

**ESCHERICHIA COLI VE KLEBSIELLA PNEUMONIAE
SUŞLARINDAKİ KARBAPENEM DİRENCİ İLE VİRÜLANS
FAKTÖRLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN MOLEKÜLER
YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**THE INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN
CARBAPENEM RESISTANCE AND VIRULENCE FACTORS
OF ESCHERICHIA COLI AND KLEBSIELLA PNEUMONIAE
STRAINS BY USING MOLECULAR METHODS**

ESRA DENİZ CANDAN

PROF. DR. NİLÜFER AKSÖZ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2016

Bilge Deniz CANDAN' a ithaf edilmiştir.

ESRA DENİZ CANDAN' ın hazırladığı "***Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*** Suşlarındaki Karbapenem Direnci ile Virülans Faktörleri Arasındaki İlişkinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI'** nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Üye

Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Danışman

Prof. Dr. Güven URAZ

Üye

Doç. Dr. Abbas TANER

Üye

Doç. Dr. Işıl SEYİS BİLKAY

Üye

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

../01/2016

ESRA DENİZ CANDAN

Doktora tez çalışması, Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ'ün yürütücülüğündeki "**Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırmalar Birimi 014D01601002 No'lu Destek Projesi**"

ve

TUBITAK Bilim İnsani Destekleme Daire Başkanlığı birimi tarafından "**TÜBİTAK 2211-C Öncelikli Alanlara Yönelik Yurt İçi Doktora Bursu**" ile desteklenmiştir.

ÖZET

ESCHERICHIA COLI VE KLEBSIELLA PNEUMONIAE SUŞLARINDAKİ KARBAPENEM DİRENCİ İLE VİRÜLANS FAKTÖRLERİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN MOLEKÜLER YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Esra Deniz CANDAN

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Ocak, 2016, 84 sayfa

Nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan etkenler arasında yer alan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin insan sağlığı için tehlikeli enfeksiyonlara neden olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, apse, bronşiyal aspirasyon, idrar, kan, plevral efüzyon, safra, trake, vücut sıvısı ve yara materyalleri, kateter ucu, kulak sıvısı ve rektal sürüntü kültürlerinden izole edilen 50 *E.coli* ve 50 *K. pneumoniae* klinik izolatının karbapenemaz gen bölgeleri ve virülans faktörlerin varlığı Multiplex-PCR kullanılarak saptandı.

Çalışma kapsamında toplanan *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatının %44'ünde (*E.coli*'de 11, *K.pneumoniae*'de 33) OXA-48 tip karbapenem direnci saptandı. Bunun yanında *K. pneumoniae* izolatlarının birinde yalnızca NDM-1, dördünde hem OXA-48 hem de NDM-1 direnci bir arada görülmüştür.

E.coli izolatları arasında sıklıkla rastlanan virülans gen bölgeleri sırasıyla; %92 oranında ferrik aerobaktin üretiminden sorumlu olan *iutA*, %90 aerobaktin üretiminden sorumlu olan *aer* ve %84 tip I fimbriya'yı kodlayan *fimA* gen bölgeleridir. *fimA* ve *afa* gen bölgelerinin karbapenem dirençli ve duyarlı suşlar arasında *fimA* ve *afa* gen bölgelerinde önemli derecede fark olduğu görülmüştür (*fimA* ve *afa*; $P \leq 0.05$). Aynı zamanda, tip I fimbriyanın (*fimA*) idrar yolu enfeksiyonlarına, P

fimbriyanın (*pap*) komplike idrar yolu enfeksiyonlarına, S fimbriya (*sfa*) ve afimbriyal adezinin (*afa*) ise; idrar dışında diğler enfeksiyonlar ile ilişkili olduğu saptanmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarında ise, sıklıkla rastlanan gen bölgeleri sırasıyla; %88 kapsül ile ilişkili *wabG*, %86 kapsül lipoproteini ile ilişkili *uge*, %80 dış membran proteini ile ilişkili *ycfM* ve %72 oranında enterobaktin üretiminden sorumlu *entB* gen bölgeleridir. Çalışma kapsamındaki virülans gen bölgelerinin dirençli ve duyarlı suşlar arasında önemli derecede fark olmadığı görülmüştür ($P \geq 0.05$). Bunun yanında, tip 1 (*fimH*) ve tip 3 (*mrkD*) fimbriyaların idrar yolu enfeksiyonu ve pnömoniye özgü faktörler olduğu bulunmuştur. Bu çalışma sonucunda izolatların sahip oldukları karbapenem direncinde ve çeşitliliğinde artış saptanmıştır. Aynı zamanda enfeksiyonlara özgü virülans faktörler ortaya konmuştur.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, karbapenemaz, multi direnç, multiplex pcr, OXA-48, NDM-1, virülans faktör.

ABSTRACT

THE INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN CARBAPENEM RESISTANCE AND VIRULENCE FACTORS OF ESCHERICHIA COLI AND KLEBSIELLA PNEUMONIAE STRAINS BY USING MOLECULAR METHODS

Esra Deniz CANDAN

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

January, 2016, 84 pages

Escherichia coli and *Klebsiella pneumoniae* are most common factors of nosocomial and community acquired infections. They are known as major threats on public health. In this study, 50 *E.coli* and 50 *K. pneumoniae* clinic specimens isolated from abscess, bronchial, urea, blood, catheter, ear, pleural efusion, rectal, bile, tracheal, body fluid and wound cultures were collected and their carbapenemase gene regions and presence of virulence factors of these isolates were determined by using Multiplex-PCR.

OXA-48 type of carbapenem resistance was determined as 44% of the total isolates (11 specimens for *E.coli*, 33 specimens for *K. pneumoniae*) collected in this study. In addition for *K. pneumoniae* isolates, NDM-1 resistance in one, OXA-48 and NDM-1 resistance in four specimens were detected.

Virulence gene regions that encountered among *E.coli* isolates were 92% *iutA*, 90% *aer* and 84% *fimA*, which are responsible for ferric aerobactin, aerobactin and Type I fimbria production, respectively. There was a significant difference in *fimA* and *afa* gene regions between carbapenem resistant and sensitive strains (*fimA* and *afa*; $P \leq 0.05$). The relations of Type I fimbria (*fimA*) with urinary tract infections, P fimbria

(*pap*) with complicated urinary tract infections, S fimbria (*sfa*) and fimbrial adezine (*afa*) with other infections except urinary tract infections were determined.

As for *K. pneumoniae* isolates, gene regions that commonly encountered were 88% *wabG*, 86% *uge*, 80% *ycfM* and 72% *entB*, related with capsula, capsula lipoprotein, external membrane protein and responsible for enterobactin production, respectively. There was no significant difference between resistant and sensitive strains in virulence gene regions ($P \geq 0.05$). On the other hand, type 1 (*fimH*) and type 3 (*mrkD*) fimbria were determined as specific factors for urinary tract infections and pneumonia. According to the result of this study, an increase in the carbapenem resistance and diversity of isolates were determined. It was also determined that specific virulence factors takes part in certain infections.

Keywords: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, carbapenemase, multi resistance, multiplex pcr, OXA-48, NDM-1, virulence factor.

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans ve doktora öğrenimim ve tez çalışmalarım sırasında, ihtiyacım olan her an bilgisi, tecrübeleri ve tüm içtenliğiyle devamlı yanımda olan ve doktora çalışmamın bir proje olarak kabul edilmesinde ve gereken maddi desteğin Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Birimi tarafından sağlanmasında büyük emeği olan değerli hocam Prof.Dr. Nilüfer Aksöz'e;

Çalışmalarım süresince engin tecrübelerinden yararlandığım, sorularımı hiçbir zaman cevapsız bırakmayan hocam Doç. Dr. Abbas Taner'e;

Tez çalışmalarına katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi'nde başta danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer Aksöz olmak üzere Prof. Dr. Nilüfer Cihangir ve Prof. Dr. Güven Uraz'a;

Lisans ve lisansüstü öğrenim hayatım boyunca beni yüreklendiren hocam Doç.Dr. Işıl Seyis Bilkay'a;

Çalışmam için klinik izolatların toplanmasında büyük katkıları olan; Doç. Dr. Abbas Taner, Prof. Dr. Ayşe Esra Karakoç, Prof. Dr. Zerrin Aktaş, Prof. Dr. Hüseyin Kılıç, Doç. Dr. Dolunay Gülmez, Dr. Sefer Erman Yılmaz ve Bilim Uzmanı Mehtap Ülker Demirel'e;

2211-Yurt İci Doktora Burs Programı kapsamında sağladığı destekten dolayı TÜBİTAK Bilim İnsanı Destekleme Daire Başkanlığı Birimi'ne;

İstatistik programlarının kullanılmasında ve analizlerinde yardımcı olan ve katkılarda bulunan arkadaşım Bilim Uzmanı Çağla Kılıç'a;

Deneylerimde bana bıkmadan usanmadan yardımlarını esirgemeyen Şeyma Duman'a;

Lisansüstü eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, desteğini her an hissettiğim, her zorlukta yardımına koşan değerli dostum Dr. Neslihan İdil'e;

Doktora eğitim boyunca desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen arkadaşlarım; Dr. Demet Erdönmez, Dr. N. Hande Avcıoğlu, Bil. Uzm. Kübra Erkan Türkmen, Bil. Uzm. Sezen Bilen Özyürek, Bil. Uzm. Sinem Diken Gür'e;

Tüm çalışmalarım boyunca maddi manevi her an yanımda olan ve beni akademik yolda destekleyen anneme ve babama, desteklerine ihtiyaç duyduğum her an yanı başımda olan ablam Nevin Ata'ya;

Çalışmam sırasında her konuda desteğini, bilgi ve yardımlarını esirgemeyen, çalışmamda çektiği resimlerle tezimi renklendiren, sonsuz sevgisi ile her zaman desteğim olan eşim Onur Candan'a;

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELER	ix
ŞEKİLLER	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİ	3
2.1. <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> 'da Antibiyotik Direnç Durumu	4
2.1.1. Karbapenemler	4
2.2. <i>Enterobacteriaceae</i> 'de karbapenem direncinin etki mekanizması	5
2.2.1. Porin değişimleri	5
2.2.2. Karbapenemazların varlığı	5
2.3. Virülans Faktörler	7
2.4. Karbapenem Direncinin ve Virülans Faktörlerin Tanısında Kullanılan Yöntemler	9
3. MATERYAL VE YÖNTEM	11
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	11
3.2. İzolatların Tanısı	11
3.2.1. Otomatize Sistem	12
3.2.2. CHROMagar Orientation	12
3.2.3. Gram Boyama	12
3.2.4. Hareket İndol Ornitin Dekarboksilaz Testleri	13
3.2.5. Hemoliz	13
3.2.6. İpliklenme (String) Testi	14
3.2.7. Eozin Metilen Mavili (EMB) Agar Besiyeri'nde Koloni Morfolojisi ve Laktoz Fermentasyonu	14
3.2.8. İMViC (İndol, Metil Kırmızısı, Voges Proskauer, Sitrat) Testi	15
3.3. İzolatların Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) ve Karbapenem Duyarlılıklarının Belirlenmesi	17

3.3.1. Vitek-32 Otomatize Sistem	17
3.3.2. CHROMagar ESBL.....	18
3.3.3. CHROMagar KPC	18
3.4. İzolatlardan DNA İzolasyonu	18
3.4.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	19
3.4.2. Plazmid DNA İzolasyonu	19
3.5. Multiplex PCR ile Karbapenemaz ve Virülans Gen Bölgelerinin Analizi	20
3.5.1. Karbapenemaz Gen Bölgelerinin Multiplex PCR İle Analizi	20
3.5.2. Virülans Gen Bölgelerinin Multiplex PCR İle Analizi	21
3.6. Agaroz Jel Elektroforezi.....	24
3.7. İstatistiksel Analiz	25
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	26
4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler	26
4.2. İzolatların Tanı Sonuçları	26
4.3. İzolatların Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) ve Karbapenem Dirençlerinin Saptanması	33
4.4. Genomik ve Plazmid DNA Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi	36
4.4.1. Genomik DNA Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi.....	36
4.4.2. Plazmid DNA Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi	37
4.5. Karbapenemaz Gen Bölgelerinin Multiplex PCR Analizi.....	38
4.5.1. <i>E.coli</i> 'de Karbapenemaz Gen Bölgelerinin Analizi	38
4.5.2. <i>K. pneumoniae</i> 'de Karbapenemaz Gen Bölgelerinin Analizi.....	42
4.6. Virülans Gen Bölgelerinin Multiplex PCR Analizi	48
4.6.2. <i>K.pneumoniae</i> 'de Virülans Gen Bölgelerinin Analizi	59
5. YORUM	70
KAYNAKLAR	72
ÖZGEÇMİŞ	84

ÇİZELGELER

	<u>Sayfa</u>
Çizelge 3. 1. : Karbapenemaz Gen Bölgeleri.....	21
Çizelge 3. 2. : <i>E. coli</i> 'de çeşitli virülans faktörlerini kodlayan gen bölgeleri	22
Çizelge 3. 3. : <i>K.pneumoniae</i> 'da çeşitli virülans faktörlerini kodlayan gen bölgeleri	23
Çizelge 4. 1: <i>E. coli</i> izolatlarının toplu test sonuçları	27
Çizelge 4. 2: : <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının toplu test sonuçları	30
Çizelge 4. 3: <i>E. coli</i> izolatlarının GSBL ve KPC direnç durumları	33
Çizelge 4. 4: <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının GSBL ve KPC direnç durumları.....	35
Çizelge 4. 5: <i>E. coli</i> izolatlarının karbapenem direncine ait toplu test sonuçları ...	39
Çizelge 4. 6: <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının karbapenem direncine ait toplu test sonuçları.....	44
Çizelge 4. 7: <i>E.coli</i> izolatlarının karbapenem direnci ve virülans gen profilleri	56
Çizelge 4. 8: Karbapenem duyarlı ve dirençli <i>E.coli</i> izolatlarında virülans faktörlerin dağılımı	58
Çizelge 4. 9: <i>K.pneumoniae</i> izolatlarının karbapenem direnci ve virülans gen profilleri.....	66
Çizelge 4. 10: Karbapenem duyarlı ve dirençli <i>K..pneumoniae</i> izolatlarında virülans faktörlerin dağılımı.....	69

ŞEKİLLER

	<u>Sayfa</u>
Şekil 3. 1. : İzolatların teşhisi için yapılan fenotipik testler	11
Şekil 3. 2. : CHROMagar Orientation testi	12
Şekil 3. 3. : <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> 'nin ışık mikroskobu görüntüsü	12
Şekil 3. 4. : İndol, hareket ve ornitin dekarboksilaz testi	13
Şekil 3. 5. : Hemoliz.....	14
Şekil 3. 6. : İpliklenme testi	14
Şekil 3. 7. : Eozin Metilen Mavili Agar Besiyeri'ndeki gelişim ve koloni morfolojisi	15
Şekil 3. 8. : İndol testi	15
Şekil 3. 9. : MR testi	16
Şekil 3. 10. : VP testi	16
Şekil 3. 11. : Sitrat testi	17
Şekil 3. 12. : CHROMagar ESBL testi	18
Şekil 3. 13. : CHROMagar KPC testi	18
Şekil 3. 14. : Multiplex PCR reaksiyon karışımının hazırlanması.....	20
Şekil 3. 15. : Agarozun hassas terazide tartımı ve mikrodalga fırında eritilmesi ...	24
Şekil 3. 16. : Boyanın agaroz jele eklenmesi.....	24
Şekil 3. 17. : Agaroz jelin dökülmesi.....	25
Şekil 3. 18. : Örneklerin agaroz jele yüklenmesi.....	25
Şekil 4. 1. : <i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının klinik örneklere göre yüzde dağılımları.....	26
Şekil 4. 2. : Genomik DNA ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	36
Şekil 4. 3. : <i>E.coli</i> suşlarının plazmid DNA ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü ..	37
Şekil 4. 4. : <i>K.pneumoniae</i> suşlarının plazmid DNA ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü.	37
Şekil 4.5. : <i>E. coli</i> izolatlarında OXA-48 tip gen bölgelerine ait jel görüntüleri	38
Şekil 4. 6: <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında OXA-48 tip gen bölgelerine ait jel görüntüleri	42
Şekil 4. 7: <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında OXA-48 tip gen bölgelerine ait jel görüntüleri	42
Şekil 4. 8: <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında OXA-48 ve NDM-1 tip gen bölgesine ait jel görüntüleri	43

Şekil 4. 9 : <i>E.coli</i> 'de bulunan virülans gen bölgeleri.....	48
Şekil 4. 10: <i>E. coli</i> izolatlarında <i>pap</i> gen bölgelerine ait jel görüntüleri	49
Şekil 4. 11: <i>E. coli</i> izolatlarında <i>afa</i> , <i>fimA</i> ve <i>sfa</i> gen bölgelerine ait jel görüntüleri	49
Şekil 4. 12: <i>E. coli</i> izolatlarında <i>hly</i> , <i>iroN</i> , <i>aer</i> , <i>cnf-1</i> ve <i>iutA</i> gen bölgelerine ait jel görüntüleri	50
Şekil 4. 13: Virülans gen bölgelerinin <i>E.coli</i> izolatlarındaki dağılımı	51
Şekil 4. 14 : <i>E.coli</i> 'ye ait virülans gen bölgelerinin klinik örneklerle göre yüzde dağılımı	53
Şekil 4. 15: <i>K.pneumoniae</i> 'de bulunan virülans gen bölgeleri	59
Şekil 4. 16: <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında <i>fimH</i> , <i>uge</i> ve <i>iutA</i> gen bölgelerine ait jel görüntüleri	60
Şekil 4. 17: <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında <i>wabG</i> , <i>rmpA</i> ve <i>ycfM</i> gen bölgelerine ait jel görüntüleri.....	60
Şekil 4. 18: <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında <i>iroN</i> ve <i>mrkD</i> gen bölgelerine ait jel görüntüleri	61
Şekil 4. 19: <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında <i>kpn</i> , <i>entB</i> ve <i>wcaG</i> gen bölgelerine ait jel görüntüleri	61
Şekil 4. 20. : Virülans gen bölgelerinin <i>K.pneumoniae</i> izolatlarındaki dağılımı	62
Şekil 4. 21 : <i>K.pneumoniae</i> 'ye ait virülans gen bölgelerinin klinik örneklerle göre yüzde dağılımı	64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	Alfa
β	Beta
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat Derece
%	Yüzde
pH	Power of Hydrogen
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre

Kısaltmalar

A	Adenin
Aer	Aerobaktin
afa	Afimbriyal adezin
allS	Allantoin
AmpC	Ampisilin C
ATCC	American Type Culture Collection
C	Sitozin
CDC	USA Centers for Disease Control and Prevention (Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri)
cnf	Cytotoxic necrotizing factor (Sitotoksik nekrotizan faktör)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
EMB	Eozin Metilen Mavili Agar Besiyeri
entB	Enterobaktin biyosentezi
ESBL	Extended Spectrum Beta-lactamase (GSBL; Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz)
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi)
F	Forward
fimH	Tip 1 fimbriya
G	Guanin

g	Gram
GES	Guiana Extended Spectrum
HCl	Hidrojen Klorür
Hly	Hemolysin (Hemolizin)
HPA	UK Health Protection Agency (Sağlık Koruma Örgütü)
H ₂ S	Hidrojen Sülfür
IMP	İmipenem metallo-beta-laktamaz
İMVIC	İndol, Metil Kırmızısı, Voges Proskauer ve Sitrat Testi
iroN	Salmochelin
iutA	Ferrik aerobaktin
k ₂ A	Specific to K2 capsule serotype (K2 kapsül serotipine özgü)
kb	Kilo baz
KCl	Potasyum klorür
KOH	Potasyum hidroksit
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (karbapenemaz)
Kpn	fimH benzeri fimbriya
LB	Luria Bertani Besiyeri
M	Molar
M koloni	Mukoid koloni
MAC	MacConkey Agar
magA	Mucoviscosity associated gene A (Mukoviskozite ile ilişkili gen A)
MBL	Metallo-beta-laktamaz
MgSO ₄	Magnezyum sülfat
(NH ₄) ₂ SO ₄	Amonyum sülfat
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mm	Milimetre
mrkD	Tip 3 fimbriya
NDM	New Delhi Metallo-beta-laktamaz
NmcA	Not Metalloenzim carbapenemase (karbapenemaz)
OXA	Oxacillinase (Oksasilinaz)
Pap	Pyelonephritis-associated pili (Piyelonefrit ilişkili pili)
PCR	Polymerase chain reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
R	Reverse

rpm	Revolutions per Minute (Dakikadaki devir sayısı)
rmpA	Regulator of mucoid phenotype A (Mukoid fenotip A düzenleyici)
sfa	S fimbriya
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzimi
T	Timin
TBE	Tris-Borat-Etilendiamin tetra asetik asit
U	Ünite
Uge	Uridine diphosphate galacturonate 4-epimerase (Üridin difosfat galakuronat 4-epimeraz)
V	Volt
VIM	Verona Integron-encoded Metallo-beta-laktamaz
wabG	Biosynthesis of the core lipopolysaccharide (Lipopolisakkaritin kor kısmının biyosentezi)
wcaG	Guanosine diphosphate-beta-L-fucose synthetase (Guanozin difosfat-beta-L-fukoz sentetaz)
ycfM	Outer membrane lipoprotein (Dış membrane lipoprotein)

1. GİRİŞ

Ülkemizde, nozokomiyal enfeksiyon etkenleri içinde, gram negatif bakteriler ön sırada yer almakta ve *Enterobacteriaceae* ailesine ait mikroorganizmalar klinik örneklerden en sık izole edilen bakteri grubunu oluşturmaktadır [1,2]. Son yıllarda bu grup içerisinde ilk sırayı nozokomiyal enfeksiyonun yanı sıra toplumsal enfeksiyonlarda da sıklıkla rastlanan *E.coli* ve *K.pneumoniae* paylaşmaktadır [3, 4]. Günümüzde uygulanan enfeksiyon kontrol önlemlerindeki gelişmelere karşın nozokomiyal ve toplumsal enfeksiyonlarda antibiyotiklere karşı direnç oranları hızla artmakta, tedavi seçimi ve etkinliğinde sorunlar ortaya çıkmaktadır. Bu artan direnç oranı, özellikle nozokomiyal enfeksiyonlarında tedaviyi zorlaştıran, mortaliteyi ve tedavi maliyetlerini ciddi oranda artıran önemli bir unsurdur [5].

Hastane kaynaklı gram negatif bakterilerdeki direncin hızlı yayılması son dönemlerde kullanılan antibiyotiklerin hemen hepsine dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına yol açarak son derece tehlikeli gelişmelere neden olmaktadır [3]. Son yıllarda ise; *Enterobacteriaceae* üyelerinde her tip karbapenem direnci gösteren *E.coli* ve *K.pneumoniae* kaynaklı enfeksiyonlar önem kazanmaya başlamıştır [6, 7]. Karbapenemaz gen bölgelerinin çoğunun transfer edilebilir (plazmid) genler tarafından kodlanması, bu direncin hızlı bir şekilde yayılımını sağlamakta ve uluslararası boyutta toplum sağlığı için ciddi bir tehdit oluşturabileceğini göstermektedir [8].

Karbapenem direncinin yanı sıra *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatları neden oldukları enfeksiyonlarla ilişkili olarak kapsül oluşumu, mukoid koloni, allantoin metabolizması, siderofor oluşturma, hemolitik aktivite ve fimbriya varlığı gibi birçok virülans faktörlere sahiptirler [9, 10]. Bu virülans faktörlerinin gösterilmesi ve enfeksiyonlar ile ilişkilerinin belirlenmesi; mevcut enfeksiyon kaynağının saptanmasında, yayılımının önlenmesinde ve özellikle antimikrobik tedavi sürecinde önemli rol oynamaktadır.

Bu çalışmada, Türkiye'nin bazı illerindeki hastanelerdeki klinik örneklerden izole edilen *E.coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının karbapenemaz (KPC, NDM-1, OXA-48, IMP ve VIM) gen bölgelerinin ve neden oldukları enfeksiyonlarla ilişkili olan virülans faktörlerinin ortaya çıkışından sorumlu gen bölgelerinin varlığı Multiplex-PCR kullanılarak saptanmıştır. Bunlara ilaveten, *E.coli* ve *K.pneumoniae* kaynaklı

enfeksiyonlarda virülans gen bölgelerinin bulunma sıklığı belirlenmiştir. Çalışma doğrultusunda saptanan virülans faktör ve karbapenemaz gen bölgeleri arasındaki olası ilişki değerlendirilerek bu izolatların sahip oldukları virülans gen bölgelerine özgü genotipler ortaya çıkartılmıştır.

Bu çalışma kapsamında klinik örneklerden izole edilen karbapenem dirençli *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşları bir arada toplanarak herhangi bir salgın durumunda bu türlerin teşhisi için kolaylık sağlayacak olan referanslar da elde edilmiştir. Bu bağlamda stok kültürleri hazırlanan *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatları Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde yer alan Mikrobiyal Taksonomi ve Kültür Koleksiyonları Laboratuvarı'nda, -20°C de saklanmıştır.

Bu çalışma ile nozokomiyal enfeksiyonlarda önemli rol oynayan *E.coli* ve *K.pneumoniae*'nin son yıllardaki karbapenem direncinde ve çeşitliliğindeki artış saptanmış olmaktadır. Aynı zamanda bu izolatların neden olduğu enfeksiyonlar ile sahip oldukları virülans faktör çeşitlilikleri de ortaya konmuştur. Çalışma Türkiye'deki *E.coli* ve *K.pneumoniae* kaynaklı enfeksiyonların gerek yayılımının önüne geçilmesi gerekse tedavi sürecinin doğru bir şekilde planması açısından önem göstermektedir.

2. GENEL BİLGİ

Escherichia coli üriner sistem enfeksiyonu, neonatal menenjit, sepsis ve barsak enfeksiyonlarına diğer *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerine kıyasla daha sıklıkla neden olur ve toplum kökenli idrar yolu enfeksiyonlarının % 80'inden sorumludur [11]. Yara enfeksiyonları, immünsüprese hastalarda nozokomiyal pnömoniler, sık karşılaşılan enfeksiyonları arasındadır. Aynı zamanda *E. coli* nozokomiyal gram negatif bakteremilerde etken olarak ilk sırada yer almaktadır [12].

Enterobacteriaceae ailesi içerisinde yer alan *E. coli*, 1,0-1,5 µm çapında ve 2-4 µm uzunluğunda, düz, uçları yuvarlak basillerdir. Besiyerinde hafif kabarık, 1-2 mm çapında, S tipi koloniler oluştururlar [13]. Kapsül içeren bazı suşlar mukoid (M) koloniler oluşturabilmektedir [14, 15]. Genellikle peritriş kirpikleri sayesinde hareketlidirler. Gram negatif ve fakültatif anaerob özellik gösteren *E. coli* 'nin optimal üreme sıcaklığı 37°C, optimal üreme pH'sı 7.2'dir [13]. *E. coli* dış etkilere oldukça dayanıklı olup 55°C'de bir saat, 60°C'de 20-30 dakika, oda ısısında ise uzun süre canlı kalabilmektedir. Soğuğa dirençli, dezenfektanlara karşı dirençsizdirler.

E. coli, laboratuvarlarda kullanılan rutin besiyerleri olan %5 Koyun Kanlı Agar, Eozin Metilen Mavis (EMB) Agar ve MacConkey (MAC) Agar'da kolaylıkla ürerler. IMViC olarak bilinen biyokimyasal özellikleri (Triptofandan indol oluşturma, metil kırmızısı testi, Voges Proskauer testi, sitratı kullanma) (++ --) şeklindedir. H₂S oluşturmazlar. Üreaz testleri negatiftir [13].

Çalışma kapsamımızda yer alan diğer nozokomiyal etken *Klebsiella pneumoniae* ise; üriner sistem ve nozokomiyal enfeksiyonlara yaygın olarak neden olan bakteriler arasında *E. coli*'den sonra ikinci sırada yer almaktadır [16]. *K. pneumoniae*'nin oluşturduğu en önemli hastalık alkol bağımlılarında ve akciğer fonksiyonları bozuk olan kişilerde görülen pnömonidir. Bunun yanında; neonatal septisemi, yara enfeksiyonu ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olabilmektedir [17].

K. pneumoniae, 0,3-1,0 µm çapında ve 0,6-6,0 µm uzunluğundadır. Geniş polisakkarit kapsülleri vardır, buna bağlı olarak besiyerlerinde mukoid (M) koloniler oluştururlar ve tümü hareketsizdir. Gram negatif ve fakültatif anaerob özellik gösteren *K. pneumoniae*'nin optimal üreme sıcaklığı 37°C, optimal üreme pH'sı ise 7.0'dir [13]. Isıya dayanıksızdır ve nemli ısıda 55°C'de yarım saatte ölürler. Ancak kuruluğa karşı oldukça dirençlidir.

