

T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜROPATOJEN *ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARININ  
BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEĞİNİN VE BİYOFİLMDE  
ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI**

Doğanhan Kadir ER

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü  
DOKTORA TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ  
2019



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÜROPATOJEN *ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARININ  
BİYOFİLM OLUŞTURMA YETENEĞİNİN VE BİYOFİLMDE  
ANTİBİYOTİK DUYARLILIĞININ ARAŞTIRILMASI**

**Doğanhan Kadir ER**

Kocaeli Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin  
Mikrobiyoloji Programı için Öngördüğü

**DOKTORA TEZİ**

Olarak Hazırlanmıştır.

Danışman: Prof. Dr. Devrim DÜNDAR

Destekleyen Kurum: TÜBİTAK 217S252  
Etik Kurul Onayı: KÜ GOKAEK 2017/165

KOCAELİ

2019

## KABUL VE ONAY

### SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ' NE

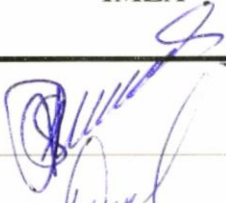
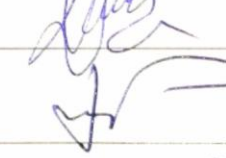
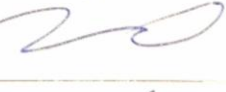



**Tez Adı:** Üropatojen *Escherichia coli* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin ve Biyofilmde Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması.

Tez Yazarı: Doğanhan Kadir ER

Tez Savunma Tarihi: 18.06.2019

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Devrim DÜNDAR

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Mikrobiyoloji Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		İMZA
ÜNVANI	ADI SOYADI	
BAŞKAN	Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ	
ÜYE (DANIŞMAN)	Prof. Dr. Devrim DÜNDAR	
ÜYE	Prof. Dr. Mustafa ALTINDIŞ	
ÜYE	Prof. Dr. Zerrin AKTAŞ	
ÜYE	Doç. Dr. Emel ERGÜL	
ÜYE	Doç. Dr. Lutfiye ÖKSÜZ	

### Onay

Yukarıdaki imzaların, adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

18.06/2019

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ  
KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



## ÖZET

### Üropatojen *Escherichia coli* İzolatlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin ve Biyofilimde Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması.

**Amaç:** *Escherichia coli* (*E. coli*), üriner sistem enfeksiyonlarında en sık karşılaşılan etkindir ve A, B1, B2 ve D olarak 4 temel filogenetik gruba ayrılmıştır. B2 filogenetik grubuna dahil olan ST131 klonal grubu, tedaviyi zorlaştırmakta ve rekürrense sebep olabilmektedir; buna sebep olan faktörlerden birisi, biyofilm oluşturabilme yeteneğidir. Farklı filogenetik ve klonal kökenlere sahip olan üropatojenik *E. coli* izolatlarının biyofilimdeki duyarlılıkları hakkında, literatürdeki veri çok kısıtlıdır. Çalışmanın amacı, üriner sistem enfeksiyonu etkeni olan, farklı filogenetik ve klonal kökenlere sahip *E. coli* izolatlarının biyofilm varlığında, sıklıkla kullanılan antimikrobiyallere karşı duyarlılığının belirlenmesidir.

**Yöntem:** Çalışmaya, A, B1, B2 ve D filogenetik gruplarından 10'ar ve ST131 klonal grubundan 39 olmak üzere, toplam 79 üropatojenik *E. coli* izolatı dahil edilmiştir. Bu izolatların amoksisilin/klavulonik asit, gentamisin, seftriakson, siprofloksasin, nitrofurantoin, trimetoprim/sulfametoksazole karşı minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) değerleri belirlenmiş ve filogenetik grup, ST131 pozitifliği ve direnç potansiyelleri arasındaki ilişkiler araştırılmıştır.

**Bulgular:** MİK değerlerine göre duyarlı olarak saptanan izolatların, biyofilm varlığında dirençli olabildiği gözlenmiştir. Bazı antibiyotikler için MBEK değerleri, MİK değerlerine göre 32000 kata kadar artış göstermiştir. MBEK sonuçları sınır değer tablolarına göre değerlendirildiğinde, dirençli bakteri sayısında 1,5-24,5 kat artış olduğu belirlenmiştir. ST131 izolatlarının MBEK değerleri, seftriakson ( $p=0,017$ ) ve siprofloksasin ( $p<0,001$ ) için ST131 dışı izolatlardan daha yüksektir. Nitrofurantoinine ait MİK değerleri, A filogenetik grubunda diğer gruplara göre daha yüksektir ( $p<0,001$ ). MBEK değerleri filogenetik gruplar ile karşılaştırıldığında, gentamisin ( $p=0,014$ ) ve nitrofurantoinde ( $p=0,011$ ) MBEK değerlerinin D filogenetik grubunda B2 filogenetik grubuna göre daha yüksek olduğu belirlenmiştir.

**Sonuç:** Üriner sistem enfeksiyonlarının gelişmesinde hem abiyotik yüzeylerdeki biyofilmin hem de hücre içi biyofilm benzeri bakteri topluluklarının etkisi bilinmektedir.

Rutin *in vitro* antimikrobiyal duyarlılık testleri, sadece planktonik hücrelere ait duyarlılığı belirleyebilmektedir; biyofilm varlığında antimikrobiyal duyarlılık hakkında fikir vermemektedir. Bu nedenle, MBEK testlerinin standardizasyonuna ihtiyaç duyulmaktadır. Üropatojenik *E. coli* üzerine nitrofurantoin, filogenetik grup ve pandemik klonal grup farketmeksizin hem biyofilm hem de planktonik bakteri üzerine en etkili antibiyotiktir.

**Anahtar Sözcükler:** *Escherichia coli*, üriner sistem enfeksiyonu, ST131, filogenetik grup, MBEK, MİK, biyofilm.



## ABSTRACT

### **Investigation of the Ability to Form Biofilm and Antibiotic Susceptibility of Biofilm Forming Uropathogenic *Escherichia coli*.**

**Objective:** *Escherichia coli* is the leading cause of urinary tract infections and has divided to 4 phylogenetic groups including A, B1, B2 and D. The clonal group B2-ST131 complicates the treatment and may cause recurrence; one of the factors causing this is biofilm-forming ability. The data about the susceptibility of uropathogenic *E. coli* (UPEC) with different phylogenetic and clonal origins in biofilm is limited. The aim of this study was to determine the susceptibility of *E. coli* isolates with different phylogenetic and clonal origins to the commonly used antimicrobial agents in the presence of biofilm.

**Method:** A total of 79 UPEC isolates, including 10 from each phylogenetic groups and 39 from the ST131, were included. The minimum inhibition concentration (MIC)s and the minimum biofilm eradication concentration (MBEC)s of the isolates against amoxicillin/clavulonic acid, ceftriaxone, ciprofloxacin, gentamicin, nitrofurantoin and trimethoprim/sulfamethoxazole were determined and the relationships between phylogenetic groups, ST131 status and resistance potentials were investigated.

**Results:** It was observed that the isolates detected as susceptible according to MICs, were resistant in the presence of biofilm. For some antibiotics, MBECs increased by 32000 times compared to MICs. When the MBECs were evaluated according to the susceptibility tables, it was determined that there was a 1.5-24.5 fold increase in the number of resistant bacteria. The MBECs of ST131 were higher for ceftriaxone ( $p=0.017$ ) and ciprofloxacin ( $p<0.001$ ) than non-ST131 isolates. MICs of nitrofurantoin are higher in the A phylogenetic group than in other phylogenetic groups ( $p<0.001$ ). When MBECs were compared with phylogenetic groups, it was determined that MBECs in gentamicin ( $p=0.014$ ) and nitrofurantoin ( $p=0.011$ ) were higher in D phylogenetic group than B2.

**Conclusions:** The effects of both biofilms on the abiotic surfaces and biofilm-like intracellular bacterial communities are well-known in the development of urinary tract infections. The susceptibility of the biofilm-formed organisms, could not accurately identified by routine *in vitro* susceptibility tests. Therefore, standardization of MBEC tests is needed. Nitrofurantoin may be the drug-of-choice due to its effect on both biofilm and

planctonic cells in the treatment of UPEC regardless of the phylogenetic groups or pandemic clonal group.

**Keywords:** *Escherichia coli*, urinary tract infection, ST131, phylogenetic group, MBEC, MIC, biofilm.





## TEŞEKKÜR

Danışman hocam Sayın Prof. Dr. Devrim DÜNDAR' a bana bu değerli çalışmada bulunma fırsatı verdiği, her basamağında anlayışla yaklaştığı ve hiçbir zaman esirgemediği desteği için minnettarım.

Tez İzleme Komitesi' nde bulunan Hocalarım Sayın Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ ve Doç. Dr. Emel ERGÜL' e her türlü destekleri ve bu tezin oluşmasına katkı sağlayan motive edici yaklaşımlarından dolayı çok teşekkür ederim.

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Hocalarım Sayın Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI, Prof. Dr. Aynur KARADENİZLİ, Prof. Dr. Fatma BUDAK, Prof. Dr. Zeki YUMUK, Prof. Dr. Gülden SÖNMEZ TAMER ve Dr. Öğretim Üyesi Erdener BALIKÇI' ya desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Sayın Prof. Dr. Canan BAYDEMİR' e istatistiksel analiz konusundaki desteği ve önerileri için teşekkür ederim.

Minnesota Üniversitesi US Veterans Medical Center Epidemiyoloji Direktörü Sayın Prof. Dr. James R. JOHNSON ve asistanı Dr. Brian JOHNSTON' a gönderdikleri pozitif kontrollerden dolayı teşekkür ederim.

Arş. Gör. Hüseyin UZUNER ve Agim OSMANİ başta olmak üzere, tüm laboratuvar arkadaşlarıma, anlayışları ve destekleri için teşekkür ederim.

Annem Pervin, babam Ünsel, ağabeyim Boğaç Han ve sevgili eşim Merve Sefa ER' e sonsuz desteklerinden, anlayışlarından ve sevgilerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu proje, Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından 217S252 proje numarasıyla desteklenmiştir.

## TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ

Tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, çizim, çizelge, ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimin herhangi bir yayından kısmen ya da tamamen aşırma olmadığını ve bir İntihal Programı kullanılarak test edildiğini beyan ederim.

28/06/2019  
Doğanhan Kadir ER

## İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
TEZİN AŞIRMA OLMADIĞI BİLDİRİSİ.....	ix
İÇİNDEKİLER.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
ÇİZİMLER DİZİNİ .....	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xv
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları .....	1
1.2. Ekstraintestinal Patojenik <i>E. coli</i> .....	2
1.2.1. Virülans ve Antimikrobiyal Duyarlılık .....	2
1.2.2. Filogenetik ve Klonal Gruplar .....	3
1.2.3. Patojeniz .....	4
1.3. Biyofilm ve Biyofilm Belirleme Yöntemleri .....	4
2. AMAÇ .....	13
3. YÖNTEM .....	15
3.1. Örnek Seçimi ve Etik Kurul Onayı .....	15
3.2. Tampon Çözeltilerin, Besiyerlerinin ve Ayraçların Hazırlanması .....	16
3.2.1. Eozin - Metilen Mavis (EMB) Agar Besiyeri.....	16
3.2.2. Gliserollü (%15) Tryptik Soy Broth (TSB) Besiyeri .....	16
3.2.3. Luria-Bertani (LB) Broth Besiyeri.....	16
3.2.4. Mueller-Hinton Broth (MHB) Besiyeri .....	16
3.2.5. Tryptik Soy Agar (TSA) Besiyeri .....	17
3.2.6. Tryptik Soy Broth (TSB) Besiyeri .....	17
3.2.7. Reaktif ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması.....	17
3.3. Biyofilm Deneyleri.....	19
3.3.1. Biyofilm Oluşturma Yönteminin Denenmesi .....	19
3.3.2. Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi .....	22
3.3.3. Plağın Tamamında Eşit Biyofilm Oluşumunun Araştırılması .....	25
3.3.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi .....	27

3.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	29
3.4.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirlenmesi .....	29
3.4.2. Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu Belirlenmesi .....	32
3.5. İstatistiksel Analiz .....	35
4. BULGULAR.....	37
4.1. Biyofilm Oluşturma Yöntemi Deneme Sonucu .....	37
4.2. Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi .....	38
4.3. Eşit Biyofilm Oluşumunun Araştırılması .....	39
4.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi .....	40
4.5. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu ve Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu Verilerinin Karşılaştırılması .....	46
5. TARTIŞMA .....	63
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	70
KAYNAKLAR.....	72
ÖZGEÇMİŞ.....	77
EKLER .....	82

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BaSO <sub>4</sub>	: Baryum Sülfat
BaCl <sub>2</sub>	: Baryum Klorid
CaCl <sub>2</sub>	: Kalsiyum Klorid
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	: Ekstraintestinal patojenik <i>E. coli</i>
EMB	: Eozin Metilen Mavisi
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu-β-Laktamaz
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	: Sülfirik Asit
KA-MHB	: Katyon Ayarlı Mueller Hinton Broth
KÜ GOKAEK	: Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
L	: Litre
MgCl <sub>2</sub>	: Magnezyum Klorid
MVCC	: Mean Viable Cell Count (Ortalama Canlı Hücre Sayısı)
µm	: Mikrometre
µM	: Mikromolar
ml	: Mililitre
mM	: Milimolar
MBEK	: Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
M	: Molar
MHA	: Mueller-Hinton Agar
MHB	: Mueller-Hinton Broth
nm	: Nanometre
NaOH	: Sodyum Hidroksit
PCR	: Polymerase Chain Reaction
rpm	: Revolutions Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)

ST131	: Sekans tip-131
TSA	: Triptik Soy Agar
TSB	: Triptik Soy Broth
UPEC	: Üropatojenik <i>E. coli</i>
ÜSE	: Üriner Sistem Enfeksiyonu
VCC	: Viable Cell Count (Canlı Hücre Sayısı)



## ÇİZİMLER DİZİNİ

Çizim 1.1. Üriner sistem enfeksiyonu patojenezi.....	5
Çizim 1.2. Biyofilm benzeri hücre içi toplulukların oluşum basamakları.....	9
Çizim 3.1. Pegleri içeren plak kapağı ve plağın yandan görünüşü. ....	20
Çizim 3.2. İnkübasyon sonrası plağın ve kapağın görüntüsü.....	21
Çizim 3.3. Ultrasonik banyo ve plağın yerleşimi. ....	24
Çizim 3.4. Dilüsyon plağı şeması.....	25
Çizim 3.5. TSA spot ekim plak şeması. ....	26
Çizim 3.6. Çalkalamalı etüvdeki inkübasyon basamağı.....	28
Çizim 3.7. Plakta üreme sonrası MBK deney protokolüne ait akış şeması. ....	35
Çizim 4.1. Boyanmış peglerin üstten ve yandan görüntüsü. ....	37
Çizim 4.2. Biyofilm canlı hücre kantitasyon ekimi.....	38
Çizim 4.3. Satırlara ait VCC değerleri. ....	39
Çizim 4.4. MBK plağına ait örnek görüntü.....	52

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Yaygın kullanılan biyofilm belirleme sistemleri.....	10
Çizelge 1.2. Biyofilm biyokütlesi, canlı hücre sayısı ve ekstrasellüler polimerik madde belirlenmesi için kullanılan yöntemler. ....	11
Çizelge 1.3. <i>In vitro</i> biyofilmin antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması .....	12
Çizelge 3.1. Reaktif ve tampon çözeltiler.....	18
Çizelge 3.2. Canlı hücre sayısı plak şeması.....	22
Çizelge 3.3. Çalışılan MİK aralıkları.....	31
Çizelge 3.4. Çalışılan MBEK aralıkları.....	32
Çizelge 4.1. Satırlarda eşit biyofilm oluşumu deneyine ait tanımlayıcı veriler. ....	40
Çizelge 4.2. Suşlara ait biyofilmdeki canlı hücrelerin kantitasyon verileri.....	41
Çizelge 4.3. ST131 ve ST131 dışı izolatların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları. ....	47
Çizelge 4.4. Suşlara ait MİK değerleri ve KA-MHB MBEK plağından elde edilen MİK değerleri.....	48
Çizelge 4.5. Suşlara ait MİK <sub>50</sub> , MİK <sub>90</sub> , MBEK <sub>50</sub> , MBEK <sub>90</sub> ve belirlenen aralık değerleri. 53	
Çizelge 4.6. Filogenetik gruplara ve ST131 klonal grubuna ait ortanca MİK ve MBEK verileri.....	53
Çizelge 4.7. MİK ve MBEK verilerine göre dirençli izolat sayıları ve yüzdeleri. ....	54
Çizelge 4.8. Antibiyotiklere ait MBEK/MİK oranları.....	55
Çizelge 4.9. İzolatlara ait MİK ve MBEK sonuçları. ....	56



# 1. GİRİŞ

## 1.1. Üriner Sistem Enfeksiyonları

Üriner sistem enfeksiyonları, yüksek morbidite ve mortaliteyle seyreden, toplum için önemli bir mali yüke sahip olan enfeksiyonların başında gelmektedir. Dünya geneline bakıldığında, her yıl 150 milyon kişiye üriner sistem enfeksiyonu tanısı konmaktadır. Dünya ekonomisine tahmini maliyeti 6 milyar doları geçmektedir (Gonzalez ve Schaeffer 1999, Foxman 2002). Ülkemizde, üriner sistem enfeksiyonu nedeniyle yılda yaklaşık 5 milyon reçete yazıldığı tahmin edilmektedir (Ozturk ve diğ. 2008).

Epidemiyolojik çalışmalar, dünya üzerindeki kadınların neredeyse yarısının hayatları boyunca en az bir kez üriner sistem enfeksiyonu geçirdiğini belirlemiştir. Kadınların erkeklere oranla daha sık üriner sistem enfeksiyonu geçirdiği bilinmektedir. Her üç kadından biri, yirmi dört yaşına kadar en az bir kez antibiyotik kullanımı gerektirecek bir üriner sistem enfeksiyonu geçirmektedir (Foxman 2002). Ayrıca, geçirilmiş üriner sistem enfeksiyonu öyküsü olan kişilerin rekürrense yatkın olduğu belirlenmiştir; başlangıç enfeksiyonunun ardından 6 ay içerisinde ikinci bir enfeksiyonun görülme sıklığı %20 - %50 arasındadır (Hannan ve diğ. 2010, Ikaheimo ve diğ. 1996, Foxman ve diğ. 2000).

Üriner sistem enfeksiyonlarında en sık izole edilen etken *Escherichia coli* (*E. coli*)'dir ve enfeksiyonların yaklaşık olarak %70 - %90'ında bu tür izole edilmektedir. *E. coli*, hastane kökenli üriner sistemi enfeksiyonlarda da sıklıkla belirlenmektedir; hastane enfeksiyonu olgularının ortalama %40'ı *E. coli*'ye bağlıdır (Brzuszkiewicz ve diğ. 2006).

Antimikrobiyal direnç üriner sistem enfeksiyonları için büyük bir sorun haline gelmiştir. Artan direnç, tedavi başarısızlıklarına sebep olmaktadır. Direncin üstesinden gelebilmek için farklı yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle enfeksiyon mekanizmalarının doğru bir biçimde anlaşılması, virülans faktörlerine veya biyofilm oluşumuna yönelik alternatif tedavi yöntemlerinin belirlenebilmesi için önem teşkil etmektedir.

Üriner sistem enfeksiyonlarında *E. coli*'nin hem kateter gibi abiyotik yüzeylerde biyofilm, hem de hücre içi biyofilm benzeri bakteri toplulukları oluşturmaya eğilimli olduğu bilinen bir durumdur (Kostakioti ve diğ. 2013, Flores-Mireles ve diğ. 2015, Price ve Chapman 2018). Günümüzde rutin laboratuvarında uygulanan antimikrobiyal duyarlılık belirleme yöntemleri, bakterilerin biyofilm oluşturmuş vaziyetteki duyarlılıklarını

belirlemede etkisiz kalmaktadır. *In vitro* antimikrobiyal duyarlılık ile *in vivo* duyarlılık, biyofilm varlığında çoğunlukla uyuşmamaktadır. Bu durumun sonucunda, enfeksiyon eradikasyonunda zorluklarla karşılaşmaktadır. Bu çalışma ile, *E. coli*' ye bağlı üriner sistem enfeksiyonlarında eradikasyonu engelleyen temel sebeplerden birisi olan biyofilm oluşumunun, antimikrobiyal duyarlılığa etkisinin belirlenmesi planlanmıştır.

## 1.2. Ekstraintestinal Patojenik *E. coli*

### 1.2.1. Virülans ve Antimikrobiyal Duyarlılık

İnsan gastrointestinal sistemi, doğumun ardından ilk birkaç saat içerisinde *E. coli* ile kolonize olmaya başlamaktadır. Çoğunlukla bakteri ve konak yıllar boyunca karşılıklı yarar sağlayacak "kommensal" biçimde hayatlarını sürdürmektedirler. Fakat kommensal *E. coli* izolatları dışında patojenik formlar da kolonizasyon oluşturabilmektedirler ve enfeksiyonlara sebep olabilirler. Günümüzde bu bakış açısıyla *E. coli*, kommensal, diyarejenik ve ekstraintestinal olarak farklı patotiplere ayrılabilir. Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) izolatları, gastrointestinal sistem dışındaki enfeksiyonlardan sorumlu tutulan izolatları içermektedir; tarihsel olarak üropatojenik *E. coli* (UPEC), sepsis ile ilişkili *E. coli* (SEPEC) ve yenidoğan menenjitisi ile ilişkili *E. coli* (NMEC) olarak sınıflanan farklı gruplar, toplu olarak ExPEC grubuna dahil edilmiştir (Russo ve Johnson 2000, Willes ve diğ. 2008).

ExPEC, çeşitli sayıda ve özellikle virülans faktörüne sahiptir. Bazı virülans faktörlerine sahip izolatların özellikle üriner sisteme spesifik enfeksiyonlar oluşturabilmesi nedeniyle, UPEC terimi ortaya çıkmıştır. Bu virülans faktörleri adezinler, toksinler, demir edinim mekanizmaları, protektinler, invazinler ve diğerleri olarak gruplanabilmektedir (Dale ve Woodford 2015).

Üropatojenik *E. coli*' nin enfeksiyonlarda virülans faktörleriyle başarılı olmasının yanında, antimikrobiyal direncinin yüksek olabilmesi sebebiyle, tedavi başarısızlıkları meydana gelebilmektedir (Can ve diğ. 2015). Buna bağlı olarak organizmanın yüksek direnç yeteneği sayesinde, ampirik tedavi seçiminde de zorluklar oluşmaktadır. Üriner sistem enfeksiyonlarının ampirik tedavisinde, Amerika Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (Infectious Diseases Society of America) ve Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases)' nin kılavuzları doğrultusunda komplike olmayan sistit tedavisinde önerilen antibiyotiklerin

başında nitrofurantoin, trimetoprim/sulfametoksazol, fosfomisin, florokinolonlar ve  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikler gelmektedir (Gupta ve diğ. 2011). Ülkemizde, amoksisilin/klavulonik asit, trimetoprim/sulfametoksazol ve siprofloksasin gibi ilk sıralarda tercih edilen antibiyotiklere karşı direnç, %40' lara kadar ulaşmıştır (Canbaz ve diğ. 2002, Arslan ve diğ. 2005, Aypak ve diğ. 2009).

### 1.2.2. Filogenetik ve Klonal Gruplar

Üriner sistem kökenli *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplandırması, izolata ait köken ve virülans genlerinin dağılımının belirlenmesi amacıyla kullanılmaktadır. *E. coli*, temel olarak 4 farklı filogenetik gruba ayrılmıştır. Bu gruplar, A, B1, B2 ve D olarak adlandırılmıştır. Sınıflandırma, tarihsel olarak multilokus enzim elektroforezi ve multilokus sekans tipleme ile gerçekleştirilmiştir. Günümüzde multilokus enzim elektroforezi ve multilokus sekans tipleme yöntemleri, yerini daha kolay ve ucuz olan çoklu polimeraz zincirleme tepkimesi (PZT) temelli yöntemlere bırakmıştır (Clermont ve diğ. 2015).

Çoklu PZT temelli yöntem, *chuA*, *yjaA* genleri ve TSPE4.C2 isimli DNA parçacığının varlıkları ve/veya yokluklarına göre izolatları filogenetik gruplara ayırabilmektedir. Bunun için, Clermont sınıflaması adı verilen bir dikotomöz karar ağacı kullanılmaktadır (Clermont ve diğ. 2000).

Filogenetik gruplar arasında genom büyüklükleri, virülans genlerini taşıma sıklıkları, ve antimikrobiyal duyarlılık açısından farklılıklar bulunduğu bilinmektedir (Gordon ve diğ. 2008). ExPEC' e bağlı üriner sistem enfeksiyonlarında klinik izolatlar, çoğunlukla B2 ve D filogenetik gruplarına dahildir. Kommensal *E. coli* izolatları ise A ve B1 filogenetik gruplarına yayılmıştır (Er ve diğ. 2015).

B2 filogenetik grubunda bulunan, kısaca sekans tip-131 (ST131) olarak adlandırılan klonal grubun enfeksiyon sıklığı giderek artmaktadır. Bu klonal grup, pandemik ve hipervirülan olarak tanımlanmaktadır. Ayrıca bu klonal grup çoğunlukla genişlemiş spektrumlu- $\beta$ -laktamaz aktivitesi ve çoklu ilaç direnciyle de ilişkilendirilmiştir (Rogers ve diğ. 2010, Er ve diğ. 2015). ST131' in üç karakteristik özelliği, bulunduğu serogrubu (O25b veya O16), filogenetik grubu (B2) ve multilokus sekans tiplemesi ile belirlenen sekans tipi (ST131) olarak bildirilmiştir (Rogers ve diğ. 2010). ST131 içerisinde O25b:H4 serotipi baskın olarak görülmektedir fakat O16:H5 olarak tanımlanan ve %1-%12 sıklığında görülen bir ST131 serotipi daha bulunmaktadır (Zhong ve diğ. 2015). Üriner

sistem enfeksiyonu oluşturma ve rekürrense sebep olabilme konularında bu klonal grubun başarısı, onu çalışılması gereken bir klonal grup haline getirmektedir.

ST131' in tanımlanmasında multilokus sekans tiplleme yöntemi haricinde, çoklu PZT temelli daha kolay yöntemler de kullanılabilir. B2 filogenetik grubuna dahil olduğu bilinen izolatlarda, *mdh* ve *gyrB* genlerindeki tek nükleotid polimorfizmine (SNP) ve O antijenine spesifik PZT ile ST131 tanısı koyulabilmektedir (Clermont ve diğ. 2007, Johnson ve diğ. 2009).

