275 (4): 300-304 (1996).

Thomson, K. S., Sanders, C. C., Moland, E. S., “Use of Microdilution Panels with and without β -Lactamase Inhibitors as a Phenotypic Test for β -Lactamase Production among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, and *Serratia marcescens*”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (6): 1393-1400 (1999).

Tükenmez-Tigen, E., Mülazımoğlu, L., “Toplum Kökenli İnfeksiyonlarda Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamazlar ve Klinik Önemi”, *Klinik Dergisi*, 25 (3): 94-8 (2012).

Tünger, Ö., “Vankomisine dirençli enterokok infeksiyonlarının tedavisinde eski ve yeni tedavi seçenekleri”, *Ankem Dergisi*, 26 (4): 215-227 (2012).

Töreci, K., “Hastane infeksiyonlarının tanımlanması, epidemiyolojisi ve ekonomik yönü”, *Ankem Dergisi*, 11 (2): 181-184 (1997).

Töreci, K., “*Enterobacteriaceae* Genel Özellikleri”, İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi, edited by Topçu, A., Söyletir, G. and Doğanay, M., *Nobel Tıp Kitabevleri*, İstanbul, 1555 (2002).

Ullah, F., Malik, S. A., Ahmed, J., “Antimicrobial susceptibility pattern and ESBL prevalence in *Klebsiella pneumoniae* from urinary tract infections in the North-West of Pakistan”, *African Journal of Microbiology Research*, 3 (11): 676-680 (2009).

Unat, K. E., “Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi: İnsanda Hastalık Yapan Bakteriler, Virüsler ve Bunlarla Oluşan İnfeksiyon Hastalıkları”, *Dergah Tıp Yayınları*, 607-609 (1987).

Uttley, A. H , Collins, C. H., Naidoo, J., George, R. C., “Vancomycin-resistant enterococci” , *Lancet*, 1: (8575–6), 57–58 (1988).

Uysal, U. Ş., “Kıyasal sular ve midyelerden izole edilen enterik bakterilerin antibiyotik direncinin moleküler karakterizasyonu”, Doktora Tezi, **İstanbul Üniversitesi Adli Tıp Enstitüsü**, İstanbul, 17 (2013).

Vaez, H., Faghri, J., Isfahani, B. N., Moghim, S., Yadegari, S., Fazeli, H., Safaei, H. G., “Efflux pump regulatory genes mutations in multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Isfahan hospitals”, **Advanced Biomedical Research**, 28(3): 117 (2014).

Van Bambeke, F., Balzi, E., Tulkens, P. M., “Antibiotic efflux pumps”, **Biochemical Pharmacology**, 60 (4): 457-470 (2000).

Van Bambeke, F., Lee, V. J. “Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux”, **Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery**, 1 (2): 157-175 (2006).

Vercauteren, E., Descheemaeker, P., IEven, M., Sanders, C. C., Goossens, H., “Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian Teaching Hospital”, **Journal of Clinical Microbiology**, 35 (9): 2191-2197 (1997).

Viveiros, M., Martins, A., Paixão, L., Rodrigues, L., Martins, M., Couto, I., Amaral, L., “Demonstration of intrinsic efflux activity of *Escherichia coli* K-12 AG100 by an automated ethidium bromide method”, **International Journal of Antimicrobial Agents**, 31 (5): 458-462 (2008).

Vural, T., Çekercioğlu, A. O., Ögünç, D., Gültekin, M., Çolak, D., YesHipek, A., Mutlu, G., “Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium* suşu”, **Ankem Dergisi**, 13 (1): 1-4 (1999).

Walsh, C., “Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance”, **Nature**, 406 (6797): 775-781 (2000).

Webber, M. A., Piddock, L. J. V., “The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance”, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 51 (1): 9-11 (2003).

Weinstein, R. A., “Nosocomial infection update”, **Emerging Infectious Diseases**, 4 (3): 416 (1998).

Weinstein, R. A., Hooper, D. C., “Efflux pumps and nosocomial antibiotic resistance: a primer for hospital epidemiologists”, **Clinical Infectious Diseases**, 40 (12): 1811-1817 (2005).