IMViC sonucu izole edilen etkene göre değişkenlik göstermektedir. *K.pneumoniae*'de sıklıkla karşılaşılan paternler (– – + +), (+ + + +) ve (– + + +) şeklindedir [18]. (–+–+) IMViC paternine ise 1960 yılından beri birçok *K.pneumoniae*'de rastlanmaktadır [19, 20]. Üreyi yavaş hidroliz ederler. H₂S üretmezler [13].

2.1. *E. coli* ve *K. pneumoniae*'da Antibiyotik Direnç Durumu

Penisilinleri, sefalosporinleri ve monobaktamları hidroliz eden ve genellikle klavulonik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi β-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olan geniş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL), *E.coli* ve *K.pneumoniae* başta olmak üzere tüm *Enterobacteriaceae* ailesi tarafından üretilebilmektedir [21-23]. Özellikle GSBL üreten *K. pneumoniae* ve *E. coli* kaynaklı enfeksiyonlarda ilk tedavi seçeneği olan karbapenemlerin giderek artan kullanımı karbapenem direnci sorununu gündeme getirmiştir [24-27].

2.1.1. Karbapenemler

Karbapenemler hem beta laktam grubunun hem de tüm antibiyotiklerin en geniş spektrum içeren en etkin üyesidir [28]. Diğer beta laktamlar gibi penisilin bağlayan proteinler (PBP) ile kovalent bağ yaparak hücre duvar sentezini inhibe ederek etki göstermektedirler. Karbapenemler gram pozitif, gram negatif ve anaeroplara karşı etkin olmalarına rağmen klinikte en yoğun kullanıldıkları yer gram negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlardır [29].

Ülkemizde sıklıkla kullanılan karbapenem antibiyotikleri arasında piyasaya ilk giren imipenem, 3 aydan büyük çocuklarda dahi kullanılabilen meropenem, pnömoni ve idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde önemli bir seçenek olan ertapenem yer almaktadır [30, 31]. Bunun yanında bu grubun en yeni üyesi; komplike intraabdominal enfeksiyonlar, komplike üriner sistem enfeksiyonları (piyelonefrit), hastane kökenli pnömoni ve ventilatörle ilişkili pnömoni tedavisinde 2007 yılından beri kullanılan doripenemdir [32, 33].

Karbapenemler çinko metalloenzimlere duyarlıdır. Karbapenemleri hidrolize eden bu enzimler -karbapenemazlar- *Enterobacteriaceae*'de ilk olarak 1982 (SME-1 tip) ve 1984 (IMI-1tip) yıllarında saptanmıştır [34]. Bu tarihten sonra dünyanın birçok ülkesinde moleküler yapıları farklı birden çok karbapenemaz özelliğinde metallo beta-laktamaz izole edilmiştir. Ülkemizde ise 1995 yılından itibaren giderek artan bir

karbapenem direnci söz konusudur [28]. Bu artan direnç özellikle hastane kökenli gram negatif bakteriler arasında yaygındır.

2.2. Enterobacteriaceae'de karbapenem direncinin etki mekanizması

Enterobacteriaceae'de karbapenem direnci iki ana mekanizma ile gelişebilmektedir:

2.2.1. Porin değişimleri

Porin değişimleri *Pseudomonas aeruginosa* suşlarındaki temel direnç mekanizması olup karbapenemler için özel bir porin olan OprD'nin kaybı direnç gelişimine yol açmaktadır [35]. *Enterobacteriaceae* ailesinde ise; bu porinler OmpF ve OmpC ailelerine ait olup *P. aeruginosa*'da olduğu gibi bu bakteriyel porinlerin sayısı ve aktivitesindeki herhangi bir değişiklik zardaki antibiyotik direncinin gelişimine yol açabilmektedir [36]. *Enterobacter spp.*'de saptanan karbapenem direnci, OmpC ve OmpF porinlerindeki modifikasyonların yanı sıra sefolasporinazları kodlayan *AmpC*'nin aşırı üretimi olan ikinci bir mekanizmanın varlığı ile gerçekleşmiştir [37, 38]. Bu mekanizma; *K. pneumoniae*'de *OmpK35/36*, *E. coli*'de ise; OmpF ve OmpC tarafından kodlanan porinlerin modifikasyonların yanında *AmpC* ya da GSBL'nin aşırı üretimi ile gerçekleşmektedir [36, 39]. Bu tip direnç; *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*, *P. rettgeri*, *C. freundii*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* gibi birçok türde saptanmıştır [35].

2.2.2. Karbapenemazların varlığı

Karbapenemaz literatürde ilk olarak klinik izolat olan *Enterobacter cloacae*'de saptanmış serin karbapenemaz olup kromozomal olarak *NmcA* geni tarafından kodlanmaktadır [40]. Bundan sonra dünyanın her yanından karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* rapor edilmeye başlamıştır [41]. Karbapenemazlar arasında en yaygın olarak görülenler; serin karbapenemazlar (KPC ve OXA-48) ve metallo- β -laktamaz karbapenemazlardır (VIM, IMP ve NDM) [42]. Oldukça çeşitli olan karbapenemazlar Ambler moleküler sınıflandırma sisteminde aminoasit homolojisine göre sınıflandırılmaktadır.

Sınıf A, C ve D β -laktamazlar aktif bölgelerinde bir serin rezidüsü taşıırken Sınıf B enzimleri (metallo- β -laktamaz) aktivasyon için çinkoya ihtiyaç duymaktadırlar. Nozokomiyal patojenler arasında tüm β -laktamları hidroliz edebildiğinden dolayı Sınıf A, B ve D karbapenemazlar en büyük öneme sahipken Sınıf C (*AmpC*) nadir olarak görülen kromozomal olarak kodlanan sefalosporinazları içermektedir. Sınıf C

Enterobacteriaceae'de porin kaybı ile gerçekleşen direnç mekanizmasını kapsayan grubu oluşturmaktadır.

Sınıf A β -laktamazlar, aktif bölgelerinde serine ihtiyaç göstermekte ve penisilin, sefalosporin, karbapenem ve aztreonamı hidroliz eden β -laktamazlardır. Hidrolitik aktiviteleri *in vitro* koşullarda klavulanik asit ve tazobaktam ile inhibe edilebilmektedir [34]. Bu grup, kromozomda kodlanmış SME (*Serratia marcescens* enzyme), NmcA (not metalloenzyme carbapenemase), IMI (imipenem-hydrolyzing) ile plazmidde kodlanmış KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) ve GES (Guiana extended spectrum) enzimlerini içermektedir [35].

Bu gruptaki karbapenemazlardan en yaygın görülen KPC ailesi; sıklıkla *K. pneumoniae*'de görülmektedir ve bu izolatlar genellikle çoklu dirence sahiptir. KPC tip karbapenemaz (KPC-1) ilk olarak 2001 yılında Kuzey Karolina'da *K. pneumoniae*'nin klinik bir izolatında tanımlanmış ve bunu takiben birçok çeşidi saptanmıştır [43-46]. Daha sonra Avrupa, Latin Amerika, Çin, Yunanistan, İsrail ve Türkiye'de görülmüştür [42, 47-49].

Sınıf B β -laktamazlar, β -laktamazın etkin hidrolizi için çinkoya ihtiyaç duymaları sebebiyle Metallo- β -laktamaz (MBL) olarak da bilinmektedir. Bu enzimlerin en önemli özelliği; monobaktam aztreonam dışında tüm β -laktamları ve karbapenemleri hidrolize edebilmeleridir. Bu enzimler klavulanik asit, tazobaktam, sulbaktam gibi klasik β -laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler fakat EDTA (etilen diamin tetra asetik asit) gibi bir metal şelatörü ile inaktive olmaktadır [35]. MBL'ler ilk olarak fırsatçı bir patojen de olabilen *Bacillus cereus*, *Aeromonas* ve *Stenotrophomonas maltophilia*'da tanımlanmıştır [50-52]. 1990lardan sonra MBL genlerinin transferi ile önce *Pseudomonas* spp.'de daha sonra *Enterobacteriaceae*'de tanımlanmıştır. Yakın zamana kadar *Enterobacteriaceae*'de sıklıkla rastlanan MBL'ler VIM (Verona integron-encoded) ve IMP (imipenem) iken, 2009 yılında yeni bir MBL geni, New Delhi metallo- β -laktamaz (NDM-1) taşıyan *Enterobacteriaceae* izolatları tespit edilmiştir [49].

IMP ve VIM tip karbapenemazlardan IMP-1 Türkiye'de ilk olarak 2003 yılında *K. pneumoniae*'de ve 2007 yılında ise; *E.coli*'de saptanmıştır [53, 54]. VIM-1 tip *K. pneumoniae* ise ülkemizde Özen ve ark., [55] tarafından bildirilmiştir. IMP tip

karbapenemaza Uzak Doğu'da, VIM tip karbapenemaza ise Doğu Avrupa'da sıklıkla rastlanmaktadır [56, 57].

Klinik açıdan oldukça önemli olan NDM-1 tip direnç, ilk olarak Yeni Delhi'de saptanmıştır [58]. 2010 yılının ortalarında Amerika, İngiltere, Pakistan ve dünya genelinde çeşitli vakalar rapor edilmiştir [59, 60]. 2012 ve 2013 yıllarında ise NDM-1 gen bölgesine Türkiye'de de saptanmıştır [49, 61].

Sınıf D β -laktamazlar ise; penisilinin yanında oksasilini de hidrolize etmeleri sebebiyle OXA tip enzimler olarak anılmaktadır. OXA-48 üreten *K. pneumoniae* ilk olarak 2003 yılında Türkiye'de tanımlanmıştır [62]. Bu direnç daha sonra Orta Doğu, Hindistan, Avrupa ve Kuzey Afrika'da saptanmıştır [41, 47, 62]. Günümüzde karbapenem direnci ise; Fas, Umman, Singapur, Tunus ve Amerika'da NDM ve OXA tip karbapenemazların çeşitli kombinasyonları şeklinde ortaya çıkmıştır [59, 63-66].

2.3. Virülans Faktörler

Günümüzde sıklıkla idrar yolu enfeksiyonu etkeni olarak karşımıza çıkan *E.coli*'nin virülans faktörleri üroepitelyal hücrelere yapışma yeteneği, fimbriya varlığı, siderofor üretimi, sitotoksik nekrotizan faktör-1 ve hemolitik aktivitedir [67].

E.coli'nin sahip olduğu virülans faktörlerinin ortaya çıkışından sorumlu bir takım gen bölgeleri bulunmaktadır. Plazmid aracılı *fimA* geni tarafından kodlanan ve izolatlarda yaygın olarak bulunan Tip 1 fimbriya alt üriner sistem enfeksiyonlarında görülmekte ve *E.coli*'nin insan üreteral mukoza epitel hücrelerine tutunmasını sağlamaktadır [10, 68]. Yine plazmid aracılı *pap* (pyelonephritis-associated pili) geni tarafından ifade edilen P fimbriya ise üst üriner sistem enfeksiyon etkenlerinde görülmektedir [69, 70]. Afimbriyal adezini ifade eden *afa* (plazmid ya da kromozomal) ve S fimbriyayı ifade eden *sfa* (plazmid aracılı) gen bölgeleri ekstraintestinal *E.coli* izolatlarında görülmektedir. Bu gen bölgeleri; yaygın olarak sepsis ve menenjitin yanı sıra üriner sistem enfeksiyonu kaynaklı izolatlarda da görülmektedir [10, 71, 72].

E.coli izolatlarında yaygın olarak bulunan sideroforlar; *aer* ve *iutA* tarafından ifade edilen aerobaktin ve ferrik aerobaktindir [73]. Bunun yanında son yıllarda *iroN* geni ile ifade edilen salmochelin tip siderofor da önem kazanmaya başlamıştır [74]. Bu yapılar; plazmid aracılı ifade edilmektedir ve özellikle idrar yolu enfeksiyonları, septisemi, bakteriyemi ve sistemik enfeksiyonlara neden olan nekrotoksijenik,

üropatojenik ve septisemik *E.coli* izolatlarında bu yapılar ile ilişkili gen bölgeleri bulunmaktadır [10, 75].

Bunun yanında sitotoksik nekrotizan faktör 1 (*cnf-1*) ve hemolizin (*hly*) toksinleri *E.coli* kaynaklı enfeksiyonların çeşitliliğinde önemli olan virülans faktörleri arasındadır [76, 77]. Plazmidler tarafından ifade edilen bu gen bölgeleri çoğunlukla üropatojenik *E.coli* tarafından üretilmektedir [78].

Önemli bir nozokomiyal enfeksiyon patojeni olan *K. pneumoniae*'nin patojenitesinin belirlenmesinde ise; günümüzde beş faktör kullanılmaktadır. Bunlar kapsül antijenleri, lipopolisakkaritler, fimbriya varlığı, siderofor üretimi ve hemolitik aktivitedir [17, 25, 79].

K. pneumoniae'da moleküler açıdan virülans faktörlerinin ortaya çıkışından sorumlu bir takım gen bölgeleri bulunmaktadır. Bu gen bölgeleri enfeksiyonun şiddetinde önemli rol oynamaktadır [80]. *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının yayılımı çoğunlukla bakterinin sahip olduğu büyük mukoid koloni (>5 mm) fenotipi göstermesi ile ilişkilidir. Büyük mukoid fenotip bakterinin serum bileşenleri tarafından öldürülmesini ve akyuvarlar tarafından fagositozunu engellemektedir. *K. pneumoniae*'da bu fenotipin ortaya çıkışından sorumlu plazmid aracılı ifade edilen *rmpA* (regulator of mucoid phenotype) ve kromozomal *magA* (mucoviscosity associated gene) olmak üzere iki gen bölgesi bulunmaktadır [81, 82]. *magA* aynı zamanda en fazla virülans etkiye sahip serotiplerden biri olan *K. pneumoniae* K1 kapsül serotipine özgün gen bölgesidir [83]. Plazmid aracılı *k2A* ise; en fazla virülans etkiye sahip diğer serotip olan K2 kapsül serotipine özgündür [84]. *rmpA* ve *magA*'nın yanında plazmid aracılı ifade edilen *uge* gen bölgesi de kapsül lipopolisakkaritin biyosentezi için gerekli olan üridin difosfat galakuronat 4-epimeraz'ı kodlamaktadır [85]. Kromozomal *wabG* gen bölgesinin ise; lipopolisakkaritin biyosentezi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir [81]. Diğer bir gen bölgesi ise; bakterilerin makrofajlar tarafından gerçekleştirilen fagositozdan kurtulabilme yeteneğini arttıran ve kapsüldeki bir çeşit adezin olan fukozun sentezinden sorumlu plazmid aracılı ifade edilen *wcaG*'dir [86].

K. pneumoniae'de yaygın olarak iki tip fimbriyal adezin bulunmaktadır [17]. Bu fimbriyalar; Tip I ve III fimbriya genlerini kodlayan sırasıyla idrar yolu enfeksiyonunda önemli rol oynayan plazmid aracılı ifade edilen *fimH* ve biyofilm oluşumundan

sorumlu *mrkD*'dir [83, 87]. *K. pneumoniae*'de görülen diğer bir fimbriya tipi ise; *kpn* gen bölgesi ile ifade edilen fimH benzeri fimbriyadır [88, 89].

K.pneumoniae virülansında önemli bir diğer faktör ise; siderofor üretimidir. Demir bağlayıcı proteinler olarak da bilinen bu yapının aynı zamanda biyofilm üretimini desteklediği bilinmektedir [89, 90]. *K.pneumoniae*'da siderofor üretiminden sorumlu gen bölgeleri; plazmid aracılı ifade edilen ferrik aerobaktin ile ilişkili *iutA*, salmochelin ile ilişkili *iroN* ve enterobaktin üretiminden sorumlu *entB* gen bölgeleridir [77, 89, 91].

Bunun yanında virülans ile ilişkili diğer genler, allantoin metabolizması düzenleyicisi kromozomal olarak ifade edilen *allS*, plazmid aracılı ifade edilen dış membran proteini ile ilişkili *ycfM*, hemolitik aktiviteyi düzenleyen *hly*, sitotoksik nekrotizan faktör 1 ile ilişkili *cnf-1* genleridir [80, 83, 89, 91].

Antibiyotik direnci tipleri ve bakteriyel virülans mekanizmaları farklı zamanlarda ortaya çıkmasına rağmen bu mekanizmalar bazı ortak özelliklere sahiptir. Her iki mekanizma da bakterilerin olumsuz koşullarda hayatta kalması için şarttır. Bunun için; virülans mekanizmaları konak savunma sistemlerine; antibiyotik direnci konağa uygulanan antimikrobiyal terapilere göre zaman içerisinde değişmekte ve gelişmektedir. Bunun yanında; virülans ve direnç faktörleri yatay gen transferleri gibi benzer mekanizmalar ile türler ve cinsler arasında aktarılmaktadır. Bu sayede plazmidler aracılığıyla virülans ve direnç genlerinin yayılımı gerçekleşmektedir. Plazmidler dışında; her iki mekanizma; efluks pompası, porinler ve bu gen bölgelerinin aktive edilmesi ya da baskılanmasını sağlayan sistemler gibi ortak yapılara sahiptir [92].

2.4. Karbapenem Direncinin ve Virülans Faktörlerin Tanısında Kullanılan Yöntemler

Enterobacteriaceae ailesindeki multi direnç teröpatik, enfeksiyon kontrolü ve toplum sağlığı açısından oldukça önemli bir sorun olmaktadır. Özellikle GSBL ve karbapenem direnci bu ailede sıklıkla görülmektedir [21, 27]. Bu nedenle bu tip dirence sahip patojenlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması gerekmektedir. Bu amaçla CDC (Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri), HPA (Sağlık Koruma Örgütü) ve EUCAST (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi) tarafından çeşitli metotlar önerilmektedir [93-95]. CHROMagar Orientation, CHROMagar ESBL ve CHROMagar KPC bu amaçla kullanılan besiyerleridir. Bunlardan CHROMagar Orientation (CHROMagar

Company, Paris, Fransa), özellikle ürün analizde, gram pozitif ve gram negatif patojen mikroorganizmaların saptanması ve tanımlanmasında kullanılan, tek plakta yedi farklı patojenin (*E. coli*, *Citrobacter*, *Enterococcus*, *Klebsiella-Enterobacter*, *Proteus*, *S. aureus*, *S. saprophyticus*) yüksek duyarlılıkta tanısına olanak sağlamaktadır [96]. Genel bir besiyeri olduğu için üriner sistem enfeksiyonu analizleri haricinde yara gibi başka enfeksiyonlu bölgelerden alınan örnekler de analize edilebilmektedir [97].

GSBL üreten patojenler geniş spektrumlu monobaktamlar, üçüncü kuşak sefalosporinler ve penisilline karşı direnç göstermektedirler. CHROMagar ESBL (CHROMagar Company, Paris, Fransa), herhangi bir selektif ön zenginleştirme işlemine gerek duyulmadan AmpC tipi dirençli bakterilerin gelişmesini önlemektedir. GSBL üreten *Proteus*, *E.coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter* ve *Citrobacter* için %100 duyarlılık ve %93,3 seçicilikte güvenilir sonuçlar vermektedir [98].

Karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae*'nin direkt izolasyonunda kullanılan CHROMagar KPC (CHROMagar Company, Paris, Fransa) ise; ön zenginleştirme işlemlerine gerek duyulmadan 18-24 saatlik inkübasyondan sonra sonuç vermektedir [96]. *Klebsiella pneumoniae* karbapenemazına (KPC) sahip *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* ve *Pseudomonas* için %92,7 duyarlılık ve %95,9 özgüllükte sonuçlar vermektedir [99].

Kromojenik besiyerleri izolatları ve sahip oldukları antibiyotik direncini fenotipik olarak oldukça yüksek duyarlılık ve seçicilikte tanımlamasına rağmen moleküler metotlar kadar güvenilir değildir. Multiplex PCR yöntemi özellikle karbapenem direncinin belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [100, 101]. İlk olarak 1988 yılında tanımlanan Multiplex PCR'da, Klasik PCR'dan farklı olarak her bir reaksiyonda çoklu primer setleri kullanılmaktadır [102]. Bu yöntemle daha az zamanda daha çok hedef bölge amplifikasyonunun gerçekleştirilmesi mümkündür. Değişik hedeflerin aynı reaksiyon şartlarında amplifikasyonunu sağlamak için kullanılacak primerlerin dikkatli seçilmesi, primerlerin annealing ısılarının birbirine uygun olması ve birbirleriyle dimerizasyona girmemeleri için optimizasyonun çok iyi yapılması gerekmektedir. Aynı zamanda non spesifik amplifikasyonların önlenmesi için birçok deneme gerektirmektedir [103]. Bu yöntem karbapenemaz gen bölgelerinin yanı sıra virülans gen bölgelerinin varlığının saptanmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [86, 104].

3. MATERYAL VE YÖNTEM

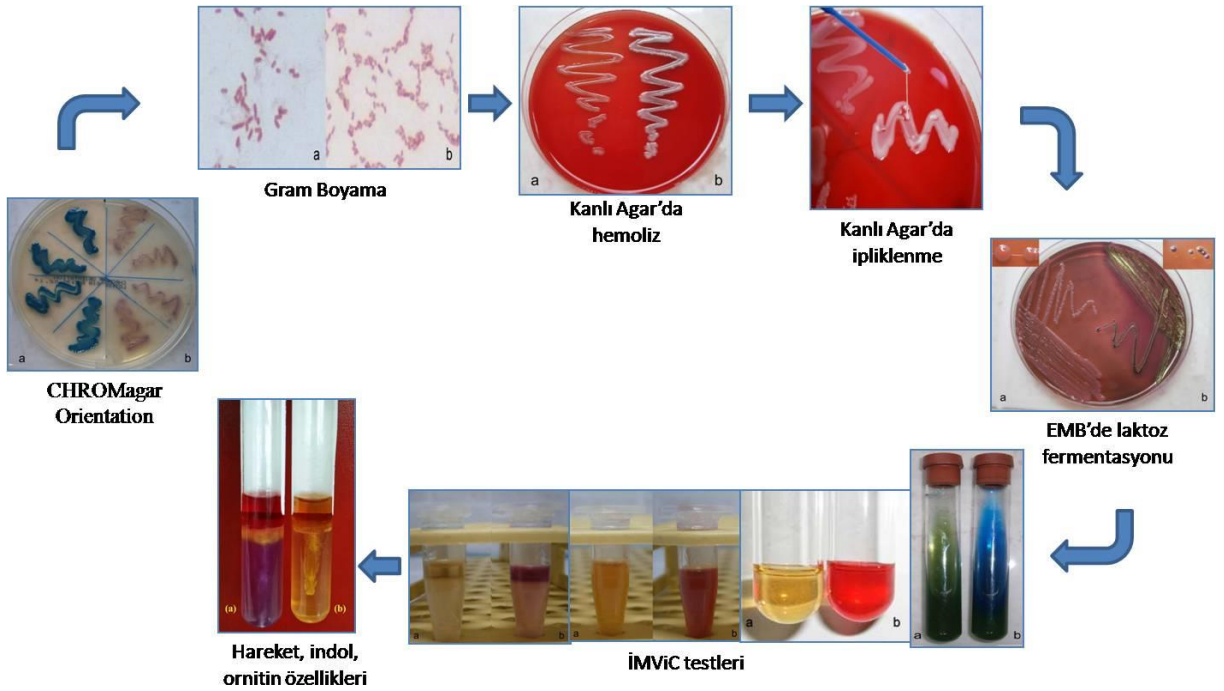
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Bu çalışmada; Ankara, Antalya, İstanbul ve Kayseri’de altı farklı hastaneden *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* klinik örnekleri toplandı. Bu örnekler apse, bronşiyal aspirasyon, idrar, kan, plevral efüzyon, safra, trake, vücut sıvısı ve yara materyalleri, kateter ucu, kulak sıvısı ve rektal sürüntü kültürlerinden izole edildi.

Luria Bertani Agar’a tek koloni ekimi yapılarak kontrol edilen izolatlar, 2 ayda bir pasajlanarak çalışılan süre içerisinde -20°C’de saklandı. Pasajlanan kültürler Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü Biyoteknoloji Anabilim Dalı Mikrobiyal Taksonomi ve Kültür Koleksiyonları Laboratuvarı’nda stoklanmıştır.

3.2. İzolatların Tanısı

Klinik izolatlardan toplanan *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarının tanısı; Vitek-32 Sistemi (bioMerrieux-Fransa), CHROMagar Orientation (CHROMagar Company, Paris, Fransa), ve geleneksel fenotipik yöntemler (Gram Boyama, Kanlı Agar’da hemoliz, ipliklenme, Eozin Metilen Mavili Agar’da laktöz fermentasyonu, İMVİC, ornitin dekarboksilaz ve hareket testleri) kullanılarak gerçekleştirildi (Şekil 3.1).



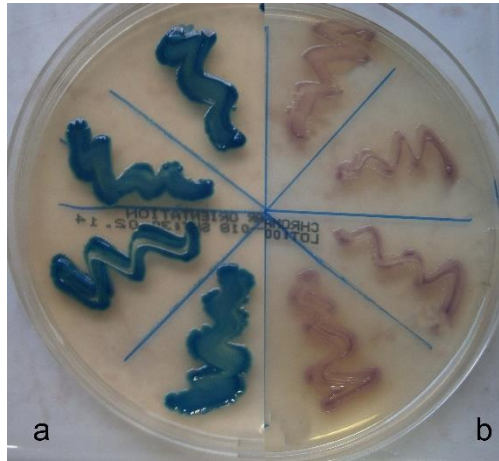
Şekil 3. 1. : İzolatların teşhisi için yapılan fenotipik testler (a; *K. pneumoniae*, b; *E. coli*)

3.2.1. Otomatize Sistem

İzolatlar ilk olarak biyokimyasal testler içeren otomatize bir sistem olan Vitek-32 Sistemi (bioMerriex-Fransa) kullanılarak tanımlandı.

3.2.2. CHROMagar Orientation

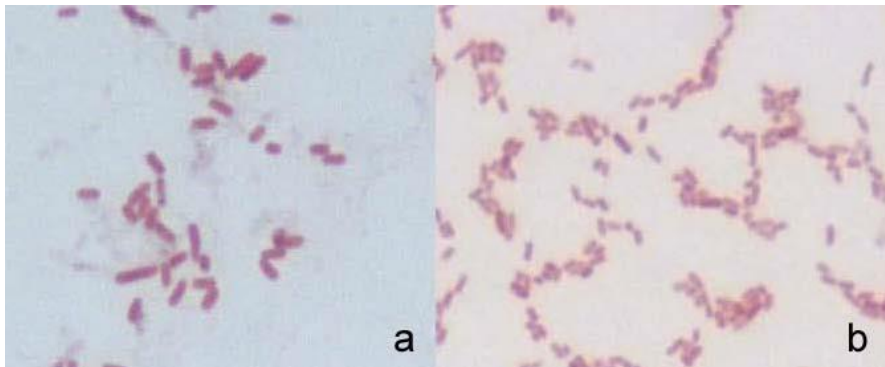
İzolatların CHROMagar Orientation (CHROMagar Company, Paris, Fransa) hazır besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda; koyu pembe renkte oluşan koloniler *E. coli*; metalik mavi renkte olanlar ise *K. pneumoniae* olarak tanımlandı [97] (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. : CHROMagar Orientation testi (a; *K. pneumoniae* b; *E. coli*)

3.2.3. Gram Boyama

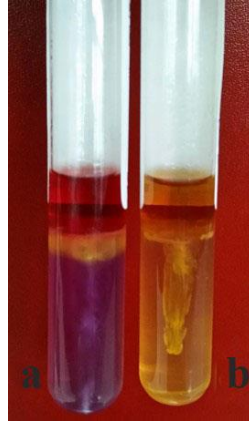
Kolonilerden temiz lam üzerine bir damla serum fizyolojik kullanılarak preparat hazırlandı. Preparatın gram boyama tekniğine göre boyanmasından sonra ışık mikroskopunun x100'lük objektifinde immersiyon yağı ile incelendi (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. : *E. coli* (a) ve *K. pneumoniae* (b)'nin ışık mikroskopunun x100'lük objektifteki görüntüsü

3.2.4. Hareket İndol Ornitin Dekarboksilaz Testleri

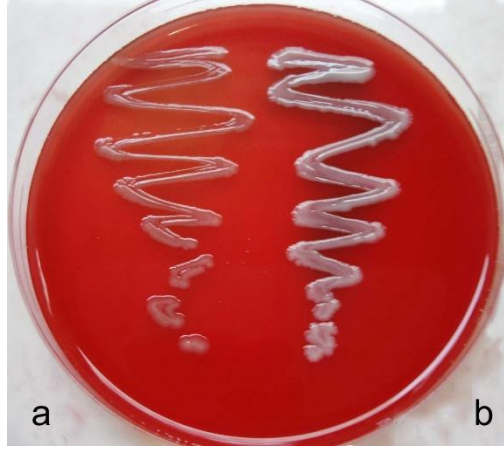
Tüm izolatlar hareket, indol, ornitin besiyerinde besiyerine batırma tekniği kullanılarak inoküle edilip 37°C'de, 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrası izolatların ekim bölgesinde bulanıklık ile hareket özelliği, renk değişimine göre ise; ornitin dekarboksilaz enzimine sahip olup olmadığı değerlendirildi. Üreme yalnızca ekimin yapıldığı hat üzerinde ise hareket negatif, üreme ekim yapılan hattının dışında ve besiyerinde bulanıklık oluşması halinde ise; hareket pozitif olarak kabul edildi. Besiyerinin pembe-sarı ya da pembe renkte olması halinde ornitin dekarboksilaz pozitif, sarı renge dönüşmesi halinde ise negatif olarak kabul edildi (Şekil 3.4).