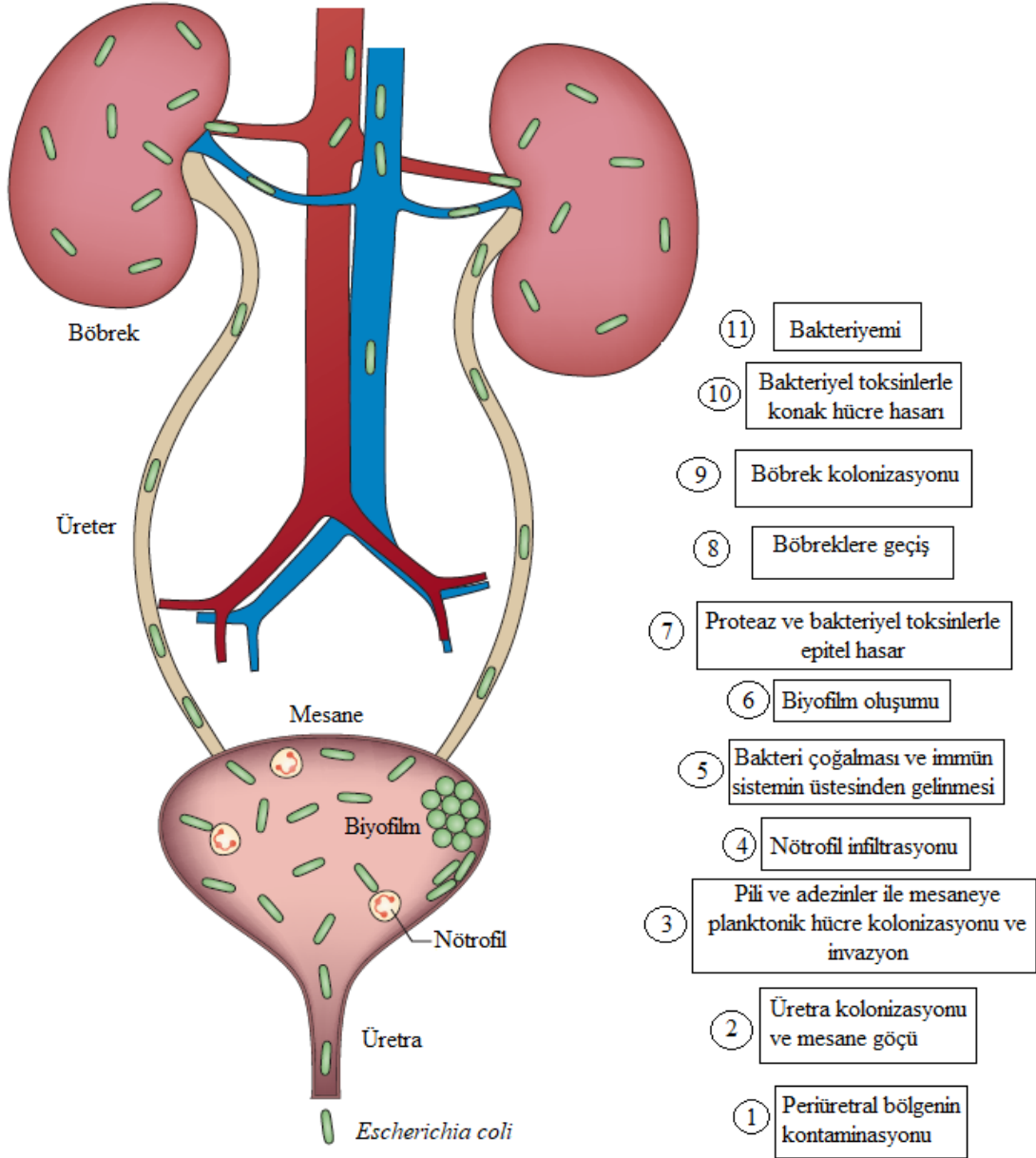
### 1.2.3. Patojenez

*E. coli*' ye bağlı üriner sistem enfeksiyonları, asemptomatik bakteriüriden sepsisin eşlik ettiği piyelonefrite kadar değişiklik gösteren klinik sendromları içermektedir. Enfeksiyon sadece alt üriner sistemde gerçekleşebildiği gibi hem alt hem de üst üriner sistemi kapsayabilmektedir (Sobel ve Kaye, 2009). *E. coli*' ye bağlı üriner sistem enfeksiyonlarının patojenezindeki basamaklar: (1) Periüretal bölgenin kontaminasyonu, (2) üretra kolonizasyonu ve mesane göçü, (3) pili ve adezinler ile mesaneye planktonik hücre kolonizasyonu ve invazyon, (4) nötrofil infiltrasyonu, (5) konak savunmasını atlatabilen hücrelerin çoğalması, (6) biyofilm oluşumu, (7) proteaz ve bakteriyel toksinlerle epitel hasarı, (8) böbreklere geçiş, (9) böbrek kolonizasyonu, (10) bakteriyel toksinlerle konak hücre hasarı ve (11) bakteriyemi olarak sınıflanabilir (Flores-Mireles ve diğ. 2015). *E. coli*' ye bağlı üriner sistem enfeksiyonu patogenezi, Çizim 1. 1.' de gösterilmiştir.

### 1. 3. Biyofilm ve Biyofilm Belirleme Yöntemleri

Ekstrasellüler DNA, ekstrasellüler polimerik maddeler olarak adlandırılan ekzopolisakkaritler, pili, flagella ve diğer adezinler ile bir çatı görevi görerek, "biyofilm" olarak adlandırılan multisellüler bakteriyel topluluklar oluşturulabilmektedir (Flores-Mireles ve diğ. 2015). Bakteriler tarafından oluşturulan bu çatı, "ekstrasellüler matriks" olarak tanımlanmıştır ve biyofilm biyokütlesinin yaklaşık %90' ını kapsayabilmektedir (Kostakioti ve diğ. 2013). Oluşturulan bu yapı, bakteriyel topluluğu -biyofilmi- immün yanıtta, antimikrobialardan ve diğer stres kaynaklarından korumaktadır. Biyofilm, quorum sensing regülasyon sistemleriyle düzenlenen kompleks hücre içi ve dışı sinyalizasyon ve iletişim proseslerinin sonucunda oluşabilmektedir (Flores-Mireles ve diğ. 2015).

Bakterilerin biyofilm oluşturması ve biyofilmin olgunlaşması, geri dđnüşümlü ve geri dđnüşümsüz çok sayıda basamağı kapsamaktadır. Bu basamakların işleyişi türler arasında farklılıklar gösterebilse de biyofilm oluşumuyla ilgili temel olarak 3 temel bölümden bahsetmek mümkündür; tutunma, olgunlaşma ve dağılma (Kostakioti ve diğ. 2013, Price ve Chapman 2018). İlk basamak bakterinin kısmen rastlantısal olarak bir



**Çizim 1.1.** Üriner sistem enfeksiyonu patojenezi. Flores - Mireles ve diğ (2015) 'den alınmıştır.

yüzeyle ulaşmasıdır. Gerçekleşen pasif hareketler, Brownian hareketi veya yerçekimi kuvvetleri tarafından yönetilmektedir. Bu pasif hareketler haricinde bakteriler, yüzeyler

boyunca karşılaşılan itici elektrostatik ve hidrodinamik kuvvetlerin üstesinden gelmelerini sağlayan ve dolayısıyla yüzeylerle etkileşime girme şanslarını arttıran aktif hareket mekanizmaları da geliştirmişlerdir (Donlan 2002, Beloin ve diğ. 2008, Kostakioti ve diğ. 2013). Mikroorganizma yüzeye temas kurduğunda, hücredeki adezinler vasıtasıyla tutunma gerçekleşir fakat bu "yapışma" mutlak değildir; dinamik ve geriye dönüşümlüdür. Bakteri, hidrodinamik kuvvetler vasıtasıyla veya bir besine ulaşım için planktonik popülasyona geri dönebilir (Dunne 2002, Wu ve Outten 2009). Geri dönüşümsüz tutunma, hidrodinamik kuvvetlerin üstesinden gelinerek sağlanabilmektedir. Özellikle UPEC izolatları için, tip I fimbria, curli olarak adlandırılan amiloid fiberler ve antijen 43' ün abiyotik yüzeylere geri dönüşümsüz tutunmayla ilişkisi bilinmektedir (Beloin ve diğ. 2008, Cegelski ve diğ. 2009, Kostakioti ve diğ. 2013). Tip I fimbria (D-mannoz spesifik adezin)' nin aktif kısmı olan FimH, UPEC izolatları için biyofilm başlangıcında en önemli proteindir. FimH proteini insan mesane epitel hücrelerinin invazyonuna ve üroplakin hücrelerine bağlanmada etkilidir (Busch ve Waksman 2012, Kostakioti ve diğ. 2013, Sihra ve diğ. 2018).

Bakterinin yüzeye kontağı, bazı genlerin ekspresyonu üzerinde değişiklikler yapmaktadır ve "biyofilm fenotipi" nin induksiyonu gerçekleşmektedir. Böylelikle, organizmanın sesil yaşamla ilişkili özellikle ekstrasellüler matriks ürünlerinin sentezi tetiklenmektedir (Mah ve O'Toole 2001, Otto ve Silhavy 2002, Beloin ve diğ. 2008, Bhomkar ve diğ. 2010). Bazı hücreler ise lizise uğrayarak yüzeyin ekstrasellüler DNA ile kaplanmasına yardımcı olur. Lizise uğramış hücreler ayrıca ilave bakteri tutunmasını tetiklerler (Price ve Chapman 2018). Patojenik *E. coli*' ye ait ekstrasellüler matriks yapısı tam olarak bilinmemektedir. Bilindiği kadarıyla biyofilmin olgunlaşması, curli gibi adezinleri, sellülozu, kolanik asiti ve poli- $\beta$ -1,6-N-asetil-D-glukozamini içeren koruyucu ekstrasellüler matriksin oluşmasına bağlıdır (Kostakioti ve diğ. 2013, Price ve Chapman 2018).

Olgun biyofilm içerisinde, aktif bir topluluktan bahsedilebilir. Bu topluluk biyofilm içerisindeki bakteriler için gerekli ürünleri paylaşmakta ve biyofilm mimarisinin sürdürülmesini sağlamaktadır. Biyofilm olgunlaştıkça, biyofilm içerisindeki bakterilerden bazıları persistan forma geçerek metabolik aktivitelerini sınırlayabilirler. Ayrıca bu dönemde dağılma bir seçenek haline gelebilir. Biyofilmin dağılması, kayma gerilimi gibi hidrodinamik parametreler ile meydana gelen pasif dağılma biçiminde gelişebilir (Karatan ve Watnick 2009). Ayrıca bakteriler çevresel değişiklikleri algılayarak biyofilm içinde kalmanın yararlı olmadığı durumlarda, planktonik forma geçişin sağlanabildiği yollar

geliştirmişlerdir. Biyofilmin dağılması; besin erişimindeki güçlük, oksijen dalgalanmaları, toksik ürünlerin artması ve diğer stres kaynakları sebebiyle gerçekleşir (Karatan ve Watnick 2009, Rowe ve diğ. 2010, Kostakioti ve diğ. 2013).

Biyofilm oluşturmuş bakteriler planktonik formlarıyla kıyaslandığında, birçok antimikrobiyal maddeye karşı yüksek oranda dirençli hale gelebilmektedir. Bu dirençlilik oranı, bazı antibiyotikler için 1000 katın üzerine çıkabilmektedir (Ceri ve diğ. 1999). Biyofilm oluşturmuş bakterinin planktonik hücrelere göre daha fazla dirençli olmalarının birçok nedeni bulunmaktadır. Bu temel nedenler; (1) ekstrasellüler matriksten dolayı antimikrobiyal maddenin difüzyonun kısıtlanması, (2) topluluk içerisinde direnç genlerinin aktarılabilmesi, (3) metal iyon konsantrasyonu ve pH değerlerine bağlı olarak eflüks pompalarının ekspresyonu ve antibiyotiklerin inaktivasyonu, (4) çevresel etkenler ve besin sınırlaması nedeniyle bakterilerin metabolik aktivite ve büyüme özellikleri gibi fizyolojik özelliklerinin değişimi, (5) biyofilm içerisinde metabolik özellikleri kısmen inaktif hale gelmiş ve bölünme eğiliminde olmayan persistan hücrelerin bulunması ve (6) biyofilm fenotipinin indüksiyonudur (Delcaru ve diğ. 2016).

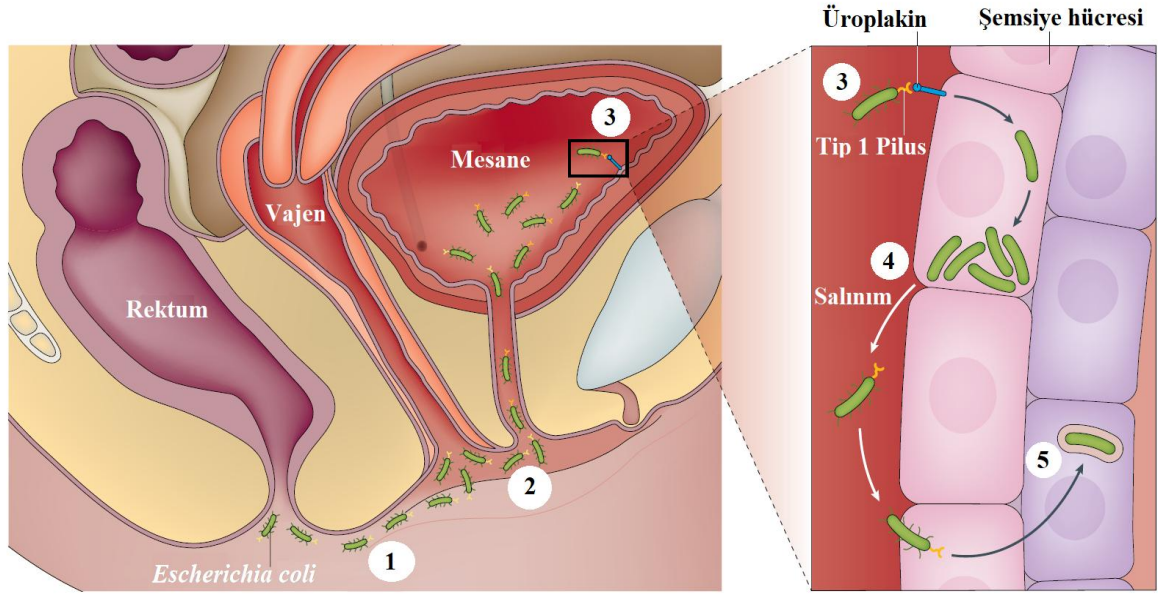
UPEC suşları, üriner kateter, böbrek veya mesane taşı gibi abiyotik yüzeylere bağlanarak ya da üriner sistemde fiziksel bir tıkanıklık bulunduğunda, hücre dışı bir biyofilm oluşturabilmektedir. Bunun haricinde, "biyofilm benzeri hücre içi bakteriyel topluluk" adı verilen ve belirli konak hücreleri içerisinde oluşan biyofilm benzeri yığınlar da söz konusudur (Flores-Mireles ve diğ. 2015).

Son yıllarda yapılan araştırmalar, hücre içerisine girmeden enfeksiyon oluşturduğu düşünülen birçok patojenin, konak hücresi içerisinde biyofilm benzeri bir yapı oluşturarak ve hücre içi yaşama adaptasyon sağlayarak persistan hale gelebildiğini göstermektedir (Kostakioti ve diğ. 2013). Bu yapı, "biyofilm benzeri hücre içi bakteriyel topluluk" olarak adlandırılmaktadır ve ilk olarak UPEC izolatlarında belirlenmiştir. Biyofilm benzeri hücre içi bakteriyel topluluk, özellikle enfeksiyonun akut fazında önem teşkil etmektedir (Mulvey ve diğ. 1998, Anderson ve diğ. 2003, Hannan ve diğ. 2010). Biyofilm benzeri hücre içi bakteriyel topluluk gelişimi, çeşitli morfolojik süreçlerden oluşmaktadır; gerçekleştirilen fare inokülasyonu deneylerinde, bu durum gözlemlenebilmiştir (Justice ve diğ. 2004, Kostakioti ve diğ. 2013). Mesane inokülasyonunun ardından ilk 6 saatte UPEC izolatı hızla (bölünme süresi 30-35 dakika) bölünme eğilimindedir ve mesanede gevşek bağlantılı basillerin küçük kümeleri oluşur. Bu durum erken hücre içi bakteriyel topluluk olarak adlandırılmaktadır (Justice ve diğ. 2004, Kostakioti ve diğ. 2013). UPEC izolatları, tip I fimbria ve muhtemelen diğer adezinler vasıtasıyla, şemsiye hücrelerinin yüzeyindeki

üroplakin reseptörlerine tutunmaktadırlar (Sihra ve diğ. 2018). Ardından, sıkı bir paket haline gelen ve ortalama 0,7 µm uzunluğunda kokoid hücrelerden oluşan kümeler meydana gelir. Altı-sekiz saat sonrasında, hücre bölünme süresi 60 dakikanın üzerine çıkarak dramatik bir şekilde yükselir. Bu aşamada bakteri sıkı bir şekilde paketlenmiştir ve hücre içinde olgunlaşmış hücre içi bakteriyel topluluğu içeren organize bir küre oluşturmuştur (Justice ve diğ. 2004, Kostakioti ve diğ. 2013). Enfekte bir mesanede hücre içi bakteri topluluklarının sayısı 3 ile 700 arasında değişebilmektedir. Her bir hücre içi bakteri topluluğu klonaldır ve  $10^4$  -  $10^5$  bakteriden oluşmaktadır (Anderson ve diğ. 2003, Schwartz ve diğ. 2011). Hücre içi bakteri toplulukları, abiyotik yüzey biyofilmindeki ekstrasellüler matrikse benzer bir yapıyı barındırmaktadır. Ekzopolisakkaritler, hücre içi biyofilm topluluğunu nötrofillerden korumak için bu ekstrasellüler matrikste bulunur (Anderson ve diğ. 2010).

Biyofilm benzeri hücre içi bakteri topluluğu genişledikçe, enfekte konak hücresinin membranını dışa doğru iterek ayak benzeri bir çıkıntı oluşmasına sebep olur (Anderson ve diğ. 2003). Bunun sonucunda hücre içi bakteri topluluğundaki UPEC, tek basiller veya filamentler halinde enfekte hücreden ayrılabilir ve naif epitel hücrelerine tekrar tutunabilir. Böylelikle, önceden enfekte olmamış bir epitel hücresin içerisine girerek-biyofilm benzeri hücre içi topluluğunun oluşumunu başlatabilir. Alternatif olarak, epitelin tekrar enfeksiyonu sonucu pasif hücre içi rezervuarlar oluşturulabilir. Pasif hücre içi rezervuarlar, 4-10 bakteriden oluşurlar. Bu rezervuarların içerisindeki bakteriler bölünmeme eğilimindedirler ve aylarca hücre içerisinde kalarak rekürrense sebep olabilmektedirler. Morfoloji değişikliği ile oluşan bu filamentöz hücreler, aynı zamanda nötrofillere karşı dayanıklılık sağlarlar (Flores-Mireles ve diğ. 2015). Biyofilm benzeri hücre içi bakteri topluluğunun, böyle mekanizmalarla kronik enfeksiyon gelişiminde önemli bir role sahip olduğu bilinmektedir (Hannan ve diğ. 2010). Biyofilm benzeri hücre içi bakteri topluluğunun, abiyotik yüzeylerde oluşan biyofilm konusunda da benzer özellikler gösterdiği ve çok benzer mekanizmalarla bakterinin antibiyotik direncini arttırdığı bilinmektedir (Flores-Mireles ve diğ. 2015). Biyofilm benzeri hücre içi bakteriyel topluluğun oluşum basamakları, Çizim 1. 2.' de gösterilmiştir.





**Çizim 1.2.** Biyofilm benzeri hücre içi toplulukların oluşum basamakları. Perianal bölgenin kolonizasyonu (1), mesaneye göç (2), üroplakine tutunma ve hücre içerisine giriş (3), bakteri çoğalması ve hücre içi bakteri topluluğunun oluşumu (4), filamentöz hücrelerin salgınımı, komşu hücrelerin invazyonu ile hücre içi bakteri topluluğunun enfekte edilen yeni hücrede oluşturulması veya aylarca canlı kalabilen pasif hücre içi rezervuarların oluşumu (5). Sihra ve diğ (2018)' den alınmıştır.

Biyofilmin belirlenebilmesi için çok sayıda sistem geliştirilmiştir. Besin aktarımına bağlı olarak, bu sistemler iki temel grup altında toplanmaktadır; kapalı (kesikli) ve açık (sürekli) sistemler (McBain 2009). Kapalı sistemler genel olarak daha basit ve uygulanabilirken, açık sistemler büyüme parametrelerinin ve dinamiklerinin daha iyi kontrol edilmesine olanak verebilmektedir (Lourenço ve diğ. 2014, Macia ve diğ. 2014). Kapalı sistemlere örnek olarak kuyucuk temelli mikropalaklar, peg çıkıntısı içeren kapaklar ile oluşturulan Calgary biofilm device ve biyofilm ring testi verilebilir. Açık sistemlerde ise CDC biyofilm reaktörü, akışkan-hücre çemberi, drip flow biyofilm reaktörü bulunmaktadır. Yöntemlerin birbirlerine karşı avantajları ve/veya dezavantajları bulunmakta, amaca uygun yöntemin seçilmesi önemlidir (Macia ve diğ. 2014, Azeredo ve diğ. 2017). Bu yöntemlerin bazıları, biyofilmde antimikrobiyal duyarlılığın belirlenebilmesi için kullanılabilir. Kapalı yöntemlerden kuyucuk temelli plaklar ve peg çıkıntısı içeren kapaklar ile açık yöntemlerden akışkan-hücre modeli ve suspended substratum reaktörü, antimikrobiyal duyarlılığın belirlenebildiği biyofilm yöntemlerine örnek olarak verilebilir (Macia ve diğ. 2014). Çizelge 1. 1.' de biyofilm belirleme sistemlerinden bazıları gösterilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Yaygın kullanılan biyofilm belirleme sistemleri.

Sistem Adı	Sistem Özelliği	Genel Uygulama Alanı
<b>Mikroplak Sistemi</b>	Kapalı	Biyofilm oluşturma kapasitesinin araştırılması, Antimikrobiyal duyarlılık
<b>Calgary biyofilm device</b>	Kapalı	Biyofilm oluşturma kapasitesinin araştırılması, Antimikrobiyal duyarlılık
<b>Biyofilm Ring Test</b>	Açık/Kapalı	Biyofilm oluşturma kapasitesinin araştırılması, Antimikrobiyal duyarlılık
<b>Drip Flow Biofilm Reactor</b>	Açık	Lamlarda düşük kayma gerilimi varlığında biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi ve kantifikasyonu
<b>Flow Chamber</b>	Açık	Sürekli taze besiyeri varlığında düşük sayılı biyofilmin belirlenmesi

Sistemlerde oluşturulan biyofilmin varlığının gösterilebilmesi için, farklı biyofilm belirleme yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler mikrobiyolojik, moleküler, fiziksel ve kimyasal yöntemler olarak tanımlanmıştır (Azeredo ve diğ. 2017). Özellikle antimikrobiyal duyarlılık belirlenmesinde biyofilmin canlılığını belirlemeye yönelik canlı hücre sayım yöntemleri ve metabolik aktivite belirlemeye yönelik kimyasal yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Biyofilm biyokütlesi, canlılığı ve ekstrasellüler polimerik madde ölçümü için kullanılan yöntemler, Çizelge 1. 2.' de gösterilmiştir.

Kuyu temelli mikroplak sistemlerinde, genel olarak metabolik aktiviteyi belirlemeye yönelik olan XTT (2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit) ve total biyokütleyi belirlemeye yönelik kristal viyole gibi boyama yöntemleri kullanılmaktadır (Sule ve diğ. 2009, Azeredo ve diğ. 2017). Peg çıkıntısı içeren plak kapağı sistemlerinde biyofilm yoğunluğu ise peg başına düşen canlı hücre sayısı vasıtasıyla belirlenmektedir (Harrison ve diğ. 2010, Azeredo ve diğ. 2017). Peg temelli yöntemler, alternatif mikroskopik ve boyama yöntemleriyle birleştirilebilmektedir (Harrison ve diğ. 2010). Çizelge 1. 3.' de *in vitro* biyofilmin antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması gösterilmiştir (Macia ve diğ. 2014).

**Çizelge 1.2.** Biyofilm biyokütlesi, canlı hücre sayısı ve ekstrasellüler polimerik madde belirlenmesi için kullanılan yöntemler.

<b>Yöntem</b>	<b>Ölçüm Özelliği</b>
<b>Mikrobiyolojik Yöntemler</b>	
Koloni Oluşturan Birim	Canlı hücre sayısı
<b>Moleküler Yöntemler</b>	
qPCR	Biyokütle
PMA-qPCR	Canlı hücre sayısı
<b>Fiziksel Yöntemler</b>	
Ağırlık	Biyokütle
Elektrokimyasal empedans spektroskopisi	Biyokütle
<b>Kimyasal Yöntemler</b>	
Biyokütle belirleme için mikroplak boyama	Biyokütle
Metabolik aktivite belirleme için mikroplak boyama	Canlı hücre sayısı
<b>EPM Ölçümü Yöntemleri</b>	
EPM ekstraksiyonu	
KTLM+FLBA	EPM belirlenmesi
Anti-EPM komponent antikorları	

qPCR, Kantitatif Polimeraz Zincirleme Tepkimesi; PMA, propidyum monoazid; EPM, ekstrasellüler polimerik madde; KTLM, konfokal taramalı lazer mikroskobisi; FLBA, floresan lektin bağlanma analizi.

**Çizelge 1.3.** *In vitro* biyofilmin antimikrobiyal duyarlılığının belirlenmesinde sıklıkla kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması. Macia ve diğ. (2014)' den alınmıştır.

Parametreler	Biyofilm Modeli			
	Mikroplak Yöntemi	Peg Temelli Kapak	Akışkan-Hücre Modeli	Suspended Substratum Reaktörü
<b>Besin Aktarımı</b>	Kapalı Sistem	Kapalı Sistem	Açık Sistem	Açık Sistem
<b>Biyofilm Oluşumu</b>	Kuyulara tutunma	Peg çıkıntılara tutunma	Cam yüzeye (lama) tutunma	Kuponlara tutunma
<b>Antibiyogram</b>	Kuyular antibiyotikle inkübe edilir Günlük besiyeri değişimi	Peg çıkıntılar antibiyotikle inkübe edilir Günlük besiyeri değişimi	Besiyeri şişesine eklenir ve istenilen süre akışta tutulur	Sıvı faza antibiyotik eklenir ve tüm kuponlar eş zamanlı olarak inkübe edilir
<b>Biyokütle/KOB Sayımı</b>	KV (veya XTT) boyama OD belirleme	Santrifüj veya sonikasyonla biyofilm aktarımı OD belirleme veya gözle değerlendirme Onar kat dilüsyon ve sayım	Boncuklarla yıkayarak biyofilm aktarımı Onar kat dilüsyon ve sayım	Vorteks veya sonikasyonla biyofilm aktarımı Onar kat dilüsyon vesayım
<b>Mikroskopik Analiz</b>	SEM Canlı/ölü hücre görüntüsü	SEM KTLM Boyama ve fiksasyon ihtiyacı olabilir	Floresan proteinle işaretli bakterinin görüntülenmesi	SEM KTLM Boyama ihtiyacı olabilir
<b>Yapısal Analiz</b>	Tanımlanmamıştır	Üç boyutlu görüntüleme ve canlı-ölü hücre görüntüsü	Özel yazılımla biyokütle, kalınlık, pürüzlülük analizleri	Üç boyutlu görüntüleme ve canlı-ölü hücre görüntüsü
<b>Karakteristik Özellikler</b>	Uygulanabilir ve tekrarlanabilir Kontaminasyon riski düşük Biyofilm kalınlığı <50µm	Uygulanabilir ve tekrarlanabilir Kontaminasyon riski çok düşük Biyofilm kalınlığı <50µm	Hücre yıkımı olmaksızın gerçek zamanlı görüntüleme Biyofilm kalınlığı >50µm	Biyofilmden ayrılan planktonik hücrelerin ve sessil hücrelerin eş zamanlı analizi
<b>Denenen Mikroorganizmalar</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Candida albicans</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>aeruginosa</i>	<i>aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>	<i>Candida spp.</i>
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Streptococcus spp.</i>	<i>spp.</i>	<i>Staphylococcus spp.</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Mycobacterium spp.</i>	<i>Candida spp.</i>	
		<i>Burkholderia spp.</i>		

KOB, koloni oluşturan birim; KV, kristal viyole; XTT, 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sulfofenil)-5-[(fenilamino)karbonil]-2H-tetrazolyum hidroksit; OD, optik dansite; SEM, taramalı elektron mikroskobu; KTLM, konfokal taramalı lazer mikrosobu.

## 2. AMAÇ

Günümüzde, *Escherichia coli* (*E. coli*)'ye bağlı üriner sistem enfeksiyonlarında rekürrense çok sık rastlanmaktadır. Bu nedenle, organizmanın virülansının belirlenmesine yönelik çok sayıda çalışma mevcuttur (Antao ve diğ. 2009, Banerjee ve diğ. 2013, Er ve diğ. 2015). Organizmaya ait yüksek direnç ve dolayısıyla tedavi başarısızlıklarının önüne geçebilmek için, biyofilm oluşum basamaklarını da içeren bazı spesifik virülans faktörlerine karşı, anti-virülans yaklaşımlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple oluşturulmuş çeşitli protein, bileşik ve bunun gibi ürünleri kapsayan anti-virülans ve anti-biyofilm maddeler mevcuttur (Pinkner ve diğ. 2006, Cegelski ve diğ. 2009, Roy ve diğ. 2018). Fakat bu maddelerden *E. coli*'ye bağlı üriner sistem enfeksiyonu tedavisinde, aktif olarak kullanılanı henüz bulunmamaktadır.