Yakupogulları, Y., Toraman, Z. A., Kizirgil, A., “Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten kan izolatu *Klebsiella* suslarına karşı beta-laktamaz inhibitörlü antibiyotiklerin in-vitro etkinliği”, **Ankem Dergisi**, 18 (2): 109-112 (2004).

Yamasaki, S., Nagasawa, S., Hayashi-Nishino, M., Yamaguchi, A., Nishino, K., “AcrA dependency of the AcrD efflux pump in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium”, *The Journal of Antibiotics*, 64 (6): 433-437 (2011).

Yan, J. J., Wu, J. J., Ko, W. C., Tsai, S. H., Chuang, C. L., Wu, H. M., Li, J. D., “Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54 (6): 1007-1012 (2004).

Yang, S., Clayton, S. R., Zechiedrich, E. L., “Relative contributions of the AcrAB, MdfA and NorE efflux pumps to quinolone resistance in *Escherichia coli*”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51 (3): 545-556 (2003).

Yedekçi, S., Eraç, B., Hoşgör-Limoncu, M., “Detection of the efflux pump-mediated quinolone resistance in ESBL positive *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates by phe-arg-e beta-naphthylamide”, *Turk J Pharm Sci*, 9 (1): 67-74 (2012).

Yılmaz, E., “Klinik örneklerden izole edilen *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzim varlığının PCR-RFLP yöntemi ile araştırılması”, Doktora Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 24-26, 47 (2009).

Yula, E., Deveci, Ö., İnci, M., Tekin, A., “Bir devlet hastanesinde intestinal parazit dağılımı ve etiyolojik analiz raporu”, *Journal of Clinical and Experimental Investigations*, 2 (1): 74-79 , (2011).

Yurtsever, S. G., Kurultay, N., Çeken, N., Yurtsever, Ş., Afşar, İ., Şener, A. G., Yılmaz, N., “Yara yeri örneklerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi”, *Ankem Dergisi*, 23 (1): 34-38 (2009).

Yüce, A., “Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmalar”, *Klimik Dergisi*, 14 (2): 41-46 (2001).

Zacharczuk, K., Piekarska, K., Szych, J., Jagielski, M., Hidalgo, L., San Millán, Á., Gierczynski, R., “Plasmid-borne 16S rRNA methylase ArmA in aminoglycoside-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Poland”, *Journal of Medical Microbiology*, 60 (9): 1306-1311 (2011).



EK-1. Etik Kurulu Onay Formu



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/ 4568

02.03.2015

Sayın : Doç. Dr. Tuba YILDIRIM

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Hastane kökenli Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) (+) *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında, çoklu ilaç direncine neden olan efluks pompasını kodlayan gen bölgelerinin belirlenmesi, başlıklı OMÜ KAİK 2014/711 Karar nolu Moleküler mikrobiyoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik Kurulu yönergesine göre incelenmiş etik açıdan bir sakınca olmadığına, çalışmanın süresi 6 ayı geçerse 6 aylık bildirimlerinin yapılmasına; çalışma tamamlandıktan sonra sonucunun tarafımıza en geç üç(3) ay içerisinde bildirilmesine 26.06.2014 tarihli Etik kurulumuzda oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Doç. Dr. A. Tevfik SÜNER
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, Adı : TÜRKEK, İbrahim

Uyruğu : T.C.

Doğum tarihi ve yeri : 28.01.1985, Samsun

Medeni hali : Bekar

Telefon : 0 (543) 415 41 04

e-mail : ibrahimturkel55@gmail.com

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Amasya Üniversitesi	Devam ediyor
Lisans	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	2011
Lise	Samsun Anadolu Lisesi	2003

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2012-2013	İmaretçioğlu Tıbbi Aletler	Biyolog

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

GSBL Pozitif *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında *acrA* ve *KdeA* Efluks Pompa Genlerinin Real Time PCR ile Belirlenmesi, 18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi, Konya, 2015

Hobiler

Basketbol, masa tenisi, bilgisayar oyunları, seyahat etmek