Şekil 3. 4. : İndol, hareket ve ornitin dekarboksilaz pozitif (a; *E. coli*) ve indol, hareket ve ornitin dekarboksilaz negatif (b; *K. pneumoniae*)

3.2.5. Hemoliz

İzolatlar, %5 Koyun Kanlı Besiyeri'ne inoküle edilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona tabi tutuldu. İnkübasyon sonrası izolatların pigmentasyonuna ve hemoliz tipine bakılarak değerlendirme yapıldı (Şekil 3.5).



Şekil 3. 5. : *E. coli* (a) ve *K. pneumoniae* (b) suşlarının hemoliz durumu

3.2.6. İpliklenme (String) Testi

Kanlı Agar Besiyeri'nde inkübasyon sonucu oluşan bakteri kolonileri, petri içerisinde öze yardımıyla %0,5'lik sodyum deoksikolat solüsyonunda süspanse edilip ip gibi uzaması halinde Mukoid (M tipi) koloni olarak tanımlandı (Şekil 3.6). 5 mm'den büyük mukoid (viskoz) kolonilere sahip izolatlar 'büyük mukoid fenotip pozitif' diğerleri ise 'negatif' olarak değerlendirildi.



Şekil 3. 6. : İpliklenme testi

3.2.7. Eozin Metilen Mavili (EMB) Agar Besiyeri'nde Koloni Morfolojisi ve Laktoz Fermentasyonu

İzolatların EMB Besiyeri'nde 37°C'de inkübasyonu sonucunda; üremesi ve laktozu fermente etmesi sonucu kırmızı renk oluşumuna bakılarak test sonucu pozitif olarak kabul edildi (Şekil 3.7).

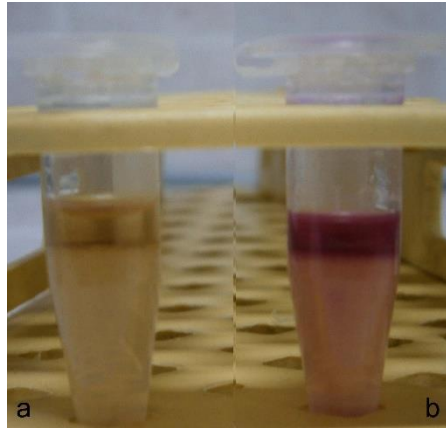


Şekil 3. 7. : *K. pneumoniae* (a) ve *E. coli* (b) suşlarının Eozin Metilen Mavili Agar Besiyeri'ndeki gelişimi ve koloni morfolojileri

3.2.8. İMViC (İndol, Metil Kırmızısı, Voges Proskauer, Sitrat) Testi

İndol Testi (İ)

İzolatların %1 oranında triptofan içeren besiyerinde 37°C'de 48 saat inkübasyonu sonucunda; tüpe 0,5 ml kovaks ayırıcı (p-dimetil amino benzaldehit 5 g; izo-amil alkol 75 ml) damlatılarak iyice karıştırıldı. Triptofanın hidrolize olduğu tüplerde oluşan indol, kovaks ayırıcının bileşeni olan para dimetil amino benzaldehitlerle reaksiyona girmesiyle besiyerinin üst kısmında kırmızı halka oluşumu gözlemlendi. Kırmızı bir halka oluşması halinde sonuç indol pozitif, sarımsı kahverengi bir halka oluşması halinde ise sonuç indol negatif olarak değerlendirildi (Şekil 3.8).

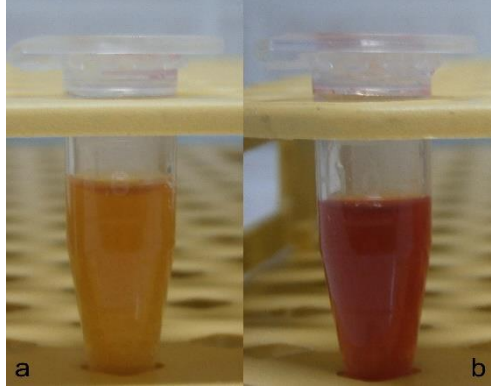


Şekil 3. 8. : İndol testi (a; indol negatif b; indol pozitif)

Metil Kırmızısı Testi (MR)

İzolatların glikoz fosfatlı besiyerinde 37°C'de 48 saat inkübasyonu sonucunda; pH indikatörü olarak metil kırmızısı (Metil kırmızısı 0,1 g; %96 'lık etil alkol 300 ml; distile

su 200 ml) damlatıldı. Glikozu karışık asit fermentasyonu yoluyla fermente ederek organik asit oluşturan izolatlarda ortamın pH değeri düşmekte ve metil kırmızısı indikatörü pH 4.4 ve altında kırmızı renk oluşumuna neden olmaktadır. Kırmızı renk oluşumu metil kırmızısı pozitif, ortam renginde bir değişiklik olmaması metil kırmızısı negatif olarak değerlendirdi (Şekil 3.9).



Şekil 3. 9. : MR testi (a; MR negatif b; MR pozitif)

Voges Proskauer Testi (VP)

İzolatların glikoz fosfatlı besiyerinde 37°C'de 48 saat inkübasyonu sonucunda; Barritt 1 (%5'lik α -naftol) ve 2 (%40'luk KOH) ayıraçları damlatıldı. Glikozu 2-3 bütandiol fermentasyonu yoluyla fermente ederek ortamda bazik bir ürün olan asetil metil karbonil (asetoin) ara ürünü oluşturan izolatlarda besiyerinin üst kısmında pembeden kırmızıya kadar değişen renk oluşumu gözlemlendi. Kırmızı renk oluşumu Voges Proskauer pozitif, sarı renk oluşumu ise Voges Proskauer negatif olarak değerlendirildi (Şekil 3.10).



Şekil 3. 10. : VP testi (a; VP negatif b; VP pozitif)

Sitrat Testi (C)

İzolatların sitratlı besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda; sitrat kullanımı ile oluşan alkali bir ürün olan sodyum karbonat nedeniyle besiyerinin renginin maviye dönüşmesi halinde test sonucu pozitif olarak değerlendirildi (Şekil 3. 11)



Şekil 3. 11. : Sitrat testi (a; sitrat negatif b; sitrat pozitif)

E. coli ve *K. pneumoniae* olarak tanımlanan toplam 100 izolat, %20 gliserollü Tryptic Soy Broth besiyerine çekilerek, 2 ayda bir pasajlanarak çalışılan süre içerisinde -20°C'de saklandı.

3.3. İzolatların Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) ve Karbapenem Duyarlılıklarının Belirlenmesi

İzolatların GSBL ve karbapenem duyarlılıkları, Vitek-32 otomatize sistem (bioMerrieux-France), CHROMagar ESBL (CHROMagar Company, Paris, Fransa) ve CHROMagar KPC (CHROMagar Company, Paris, Fransa) kullanılarak belirlenmiştir.

3.3.1. Vitek-32 Otomatize Sistem

Otomatize bir sistem olan Vitek-32 otomatize sistem (bioMerrieux-Fransa) ile izolatların GSBL ve karbapenem direnci belirlendi. Kalite kontrol kökeni olarak *E. coli* ATCC-25922 kullanıldı.

3.3.2. CHROMagar ESB

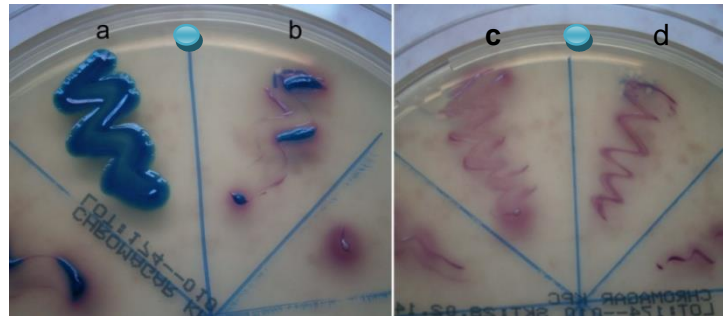
İzolatların CHROMagar ESB (CHROMagar Company, Paris, Fransa) hazır besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda; üreme gösteren izolatlar ESB pozitif olarak tanımlandı [98] (Şekil 3.12).



Şekil 3. 12. : CHROMagar ESB testi (a; ESB pozitif *E. coli* b; ESB pozitif *K. pneumoniae*)

3.3.3. CHROMagar KPC

İzolatların CHROMagar KPC (CHROMagar Company, Paris, Fransa) hazır besiyerinde 37°C'de 24 saat inkübasyonu sonucunda; üreme gösteren izolatlar karbapenem dirençli olarak tanımlandı [99] (Şekil 3.13).



Şekil 3. 13. : CHROMagar KPC testi (a; KPC pozitif *K. pneumoniae*, b; KPC negatif *K. pneumoniae* c; KPC pozitif *E. coli*, d; KPC negatif *E. coli*)

3.4. İzolatlardan DNA İzolasyonu

Fenotipik olarak karbapenem duyarlılıkları belirlenen izolatlardan; genomik DNA izolasyonu; NücleoSpin®Tissue (Macherey-Nagel, Almanya), plazmid izolasyonu ise; NücleoSpin®Plasmid (Macherey-Nagel, Almanya) kiti ile gerçekleştirildi.

3.4.1. Genomik DNA İzolasyonu

NücleoSpin® Tissue Kit protokolü:

- LB Agar kültüründen öze yardımıyla alınan 3-4 koloni 250 µl Buffer A1 solüsyonu eklenerek homojen bir karışım elde edildi. Daha sonra sırasıyla 250 µl Buffer A2 ve 300 µl Buffer A3 eklenerek iyice karıştırıldı.
- 200 µl Buffer B3 eklenerek iyice karıştırıldı ve 70°C'de 10 dakika inkübasyona tabi tutuldu.
- 210 µl %96-100 etanol eklenerek karıştırıldı.
- Karışım 2 ml hacimdeki NücleoSpin®Tissue kolonlarına uygulandı.
- 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra tüpteki sıvı kısım uzaklaştırdı.
- 500 µl Buffer BW ve 600 µl Buffer B5 solüsyonları sırasıyla eklenerek 8.000 rpm'de 1'er dakika santrifüj edildi.
- Yıkama solüsyonunun kalıntılarının uzaklaştırmak için 11.000 rpm'de birkaç dakika santrifüj edildi.
- NücleoSpin®Tissue kolonu 1.5 ml hacimde temiz santrifüj tüpüne yerleştirilerek 70°C'de ısıtılmış 100 µl Elution Buffer BE kolondaki membranın merkezine uygulandı.
- 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA elde edilmiş oldu.

3.4.2. Plazmid DNA İzolasyonu

NücleoSpin®Plasmid Kit protokolü:

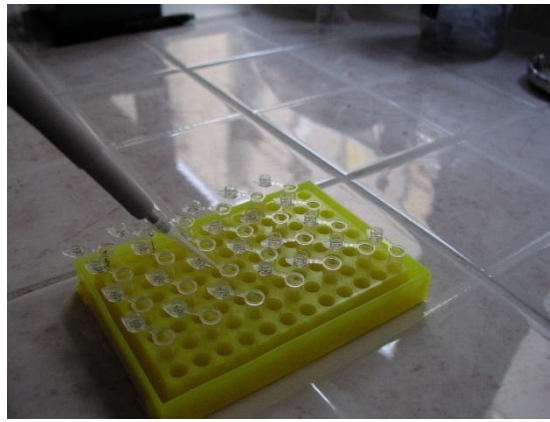
- LB Agar kültüründen öze yardımıyla alınan 3-4 koloni 250 µl Buffer A1 solüsyonu eklenerek homojen bir karışım elde edildi. Daha sonra sırasıyla 250 µl Buffer A2 ve 300 µl Buffer A3 eklenerek iyice karıştırıldı.
- 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi.
- Süpernatant 2 ml hacimdeki NücleoSpin®Tissue kolonlarına uygulandı.
- 8.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra tüpteki sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- 500 µl Buffer AW ve 600 µl Buffer A4 solüsyonları sırasıyla eklenerek 8.000 rpm'de 1'er dakika santrifüj edildi.
- Yıkama solüsyonunun kalıntılarının uzaklaştırmak için 11.000 rpm'de birkaç dakika santrifüj edildi.

- NücleoSpin®Tissue kolonu 1,5 ml hacimde temiz santrifüj tûpüne yerleştirilerek 50 µl Elution Buffer AE kolondaki membranın merkezine uygulandı.
- 11.000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek saf DNA elde edilmiş oldu.

3.5. Multiplex PCR ile Karbapenemaz ve Virülans Gen Bölgelerinin Analizi

3.5.1. Karbapenemaz Gen Bölgelerinin Multiplex PCR İle Analizi

Multiplex PCR koşullarının standardizasyonu için öncelikle kullanılan genomik ya da plazmid DNA, primer, tampon, MgSO₄, Taq Polimeraz'ın farklı konsatrasyonlarını içeren kombinasyonları ön deneylerle optimize edildi (Şekil 3.14).



Şekil 3. 14. : Multiplex PCR reaksiyon karışımının hazırlanması

Multiplex PCR reaksiyon karışımı toplam hacim 50µl olacak şekilde; 1XPCR tamponu (20mM Tris HCl, 10mM (NH₄)₂SO₄, 10mM KCl, 2mM MgSO₄, %0,1 Triton X-100), 0,05mM dNTP, 2U Taq Polimeraz (NEB, Beverly, MA), 50 µmol/L primer (NEB, Beverly, MA) ve 2µl DNA'dan oluşmaktadır. Hem genomik hem de plazmid DNA'sı için PCR reaksiyonu en az 3'er tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Karbapenemaz gen bölgelerine ait primerler Çizelge 3.1'de açıkça görülmektedir. Bu primerler iki farklı grup (*IMP-VIM* ve *KPC-NDM-1-OXA-48*) olacak şekilde PCR reaksiyonuna tabii tutuldu [101].

Çizelge 3. 1. : Karbapenemaz Gen Bölgeleri [101]

Primer	Primer Dizisi* (5'-3')	Gen bölgesi	Ürün (kb)
KPC-F	5'- CGTCTAGTTCTGCTGTCTTG -3'	KPC	798
KPC-R	5'- CTTGTCATCCTTGTTAGGCG -3'		
NDM-1-F	5'- GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC -3'	NDM-1	621
NDM-1-R	5'- CGGAATGGCTCATCACGATC -3'		
OXA-48-F	5'- GCGTGGTTAAGGATGAACAC -3'	OXA-48	438
OXA-48-R	5'- CATCAAGTTCAACCCAACCG -3'		
IMP-F	5'- GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC -3'	IMP	232
IMP-R	5'- GGTTTAAAYAAAACAACCACC-3'		
VIM-F	5'- GATGGTGTGGTTCGCATA -3'	VIM	390
VIM-R	5'- CGAATGCGCAGCACCAG -3'		

*Y=C ya da T

Multiplex PCR döngüsü; 95°C'de 5 dakika ön denatürasyon, 95°C'de 1 dakika, 52°C'de 1 dakika, 72°C'de 1 dakika (35 döngü) ve 72°C'de 10 dakika son uzama olacak şekilde uygulandı (Sensoquest Labcycler, Germany).

3.5.2. Virülans Gen Bölgelerinin Multiplex PCR İle Analizi

Multiplex PCR koşullarının standardizasyonu için öncelikle kullanılan genomik ya da plazmid DNA, primer, tampon, MgSO₄, Taq Polimeraz'ın farklı konsantrasyonlarını içeren kombinasyonları ön deneylerle optimize edildi. Multiplex PCR reaksiyon karışımı toplam hacim 50µl olacak şekilde; 2XPCR tamponu (40mM Tris HCl, 20mM (NH₄)₂SO₄, 20mM KCl, 4mM MgSO₄, %0,2 Triton X-100), 0,2mM dNTP, 2U Taq Polimeraz (NEB, Beverly, MA), 2,5 µmol/L primerler (NEB, Beverly, MA) ve 2,5µl DNA'dan oluşmaktadır. Hem genomik hem de plazmid DNA'sı için PCR reaksiyonu en az 3'er tekrar olacak şekilde gerçekleştirildi. Virülans gen bölgeleri *E.coli* için 3 (*pap*, *afa-sfa-fimA*, *hly-iroN-aer-cnf1-iutA*) *K. pneumoniae* için ise; 4 (*magA-fimH-uge-iutA*, *wabG-rmpA-cnf1-ycfM*, *hly-iroN-k₂A-mrkD*, *kpn-allS-entB-wcaG*) farklı grup olacak şekilde PCR reaksiyonuna tabii tutuldu. Virülans genlerinin PCR ile analizinde *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarının çeşitli virülans faktörlerini kodlayan gen bölgeleri için kullanılan primerler Çizelge 3.2 ve 3.3'te görülmektedir.

Çizelge 3. 2. : *E. coli*' de çeşitli virülans faktörlerini kodlayan gen bölgeleri

Gen Bölgesi	Primer Dizisi*	Ürün (kb)	
<i>fimA</i> fimA-F fimA-R	5'- GTTGTTCTGTCGGCTCTGTC-3' 5'- ATGGTGTGGTTCCGTTATTC-3'	447	[105]
<i>pap</i> pap1 pap2 pap3 pap4	5'- GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG-3' 5'- ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA-3' 5'-GCAACAGCAACGCTGGTTGCATCAT-3' 5'-AGAGAGAGCCACTCTTATACGGACA-3'	328 336	[76]
<i>sfa</i> sfa-F sfa-R	5'- CTCCGGAGAAGTGGGTGCATCTTAC -3' 5'-CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA-3'	410	
<i>aer</i> aer-F aer-R	5'- TACCGGATTGTCATATGCAGACCG -3' 5'- AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG -3'	602	
<i>cnf-1</i> cnf-F cnf-R	5'-AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG-3' 5'-CATTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT -3'	498	
<i>hly</i> hly-F hly-R	5'-AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT -3' 5'-ACCATATAAGCGGTTCATTCCCGTCA -3'	1177	
<i>afa</i> afa-F afa-R	5'-GCTGGGCAGCAAAGTATAACTCTC -3' 5'-CATCAAGCTGTTTGTTCGTCCGCCG -3'	750	
<i>iutA</i> iutA-F iutA-R	5'-GGCTGGACATCATGGGAACTGG-3' 5'- CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG-3'	300	[77]
<i>iroN</i> iroN-F iroN-R	5'- AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG-3' 5'- GACGCCGACATTAAGACGCAG-3'	665	

Çizelge 3. 3. : *K.pneumoniae*'da çeşitli virülans faktörlerini kodlayan gen bölgeleri

Gen Bölgesi	Primer Dizisi	Ürün (kb)	
magA magA-F magA-R	5'- GGTGCTCTTTACATCATTGC -3' 5'- GCAATGGCCATTTGCGTTAG -3'	1282	[81]
k2A k2A-F k2A-R	5'-CAACCATGGTGGTTCGATTAG-3' 5'-TGGTAGCCATATCCCTTTGG-3'	543	[84]
rmpA rmpA-F rmpA-R	5'- ACTGGGCTACCTCTGCTTCA -3' 5'- CTTGCATGAGCCATCTTTCA -3'	516	[81, 86]
wabG wabG-F wabG-R	5'- ACCATCGGCCATTTGATAGA -3' 5'- CGGACTGGCAGATCCATATC -3'	683	[81]
uge uge-F uge-R	5'- TCTTCACGCCTTCCTTCACT -3' 5'- GATCATCCGGTCTCCCTGTA -3'	534	
allS allS-F allS-R	5'- CCGAAACATTACGCACCTTT -3' 5'- ATCACGAAGAGCCAGGTCAC -3'	508	[83]
fimH fimH-F fimH-R	5'- TGCTGCTGGGCTGGTTCGATG -3' 5'- GGGAGGGTGACGGTGACATC -3'	688	
mrkD mrkD-F mrkD-R	5'-TTCTGCACAGCGGTCCC-3' 5'-GATACCCGGCGTTTTTCGTTAC-3'	240	[87]
wcaG wcaG-F wcaG-R	5'- GGTTGGKTCAGCAATCGTA -3' 5'- ACTATTCCGCCAACTTTTGC -3'	169	[86]
kpn kpn-F kpn-R	5'- GTATGACTCGGGGAAGATTA-3' 5'- CAGAAGCAGCCACCACACG-3'	626	[89]
ycfM ycf-F ycf-R	5'- ATCAGCAGTCGGGTCAGC-3' 5'- CTTCTCCAGCATTTCAGCG-3'	160	
entB entB-F entB-R	5'- ATTCCTCAACTTCTGGGGC-3' 5'- AGCATCGGTGGCGGTGGTCA-3'	371	
iutA iutA-F iutA-R	5'-GGCTGGACATCATGGGAACCTGG-3' 5'- CGTCGGGAACGGGTAGAATCG-3'	300	[91]
iroN iroN-F iroN-R	5'- AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG-3' 5'- GACGCCGACATTAAGACGCAG-3'	665	[77]
hly hly-F hly-R	5'-AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT -3' 5'-ACCATATAAGCGGTCAATCCCGTCA -3'	1177	[91]
cnf-1 cnf-F cnf-R	5'-AAGATGGAGTTTCTATGCAGGAG-3' 5'-CATTTCAGAGTCCTGCCCTCATTATT -3'	498	

3.6. Agaroz Jel Elektroforezi

Elektroforez tanklarını doldurmak ve agaroz jelin hazırlanması için 1× TBE (Tris-Borat-EDTA (1×TBE: 89 mM Tris, 89 mM Borik Asit ve 2 mM EDTA) tamponu kullanıldı. Erlenmayer içerisindeki elektroforez tamponuna, DNA izolasyonu sonucu elde edilen ürünler için % 1,5, Multiplex PCR ile elde edilen karbapenemaz ve virülans gen bölgeleri için % 1,8 konsantrasyon olacak şekilde toz agaroz eklendi. Tampon içindeki agaroz eriyene kadar mikrodalga fırında tutuldu. Agaroz taneciklerinin mümkün olan en kısa sürede erimesi sağlandı (Şekil 3.15).



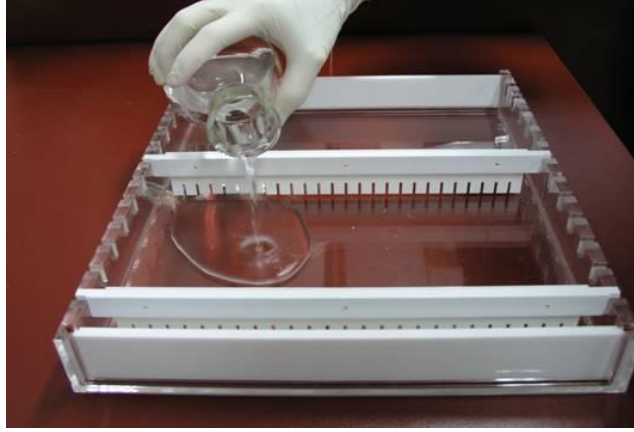
Şekil 3. 15. : Agarozun hassas terazide tartımı ve mikrodalga fırında eritilmesi

Erlenmayer düzenli olarak karıştırılarak çepere yapışan taneciklerin çözeltiye katılması sağlandı. Sıcaklık yaklaşık olarak 55°C olunca jele yatay elektroforez tankına dökülmeden önce 0.05 mg/ml'lik etidium bromür (MpBIO, Amerika) eklendi (Şekil 3.16).



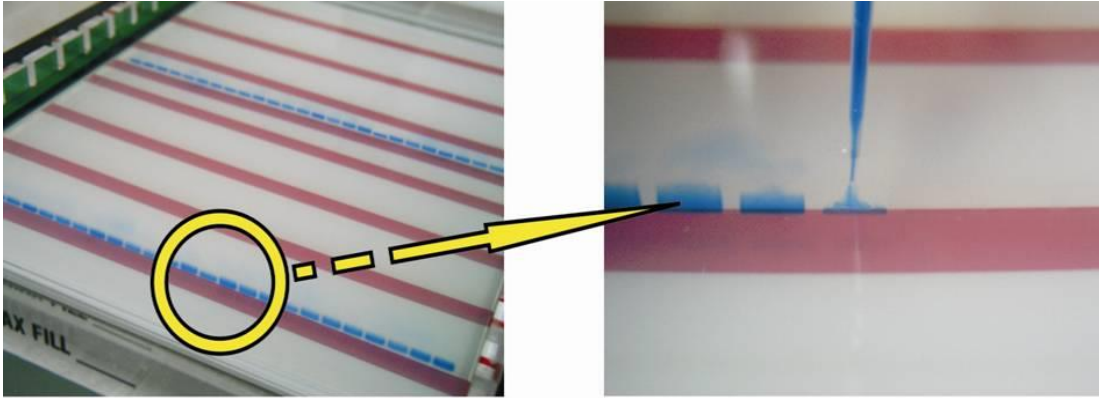
Şekil 3. 16. : Boyanın agaroz jele eklenmesi

Elektroforez düzeneği kurulduktan sonra, agaroz çözeltisi tarağın dişleri arasında ya da altında hava kabarcıkları olmamasına dikkat edilerek kalıbın içerisine döküldü (Şekil 3.17).



Şekil 3. 17. : Agaroz jelin dökülmesi

Jel, polimerize olduktan sonra içerisinde $1\times$ TBE (pH 8.3) tamponu olan elektroforez tankına yerleştirildi. 15 μ l amplifikasyon ürününe 5 μ l yükleme boyası (6X; NEB, İngiltere) ilave edilerek örnekler toplam 20 μ l hacimde olacak şekilde kuyucuklara yüklendi (Şekil 3.18).



Şekil 3. 18. : Örneklerin agaroz jele yüklenmesi

Örnekler 150 V sabit voltaj uygulanarak 2 saat yürütüldü. Daha sonra jel Gel Logic 200 Molecular Imaging System görüntüleme sistemi (Kodak, Rochester) ile görüntülendi.

3.7. İstatistiksel Analiz

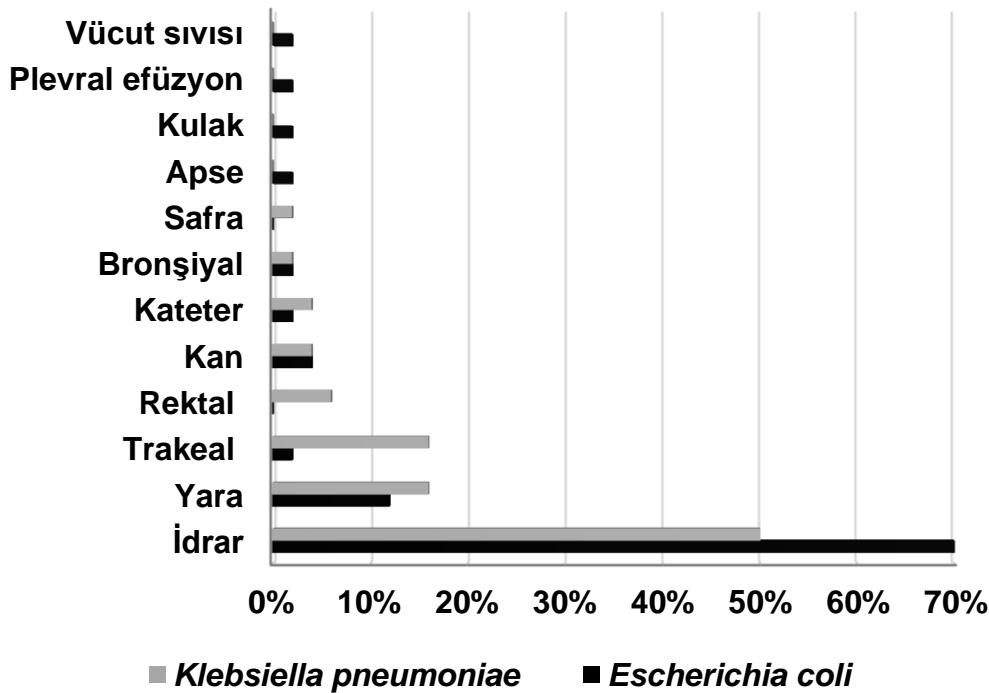
Elde edilen sonuçların istatistiksel değerlendirmesi için "Minitab v17.1.0" programı kullanılmıştır. Analiz için Fisher'in kesin testi kullanılarak değerlendirme yapıldı. P değerinin ≤ 0.05 olması halinde elde edilen sonuçlar arasında önemli bir fark olduğu kabul edildi.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Çalışmada Kullanılan Bakteriler

Apse, bronşiyal, idrar, kan, kateter, kulak, plevral efüzyon, rektal sürüntü, safra, trakeal, vücut sıvısı ve yara kültürlerinden 50 *Escherichia coli* ve 50 *Klebsiella pneumoniae* izolatları toplandı. Çeşitli klinik örneklerden izole edilen bu izolatların hastalara ait klinik örneklere göre dağılımları belirlendi.