Anti-virülans yaklaşımlar umut vaat etmektedir fakat henüz klinikte kullanımının olmaması sebebiyle hastalar, mevcut antibiyotiklerle ve bunların kombinasyonlarıyla tedavi edilmeye çalışılmaktadır. Enfeksiyona sebep olan bakterinin antibiyotiklere karşı çoğunlukla dirençli olması sebebiyle, tedavi başarısızlıkları söz konusudur (Can ve diğ. 2015).

*E. coli* dışındaki bazı bakterilerle gerçekleştirilen ve hayvan modellerini kapsayan çalışmalar, bakterisidal aktivitesi olmayan ürünlerle biyofilmin hızlı bir biçimde yıkımının sepsis ve bakteriyemi gibi risklere sebep olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle, yakın gelecekte anti-biyofilm stratejiler geliştirilse dahi bu stratejilerin içinde belirli bir süre antibiyotik kombinasyonlarının olması gerektiği düşünülmektedir (Fleming ve Rumbaugh 2018).

Tedavi başarısızlıklarının bir diğer sebebi, rutin antimikrobiyal duyarlılık testlerinin, *in vivo* bakteriyi inhibe edecek gerçek değerini belirlemede yeterli olmama durumudur. Rutin *in vitro* duyarlılık testleri, sadece planktonik hücreye ait duyarlılık konsantrasyonlarını belirleyebilmektedir fakat *E. coli* ve diğer birçok bakteri, hücre içi biyofilm benzeri yapı ve biyofilm oluşturabilmektedir. Biyofilm oluşturmuş durumdaki bakterinin, planktonik hücreye göre çok daha fazla dirençli olduğu bilinen bir durumdur. Bu direnç, bazı antibiyotikler için 1000 katın üstüne çıkabilmektedir (Ceri ve diğ. 1999). Bu nedenle, rutin testlerle elde edilen minimum inhibisyon konsantrasyon değerlerine göre gerçekleştirilen tedaviyle bakteri eradike edilememektedir. Bu durumun üstesinden

gelebilmek için, rutine uyarlanabilen ve bakterinin minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonunu belirlemeye yönelik testler geliştirilmesi elzemdir.

Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu belirlemede, rutin laboratuvarda uygulaması en kolay sistemin, yüksek-verimli olarak tanımlanan Calgary biyofilm aracı olduğu düşünülmektedir. Calgary biyofilm aracı, plak kapağındaki pinlerde biyofilm üretiminin sağlandığı bir mikroplak sistemidir (Azeredo ve diğ. 2017). Her ne kadar tekniğin uygulanmasında zorluklar bulunsa da, yapılan çalışmalarla tekniğin rutine uygun bir biçimde optimize edilebilmesi muhtemeldir (Harrison ve diğ. 2010).

Çalışmamızın amacı, üriner sistem enfeksiyonu etkeni olarak tanımlanmış ve filogenetik grupları belirlenmiş *E. coli* izolatlarının minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının belirlenmesi ve bu verilerin minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleriyle kıyaslanmasıdır. Daha önceki bir çalışmada 4 temel filogenetik gruba (A, B1, B2 ve D) ayrılmış olan ve ayrıca bilinen en önemli pandemik dirençli klonlardan B2-ST131 olarak tanımlanmış olan *E. coli* izolatları çalışmaya alınmıştır. Çalışmamızda, bir plak ve peglere sahip bir plak kapağı sistemi kullanılacaktır. Böylelikle, ülkemizde sıklıkla tercih edilen ve/veya kullanımı uluslararası kılavuzlarca önerilen antibiyotiklerin, biyofilm üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

### 3. YÖNTEM

#### 3.1. Örnek Seçimi ve Etik Kurul Onayı

Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu' na "Etik Kurul Onayı" için başvurulmuştur. KÜ GOKAEK 2017/165 proje numarasıyla ve KÜ GOKAEK 2017/8.24 karar numarasıyla, çalışmanın gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığı kararı, 07.06.2017 tarihinde tarafımıza bildirilmiştir. Teze daha önceki bir projeden (TÜBİTAK 215S136 - Üriner Sistem Enfeksiyonu Etkeni Olan *Escherichia coli* İzolatlarında, ST131 Sekans Tipinin ve Alt Klonlarının Belirlenmesi) elde edilen semptomatik üriner sistem enfeksiyonu etkeni *E. coli* izolatları dahil edilmiştir.

Çalışmada, toplam 79 (39 ST131 ve 40 ST131 dışı *E. coli* izolatı) izolat kullanılmıştır. ST131 dışı *E. coli* izolatlarının 10 tanesi A, 10 tanesi B1, 10 tanesi B2 ve 10 tanesi D filogenetik grubuna dahildir. İzolatların filogenetik grupları ve ST131 durumu, daha önceki projede tanımlanmıştır; filogenetik gruplar, çoklu PCR kullanılarak belirlenmiştir (Clermont ve diğ. 2000, Er ve diğ. 2015). ST131 klonal grup tanımlaması ise iki farklı PCR temelli (ST131 ile ilişkili O25b ve O16 *rbf* varyantların saptanması için çoklu PCR ve *mdh* ve *gyr* genlerindeki tek nükleotid polimorfizmine (SNP) spesifik çoklu PCR) yöntemle gerçekleştirilmiştir (Clermont ve diğ. 2007, Johnson ve diğ. 2009, Er ve diğ. 2015).

İzolatlar, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı' ndan 01.12.2015 - 29.05.2016 tarihleri arasında toplanmıştır. İzolatların identifikasyonu, Vitek 2 (BioMérieux, Fransa) ve Vitek MS (BioMérieux, Fransa) sistemleri ile gerçekleştirilmiştir. DNA izolasyonu, filogenetik gruplama, ST131 klonal grubunun tanımlanması, minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) ve minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının (MBEK) araştırılması işlemleri, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı' nda gerçekleştirilmiştir. Örnekler, %15 gliserol içeren Triptik Soy Buyyon (TSB) (Merck, Almanya) besiyerinde - 80°C' de medikal tip dondurucuda (Sanyo, Japonya) saklanmışlardır.

## **3.2. Tampon Çözeltilerin, Besiyelerinin ve Ayraçların Hazırlanması**

### **3.2.1. Eozin - Metilen Mavisini (EMB) Agar Besiyeri**

EMB agar (Merck, Almanya), ticari olarak satın alınmıştır ve üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavla (Alp, Türkiye) steril edilmiştir, 45-50°C' ye kadar soğutulmuştur ve steril petri kutularına ~4mm kalınlıkta olacak şekilde aseptik şartlarda dökülmüştür. Plaklar oda sıcaklığında düz bir zeminde katılaşmaya bırakılmıştır. Petriler kullanılıncaya kadar +4°C' de buzdolabında (Arçelik, Türkiye) saklanmıştır.

### **3.2.2. Gliserollü (%15) Triptik Soy Broth (TSB) Besiyeri**

TSB, ticari olarak satın alınmıştır ve üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyerine eklenen su %15 eksik koyularak gliserol (Merck, Almanya) ile tamamlanmıştır. Besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavla steril edilmiştir. Steril hale gelmiş besiyeri, otomatik pipet (Eppendorf, Almanya) yardımıyla 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine ~1 ml olacak şekilde aseptik şartlarda dağıtılmıştır. Tüpler kullanılıncaya kadar +4°C' de buzdolabında saklanmıştır.

### **3.2.3. Luria-Bertani (LB) Broth Besiyeri**

LB Broth (Becton Dickinson, ABD) ticari olarak satın alınmıştır ve üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavla (Alp, Türkiye) steril edilmiştir. Steril hale gelmiş besiyeri, otomatik pipet yardımıyla 1.5 ml' lik mikrosantrifüj tüplerine ~1 ml olacak şekilde aseptik şartlarda dağıtılmıştır. Tüpler kullanılıncaya kadar +4°C' de buzdolabında saklanmıştır.

### **3.2.4. Mueller-Hinton Broth (MHB) Besiyeri**

MHB (Merck, Almanya) ticari olarak satın alınmıştır ve üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri eritildikten sonra, otomatik pipet (Eppendorf, Almanya) yardımıyla cam tüplere 5 ml olacak şekilde dağıtılmıştır ve ağızları pamukla



kapatılmıştır. Besiyelerini içeren tüpler 121 °C' de 15 dakika otoklavla steril edilmiştir. Tüpler kullanılıncaya kadar +4°C' de buzdolabında saklanmıştır.

Katyon ayarlı Mueller-Hinton Besiyeri (KA-MHB) ise Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri 121 °C' de 15 dakika otoklavla steril edilip 45-50°C' ye kadar soğutulmuştur. Önceden hazırlanan 10' ar mg/ml kalsiyum ve magnezyum çözeltileri aseptik şartlarda otomatik pipet kullanılarak besiyerine ilave edilmiştir. Besiyerinin kalsiyum son konsantrasyonu 22,5 mg/L ve magnezyum son konsantrasyonu 11,25 mg/L olacak şekilde ayarlanmıştır (CLSI 2006). KA-MHB besiyeri, MİK ve MBEK belirlemek için antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılmıştır. Besiyeri, kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır.

### **3.2.5. Triptik Soy Agar (TSA) Besiyeri**

TSA (Merck, Almanya), ticari olarak satın alınmıştır ve üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri 121°C' de 15 dakika otoklavla steril edilmiştir, 45-50°C' ye kadar soğutulmuştur ve steril petri kutularına ~4mm kalınlıkta olacak şekilde aseptik şartlarda dökülmüştür. Plaklar, oda sıcaklığında düz bir zeminde katılaşmaya bırakılmış ve petriker kullanılıncaya kadar +4°C' de buzdolabında saklanmıştır.

### **3.2.6. Triptik Soy Broth (TSB) Besiyeri**

TSB (Merck, Almanya) ticari olarak satın alınmıştır ve üreticinin tavsiyeleri doğrultusunda hazırlanmıştır. Besiyeri eritildikten sonra 121°C' de 15 dakika otoklavla steril edilmiştir. TSB besiyeri, bakteri biyofilm oluşturma deneyleri ve MBEK belirleme deneylerinde kullanılmıştır. Kullanım öncesi taze olarak hazırlanmıştır.

### **3.2.7. Reaktif ve Tampon Çözeltilerin Hazırlanması**

Deneylerde kullanılan reaktif ve tampon çözeltiler, Çizelge 3. 1.' de belirttikleri şekilde hazırlanmıştır.

**Çizelge 3.1.** Reaktif ve tampon çözeltiler.

<b>Reaktif veya Çözelti Adı</b>	<b>Konsantrasyonu ve Miktarı</b>	<b>Hazırlanışı</b>
0,5 McFarland Standardı	100 ml	0,18 mol/L H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> çözeltisinden 99,5 ml ve 0,048 mol/L BaCl <sub>2</sub> çözeltisinden 0,5 ml karıştırılmıştır. Spektrofotometre (Shimadzu, Japonya) ile 625 nm' de absorbansı okunmuştur.
Amoksisilin trihidrat	10 mg/ml	1 ml steril DMSO içerisinde 10 mg amoksisilin trihidrat çözülmüştür.
Ca <sup>++</sup>	10 mg/ml	3,68 g CaCl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O 100 ml suda çözülmüştür ve 0,2 µm' lik filtre ile steril edilmiştir.
Gentamisin sülfat	10 mg/ml	1 ml steril distile su içerisinde 10 mg gentamisin sülfat çözülmüştür.
Mg <sup>++</sup>	10 mg/ml	8,36 g MgCl <sub>2</sub> .6 H <sub>2</sub> O 100 ml suda çözülmüştür ve 0,2 µm' lik filtre ile steril edilmiştir.
Kristal Viyole Çözeltisi	%0,1	0,1 g kristal viyole tartılarak, 100 ml steril distile suda çözülmüştür.
Lityum klavulonat	10 mg/ml	1 ml Sodyum Fosfat (pH=6,0) içerisinde 10 mg lityum klavulonat çözülmüştür.
Nitrofurantoin	10 mg/ml	1 ml steril DMSO içerisinde 10 mg nitrofurantoin çözülmüştür.
Seftriakson sodyum	10 mg/ml	1 ml steril distile su içerisinde 10 mg seftriakson sodyum çözülmüştür.
Siprofloksasin	10 mg/ml	900 µl distile su içerisine 10 mg siprofloksasin eklenmiştir ve 0,1 M sodyum hidroksit çözeltisi damlatılarak çözülmüştür. Eksik kalan kısım steril distile su ile tamamlanmıştır.
Sodyum Fosfat Tamponu, pH 6,0	0,1 M	3,67 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O ve 11,91 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O tartılarak 800 ml distile suda çözülmüştür. pH ayarlanarak 1000 ml' ye distile suyla tamamlanmıştır ve 0,2 µm' lik filtre ile steril edilmiştir.

**Çizelge 3.1.** Rekatif ve tampon çözeltiler (devam).

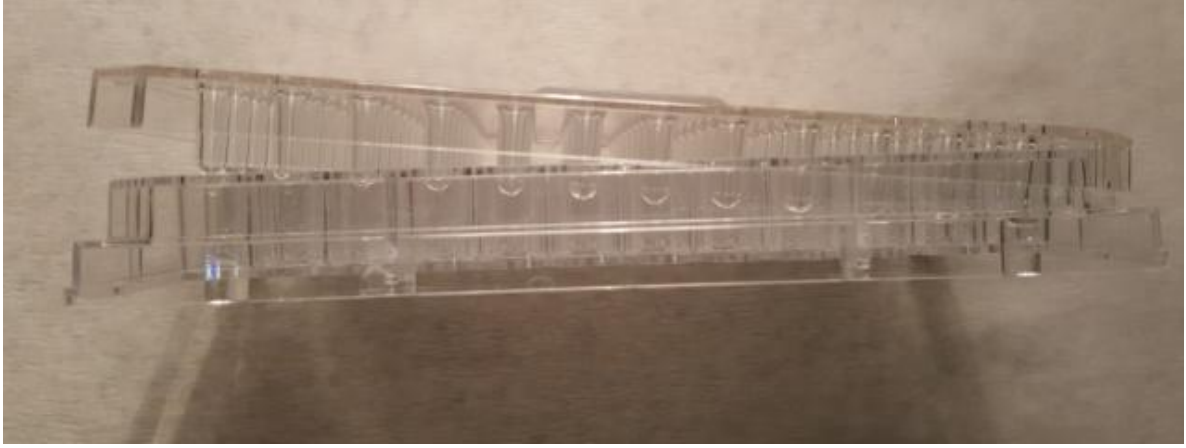
<b>Reaktif veya Çözelti Adı</b>	<b>Konsantrasyonu ve Miktarı</b>	<b>Hazırlanışı</b>
Sodyum Hidroksit	0,1 M	0,2 g sodyum hidroksit tartılarak 45 ml steril distile su içerisinde çözülmüştür. Steril distile su eklenerek 50 ml' ye tamamlanmıştır.
Sulfametoksazol	50 mg/ml	1 ml steril DMSO içerisinde 50 mg sulfametoksazol çözülmüştür.
Trimetoprim	10 mg/ml	1 ml steril DMSO içerisinde 10 mg trimetoprim çözülmüştür.

### **3.3. Biyofilm Deneyleri**

Çalışılacak örnekler, -80 °C' den çıkartılarak EMB agara aseptik şartlar altında tek koloni düşürme yöntemi ile pasajlanmışlardır. 37±2 °C' de 18±2 saat aerobik ortamda etüvde (Nüve, Türkiye) inkübe edilmiştir. Seçici besiyerinde gerçekleştirilen deneyler, bakterilerin biyofilm oluşturma özelliklerini etkileyebilmektedir (Harrison ve diğ. 2010). Bu nedenle, EMB Agar' da üreyen suşlardan TSA besiyerine tek koloni düşürme yöntemiyle ekim yapılmıştır ve 35±2 °C' de 18±2 saat aerobik ortamda etüvde inkübasyonun sonunda bu plaklardan biyofilm deneylerine geçilmiştir.

#### **3.3.1. Biyofilm Oluşturma Yönteminin Denenmesi**

Gerçekleştirilen biyofilm oluşturma ve biyofilmde antimikrobiyal duyarlılık araştırma deneyleri, ELISA plağı temellidir. Biyofilm oluşumu, 96 kuyucuklu Nunc MicroWell hücre kültürü plağında (Thermo Fisher Scientific, ABD) ve bu plağa uygun pegleri (çıkıntıları) içeren Nunc ImmunoTSP lid (Thermo Fisher Scientific, ABD) kapaklarla sağlanmıştır. (Harrison ve diğ. 2010). Kuyucuklara alınan belirli konsantrasyondaki planktonik bakterinin, plak kapağındaki peglere tutunarak biyofilm oluşturması beklenmektedir. Çizim 3. 1.' de pegleri içeren plak kapağı ve plağın yandan görünüşü gösterilmiştir.

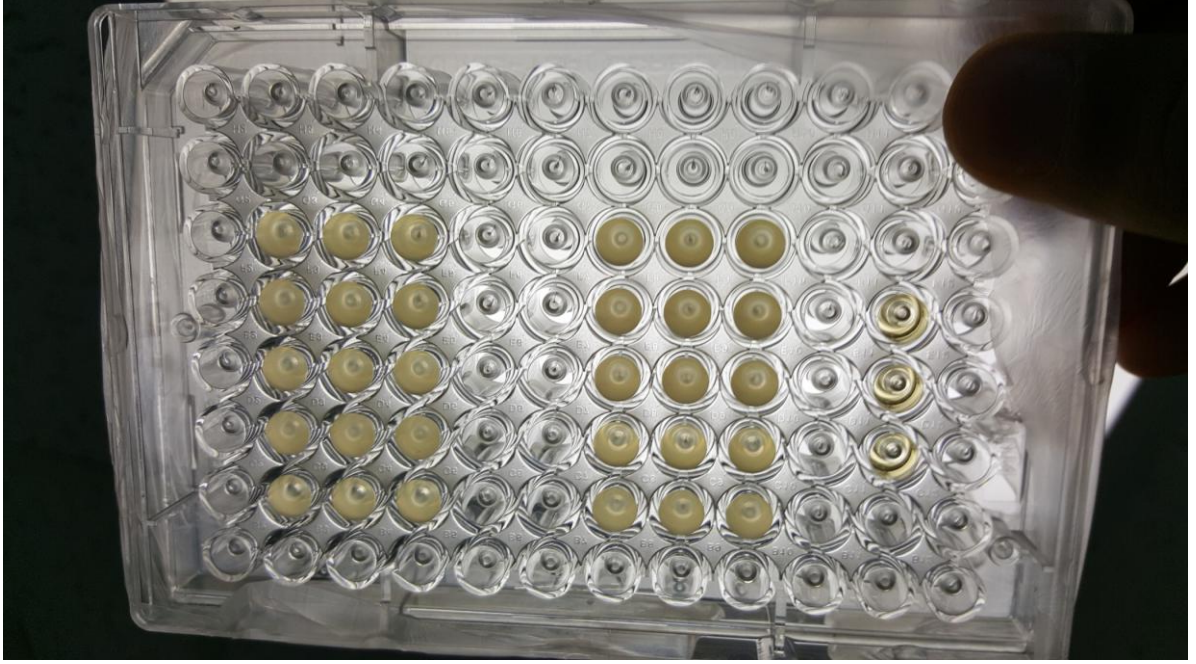


**Çizim 3.1.** Pegleri içeren plak kapağı ve plağın yandan görünüşü.

Biyofilm oluşumunun denenmesi için, öncelikle az sayıda fakat bütün grupları içeren örneklerle bir deney tasarlanmıştır. A grubundan 1 izolat, B1 grubundan 1 izolat, D grubundan 1 izolat, B2-ST131 dışı 1 izolat, ST131 klonal grubundan 4 izolat, kontrol için *E. coli* ATCC 25922 ve ST131 pozitif kontrol suşu olarak daha önceki bir çalışmada kullanılan MVA0004 suşunu içeren toplam 10 izolat ilk çalışmaya dahil edilmiştir (Er ve diğ. 2015). Gerçekleştirilen bu ilk çalışmanın amacı, mevcut sistemle biyofilm oluşumunun sağlanabilirliğini belirlemektir.

TSA besiyerine pasajlanan 10 farklı suş,  $35\pm 2$  °C' de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda inkübe edilmiştir. Her bir suş için steril tüpler içerisindeki serum fizyolojik ile 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır. McFarland standardı, Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda oluşturulmuştur (CLSI 2006). Hazırlanan süspansiyonların her birinden 1 ml alınarak, her bir suş için 29 ml TSB besiyeri içeren tüplere inoküle edilmiştir ve böylelikle 1:30 dilüsyon yapılmıştır. Bu tüplerden 150 µl çekilerek 96 kuyucuklu, düz tabanlı Nunc MicroWell hücre kültürü plağında 3 farklı kuyucuğa inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Sıvı hacmi olarak 150 µl tercih edilmesinin nedeni, sonraki basamaklarda çalkalama işleminin uygulanacak olmasıdır (Harrison ve diğ. 2010). Negatif kontrol amacıyla, bakteri inoküle edilmemiş 150 µl TSB besiyeri kullanılmıştır. Deneyde tek bir hücre kültür plağı kullanılmıştır. Bu plağın kapağı kaldırılmış ve daha sonraki çalışmalar için saklanmıştır. Plak kapağı olarak, biyofilmin oluşturulacağı pegleri içeren Nunc ImmunoTSP kapaklar kapatılmıştır ve etrafı parafilmle sarılmıştır. Plak,  $35\pm 2$  °C' de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda, 100 rpm' de orbital çalkalamalı etüvde (Labnet, ABD) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası plaktaki bulanıklık, Çizim 3. 2.' de gösterilmiştir.

İnkübasyon sonunda ayrı bir plak olarak yıkama plağı hazırlanmıştır. Yıkama plağı için, Nunc MicroWell hücre kültürü plağı kullanılmıştır. Yıkama tamponu olarak 200 µl steril serum fizyolojik kullanılmıştır. İnokulumların denk geldiği kuyucuklara, 200 µl yıkama tamponu ilave edilmiştir. Biyofilm oluşmuş plak kapağı aseptik şartlarda kaldırılarak yıkama plağı üzerine kapatılmıştır ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. Bu basamak ile peglerdeki planktonik hücrelerin uzaklaştırılarak sadece peglere tutunan bakterilerin kalması planlanmıştır (Harrison ve diğ. 2010).



**Çizim 3.2.** İnkübasyon sonrası plağın ve kapağın görüntüsü (görüntü plağın altından alınmıştır).

Ardından, peg üzerindeki biyofilmin boyanması için kristal viyole çözeltisi kullanılmıştır ve protokolda minör modifikasyonlar gerçekleştirilmiştir (O'Toole 2011). Bu işlemin amacı, elde edilen biyofilmin görsel olarak belirlenmesidir. On beş ml' lik steril bir falkon tüpte %0,1' lik kristal viyole çözeltisi hazırlanmıştır. Ayrı bir plak aseptik şartlarda açılarak biyofilmin oluşturulduğu ve negatif kontrolün bulunduğu ilgili kuyucuklara %0,1' lik kristal viyole çözeltisinden 200 µl eklenmiştir. Yıkama plağından aseptik şartlarda alınan plak kapağı, boya çözeltisi olan plağa kapatılmış ve oda sıcaklığında 15 dakika bekletilmiştir. Bir başka plak, ilgili kuyucuklara 200 µl steril serum fizyolojik eklenerek boya yıkama plağı olarak hazırlanmıştır. Boyada bekletilen plak kapağı bu plağa kapatılmıştır. Beş dakikalık oda sıcaklığında yıkama işleminin ardından, plak kapağı görsel olarak incelenmiştir.

### 3.3.2. Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi

Farklı izolatların aynı oranda biyofilm oluşturduğunu belirlemek için, biyofilm içerisindeki canlı hücre sayısının araştırılması gerekmektedir (Harrison ve diğ. 2010). Ayrıca optimum bir antimikrobiyal duyarlılık testi için, antimikrobiyal madde solüsyonu - bakteri oranını sabit bir hale getirerek korumak gerekmektedir. Bu gibi nedenlerle, mevcut deney ile farklı suşlara ait canlı hücre sayımının yapılması hedeflenmiştir.

Toplam 40 izolat (39 ST131 izolatı ve *E. coli* ATCC 25922 suşu), mevcut deneye dahil edilmiştir. *E. coli* ATCC 25922 suşu baştaki ve sondaki kuyucuklarda çalışılmıştır. Standart suş çift kuyucukta çalışılarak, sapma hakkında fikir elde edilmesi planlanmıştır. Negatif kontrol olarak boş TSB besiyeri kullanılmıştır. Toplamda 42 kuyucuk ilk sıradan itibaren dizilerek çalışılmıştır. Deneye ait plak şeması, Çizelge 3. 2.' de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Canlı hücre sayısı plak şeması. Her kuyucuk bir izolat numarasıyla numaralandırılmıştır.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ATCC	52	30	54	5	10	81	92	93	94	63	101
B	120	128	130	137	141	142	69	159	160	162	166	169
C	177	179	184	186	200	202	208	211	232	234	32	58
D	249	252	275	290	ATCC	NK						
E												
F												
G												
H												

ATCC, *E. coli* ATCC 25922; NK, negatif kontrol.

TSA besiyerine pasajlanan 40 farklı suş,  $35\pm 2$  °C' de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda etüvde inkübe edilmiştir. Her bir suş için steril tüpler içerisindeki serum fizyolojik ile 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyonların her birinden 0,1 ml alınarak, her bir suş için 2,9 ml TSB besiyeri içeren tüplere inoküle edilmiştir. Bu tüplerden 150 µl çekilerek hücre kültür plağına ilgili kuyucuklara inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol amacıyla, bakteri inoküle edilmemiş 150 µl TSB besiyeri inoküle edilmiştir. Bu plağın kapağı kaldırılmış ve daha sonraki çalışmalar için saklanmıştır. Plağa, pegleri içeren kapaklar kapatılmıştır ve etrafı parafilmle sarılmıştır.

Plak,  $35\pm 2$  °C' de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda ve 100 rpm' de orbital çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Deneyin gerçekleştirilen ikinci tekrarında, çalkalama hızı 115 rpm' e çıkarılmıştır. Diğer tekrarlarda da 115 rpm kullanılmıştır.

İnkübasyon sonunda farklı bir plağın ilgili kuyucuklarına 200 µl steril serum fizyolojik eklenerek bir yıkama plağı oluşturulmuştur. Yıkama plağının kapağı kaldırılarak, sonraki kısımlar için saklanmıştır. Biyofilm oluşturulmuş pegleri içeren plak kapağı, yıkama plağına alınarak 1 dakika süreyle oda sıcaklığında yıkamaya alınmıştır. Eş zamanlı olarak, başka bir plakta ilgili kuyucuklara 200 µl TSB besiyeri ilave edilmiştir. Yıkama işleminin sonunda plak kapağı kaldırılarak TSB içeren plağı kapatılmıştır. Etrafı parafilmle çevrilmiş ve 10 dakika ultrasonik banyoda (Branson, ABD) oda sıcaklığında sonikasyon işlemine alınmıştır (Ceri ve diğ. 1999, Harrison ve diğ. 2010). Sonikasyon işleminde, içerisine su girmeyen bir çelik tepsi (Branson, ABD) kullanılmıştır. Ultrasonik banyo, üreticinin önerileri doğrultusunda musluk suyu ile doldurulmuş ve çelik tepsi daldırılmıştır. Çelik tepsi içerisindeki plak, su seviyenin altında kalacak şekilde su yüksekliği ayarlanmıştır. Ultrasonik banyoda geçen 10 dakikalık süre, daha önceki çalışmalarda belirlenmiştir. Süreyi uzatmanın özellikle antimikrobiyal duyarlılık testi gerçekleştirildiği dönemde hücre hasarına sebep olabileceği düşünülmüştür (Ali ve diğ. 2006, Harrison ve diğ. 2010). Böylelikle, peglere tutunmuş biyofilmin, hücre yıkımı en aza indirilerek sıvı besiyerine aktarılması planlanmıştır (Ceri ve diğ. 1999, Harrison ve diğ. 2010). Çizim 3. 3.' de ultrasonik banyo işlemi gösterilmiştir.



**Çizim 3.3.** Ultrasonik banyo ve plağın yerleşimi.

Plak ultrasonik banyoda işlem görürken, steril plaklarda besiyeri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her suş için bir sütuna, 180 µl steril TSB besiyeri ilave edilmiştir. Böylelikle,  $10^{-1}$  ile  $10^{-8}$  arasında dilüsyonlar oluşturulacaktır. Örnek dilüsyon şeması, Çizim 3. 4.' de gösterilmiştir.