Çalışmamızda izole edilen 50 *E. coli*'nin 35'i idrar, 6'sı yara, 2'si kan, diğerleri ise; apse, bronşiyal aspirasyon, kateter ucu, kulak sıvısı, plevral efüzyon, trakeal, vücut sıvısı kaynaklıdır. 50 *K. pneumoniae*'nin ise; 25'i idrar, 8'i trakeal, 8'i yara, 3'ü rektal, 2'si kan, 2'si kateter ve diğerleri bronşiyal ve safra kaynaklıdır. İzolatların klinik örneklere göre yüzde dağılımları Şekil 4.1'deki grafikte açıkça görülmektedir.



Şekil 4. 1. : *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının klinik örneklere göre yüzde dağılımları

4.2. İzolatların Tanı Sonuçları

İncelenen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının sayısı, uygulanan testler ve bu testlerin sonuçları Çizelge 4.1 ve 4.2'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1: *E. coli* izolatlarının toplu test sonuçları

İzolat no	Kültür	VITEK-32	IMViC				MİO		KA	EMB		HİPERMUKOİD	
		İzolat	I	MR	VP	C	Ornitin	Hareket	Hemoliz	Metalik röfle	Laktoz	>5mm	M koloni
1	Apse	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
2	Bronşiyal	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
3	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
4	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
5	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
6	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
7	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
8	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
9	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
10	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	-
11	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
12	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
13	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
14	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
15	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
16	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
17	Kan	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
18	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
19	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
20	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-

1-20, *E. coli*; EMB, Eozin Metilen Mavili Besiyeri; KA, Kanlı Agar; MİO, Hareket, İndol, Ornitin Besiyeri.

Çizelge 4.1.'in devamı

İzolat no	Kültür	VITEK-32	IMViC				MİO		KA	EMB		HİPERMUKOİD	
		İzolat	I	MR	VP	C	Ornitin	Hareket	Hemoliz	Metalik röfle	Laktoz	>5mm	M koloni
21	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
22	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	-
23	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
24	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
25	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
26	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
27	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
28*	Plevral efüzyon	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
29	Kateter	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
30	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
31	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
32	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
33	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
34	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
35	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
36	Trakeal	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
37	Kan	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
38	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	α	+	+	-	-
39	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	α	+	+	-	-
40	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-

21-40, *E. coli*; EMB, Eozin Metilen Mavili Besiyeri; KA, Kanlı Agar; MİO, Hareket, İndol, Ornitin Besiyeri.

*Gülmez ve ark. (2008) tarafından yapılan çalışmada kullanılan plevral efüzyon suşu çalışmamıza dahil edilmiştir.

Çizelge 4.1.'in devamı

İzolasyon no	Kültür	VITEK-32	IMViC				MİO		KA	EMB		HİPERMUKOİD	
		İzolasyon	I	MR	VP	C	Ornitin	Hareket	Hemoliz	Metalik röfle	Laktoz	>5mm	M koloni
41	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
42	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
43	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
44	Vücut sıvısı	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
45	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
46	Kulak	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
47	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	α	-	+	-	-
48	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-
49	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	+
50	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-

41-50, *E. coli*; EMB, Eozin Metilen Mavili Besiyeri; KA, Kanlı Agar; MİO, Hareket, İndol, Ornitin Besiyeri.

Çizelge 4. 2: : *K. pneumoniae* izolatlarının toplu test sonuçları

İzolat no	Kültür	VITEK-32 İzolat	IMViC				MiO		KA	EMB		HİPERMUKÖİD	
			I	MR	VP	C	Ornitin	Hareket	Hemoliz	Metalik röfle	Laktoz	(>5mm)	M koloni
51	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
52	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
53	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
54	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
55	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
56	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
57	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
58	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
59	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
60	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
61	Safra	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
62	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
63	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
64	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+
65	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
66	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
67	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
68	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+
69	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+

51-69, *K. pneumoniae*; EMB, Eozin Metilen Mavili Besiyeri; KA, Kanlı Agar; MiO, Hareket, İndol, Ornitin Besiyeri.

Çizelge 4.2.'nin devamı

İzolasyon no	Kültür	VITEK-32	IMViC				MİO		KA	EMB		HİPERMUKOİD	
		İzolasyon	I	MR	VP	C	Ornitin	Hareket	Hemoliz	Metalik röfle	Laktoz	(>5mm)	M koloni
70	Kateter	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
71	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
72	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
73	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
74	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
75	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
76	Kateter	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
77	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
78	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
79	Rektal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
80	Rektal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
81	Kan	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
82	Rektal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
83	Bronşiyal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
84	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
85	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
86	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
87	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
88	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
89	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
90	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+

70-90, *K. pneumoniae*; EMB, Eozin Metilen Mavili Besiyeri; KA, Kanlı Agar; MİO, Hareket, İndol, Ornitin Besiyeri.

Çizelge 4.2.'nin devamı

İzolat no	Kültür	VITEK-32	IMViC				MİO		KA	EMB		HİPERMUKOİD	
		İzolat	I	MR	VP	C	Ornitin	Hareket	Hemoliz	Metalik röfle	Laktoz	(>5mm)	M koloni
91	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
92	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
93	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
94	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
95	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
96	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
97	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
98	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+
99	Kan	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+
100	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+

91-100, *K. pneumoniae*, EMB, Eozin Metilen Mavili Besiyeri; KA, Kanlı Agar; MİO, Hareket, İndol, Ornitin Besiyeri.

4.3. İzolatların Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) ve Karbapenem Dirençlerinin Saptanması

CHROMagar KPC (*K. pneumoniae* karbapenemaz) besiyerine göre; toplanan 50 *E. coli*'den 10'u, 50 *K. pneumoniae*'den 34'ü karbapenem pozitif olarak saptanmıştır. CHROMagar ESBL (Extended spectrum beta lactamase) besiyerine göre ise; toplanan 50 *E. coli*'den 38'i, 50 *K. pneumoniae*'den 49'u karbapenem pozitif olarak saptanmıştır. İzolatların GSBL ve karbapenem direnci durumları Çizelge 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4. 3: *E. coli* izolatlarının GSBL ve KPC direnç durumları

İzolat no	Kültür	VITEK-32			CHROMagar		
		İzolat	GSBL	KPC	Orientation	GSBL	KPC
1	Apse	<i>E.coli</i>	-	-	<i>E.coli</i>	+	-
2	Bronşiyal	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
3	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
4	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
5	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
6	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
7	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
8	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
9	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
10	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
11	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
12	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
13	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
14	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
15	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
16	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
17	Kan	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
18	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
19	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
20	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
21	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
22	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
23	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
24	Yara	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
25	Yara	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
26	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
27	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-

1-30, *E. coli*; GSBL, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz, Karbapenem dirençli olanlar koyu renk ile gösterilmiştir.

Çizelge 4.3'ün devamı

İzolat no	Kültür	VITEK-32			CHROMagar		
		İzolat	GSBL	KPC	Orientation	GSBL	KPC
28	Plevral efüzyon	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	+
29	Kateter	<i>E.coli</i>	-	+	<i>E.coli</i>	-	+
30	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	-
31	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	-
32	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	+
33	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	+
34	İdrar	<i>E.coli</i>	-	+	<i>E.coli</i>	-	-
35	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	+
36	Trakeal	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	+
37	Kan	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	+
38	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	+
39	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	<i>E.coli</i>	-	+
40	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	-
41	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	+
42	Yara	<i>E.coli</i>	-	+	<i>E.coli</i>	-	-
43	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	<i>E.coli</i>	+	-
44	Vücut sıvısı	<i>E.coli</i>	-	-	<i>E.coli</i>	-	-
45	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	<i>E.coli</i>	-	-
46	Kulak	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
47	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	<i>E.coli</i>	-	-
48	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	<i>E.coli</i>	-	-
49	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-
50	İdrar	<i>E.coli</i>	+	-	<i>E.coli</i>	+	-

31-50, *E. coli*; GSBL, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz; KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz, Karbapenem dirençli olanlar koyu renk ile gösterilmiştir.

Çizelge 4. 4: *K. pneumoniae* izolatlarının GSBL ve KPC direnç durumları

İzolat no	Kültür	VITEK-32			CHROMagar		
		İzolat	GSBL	KPC	Orientation	GSBL	KPC
51	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
52	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
53	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
54	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
55	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
56	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
57	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
58	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
59	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
60	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
61	Safra	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
62	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
63	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	+	<i>K.pneumoniae</i>	-	+
64	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
65	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
66	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
67	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
68	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
69	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
70	Kateter	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
71	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
72	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
73	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
74	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
75	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
76	Kateter	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
77	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
78	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
79	Rektal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
80	Rektal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+

51-80, *K. pneumoniae*; GSBL, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz; KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz, Karbapenem dirençli olanlar koyu renk ile gösterilmiştir.

Çizelge 4.4.'ün devamı

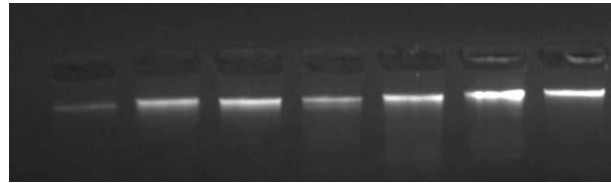
İzolat no	Kültür	VITEK-32			CHROMagar		
		İzolat	GSBL	KPC	Orientation	GSBL	KPC
81	Kan	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
82	Rektal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
83	Bronşiyal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
84	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
85	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
86	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
87	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
88	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
89	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
90	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
91	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
92	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
93	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
94	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
95	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
96	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
97	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
98	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-
99	Kan	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	<i>K.pneumoniae</i>	+	+
100	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	-	<i>K.pneumoniae</i>	+	-

81-100; *K. pneumoniae*; GSBL; genişlemiş spektrumlu beta laktamaz; KPC; *K. pneumoniae* karbapenemaz, Karbapenem dirençli olanlar koyu renk ile gösterilmiştir.

4.4. Genomik ve Plazmid DNA Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

4.4.1. Genomik DNA Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

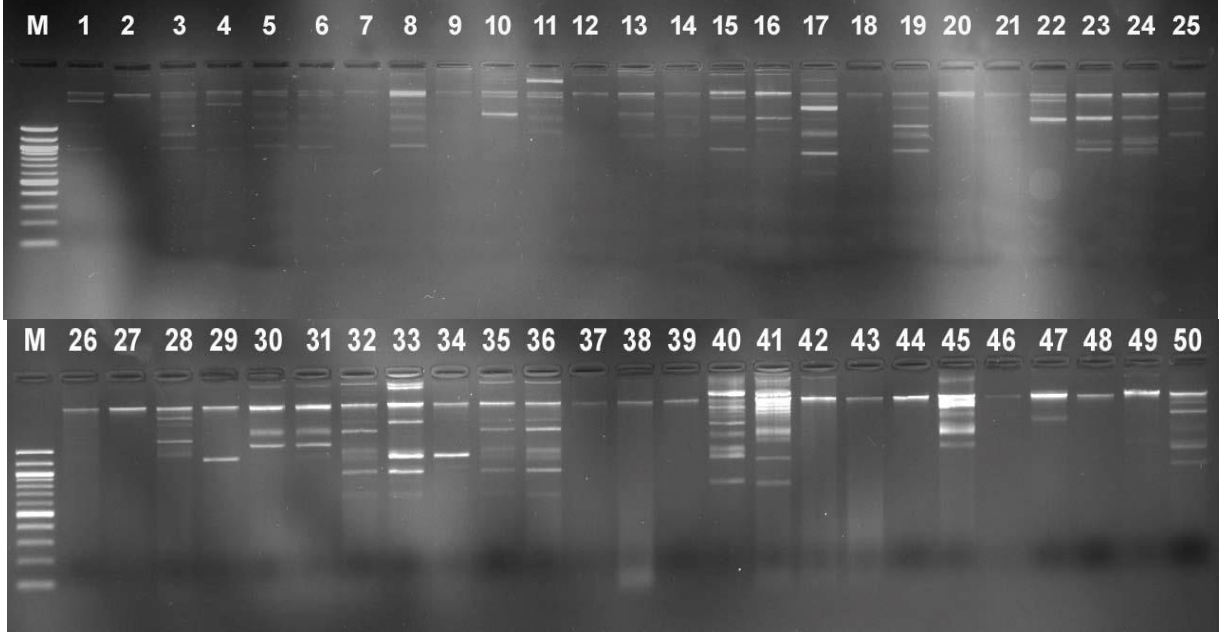
Çalışma kapsamında *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarından izole edilen genomik DNA ürünlerinin jel görüntüleri Şekil 4.2'de verilmiştir.



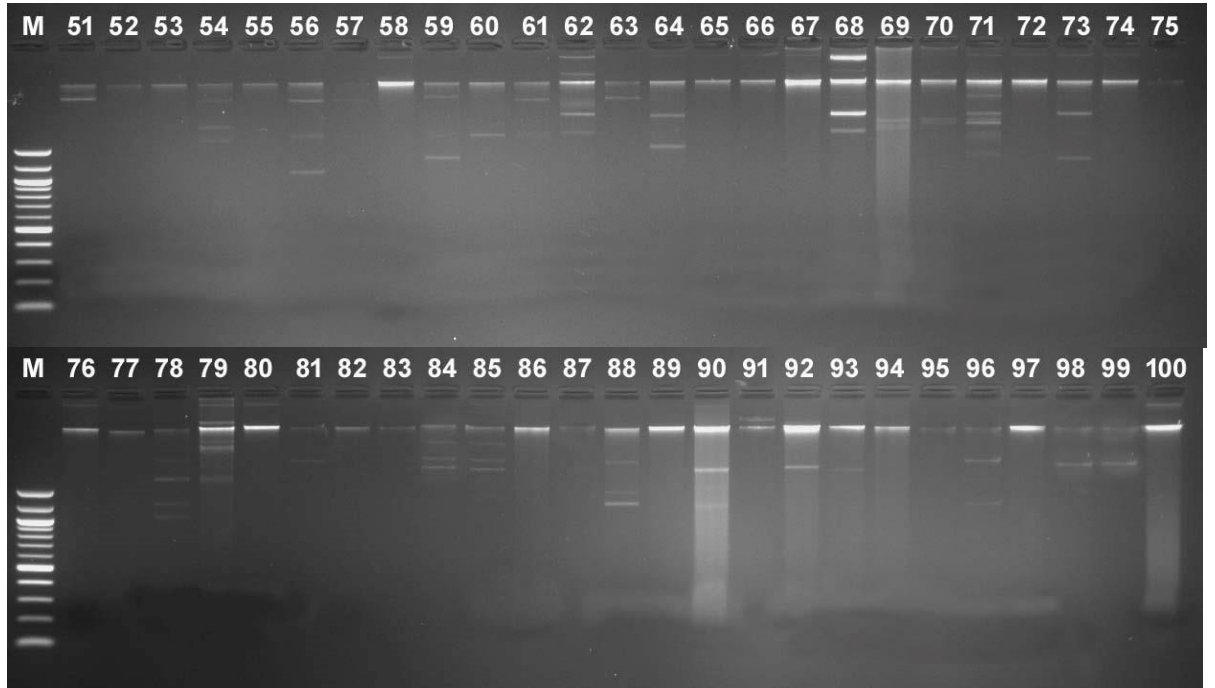
Şekil 4. 2. : Genomik DNA ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü

4.4.2. Plazmid DNA Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

Çalışma kapsamında *E.coli* ve *K.pneumoniae* suşlarından izole edilen plazmid profilleri sırasıyla Şekil 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4. 3. : *E.coli* suşlarının plazmid DNA ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. 1-50, *E.coli*; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı



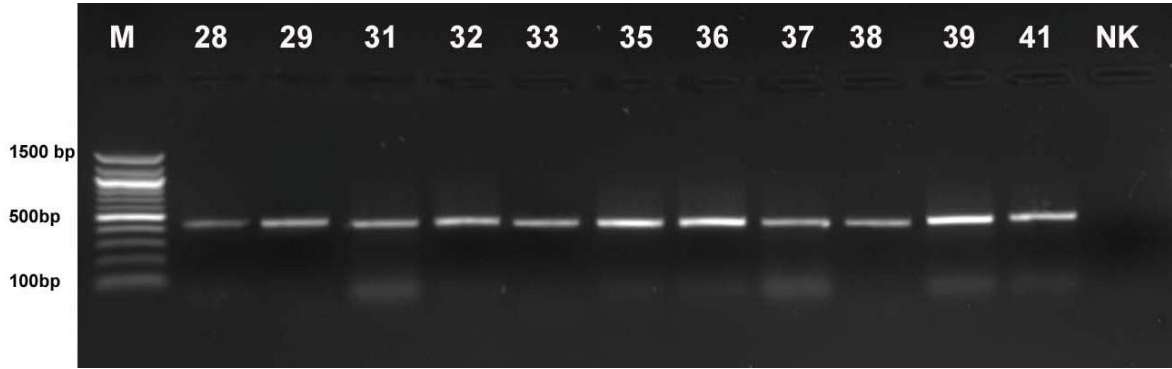
Şekil 4. 4. : *K.pneumoniae* suşlarının plazmid DNA ürünlerinin agaroz jeldeki görüntüsü. 51-100, *K.pneumoniae*; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı

4.5. Karbapenemaz Gen Bölgelerinin Multiplex PCR Analizi

Çalışma kapsamında toplanan *E.coli* ve *K.pneumoniae* izolatlarının %44'ünde (*E.coli*'de 11, *K.pneumoniae*'de 33) OXA-48 tip karbapenem direnci saptandı.

4.5.1. *E.coli*'de Karbapenemaz Gen Bölgelerinin Analizi

Toplanan 50 *E. coli*'nin 11 (%22)'sinde plazmid kökenli OXA-48 karbapenemaz gen bölgesi saptanmıştır. Çalışma kapsamında Multiplex PCR yöntemi ile karbapenemaz gen bölgesi saptanan *E. coli* izolatlarına ait jel görüntüleri Şekil 4.5'te verilmiştir.



Şekil 4.5. : *E. coli* izolatlarında OXA-48 tip (438 kb) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 28-41, *E. coli*; NK, Negatif kontrol, M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı

İzolatların CHROMagar ve Multiplex PCR ile elde edilen karbapenem direnç durumları Çizelge 4.5'te karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Karbapenem direnci açısından her iki yöntemin sonuçları 31 numaralı izolat haricinde uyumlu bulunmuştur.

Çizelge 4. 5: *E. coli* izolatlarının karbapenem direncine ait toplu test sonuçları

İzolat no	Kültür	CHROMagar		Multiplex PCR		
		Orientation	KPC	Genomik DNA	Plazmid DNA	Karbapenemaz tipi
1	Apse	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
2	Bronşiyal	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
3	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
4	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
5	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
6	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
7	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
8	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
9	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
10	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
11	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
12	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
13	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
14	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
15	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
16	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
17	Kan	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
18	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
19	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
20	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-

KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz

Çizelge 4.5.'in devamı

İzolat no	Kültür	CHROMagar		Multiplex PCR		
		Orientation	KPC	Genomik DNA	Plazmid DNA	Karbapenemaz tipi
21	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
22	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
23	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
24	Yara	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
25	Yara	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
26	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
27	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
28	Plevral efüzyon	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
29	Kateter	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
30	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
31	İdrar	<i>E.coli</i>	-	+	+	OXA-48
32	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
33	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
34	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
35	Yara	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
36	Trakeal	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
37	Kan	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
38	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
39	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
40	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-

KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz; OXA, Oksasilinaz tip, Karbapenem dirençli olanlar koyu renk ile gösterilmiştir.

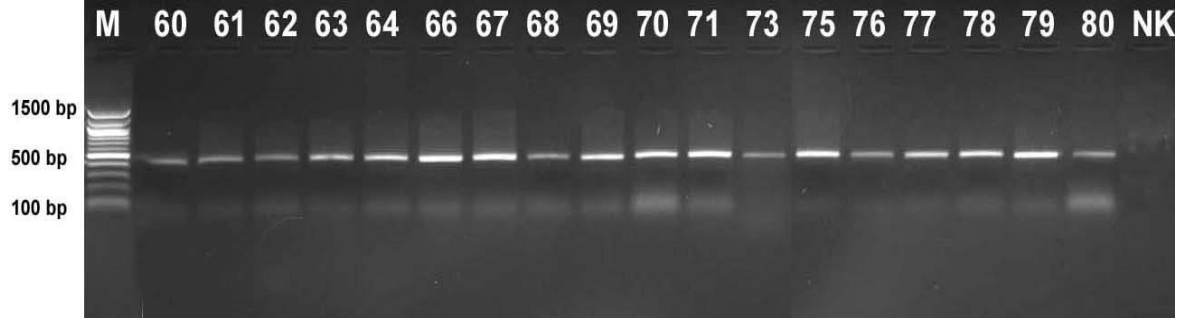
Çizelge 4.5.'in devamı

İzolat no	Kültür	CHROMagar		Multiplex PCR		
		Orientation	KPC	Genomik DNA	Plazmid DNA	Karbapenemaz tipi
41	İdrar	<i>E.coli</i>	+	+	+	OXA-48
42	Yara	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
43	Yara	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
44	Vücut sıvısı	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
45	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
46	Kulak	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
47	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
48	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
49	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-
50	İdrar	<i>E.coli</i>	-	-	-	-

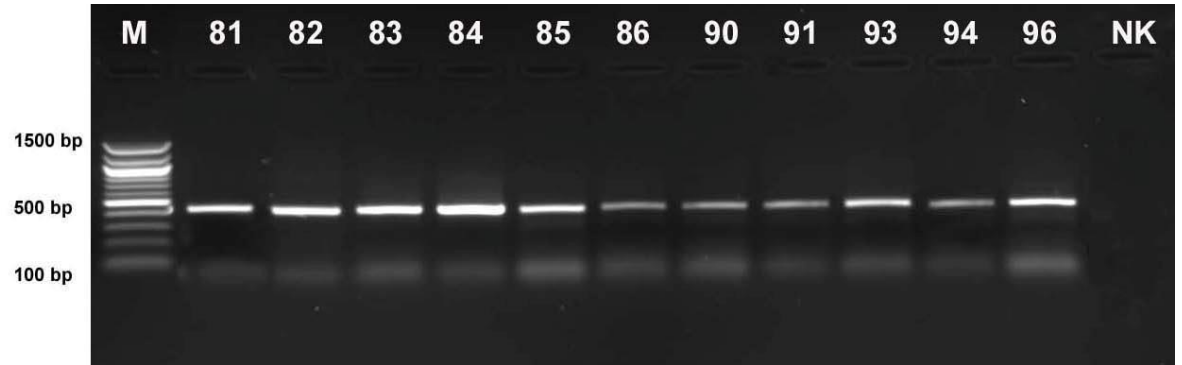
KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz; OXA, Oksasilinaz tip

4.5.2. *K. pneumoniae*'de Karbapenemaz Gen Bölgelerinin Analizi

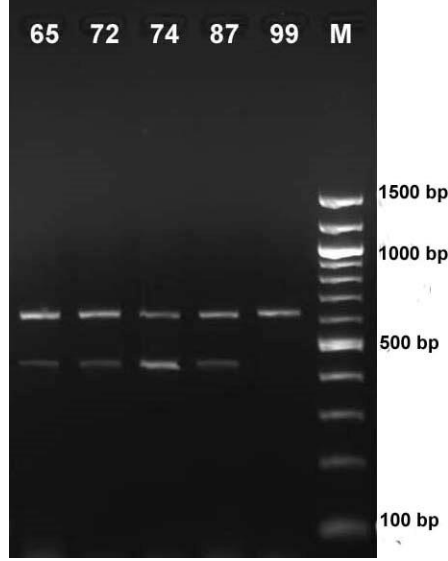
Toplanan 50 *K. pneumoniae*'nin 29 (%58)'inde yalnızca plazmid kökenli OXA-48, birinde (%2) yalnızca NDM-1, 4 (%8)'inde ise; hem OXA-48 hem de NDM-1 karbapenemaz gen bölgeleri bulunmaktadır. Çalışma kapsamında Multiplex PCR yöntemi ile karbapenemaz gen bölgesi saptanan *K. pneumoniae* izolatlarına ait jel görüntüleri Şekil 4.6-4.8'de verilmiştir.



Şekil 4. 6: *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48 tip (438 bp) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 60-80, *K. pneumoniae*; NK, Negatif kontrol; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı



Şekil 4. 7: *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48 tip (438 bp) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 81-96, *K. pneumoniae*; NK, Negatif kontrol; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı



Şekil 4. 8: *K. pneumoniae* izolatlarında OXA-48 (438 kb) ve NDM-1 tip (621 kb) gen bölgesine ait jel görüntüleri. 65, 72, 74, 87, Multi direnç; 99, NDM-1 tip; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı

İzolatların CHROMagar ve Multiplex PCR ile elde edilen karbapenem direnç durumları Çizelge 4.6'da karşılaştırılmalı olarak verilmiştir. Karbapenem direnci açısından her iki yöntemin sonuçları uyumlu bulunmuştur. Bu yöntemin *E. coli* ve *Klebsiella* gibi karbapenem direnci pozitif bazı bakteriler için %92,7 duyarlılık ve %95,9 özgüllükte sonuçlar verdiği bilinmektedir [99].

Çizelge 4. 6: *K. pneumoniae* izolatlarının karbapenem direncine ait toplu test sonuçları

İzolat no	Kültür	CHROMagar		Multiplex PCR		
		Orientation	KPC	Genomik DNA	Plazmid DNA	Karbapenemaz tipi
51	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
52	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
53	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
54	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
55	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
56	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
57	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
58	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
59	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
60	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
61	Safra	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
62	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
63	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
64	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
65	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48 ve NDM-1
66	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
67	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
68	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
69	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
70	Kateter	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48

KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz, OXA, Oksasilinaz tip; NDM, New Delhi Metallo beta-laktamaz tip

Çizelge 4.6'nın devamı

İzolasyon no	Kültür	CHROMagar		Multiplex PCR		
		Orientation	KPC	Genomik DNA	Plazmid DNA	Karbapenemaz tipi
71	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
72	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48 ve NDM-1
73	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
74	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48 ve NDM-1
75	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
76	Kateter	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
77	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
78	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
79	Rektal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
80	Rektal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
81	Kan	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
82	Rektal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
83	Bronşiyal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
84	Trakeal	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
85	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
86	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
87	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48 ve NDM-1
88	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
89	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
90	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48

KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz, OXA, Oksasilinaz tip; NDM, New Delhi Metallo beta-laktamaz tip

Çizelge 4.6'nın devamı

İzolat no	Kültür	CHROMagar		Multiplex PCR		
		Orientation	KPC	Genomik DNA	Plazmid DNA	Karbapenemaz tipi
91	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
92	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
93	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
94	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
95	Yara	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
96	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	OXA-48
97	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
98	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-
99	Kan	<i>K.pneumoniae</i>	+	+	+	NDM-1
100	İdrar	<i>K.pneumoniae</i>	-	-	-	-

KPC, *K. pneumoniae* karbapenemaz, OXA, Oksasilinaz tip; NDM, New Delhi Metallo beta-laktamaz tip

Ülkemizde *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de yaygın olarak görülen karbapenemazlar; OXA-48 ve NDM-1'dir [49, 61, 62, 106, 107]. Bunun yanında son yıllarda; IMP-1, VIM-1 ve OXA-51 tip karbapenemazlar saptanmıştır [53-55, 61, 108, 109].

Çalışma kapsamında toplanan izolatların %44'ünde OXA-48 tip direnç saptandı. Plazmid kökenli bu direncin çalışmadaki diğer direnç tiplerine göre yüksek olması 2010 yılında Carrer ve arkadaşları [110] tarafından yapılan Türkiye'nin çeşitli illerini kapsayan çalışması ile uyumlu bulunmuştur. Ayrıca; bu direncin özellikle ülkemizde diğer direnç tiplerine göre daha yaygın olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [41, 61, 106, 111].

Çalışmamızda; OXA-48 tip karbapenem direncinin yanı sıra günümüzde Türkiye'de de görülmeye başlayan NDM-1 tip karbapenem direnci saptandı [41, 49]. Dünya'da en fazla *K.pneumoniae*'da sonra da *E.coli*'de görülen bu direnç tipi ülkemizde en fazla *K.pneumoniae*'de görülmektedir [49, 61, 112]. NDM-1 tip direncin ilk olarak Hindistan'da görülmesinin ardından Pakistan ve Bangladeş'te de aynı tip direnç saptanmıştır. Bunun yanında, daha sonraki zamanlarda Orta Doğu ile ilişkili birçok hastada NDM-1 üreten enterobakteriyel izolatlar rapor edilmiştir [41]. NDM-1 tip direncin ülkemize girişi bu direncin daha önceden Irak'ta tespit edilmiş olması kolonize olmuş bir hastanın Türk hastanesine kabulü ile olduğu rapor edilmiştir [107].

Çalışma sonuçlarından elde edilen karbapenem direnci açısından en önemli bulgu ise; *K.pneumoniae* izolatlarının 4'ünde hem OXA-48 hem de NDM-1 direncinin bir arada görülmesidir. Buna benzer bir durum; 2012 yılında Tunus'ta OXA-48 ve NDM-1, aynı yıl içerisinde Fas'ta OXA-48, NDM-1 ve VIM-1 ve Umman'da NDM-1, OXA-48 ve OXA-181 kombinasyonu şeklinde ortaya çıkmıştır [59, 63, 65]. Ülkemizde ise; ilk defa Alp ve ark. tarafından [61] yapılan bir çalışmada 2010-2011 yılları arasında toplanan 94 *K.pneumoniae* izolatının yalnızca %1'inde (1 izolat) OXA-48 ve NDM-1 direnci tespit edilmiştir. Kilic ve Baysallar [113] tarafından yapılan çalışmada ise; aynı multi direnç Suriye mülteci kampından Şanlıurfa Hastanesi'nde tedavi olan bir hastada saptanmıştır. Çalışmamızda ise bu direnç 4 *K. pneumoniae* izolatında tespit edilmiş ve zaman içerisinde artış gösterdiği açıktır. Son yıllarda fazla sayıda rapor edilen bu multi direnç için; Izdebski ve ark. tarafından [114] 2015 yılında Tunus'ta yapılan bir çalışmada; terör saldırılarını takiben ağır yaralı iki Polonyalı turistten

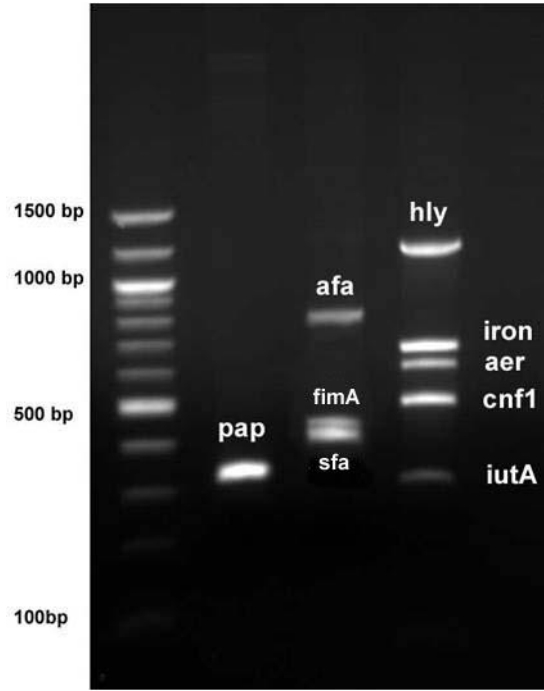
birinde yalnızca NDM-1 üreten *K.pneumoniae*, diğer hasta da ise; bu izolatin yanında OXA-48 üreten *K.pneumoniae* ve NDM-1 üreten *E.coli* izole edilmiştir.

Ülkemizde son yıllarda artış gösteren karbapenem direncinin; direncin görüldüğü ülkelere yapılan seyahatların yanı sıra son yıllarda ülkemizde artış gösteren terör olayları sonucu yaralıların ve ülkemize kabul edilen mültecilerin Türk hastanelerinde tedavisi nedeniyle hızlı bir şekilde yayılım gösterdiği açıktır.

4.6. Virülans Gen Bölgelerinin Multiplex PCR Analizi

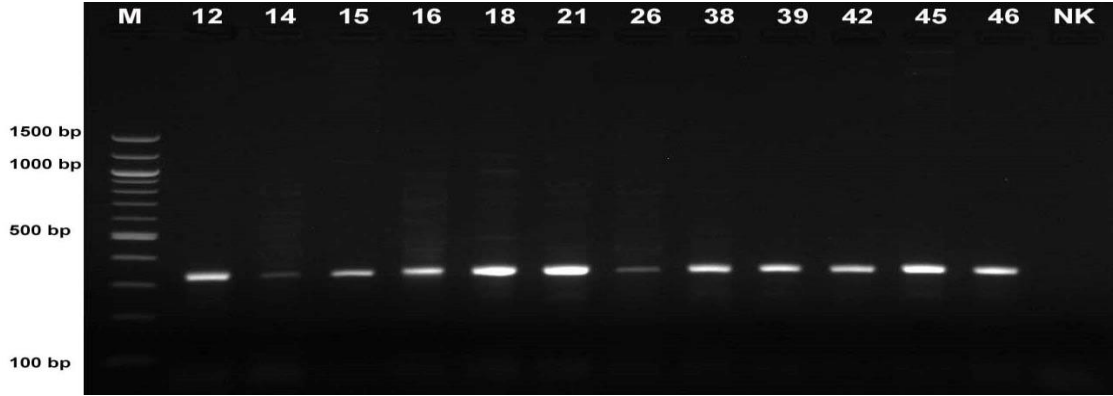
4.6.1. *E.coli*'de Virülans Gen Bölgelerinin Analizi

Çalışmamızda *E.coli* izolatları için 9 farklı virülans gen bölgesi (*pap*, *afa*, *fimA*, *sfa*, *hly*, *iroN*, *aer*, *cnf-1* ve *iutA*) Multiplex PCR ile analiz edildi. Analiz sonucu elde edilen virülans gen bölgeleri Şekil 4.9'da görülmektedir.

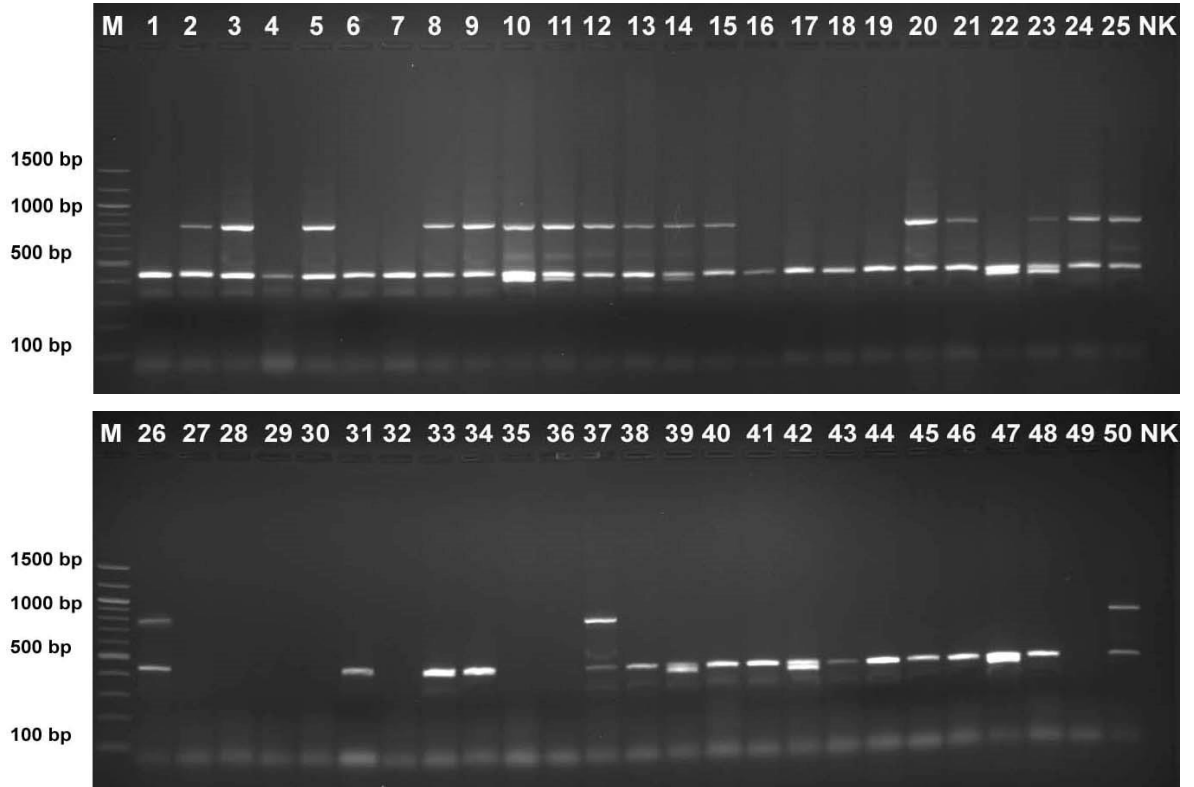


Şekil 4. 9 : *E.coli*'de bulunan virülans gen bölgeleri (*pap*; 328-336 bp, *afa*; 750 bp, *fimA*; 447 bp, *sfa*; 410 bp, *hly*; 1177 bp, *iroN*; 665 bp, *aer*; 602 bp, *cnf-1*; 498 bp, *iutA*; 300 bp)

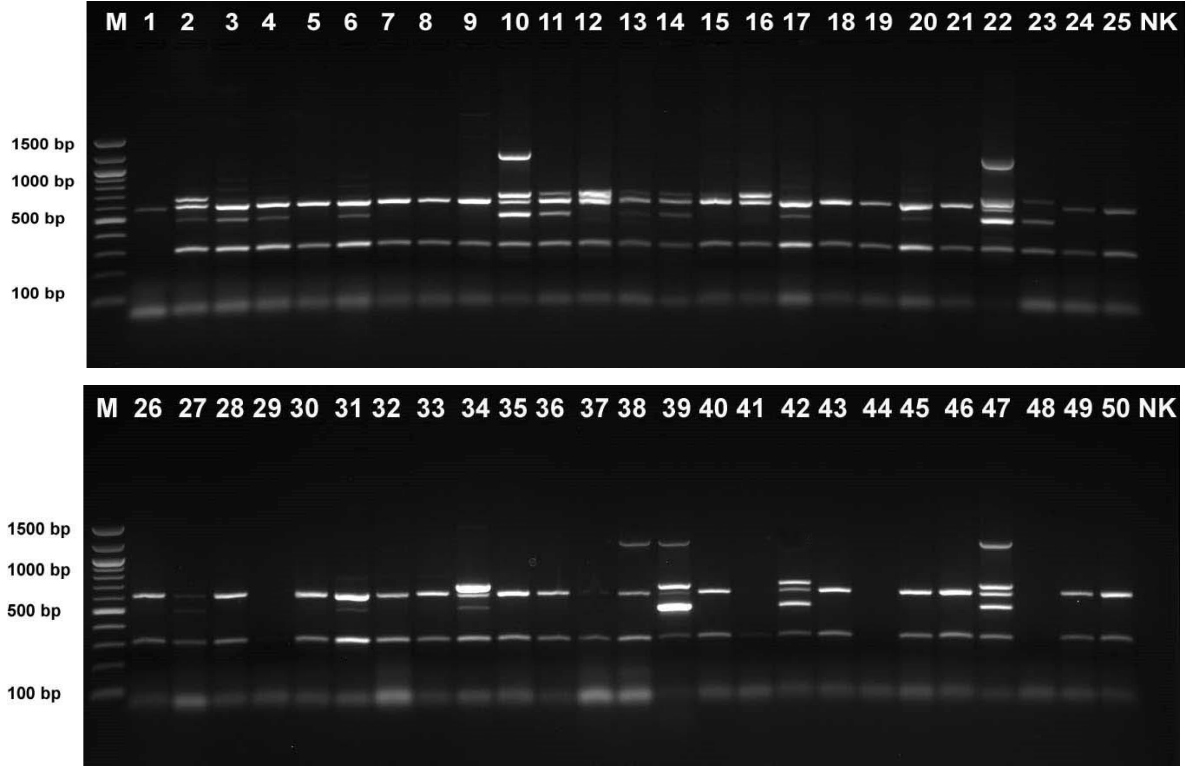
Virülans gen bölgesi saptanan *E. coli* izolatlarına ait jel görüntüleri Şekil 4.10-4.12'de verilmiştir.



Şekil 4. 10: *E. coli* izolatlarında *pap* (328-336 kb) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 12-46, *E. coli*; NK, Negatif kontrol; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı

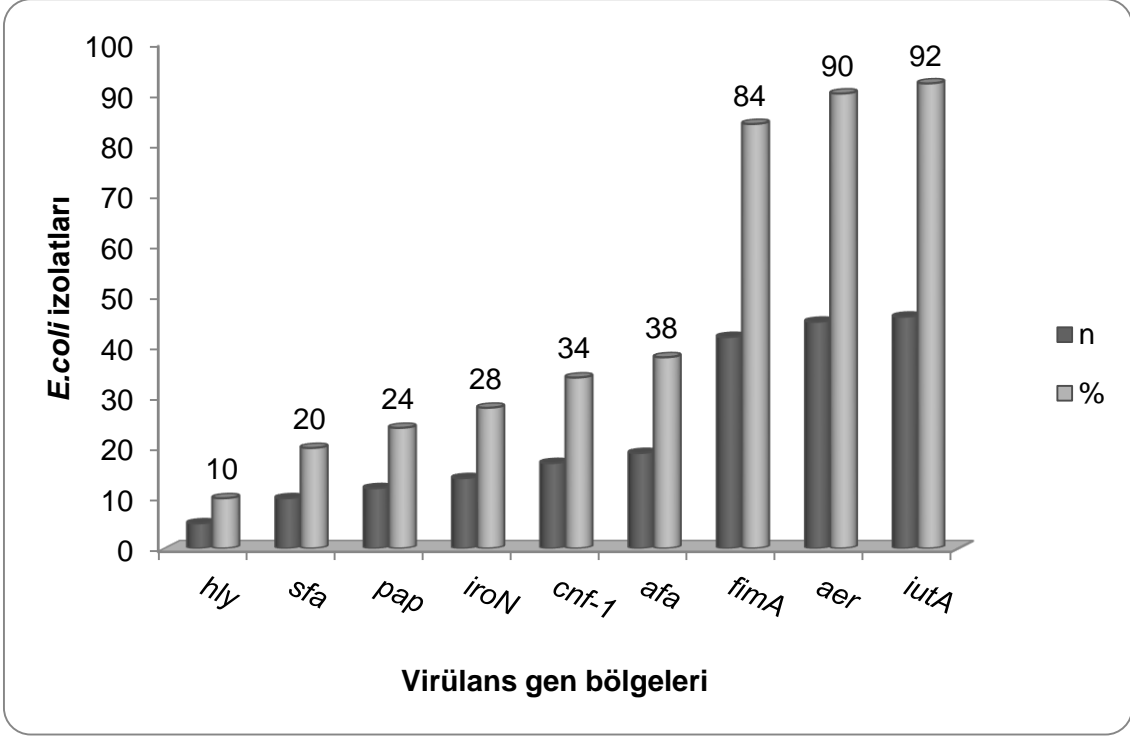


Şekil 4. 11: *E. coli* izolatlarında *afa* (750 kb), *fimA* (447 kb) ve *sfa* (410 kb) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 12-46, *E. coli*; NK, Negatif kontrol; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı



Şekil 4. 12: *E. coli* izolatlarında *hly* (1177 kb), *iroN* (665 kb), *aer* (602 kb), *cnf-1* (498 kb) ve *iutA* (300 kb) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 12-46, *E. coli*; NK, Negatif kontrol; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı

Saptanan virülans gen bölgelerinin *E.coli* izolatlarındaki dağılımı Şekil 4.13'deki grafikte açıkça görülmektedir. İzolatlar arasında sıklıkla rastlanan gen bölgeleri sırasıyla; %92 oranında siderofor tiplerinden ferrik aerobaktin üretiminden sorumlu olan *iutA* ve %90 aerobaktin üretiminden sorumlu olan *aer*, %84 Tip I fimbriya'yı ifade eden *fimA* gen bölgeleridir. İzolatlar arasında en az görülen virülans gen bölgesi ise; %10 oranında hemolizinden sorumlu olan *hly* gen bölgesidir.



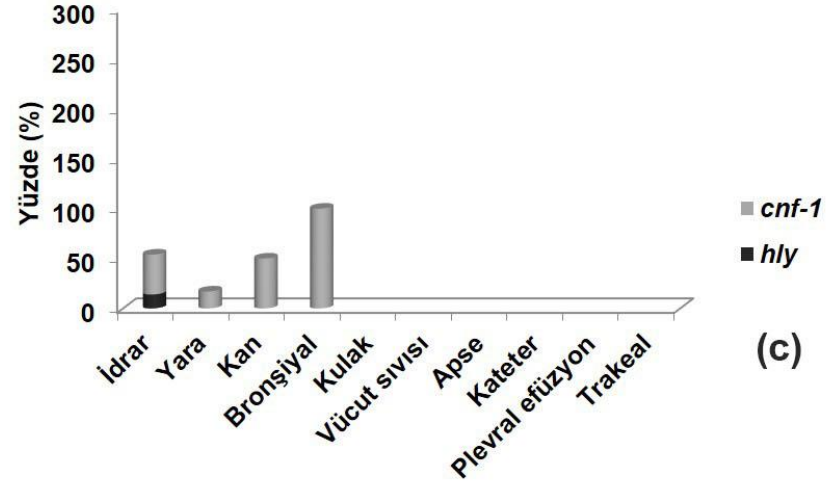
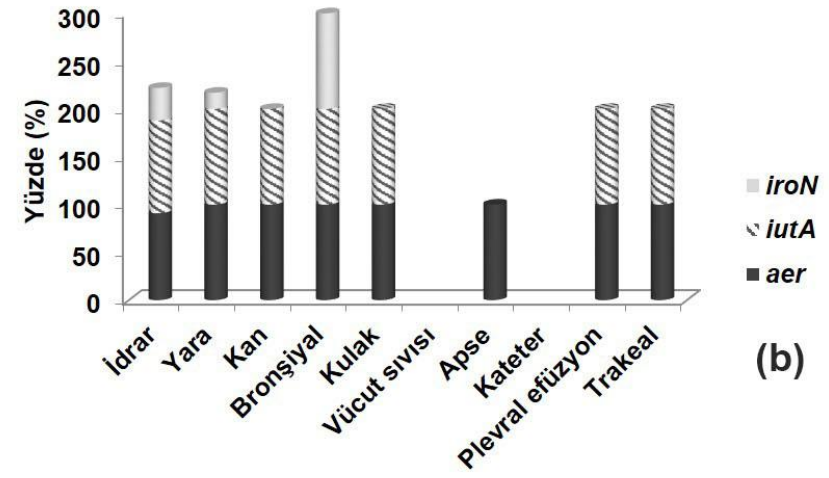
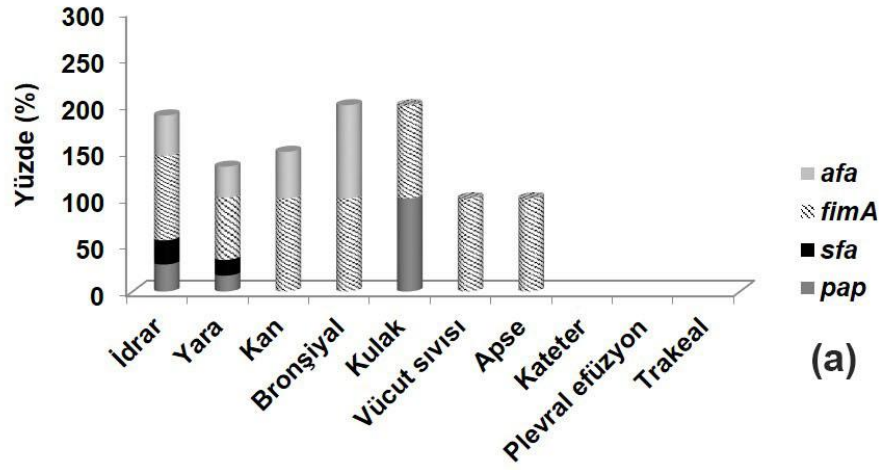
Şekil 4. 13.: Virülans gen bölgelerinin *E.coli* izolatlarındaki dağılımı. *n*; genlerin bulunduğu izolat sayısı, %; gen bölgelerinin toplam 50 izolata göre oranı

Sideroforlar, demir varlığı sınırlı olan doku ve kanda bakteri gelişimini destekleyen en önemli virülans faktördür. *aer* ve *iutA* gen bölgeleri tarafından ifade edilen aerobaktin ve ferrik aerobaktin *E.coli* virülansında önemli sideroforlar olup birçok izolatta bulunmaktadır [73, 74]. Çalışmamızda *E.coli* izolatlarında; enfeksiyonda önemli bir rolü olan aerobaktin üretiminden sorumlu *iutA* ve *aer* gen bölgeleri yüksek oranda bulunmuştur (Çizelge 4.13). Arısoy ve ark. [76] ve Tarchouna ve ark. [104] tarafından yapılan çalışmalarda; taranan virülans genleri içerisinde *aer* gen bölgesi en yüksek oranda (sırasıyla %42 ve %52) bulunmuştur. Ekstraintestinal *E.coli* izolatları ile yapılan başka bir çalışmada ise; virülans gen bölgeleri içerisinde en fazla *iutA* (%65) gen bölgesi saptanmış ve aynı çalışmada kullanılan kontrol (patojenik olmayan) izolatlarda bu gen bölgesine rastlanmamıştır [75]. Çalışmamızda siderofor ile ilişkili diğer bir gen bölgesi %28 oranında bulunan *iroN* gen bölgesidir (Çizelge 4.13). Bu gen bölgesi; salmochelin sideroforunun üretiminden sorumlu olup ürotelisel hücrelerde invazyona neden olmaktadır [115]. Koga ve ark. [75] tarafından yapılan çalışmada bu gen bölgesi *iutA*'dan sonra yüksek oranda (*iroN*; %55) saptanmıştır.

Çalışmamızda saptanan fimbriya ile ilişkili gen bölgeleri sırasıyla; *fimA* (%84), *afa* (%38), *pap* (%24) ve *sfa* (%20) şeklindedir (Çizelge 4.13). Tip 1 fimbriya *E.coli* izolatlarının çoğunluğunda yaygın olarak bulunan bir yapıdır [10]. Bu yapı, önemli bir virülans faktör olmasına rağmen hem patojenik hem de kommensal izolatlarda gözlenmektedir [72]. Çalışmamızda olduğu gibi bu gen bölgesinin diğer fimbriya tiplerine göre daha fazla olduğu birçok çalışmada rapor edilmiştir [75, 104, 116].

Hemolizin ekstraintestinal (sistit, menenjit, septisemi, piyelonefrit) ve intestinal enfeksiyonlara neden olan *E.coli*'nin çeşitli patojenik tipleri tarafından üretilmektedir ve virülans üzerindeki etkisi tam olarak aydınlatılmamıştır [10, 72]. Koga ve ark. [75] tarafından ekstraintestinal enfeksiyona neden olan *E.coli* izolatlarında yapılan çalışmada; *hly* gen bölgesi yüksek oranda bulunmasına rağmen patojen olmayan *E.coli* (kontrol grubu) izolatlarında da benzer bir oran bulunmuştur. Aynı çalışmada *cnf-1* gen bölgesi hiçbir izolatta saptanmamıştır. Benzer bir şekilde; Tarchouna ve ark., [104] tarafından yapılan bir çalışmada da, *hly* (%19) ve *cnf-1* (%3) gen bölgeleri en az saptanan gen bölgeleri olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda da bu gen bölgelerine ait oranların oldukça düşük olması bu durumu desteklemektedir.

E.coli izolatlarındaki virülans faktörlerin klinik örneklerle göre yüzde dağılımı Şekil 4.14'te fimbriya tipleri (*afa*, *fimA*, *sfa* ve *pap*), siderofor oluşumu (*iroN*, *iutA* ve *aer*) ve diğer virülans faktörler (*cnf-1* ve *hly*) ile ilişkili gen bölgelerinin klinik örneklerle göre dağılımı görülmektedir.



Şekil 4. 14. : E.coli'ye ait fimbriya tipleri (a), siderofor oluşumu (b) ve diğer virülans faktörlerin (c) klinik örnekler göre yüzde dağılımı. (İdrar; 35, yara; 6, kan; 2, bronşiyal; 1, kulak; 1, vücut sıvısı; 1, apse; 1, kateter; 1, plevral efüzyon; 1, trakeal; 1 izolat)

E.coli izolatlarındaki virülans faktörlerin klinik örneklerle göre dağılımına bakıldığında; virülans faktör çeşitliliği en fazla idrar örneklerinde görülmektedir (Şekil 4.14). Bu durum *E.coli*'nin insanlarda oldukça yaygın ve çok çeşitli semptomlarla görülen idrar yolu enfeksiyonlarının (sistik, piyelonefrit vb.) etkeni olması ile yakından ilişkilidir [72, 117].

İdrar yolu enfeksiyonları için en önemli virülans faktörler fimbriyalardır. Yapılan bir çalışmada; idrar yoludaki az ve çok virulan izolatlar arasında tip I fimbriya ile ilişkili genin bulunma sıklığında önemli bir fark bulunmadığı saptanmıştır [118]. Çalışmamızda ise; idrar örneklerinin %91'inde (32 izolat) *fimA* gen bölgesi saptanmıştır. Benzer bir şekilde; Johnson ve ark. [116] tarafından yapılan bir çalışmada çeşitli idrar yolu enfeksiyonu (sistit, piyelonefrit, prostatitis) etkeni *E.coli* izolatların da taranan virülans gen bölgeleri içerisinde %95 (60 izolat) oranında Tip 1 fimbriya saptanmıştır. Bu gen bölgesi; *E.coli* izolatlarının çoğunda yaygın olarak görülmesine rağmen idrar yolu enfeksiyonu etkeni izolatlarına özgü bir gen bölgesi olduğunu söylemek mümkündür.

Üropatojenik *E.coli*'nin patogenezinde önemli rol oynayan özellikle piyelonefrit ile ilişkili gen bölgesi olan *pap* gen bölgesi; çalışmada idrar örneklerinin yalnızca %29 (10 izolat)'unda saptanmıştır. Benzer bir sonuç Arısoy ve ark. [76] tarafından yapılan çalışmada 136 idrar yolu enfeksiyonu etkeni olan *E.coli* izolatlarında yapılan çalışmada bu oran %23 (31 izolat) şeklindedir. Wang ve ark. [117] tarafından yapılan çalışmada; komplike idrar yolu enfeksiyonu etkeni izolatlarda *pap* geni %94 (48 izolat) olarak bulunmuştur. Benzer şekilde; Roberts ve ark. [119] tarafından maymunlar üzerinde yapılan bir çalışmada; *pap* genin inaktive edilmesi ile *E.coli*'nin böbreklerdeki kolonizasyonun ve yangının azaldığı saptanmıştır. Bu çalışmalar da; *pap* geninin daha çok komplike idrar yolu enfeksiyonları ile ilişkili olduğunu net bir şekilde göstermektedir.

Çalışmamızda; afimbriyal adezin ile ilişkili *afa* geni idrar, yara, kan ve bronşiyal örneklerinde saptanmıştır (Çizelge 4.14). İnsanda hemopoietik endotel, intestinal ve üriner hücrelerdeki glikoprotein olan bozulma hızlandırma faktörü (DAF; Decay-accelerating factor) bu gen bölgesi ile ifade edilen afimbriyal adezinler için reseptör olmaları bu klinik örnekler ile olan ilişkiyi açıklamaktadır [10]. S fimbriya ile ilişkili *sfa* gen bölgesi de; *afa* gen bölgesi gibi idrar yolu enfeksiyonlarının yanında sepsis, menenjit gibi enfeksiyonlarda da bulunmaktadır [72]. Wang ve ark. [117] tarafından

yapılan çalışmada; komplike idrar yolu enfeksiyonu olan ve sağlıklı bireylerden alınan örneklerin hiçbirinde *sfa* ve *afa* genleri saptanmamıştır. Johnson ve ark. [116] tarafından yapılan benzer bir çalışmada da; *sfa* ve *afa* gen bölgelerine komplike idrar yolu enfeksiyonlarından alınan örneklerde sırasıyla %14 ve %3'ünde saptanmış olması bu tip enfeksiyonlar için özgü gen bölgeleri olmadığını göstermektedir.

Sideroforlar *E.coli*'nin çeşitli patojenik tiplerinin çoğunda fimbriyalardan sonra sıklıkla saptanan virülans faktörlerdir. Wang ve ark. [117] tarafından yapılan çalışmada; kontrol grubu, sistemik bir enfeksiyon olan akut kolanjit ve komplike idrar yolu enfeksiyonu etkeni *E.coli* izolatlarında virülans gen bölgeleri araştırılmıştır. Çalışmada aerobaktin üretiminden sorumlu *iutA* gen bölgesi, komplike idrar yolu enfeksiyonu etkenlerinde (%78; 40 izolat), akut kolanjit etkenleri (%52;13 izolat) ve kontrol grubuna (%47;14 izolat) göre daha yüksek oranda bulunmuştur. Buna karşın; Landgraf ve ark. [120] tarafından yapılan bir çalışmada, ferrik aerobaktin (*iutA*) ve üropatojeni arasında oldukça zayıf bir ilişki tespit etmiştir. Johnson et al. [116] ve Henderson ve ark. [74] tarafından yapılan araştırmalarda ise; idrar örneklerinde salmochelinin (*iroN*) ferrik aerobaktine (*iutA*) göre daha fazla bulunduğu saptanmıştır. Çalışmamızda ise; aerobaktin ve ferrik aerobaktinlerin klinik örneklerin birçok çeşidinde (Şekil 4.14), salmochelinin ise; ağırlıklı olarak idrar örneklerinde saptanmış olması salmochelinin idrar yolu enfeksiyonuna özgü bir siderofor olduğunu göstermektedir.