Sonikasyon işleminin ardından, biyofilmin döküldüğü plak aseptik şartlarda açılmıştır. Her izolat için ilgili kuyucuktan 20 µl bakteri süspansiyonu alınarak dilüsyon plağının ilgili ilk kuyucuğuna eklenmiştir. Çok kanallı otomatik pipet kullanılarak dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Her dilüsyonun sonunda, pipet ucu tıbbi atık kutusuna atılmış ve steril yeni uç takılmıştır. Buradaki amaç, dilüsyon hatasını en aza indirmektir. Son kuyucuklardan yani  $10^{-8}$  lik dilüsyondan çekilen süspansiyon tıbbi atık kutusuna atılmıştır.



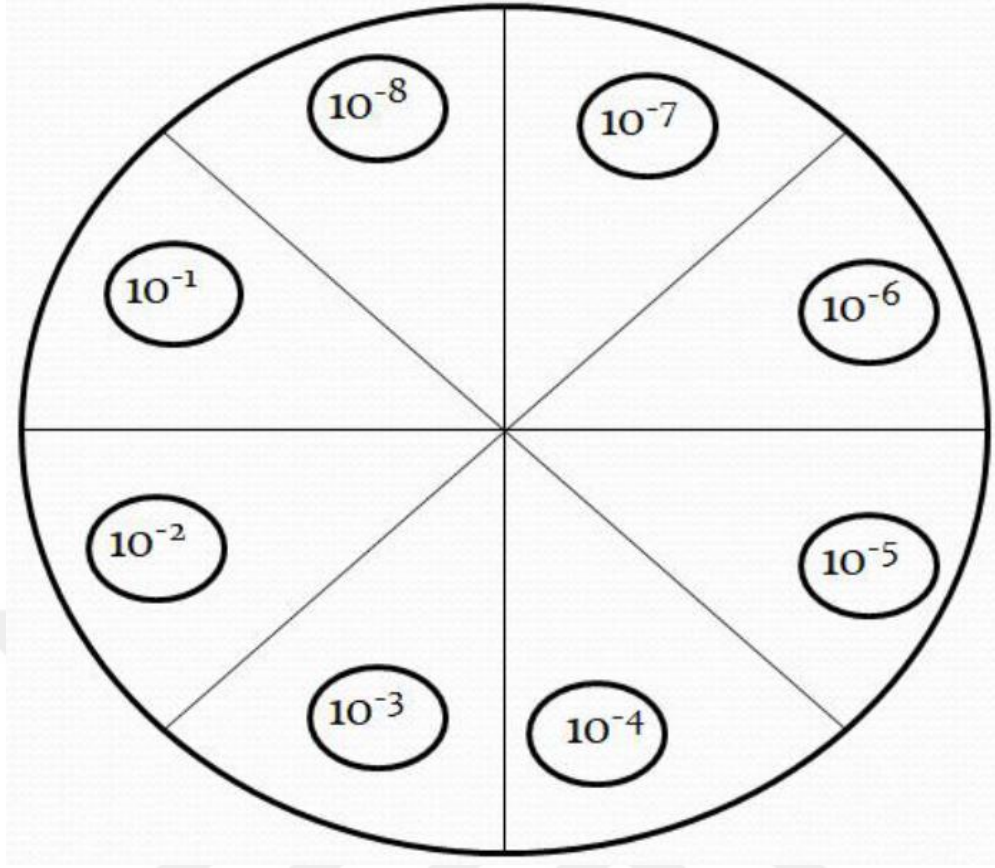
	1 (ATCC)	2 (52)	3 (30)	4 (54)	5 (5)	6 (10)	7 (81)	8 (92)	9 (93)	10 (94)	11 (63)	12 (101)
20µl	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>	180µl 10 <sup>-1</sup>
20µl	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>	180µl 10 <sup>-2</sup>
20µl	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>	180µl 10 <sup>-3</sup>
20µl	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>	180µl 10 <sup>-4</sup>
20µl	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>	180µl 10 <sup>-5</sup>
20µl	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>	180µl 10 <sup>-6</sup>
20µl	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>	180µl 10 <sup>-7</sup>
20µl	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>	180µl 10 <sup>-8</sup>

**Çizim 3.4.** Dilüsyon plağı şeması. Parantez içi numaralar, örnek izolat numaralarını göstermektedir.

Dilüsyon işleminin gerçekleştirilmesinin ardından, sekize bölünerek 10<sup>-1</sup>' den 10<sup>-8</sup>' e kadar numaralandırılmış TSA plaklarına ilgili dilüsyon kuyucuklarından 10' ar µl süspansiyon inoküle edilmiştir. Yapılan işlemin şeması, Çizim 3. 5.' de gösterilmiştir. İşlem, her suş için 1 TSA petri kutusu olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Spot ekim yapılmış TSA plakları, 35±2 °C' de 18±2 saat aerobik ortamda etüvde inkübe edilmiştir ve oluşan koloniler sayılmıştır. Koloni sayımında, sayılabilecek en düşük dilüsyondaki koloni sayısı değerlendirilmiştir. Yapılan deney sonucunda, standart hesaplamalar ile peg başına düşen canlı hücre sayısı (viable cell count - VCC) hesaplanmıştır (Ceri ve diğ. 1999, Harrison ve diğ. 2010).

### 3.3.3. Plağın Tamamında Eşit Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

Plağın tamamında eşit biyofilm oluşumunun araştırılması, MBK değerlerinin standardizasyonu için gerekmektedir. Bu durumun araştırılması amacıyla, steril bir plağın ilk iki kuyucuğu haricinde tamamına *E. coli* ATCC 25922 suşu inoküle edilmiştir. TSA besiyerine pasajlanan *E. coli* ATCC 25922 suşu, 35±2 °C' de 18±2 saat aerobik ortamda etüvde inkübe edilmiştir. Serum fizyolojik ile 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan 0,5 ml alınarak, 14,5 ml TSB besiyeri içeren tüpe inoküle edilmiştir. Bu tüpten 150 µl çekilerek hücre kültür plağına ilgili kuyucuklara



**Çizim 3.5.** TSA spot ekim plak şeması.

inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol amacıyla, son iki kuyucuğa bakteri inoküle edilmemiş, 150 µl TSB besiyeri eklenmiştir. Bu plağın kapağı kaldırılmış ve daha sonraki çalışmalar için saklanmıştır. Plağa, pegleri içeren kapaklar kapatılmıştır ve etrafı parafilmle sarılmıştır. Plak,  $35\pm 2$  °C' de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda ve 115 rpm' de orbital çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda farklı bir plağın ilgili kuyucuklarına 200 µl steril serum fizyolojik eklenerek bir yıkama plağı oluşturulmuştur. Yıkama plağının kapağı kaldırılarak, sonraki kısımlar için saklanmıştır. Biyofilm oluşturulmuş pegleri içeren plak kapağı, yıkama plağına alınarak 1 dakika süreyle oda sıcaklığında yıkamaya alınmıştır. Eş zamanlı olarak, başka bir plakta ilgili kuyucuklara 200 µl TSB besiyeri ilave edilmiştir. Yıkama işleminin sonunda plak kapağı kaldırılarak TSB içeren plağa kapatılmıştır. Etrafı parafilmle çevrilmiş ve 10 dakika ultrasonik banyoda oda sıcaklığında daha önce anlatıldığı biçimde sonikasyona alınmıştır.

Plak ultrasonik banyoda işlem görürken, steril plaklarda besiyeri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her kuyucuk için ilgili bir sütuna, daha önce anlatıldığı biçimde 180 µl steril TSB besiyeri ilave edilerek  $10^{-1}$  ile  $10^{-8}$  arasında dilüsyonlar oluşturulmuştur.

Sonikasyon işlemi tamamlandığında, biyofilmin döküldüğü plak aseptik şartlarda açılmıştır. İlgili kuyucuklardan 20 µl bakteri süspansiyonu alınarak dilüsyon plağının ilgili ilk kuyucuğa eklenmiştir. Çok kanallı otomatik pipet kullanılarak dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Her dilüsyonun sonunda, pipet ucu tıbbi atık kutusuna atılmış ve steril yeni uç takılmıştır. Son kuyucuklardan yani  $10^{-8}$ 'lik dilüsyondan çekilen süspansiyon tıbbi atık kutusuna atılmıştır.

Dilüsyon işleminin gerçekleştirilmesinin ardından, sekize bölünerek  $10^{-1}$ 'den  $10^{-8}$ 'e kadar numaralandırılmış TSA plaklarına, ilgili dilüsyon kuyucuklarından  $10^1$  ar µl süspansiyon inoküle edilmiştir. Spot ekim yapılmış TSA plakları,  $35\pm 2$  °C'de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda etüvde inkübe edilmiştir ve oluşan koloniler sayılmıştır. Koloni sayımında, sayılabilecek en düşük dilüsyondaki koloni sayısı değerlendirilmiştir.

Satırlar arasında farklılık olup olmadığının araştırılması amacıyla *E. coli* ATCC 25922'nin VCC değerleri ve satırlardaki ortalama VCC (MVCC) değerleri hesaplanmıştır ve elde edilen değerler SPSS 21 (IBM, ABD) programı ile tek yönlü varyans analizi (tek yönlü-ANOVA) testiyle istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Harrison ve diğ. 2010).

#### **3.3.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi**

Yöntemin optimize edilmesiyle birlikte, seçilen izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri araştırılmaya başlanmıştır. Her izolat, yan yana iki kuyucukta çalışılmıştır ve bu kuyucuklar "izolat numarası-1" ve "izolat numarası-2" olarak işaretlenmiştir. Farklı tarihlerde gerçekleştirilen deneylerin her birinde, kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır. TSA besiyeri üçe bölünerek tek düşürme ekim yöntemiyle pasajlanan her bir izolat,  $35\pm 2$  °C'de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda etüvde inkübe edilmiştir. Her izolat için serum fizyolojik ile 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan 0,1 ml alınarak, 2,9 ml TSB besiyeri içeren tüpe inoküle edilmiştir. Her izolat için ilgili tüpten 150 µl çekilerek hücre kültür plağına ilgili kuyucuklara inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Negatif kontrol amacıyla, son iki kuyucuğa bakteri inoküle edilmemiş 150 µl TSB besiyeri eklenmiştir. Bu plağın kapağı kaldırılmış ve daha sonraki çalışmalar için saklanmıştır. Plağa, pegleri içeren kapaklar kapatılmıştır ve etrafı parafilmle sarılmıştır. Plak,  $35\pm 2$  °C'de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda ve 115 rpm'de orbital çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir. Çalkalamalı etüvdeki inkübasyon basamağı, Çizim 3. 6.'da gösterilmiştir.



**Çizim 3.6.** Çalkalamalı etüvdeki inkübasyon basamağı.

İnkübasyon sonunda farklı bir plağın ilgili kuyucuklarına 200 µl steril serum fizyolojik eklenerek bir yıkama plağı oluşturulmuştur. Yıkama plağının kapağı kaldırılarak, sonraki kısımlar için saklanmıştır. Biyofilm oluşturulmuş pegleri içeren plak kapağı, yıkama plağına alınarak 1 dakika süreyle oda sıcaklığında yıkamaya alınmıştır. Eş zamanlı olarak, başka bir plakta ilgili kuyucuklara 200 µl TSB besiyeri ilave edilmiştir. Yıkama işleminin sonunda plak kapağı kaldırılarak TSB içeren plağa kapatılmıştır. Etrafi parafilmle çevrilmiş ve 10 dakika ultrasonik banyoda oda sıcaklığında daha önce anlatıldığı biçimde sonikasyona alınmıştır.

Plak ultrasonik banyoda işlem görürken, steril plaklarda besiyeri dilüsyonları hazırlanmıştır. Her kuyucuk için ilgili bir sütuna, daha önce anlatıldığı biçimde 180 µl steril TSB besiyeri ilave edilerek  $10^{-1}$  ile  $10^{-8}$  arasında dilüsyonlar oluşturulmuştur. Sonikasyon işlemi tamamlandığında, biyofilmin döküldüğü plak aseptik şartlarda açılmıştır. İlgili kuyucuklardan 20 µl bakteri süspansiyonu alınarak dilüsyon plağının ilgili ilk kuyucuğuna eklenmiştir. Çok kanallı otomatik pipet kullanılarak dilüsyonlar gerçekleştirilmiştir. Her dilüsyonun sonunda, pipet ucu tıbbi atık kutusuna atılmış ve steril yeni uçlar takılmıştır. Son kuyucuklardan yani  $10^{-8}$  lik dilüsyonlardan çekilen süspansiyon tıbbi atık kutusuna atılmıştır.

Dilüsyon işleminin gerçekleştirilmesinin ardından, sekize bölünerek  $10^{-1}$  den  $10^{-8}$  e kadar numaralandırılmış TSA plaklarına, ilgili dilüsyon kuyucuklarından  $10^1$  ar µl süspansiyon inoküle edilmiştir. Her izolat için bir TSA petri kutusu kullanılmıştır ve bu iki farklı kuyucuğun dilüsyonları, suşa ait ilk kuyucuk üste, ikinci kuyucuk alta gelecek şekilde aynı plağa ekilmiştir. Spot ekim yapılmış TSA plakları,  $35\pm 2$  °C' de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda etüvde inkübe edilmiştir ve oluşan koloniler sayılmıştır. Koloni sayımında, sayılabilecek en düşük dilüsyondaki koloni sayısı değerlendirilmiştir.

Bakterilerin biyofilm oluşturma yetenekleri arasında farklılık olup olmadığının araştırılması amacıyla suşlara ait MVCC değerleri belirlenmiş ve elde edilen değerler SPSS 21 programı ile veri setinin homojenitesini test etmek amacıyla one-sample Kolmogorov-Smirnov testiyle istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

### **3.4. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri**

#### **3.4.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Belirlenmesi**

Toplam 6 antibiyotiğin (amoksisilin/klavulonik asit, gentamisin, seftriakson, siprofloksasin, trimetoprim/sulfametoksazol ve nitrofurantoin), minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerleri belirlenmiştir. Antibiyotikler, Infectious Disease Society of America (IDSA) ve European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) önerileri göz önüne alınarak, kullanım sıklıklarına göre seçilmiştir (Gupta ve diğ. 2011). Antibiyotik seçiminde ayrıca, çoklu ilaç direnci özelliğinin belirlenebilmesi için, farklı gruplardaki antibiyotiklere yer verilmiştir. Yukarıdaki 6 farklı antibiyotik grubundan üç ve üzeri antibiyotiğe dirençli olan bir bakteri, çoklu ilaç direncine sahip olarak kabul edilmiştir (Johnson ve diğ. 2010, Er ve diğ. 2015).

Bakterilere ait MİK değerleri, sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri dahilinde steril U tabanlı ELISA plakları kullanılarak belirlenmiştir ve izolatların duyarlılıkları, EUCAST duyarlılık tablolarına göre değerlendirilmiştir (EUCAST 2019a).

Besiyeri olarak katyon ayarlı Mueller Hinton Broth (KA-MHB) kullanılmıştır. Besiyeri hazırlığı ve katyon ayarı, EUCAST önerileri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir (EUCAST 2019c). Her satır için suşa ait bir üreme kontrol ve her satır için bir sterilit kontrol çalışılmıştır.

Amoksisilin trihidrat (Sigma-Aldrich, Almanya), trimetoprim (Sigma-Aldrich, Almanya) ve nitrofurantoin (Sigma-Aldrich, Almanya), ayrı ayrı 10 mg/ml olacak şekilde dimetil sülfoksit (DMSO) (Fluka, İsviçre) içerisinde çözülmüştür (Andrews 2001, Macingwana ve diğ. 2012, CLSI 2018). Sulfametoksazol (Sigma-Aldrich, Almanya) ise 50 mg/ml olacak şekilde DMSO içerisinde çözülmüştür (Macingwana ve diğ. 2012). Gentamisin sülfat (Sigma-Aldrich, Almanya) ve seftriakson sodyum (Sigma-Aldrich, Almanya), 10 mg/ml olarak steril distile suda çözülmüştür. Siprofloksasin (Sigma-Aldrich, Almanya), steril distile su içerisinde 0,1 molar sodyum hidroksit çözeltisinin damlatılmasıyla 10mg/ml olacak şekilde çözülmüştür (Olofsson ve diğ. 2006). Lityum klavulonat (Sigma-Aldrich, Almanya) ise 10 mg/ml olacak şekilde sodyum fosfat tamponu (pH=6,0) içerisinde çözülmüştür (EUCAST 2003). Antibiyotiklerin hepsi çalışma yapılacağı gün içerisinde hazırlanmıştır. Amoksisilin/klavulonik asit dilüsyonlarında, klavulonik asit konsantrasyonu, denenen her bir kuyucukta 2 mg/L olacak şekilde ayarlanmıştır. Sınır değeri, amoksisilin konsantrasyonuna göre verilmiştir (EUCAST 2019a). Trimetoprim/sulfametoksazol dilüsyonlarında ise, trimetoprim:sulfametoksazol oranı, 1:19 olacak şekilde dilüe edilmiştir. Sınır değeri, trimetoprim konsantrasyonuna göre verilmiştir (EUCAST 2019a).

*E. coli* ATCC 25922 ve 4 farklı izolatın MİK aralıkları belirlenerek deney optimize edildikten sonra tüm suşlar çalışmaya alınmıştır. Her deneyde, *E. coli* ATCC 25922 suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Suşlar için çalışılan MİK aralıkları, Çizelge 3. 3.' de gösterilmiştir.

TSA besiyeri üçe bölünerek tek düşürme ekim yöntemiyle pasajlanan her bir izolat, 35±2 °C' de 18±2 saat aerobik ortamda etüvde (Nüve, Türkiye) inkübe edilmiştir. Her izolat için MHB ile 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır.

İlgili plaklardaki her bir suşa ait satırların ilk kuyucukları üreme kontrol, ikinci kuyucukları ise sterilite kontrol olarak kullanılmıştır. Kuyucuklardaki son hacim 100 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Besiyeri-antibiyotik konsantrasyonu, %25' i geçmeyecek şekilde düzenlenmiştir (Harrison ve diğ. 2010). Amoksisilin/klavulonik asit antibiyogramı haricinde, en yüksek konsantrasyonlu antibiyotik kuyucuğu dışındaki kuyucuklara, 100 µl KA-MHB besiyeri ilave edilmiştir. Amoksisilin/klavulonik asit haricindeki antibiyotikler için çalışılacak en yüksek konsantrasyonlu kuyucuklara, ilgili antibiyotik konsantrasyonu ayarlanarak 200 µl antibiyotikli KA-MHB besiyeri dağıtılmıştır. Ardından, çok kanallı otomatik pipet yardımıyla, en yüksek antibiyotik dilüsyonu olan kuyucuklardan başlanarak

100 µl ile aritmetik dilüsyon yapılmıştır. En düşük antibiyotik konsantrasyonlu kuyucuklarda da dilüsyon yapıldıktan sonra artan sıvı tıbbi atığa atılmıştır.

Amoksisilin/klavulonik asit için ise öncelikle sterilite ve üreme kontrol kuyucuklarına 100 µl KA-MHB besiyeri dağıtılmıştır. En yüksek konsantrasyonlu antibiyotik kuyucuğu dışındaki kuyucuklara ise 50 µl KA-MHB besiyeri ilave edilmiştir. En yüksek konsantrasyonlu kuyucuklara, amoksisilin konsantrasyonu ayarlanarak 100 µl antibiyotikli KA-MHB besiyeri dağıtılmıştır. Ardından, çok kanallı otomatik pipet yardımıyla, en yüksek antibiyotik dilüsyonu olan kuyucuklardan başlanarak 50 µl ile aritmetik dilüsyon yapılmıştır. En düşük antibiyotik konsantrasyonlu kuyucuklarda da dilüsyon yapıldıktan sonra artan sıvı tıbbi atığa atılmıştır. Sonrasında, 4 mg/L olarak ayarlanan klavulonik asit-KA-MHB çözeltisinden amoksisilin bulunan her kuyucuğa 50 µl eklenmiştir. Böylelikle "MİK antibiyogram plakları" oluşturulmuştur.

Plak hazırlığının ardından, her bir izolat için MHB ile 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır. Kuyucuklara inoküle edilecek bakteri miktarı, 0,5 McFarland süspansiyonunun 1:10 dilüsyonu ile ayarlanmıştır. Çok kanallı otomatik pipet kullanılarak bu bakteri dilüsyonlarından, ilgili kuyucuklara 5 µl bakteri süspansiyonu inoküle edilmiştir. Böylelikle her bir kuyucuğa,  $\sim 5 \times 10^5$  KOB/ml bakteri inokülasyonu gerçekleştirilmiştir. İnokülasyon işlemi, 0,5 McFarland hazırlığının ardından 15 dakika içerisinde gerçekleştirilmiştir (CLSI 2006). Plak kapakları kapatılarak etrafları parafilmle çevrilmiş ve  $35 \pm 2$  °C'de  $22 \pm 2$  saat aerobik ortamda etüvde (Nüve, Türkiye) inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda plaklar görsel olarak değerlendirilmiş ve üremenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu, "MİK değeri" olarak kaydedilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Çalışılan MİK aralıkları.

<b>Antibiyotik Adı</b>	<b>Çalışılan MİK Aralığı (mg/L)</b>	<b>Suş Başına Çalışılan Toplam Kuyucuk Sayısı</b>
Amoksisilin/klavulonik asit	0,25/2 - 128/2	10
Gentamisin	0,25 - 128	10
Seftriakson	0,001 - 128	18
Siprofloksasin	0,001 - 128	18
Nitrofurantoin	1 - 512	10
Trimetoprim/sulfametoksazol	0,001/0,019 - 128/2432	18



Gerçekleştirilen sıvı mikrodilüsyon testi sonucunda, *E. coli* ATCC 25922 suşunun MİK aralıklarının uygunluğu, EUCAST önerileri doğrultusunda değerlendirilmiştir (EUCAST 2019b). Deneyler, iki kez tekrar edilmiştir. Tüm suşlara ait MİK<sub>50</sub> ve MİK<sub>90</sub> değerleri, izolatların MİK değerlerinin sıralanarak, %50 ve %90 izolatu inhibe eden en düşük konsantrasyon olarak belirlenmiştir (Moskowitz ve diğ. 2004).

### 3.4.2. Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu Belirlenmesi

Öncelikle, MİK testinin optimizasyonunda kullanılan ve *E. coli* ATCC 25922' yi içeren 5 farklı suş, minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) aralıklarının belirlenebilmesi için aşağıdaki protokolle çalışılmıştır. Deney optimize edildikten sonra tüm suşlar aynı protokolle çalışmaya alınmıştır. Farklı günlerde gerçekleştirilen her deneyde, *E. coli* ATCC 25922 suşu çalışmaya dahil edilmiştir. Her satırdaki suş için bir üreme kontrol ve her satır için bir sterilit kontrol çalışılmıştır. Suşlar için çalışılan MBEK aralıkları, Çizelge 3. 4.' de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.4.** Çalışılan MBEK aralıkları.

Antibiyotik Adı	Çalışılan MBEK Aralığı (mg/L)	Suş Başına Çalışılan Toplam Kuyucuk Sayısı
Amoksisilin/klavulonik asit	2/2 - 1024/2	10
Gentamisin	2 - 1024	10
Seftriakson	2 - 1024	10
Siprofloksasin	2 - 1024	10
Nitrofurantoin	2 - 1024	10
Trimetoprim/sulfametoksazol	2/38 - 512/9728	10

Antibiyotik stok solüsyonları, MİK belirleme deneyiyle aynı yöntemle ve hepsi çalışma yapılacağı gün içerisinde hazırlanmıştır. Kuyucuktaki son hacim, MİK belirleme için gerçekleştirilen sıvı mikrodilüsyondan farklı olarak 200 µl olacak şekilde ayarlanmıştır. Besiyeri-antibiyotik konsantrasyonu, %25' i geçmeyecek şekilde düzenlenmiştir (Harrison ve diğ. 2010). Amoksisilin/klavulonik asit dilüsyonlarında klavulonik asit konsantrasyonu, denenen her bir kuyucukta 2 mg/L olacak şekilde ayarlanmıştır. Sınır değer, amoksisilin konsantrasyonuna göre verilmiştir (EUCAST 2019a). Trimetoprim/sulfametoksazol dilüyonlarında ise, trimetoprim:sulfametoksazol oranı, 1:19



olacak şekilde dilüe edilmiştir. Sınır değeri, trimetoprim konsantrasyonuna göre verilmiştir (EUCAST 2019a).

TSA besiyeri üçe bölünerek tek düşürme ekim yöntemiyle pasajlanan her bir izolat,  $35\pm 2$  °C' de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda etüvde inkübe edilmiştir. Her izolat için MHB ile 0,5 McFarland standardı hazırlanmıştır. Hazırlanan süspansiyondan 0,3 ml alınarak, 8,7 ml TSB besiyeri içeren tüpe inoküle edilmiştir. Böylelikle, 1:30 dilüsyon oluşturulmuştur. Her izolat için ilgili tüpten 150 µl çekilerek hücre kültür plaklarında ilgili kuyucuklara inokülasyon gerçekleştirilmiştir. Besiyeri kontrol amacıyla, her satırın ikinci kuyucuğuna bakteri inoküle edilmemiş 150 µl TSB besiyeri eklenmiştir. Bu plakların kapakları kaldırılmış ve daha sonraki çalışmalar için saklanmıştır. Plaklara, pegleri içeren kapaklar kapatılmıştır ve etrafları parafilmle sarılmıştır. Plaklar,  $35\pm 2$  °C' de  $18\pm 2$  saat aerobik ortamda ve 115 rpm' de orbital çalkalamalı etüvde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda farklı bir plak serisinin ilgili tüm kuyucuklarına 200 µl steril serum fizyolojik eklenerek bir yıkama plağı serisi oluşturulmuştur. Yıkama plaklarının kapakları kaldırılarak, sonraki kısımlar için saklanmıştır. Biyofilm oluşturulmuş pegleri içeren plak kapakları, yıkama plaklarına alınarak 1 dakika süreyle oda sıcaklığında yıkama gerçekleştirilmiştir.

Eş zamanlı olarak, başka bir plak serisinde amoksisilin/klavulonik asit antibiyogramı haricinde, en yüksek konsantrasyonlu antibiyotik kuyucuğu dışındaki kuyucuklara 200 µl KA-MHB besiyeri ilave edilmiştir. Amoksisilin/klavulonik asit haricindeki antibiyotikler için çalışılacak en yüksek konsantrasyonlu kuyucuklara ise antibiyotik konsantrasyonu ayarlanarak 400 µl antibiyotikli KA-MHB besiyeri dağıtılmıştır. Ardından, çok kanallı otomatik pipet yardımıyla, en yüksek antibiyotik dilüsyonu olan kuyucuklardan başlanarak 200 µl ile aritmetik dilüsyon yapılmıştır. En düşük antibiyotik konsantrasyonlu kuyucuklarda da dilüsyon yapıldıktan sonra artan sıvı tıbbi atığa atılmıştır.

Amoksisilin/klavulonik asit için ise öncelikle sterilite ve üreme kontrol kuyucuklarına 200 µl KA-MHB besiyeri dağıtılmıştır. En yüksek konsantrasyonlu antibiyotik kuyucuğu dışındaki kuyucuklara ise 100 µl KA-MHB besiyeri ilave edilmiştir. En yüksek konsantrasyonlu kuyucuklara, amoksisilin konsantrasyonu ayarlanarak 200 µl antibiyotikli KA-MHB besiyeri dağıtılmıştır. Ardından, çok kanallı otomatik pipet yardımıyla, en yüksek antibiyotik dilüsyonu olan kuyucuklardan başlanarak 100 µl ile aritmetik dilüsyon yapılmıştır. En düşük antibiyotik konsantrasyonlu kuyucuklarda da dilüsyon yapıldıktan sonra artan sıvı tıbbi atığa atılmıştır. Sonrasında, 4 mg/L olarak

ayarlanan klavulonik asit-KA-MHB çözeltilisinden amoksisilin bulunan her kuyucuğa 100 µl eklenmiştir. Böylelikle "MBEK antibiyogram plakları" oluşturulmuştur.

Yıkama işleminin sonunda, biyofilmin oluşturulduğu plak kapakları kaldırılarak MBEK antibiyogram plaklarına kapatılmıştır. Etrafları parafilmle çevrilmiş ve  $35\pm 2$  °C' de  $22\pm 2$  saat aerobik ortamda etüvde inkübe edilmiştir.