Çoğunlukla üropatojenik *E.coli* tarafından üretilen *cnf-1* ve *hly* gen bölgeleri özellikle idrar yolu enfeksiyonlarının semptomlarında meydana gelen yangı cevabının oluşumunda önemlidir [121]. *hly* gen bölgesinin piyelonefrit ve sistit gibi komplike idrar yolları enfeksiyonları ile ilişkili olduğu birçok araştırmacı tarafından rapor edilmiştir [72, 104, 117]. *cnf-1* gen bölgesi ise; piyelonefrite neden olan izolatların üçte birinde üretilmekte ve bu izolatlar böbrek invazyonuna neden olabilmektedir [72]. Wang ve ark. [117] tarafından yapılan çalışmada; komplike idrar yolu enfeksiyonuna neden olan *E.coli* izolatlarında *hly* ve *cnf-1* gen bölgeleri sırasıyla %23 ve %21 iken; kontrol grubunda bu gen bölgeleri %2 ve %1 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda da; *cnf-1* gen bölgesi %34 (17 izolat) olarak saptandı (Şekil 4.13) ve bu izolatların %82 (14 izolat)'si idrardan izole edilmiştir (Şekil 4.14). *hly* gen bölgesinde ise; bu oran %10 olup bu gen bölgesi yalnızca idrar örneklerinde saptanmıştır (Şekil 4.14) ve bu durumu destekler niteliktedir.

Çalışmada, karbapenem ve virülans gen profilleri bir arada değerlendirildiğinde 24 tip virülans profili tanımlandı. Tanımlanan virülans gen profilleri Çizelge 4.7’de izole edildikleri örnekler ile toplu bir şekilde verilmiştir. Çizelgede fimbriya ile ilişkili gen bölgeleri mavi, siderofor ile ilişkili gen bölgeleri yeşil, hemolizin ile ilişkili gen bölgesi kırmızı, sitotoksik nekrotizan faktör ise; mor renk ile ifade edilmiştir.

Çizelge 4. 7: *E.coli* izolatlarının karbapenem direnci ve virülans gen profilleri

İzolat no	Klinik örnek	Karbapenem direnci	Virülans gen profilleri
29	Kateter	OXA-48	-
44	Vücut sıvısı	karbapenem duyarlı	<i>fimA</i>
48	İdrar	karbapenem duyarlı	
41	İdrar	OXA-48	<i>fimA, iutA</i>
1	Apse	karbapenem duyarlı	<i>fimA, aer</i>
28	Plevral efüzyon	OXA-48	
32	Yara	OXA-48	
35	Yara	OXA-48	<i>aer, iutA</i>
36	Trakeal	OXA-48	
30	İdrar	karbapenem duyarlı	
49	İdrar	karbapenem duyarlı	
27	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>aer, iutA, cnf-1</i>
7	İdrar	karbapenem duyarlı	
19	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, aer, iutA</i>
40	İdrar	karbapenem duyarlı	
43	Yara	karbapenem duyarlı	
33	İdrar	OXA-48	<i>fimA, sfa, aer, iutA</i>
18	İdrar	karbapenem duyarlı	
45	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, pap, aer, iutA</i>
46	Kulak	karbapenem duyarlı	

Çizelge 4.7'nin devamı

İzolasyon no	Klinik örnek	Karbapenem direnci	Virülans gen profilleri
37	Kan	OXA-48	
5	İdrar	karbapenem duyarlı	
8	İdrar	karbapenem duyarlı	
9	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, afa, aer, iutA</i>
24	Yara	karbapenem duyarlı	
25	Yara	karbapenem duyarlı	
50	İdrar	karbapenem duyarlı	
31	İdrar	OXA-48	
4	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, aer, iutA, cnf-1</i>
6	İdrar	karbapenem duyarlı	
17	Kan	karbapenem duyarlı	
34	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, sfa, aer, iutA, iroN</i>
38	İdrar	OXA-48	<i>fimA, pap, aer, iutA, hly</i>
16	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, pap, aer, iutA, iroN</i>
21	İdrar	karbapenem duyarlı	
26	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, pap, afa, aer, iutA</i>
3	İdrar	karbapenem duyarlı	
20	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, afa, aer, iutA, cnf-1</i>
12	İdrar	karbapenem duyarlı	
15	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, pap, afa, aer, iutA, iroN</i>
23	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, sfa, afa, iutA, iroN, cnf-1</i>
2	Bronşiyal	karbapenem duyarlı	
13	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, afa, aer, iutA, iroN, cnf-1</i>
22	İdrar	karbapenem duyarlı	
47	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, sfa, aer, iutA, iroN, hly, cnf-1</i>
11	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, sfa, afa, aer, iutA, iroN, cnf-1</i>
42	Yara	karbapenem duyarlı	<i>fimA, pap, sfa, aer, iutA, iroN, cnf-1</i>
39	İdrar	OXA-48	<i>fimA, pap, sfa, aer, iutA, iroN, hly, cnf-1</i>
10	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, sfa, afa, aer, iutA, iroN, hly, cnf-1</i>
14	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimA, pap, sfa, afa, aer, iutA, iroN, cnf-1</i>

Çizelge 4.7’de virülans profilleri incelendiğinde; karbapenem dirençli 29 numaralı kateterden izole edilen *E.coli*’de; taranan virülans gen bölgelerinden hiçbiri saptanmamıştır. Buna karşın; karbapenem dirençli idrardan izole edilen 39 numaralı izolatta sekiz virülans gen bölgesini taşıdığı ve en virülant izolat olduğunu söylemek mümkündür.

Virülans faktörlerinin karbapenem dirençli ve duyarlı *E.coli* izolatları arasındaki dağılımına bakıldığında; *fimA* ve *afa* gen bölgelerinin dirençli duyarlı suşlar arasında önemli derecede fark olduğu görülmüştür (*fimA* ve *afa*; $P \leq 0.05$) (Çizelge 4.8).

Çizelge 4. 8: Karbapenem duyarlı ve dirençli *E.coli* izolatlarında virülans faktörlerin dağılımı

Virülans faktörler	Karbapenem dirençli izolatlar (n=11) (%)	Karbapenem duyarlı izolatlar (n=39) (%)	<i>P</i> değeri
<i>pap</i>	2 (18)	10 (26)	1.00
<i>sfa</i>	2 (18)	8 (21)	1.00
<i>fimA</i>	6 (55)	36 (92)	<0.05
<i>afa</i>	1 (9)	18 (46)	<0.05
<i>hly</i>	2 (18)	3 (8)	0.301
<i>cnf-1</i>	2 (18)	15 (38)	0.292
<i>iutA</i>	10 (91)	36 (92)	1.000
<i>aer</i>	9 (82)	36 (92)	0.301
<i>iroN</i>	1 (9)	13 (33)	0.148

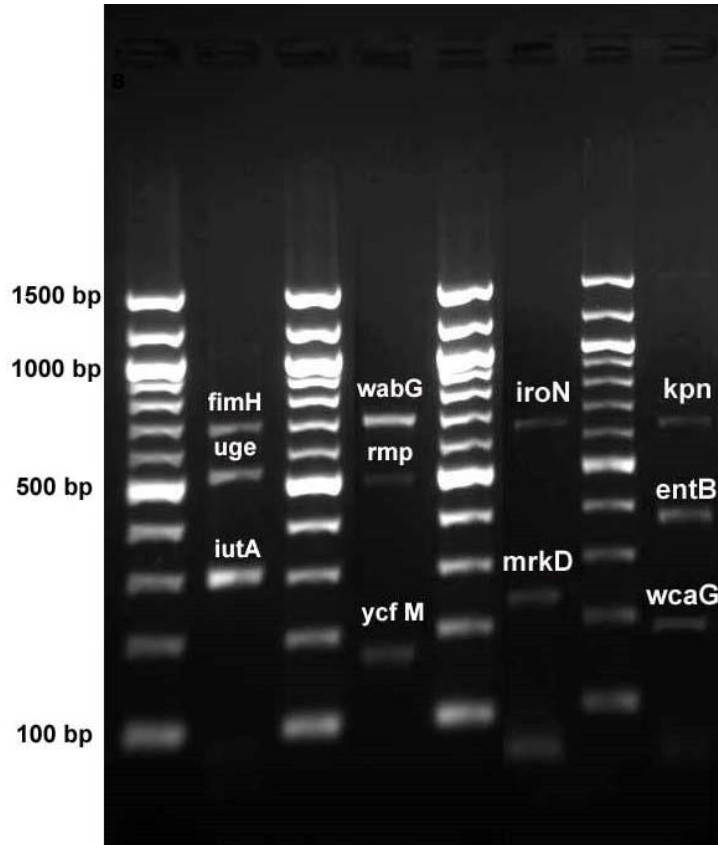
İdrar yolu enfeksiyonu etkeni *E.coli*’nin sahip olduğu virülans faktörler ile GSBL ve siprofloksasin direnci arasındaki ilişki çeşitli araştırmacılar tarafından ortaya konmuştur [105, 122]. Buna karşın Arısoy ve ark. [76] tarafından yapılan çalışmada; virülans genlerinin artışı ile bazı antibiyotiklerde direnç bazılarında ise; duyarlılık artışı saptanmıştır.

Son yıllarda virülans ile antibiyotik direnci arasında yapılan çalışmalarda; bu ilişki için birkaç mekanizma üzerinde durulmaktadır [92]. Bunlardan biri; antibiyotik direncini taşıyan plazmidler diğerleri ise; porin kaybı ve efluks pompasıdır. Fekete ve ark. [123] tarafından yapılan çalışmada plazmid aracılı olan bu ilişki; enterotoksijenik *E.coli* virülans plazmidinin tetrasiklin direncini taşıyan Tn10 transpozonuna sahip olması şeklinde açıklanmıştır. Rolhion ve ark. [124] tarafından yapılan çalışmada ise; *E.coli*’deki OmpC porini kaybının tutunma, invazyon ve intestinal kolonizasyonun

azalmasına neden olduğu bulunmuştur. Çalışmamıza 28 numaralı izolat olarak dahil edilen ve Gülmez ve ark. [39] tarafından yapılan çalışmada kullanılan, porin kaybı ve OXA-48 direnci tespit edilen *E.coli* izolatının virülans faktörleri incelendiğinde; bu izolatta yalnızca siderofor ile ilişkili (*aer*, *iutA*) gen bölgeleri saptanmıştır (Çizelge 4.7). Buna benzer olarak, çalışmamızda karbapenem duyarlı izolatlarda virülans faktörlerin daha fazla olması; porin kaybının karbapenem direnci ve virülans arasındaki ilişkide etkisinin daha fazla olduğunu göstermektedir.

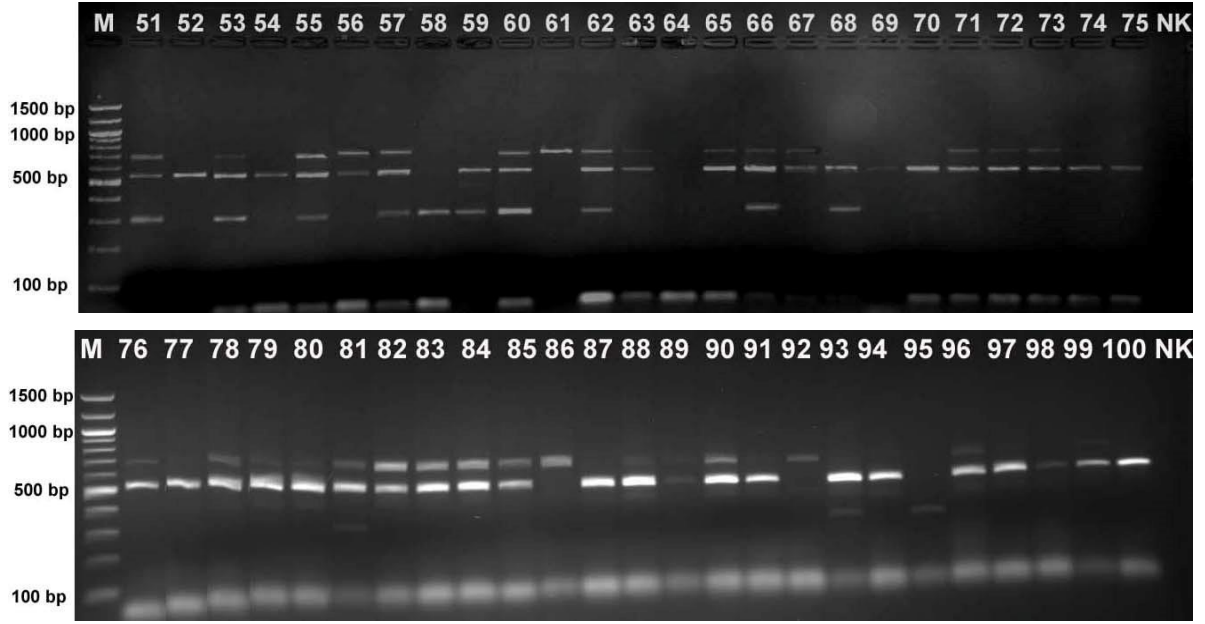
4.6.2. *K.pneumoniae*'de Virülans Gen Bölgelerinin Analizi

Çalışmamızda *K.pneumoniae* izolatları için 16 farklı virülans gen bölgesi (*fimH*, *uge*, *iutA*, *wabG*, *rmpA*, *ycfM*, *iroN*, *mrkD*, *kpn*, *entB*, *wcaG*, *magA*, *k₂A*, *allS*, *hly* ve *cnf-1*) Multiplex PCR ile analiz edildi. Analiz sonucu izolatlarda taranan virülans gen bölgelerinden 11 virülans gen bölgesi saptandı. Saptanan virülans gen bölgeleri Şekil 4.15'te görülmektedir.

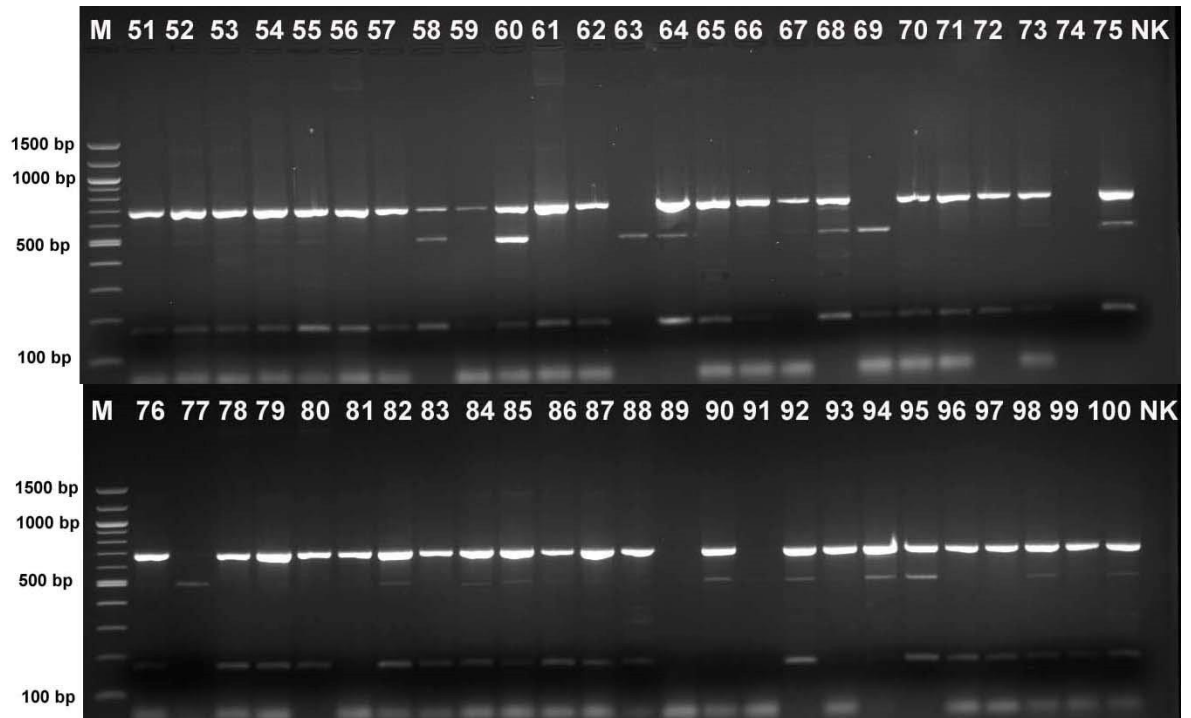


Şekil 4. 15: *K.pneumoniae* 'de bulunan virülans gen bölgeleri (*fimH*; 688 bp, *uge*; 534 bp, *iutA*; 300 bp, *wabG*; 683 bp, *rmpA*; 516 bp, *ycfM*; 160 bp, *iroN*; 665 bp, *mrkD*; 240 bp, *kpn*; 626 bp, *entB*; 371 bp, *wcaG*; 169 bp)

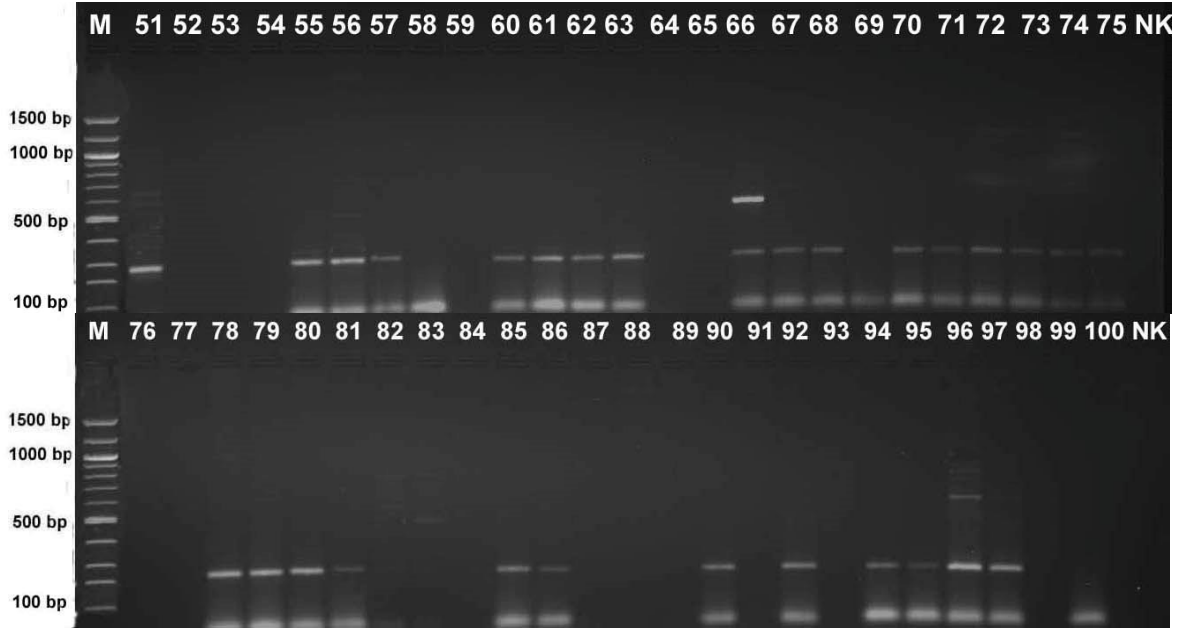
Virülans gen bölgesi saptanan *K. pneumoniae* izolatlarına ait jel görüntüleri Şekil 4.16-4.19'da verilmiştir.



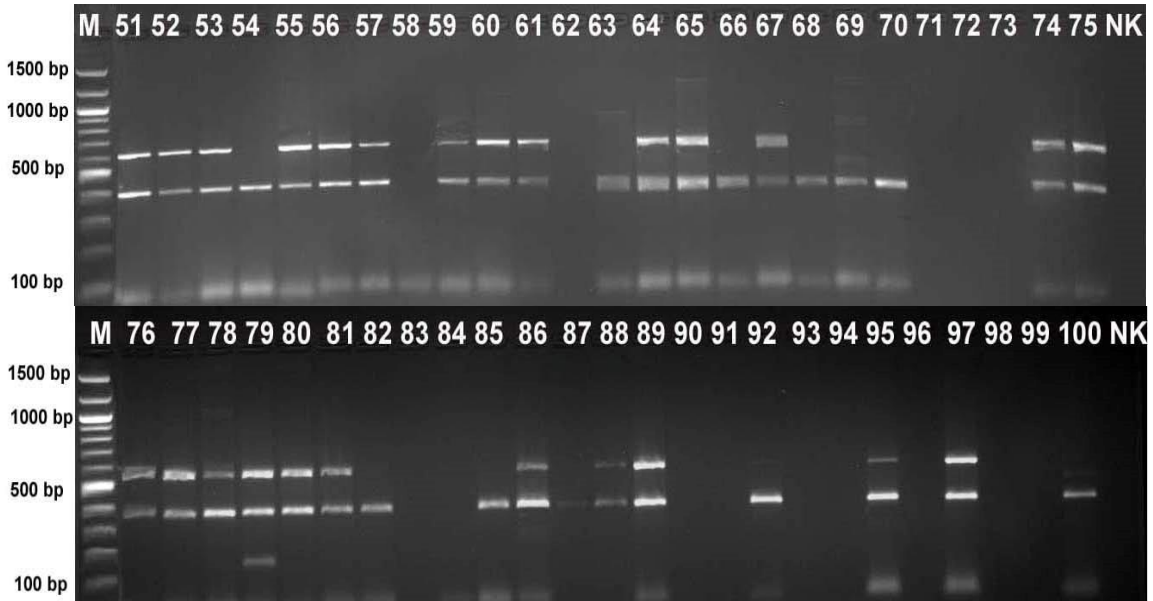
Şekil 4. 16: *K. pneumoniae* izolatlarında *fimH* (688 kb), *uge* (534 kb) ve *iutA* (300 kb) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 51-100, *K. pneumoniae*; NK, Negatif kontrol; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı



Şekil 4. 17: *K. pneumoniae* izolatlarında *wabG* (683 kb), *rmpA* (516 kb) ve *ycfM* (160 kb) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 51-100, *K. pneumoniae*; NK, Negatif kontrol; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı

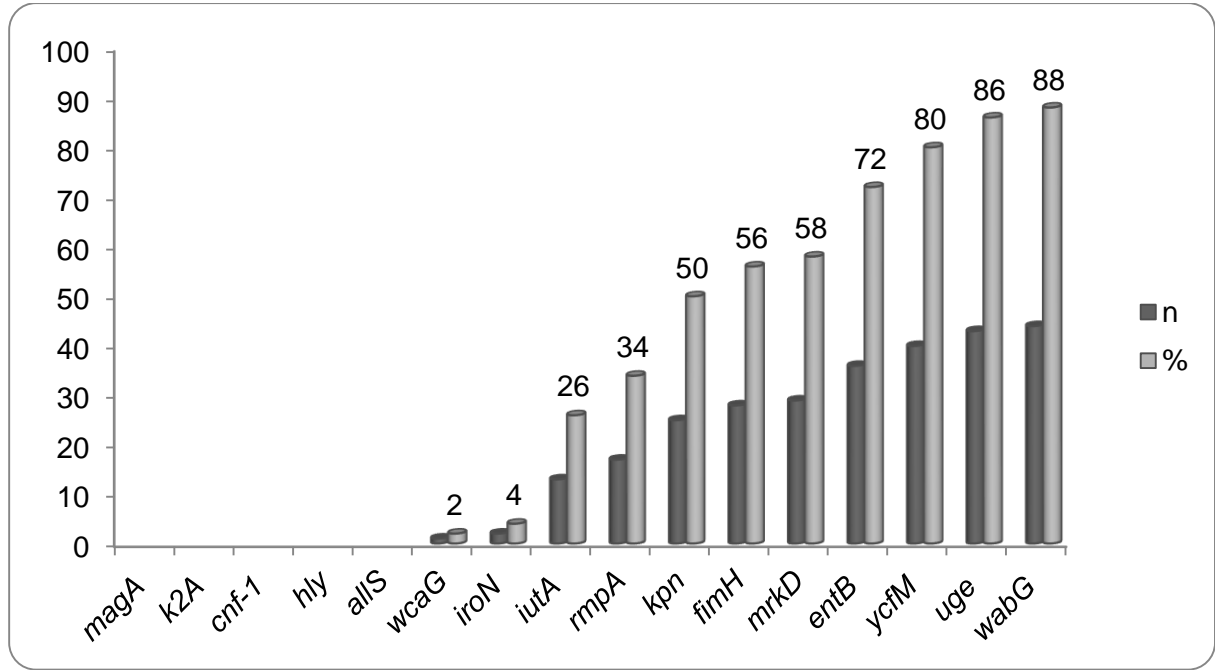


Şekil 4. 18: *K. pneumoniae* izolatlarında *iroN* (665 kb) ve *mrkD* (240 kb) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 51-100, *K. pneumoniae*; NK, Negatif kontrol; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı



Şekil 4. 19: *K. pneumoniae* izolatlarında *kpn* (626 kb), *entB* (371 kb) ve *wcaG* (169 kb) gen bölgelerine ait jel görüntüleri. 51-100, *K. pneumoniae*; NK, Negatif kontrol; M, 100 kb DNA moleküler ağırlık standardı

Saptanan virülans gen bölgelerinin *K.pneumoniae* izolatlarındaki dağılımı Şekil 4.20'deki grafikte açıkça görülmektedir. İzolatlar arasında sıklıkla rastlanan gen bölgeleri sırasıyla; kapsül ve kapsül lipopolisakkaritlerinin üretiminde sorumlu *wabG* (%88) ve *uge* (%86), dış membran proteini ile ilişkili *ycfM* (%80), enterobaktin üretiminden sorumlu *entB* (%72) gen bölgeleridir. İzolatların hiçbirinde *magA*, *k2A*, *cnf-1*, *hly* ve *allS* gen bölgeleri saptanmamıştır.



Şekil 4. 20. : Virülans gen bölgelerinin *K.pneumoniae* izolatlarındaki dağılımı. n; genlerin bulunduğu izolat sayısı, %; gen bölgelerinin toplam 50 izolata göre oranı

K. pneumoniae'nin virülansında sahip oldukları lipopolisakkarit ve kapsül polisakkariti oldukça önemlidir. Bu iki yapı; fagositoza direnç göstererek enfeksiyonu tetiklemektedir ve özellikle bakterilerin kanda yayılımında kritik rol oynamaktadır [125]. Çalışmamızda da; bu yapılar ile ilişkili *ycfM*, *uge* ve *wabG* gen bölgeleri diğer virülans gen bölgelerine göre daha fazla bulunmuştur. Kapsül mukopolisakkaritlerin oluşumunu düzenleyen kapsül ile ilişkili diğer bir gen bölgesi olan *rmpA*; izolatların %34'ünde saptanmıştır. Bu gen bölgesinin yanında hipermukoid koloniye (>5mm) sahip izolatlar böbrekte oluşan apselerin patogeneğinde yer almaktadır ve özellikle Doğu ve Güneydoğu Asya ülkelerinde rastlanmaktadır [126]. Bu durum; çalışmamızdaki *rmpA* gen bölgesindeki bu düşük oranı ve hipermukoid koloninin hiçbir izolatta saptanmamasını açıklamaktadır.

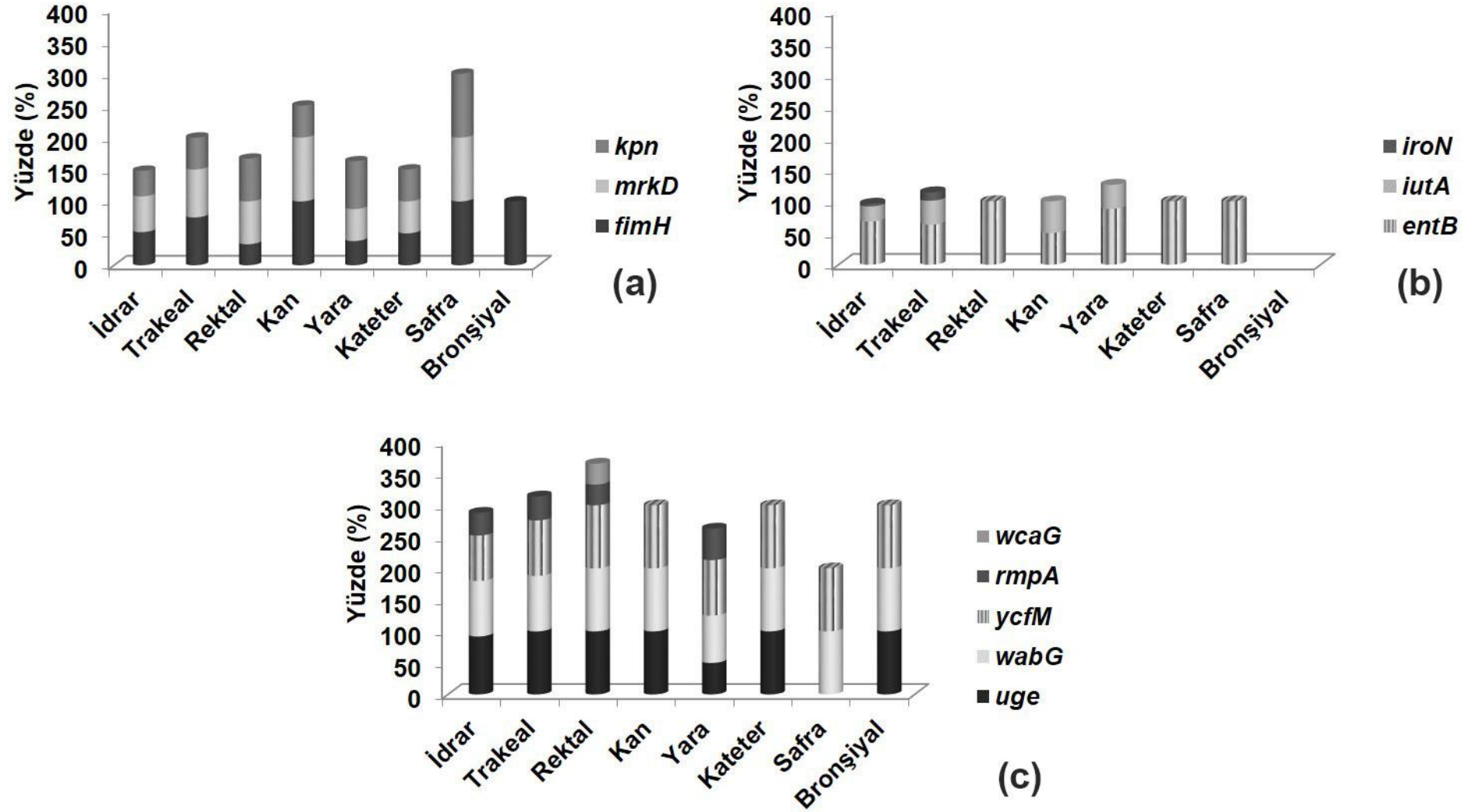
Çalışmamızda tüm kapsül ile ilişkili gen bölgelerine göre daha az sıklıkla bulunan diğer gen bölgesi ise; bir çeşit siderofor oluşumundan sorumlu olan enterobaktin üreten *entB* (%72)'dir. Bu gen bölgesinin birçok klinik *K.pneumoniae* izolatlarında bulunduğu birçok çalışma tarafından rapor edilmiştir [89, 127, 128]. *entB* gen bölgesi biyofilm gelişiminde rol oynamasına rağmen *Klebsiella* virülansında rolü hala tam olarak bilinmemektedir [90].

Çalışmada oldukça yüksek oranda bulunan diğer gen bölgeleri ise; fimbriya ile ilişkili (*fimH*, *mrkD* ve *kpn*) gen bölgeleridir. Tip I fimbriya ile ilişkili *fimH* ve Tip 3 fimbriya ile ilişkili *mrkD* gen bölgeleri *K. pneumoniae*'de en sık görülen fimbriya tipleri olup birçok çalışma tarafından rapor edilmiştir [17, 89].

K. pneumoniae'da *cnf-1* ve *hly* gen bölgeleri diğerlerine göre daha az saptanan virülans gen bölgeleri arasındadır [89, 91, 128]. Çalışmamızda da; izolatların hiçbirinde bu gen bölgeleri saptanmamıştır.

Mukoviskozite ile ilişkili ve K1 kapsül serotipine özgü bir gen bölgesi olan *magA*, K2 serotipine özgü bir gen bölgesi olan *k₂A* ve allantoin metabolizması ile ilişkili bir gen bölgesi olan *allS* genleri ise; böbrek absesinin patogeneğinde önemli rol oynamaktadır [83, 84, 129]. Aynı zamanda *magA* geni özellikle hipermukoid koloniye (>5mm) sahip olan izolatlarda oldukça sık rastlanmaktadır [81]. Çalışmamızda bu genlerin saptanmaması; hipermukoid koloniye sahip ya da karaciğer ile ilişkili hiçbir izolatın çalışmamız kapsamında yer almaması şeklinde açıklanabilir. Chou et al. [130] Compain ve ark. [131] tarafından yapılan çalışmalar da bu görüşü destekler niteliktedir.

K.pneumoniae izolatlarındaki virülans faktörlerin klinik örneklere göre yüzde dağılımı Şekil 4.21'de fimbriya tipleri (*kpn*, *mrkD* ve *fimH*), siderofor oluşumu (*iroN*, *iutA* ve *entB*), kapsül ve diğer virülans faktörler (*wcaG*, *mpA*, *ycfM*, *wabG* ve *uge*) ile ilişkili gen bölgelerinin klinik örneklere göre dağılımı görülmektedir.



Şekil 4. : *K.pneumoniae*'ye ait fimbriya tipleri (a), siderofor oluşumu (b), kapsül ve diğer virülans faktörlerin (c) klinik örneklerle göre yüzde dağılımı. (idrar; 25, trakeal; 8, rektal; 3, kan; 2, yara; 8, kateter; 2, safra; 1, bronşiyal; 1 izolat)

K.pneumoniae izolatlarındaki virülans faktörlerin klinik örneklere göre dağılımına bakıldığında; virülans faktör çeşitliliği en fazla idrar ve trakeal örneklerinde görülmektedir (Şekil 4.21). Bu durum *K.pneumoniae*'nin sıklıkla neden olduğu idrar yolu enfeksiyonu ve pnömoni ile yakından ilişkilidir [17].

Tip 1 fimbriyayı ifade eden *fimH* geni ürogenital sistem ve trake epitel hücrelerindeki mannoz içeren reseptörlere bağlanmaktadır [132] ve çalışmamızda bulunan idrar örneklerinin %49'unda (13 izolat), trake örneklerinin %75'inde (6 izolat) bu gen bölgesi bulunmaktadır. *mrkD* gen bölgesi ise; trakeal epitel ve renal tübüler hücrelere tutunmayı desteklemekte [87] ve çalışmamızda toplanan trakeal kaynaklı izolatların %75'inde (6 izolat), idrar örneklerinin %56'sında (14 izolat) bu gen bölgesi bulunmaktadır.

Çalışmamızda idrar ve trakeal örneklerinden sonra virülans çeşitliliği fazla olan diğer bir klinik örnek ise; rektal sürüntüdür (Şekil 4.21). Rektal sürüntü örnekleri; hastane kaynaklı dirençli bakterilerin kolonizasyonunun tespitinde, çocuklarda ciddi enfeksiyonlara neden olan enterik patojenlerin tanımlanmasında ve yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda nozokomiyal enfeksiyonların belirlenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır, hassasiyeti ve spesifikliği oldukça yüksektir [133-136]. Çalışmamızda alınan rektal sürüntü örneklerinin hepsi karbapenem dirençli (OXA-48)'dir. Bu direncin yanında; 79 numaralı izolatta diğer klinik örneklerin sahip olduğu virülans gen bölgelerinden farklı olarak bakterilerin makrofajlar tarafından gerçekleştirilen fagositozdan kurtulabilme yeteneğini arttıran *wcaG* gen bölgesi saptanmıştır (Çizelge 4.9). Bu gen bölgesi, diğer virülans gen bölgelerine göre daha az çalışılmıştır. Turton ve ark. [86] tarafından yapılan bir çalışmada 77 *K. pneumoniae* izolatından invaziv ve ciddi enfeksiyonlara neden olan 11 izolatta bu gen bölgesi saptanmıştır. Yapılan çalışmalar doğrultusunda; hem *wcaG* gen bölgesinin hem de OXA-48 karbapenemazının varlığı rektal sürüntü olarak alınan bu izolatın da ciddi bir enfeksiyonun nedeni olduğunu göstermektedir.

Çalışmada, karbapenem ve virülans gen profilleri bir arada değerlendirildiğinde 40 tip virülans profili tanımlanmıştır. Tanımlanan virülans gen profilleri Çizelge 4.9'da izole edildikleri örnekler ile toplu bir şekilde verilmiştir Çizelgede fimbriya ile ilişkili gen bölgeleri mavi, siderofor ile ilişkili gen bölgeleri yeşil, kapsül ve lipopolisakkarit ise kırmızı renk ile ifade edilmiştir.

Çizelge 4. 9: *K.pneumoniae* izolatlarının karbapenem direnci ve virülans gen profilleri

İzolat no	Klinik örnek	Karbapenem direnci	Virülans gen profilleri
91	İdrar	OXA-48	<i>uge</i>
93	İdrar	OXA-48	<i>iutA, uge, wabG</i>
80	Rektal	OXA-48	<i>mrkD, entB, ycfM</i>
97	İdrar	karbapenem duyarlı	
54	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>entB, uge, wabG, ycfM</i>
87	İdrar	NDM-1 ve OXA-48	
58	Yara	karbapenem duyarlı	<i>iutA, wabG, ycfM, rmpA</i>
89	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimH, kpn, entB, uge</i>
83	Bronşiyal	OXA-48	<i>fimH, uge, wabG, ycfM</i>
99	Kan	NDM-1	
69	Yara	OXA-48	<i>entB, uge, ycfM, rmpA</i>
77	Trakeal	OXA-48	<i>kpn, entB, uge, rmpA</i>
94	İdrar	OXA-48	<i>ycfM, uge, wabG, rmpA</i>
98	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>uge, wabG, ycfM, rmpA</i>
52	İdrar	karbapenem duyarlı	
88	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>kpn, entB, uge, wabG, ycfM</i>
63	İdrar	OXA-48	<i>fimH, mrkD, entB, uge, rmpA</i>
74	Yara	NDM-1 ve OXA-48	<i>fimH, mrkD, kpn, entB, uge</i>
64	Yara	OXA-48	<i>kpn, entB, wabG, ycfM, rmpA</i>
71	Trakeal	OXA-48	
72	İdrar	NDM-1 ve OXA-48	<i>fimH, mrkD, uge, wabG, ycfM</i>
73	İdrar	OXA-48	
70	Kateter	OXA-48	<i>mrkD, entB, uge, wabG, ycfM</i>
100	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>entB, uge, wabG, ycfM, rmpA</i>
84	Trakeal	OXA-48	<i>fimH, uge, wabG, ycfM, rmpA</i>

Çizelge 4.9'un devamı

İzolasyon no	Klinik örnek	Karbapenem direnci	Virülans gen profilleri
90	İdrar	OXA-48	<i>fimH, mrkD, uge, wabG, rmpA</i>
51	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>mrkD, kpn, entB, iutA, wabG, ycfM</i>
59	Yara	karbapenem duyarlı	<i>kpn, entB, iutA, uge, wabG, ycfM</i>
61	Safra	OXA-48	<i>fimH, mrkD, kpn, entB, wabG, ycfM</i>
86	Yara	OXA-48	
62	Trakeal	OXA-48	<i>fimH, mrkD, iutA, uge, wabG, ycfM</i>
65	İdrar	NDM-1 ve OXA-48	<i>fimH, kpn, entB, uge, wabG, ycfM</i>
76	Kateter	OXA-48	
67	İdrar	OXA-48	<i>fimH, mrkD, kpn, entB, uge, wabG</i>
96	İdrar	OXA-48	<i>fimH, mrkD, iroN, uge, wabG, ycfM</i>
82	Rektal	OXA-48	<i>fimH, entB, uge, wabG, ycfM, rmpA</i>
92	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimH, mrkD, entB, wabG, ycfM, rmpA</i>
53	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimH, kpn, entB, iutA, uge, wabG, ycfM</i>
56	Trakeal	karbapenem duyarlı	<i>fimH, mrkD, kpn, entB, uge, wabG, ycfM</i>
78	Yara	OXA-48	
81	Kan	OXA-48	<i>fimH, mrkD, kpn, entB, iutA, uge, wabG</i>
68	İdrar	OXA-48	<i>mrkD, entB, iutA, uge, wabG, ycfM, rmpA</i>
95	Yara	karbapenem duyarlı	<i>mrkD, kpn, entB, iutA, wabG, ycfM, rpmA</i>
79	Rektal	OXA-48	<i>mrkD, kpn, entB, uge, wabG, ycfM, wcaG</i>
75	Trakeal	OXA-48	<i>mrkD, kpn, entB, uge, wabG, ycfM, rmpA</i>
85	İdrar	OXA-48	<i>fimH, mrkD, entB, uge, wabG, ycfM, rmpA</i>
55	İdrar	karbapenem duyarlı	<i>fimH, mrkD, kpn, entB, iutA, uge, wabG, ycfM</i>
57	Trakeal	karbapenem duyarlı	
66	Trakeal	OXA-48	<i>fimH, mrkD, entB, iutA, iroN, uge, wabG, ycfM</i>
60	İdrar	OXA-48	<i>fimH, mrkD, kpn, entB, iutA, uge, wabG, ycfM, rmpA</i>

Çizelge 4.9'da virülans profilleri incelendiğinde; karbapenem dirençli olan 91 numaralı izolatın yalnızca bir virülans faktöre (*uge*) sahip olduğu fakat karbapenem duyarlı 53, 55, 56, 57 ve 95 numaralı izolatların en az yedi virülans gene sahip oldukları görülmektedir. Bunun yanında; 55-57 ve 56-78 grupları aynı virülans faktörlere sahip olmasına karşın gruplar kendi arasında karbapenem direnci ve klinik örnek yönünden farklılık göstermektedir. Bu durum bu tip karbapenem dirençleri ile virülans faktörler arasında bir ilişkinin olmadığını göstermektedir.

Virülans faktörlerinin karbapenem dirençli ve duyarlı *K.pneumoniae* izolatları arasındaki dağılımı Çizelge 4.10'da verilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre; karbapenem dirençli ve duyarlı izolatlar ile sahip oldukları virülans faktörler arasında önemli derecede fark olmamasına ($P \geq 0.05$) karşın karbapenem dirençli izolatlarda virülans faktör çeşitliliğinin oldukça fazla olduğu bulunmuştur.

Karbapenem duyarlı ve dirençli *K.pneumoniae* izolatlarında virülans faktörlerin dağılımı (Çizelge 4.9) ve virülans profilleri (Çizelge 4.10) incelendiğinde; karbapenem dirençli izolatlarda duyarlı izolatlara göre virülans faktör çeşitliliğinin oldukça fazla olduğu görülmektedir. Virülans gen bölgelerinden kapsül ile ilişkili genlerin (*wabG*, *ycfM* ve *uge*) yanı sıra fimbriya ve siderofor üretiminden sorumlu gen bölgeleri toplu olarak değerlendirildiğinde; fimbriya oluşumunda sorumlu gen bölgelerinin (*fimH*, *mrkD* ve *kpn*) en az birinin izolatların %84'ünde (42 izolat), siderofor üretiminden sorumlu gen bölgelerinin ise; izolatların %80'inde (40 izolat) yer aldığı görüldü (Çizelge 4.10). Bu sonuçlar gözönüne alındığında; kapsül ile ilişkili gen bölgelerinin yanı sıra fimbriya ve sideroforun da *K.pneumoniae* virülansında önemli rol oynadığı söylenebilir.

Virülans faktörlerinin karbapenem dirençli ve duyarlı *K.pneumoniae* izolatları arasındaki dağılımı Çizelge 4.10'da verilmiştir. Yapılan istatistiksel analize göre; karbapenem dirençli ve duyarlı izolatlar ile sahip oldukları virülans faktörler arasında önemli derecede fark olmamasına ($P \geq 0.05$) karşın karbapenem dirençli izolatlarda virülans faktör çeşitliliğinin oldukça fazla olduğu bulunmuştur.

Çizelge 4. 10: Karbapenem duyarlı ve dirençli *K. pneumoniae* izolatlarında virülans faktörlerin dağılımı

Virülans faktörler	Karbapenem dirençli izolatlar (n=34) (%)	Karbapenem duyarlı izolatlar (n=16) (%)	P değeri
<i>magA</i>	0	0	-
<i>k2A</i>	0	0	-
<i>cnf-1</i>	0	0	-
<i>hly</i>	0	0	-
<i>allS</i>	0	0	-
<i>wcaG</i>	1 (3)	0	1.000
<i>iroN</i>	2 (6)	0	1.000
<i>mrkD</i>	22 (65)	7 (44)	0.222
<i>iutA</i>	6 (18)	7 (44)	0.082
<i>rmpA</i>	12 (35)	5 (31)	1.000
<i>kpn</i>	14 (41)	11 (69)	0.122
<i>fimH</i>	22 (65)	6 (38)	0.126
<i>entB</i>	22 (65)	14 (88)	0.175
<i>ycfM</i>	25 (74)	15 (94)	0.138
<i>uge</i>	31 (91)	12 (75)	0.190
<i>wabG</i>	29 (85)	15 (94)	0.650

Son yıllarda yapılan çalışmalar *K. pneumoniae* izolatlarındaki virülans ile antibiyotik direnci arasında ilişki olduğunu göstermektedir [92, 137]. Sahly ve ark. [138] tarafından yapılan çalışmada; *K. pneumoniae*'de GSBL ve fimbriyalar arasındaki ilişkinin, GSBL direncini taşıyan plazmidin invazyona neden olan birden fazla virülans genini regüle etmesi şeklinde olduğu saptanmıştır. Bialek ve ark. [139] tarafından yapılan bir diğer çalışmada ise; *K. pneumoniae*'de bulunan OmpK35 ve OmpK36 porinlerinin kaybı ile karbapenem direncinin yanında sefalosporinlere olan direncin ortaya çıkması ile eş zamanlı olarak virülansı azaltıcı yönde etkisi olduğunu ortaya çıkarmıştır. Benzer bir şekilde; Tsai ve ark. [140] tarafından yapılan diğer bir çalışmada; aynı porinlerin kaybının antibiyotik direncinde artış ve virülansı azaltıcı yönde etkili olduğunu göstermiştir. Ancak KPC tip karbapenemaz üreten *K. pneumoniae* izolatlarında yapılan çalışmalarda ise; bu tip direncin virülans üzerinde etkisinin çok az olduğu bulunmuştur [128, 141]. Çalışmamızda karbapenem dirençli izolatlarda saptanan virülans genleri farklılık gösterse de toplu olarak değerlendirildiğinde tespit edilen OXA-48, NDM-1 ve multi dirençlerin virülans üzerinde bir etkisi olmadığı açıkça görülmüştür.

5. YORUM

Ülkemizde çok çeşitli karbapenem direnci tipleri görülmesine rağmen bu alanda yapılan çalışmalar genellikle belli bölgelerdeki direncin tanımlanması, sayısı ve çeşitlerinin bildirilmesi şeklindedir. Türkiye’de bu alanda yapılan çalışmalara bakıldığında; direncin bulunduğu yerler genellikle farklı illerden hasta kabul eden büyük şehirlerdeki hastanelerdir [106, 110, 142]. Bir kısmı ise; Gaziantep, Elazığ ve Şanlıurfa gibi son yıllarda artış gösteren terör olayları ve ülkemize kabul edilen mültecilerin yerleştirildiği ve tedavi gördükleri illeri kapsamaktadır [39, 108, 113]. Bu alanda yapılan çalışmalarda direncin tanımlanmasının yanında; hastanın mevcut enfeksiyonu ile ilişkili olabilecek; hastanın yaşam profili, geçmişi, seyahat edip etmediği, yakın zamanda farklı hastanelere giriş çıkışı gibi risk faktörlerinin de bir arada kapsamlı bir şekilde değerlendirilerek bulaş yolunun saptanması zorunlu hale gelmiştir. Bu sayede dünyada bir ülkeden diğerine insan kaynaklı olarak hızlı bir şekilde taşınan bu dirence karşı öncelikle çocuklara ve immünsüpresif hastalara yönelik koruma stratejilerinin belirlenmesi gerekmektedir.

Çalışmamızda belirli yıllar aralığında toplanan izolatların büyük bir çoğunluğunu idrar örnekleri oluşturmaktadır. *E.coli* izolatlarında; tip 1 fimbriya (*fimA*) idrar yolu enfeksiyonlarına, P fimbriya (*pap*) komplike idrar yolu enfeksiyonlarına, S fimbriya (*sfa*) ve afimbriyal adezin (*afa*) ise; idrar dışı diğer enfeksiyonlara özgü virülans faktörlerdir. İdrar yolu enfeksiyonuna özgü diğer yapılar; salmochelin (*iroN*) tip siderofor, sitotoksik nekrotizan faktör (*cnf-1*) ve hemolizin (*hly*)’dir. *K. pneumoniae*’da virülansı yüksek izolatlarda bulunan hipermukoid yapı, K1 (*magA*) ve K2 (*k₂A*) serotipi, allantoin metabolizması (*allS*) gibi faktörler çalışmamızda saptanmamıştır. Fimbriya tiplerinden tip 1 (*fimH*) ve tip 3 (*mrkD*) fimbriyalar idrar yolu enfeksiyonu ve pnömoniye özgü virülans faktörlerdir. İzolatların çoğunluğunda bulunan kapsül ve dış membran ile ilişkili gen bölgelerinin virülansla oldukça önemli bir yere sahip olduğu gösterilmiştir.

Karbapenem direnci ve virülans faktörler arasında istatistiksel olarak önemli bir ilişki olmamasına rağmen; β -laktam direncinin virülansa etkisi bilinmektedir. Bu etki plazmidler aracılığı ile olabileceği gibi porin proteinlerindeki değişiklikler, penisilin bağlayan proteinlerdeki modifikasyonlar ve efluks pompaları mekanizmaları ile gerçekleşebilmektedir [92]. Efluks pompaları da; quorum sensing ile regüle edilen virülans faktörlerin içeren moleküllerin atımından sorumludur. Quorum sensing

mekanizmasının da; antibiyotik direnci ve virülans üzerinde pozitif bir etkisi olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [143, 144]. Dolayısıyla β -laktam grubu direncinin saptanmasında bu mekanizmaların gözönünde bulundurulması gereklidir. Çalışmamızda elde edilen verilerin ışığında; karbapenem direnci ve virülans faktörleri arasındaki ilişkinin belirlenmesinde gen bölgelerinin saptanmasının yanı sıra porinler, multidrug efluks pompası ve quorum sensing mekanizmalarının toplu bir şekilde değerlendirilmesinin uygun olacağı söylenebilir.

KAYNAKLAR

- [1] Mamıkoğlu, L., Günsere, F., Özçelik, F. T., Saba, R., Sarıgöl, F., Atakan, P., Gültekin, M., Akdeniz Üniversite Hastanesinde Hastane İnfeksiyonları: 1994-1995, *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 2, 42-45, **1998**.
- [2] Karahocagil, M. K., Yaman, G., Gökteş, U., Sünnetçioğlu, M., Çıkman, A., Bilici, A., Yapıcı, K., Baran, A. İ., Binici, İ., Akdeniz, H., Hastane Enfeksiyon Etkenlerinin ve Direnç Profillerinin Belirlenmesi, *Van Tıp Dergisi*, 18, 27-32, **2011**.
- [3] Akyar, İ., Kocagöz, S., Kocagöz, T., Sarıgöl Sar, N., Gültekin, M., Ercis, S., Özen, Ö., Öztürk, N., Onaç, H., Kabaş, Z. M., Beş yılda izole edilen 15434 *Escherichia coli* ve 3178 *Klebsiella* spp. suşunda genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretiminin yıllara, kliniklere ve örnek türlerine dağılımı, *ANKEM Dergisi*, 24, 34-41, **2010**.
- [4] Ailiken, M., *Escherichia coli* İzolatlarında Ertapenem Direncinin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, **2012**.
- [5] Maltezou, H. C., Kontopidou, F., Katerelos, P., Daikos, G., Roilides, E., Theodoridou, M., Infections caused by carbapenem-resistant gram-negative pathogens in hospitalized children, *Pediatric Infectious Disease Journal*, 32, 151–154, **2013**.
- [6] Pillai, D.R., Melano, R., Rawte, P., Lo, S., Tijet, N., Fuksa, M., Roda, N., Farrell, D.J., Krajden, S., *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, Canada, *Emerging Infectious Diseases*, 15, 827-829, **2009**.
- [7] Michalopoulos, A., Vitzili, S., Rafailidis, P., Chalevelakis, G., Damala, M., Falagas, M.E., Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation, *Clinical Microbiology and Infection*, 16, 84-186, **2010**.
- [8] Pitart, C., Solé, M., Roca, İ., Fàbrega, A., Vila, J. and Marco, F., First Outbreak of a Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing OXA-48 β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 4398–4401, **2011**.
- [9] Brisse, S., Fevre, C., Passet, V., Issenhuth-Jeanjean, S., Tournebize, R., Diancourt, L., Grimont, P., Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization, *PLoS One*, 4, e4982, **2009**.
- [10] Mainil, J., *Escherichia coli* virulence factors, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152, 2-12, **2013**.
- [11] Blondeau, J.M., Current issues in the management of urinary tract infections: Extended-release ciprofloxacin as a novel treatment option, *Drugs*, 64, 611-628, **2004**.
- [12] Friedman, N.D., Kaye, K.S., Stout, J.E., McGarry, S.A., Trivette, S.L., Briggs, J.P. Wanda Lamm, R.N., Connie Clark, R.N., Jennifer MacFarquhar, R.N.,

- Aaron, L.W., Reller, L.B., Sexton, D.J., Health care--associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections, *Annals of Internal Medicine*, 137, 791-797, **2002**.
- [13] Winn, W.Jr., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenberger, P., Woods, G., *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, The Enterobacteriaceae*, 6th edition, Lippincott Williams and Wilkins, 212-294, **2006**.
- [14] Raksha, R., Srinivasa, H., Macaden, R.S., Occurrence and characterisation of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections, *Indian Journal of Medical Microbiology*, 21, 102-107, **2003**.
- [15] Bottone, E.J., Hypermucoviscous Phenotype Expressed by an Isolate of Uropathogenic *Escherichia coli*: an Overlooked and Underappreciated Virulence Factor, *Clinical Microbiology Newsletter*, 32, 81-85, **2010**.
- [16] Pais, P., Khurana, R. and George, J., Urinary Tract Infections: A Retrospective Survey of Causative Organisms and Antibiotics Prescribed in A Tertiary Care Setting, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 34, 278-280, **2002**.
- [17] Podschun, R., Ullmann, U., *Klebsiella* spp. As nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors, *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 589-603, **1998**.
- [18] Brown, C., Seidler, R.J., Potential Pathogens in the Environment: *Klebsiella pneumoniae*, a Taxonomic and Ecological Enigma, *Applied Microbiology*, 25, 900-904, **1973**.
- [19] Cowan, S.T., Steel, K.J. and Shaw, C., A classification of the *Klebsiella* group, *Journal of General Microbiology*, 23, 601-612, **1960**.
- [20] Bascomb, S., Lapage, S.P., Wilcox, W.R. and Curtis, M.A., Numerical classification of the tribe *Klebsiella*, *Journal of General Microbiology*, 66, 279-295, **1971**.
- [21] Fırat, P., *Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten Escherichia coli ve Klebsiella spp. suşlarının karbapenem ve beta-laktamaz inhibitörlü kombinasyonlara karşı duyarlılıklarının araştırılması*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Elazığ, **2006**.
- [22] Falagas, M.E., Karageorgopoulos, D.E., Extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms, *Journal of Hospital Infection*, 73, 345-354, **2009**.
- [23] Kızılca, Ö., *Çocukluk çağında görülen idrar yolu enfeksiyonlarında saptanan genişlemiş spektrumlu beta laktamaz pozitifliğinde risk faktörlerinin değerlendirilmesi*, Tıpta Uzmanlık Tezi, Sağlık Bakanlığı, İstanbul Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi, İstanbul, **2010**.
- [24] Rupp, M.E., Fey, P.D., Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment, *Drugs*, 63, 353-365, **2003**.
- [25] Gupta, A., Ampofo, K., Rubenstein, D., Saiman, L., Extended spectrum beta lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a Review of the Literature, *Journal of Perinatology*, 23, 439-443, **2003**.

- [26] Braykov, N. P., Eber, M. R., Klein, E. Y., Morgan, D. J., Laxminarayan, R., Trends in resistance to carbapenems and third-generation cephalosporins among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1999–2010, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 34, 259-268, **2013**.
- [27] McLaughlin, M., Advincula, M.R., Malczynski, M., Qi, C., Bolon, M., Scheetz, M.C., Correlations of Antibiotic Use and Carbapenem Resistance in *Enterobacteriaceae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 5131-5133, **2013**.
- [28] Çakır, N., *Güncel Bilgiler Işığında Antibiyotikler. Karbapenemler*, (çev: Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S.), Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 91-110, **2008**.
- [29] Turner, P.J., Meropenem activity against European isolates: report on the MYSTIC (Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection) 2006 results, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60, 185-192, **2008**.
- [30] Keating, G.M., Perry, C.M., Ertapenem: a review of its use in the treatment of bacterial infections, *Drugs*, 65, 2151-2178, **2005**.
- [31] Alhan, E., Yeni Karbapenemler, *Journal of Pediatric Infection*, 5, 90-94, **2011**.
- [32] Karageorgopoulou, D.E., Falagas, M.E., New antibiotics: optimal use in current clinical practice, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, S55-62, **2009**.
- [33] Rice, D.A., Kaniga, K., Lee, M., Redman, R., Activity of doripenem versus comparators in subjects with baseline bacteraemia in six pooled phase 3 clinical trials, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 41, 388-392, **2013**.
- [34] Nordmann, P., Dortet, L., Poirel, L., Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18, 263-272, **2012**.
- [35] Gülay, Z., Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları ve Çözüm Önerileri: Beta-Laktamlara ve Karbapenemlere Direnç, *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 5, 210-229, **2001**.
- [36] Pages, J.M., James, C.E., Winterhalter, M., The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria, *Nature Reviews Microbiology*, 6, 893–903, **2008**.
- [37] Martinez-Martinez, L., Extended-spectrum b-lactamases and the permeability barrier. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 82–89, **2008**.
- [38] Gupta, N., Limbago, B.M., Patel, J.B., Kallen, A.J., Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention, *Clinical Infectious Diseases*, 53, 60–67, **2011**.
- [39] Gülmez, D., Woodford, N., Palepou, Marie-France I., Mushtaq, S., Metan, G., Yakupogullari, Y., Kocagoz, S., Uzun, O., Hascelik, G., Livermore, D.M., Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 523–526, **2008**.

- [40] Naas, T., Nordmann, P., Analysis of a carbapenem hydrolyzing class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 91, 7693-7697, **1994**.
- [41] Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L., Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, *Emerging Infectious Diseases*, 17, 1791-1798, **2011**.
- [42] Daikos, G.L., Markogiannakis, A., Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clinical Microbiology and Infection*, 17, 1135–1141, **2011**.
- [43] Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K. and Tenover, F.C., Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 1151-1161, **2001**.
- [44] Woodford, N., Tierno Jr. P.M, Young, K., Tysall, L., Palepou, Marie-France I., Ward, E., Painter, R.E., Suber, D.F., Shungu, D., Silver, L.L., Inglima, K., Kornblum, J. and Livermore, D.M., Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing a New Carbapenem-Hydrolyzing Class A β -Lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 4793-4799, **2004**.
- [45] Wolter, D.J., Kurpiel, P.M., Woodford, N., Palepou, Marie-France I., Goering, R.V. and Hanson, N.D., Phenotypic and Enzymatic Comparative Analysis of the Novel KPC Variant KPC-5 and Its Evolutionary Variants, KPC-2 and KPC-4, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 557-562, **2009**.
- [46] Hsu, Shu-Ching, Yu, Wen-Liang, Lee, Mei-Feng, Chuang, Yin-Ching, Emergence of two KPC new variants (KPC-17 and KPC-22) in Southern Taiwan: A case report, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, 48, S132, **2015**.
- [47] Gundmann, H., Livermore, D.M., Giske, C.G., Canton, R., Rossolini, G.M., Campos, J., Vatopoulos, A., Gniadkowski, M., Toth, A., Pfeifer, Y., Jarlier, V., Carmeli, Y. CNSE Working Group, Carbapenem non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Eurosurveillance*, 18, 19711, **2010**.
- [48] Qi, Y., Wei, Z., Li, S., Du, X., Shen, P., Yu, Y., ST1, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 307–312, **2010**.
- [49] Poirel, L., Yilmaz, M., Istanbulu, A., Arslan, F., Mert, A., Spread of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in a neonatal intensive care unit, Istanbul, Turkey, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58, 2929-2933, **2014**.
- [50] Kuwabara, S. and Abraham, E.P., Some properties of two extracellular β -lactamases from *Bacillus cereus* 569/H, *Biochemical Journal*, 103, 27C–30C, **1967**.
- [51] Saino, Y., Kobayashi, F., Inoue, M., Mitsuhashi, S., Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 22, 564–570, **1982**.

- [52] Iaconis, J.P., Sanders, C.C. Purification and characterization of inducible β -lactamases in *Aeromonas* spp. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 34, 44–51, **1990**.
- [53] Aktas, Z., Bal, C., Midilli, K., Poirel, L., Nordmann, P., First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey, *Clinical Microbiology and Infection*, 12, 695–696, **2006**.
- [54] Aktas, Z., Satana, D., Kayacan, C., Ozbek, B., Gurler, N., Somer, A., Salman, N., Aydin, A.E., Carbapenem resistance in Turkey: Repeat report on OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* and first report on IMP-1 beta-lactamase in *Escherichia coli*, *African Journal of Microbiology Research*, 6, 3874–3878, **2012**.
- [55] Özen, N.S., Ögünç, D., Öngüt, G., Seyman, D., Dağlar, D., Özhak Baysan, B., Çolak, D., Hazar, V., Naas, T., Bacteremia due to a VIM-1 Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolate from an Acute Lymphoblastic Leukemia Patient in Antalya, *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 21, 291–293, **2014**.
- [56] Yan, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Outbreak of infection with multidrugresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaIMP-8 in a university medical center in Taiwan, *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 4433–4439, **2001**.
- [57] Kurnarasamy, K.K., Toleman, M.A., Walsh, T.R., Bagaria, J., Butt, F., Balakrishnan, R., Chaudhary, U., Doumith, M., Giske, C.G., Irfan, S., Krishnan, P., Kumar, A.V., Maharjan, S., Mushtaq, S., Noorie, T., Paterson, D.L., Pearson, A., Perry, C., Pike, R., Rao, B., Ray, U., Sarma, J.B., Sharma, M., Sheridan, E., Thirunarayan, M.A., Turton, J., Upadhyay, S., Warner, M., Welfare, W., Livermore, D.M., Woodford, N., Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan and the UK: a molecular, biological and epidemiological study, *The Lancet Infectious Diseases*, 10, 597–602, **2010**.
- [58] Yong, D., Toleman, M.A., Giske, C.G., Cho, H.S., Sundman, K., Lee, K., Walsh, T.R., Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53, 5046–5054, **2009**.
- [59] Dortet, L., Poirel, L., Al Yaqoubi, F., Nordmann, P., NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Sultanate of Oman, *Clinical Microbiology and Infection*, 18, E144–E148, **2012**.
- [60] Dortet, L., Poirel, L., Nordmann, P., Worldwide Dissemination of the NDM-Type Carbapenemases in Gram-Negative Bacteria, *BioMed Research International*, 249856, **2014**.
- [61] Alp, E., Perçin, D., Colakoğlu, S., Durmaz, S., Kürkcü, C.A., Ekincioglu, P., Güneş, T., Molecular characterisation of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary university hospital in Turkey, *Journal of Hospital Infection*, 84, 178–180, **2013**.
- [62] Poirel, L., Heritier, C., Tolun, V., Nordmann, P., Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48, 15–22, **2004**.

- [63] Abouddihaj, B., Fatima, El Otmani, Fouzia, L. El Yaagoubi, Talmi, M., Khalid, Z., Timinouni M., First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco, *APMIS*, 121, 675–677, **2012**.
- [64] Balm, M.N.D., La, M.V., Krishnan, P., Jureen, R., Lin, R.T.P. and Teo, J.W.P. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-type and OXA-181 carbapenemases. *Clinical Microbiology and Infection*, 19, E421-E423, **2013**.
- [65] Ben Nasr, A., Decré, D., Compain, F., Genel, N., Barguelli, F., Arlet, G., Emergence of NDM-1 in association with OXA-48 in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 4089-4090, **2013**.
- [66] Doi, Y., O'Hara, J.A., Lando, J.F., Querry, A.M., Townsend, B.M., Pasculle, A.W., Muto, C.A. Co-Production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*, *Emerging Infectious Diseases*, 20, 163-164, **2014**.
- [67] Einstein, B.I., Zalesnik, D.F., Enterobacteriaceae, *Mandell, Douglas and Bennett's Principles on practice of infectious diseases*, 5th ed., (eds: Mandell, G.L., Bennett, J.E., Dolin, R.), Churchill Livingstone, 2294 – 2301, **2000**.
- [68] Tunçkanat, F., Üriner sistem infeksiyonu patogenezinde bakteriyel virülans faktörleri, *Klinik Dergisi*, 6, 3-5, **1993**.
- [69] Naveen, R., Mathai, E., Some virulence characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* in different patient groups, *Indian Journal of Medical Research*, 122, 143-147, **2005**.
- [70] Melican, K., Sandoval, R.M., Kader, A., Josefsson, L., Tanner, G.A., Molitoris, B.A., Richter-Dahlfors, A., Uropathogenic *Escherichia coli* P and Type 1 Fimbriae Act in Synergy in a Living Host to Facilitate Renal Colonization Leading to Nephron Obstruction, *PLOS Pathogens*, 7, e1001298, **2011**.
- [71] Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hartsch, T., S-fimbria-encoding determinant *sfaI* is located on pathogenicity island III536 of uropathogenic *Escherichia coli* strain 53, *Infection and Immunity*, 69, 4248–4256, **2001**.
- [72] Bien, J., Sokolova, O., Bozko, P., Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage, *International Journal of Nephrology*, 2012:681473, **2012**.
- [73] Demir, M., Kaleli, I., Production by *Escherichia coli* isolates of siderophore and other virulence factors and their pathogenic role in a cutaneous infection model. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 1011-1014, **2004**.
- [74] Henderson, J.P., Crowley, J. R., Pinkner, J.S., Walker, J.N., Tsukayama, P., Stamm, W.E., Hooton, T.M., Hultgren, S.J., Quantitative Metabolomics Reveals an Epigenetic Blueprint for Iron Acquisition in Uropathogenic *Escherichia coli*, *PLoS Pathogens*, 5, e1000305, **2009**.
- [75] Koga, V.L., Tomazetto, G., Cyoia, P.S., Neves, M.S., Vidotto, M.C., Nakazato, G., Kobayashi R.K.T., Molecular Screening of Virulence Genes in Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Isolated from Human Blood Culture in Brazil, *BioMed Research International*, 15, 2014:465054, **2014**.

- [76] Arisoy, M., Yousefi Rad, A., Akin, A., Akar, N., Relationship between susceptibility to antimicrobials and virulence factors in pediatric *Escherichia coli* isolates, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31, 4–8, **2008**.
- [77] Guiral, E., Bosch, J., Vila, J., Soto, S. M., Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant women: relationship with virulence, *FEMS, Microbiology Letters*, 314, 170–173, **2011**.
- [78] Welinder-Olsson, C., Eriksson, E., Kaijser, B., Virulence genes in verocytotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from humans and cattle, *APMIS*, 113, 577-585, **2005**.
- [79] Damian, M., Usein, C.R., Palade, A.M., Cociu, S., Cosman, M., Molecular Epidemiology and Virulence Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated from Hospital-Associated Infections, *The Open Epidemiology*, 2, 69-78, **2009**.
- [80] Ma, L.C., Fang, C.T., Lee, C.Z., Shun, C.T., Wang, J.T., Genomic heterogeneity in *Klebsiella pneumoniae* strains is associated with primary pyogenic liver abscess and metastatic infection, *Journal of Infectious Diseases*, 192, 117-128, **2005**.
- [81] Yu, W.L., Ko, W.C., Cheng, K.C., Lee, H.C., Ke, D.S., Lee, C.C., Fung, C.P., Chuang, Y.C., Association between *rmpA* and *magA* Genes and Clinical Syndromes Caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan, *Clinical Infectious Diseases*, 42, 1351–1358, **2006**.
- [82] Hartman, L.J., Selby, E.B., Whitehouse, C.A., Coyne, S.R., Jaissle, J.G., Twenhafel, N.A., Burke, R.L., Kulesh, D.A., Rapid Real-Time PCR assays for detection of *Klebsiella pneumoniae* with the *rmpA* or *magA* genes associated with the hypermucoviscosity phenotype, *Journal of Molecular Diagnostics*, 11, 464-471, **2009**.
- [83] Yu, W.L., Ko, W.C., Cheng, K.C., Lee, C.C., Lai, C.C., Chuang, Y.C., Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 62, 1-6, **2008**.
- [84] Yu, W.L., Fung, C.P., Ko, W.C., Cheng, K.C., Lee, C.C., Chuang Y.C., Polymerase chain reaction analysis for detecting capsule serotypes K1 and K2 of *Klebsiella pneumoniae* causing abscesses of the liver and other sites, *The Journal of Infectious Diseases*, 195, 1235–1236, **2007**.
- [85] Regue, M., Hita, B., Pique, N., Izquierdo, L., Merino, S., Fresno, S., Benedi, V.J., Tomas, J.M., A Gene, *uge*, Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence, *Infection and Immunity*, 72, 54–61, **2004**.
- [86] Turton, J. F., Perry, C., Elgohari, S., Hampton, C. V., PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets, *Journal of Medical Microbiology*, 9, 541–547, **2010**.
- [87] Sebghati, T.A.S., Korhonen, T.K., Hornick, D.B., Clegg, S., Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains, *Infection and Immunity*, 66, 6, 2887–2894, **1998**.

- [88] Struve, C., Bojer, M., Krogfelt, K.A., Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. *Infection and Immunity*, 77, 5016-5024, **2009**.
- [89] El Fertas-Aissani, R., Messai, Y., Alouache, S., Bakour, R., Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens, *Pathologie Biologie*, 61, 209–216, **2013**.
- [90] May, T., Okabe, S., Enterobactin is required for biofilm development in reduced-genome *Escherichia coli*, *Environmental Microbiology*, 13, 3149-1362, **2011**.
- [91] Mamlouk, K., Boutiba-Ben Boubaker, I., Gautier, V., Vimont, S., Picard, B., Ben Redjeb, S., Emergence and outbreaks of CTX-M beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital, *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 4049–4056, **2006**.
- [92] Beceiro, A., Tomás, M., Bou, G., Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World? *Clinical Microbiology Reviews*, 26, 185–230, 2013.
- [93] Centers for Disease Control and Prevention (CDC), Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from rectal swabs, http://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/klebsiella_or_ecoli.pdf. 2011.
- [94] Health Protection Agency (HPA), Advice on carbapenemase producers: recognition, infection control and treatment. www.hpa.org.uk; 2011.
- [95] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), EUCAST breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, 2011.
- [96] Samra, Z., Bahar, J., Madar-Shapiro, L., Aziz, N., Israel, S., Bishara, J., Evaluation of CHROMagar KPC for Rapid Detection of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*, *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 3110–3111, **2008**.
- [97] Merlino, J., Siarakas, S., Robertson, G.J., Funnell, G.R., Gottlieb, T. and Bradbury, R., Evaluation of CHROMagar Orientation for of differentiation and presumptive identification gram-negative bacilli and *Enterococcus* species, *Journal of Clinical Microbiology*, 34, 1788, **1996**.
- [98] Saito, R., Koyano, S., Nagai, R., Okamura, N., Moriya K. and Koike, K., Evaluation of a chromogenic agar medium for the detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, *Letters in Applied Microbiology*, 51, 704–706, **2010**.
- [99] Panagea, T., Galani, I., Souli, M., Adamou, P., Antoniadou, A., Giamarellou, H., Evaluation of CHROMagar™ KPC for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rectal surveillance cultures, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 37, 124–128, **2011**.
- [100] Ellington, M.J., Kistler, J., David, M., Livermore and Neil Woodford, Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 321–322, **2007**.

- [101] Poirel, L., Walsh, Timothy R., Cuvillier, V., Nordmann, P., Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70, 119–123, **2011**.
- [102] Chamberlain, J.S., Gibbs, R.A., Ranier, J.E., Nguyen, P.N., Caskey, C.T., Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification, *Nucleic Acids Research*, 16, 11141-11156, **1988**.
- [103] Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H. and Vogt, P.H., Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol, *BioTechniques*, 23, 504-511, **1997**.
- [104] Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W., Boukadida, J., Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection, *International Journal of Infectious Diseases*, 17, e450-e453, **2013**.
- [105] Arslan, A., *İdrar Yolları Enfeksiyonu Etkeni E.coli'lerin Adezinleri ile Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişkinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması*, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2010**.
- [106] Azap, Ö., Otlu, B., Yeşilkaya, A., Yakupoğulları, Y., Detection of OXA-48-like Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tertiary Care Center in Turkey: Molecular Characterization and Epidemiology, *Balkan Medical Journal*, 30, 259–260, **2013**.
- [107] Poirel, L., Ozdamar, M., Ocampo-Sosa, A.A., Türkoglu, S., Ozer, U.G., Nordmann, P., NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* now in Turkey. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 56, 2784-2785, **2012**.
- [108] Demir, Y., Zer, Y., Karaoglan, I., Investigation of VIM, IMP, NDM-1, KPC AND OXA-48 enzymes in *Enterobacteriaceae* strains, *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 28, 1127-1133, **2015**.
- [109] Budak, S., Aktas, Z., Oncul, O., Acar, A., Ozyurt, M., Turhan, V., Gorenek, L., Detection of OXA-51 Carbapenemase Gene in *Klebsiella pneumoniae*: A Case Report and a New Dimension on Carbapenemase Resistance, *Journal of Molecular and Genetic Medicine* 7, 63, **2013**.
- [110] Carrer, A., Poirel, L., Yilmaz, M., Arikani Akan, Ö., Feriha, C., Cuzon, G., Matar, Honderlick, P., Nordmann, P., Spread of OXA-48-Encoding Plasmid in Turkey and Beyond, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 1369-1373, **2010**.
- [111] Carrer, A., Poirel, L., Eraksoy, H., Cagatay, A.A., Spread of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Istanbul, Turkey, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 2950–2954, **2008**.
- [112] Berrazeg, M., Diene, S., Medjahed, L., Parola, P., Drissi, M., Raoult, D., Rolain, J., New Delhi Metallo-beta-lactamase around the world: an eReview using Google Maps, *Eurosurveillance*, 22, 20809, **2014**.
- [113] Kilic, A., Baysallar, M., The First *Klebsiella pneumoniae* Isolate Co-Producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey, *Annals of Laboratory Medicine*, 35, 382–383, **2015**.
- [114] Izdebski, R., Bojarska, K., Baraniak, A., Literacka, E., Herda, M., Żabicka, D., Guzek, A., Półgrabia, M., Hryniewicz, W., Gniadkowski, M., NDM-1- or OXA-48-

- producing *Enterobacteriaceae* colonising Polish tourists following a terrorist attack in Tunis, *Eurosurveillance*, 11, 21150, **2015**.
- [115] Magistro, G., Hoffmann, C., Schubert, S., The salmochelin receptor IroN itself, but not salmochelin-mediated iron uptake promotes biofilm formation in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC), *International Journal of Medical Microbiology*, 305, 435-445, **2015**.
- [116] Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J.P., Jimenez de Anta, M.T., Vila, J., Extended Virulence Genotypes and Phylogenetic Background of *Escherichia coli* Isolates from Patients with Cystitis, Pyelonephritis, or Prostatitis, *The Journal of Infectious Diseases*, 191, 46–50, **2005**.
- [117] Wang, M.C., Tseng, C.C., Chen, C.Y., Wu, J.J., Huang, J.J., The role of bacterial virulence and host factors in patients with *Escherichia coli* bacteremia who have acute cholangitis or upper urinary tract infection, *Clinical Infectious Diseases*, 15, 1161-1166, **2002**.
- [118] Plos, K., Lomberg, H., Hull, S., Johansson, I., Svanborg, C., *Escherichia coli* in patients with renal scarring: genotype and phenotype of Gal alpha 1-4Gal beta-, Forssman- and mannose-specific adhesins, *Pediatric Infectious Disease Journal*, 10, 15-19, **1991**.
- [119] Roberts, J., Marklund, B., Ilver, D., Haslam, D., Kaak, M., Baskin, B., Louis, M., Möllby, R., Winberg, K., Normark, S., The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract, *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 91, 11889-11893, **1994**.
- [120] Landgraf, T.N., Berlese, A., Fernandes, F.F., Milanezi, M.L., Martinez, R., Panunto-Castelo, A., The ferric aerobactin receptor iutA, a protein isolated on agarose column, is not essential for uropathogenic *Escherichia coli* infection, *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, 20, 340-345, **2012**.
- [121] Garcia, T.A., Ventura, C. L., Smith, M.A., Merrell, D.S., O'Brien, A.D., Cytotoxic Necrotizing Factor 1 and Hemolysin from Uropathogenic *Escherichia coli* Elicit Different Host Responses in the Murine Bladder, *Infection and Immunity*, 81, 99–109, **2013**.
- [122] Kim, C.S., Kim, M.E., Cho, Yong-Hyung, Cho, In Rae, Lee, G., Virulence characteristics and phylogenetic background of ciprofloxacin resistant *E.coli* in the urine samples from Korean women with acute uncomplicated cystitis, *Journal of Korean Medical Science*, 25, 602-607, **2010**.
- [123] Fekete, P.Z., Brzuszkiewicz, E., Blum-Oehler, G., Olasz, F., Szabó, M., Gottschalk, G., Hacker, J., Nagy, B., DNA sequence analysis of the composite plasmid pTC conferring virulence and antimicrobial resistance for porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*, *International Journal of Medical Microbiology*, 302, 4-9, **2012**.
- [124] Rolhion, N., Carvalho, F.A., Darfeuille-Michaud, A., OmpC and the sigma(E) regulatory pathway are involved in adhesion and invasion of the Crohn's disease-associated *Escherichia coli* strain LF82, *Molecular Microbiology*, 63, 1684-700, **2007**.

- [125] Cortes, G., Nuria Borrell, Beatriz de Astorza, Cristina Gómez, Jaume Saulea and Sebastián Albertí, Molecular Analysis of the Contribution of the Capsular Polysaccharide and the Lipopolysaccharide O Side Chain to the Virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a Murine Model of Pneumonia, *Infection and Immunity*, 70, 2583-2590, **2002**.
- [126] Tsai, F.C., Huang, Y.T., Chang, L.Y., Wang, J.T., Pyogenic liver abscess as endemic disease, Taiwan, *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1592-1600, **2008**.
- [127] Podschun, R., Sievers, D., Fischer, A., Ullmann, U., Serotypes, hemagglutinins, siderophore synthesis, and serum resistance of *Klebsiella* isolates causing human urinary tract infections, *The Journal of Infectious Diseases*, 168, 1415-1421, **1993**.
- [128] Lavigne, J.P., Cuzon, G., Combescure, C., Bourg, G., Sotto, A., Nordmann, P., Virulence of *Klebsiella pneumoniae* Isolates Harboring blaKPC-2 Carbapenemase Gene in a *Caenorhabditis elegans* Model, *PLoS ONE*, 8, e67847, **2013**.
- [129] Fang, C.T., Chuang, Y.P., Shun, C.T., Chang, S.C., Wang, J.T., A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications, *The Journal of Experimental Medicine*, 199, 697–705, **2004**.
- [130] Chou, Huei-Chi, Lee, Cha-Ze, Ma, Li-Chen, Fang, Chi-Tai, Chang, Shan-Chwen, Wang, Jin-Town, Isolation of a Chromosomal Region of *Klebsiella pneumoniae* Associated with Allantoin Metabolism and Liver Infection, *Infection and Immunity*, 72, 3783–3792, **2004**.
- [131] Compain, F., Babosan, A., Brisse, S., Genel, N., Audo, J., Ailloud, F., Kassis-Chikhani, N., Arlet, G., Decré, D., Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*, *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 4377-4380, **2014**.
- [132] Fader, R.C., Gondesen, K., Tolley, B., Ritchie, D.G., Moller, P., Evidence that in vitro adherence of *Klebsiella pneumoniae* to ciliated hamster tracheal cells is mediated by type 1 fimbriae, *Infection and Immunity*, 56, 3011–3013, **1988**.
- [133] Currie, B.P., Gnass, S., Levi, M.H., A hospital-based rectal swab culture survey to detect vancomycin-resistant enterococci: Utility and application, *International Journal of Infectious Diseases*, 1, 87–91, **1996**.
- [134] Goldfarb, D.M., Steenhoff, A.P., Pernica, J.M., Chong, S., Luinstra, K., Mokomane, M., Mazhani, L., Quaye, I., Goercke, I., Mahony, J., Smieja, M., Evaluation of Anatomically Designed Flocked Rectal Swabs for Molecular Detection of Enteric Pathogens in Children Admitted to Hospital with Severe Gastroenteritis in Botswana, *Journal of Clinical Microbiology*, 52, 3922–3927, **2014**.
- [135] Yeşilbağ, Z., Çağatay, A.A., Karadeniz, A., Başaran, S., Orhun, G., Ergin Özcan, P., Özsüt, H., Eraksoy, H., Is there a relationship between rectal colonization and nosocomial infection of patients in intensive care unit? *Bulletin of Microbiology*, 49, 327-339, **2015**.

- [136] Lautenbach, E., Harris, A.D., Perencevich, E.N., Nachamkin, I., Tolomeo, P., Metlay, J.P., Test Characteristics of Perirectal and Rectal Swab Compared to Stool Sample for Detection of Fluoroquinolone-Resistant *Escherichia coli* in the Gastrointestinal Tract, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 798–800, **2005**.
- [137] Coudeyras, S., Nakusi, L., Charbonnel, N., Forestier, C., A tripartite efflux pump involved in gastrointestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae* confers a tolerance response to inorganic acid, *Infection and Immunity*, 76, 4633–4641, **2008**.
- [138] Sahly, H., Navon-Venezia, S., Roesler, L., Hay, A., Carmeli, Y., Podschun, R., Hennequin, C., Forestier, C., Ofek, I., Extended-Spectrum β -Lactamase Production Is Associated with an Increase in Cell Invasion and Expression of Fimbrial Adhesins in *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 3029-3034, **2008**.
- [139] Bialek, S., Lavigne, J.P., Chevalier, J., Marcon, E., Leflon-Guibout, V., Davin, A., Moreau, R., Pagès, J.M., Nicolas-Chanoine, M.H., Membrane efflux and influx modulate both multidrug resistance and virulence of *Klebsiella pneumoniae* in a *Caenorhabditis elegans* model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54, 4373–4378, **2010**.
- [140] Tsai, Y.K., Fung, C.P., Lin, J.C., Chen, J.H., Chang, F.Y., Chen, T.L., Siu, L.K., *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55, 1485-1493, **2011**.
- [141] Siu, L.K., Lin, J.C., Gomez, E., Eng, R., Chiang, T., Virulence and plasmid transferability of KPC *Klebsiella pneumoniae* at the Veterans Affairs Healthcare System of New Jersey, *Microbial Drug Resistance*, 18, 380–384, **2012**.
- [142] Kilic, A., Aktas, Z., Bedir, O., Gumral, R., Bulut, Y., Stratton, C., Tang, Yi-Wei, Basustaoglu, A.C., Identification and Characterization of OXA-48 Producing, Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates in Turkey, *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 41, 161-166, **2011**.
- [143] Yang, Y.X., Xu, Z.H., Zhang, Y.Q., Tian, J., Weng, L.X., Wang, L.H., A new quorum-sensing inhibitor attenuates virulence and decreases antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*, *Journal of Microbiology*, 50, 987-993, **2012**.
- [144] Wang, H., Tu, F., Gui, Z., Lu, X., Chu, W., Antibiotic resistance profiles and quorum sensing-dependent virulence factors in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*, *Indian Journal of Microbiology*, 53, 163-167, **2013**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Esra Deniz CANDAN
Doğum Yeri : Samsun
Medeni Hali : Evli
E-posta : esrauslu@hacettepe.edu.tr, esradenizcandan@gmail.com
Adresi : Karapınar Mahallesi, Veysel Akgün Caddesi, Akkent Sitesi, D Blok, Ordu

Eğitim

Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü (1998 -2003)
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı (2004 -2007)
II. Yüksek Lisans : Ordu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji, Bölümü, Botanik Anabilim Dalı (2008–2011)
Doktora : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı

Yabancı Dil ve Düzeyi : ÜDS 70

İş Deneyimi : Ordu Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Botanik Anabilim Dalı, Araştırma Görevlisi

Deneyim Alanları : Karbapenem direnci, Virülans faktörler, Multiplex PCR

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi :

Escherichia coli ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarındaki Karbapenem Direnci İle Virülans Faktörleri Arasındaki İlişkinin Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi, 014D01601002, Yardımcı Araştırmacı, (2014-2015), Bütçe: 17.945,06 TL.

Tezden Üretilmiş Yayınlar :

Candan E.D and Aksöz N., "*Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors?", Acta Biochimica Polonica, 62, 4, 867-874, 2015 http://dx.doi.org/10.18388/abp.2015_1148.

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar:

Candan E.D and Aksöz N., "*Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors?", Acta Biochimica Polonica, Vol. 62 No. 2/2015, 6th International Weigl Conference on Microbiology, Gdańsk, Poland, 8-10 July 2015, p: 37. (Sözlü sunum).