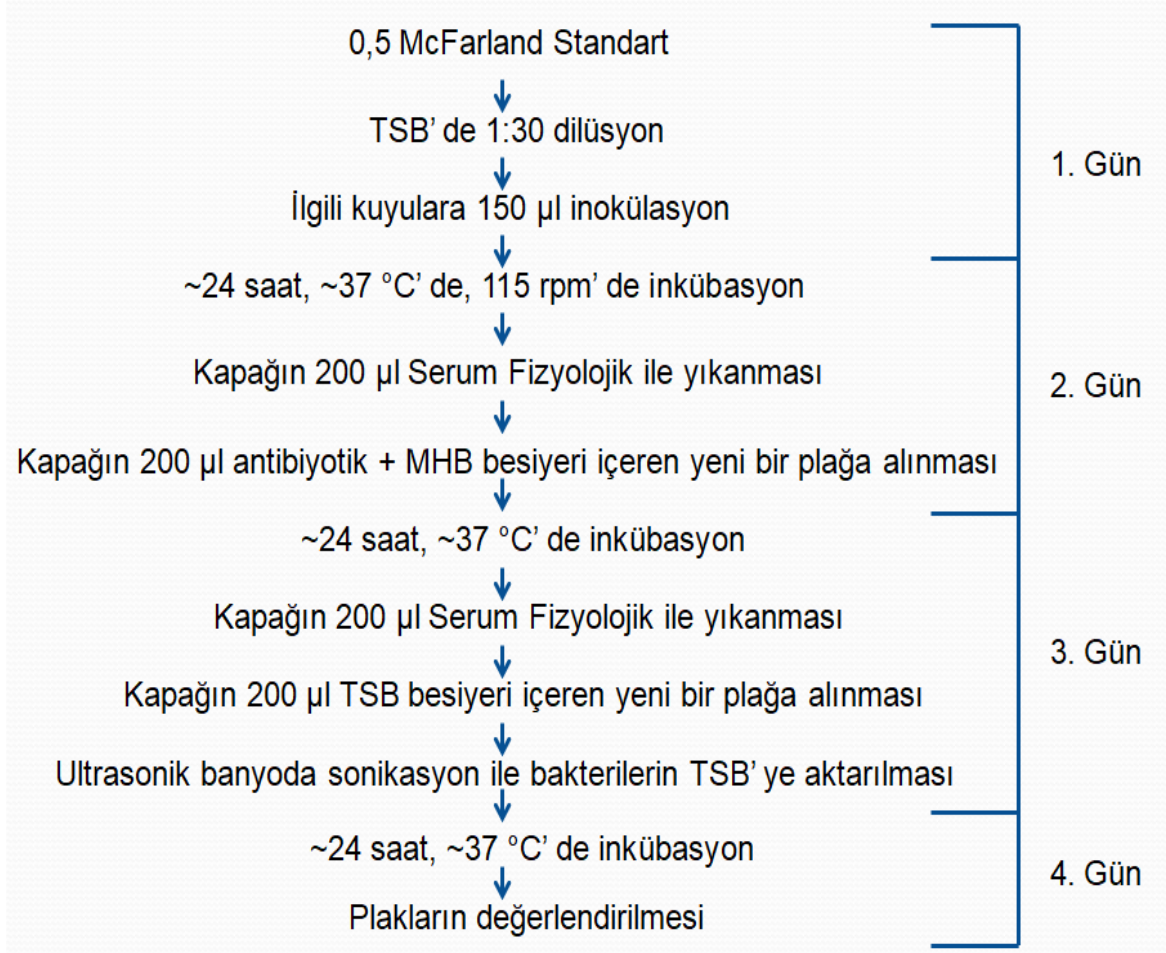
İnkübasyon sonunda, farklı bir plak serisinin ilgili tüm kuyucuklarına 200 µl steril serum fizyolojik eklenerek yeni bir yıkama plağı serisi oluşturulmuştur. Yıkama plaklarının kapakları kaldırılarak, sonraki kısımlar için saklanmıştır. KA-MHB içeren MBEK antibiyogram plağından alınan ve antibiyotik ile inkübe edilmiş biyofilme sahip plak kapakları, yıkama plaklarına daldırılarak 10 dakika boyunca oda sıcaklığında yıkanmıştır. KA-MHB içeren MBEK plaklarına ise steril düz plak kapağı kapatılarak, MİK değerlerinin kıyaslanması için saklanmıştır. Bulanıklık olmayan en düşük dilüsyonlu ilk kuyucuk, "KA-MHB MBEK plağından elde edilen MİK değeri" olarak kaydedilmiştir.

Yıkama işleminin sonunda, steril TSB içeren yeni bir plak serisi oluşturulmuştur. Pegleri içeren plak kapakları kaldırılarak, steril TSB içeren plaklara alınmıştır ve plakların etrafı parafilmle kapatılmıştır. İki plak üst üste gelecek şekilde daha önce anlatıldığı biçimde 10 dakika ultrasonik banyoda oda sıcaklığında sonikasyon işlemine alınmıştır. Sonikasyonun sonunda, pegleri içeren plak kapakları tıbbi atık kutusuna atılmıştır ve yerine steril düz plak kapakları kapatılmıştır. Plakların etrafı parafilmle kapatılmıştır ve  $35\pm 2$  °C' de  $22\pm 2$  saat aerobik ortamda etüvde inkübe edilmiştir.

İnkübasyon sonunda kuyucuklardaki bulanıklık, ilk 5 suş için hem görsel olarak hem de 650 nm dalga boyunda optik dansitenin mikropalak okuyucu ile belirlenmesiyle değerlendirilmiştir. Arada fark olmaması ve daha önceki çalışmalarda da MBEK değerinin görsel olarak belirlenebileceğinin belirtilmesi üzerine, sonraki çalışmalarda bulanıklık görsel olarak değerlendirilmiştir (Harrison ve diğ. 2018). Üremenin olmadığı en düşük antibiyotik konsantrasyonu, "MBEK" değeri olarak belirlenmiştir. Standardize hale getirilen ve bakterinin plakta üremesi sonrası MBEK deney protokolüne ait akış şeması, Çizim 3. 7.' de gösterilmiştir. Deneyler, 2 kez tekrar edilmiştir. Tüm suşlara ait MBEK<sub>50</sub> ve MBEK<sub>90</sub> değerleri, izolatların MBEK değerlerinin sıralanarak, %50 ve %90 izolata ait biyofilmi inhibe eden en düşük değer olarak belirlenmiştir (Moskowitz ve diğ. 2004).

Günümüzde, MBEK verilerini duyarlı veya dirençli olarak sınıflayabilmek için kullanılan bir duyarlılık tablosu bulunmamaktadır. Daha önceki çalışmalarda MBEK ve MİK değerlerinin kıyaslanabilmesi için, CLSI gibi duyarlılık öneri tablolarının duyarlı (S) ve dirençli (R) sınır değerleri kullanılmıştır (Sepandj ve diğ. 2004). MBEK değeri, MİK

sınır değerine göre değerlendirilerek, bakteri duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırılmıştır. Ülkemizin kullandığı standardın EUCAST olması nedeniyle, çalışmamızda EUCAST sınır değer önerileri kullanılmıştır (EUCAST 2019a).



**Çizim 3.7.** Plakta üreme sonrası MBEK deney protokolüne ait akış şeması.

### 3.5. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için, IBM SPSS Statistics 21.0 (IBM Corporation, ABD) programı kullanılmıştır.  $p < 0,05$  olan analizler, istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Sınıflanmış ve bağımsız veriler için ki-kare bağımsızlık testi kullanılmıştır. Beklenen değer beşin altında ise Fisher'ın kesin olasılık testi (çift-kuyruk) uygulanmıştır.

Elde edilen veriler parametrik olmadığında ortalamalarını karşılaştırmak için one-sample Kolmogorov-Smirnov testi; iki bağımsız grubun, belirli bir değişkene ait ortalamalarını karşılaştırmak için, Mann – Whitney U testi; grup sayısı ikiden fazla ise, Kruskal – Wallis H testi kullanılmıştır.

Kruskal – Wallis H testi yapıldığında, istatistiksel olarak anlamlı fark Bonferroni düzeltmesi ile belirlenmiştir. İstatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunması halinde, farkın hangi gruptan kaynaklandığının araştırması, Mann – Whitney U testi ile gerçekleştirilmiştir.

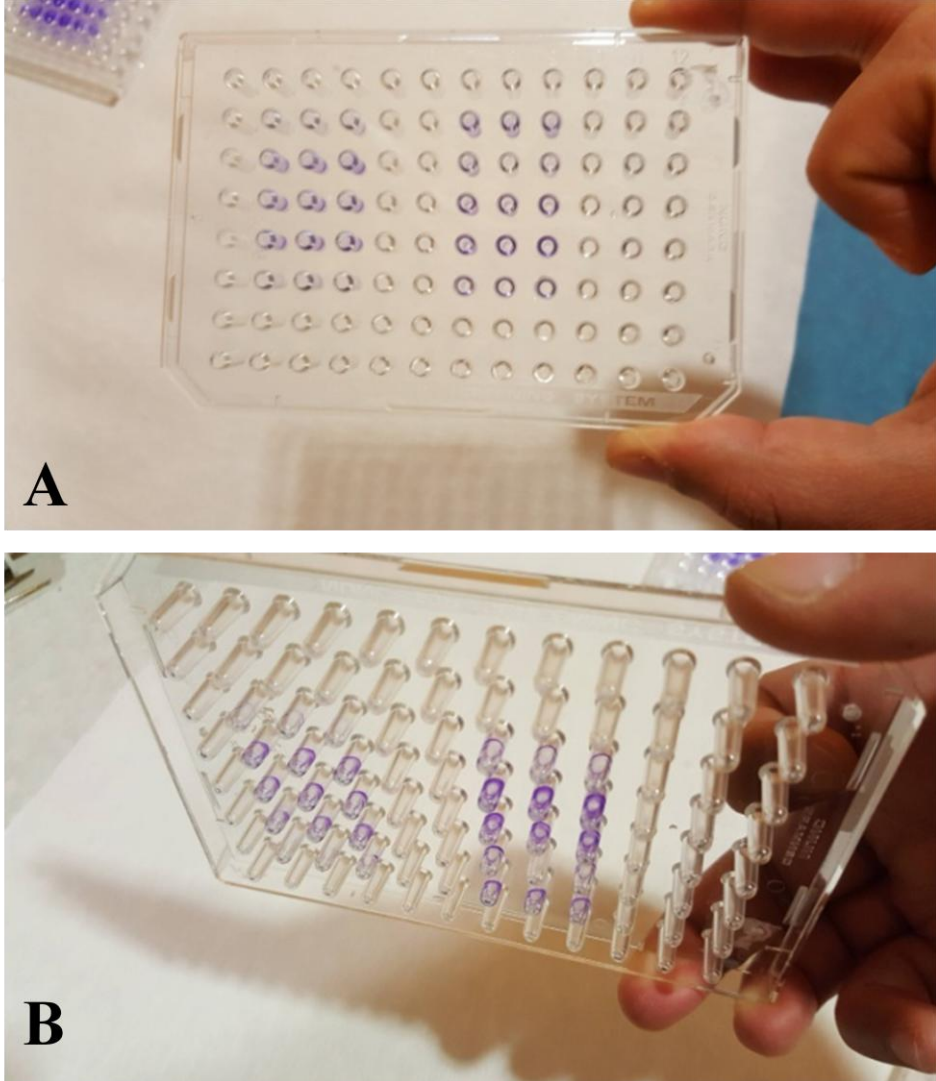
Bağımsız değişkenlerin ortalamasının karşılaştırılmasında ise tek yönlü varyans analizi (One – way ANOVA) kullanılmıştır.



## 4. BULGULAR

### 4.1. Biyofilm Oluşturma Yöntemi Deneme Sonucu

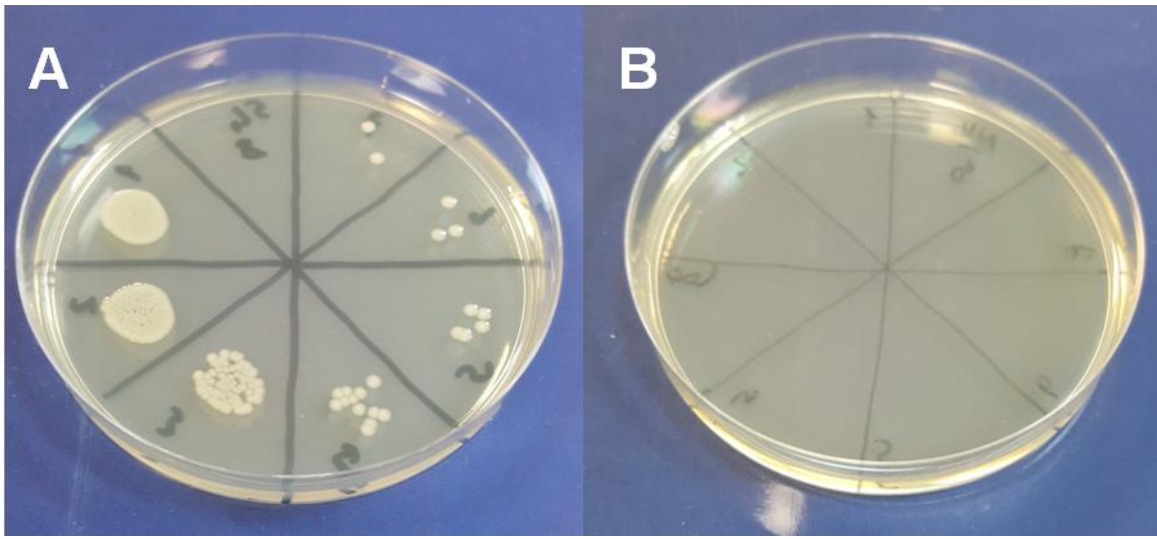
Kristal viyole ile gerçekleştirilen boyama sonucu, peg üzerinde oluşmuş biyofilm gözle görünür hale gelmiştir; negatif kontrol pegleri ise boya tutmamıştır. Çizim 4. 1.' de boyanmış pegleri içeren plak kapağının görüntüsü verilmiştir. Yapılan deney, mevcut sistem ile biyofilm oluşumunun sağlanabildiğini göstermiştir. Daha sonraki deneylerde koloni sayım yöntemiyle sanlı hücre sayısı hesabı yapılacağı için, kristal viyolenin peg üzerinden çözülerek spektrofotometrik olarak okunmasıyla yapılan optik okuma işlemi gerçekleştirilmemiştir (Harrison ve diğ. 2010, O'Toole 2011).



**Çizim 4.1.** Boyanmış peglerin üstten (A) ve yandan (B) görüntüsü.

## 4.2. Canlı Hücre Sayısının Belirlenmesi

Yapılan deney sonucunda, standart hesaplamalar ile peg başına düşen canlı hücre sayısı (viable cell count - VCC) hesaplanmıştır. VCC hesaplamasında,  $VCC = \log_{10}$  (hücre sayısı X dilüsyon faktörü) formülü kullanılmıştır. Böylelikle, minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu (MBEK) için başlangıç inokulumunun ne kadar olacağı hesaplanacaktır. Ayrıca, elde edilen veri sayesinde ortalama VCC (mean VCC - MVCC) ve standart sapma değerleri belirlenmiştir. Gerçekleştirilen biyofilmdeki canlı hücre kantitasyonu ekimi sonucunda elde edilen görüntü, Çizim 4. 2.' de gösterilmiştir.



**Çizim 4.2.** Biyofilm canlı hücre kantitasyon ekimi. (A) biyofilm oluşturmuş örnek; (B) negatif kontrol (steril TSB besiyeri).

Yukarıdaki örnek göz önüne alındığında, sayılabilecek en düşük konsantrasyonun  $10^{-4}$  lük dilüsyon olduğu görülmektedir ve bu dilüsyonda 12 bakteri sayılmıştır. VCC değeri hesaplandığında;

$VCC = (12 \times 10.000 [10^{-4} \text{ lük dilüsyon faktörü}] \times 10 [\text{kuyucuktaki dilüsyon faktörü}] \times 100 [10 \mu\text{l' lik spot ekimdeki dilüsyon faktörü}]) = 8,08 \log_{10}$  koloni oluşturan birim (KOB)/peg olarak belirlenmiştir (Harrison ve diğ. 2010).

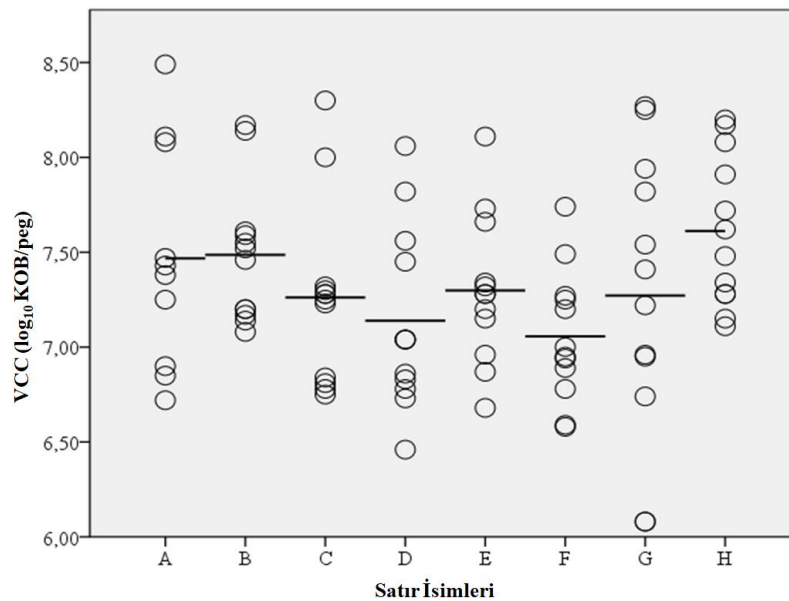
İki farklı kuyucukta çalışılan *E. coli* ATCC 25922 değerlendirildiğinde, ilk kuyucuğun VCC değeri  $7,78 \log_{10}$  KOB/peg iken ikinci kuyucuğun VCC değeri  $7,83 \log_{10}$  KOB/peg olarak belirlenmiştir. Yapılan deney tekrarında, inkübasyondaki çalkalama hızı 115 rpm' e çekilmiştir ve VCC değerleri 7,85 ve 8,01' e çıkmıştır. Çalkalama hızının optimizasyonu, yüksek oranda bakteri eldesi için önemlidir. Bu nedenle, 115 rpm hızı daha

sonraki denemelerde kullanılan orbital çalkalama hızı olarak belirlenmiştir. Ardından deney 2 kez tekrarlanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir.

### 4.3. Eşit Biyofilm Oluşumunun Araştırılması

Yapılan istatistiksel analiz sonucunda, satırlar arasında biyofilm oluşumunda istatistiksel olarak bir fark olmadığı görülmüştür ( $p=0,072$ ). Böylelikle, her satırda benzer oranda biyofilm oluştuğu belirlenmiştir. Çizim 4. 3. ve Çizelge 4. 1.' de elde edilen sonuçlar gösterilmiştir. İlk 2 kuyucuk negatif kontrol olduğundan, Çizim 4. 3. ve Çizelge 4. 1.' de A satırının 2 kuyucuğunda VCC ve MVCC değerleri verilmemiştir. Elde edilen değerler incelendiğinde, 94 kuyucuk içerisinde en düşük 6,08  $\log_{10}$  KOB/peg, en yüksek 8,49  $\log_{10}$  KOB/peg bakteri elde edildiği görülmüştür. Özellikle plağın orta kısmında daha az bakteri elde edildiği belirlenmiştir. Bu durumun orbital hareketle ilişkili olduğu düşünülmektedir fakat istatistiksel olarak satırlar arasında biyofilm oluşumunda farklılık olmaması sebebiyle, MBEK deneylerini etkilemeyeceği beklenmektedir (Harrison ve diğ. 2010). Ayrıca, kuyucuklar arasındaki minör farklılıkların pipetaj hatalarıyla ilişkili olabileceği ve benzer şekilde MBEK belirlenmesinde önemli olmadığı düşünülmektedir.

MBEK deney başlangıcı için standart bir değer bulunmamaktadır fakat yapılan çalışmalarda benzer oranlarda bakteri ile başlanması uygun görülmüştür (Ceri ve diğ. 1999, Harrison ve diğ. 2010). Bu bakış açısıyla, elde edilen biyofilm miktarının yeterli olduğu ve antimikrobiyal duyarlılık testlerine geçilebileceği düşünülmüştür.



Çizim 4.3. Satırlara ait VCC değerleri.

**Çizelge 4.1.** Satırlarda eşit biyofilm oluşumu deneyine ait tanımlayıcı veriler ( $p=0,072$ ).

Satırlar	Satır sayıları (n)	Ortalama	Standart Sapma	Standart Hata	Minimum	Maksimum
A	*10	7,4680	0,59179	0,18714	6,72	8,49
B	12	7,4858	0,36627	0,10573	7,08	8,17
C	12	7,2617	0,47726	0,13777	6,75	8,30
D	12	7,1392	0,48109	0,13888	6,46	8,06
E	12	7,2983	0,39205	0,11318	6,68	8,11
F	12	7,0567	0,34846	0,10059	6,58	7,74
G	12	7,2717	0,74580	0,21529	6,08	8,27
H	12	7,6117	0,39931	0,11527	7,11	8,20
<b>Toplam</b>	94	7,3211	0,50211	0,05179	6,08	8,49

\*A satırının ilk iki kuyucuğu negatif kontrol olarak kullanılmıştır.

#### 4.4. İzolatların Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin Belirlenmesi

Yapılan deney ile izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri belirlenmiştir. Çalışılan ve antimikrobiyal duyarlılık testine dahil edilecek toplam 79 suşun ve *E. coli* ATCC 25922' nin benzer oranda biyofilm oluşturduğu belirlenmiştir ( $p=0,116$ ). Ayrıca, biyofilm oluşturmeyen bir izolatla karşılaşılmamıştır. Suşlara ait en düşük MVCC değeri 8,020  $\log_{10}$  KOB/peg, en yüksek MVCC değeri ise 8,490  $\log_{10}$  KOB/peg' dir. Suşlara ait biyofilmdeki canlı hücre kantitasyon verileri, Çizelge 4. 2.' de gösterilmiştir.



**Çizelge 4.2.** Suşlara ait biyofilmdeki canlı hücrelerin kantitasyon verileri ( $p=0,116$ ).

İzolat Numarası	Klonal/Filogenetik Grup	Dilüsyon Katsayısı	Koloni Sayısı	$\log_{10}$ KOB/peg	
				VCC	MVCC
ATCC-1	B2	4	12	8,08	8,115
ATCC-2		4	14	8,15	
30-1	ST131	4	11	8,04	8,020
30-2		4	10	8,00	
5-1	ST131	4	20	8,30	8,320
5-2		4	22	8,34	
10-1	ST131	4	16	8,20	8,200
10-2		4	16	8,20	
81-1	ST131	4	18	8,25	8,305
81-2		4	23	8,36	
92-1	ST131	4	15	8,18	8,205
92-2		4	17	8,23	
93-1	ST131	4	12	8,08	8,080
93-2		4	12	8,08	
63-1	ST131	4	23	8,36	8,340
63-2		4	21	8,32	
101-1	ST131	4	30	8,48	8,445
101-2		4	26	8,41	
120-1	ST131	4	13	8,11	8,130
120-2		4	14	8,15	
128-1	ST131	4	18	8,25	8,215
128-2		4	15	8,18	
130-1	ST131	4	15	8,18	8,180
130-2		4	15	8,18	
141-1	ST131	4	21	8,32	8,300
141-2		4	19	8,28	
142-1	ST131	4	19	8,28	8,300
142-2		4	21	8,32	

**Çizelge 4.2.** Suşlara ait biyofilmdeki canlı hücrelerin kantitasyon verileri ( $p=0,116$ ) (devam).

İzolat Numarası	Klonal/Filogenetik Grup	Dilüsyon Katsayısı	Koloni Sayısı	log <sub>10</sub> KOB/peg	
				VCC	MVCC
69-1	ST131	4	24	8,38	8,360
69-2		4	22	8,34	
159-1	ST131	4	19	8,28	8,310
159-2		4	22	8,34	
160-1	ST131	4	15	8,18	8,165
160-2		4	14	8,15	
162-1	ST131	4	12	8,08	8,080
162-2		4	12	8,08	
166-1	ST131	4	30	8,48	8,430
166-2		4	24	8,38	
169-1	ST131	4	30	8,48	8,490
169-2		4	32	8,5	
177-1	ST131	4	15	8,18	8,205
177-2		4	17	8,23	
179-1	ST131	4	19	8,28	8,265
179-2		4	18	8,25	
184-1	ST131	4	15	8,18	8,180
184-2		4	15	8,18	
186-1	ST131	4	16	8,20	8,215
186-2		4	17	8,23	
200-1	ST131	4	18	8,25	8,250
200-2		4	18	8,25	
202-1	ST131	4	15	8,18	8,180
202-2		4	15	8,18	
208-1	ST131	4	19	8,28	8,255
208-2		4	17	8,23	
211-1	ST131	4	17	8,23	8,255
211-2		4	19	8,28	

**Çizelge 4.2.** Suşlara ait biyofilmdeki canlı hücrelerin kantitasyon verileri ( $p=0,116$ ) (devam).

İzolat Numarası	Klonal/Filogenetik Grup	Dilüsyon Katsayısı	Koloni Sayısı	log <sub>10</sub> KOB/peg VCC	
				MVCC	
232-1	ST131	4	16	8,20	8,200
232-2		4	16	8,20	
234-1	ST131	4	26	8,41	8,355
234-2		4	20	8,30	
32-1	ST131	4	16	8,20	8,215
32-2		4	17	8,23	
58-1	ST131	4	20	8,30	8,300
58-2		4	20	8,30	
249-1	ST131	4	16	8,20	8,200
249-2		4	16	8,20	
252-1	ST131	4	15	8,18	8,180
252-2		4	15	8,18	
275-1	ST131	4	19	8,28	8,240
275-2		4	16	8,20	
290-1	ST131	4	14	8,15	8,175
290-2		4	16	8,20	
52-1	ST131	4	15	8,18	8,180
52-2		4	15	8,18	
54-1	ST131	4	19	8,28	8,255
54-2		4	17	8,23	
94-1	ST131	4	17	8,23	8,240
94-2		4	18	8,25	
137-1	ST131	4	16	8,20	8,190
137-2		4	15	8,18	
21-1	A	4	30	8,48	8,485
21-2		4	31	8,49	
46-1	A	4	17	8,23	8,215
46-2		4	16	8,20	

**Çizelge 4.2.** Suşlara ait biyofilmdeki canlı hücrelerin kantitasyon verileri ( $p=0,116$ ) (devam).

İzolat Numarası	Klonal/Filogenetik Grup	Dilüsyon Katsayısı	Koloni Sayısı	log <sub>10</sub> KOB/peg VCC	
				MVCC	
86-1	A	4	15	8,18	8,180
86-2		4	15	8,18	
98-1	A	4	28	8,45	8,415
98-2		4	24	8,38	
4-1	A	4	20	8,30	8,275
4-2		4	18	8,25	
40-1	A	4	15	8,18	8,215
40-2		4	18	8,25	
2-1	A	4	18	8,25	8,250
2-2		4	18	8,25	
90-1	A	4	20	8,30	8,365
90-2		4	27	8,43	
99-1	A	4	15	8,18	8,165
99-2		4	14	8,15	
103-1	A	4	14	8,15	8,165
103-2		4	15	8,18	
19-1	B1	4	18	8,25	8,240
19-2		4	17	8,23	
124-1	B1	4	18	8,25	8,200
124-2		4	14	8,15	
153-1	B1	4	13	8,11	8,270
153-2		4	27	8,43	
175-1	B1	4	14	8,15	8,130
175-2		4	13	8,11	
256-1	B1	4	15	8,18	8,190
256-2		4	16	8,20	
23-1	B1	4	16	8,20	8,240
23-2		4	19	8,28	

**Çizelge 4.2.** Suşlara ait biyofilmdeki canlı hücrelerin kantitasyon verileri ( $p=0,116$ ) (devam).

İzolat Numarası	Klonal/Filogenetik Grup	Dilüsyon Katsayısı	Koloni Sayısı	$\log_{10}$ KOB/peg VCC	
				MVCC	
118-1	B1	4	17	8,23	8,230
118-2		4	17	8,23	
121-1	B1	4	18	8,25	8,275
121-2		4	20	8,30	
77-1	B1	4	14	8,15	8,175
77-2		4	16	8,20	
174-1	B1	4	16	8,20	8,190
174-2		4	15	8,18	
44-1	B2	4	14	8,15	8,200
44-2		4	18	8,25	
279-1	B2	4	18	8,25	8,250
279-2		4	18	8,25	
57-1	B2	4	16	8,20	8,200
57-2		4	16	8,20	
49-1	B2	4	18	8,25	8,250
49-2		4	18	8,25	
22-1	B2	4	17	8,23	8,205
22-2		4	15	8,18	
27-1	B2	4	15	8,18	8,180
27-2		4	15	8,18	
29-1	B2	4	20	8,30	8,310
29-2		4	21	8,32	
35-1	B2	4	21	8,32	8,320
35-2		4	21	8,32	
36-1	B2	4	21	8,32	8,310
36-2		4	20	8,30	
39-1	B2	4	30	8,48	8,505
39-2		4	34	8,53	

**Çizelge 4.2.** Suşlara ait biyofilmdeki canlı hücrelerin kantitasyon verileri ( $p=0,116$ ) (devam).

İzolat Numarası	Klonal/Filogenetik Grup	Dilüsyon Katsayısı	Koloni Sayısı	log <sub>10</sub> KOB/peg VCC	
				MVCC	
1-1	D	4	13	8,11	8,170
1-2		4	17	8,23	
14-1	D	4	15	8,18	8,205
14-2		4	17	8,23	
71-1	D	4	19	8,28	8,230
71-2		4	15	8,18	
79-1	D	4	16	8,20	8,190
79-2		4	15	8,18	
87-1	D	4	17	8,23	8,215
87-2		4	16	8,20	
9-1	D	4	15	8,18	8,180
9-2		4	15	8,18	
48-1	D	4	15	8,18	8,240
48-2		4	20	8,30	
37-1	D	4	22	8,34	8,270
37-2		4	16	8,20	
15-1	D	4	15	8,18	8,165
15-2		4	14	8,15	
56-1	D	4	17	8,23	8,230
56-2		4	17	8,23	

#### **4.5. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu ve Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu Verilerinin Karşılaştırılması**

MİK değerleri incelendiğinde, ST131 izolatlarının birçok antibiyotiğe ST131 dışındaki izolatlara göre çok daha fazla dirençli olduğu görülmüştür. Aynı zamanda, ST131 izolatları çoklu ilaç direnci ile ilişkilidir. ST131 için bu beklenen bir durum olup, daha önceki çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (Er ve diğ. 2015). ST131 ve ST131 dışı izolatlara ait duyarlılık verileri, Çizelge 4. 3.' de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.3.** ST131 ve ST131 dışı izolatların antibiyotiklere karşı duyarlılıkları.

Antibiyotikler	Duyarlılık	ST131 Durumu n (%)		p
		ST131 (n=39)	ST131 Dışı (n=40)	
Nitrofurantoin	S (n=77)	39 (100)	38 (95)	0,157
	R (n=2)	0 (0)	2 (5)	
	Gentamisin	S (n=58)	27 (69,2)	
R (n=21)	12 (30,8)	9 (22,5)		
Seftriakson	S (n=37)	8 (20,5)	29 (72,5)	<0,001
	R (n=42)	31 (79,5)	11 (27,5)	
	Trimetoprim/ sulfametoksazol	S (n=37)	12 (30,8)	
R (n=42)	27 (69,2)	15 (37,5)		
Amoksisilin/ klavulonik asit	S (n=30)	10 (25,6)	20 (50)	0,037
	R (n=49)	29 (74,4)	20 (50)	
	Çoklu Direnç	S (n=30)	6 (15,4)	
R (n=49)		33 (84,6)	16 (40)	
Siprofloksasin		S (n=25)	3 (7,7)	22 (55)
	R (n=54)	36 (92,3)	18 (45)	

ST131 ve ST131 dışı olarak sınıflanan izolatların MİK değerleri araştırıldığında, ST131 izolatlarının MİK değerlerinin seftriakson ( $p<0,001$ ), siprofloksasin ( $p<0,001$ ), trimetoprim/sulfametoksazol ( $p=0,001$ ) ve amoksisilin/klavulonik asit ( $p=0,009$ ) için daha yüksek olduğu görülmüştür. Nitrofurantoin MİK değerleri ise ST131 dışı izolatlarda daha yüksektir ( $p<0,001$ ). Gentamisinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir ( $p=0,172$ ).

MBEK protokolü denenirken, ilk 5 suş için 650 nm dalga boyunda optik dansite (OD) araştırılmıştır. Üreme olmayan kuyucukların hepsinde OD değeri  $<0,1$  olarak belirlenmiştir. Üreme olan kuyucuklarda ise OD değeri 1,5' un üzerindedir. OD değeri için  $<0,1$ , sınır değer olarak belirlenmiştir fakat plaklar görsel olarak değerlendirildiğinde de aynı sonuçlar elde edildiği için, izolatların MBEK' inin değerlendirmesine görsel olarak devam edilmiştir.

KA-MHB MBEK plağından elde edilen MİK değeri okunduğunda, MİK değerleri ile tutarlı olmadığı görülmüştür. Çizelge 4. 4.' de suşlara ait MİK değerleri ve KA-MHB MBEK plağından elde edilen MİK değerleri gösterilmiştir.

**Çizelge 4.4.** Suşlara ait MİK değerleri ve KA-MHB MBEK plağından elde edilen MİK değerleri.

İzolat No.	MİK Değerleri (mg/L)*					KA-MHB MBEK Plağından Elde Edilen MİK Değerleri (mg/L)*				
	Genta	AMC	Nitro	Seftri	Sipro	Genta	AMC	Nitro	Seftri	Sipro
ATCC	0,5	4	8	0,032	0,004	4	16	64	1024	$\leq 2$
30	1	8	8	$\geq 128$	64	2	8	32	$\geq 1024$	32
5	64	32	8	$\geq 128$	64	256	128	32	$\geq 1024$	128
10	128	64	8	0,25	128	128	512	32	$\leq 2$	128
81	4	128	8	$\geq 128$	128	4	512	32	1024	256
92	128	64	8	$\geq 128$	$\geq 128$	512	512	64	$\geq 1024$	512
93	1	64	8	$\geq 128$	128	4	512	32	1024	256
63	1	$\geq 128$	8	$\geq 128$	128	$\leq 2$	1024	8	$\geq 1024$	512
101	0,5	4	8	$\geq 128$	32	4	512	32	1024	512
120	4	128	16	$\geq 128$	128	16	1024	64	$\geq 1024$	$\geq 1024$
128	2	$\geq 128$	8	$\geq 128$	$\geq 128$	4	1024	64	1024	1024
130	1	$\geq 128$	8	$\geq 128$	128	$\leq 2$	256	8	512	128
141	1	4	8	$\geq 128$	32	4	4	32	$\geq 1024$	32

İzolat No: İzolat Numarası, Genta: Gentamisin, AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, Nitro: Nitrofunratoin, Seftri: Seftriakson, Sipro: Siprofloksasin.

\* Trimetoprim/sulfametoksazol, KA-MHB MBEK plağından elde edilen MİK değerlerinde tüm suşlar için  $\geq 512$  mg/L' dir.



**Çizelge 4.4.** Suşlara ait MİK değerleri ve KA-MHB plağından elde edilen MİK değerleri (devam).

İzolat No.	MİK Değerleri (mg/L)*					KA-MHB MBEK Plağından Elde Edilen MİK Değerleri (mg/L)*				
	Genta	AMC	Nitro	Seftri	Sipro	Genta	AMC	Nitro	Seftri	Sipro
142	1	64	≤1	≥128	128	8	1024	16	1024	256
69	2	≥128	8	≥128	128	≤2	1024	16	≥1024	256
159	1	≥128	8	0,125	32	≤2	≥1024	16	≤2	32
160	64	16	8	≥128	32	≥1024	128	32	≥1024	32
162	≥128	32	4	≥128	128	512	32	8	1024	128
166	1	128	8	0,0625	128	8	256	64	4	512
169	≥128	64	8	≥128	≥128	512	1024	128	≥1024	1024
177	0,5	≥128	8	≥128	1	4	≥1024	32	≥1024	4
179	0,5	8	8	≥128	32	4	16	16	≥1024	32
184	0,5	8	4	≥128	32	16	16	16	≥1024	32
186	1	64	8	≥128	128	8	512	16	≥1024	256
200	64	32	8	≥128	64	512	512	64	1024	≥1024
202	2	128	8	≥128	128	4	512	32	1024	256
208	1	16	16	0,0625	0,0625	8	64	128	512	128
211	1	8	8	0,0625	32	4	8	32	≤2	≥1024
232	1	8	8	0,25	32	4	4	64	4	512
234	1	≥128	8	≥128	64	4	1024	64	≥1024	≥1024
32	64	128	8	≥128	128	512	512	64	≥1024	≥1024
58	1	8	8	8	64	≤2	8	8	128	≥1024
249	1	≥128	8	≥128	128	≤2	64	8	64	128
252	1	≥128	8	≥128	128	4	128	32	≥1024	256
275	1	≥128	8	0,25	1	4	64	128	≤2	16
290	1	≥128	8	≥128	128	4	1024	32	512	256
52	128	≥128	8	≥128	0,125	≥1024	1024	128	≥1024	≥1024
54	128	≥128	8	≥128	0,125	≥1024	1024	32	≥1024	≥1024
94	2	8	8	64	8	4	1024	256	1024	≥1024
137	0,5	4	16	0,008	8	≥1024	1024	512	1024	≥1024
21	2	64	16	0,032	64	≥1024	1024	64	128	≥1024
46	≥128	128	16	≥128	≥128	≥1024	1024	32	≥1024	≥1024
86	1	128	16	0,032	128	≥1024	1024	256	64	≥1024

İzolat No: İzolat Numarası, Genta: Gentamisin, AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, Nitro: Nitrofunratoin, Seftri: Seftriakson, Sipro: Siprofloksasin.

\* Trimetoprim/sulfametoksazol, KA-MHB MBEK plağından elde edilen MİK değerlerinde tüm suşlar için ≥512 mg/L' dir.

**Çizelge 4.4.** Suşlara ait MİK değerleri ve KA-MHB plağından elde edilen MİK değerleri (devam).

İzolat No.	MİK Değerleri (mg/L)*					KA-MHB MBEK Plağından Elde Edilen MİK Değerleri (mg/L)*				
	Genta	AMC	Nitro	Seftri	Sipro	Genta	AMC	Nitro	Seftri	Sipro
98	128	128	128	≥128	64	≥1024	512	512	≥1024	≥1024
4	128	128	64	≥128	128	128	128	128	1024	64
40	0,5	4	16	0,064	0,002	16	8	128	4	4
2	0,25	2	16	0,032	0,004	4	16	32	4	≤2
90	0,5	2	8	0,032	0,002	≥1024	32	1024	≤2	≥1024
99	0,5	32	128	0,064	128	4	256	256	≤2	≥1024
103	0,5	2	32	0,032	0,002	≥1024	256	512	≥1024	≥1024
19	64	32	8	≥128	64	≥1024	256	1024	≥1024	≥1024
124	2	≥128	8	0,032	128	4	1024	1024	4	≥1024
153	1	≥128	32	1	8	8	1024	1024	≥1024	≥1024
175	0,5	16	4	≥128	32	≤2	64	6	≥1024	≥1024
256	2	128	8	≥128	128	≤2	256	8	≥1024	256
23	0,5	2	8	0,016	0,004	4	≤2	16	≤2	≤2
118	1	4	8	0,004	0,004	≥1024	64	128	≥1024	≤2
121	0,5	4	16	0,016	0,002	≥1024	64	128	512	≥1024
77	1	128	4	0,016	128	4	512	64	512	≥1024
174	1	≥128	16	≥128	0,125	4	≥1024	64	≥1024	≥1024
44	1	4	16	0,032	0,004	≥1024	128	128	≥1024	≥1024
279	2	8	16	0,016	32	≤2	16	16	≤2	≥1024
57	≤0,25	2	16	0,016	0,004	≤2	≤2	32	64	≥1024
49	≤0,25	4	8	0,004	0,008	4	≤2	32	16	≥1024
22	1	8	16	0,008	0,25	≥1024	256	256	32	≥1024
27	1	4	16	0,016	0,0625	16	32	128	32	≥1024
29	2	8	16	0,002	0,004	≤2	32	128	32	≥1024
35	0,5	8	16	0,032	0,004	≤2	16	16	≤2	≥1024
36	1	1	16	0,032	0,004	≥1024	128	128	≥1024	≥1024
39	1	4	16	0,008	0,002	4	64	64	≥1024	≥1024
1	1	32	16	0,032	16	≥1024	≥1024	128	≥1024	≥1024
14	≥128	128	16	≥128	≥128	512	1024	16	≥1024	512
71	64	32	16	≥128	≥128	≥1024	128	1024	≥1024	≥1024

İzolat No: İzolat Numarası, Genta: Gentamisin, AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, Nitro: Nitrofunratoin, Seftri: Seftriakson, Sipro: Siprofloksasin.

\* Trimetoprim/sulfametoksazol, KA-MHB MBEK plağından elde edilen MİK değerlerinde tüm suşlar için ≥512 mg/L' dir.

**Çizelge 4.4.** Suşlara ait MİK değerleri ve KA-MHB plağından elde edilen MİK değerleri (devam).

İzolot No.	MİK Değerleri (mg/L)*					KA-MHB MBEK Plağından Elde Edilen MİK Değerleri (mg/L)*				
	Genta	AMC	Nitro	Seftri	Sipro	Genta	AMC	Nitro	Seftri	Sipro
79	≥128	128	16	≥128	≥128	≥1024	1024	512	≥1024	≥1024
87	≥128	≥128	16	≥128	≥128	512	1024	32	≥1024	≥1024
9	128	64	16	0,032	0,004	≤2	16	16	≤2	≤2
48	0,5	8	16	0,004	0,002	≥1024	32	256	≤2	32
37	1	32	16	0,032	0,0625	≥1024	64	128	≤2	≥1024
15	1	4	16	0,016	0,002	512	4	256	≤2	≥1024
56	0,5	4	32	0,016	0,002	8	32	128	4	≥1024

İzolot No: İzolat Numarası, Genta: Gentamisin, AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, Nitro: Nitrofurantoin, Seftri: Seftriakson, Sipro: Siprofloksasin.

\* Trimetoprim/sulfametoksazol, KA-MHB MBEK plağından elde edilen MİK değerlerinde tüm suşlar için ≥512 mg/L' dir.

ST131 ve ST131 dışı olarak sınıflanan izolatların MBEK değerleri göz önüne alındığında ise, seftriakson ( $p=0,017$ ) ve siprofloksasin ( $p<0,001$ ) MBEK değerleri ST131 izolatlarında daha yüksektir. Amoksisilin/klavulonik asit ( $p=0,488$ ), nitrofurantoin ( $p=0,102$ ) ve trimetoprim/sulfametoksazol ( $p=1,000$ ) ve gentamisin ( $p=0,638$ )' de MBEK değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir. Örnek MBEK plağı, Çizim 4. 4.' de gösterilmiştir.

A, B1, B2 ve D filogenetik gruplarla antibiyogram verilerinin karşılaştırılabilmesi için, öncelikle ST131 pozitif izolatlar B2 filogenetik grubuna dahil edilmiştir. Yapılan çalışmada, 2 adet nitrofurantoin dirençli izolat tanımlanmıştır. Dirençli bu 2 izolatın, A filogenetik grubunda olduğu görülmüştür. Ayrıca, nitrofurantoinine ait MİK değerleri, A filogenetik grubunda diğer gruplara göre daha yüksektir ( $p<0,001$ ).



**Çizim 4.4.** MBEK plağına ait örnek görüntü (TSB besiyeri). Birinci sütun, pozitif kontrol; ikinci sütun, sterilite kontrol; diğer sütunlar, antibiyotik dilüsyonları.

MBEK değerleri filogenetik gruplar ile karşılaştırıldığında, gentamisin ( $p=0,014$ ) ve nirofurantoinde ( $p=0,011$ ) istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmüştür. Buradaki anlamlı farklılık, gentamisin ve nitrofurantoin MBEK değerlerinin, D filogenetik grubunda B2 filogenetik grubuna göre daha yüksek olmasıyla ilişkilidir (sırasıyla  $p=0,009$  ve  $p=0,002$ ). Amoksisilin/klavulonik asit, trimetoprim/sulfametoksazol, siprofloksasin ve seftriaksonda istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlenmemiştir (sırasıyla  $p=1,000$ ,  $p=0,436$ ,  $p=0,669$  ve  $p=0,791$ ). Suşlara ait  $MİK_{50}$ ,  $MİK_{90}$ ,  $MBEK_{50}$  ve  $MBEK_{90}$  ve belirlenen antibiyotik konsantrasyon aralıkları, Çizelge 4. 5.' de gösterilmiştir. Filogenetik gruplara ve ST131 klonal gruplara ait ortanca  $MİK$  ve MBEK değerleri, Çizelge 4. 6.' da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.5.** Suşlara ait MİK<sub>50</sub>, MİK<sub>90</sub>, MBEK<sub>50</sub>, MBEK<sub>90</sub> ve belirlenen aralık değerleri.

Antibiyotikler	mg/L					
	MİK <sub>50</sub>	MİK <sub>90</sub>	MİK Aralığı	MBEK <sub>50</sub>	MBEK <sub>90</sub>	MBEK Aralığı
AMC	32	≥128	1 - 128	512	≥1024	2 - 1024
Gentamisin	1	128	0,25 - 128	4	≥1024	2 - 1024
Nitrofurantoin	8	16	1 - 128	128	≥1024	4 - 1024
Seftriakson	64	128	0,002 - 128	1024	≥1024	2 - 1024
Siprofloksasin	32	128	0,002 - 128	1024	≥1024	2 - 1024
SXT	128	≥128	0,032 - 128	≥512	≥512	512 - ≥512

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol

**Çizelge 4.6.** Filogenetik gruplara ve ST131 klonal grubuna ait ortalanca MİK ve MBEK verileri.

Antibiyotikler	Ortanca MİK					Ortanca MBEK				
	ST131	A	B1	B2	D	ST131	A	B1	B2	D
Nitrofurantoin	8	16	8	16	16	128	≥1024	64	128	≥1024
Gentamisin	1	0,5	1	1	1	4	4	4	4	32
Seftriakson	≥128	0,032	0,032	0,016	0,032	≥1024	1024	256	32	1024
SXT	≥128	1	128	0,0625	0,25	≥512	≥512	≥512	≥512	≥512
AMC	64	32	32	4	32	1024	512	256	1024	256
Siprofloksasin	64	64	8	0,004	0,0625	1024	256	1024	256	256

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol

MBEK değeri, MİK sınır değerine göre değerlendirilerek, bakteri duyarlı veya dirençli olarak sınıflandırılmıştır. Ülkemizin kullandığı standardın EUCAST olması nedeniyle, EUCAST sınır değer önerileri, mevcut çalışmada kullanılmıştır (EUCAST 2019a). Bu bakış açısıyla, EUCAST duyarlılık sınır değer önerileri MBEK verilerine uygulandığında, izolatların 1,5 - 24,5 kat daha dirençli olarak değerlendirilmesi gerektiği görülmüştür (EUCAST 2019a). En yüksek artışın nitrofurantoinde (24,5 kat artış) olduğu görülmüştür. Fakat yine de yaklaşık 3 kat artış göstermiş gentamisinden daha az oranda dirençli izolat mevcuttur. Seftriakson, trimetoprim/sulfametoksazol ve siprofloksasinde ise izolatların tamamının dirençli hale geldiği görülmüştür. Benzer bir şekilde, izolatların tamamı çoklu ilaç direncine sahip hale geldiği belirlenmiştir. MİK ve MBEK verilerine göre dirençli izolat sayıları, Çizelge 4. 7.' de gösterilmiştir.

**Çizelge 4.7. MİK ve MBEK verilerine göre dirençli izolat sayıları ve yüzdeleri.**

Antibiyotikler	Dirençli izolat sayısı (%) n=80	
	MİK Değerine Göre	MBEK Değerine Göre
Nitrofurantoin	2 (2,5)	49 (61,3)
Gentamisin	21 (26,3)	67 (83,8)
Seftriakson	42 (52,5)	80 (100)
SXT	42 (52,5)	80 (100)
AMC	49 (61,3)	78 (97,5)
Çoklu Direnç	49 (61,3)	80 (100)
Siprofloksasin	54 (67,5)	80 (100)

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol

Bakterilerin, antibiyotiklerden bazılarına karşı biyofilm varlığında 32000 kat daha dirençli olabildiği belirlenmiştir. Özellikle seftriakson, siprofloksasin ve trimetoprim/sulfametoksazole karşı duyarlılık, biyofilm varlığında dramatik bir biçimde azalmıştır. MBEK/MİK oranındaki değişiklik, suşlar arasında homojen olarak dağılmamaktadır; aynı MİK' e sahip iki farklı izolatta MBEK değerleri farklılık gösterebilmektedir. Örneğin, seftriakson için MİK değeri 0,032 mg/L olan bir suşun MBEK değeri 1024 mg/L olabiliyorken, başka bir suşun MBEK değeri 128 mg/L olabilmektedir. Antibiyotiklerin minimum ve maksimum kat artış değerleri, Çizelge 4. 8.' de gösterilmiştir. Tüm izolatlara ait MİK ve MBEK sonuçları, Çizelge 4. 9.' da gösterilmiştir.

**Çizelge 4.8.** Antibiyotiklere ait MBEK/MİK oranları.

Antibiyotikler	MBEK/MİK Oranı (mg/L)		
	Minimum	*Ortanca	Maksimum
Nitrofurantoin	1	16	128
Gentamisin	1	4	2048
Seftriakson	1	16	32000
SXT	4	4	16000
AMC	1	16	1024
Siprofloksasin	1	32	32000

\*Ortanca MBEK/MİK değeri,  $MBEK_{50}/MİK_{50}$  olarak hesaplanmıştır. AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol

**Çizelge 4.9. İzolatlara ait MİK ve MBEK sonuçları.**

İzolat Numarası	MİK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						MBEK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						ST131 Durumu	Filogrup
	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin		
ATCC	8	0,5	0,032	0,0625	4	0,004	64	32	1024	512	128	128	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
30	8	1	≥128	≥128	8	64	32	4	≥1024	≥512	256	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
5	8	64	≥128	≥128	32	64	64	≥1024	≥1024	≥512	128	1024	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
10	8	128	0,25	≥128	64	128	32	≥1024	16	≥512	512	≥1024	+	B2
	(S)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
81	8	4	≥128	128	128	128	≥1024	4	1024	512	512	1024	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
92	8	128	≥128	≥128	64	≥128	256	≥1024	≥1024	≥512	512	≥1024	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
93	8	1	≥128	≥128	64	128	128	4	1024	≥512	512	≥1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
63	8	1	≥128	≥128	≥128	128	16	≤2	≥1024	≥512	1024	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
101	8	0,5	≥128	128	4	32	128	4	1024	≥512	≥1024	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
120	16	4	≥128	0,25	128	128	64	8	≥1024	≥512	1024	1024	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
128	8	2	≥128	128	≥128	≥128	1024	4	≥1024	≥512	1024	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
130	8	1	≥128	128	≥128	128	32	≤2	≥1024	≥512	256	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
141	8	1	≥128	≥128	4	32	128	4	≥1024	≥512	16	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol.



**Çizelge 4.9. İzolatlara ait MİK ve MBEK sonuçları (devam).**

İzolat Numarası	MİK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						MBEK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						ST131 Durumu	Filogrup
	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin		
142	≤1	1	≥128	128	64	128	64	8	≥1024	≥512	1024	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
69	8	2	≥128	128	≥128	128	32	≤2	≥1024	≥512	≥1024	≥1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
159	8	1	0,125	0,25	≥128	32	16	≤2	1024	≥512	≥1024	≥1024	+	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
160	8	64	≥128	≥128	16	32	64	≥1024	≥1024	≥512	128	1024	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
162	4	≥128	≥128	0,25	32	128	16	512	≥1024	≥512	64	128	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
166	8	1	0,0625	0,25	128	128	64	4	512	≥512	256	≥1024	+	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
169	8	≥128	≥128	0,25	64	≥128	≥1024	≥1024	≥1024	≥512	≥1024	≥1024	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
177	8	0,5	≥128	0,25	≥128	1	128	4	≥1024	≥512	≥1024	512	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
179	8	0,5	≥128	≥128	8	32	256	4	≥1024	512	≥1024	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
184	4	0,5	≥128	≥128	8	32	16	4	≥1024	512	≥1024	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
186	8	1	≥128	0,032	64	128	64	4	≥1024	≥512	≥1024	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
200	8	64	≥128	0,25	32	64	1024	≥1024	≥1024	≥512	1024	1024	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
202	8	2	≥128	≥128	128	128	256	4	≥1024	≥512	512	512	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol.

**Çizelge 4.9. İzolatlara ait MİK ve MBEK sonuçları (devam).**

İzolat Numarası	MİK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						MBEK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						ST131 Durumu	Filogrup
	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin		
208	16	1	0,0625	0,25	16	0,0625	1024	4	≥1024	≥512	≥1024	256	+	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
211	8	1	0,0625	0,25	8	32	128	4	≤2	≥512	16	1024	+	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
232	8	1	0,25	128	8	32	256	≤2	64	≥512	≥1024	512	+	B2
	(S)	(S)	(S)	(R)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
234	8	1	≥128	≥128	≥128	64	256	4	≥1024	≥512	≥1024	≥1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
32	8	64	≥128	0,25	128	128	1024	≥1024	≥1024	≥512	512	≥1024	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
58	8	1	8	≥128	8	64	32	≤2	128	≥512	8	≥1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)		
249	8	1	≥128	≥128	≥128	128	512	≤2	128	512	128	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
252	8	1	≥128	≥128	≥128	128	32	4	≥1024	≥512	128	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
275	8	1	0,25	≥128	≥128	1	128	4	256	≥512	128	64	+	B2
	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
290	8	1	≥128	≥128	≥128	128	64	4	≥1024	≥512	1024	1024	+	B2
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
52	8	128	≥128	≥128	≥128	0,125	1024	1024	≥1024	≥512	≥1024	256	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
54	8	128	≥128	≥128	≥128	0,125	≥1024	≥1024	≥1024	≥512	≥1024	512	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
94	8	2	64	≥128	8	8	256	4	1024	≥512	1024	1024	+	B2
	(S)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol.

**Çizelge 4.9. İzolatlara ait MİK ve MBEK sonuçları (devam).**

İzolat Numarası	MİK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						MBEK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						ST131 Durumu	Filogrup
	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin		
137	16	0,5	0,008	0,0625	4	8	1024	≥1024	4	512	1024	1024	+	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
21	16	2	0,032	≥128	64	64	≥1024	4	128	≥512	1024	≥1024	U.D.	A
	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
46	16	≥128	≥128	≥128	128	≥128	32	≥1024	≥1024	≥512	1024	≥1024	U.D.	A
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
86	16	1	0,032	1	128	128	≥1024	8	1024	≥512	≥1024	≥1024	U.D.	A
	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
98	128	128	≥128	≥128	128	64	≥1024	≥1024	≥1024	≥512	1024	1024	U.D.	A
	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
4	64	128	≥128	1	128	128	64	256	≥1024	≥512	128	128	U.D.	A
	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
40	16	0,5	0,064	0,125	4	0,002	≥1024	4	32	≥512	512	256	U.D.	A
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
2	16	0,25	0,032	0,125	2	0,004	64	4	≤2	≥512	≤2	256	U.D.	A
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)		
90	8	0,5	0,032	0,125	2	0,002	≥1024	4	1024	≥512	256	256	U.D.	A
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
99	128	0,5	0,064	≥128	32	128	≥1024	16	≥1024	≥512	≥1024	512	U.D.	A
	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
103	32	0,5	0,032	128	2	0,002	64	4	512	≥512	256	256	U.D.	A
	(S)	(S)	(S)	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
19	8	64	≥128	≥128	32	64	128	1024	≥1024	≥512	1024	≥1024	U.D.	B1
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
124	8	2	0,032	≥128	≥128	128	64	4	32	≥512	1024	≥1024	U.D.	B1
	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol.

**Çizelge 4.9. İzolatlara ait MİK ve MBEK sonuçları (devam).**

İzolat Numarası	MİK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						MBEK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						ST131 Durumu	Filogrup
	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin		
153	32	1	1	≥128	≥128	8	≥1024	≤2	1024	≥512	≥1024	≥1024	U.D.	B1
	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
175	4	0,5	≥128	≥128	16	32	4	≤2	≥1024	≥512	64	1024	U.D.	B1
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
256	8	2	≥128	≥128	128	128	8	≤2	≥1024	≥512	256	1024	U.D.	B1
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
23	8	0,5	0,016	0,25	2	0,004	64	4	256	≥512	256	256	U.D.	B1
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
118	8	1	0,004	0,25	4	0,004	64	8	256	≥512	32	256	U.D.	B1
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
121	16	0,5	0,016	0,032	4	0,002	512	4	16	≥512	128	64	U.D.	B1
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
77	4	1	0,016	0,0625	128	128	128	4	256	≥512	512	≥1024	U.D.	B1
	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
174	16	1	≥128	128	≥128	0,125	≥1024	4	≥1024	≥512	≥1024	512	U.D.	B1
	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
44	16	1	0,032	0,25	4	0,004	≥1024	4	≥1024	≥512	256	512	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
279	16	2	0,016	0,0625	8	32	≥1024	≤2	≤2	≥512	512	1024	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
57	16	≤0,25	0,016	0,0625	2	0,004	128	8	≤2	≥512	1024	256	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
49	8	≤0,25	0,004	0,032	4	0,008	32	≤2	≤2	≥512	256	128	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
22	16	1	0,008	0,032	8	0,25	128	4	≥1024	≥512	1024	512	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol.

**Çizelge 4.9. İzolatlara ait MİK ve MBEK sonuçları (devam).**

İzolat Numarası	MİK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						MBEK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						ST131 Durumu	Filogrup
	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin		
27	16	1	0,016	0,032	4	0,0625	128	8	32	≥512	≥1024	256	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
29	16	2	0,002	0,0625	8	0,004	128	4	32	≥512	≥1024	128	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
35	16	0,5	0,032	0,0625	8	0,004	32	≤2	8	≥512	16	16	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)		
36	16	1	0,032	0,0625	1	0,004	128	4	1024	≥512	≥1024	256	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
39	16	1	0,008	0,0625	4	0,002	64	8	≥1024	≥512	≥1024	256	-	B2
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
1	16	1	0,032	128	32	16	1024	32	1024	≥512	256	1024	U.D.	D
	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
14	16	≥128	≥128	0,25	128	≥128	≥1024	512	≥1024	≥512	512	1024	U.D.	D
	(S)	(R)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
71	16	64	≥128	≥128	32	≥128	≥1024	≥1024	≥1024	≥512	512	≥1024	U.D.	D
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
79	16	≥128	≥128	≥128	128	≥128	≥1024	≥1024	≥1024	≥512	1024	≥1024	U.D.	D
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
87	16	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128	≥1024	≥1024	≥1024	≥512	≥1024	≥1024	U.D.	D
	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
9	16	128	0,032	0,0625	64	0,004	32	≥1024	≤2	≥512	256	4	U.D.	D
	(S)	(R)	(S)	(S)	(R)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
48	16	0,5	0,004	0,25	8	0,002	1024	8	32	≥512	128	256	U.D.	D
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
37	16	1	0,032	0,25	32	0,0625	≥1024	4	1024	≥512	256	256	U.D.	D
	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol.

**Çizelge 4.9.** İzolatlara ait MİK ve MBEK sonuçları (devam).

İzolat Numarası	MİK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						MBEK Değerleri (mg/L) (duyarlılık durumu)						ST131 Durumu	Filogrup
	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin	Nitrofurantoin	Gentamisin	Seftriakson	SXT	AMC	Siprofloksasin		
15	16	1	0,016	0,25	4	0,002	512	256	1024	≥512	1024	256	U.D.	D
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		
56	32	0,5	0,016	0,032	4	0,002	≥1024	4	256	≥512	64	≤2	U.D.	D
	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(S)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)	(R)		

AMC: Amoksisilin/klavulonik asit, SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol.

## 5. TARTIŞMA

Bu çalışma ile, üriner sistem enfeksiyonu etkeni olan *Escherichia coli* (*E. coli*) izolatlarının, ülkemizde en sık kullanılan antibiyotiklere karşı minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının (MBEK) belirlenmesi ve minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ile filogenetik gruplara göre karşılaştırılması planlanmıştır.

Rutin kullanımda MBEK belirlemek için standart bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle, yapılan çalışmayla yöntem optimizasyonu da araştırılmıştır. Yöntem optimizasyonu değerlendirildiğinde, kullandığımız yöntemin uygulanabilir ve tekrarlanabilir olduğu görülmüştür. Piyasada MBEK saptanmasında kullanılan plak sistemleri mevcuttur fakat bunların pahalı olduğu bilinmektedir. Hibridoma taramalarında antikor üretimi için kullanılan ve alternatiflerine göre daha ucuz olan bir kapak sistemi (ImmunoTSP lid, Thermo Fisher Scientific, ABD), ticari MBEK sistemlerine alternatif ve daha ucuz olarak kullanılabilir (Harrison ve diğ. 2010). Çalışmamızda bu sistem kullanılmıştır.

Mevcut sistemi kuyucukta oluşturulan biyofilmle gerçekleştirilen antimikrobiyal duyarlılık testlerinden ayıran en önemli özellik, biyofilmin peglerde oluşturularak yıkamanın kolaylaştırılmasıdır. Böylelikle, kuyucuk temelli yöntemlerdeki gibi biyofilme pipet ucu ile dokunulma ve biyofilmin kaldırılması riski ortadan kalkmış olur. Ayrıca, antimikrobiyal madde dilüsyonları ayrı bir plakta gerçekleştirildiği ve biyofilm üzerine manüplasyon daha az olduğu için çapraz kontaminasyon riski çok daha düşüktür. Bunların haricinde, kuyucukta oluşturulan biyofilmle gerçekleştirilen antimikrobiyal duyarlılık testlerinde, adere olmamış planktonik hücrelerin yıkama sonucu ortamda kalma riski bulunmaktadır. Yüksek-verimli tarama olarak tanımlanan ve peglerin bulunduğu kapaklarla gerçekleştirilen sistemlerde, bu risk çok daha düşüktür. Biyofilm kapakta oluşturulduğundan, hücre sedimentasyonuna bağlı bir yığından ziyade, hücrelerin sesil forma geçişinin sonucuna bağlı bir duyarlılık testi gerçekleştirilmektedir (Harrison ve diğ. 2010, Azeredo ve diğ. 2017). Ayrıca, peg içeren plak kapağı temelli yöntemle, koloni sayımı vasıtasıyla canlı hücre belirlenebilmektedir. Bu da biyofilm içerisindeki gerçek mikrobiyal yükün belirlenebilmesi için önemlidir (Franklin ve diğ. 2016). Peg içeren plak kapağı temelli yöntemin çeşitli boyama ve mikroskopik metotlarla birleştirilme ihtimali de mevcuttur (O'Toole 2011, Franklin ve diğ. 2016, Azeredo ve diğ. 2017, Haney ve diğ. 2018). Denenen sistemin en büyük dezavantajı ise, birden çok 96 kuyucuklu plağa ihtiyaç duyulmasıdır (Haney ve diğ. 2018).

Plak sistemleriyle biyofilm oluşturulmaya çalışılan bazı türler için biyofilm verimliliğini arttırmak amacıyla, biyofilm oluşturulacak alanların çeşitli ürünlerle kaplanması gerekebilmektedir. Üriner sistem enfeksiyonu etkeni olan *E. coli* izolatlarının VCC değerleri göz önünde bulundurulduğunda, böyle bir kaplamaya ihtiyaç duyulmamıştır. Bu bulgu, yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermektedir (Ceri ve diğ. 1999, Harrison ve diğ. 2010).

Biyofilm oluşumunun optimizasyonu için, cihaz standardizasyonu önemlidir. Yapılan çalışmada, *E. coli* izolatları için 115 rpm ile daha yoğun oranda biyofilm elde edilmiştir. Çalışmamızda orbital çalkalama gerçekleştiren bir etüv ve mikropalak sistemi kullanılmıştır. Sallanan hareket ve oluk sistemi kullanılan formlar da bulunmaktadır; bu tip sistemler pegleri içeren plak kapağının bir satırının tamamının aynı izolat ile kaplanmasında kullanılmaktadır. İki yöntemde de sıvının akışını sağlayan sistemin optimizasyonu gereklidir (Harrison ve diğ. 2010). Orbital çalkalama gerçekleştiren bir etüv ve mikropalak sisteminin kullanımı, her kuyucuğa ayrı ayrı müdahale edebilmeyi sağlamaktadır. Böylelikle, çapraz kontaminasyonun belirlenmesini kolaylaştırabildiği için sterilite kontrolün her satırda kullanılabilmesi sağlanmıştır.

Çalışılan yöntem ile plağın her kuyucuğunda benzer oranda biyofilm oluşturulabilmektedir ( $p=0,072$ ). Standart *E. coli* suşlarıyla yapılan bazı çalışmalarda inokulum miktarı  $1 \times 10^7$  KOB/ml olarak kullanılmıştır ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda  $\sim 7 \log_{10}$ KOB/peg oranında bakteri elde edilmiştir (Ceri ve diğ. 1999, Harrison ve diğ. 2010). Çalışmamızda ise inokulum miktarı  $5 \times 10^6$  KOB/ml olarak kullanılmıştır ve  $\sim 8 \log_{10}$ KOB/peg bakteri elde edilmiştir. Bu nedenle, üriner sistem enfeksiyonu etkeni *E. coli* izolatlarıyla yapılacak çalışmalar için, başlangıç inokulum miktarının 0,5 McFarland standardının 1:30 dilüsyonu şeklinde standardize edilmesi tarafımızca önerilmektedir. Başka türler ve hatta suşlar için ayrıca çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışılan toplam 80 suş arasında canlı hücre sayısı (viable cell count - VCC) değerlerinde bir farklılık belirlenmemiştir ( $p=0,116$ ). Aynı zamanda, biyofilm oluşturmayan bir izolata rastlanmamıştır. Suşlara ait en düşük MVCC değeri 8,020  $\log_{10}$  KOB/peg iken en yüksek MVCC değeri ise 8,490  $\log_{10}$  KOB/peg' dir. Daha önce yapılan bazı çalışmalarda, biyofilm oluşturmayan izolatlarla karşılaşılmıştır ve izolatlar genel olarak biyofilm oluşturamayanlar, zayıf, orta ve yüksek düzey biyofilm oluşturanlar gibi farklı gruplarda incelenmiştir. Poursina ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği üriner sistem enfeksiyonu kökenli *E. coli* izolatlarını kapsayan çalışmada, suşların %20' sinin biyofilm oluşturamadığı



belirlenmiştir (Poursina ve diğ. 2018). Gonzalez ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada ise, üriner sistem enfeksiyonu kökenli toplam 116 *E. coli* suşunun biyofilm oluşturma yeteneği araştırılmış ve suşların %58,6' sının biyofilm oluşturmadığı görülmüştür. Ayrıca, biyofilm oluşturan toplam 48 izolatın 27' si D grubuna, 11' i B2 grubuna, 6' sı A grubuna ve 4' ü B1 filogenetik grubuna dahil olarak belirlenmiştir (Gonzalez ve diğ. 2017). Çalışmamızda ise 49 B2, 10 A, 10 B1 ve 10 D suşunun hepsi biyofilm oluşturmaktadır ve VCC değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Buradaki önemli bir etken yöntem farklılığı olabilir. Mevcut plak-kapak sistemiyle, üriner sistem enfeksiyonu kökenli klinik *E. coli* izolatlarına ait çalışma literatürde sınırlıdır. Ayrıca, literatürde iki yöntemi karşılaştıran herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır; bu nedenle iki yöntemin karşılaştırmasını amaçlayan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Farklı türlerin ve hatta farklı suşların biyofilm oluşturma yeteneğinin aynı olmadığı unutulmamalıdır. Gerçekleştirilen çalışma sonucunda, üriner sistem enfeksiyonu etkeni *E. coli* izolatlarının peg içeren plak kapağı temelli yöntemler ile biyofilm oluşturma verimliliğinin yüksek olduğu söylenebilir. Bu nedenle, MBEK verilerinin peg içeren plak kapağı temelli yöntemlerle araştırılmasında, yöntem optimizasyonu gerçekleştirildikten sonra izolat bazında VCC değerlerini belirlemenin şart olmadığı düşünülmektedir. Önemli olan nokta, MBEK testleri yapılırken çalışmaya, mikrodilüsyon testlerine benzer bir şekilde biyofilm üreme kontrolü, sterilite kontrolü ve standart suşun dahil edilmesi gerekliliğidir.

MBEK testinin gerçekleştirilebilmesi için komplike ve özelleşmiş cihazların bulunması gerekli değildir (Azeredo ve diğ. 2017). Yöntemin değerlendirilebilmesi için, spektrofotometrik okuma kullanılabilir fakat şart değildir; inkübasyon sonunda bulanıklık, MİK belirlemeye yönelik mikrodilüsyon testine benzer bir şekilde değerlendirilebilmektedir (Reiter ve diğ. 2013). Çalışmamızda, MBEK deney optimizasyonu kısmında MBEK sonuçlarının okunmasında spektrofotometrik yöntem ve görsel değerlendirme 6 farklı antibiyotikte, 5 farklı izolatta ve 2 tekrarla karşılaştırılmış olup, belirlenen MBEK değerlerinde fark görülmemiştir. Bu nedenle, görsel MBEK değeri okunmaya devam edilmiştir. MİK belirlemeye yönelik mikrodilüsyon testlerinde kullanılan standart laboratuvar cihazları haricinde, ultrasonik banyo ve çalkalamalı etüv ihtiyacı bulunmaktadır (Ceri ve diğ. 1999, Harrison ve diğ. 2010). Üropatojenik *E. coli*' nin MBEK verilerine ait sonuç verme süresi, izolata ait taze kültür elde edildikten sonra 4 gün olarak belirlenmiştir. MBEK değeri MİK değerinden daha düşük olan bir izolat tanımlanmamıştır.

Sonikasyon işlemi MBEK belirleme için elzemdir. Sonikasyonun uzun süreli uygulanması sonucu, antibiyotik ile fiziksel olarak zayıflamış hücrelerde yıkım ve hücre ölümleri gerçekleşebilmektedir (Harrison ve diğ. 2010). Buna bağlı olarak sonikasyon sonucunda elde edilen hücre sayısında düşüş görülebilmektedir (Ali ve diğ. 2006). Bu nedenle sonikasyon süresinin optimizasyonu için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ali ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada süre olarak 10 dakika önerilmiştir (Ali ve diğ. 2006); çalışmamızda da bu süre uygulanmıştır. Sonuç olarak sonikasyon sonrası yüksek oranda hücre üremesi elde edilebilmiştir.

ST131 izolatlarının sebep olduğu enfeksiyonlarda yüksek antibiyotik direnci ve tedavi başarısızlığı, ülkemizde ve dünyada büyük bir sorun haline gelmiştir (Er ve diğ. 2015, Can ve diğ. 2015, Can ve diğ. 2016, Demirci ve diğ. 2019). Çizmeci ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği çalışmada, ST131 ve ST131 dışı izolatların toplamında siprofloksasin direnci %62,5 ve trimetoprim/sulfametoksazol direnci %69,4 olarak belirlenmiştir (Çizmeci ve diğ. 2018). Ek olarak Can ve arkadaşlarının kan kökenli izolatlarda yaptıkları çalışmada, ST131 izolatlarının direncinin bazı antibiyotiklere karşı %98' e kadar çıkabildiği görülmüştür (Can ve diğ. 2016). Çalışmamızda, ST131 izolatlarının siprofloksasin direnci %92,3; trimetoprim/sulfametoksazole direnci ise %69,2 olarak belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada ST131 izolatlarının seftriakson, trimetoprim/sulfametoksazol, amoksisilin/klavulonik asit ve siprofloksasine karşı, ST131 dışı izolatlardan daha dirençli olduğu görülmüştür (sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p=0,007$ ,  $p=0,037$  ve  $p<0,001$ ). Ayrıca, ST131 izolatların 36 (%92,3)' sı çoklu ilaç direncine sahiptir ( $p<0,001$ ). Nitrofurantoin ve gentamisine karşı duyarlılıkta ise iki grup arasında fark bulunmamaktadır (Çizelge 4. 3.). Beklendiği üzere, çalışılan aralıktaki MİK değerleri araştırıldığında, seftriakson, siprofloksasin, trimetoprim/sulfametoksazol ve amoksisilin/klavulonik asitte ST131 izolatlarında daha yüksek MİK değerleri görülmüştür (sırasıyla  $p<0,001$ ,  $p<0,001$ ,  $p=0,001$  ve  $p=0,006$ ). Nitrofurantoin dirençli bir ST131 suşu çalışmamızda belirlenmemiştir. Ayrıca, nitrofurantoin MİK değerleri, ST131 dışı izolatlarda, ST131 izolatlara göre daha yüksektir ( $p\leq 0,001$ ). Daha önceki çalışmalarda da nitrofurantoin ile ilgili benzer sonuçlar elde edilmiştir (Colpan ve diğ. 2013, Sanchez ve diğ. 2014). Bu gibi nedenlerle, yüksek dirence sahip izolatların etkin bir biçimde tedavisini sağlayabilmek amacıyla, alternatif antibiyotik kombinasyonlarına yönelik çalışmalar (Johnson ve diğ. 2013) haricinde, anti-virülans ve anti-biyofilm (Pinkner ve diğ. 2006, Cegelski ve diğ. 2009, Roy ve diğ. 2018) çalışmaları da bulunmaktadır. Fakat anti-virülans veya anti-biyofilm aktivitesi bulunan maddelerden *E. coli*'

ye bağılı üriner sistem enfeksiyonu tedavisinde aktif olarak kullanılan bir madde henüz mevcut değildir.

MBEK değerleri araştırıldığında ise sadece seftriakson ve siprofloksasin MBEK değerlerinin ST131 izolatlarında daha yüksek olduğu görülmektedir (sırasıyla  $p=0,017$  ve  $p<0,001$ ). Nitrofurantoin, trimetoprim/sulfametoksazol, gentamisin ve amoksisilin/klavulonik asit için herhangi bir farklılık belirlenmemiştir.

Filogenetik gruplar ile MİK değerlerinin ilişkisi araştırıldığında, nitrofurantoine dirençli iki suşun birden A filogenetik grubunda olduğu görülmüştür. Ayrıca, üriner sistem enfeksiyonlarında daha az sıklıkla görülen ve özellikle dışkıda bulunan bu filogenetik grubun nitrofurantoin MİK değerleri, diğer filogenetik gruplara göre daha yüksektir ( $p<0,001$ ). Toplam 148 UPEC izolatıyla gerçekleştirilen bir çalışmada, A filogrubunda 4, B1 filogrubunda 2 ve D filogrubunda 2 izolatın nitrofurantoin dirençli olduğu görülmüştür (Munkhdelger ve diğ 2017).

Filogenetik gruplar ile MBK değerlerinin ilişkileri araştırıldığında, gentamisin ve nitrofurantoinde anlamlı fark görülmüştür (sırasıyla  $p=0,014$  ve  $p=0,011$ ). Bu anlamlı fark, gentamisin ve nitrofurantoin MBK değerlerinin, D filogenetik grubunda B2 filogenetik grubuna göre daha yüksek olmasıyla ilişkilidir (sırasıyla  $p=0,009$  ve  $p=0,002$ ). D filogenetik grubu da B2 filogenetik grubu gibi üriner sistem enfeksiyonu ile ilişkili bir filogenetik gruptur (Er ve diğ. 2015).

MBK sonuçları EUCAST duyarlılık tablosuna göre değerlendirildiğinde, izolatların dirençli olarak tanımlanma sıklıklarının 1,5 - 24,5 kat arasında arttığı görülmüştür. Bu durum özellikle biyofilm ve biyofilm benzeri hücre içi bakteri toplulukları oluşturabilen üriner sistem enfeksiyonu etkeni olan *E. coli* için önem teşkil etmektedir (Anderson ve diğ. 2003, Totsika ve diğ. 2013).

Trimetoprim/sulfametoksazol, seftriakson ve siprofloksasin MBK verileri EUCAST duyarlılık tablosuna göre değerlendirildiğinde, tüm izolatlar dirençli hale gelmiştir (Çizelge 4. 7.). Benzer bir biçimde çoklu ilaç direnci için değerlendirme gerçekleştirildiğinde, izolatların hepsinin çoklu ilaç direncine sahip hale geldiği görülmüştür. Standart bir MBK değerlendirme yönteminin olmayışı, değerlendirme için dezavantajdır. Standart MBK tabloları oluşturulduğunda, MBK sınır değerlerinin MİK sınır değerlerinden daha yüksek olacağı aşikardır, fakat bazı antibiyotiklerde bu oranın 32000 kata kadar çıkabildiği görülmüştür (Çizelge 4. 8.). Bu nedenle, daha fazla örnek ile MBK standart sınır değer tablolarının oluşturulması, ileriki dönemlerde önem teşkil etmektedir.

MİK ve MBEK verilerine göre dirençli izolat sayıları göz önüne alındığında, nitrofurantoin için MİK verilerine göre dirençli izolat sayısı ikiyken, MBEK verilerine göre dirençli izolat sayısı 49 olmuştur. Bu nedenle, en yüksek dirençli izolat sayısı artışının nitrofurantoinde (24,5 kat) olduğu söylenebilir. Fakat MBEK/MİK oranının en düşük olduğu antibiyotiğin nitrofurantoin olması dikkat çekicidir (Çizelge 4. 8.). Ayrıca, dirençlilik oranının artmasına rağmen, izolatların %38,7' si nitrofurantoina duyarlı olarak kalmıştır. Bu oran, araştırılan antibiyotikler içerisindeki en yüksek duyarlılık oranıdır.

Literatürde MBEK testi gerçekleştirilirken, katyon ayarlı Mueller-Hinton besiyeri, antibiyotik dilüsyonu ve biyofilmin birlikte inkübasyonu sonrası, ortama salınan planktonik hücrelerle MİK belirleme işleminin gerçekleştirilebileceği belirtilmiştir (Ceri ve diğ. 1999). Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler, belirtilen bu durum ile uyumlu değildir. Çalışmamıza göre, bu plaklardan MİK verisi doğru bir biçimde elde edilememiştir. Bu nedenle, MBEK testi sistemi hem MİK hem de MBEK' i aynı anda belirlemek için tarafımızca uygun görülmemiş olup, MİK ve MBEK testleri ayrı ayrı çalışılmıştır.

Günümüzde, üriner sistem enfeksiyonu için ampirik tedavi olarak ülkemizde ve dünyada en sık tercih edilen antibiyotikler siprofloksasin, seftriakson ve trimetoprim/sulfametoksazol olarak görülmektedir (Arslan ve diğ. 2005, Aypak ve diğ. 2009, Sanchez ve diğ. 2014). Bu durumun temel nedeninin mevcut alışkanlıklar ve özellikle siprofloksasinin geniş spektrumlu etkisi olduğu düşünülmektedir (Sanchez ve diğ. 2014). İronik olarak, çoklu ilaç direncine sahip olduğu bilinen ve pandemik bir klonal grup olarak tanımlanan ST131 izolatları, çok yüksek oranda siprofloksasin ve trimetoprim/sulfametoksazol dirençlidir. Yapılan mevcut çalışmada da toplam 39 ST131 izolatının sadece 3 tanesi siprofloksasin duyarlıdır. Hatta, siprofloksasin direnci, ST131 için bazı bölgelerde bir belirteç olarak tanımlanabilmektedir (Rogers ve diğ. 2010). Çalışılan izolatların tamamının ve *E. coli* ATCC 25922 trimetoprim/sulfametoksazol MBEK değeri,  $\geq 512$  mg/L' dir (Çizelge 4. 9.). Daha önce gerçekleştirilen ve peritonit etkeni Gram-negatif bakterilerin biyofilmde duyarlılığının araştırıldığı bir çalışmada, benzer bir şekilde toplam 8 *E. coli* izolatının 7 tanesinin biyofilmde trimetoprim/sulfametoksazole dirençli olduğu görülmüştür (Sepandj ve diğ. 2004). Bu nedenle, trimetoprim/sulfametoksazolün biyofilm üzerine etkisi olmadığı belirtilebilir.

*E. coli*' nin antibiyotiklere direnci, tedavi başarısızlıklarına sebep olmaktadır. Bu direnç potansiyeli ile biyofilm oluşturmuş suşun doğası gereği ortaya çıkan direnç yeteneği, mevcut direncin dramatik bir biçimde artmasına sebep olmaktadır. Yapılan literatür

taramasında, üriner sistem enfeksiyonu etkeni *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplar ışığında MBEK' inin belirlenmesine yönelik sadece bir çalışma belirlenebilmiştir. Bu çalışma, çalışmamızdan farklı olarak pediatrik popülasyonda üriner sistem enfeksiyonu kökenli *E. coli* izolatlarını kapsamaktadır ve farklı bir yöntemle gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen çalışmada, izolatların sadece %58,6' sı biyofilm oluşturabilmektedir (Gonzalez ve diğ. 2017). Pandemik ST131 izolatlarının biyofilmde duyarlılığı hakkında herhangi bir çalışma literatürde belirlenememiştir.

Nitrofurantoin kullanımının dünya genelindeki kılavuzlarca ve ülkemizde öneriliyor olmasına rağmen, yaygın kullanım trendi sağlanamamıştır (Arslan ve diğ. 2005, Aypak ve diğ. 2009, Gupta ve diğ. 2011). Çalışmamızda nitrofurantoin, MBEK/MİK oranı en düşük bulunan antibiyotiktir. Ayrıca, filogenetik ve klonal grup fark etmeksizin, hem MİK hem de MBEK verilerine göre izolatların en duyarlı olduğu antimikrobiyal maddedir.

## 6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Üriner sistem enfeksiyonlarının gelişmesinde hem abiyotik yüzeylerdeki biyofilmin hem de hücre içi biyofilm benzeri bakteri topluluklarının etkisi bilinmektedir. İki yapı da enfeksiyonun rekürrensi için konakta bir kaynak sağlamaktadır (Flores-Mireles ve diğ. 2015). Rutin antimikrobiyal duyarlılık testleri, sadece planktonik bakterinin duyarlılığını belirleyebilmektedir. Rutin antimikrobiyal duyarlılık testi sonucuna göre bakterinin duyarlı olarak belirlendiği antibiyotik ile tedavi sonrası rekürrens gelişebilmektedir. Bu nedenle, biyofilmin karakteristik özelliklerini belirlemeye yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Peg çıkıntıları içeren plak kapakları ve mikroplak ile gerçekleştirilen antimikrobiyal duyarlılık testi biyofilmin duyarlılığını belirlemek için uygulanabilir ve tekrarlanabilir bir yöntemdir. Bu yöntemde çok pahalı cihazlara ihtiyaç duyulmamaktadır. Bu nedenle ihtiyaç halinde, klinik laboratuvarlar tarafından uygulanabilir. Peg temelli sistemlerin otomatize hale getirilerek mevcut otomatize sistemlerle birleştirilmesiyle, rutin biyofilm duyarlılık sonuçları elde edilebilecektir. Ayrıca, ileriki dönemlerde minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonları için standart bir değerlendirme tablosunun oluşturulması gerekmektedir.

Bakteri üredikten sonra sonuç verme süresi çalışılan yöntem için 4 gündür. Sıvı mikrodilüsyon testinin benzer şartlarda 2 gün aldığı düşünüldüğünde, biyofilmdeki duyarlılığı belirlemek için çok uzun bir süre olmadığı düşünülmektedir. Bu süre, çalışılan bakterinin optimum üreme ve biyofilm oluşturma yeteneğine göre farklılık gösterecektir. Bu test yöntemi, biyofilm oluşturmuş bakterinin gerçek duyarlılığı hakkında fikir verebilmektedir; biyofilm varlığında direnç, pratikte kullanılan bazı antibiyotikler için 32000 kat gibi dramatik bir biçimde artabilmektedir.

Üriner sistem enfeksiyonu etkeni olan *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplarına bağlı olarak biyofilm oluşturma yeteneğinin ve biyofilmde duyarlılığının araştırıldığı çalışma sayısı sınırlıdır. Literatürde, konuyla ilişki sadece bir araştırma belirlenmiştir (Gonzalez ve diğ. 2017). Farklı bir yöntemle gerçekleştirilen bu çalışmada, izolatların yarısından fazlasının biyofilm oluşturmadığı görülmüştür. Bu nedenle, yöntemleri kıyaslamaya yönelik çalışmaların gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Pandemik ve hipervirülan bir klonal grup olan ST131' in biyofilmde duyarlılığını araştıran bir çalışma ise literatürde belirlenmemiştir.

Mevcut veriler toplu olarak incelendiğinde üriner sistem enfeksiyonları için halihazırda önerilmekte olan nitrofurantoinin, biyofilm üzerine de en etkili antibiyotik olduğu

ortaya çıkmaktadır. Çalışmamızda, nitrofurantoin filogenetik grup ve pandemik klonal grup farketmeksizin biyofilm üzerine en iyi etkinin alındığı antibiyotik olarak belirlenmiştir. Bu nedenle, özellikle akut komplike olmayan sistitin tedavisi için önerilen ve kollateral hasarı düşük olan nitrofurantoinin, ampirik tedavide kullanımının desteklenmesi gerekmektedir (Gupta ve diğ. 2011).

Anti-biyofilm maddelerden, günümüzde henüz rutin kullanımda yer bulmuş bir bileşik olmamasına rağmen antibiyotik alternatifi olarak umut vaat etmektedir. Fakat *E. coli* dışındaki bazı bakterilerle gerçekleştirilen ve hayvan modellerini kapsayan çalışmalar, bakterisidal aktivitesi olmayan ürünlerle biyofilmin hızlı bir biçimde yıkımının sepsis ve bakteriyemi gibi risklere sebep olabileceğini göstermektedir (Fleming ve Rumbaugh 2018). Bu nedenle, anti-biyofilm maddeler ile antibiyotik kombinasyonlarına ve bu kombinasyonlara ait minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonlarının (MBEK) belirlenmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Böylelikle, gelecekte anti-biyofilm maddelerin güvenli kullanımı sağlanabilecektir.

Gelecekteki çalışmalarda, çeşitli antimikrobiyal kombinasyonlarının MBEK sonuçlarının belirlenmesi, *E. coli*'ye bağlı üriner sistem enfeksiyonlarının eradikasyonuna katkı sağlayacaktır. Bu kombinasyonların biyofilm oluşturulmuş hayvan modelleriyle denenmesi, *in vivo* duyarlılık ve enfeksiyon eradikasyonu hakkında çok daha fazla bilgi edinilmesini sağlayacaktır.

## KAYNAKLAR

- Ali L, Khambaty F, Diachenko G. Investigating the suitability of the Calgary Biofilm Device for assessing the antimicrobial efficacy of new agents. *Bioresour Technol.* 2006; 97(15): 1887-1893.
- Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD ve diğ. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science.* 2003; 301(5629): 105-107.
- Anderson GG, Goller CC, Justice S ve diğ. Polysaccharide capsule and sialic acid-mediated regulation promote biofilm-like intracellular bacterial communities during cystitis. *Infect Immun.* 2010; 78(3): 963-975.
- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001; 48(S1): 5-16.
- Antao EM, Wieler LH, Ewers C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens.* 2009; 1(1): 1-12.
- Arslan H, Kurt Azap O, Ergonul O ve diğ. Risk factors for ciprofloxacin resistance among *Escherichia coli* strains isolated from community-acquired urinary tract infections in Turkey. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(5): 914-918.
- Aypak C, Altunsoy A, Duzgun N. Empiric antibiotic therapy in acute uncomplicated urinary tract infections and fluoroquinolone resistance: a prospective observational study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2009; 24(8): 27-35.
- Azerado J, Azevedo NF, Braindet R ve diğ. Critical review on biofilm methods. *Crit Rev Microbiol.* 2017; 43(3): 315-351.
- Banerjee R, Johnston B, Lohse C ve diğ. The clonal distribution and diversity of extraintestinal *Escherichia coli* varies according to patient characteristics. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(12): 5912-5917.
- Beloin C, Roux A, Ghigo JM. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322: 249-289.
- Bhomkar P, Materi W, Semenchenko V ve diğ. Transcriptional Response of *E. coli* upon FimH-mediated fimbrial adhesion. *Gene Regul Syst Bio.* 2010; 4: 1-17.
- Busch A, Waksman G. Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2012; 367(1592): 1112-1122.
- Brzuszkiewicz E, Bruggemann H, Liesegang H ve diğ. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci.* 2006; 103(34): 12879-12884.
- Can F, Azap OK, Seref C ve diğ. Emerging *Escherichia coli* O25b/ST131 clone predicts treatment failure in urinary tract infections. *Clin Infect Dis.* 2015; 60(4): 523-527.
- Can F, Azap OK, Nurtop E ve diğ. Molecular epidemiology of bloodstream-associated *Escherichia coli* ST131 H30-Rx subclone infection in a region with high quinolone resistance. *J Med Microbiol.* 2016; 64(4): 306-310.
- Canbaz S, Peksen Y, Sunter AT ve diğ. Antibiotic prescribing and urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents.* 2002; 20(6): 407-411.



Cegelski L, Pinkner JS, Hammer ND ve diğ. Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat Chem Biol*. 2009; 5(12): 913-919.

Ceri H, Olson ME, Stremick C ve diğ. The Calgary biofilm device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(6): 1771-1776.

Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*. 2000; 66(10): 4555-4558.

Clermont O, Gordon D, Denamur E. Guide to various phylogenetic classification schemes for *Escherichia coli* and the correspondence among schemes. *Microbiology*. 2015; 161: 980-988.

Clermont O, Johnson JR, Menard M ve diğ. Determination of *Escherichia coli* O types by allele-specific polymerase chain reaction: application to the O types involved in human septicemia. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007; 57(2): 129-136.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-seventh edition. CLSI document M7-A7, ABD, 2006.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI document M100-S28, ABD, 2018.

Colpan A, Johnston B, Porter S ve diğ. *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. *Clin Infect Dis*. 2013; 57(9): 1256-1265.

Çizmeçi Z, Oflu B, Aktaş E ve diğ. İdrar ve idrar dışı klinik örneklerden izole edilen GSBL üreten *Escherichia coli* izolatlarında yüksek riskli ST131 klonunun MALDI-TOF MS ve gerçek zamanlı PCR ile araştırılması. *Mikrobiyol Bul*. 2018; 52(1): 13-22.

Dale AP, Woodford N. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones. *J Infect*. 2015; 71(6): 615-626.

Delcaru C, Alexandru I, Podgoreanu P ve diğ. Microbial biofilms in urinary tract infections and prostatitis: etiology, pathogenicity, and combating strategies. *Pathogens*. 2016; 5(4): 65-72.

Demirci M, Unlu O, Istanbulu-Tosun A. Detection of O25b-ST131 clone, CTX-M-1 and CTX-M-15 genes via real time PCR in *Escherichia coli* strains in patients with UTIs obtained from a university hospital in Istanbul. *J Infect Public Health*. 2019; e1-e5, (doi: 10.1016/j.jiph.2019.02.017).

Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(9): 881-890.

Dunne WM. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev*. 2002; 15(2): 155-166.

Er DK, Dundar D, Uzun H ve diğ. Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and pyelonephritis isolates of *Escherichia coli*. *Microb Pathog*. 2015; 89: 188-194.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. *Clin Microbiol Infect*. 2003; 9(8): 9-15.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Clinical breakpoints for bacteria - (v 9.0). 2019a. (Erişim: 14 Mart 2019), [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Breakpoint\\_tables/v\\_9.0\\_Breakpoint\\_Tables.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_9.0_Breakpoint_Tables.pdf)

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). QC tables - (v 9.0). 2019b. (Erişim Tarihi: 14 Mart 2019), [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/QC/v\\_9.0\\_EUCAST\\_QC\\_tables\\_routine\\_and\\_extended\\_QC.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/QC/v_9.0_EUCAST_QC_tables_routine_and_extended_QC.pdf)

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Preparation of agar plates and broth for EUCAST AST - (v 5.0). 2019c. (Erişim Tarihi: 14 Mart 2019), [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/2017\\_manuals/Media\\_preparation\\_v\\_5.0\\_EUCAST\\_AST.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2017_manuals/Media_preparation_v_5.0_EUCAST_AST.pdf)

Gonzalez JM, Robino L, Iribarnegaray V ve diğ. Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. *Pathog Dis.* 2017; 74(4): e1-e15.

Gonzalez CM, Schaeffer AJ. Treatment of urinary tract infection: what's old, what's new and what works. *World J Urol.* 1999; 17(6): 372-382.

Gordon DM, Clermont O, Tolley H ve diğ. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environ Microbiol.* 2008; 10(10): 2484-2496.

Gupta K, Hooton TM, Naber KG ve diğ. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis.* 2011; 52(5): e103-e120.

Fleming D ve Rumbaugh D. The consequences of biofilm dispersal on the host. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 1-7.

Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M ve diğ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(5): 269-284.

Foxman B, Gillespie B, Koopman J ve diğ. Risk factors for second urinary tract infection among college women. *Am J Epidemiol.* 2000; 151(12): 1194-1205.

Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med.* 2002; 113(1A): 5 - 13.

Franklin MJ, Chang C, Akiyama T ve diğ. New technologies for studying biofilms. *Microbiol Spectr.* 2016; 3(4): 1-23.

Haney EF, Trimble MJ, Cheng JT ve diğ. Critical assessment of methods to quantify biofilm growth and evaluate antibiofilm activity of host defence peptides. *Biomolecules.* 2018; 8(2): e1-e22.

Hannan TJ, Mysorekar IU, Hung CS ve diğ. Early severe inflammatory responses to uropathogenic *E. coli* predispose to chronic and recurrent urinary tract infection. *PLoS Pathog.* 2010; 6(8): e1001 - e1042.

Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ ve diğ. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc.* 2010; 5(7): 1236-1254.

Ikaheimo R, Siitonen A, Heiskanen T ve diğ. Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year follow-up of 179 women. *Clin Infect Dis.* 1996; 22(1): 91-99.

Johnson JR, Menard M, Johnston B ve diğ. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(7): 2733-2739.

Johnson JR, Johnston B, Clabots C ve diğ. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. *Clin Infect Microbiol.* 2010; 51(3): 286-294.

Johnson JR, Drawz SM, Porter S ve diğ. Susceptibility to alternative oral antimicrobial agents in relation to sequence type ST131 status and coresistance phenotype among recent *Escherichia coli* isolates from US veterans. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(10): 4856-4860.

Justice SS, Hung C, Theriot JA ve diğ. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101(5): 1333-1338.

Karatan E, Watnick P. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2009; 73(2): 310-347.

Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, hultgren SJ. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013; 3(4): a010306.

Lourenço A, Coenye T, Goeres DM ve diğ. Minimum information about a biofilm experiment (MIABiE): standards for reporting experiments and data on sessile microbial communities living at interfaces. *Pathog Dis.* 2014; 70(3): 250-256.

Macia MD, Rojo-Molinero E, Oliver A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clin Microbiol Infect.* 2014; 20(10): 981-990.

Macingwana L, Baker B, Ngwane A ve diğ. Sulfamethoxazole enhances the antimicrobial activity of rifampicin. *J Antimicrobial Chemother.* 2012; 67(12): 2908-2911.

Mah TF ve O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol.* 2001; 9(1): 34-39.

McBain A. *In vitro* biofilm models: An overview. Laskin AI, Sariaslani S, Gadd GM (Ed) *Advances in Applied Microbiology 69<sup>th</sup> Edition.* Elsevier, ABD, 2009.

Moskowitz SM, Foster JM, Emerson J ve diğ. Clinically feasible biofilm susceptibility assay for isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol.* 2004; 42(5): 1915-1922.

Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL ve diğ. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 1998; 282(5393): 1494-1497.

Munkhdelger Y, Gunregjav N, Dorjpurev A ve diğ. Detection of virulence genes, phylogenetic group and antibiotic resistance of uropathogenic *Escherichia coli* in Mongolia. *J Infect Dev Ctries.* 2017; 11(1): 51-57.

O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. *J Vis Exp.* 2011; 47: e2437.

Olofsson SK, Marcusson LL, Lindgren PK ve diğ. Selection of ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* in an *in vitro* kinetic model: relation between drug exposure and mutant prevention concentration. *J Antimicrobial Chemother.* 2006; 57(6): 1116-1121.

Otto K, Silhavy TJ. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(4): 2287-2292.

Ozturk MI, Koca O, Kalkan S, Kaya C, Karaman MI. Current situation of antibiotic resistance against common pathogens in urology clinics. *Turk J Urol.* 2008; 34: 363-367.

Pinkner JS, Remaut H, Buelens F ve diğ. Rationally designed small compounds inhibit pilus biogenesis in uropathogenic bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006; 103(47): 17897-17902.

Poursina F, Sephehpour S, Mobasherizadeh S. Biofilm formation in nonmultidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection in Isfahan, Iran. *Adv Biomed Res.* 2018; 7: e40-e54.

Price JE, Chapman MR. Phaged and confused by biofilm matrix. *Nat Microbiol.* 2018; 3(1): 2-3.

Reiter KC, Villa B, Paim TG ve diğ. Inhibition of biofilm maturation by linezolid in meticillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: comparison with other drugs. *J Med Microbiol.* 2013; 62(3): 394-399.

Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. *Escherichia coli* O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrobiol Chemother.* 2010; 66(1): 1-14.

Rowe MC, Withers HL, Swift S. Uropathogenic *Escherichia coli* forms biofilm aggregates under iron restriction that disperse upon the supply of iron. *FEMS Microbiol Lett.* 2010; 307(1): 102-109.

Roy R, Tiwari M, Donelli G ve diğ. Strategies for combating bacterial biofilms: a focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence.* 2018; 9(1): 522-554.

Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis.* 2000; 181(5): 1753-1754.

Sanchez GV, Bairad AMG, Karlowsky JA ve diğ. Nitrofurantion retains antimicrobial activity against multidrug-resistant urinary *Escherichia coli* from US outpatients. *J Antimicrobiol Chemother.* 2014; 69(12): 3259-3262.

Schwartz DJ, Chen SL, Hultgren SJ ve diğ. Population dynamics and niche distribution of uropathogenic *Escherichia coli* during acute and chronic urinary tract infection. *Infect Immun.* 2011; 79(10): 4250-4259.

Sepandj F, Ceri H, Gibb A ve diğ. Minimum inhibitory concentration (MIC) versus minimum biofilm eliminating concentration (MBEC) in evaluation of antibiotic sensitivity of Gram-negative bacilli causing peritonitis. *Perit Dial Int.* 2004; 24(1): 65-67.

Sihra N, Goodman A, Zakri R ve diğ. Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection. *Nat Rev Urol.* 2018; 15(12): 750-776.

Sobel JD ve Kaye D. Urinary Tract Infections. Mandell GL, Bennett JE ve Dolin R (Ed). *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases.* Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, PA, 2009.

Sule P, Wadhawan T, Carr NJ ve diğ. A combination of assays reveals biomass differences in biofilms formed by *Escherichia coli* mutants. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 49(3): 299-304.

Totsika M, Kostakioti M, Hannan TJ ve diğ. A fimH inhibitor prevents acute bladder infection and treats chronic cystitis caused by multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* ST131. *J Infect Dis.* 2013; 208(6): 921-928.

Willes TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol.* 2008; 85(1): 11-19.

Wu Y, Outten FW. *IscR* controls iron-dependent biofilm formation in *Escherichia coli* by regulating type I fimbria expression. *J Bacteriol.* 2009; 191(4): 1248-1257.

Zhong YM, Liu XH, Li YM ve diğ. Emergence and spread of O16-ST131 and O25b-ST131 clones among faecal CTX-M-producing *Escherichia coli* in healthy individuals in Hunan province, China. *J Antimicrobiol Chemother.* 2015; 70(8): 2223-2227.

# ÖZGEÇMİŞ

## 1. Bireysel Bilgiler

<b>Adı Soyadı</b>	: Doğanhan Kadir ER
<b>Doğum Yeri ve Tarihi</b>	: Elazığ 14.05.1988
<b>Uyruğu</b>	: Türkiye Cumhuriyeti
<b>Medeni Durumu</b>	: Evli
<b>Askerlik Durumu</b>	: Askerlik hizmetini yerine getirmiştir.
<b>Çalıştığı Kurum</b>	: Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
<b>İletişim Adresi ve Telefonu</b>	: Atalar Mahallesi Deryalar Sokak 6/10 Körfez, KOCAELİ - (554) 637 24 36
<b>E - posta</b>	: doganhan_er@yahoo.com

## 2. Eğitim Bilgileri

<b>Lisans</b>	: 2007 - 2011 Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü
<b>Yüksek Lisans</b>	: 2011 - 2013 Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
<b>Doktora</b>	: 2013 - Halen Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
<b>Yabancı Dili</b>	: İngilizce

## 3. nvanları

## 4. Mesleki Deneyimi

<b>Araştırma Görevlisi</b>	: 2013 - 2018 Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
----------------------------	--

**Araştırma Görevlisi** : 2018 - Halen Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

## 5. Üye Olduğu Mesleki Kuruluşlar

Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti (TMC), 2012 - Halen

Klinik Mikrobiyoloji Uzmanları Derneği (KLİMUD), 2012 - Halen

European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), 2014 - Halen

## 6. Bilimsel Etkinlikler

### Poster Sunumları

#### Ulusal

1. Karadenizli A, Türker G, Uzuner H, Er DK, Kolaylı F, Oruç M, Oğuz D. Yenidoğan yoğun bakım ünitesinde ortaya çıkan konjunktivit salgınında Adenovirus araştırılması ve moleküler yöntemle tiplendirilmesi. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Poster no: 155, 3 – 7 Kasım 2012, Aydın.
2. Özdemir L, Karadenizli A, Uzuner H, Er DK; Türkiye’de ilk kez besi hayvanlarında ve bakıcılarında çiftlik hayvanları ile ilişkili metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (LA – MRSA) kolonizasyonunun araştırılması. 35. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Poster no: , 3 – 7 Kasım 2012, Aydın.
3. Sönmez Tamer G, Er DK, Kasap M. *Giardia intestinalis* tanısında polimeraz zincir reaksiyonu. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 28 Eylül - 4 Ekim 2013, Denizli, Türkiye.
4. Sönmez Tamer G, Dündar D, Er DK. Hastanemize başvuran hastaların anti-Toksoplazma antikorları sonuçlarının değerlendirilmesi. 18. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 28 Eylül - 4 Ekim 2013, Denizli, Türkiye.
5. Uzuner H, Karadenizli A, Er DK, Osmani A. Epidemik keratokonjunktivit etkeni Adenovirus 19 ve 37 üzerine antiseptik kombinasyonlarının etkisinin araştırılması. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, 16 - 20 Kasım 2016, Antalya, Türkiye.

## Uluslararası

1. Ozel E, Kolayli F, Ozturk E, Er, DK. Antibacterial activity of different mouthrinses against oral *Streptococci*: an *in vitro* study. 18<sup>th</sup> Congress of the Balkan Stomatological Society, Poster no:231 April 25 – 28 2012, Skopje, Macedonia.
2. Karadenizli A, Ozdemir L, Er DK, Uzuner H. Survival of *Francisella tularensis* in Amies agar with charcoal under different temperature conditions. International Symposium on *Francisella tularensis* and Tularemia, Poster no: 26, 2013 June 19 – 22, Nevşehir, Turkey.
3. Karadenizli A, Gurbuz YS, Ozdemir L, Er DK, Uzuner H, Ercin C. Detection of *Francisella tularensis* DNA in paraffin embedded appendix tissue samples by RT TaqMan PCR. International Symposium on *Francisella tularensis* and Tularemia, Poster no: 39, 2013 June 19 – 22, Nevşehir, Turkey.
4. Er DK, Dundar D, Uzuner H, Osmani A, Ozdemir L. Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and phylonephritis isolates of *Escherichia coli*. 24<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2014 May 10 - 13, Barcelona, Spain.
5. Sonmez Tamer ZG, Kasap M, Er DK, Pektas B. Correlation of *Giardia duodenalis* assemblages with clinical and epidemiological data in Turkish children. 25<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2015 April 25 - 28, Copenhagen, Denmark.
6. Er DK, Uzuner H, Genc S, Keceli S, Otag F. Evaluation of Mueller - Hinton agar for germ tube test. 7<sup>th</sup> Trends in Medical Mycology, Mycoses, 58 (S4), 51-226, DOI:10.1111/myc.12380, 2015 October 9 - 12, Lisbon, Portugal.
7. Er DK, Dundar D, Uzuner H. ST131 *Escherichia coli* and its H30 and H30-Rx subclones in Turkey. 7<sup>th</sup> Congress of European Microbiologists, 2017 July 9 - 13, Valencia, Spain.
8. Ozcelik Yazici E, Er DK, Tamer GS, Genc S, Dundar D. Investigation of susceptibilites to various antimicrobial and changing in penicillin susceptibility of group B *Streptococci* between years. 10<sup>th</sup> Balkan Congress of Microbiology, 2017 November 16 - 18, Sofia, Bulgaria.
9. Akbayirli U, Okumus E, Er DK, Dundar D. Laboratuvar çalışanlarının cep telefonlarındaki mikrobiyal kontaminasyonun araştırılması. International 38<sup>th</sup> Turkish Microbiology Congress, 2018 November 4 - 8, Antalya, Turkey.

## Sözlü Sunumlar

### Uluslararası

1. Tuna – Ince EB, Kolayli F, Ozel E, Er DK. *In vitro* antibacterial activity of various adhesive materials against oral *Streptococci*. 24<sup>th</sup> Congress of International Association of Paediatric Dentistry (IAPD), No: O 13-85, June 12 – 15 2013, Seul, Korea.
2. Karadenizli A, Kasap M, Er DK, Ayimigu A, Karaosmanoglu K, Akpınar G, Uzuner H. Proteomic analysis of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* isolates from patients and environment in tularemia epidemics. 8th International Conference on Tularemia, 2015 September 28 - October 1, Opatija, Croatia.
3. Er DK, Susam Z, Arslan M, Dundar D. A study among medical school students hand flora: effects of being in hospital for a certain time period. 26<sup>th</sup> International Medical Sciences Student Congress, 2016 May 4 - 6, Istanbul, Turkey.

### Makaleler

#### Ulusal Hakemli Dergi

1. Er DK, Uzuner H, Genç S, Keçeli S. Germ tüp testinin Mueller - Hinton agar ve serumda karşılaştırılması. *KOU Sag Bil Derg.* 2015; 1(1): 30-34.

#### SCI ve SCI - Expanded

1. Tamer GS, Kasap M, Er DK. Genotyping and phylogenetic analysis of *Giardia duodenalis* isolates from Turkish children. *Med Sci Monit.* 2015; 18(21); 526-532.
2. Ozel E, Kolayli F, Tuna EB, Er DK. *In vitro* antibacterial activity of various adhesive materials against oral *Streptococci*. *Biotechnology and Biotechnological Equipment.* 2016; 30(1): 121-126.
3. Er DK, Dundar D, Uzuner H, Osmani A. Relationship between phylogenetic groups, antibiotic resistance and patient characteristics in terms of adhesin genes in cystitis and phylonephritis isolates of *Escherichia coli*. *Microb Pathog.* 2015; 89: 188-194.



4. Kasap M, Karadenizli A, Akpınar G, Uzuner H, Ayimugu A, Karaosmanoglu K, Er DK. Comparative analysis of proteome patterns of *Francisella tularensis* isolates from patients and the environment. *Curr Microbiol.* 2017; 74(2): 230-238.
5. Uzuner H, Karadenizli A, Er DK, Osmani A. Investigation of the efficacy of alcohol-based solutions on Adenovirus serotypes 8, 19 and 37, common causes of epidemic keratoconjunctivitis after an Adenovirus outbreak in hospital. *Hosp Infect.* 2018; 100(3): e30-e36.
6. Dundar D, Duymaz Z, Genc S, Er DK, Irvem A, Kandemir N. *In-vitro* activities of imipenem-colistin, imipenem-tigecycline, and tigecycline-colistin combinations against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Chemother.* 2018; 30 (6-8): 342-347.

## **Projeler**

### **TÜBİTAK Projeleri**

Üriner sistem enfeksiyonu etkeni olan *Escherichia coli* izolatlarında, ST131 sekans tipinin ve alt klonlarının belirlenmesi. (Proje Yürütücüsü) Proje No: 215S136.

Üropatojen *Escherichia coli* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin ve biyofilmde antibiyotik duyarlılığının araştırılması. (Araştırmacı) Proje No: 217S252.

## EKLER



T.C.  
KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR  
ETİK KURULU



<b>Etik Kurul Bilgileri</b>	Adı	Kocaeli Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	Adres	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Ara Kat 41380 Umuttepe Yerleşkesi /KOCAELİ
	Telefon	0262 303 74 50
	Faks	0262 303 74 63
	E-Posta	gokaetikkurul@kocaeli.edu.tr

<b>Başvuru Bilgileri</b>	Araştırmacının Adı	Üropatojen Escherichia coli izolatlarının Biyofilm Oluşturma Yeteneğinin ve Biyofilmde Antibiyotik Duyarlılığının Araştırılması			
	Araştırma Proje Numarası	KÜ GOKAEK 2017/165			
	Sorumlu Araştırmacı Unvanı/Adı/Soyadı	Prof. Dr. Devrim DÜNDAR			
	Sorumlu Araştırmacının Uzmanlık Alanı	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	Araştırma Merkezi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD			
	Destekleyici	TÜBİTAK 1002			
	Araştırmacının Türü	<b>Doktora Tezi</b>			
	Araştırmaya Katılan Merkezler	Tek Merkezli <input checked="" type="checkbox"/>	Çok Merkezli <input type="checkbox"/>	Ulusal <input checked="" type="checkbox"/>	Uluslararası <input type="checkbox"/>

<b>Değerlendirilen Belgeler</b>	Belge Adı	Var	Yok	Açıklama
		Başvuru Dilekçesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
	Başvuru Formu	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırmacının Türü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Koleksiyon Materyalle Yapılacak Araştırma
	Araştırma Protokolü	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Kullanılacak Form Örnekleri	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Aydınlatılmış Onam Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Araştırma Bütçesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Literatür Örneği	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Taahhütname	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Biyolojik Materyal Transfer Anlaşması	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	İzin Belgeleri	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Başhekimlik Onayı	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Özgeçmişler	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Değişiklik Bilgi Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Proje Sonuç Formu	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Diğer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Karar Bilgileri	Karar No: <u>KÜ GOKAEK 2017/8.24</u> Proje No: 2017/165 Tarih: <u>07.06/2017</u>
	Prof. Dr. Devrim DÜNDAR sorumluluğunda yapılan ve yukarıda bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçesi, amacı, yaklaşım ve yöntemleri, gönüllüler için beklenen yarar ve riskler dikkate alınarak değerlendirilmiş ve araştırmanın ilgili protokol doğrultusunda belirtilen merkezlerde yürütülmesi etik açıdan, <input checked="" type="checkbox"/> Uygun bulunmuştur. <input type="checkbox"/> Eksikliklerin tamamlanması koşulu ile uygun bulunmuştur.* <input type="checkbox"/> Uygun bulunmamıştır.*

Dayanakları	Hasta Hakları Yönetmeliği (01.08.1998/23420); Biyoloji ve Tıbbın Uygulanması Bakımından İnsan Hakları ve İnsan Haysiyetinin Korunması Sözleşmesi; İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesinin Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (09.12.2003/25311); Biyotıp Araştırmalarına İlişkin İnsan Hakları ve Biyotıp Sözleşmesine Ek Protokolün Onaylanmasının Uygun Bulunduğuna Dair Kanun (29.03.2011/27899); İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik (13.04.2013/28617); Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği (06.09.2014/29111); Dünya Tıp Birliği Helsinki Bildirgesi; İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu; Türk Tabipleri Birliği Hekimlik Meslek Etiği Kuralları; Türk Tabipleri Birliği Araştırma Etiği Bildirgesi
-------------	--

<b>Etik Kurul Üyeleri</b>
---------------------------

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile İlişki		Toplantıda Bulunma		İmza
			E	K	E	H	E	H	
Prof. Dr. Kadir Babaoğlu Başkan	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İ. Erdem Okay Üye	Genel Cerrahi	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Haluk Emre Özel Üye	Restoratif Diş Tedavisi	Kocaeli Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Canan Baydemir Üye	Biyostatistik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Selcen Göçmez Üye	Farmakoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özlem Yıldız Gündoğdu Üye	Çocuk ve Ergen Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Yusufhan Yazır Üye	Histoloji ve Embriyoloji	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Aslıhan Akpınar Raportör	Tıp Tarihi ve Etik	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Ceyla Eraldemir Üye	Biyokimya	Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

\* Gerekçe ve öneriler: