

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDEN İZOLE EDİLEN
ENTEROBACTER VE *PROTEUS* SUŞLARINDA İNTEGRON
TAŞIYICILIĞININ BELİRLENMESİ

BÜŞRA KIR

DANIŞMAN
YRD. DOÇ. DR. ŞAHİN DİREKEL

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GİRESUN-2017

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDEN İZOLE
EDİLEN *ENTEROBACTER* VE *PROTEUS*
SUŞLARINDA İNTEGRON TAŞIYICILIĞININ
BELİRLENMESİ**

BÜŞRA KIR

DANIŞMAN

YRD. DOÇ. DR. ŞAHİN DİREKEL

Giresun Üniversitesi ve Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Ortak Yüksek Lisans Tezi


Bu araştırma Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından

SAĞ-BAP-C-140316-07 proje numarası ile desteklenmiştir.


GİRESUN - 2017

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürünün onayı.

.../.../...


Doç. Dr. Ayşegül ÇEBİ
Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı standartlarına uygun olduğunu onaylarım.


Doç. Dr. Cihangir AKDEMİR
Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumuzu ve Yüksek Lisans tezi olarak bütün gerekliliklerini yerine getirdiğini onaylarız.

Yrd. Doç. Dr. Şahin DİREKEL
Danışman



Jüri Üyeleri ve Üniversiteleri

Prof. Dr. Gürol EMEKDAŞ / Biruni Üniversitesi

Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ / Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. Şahin DİREKEL / Giresun Üniversitesi







TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel ahlak kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.


Büşra KIR





“Anneme ve Babama ithaf ediyorum”

TEŞEKKÜRLER

Yüksek Lisans eğitimim boyunca bana her türlü araştırma olanağı sağlayan, çalışmaların yürütülmesinde yardımını ve katkısını esirgemeyen, her zaman bilgi ve önerileri ile bana yol gösteren değerli tez danışmanım Yrd. Doç. Dr. Şahin DİREKEL'e minnettarlığımı bildirir ve sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Araştırmalarım boyunca desteklerini gördüğüm, gerekli tecrübe ve bilgilerinden faydalandığım Giresun Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Cihangir AKDEMİR, Öğretim Üyeleri Yrd. Doç. Dr. Emel UZUNOĞLU KARAGÖZ, Yrd. Doç. Dr. Nejla CEBECİ GÜLER hocalarım, Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalından Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ, Prof. Dr. Zihni Açar YAZICI, Doç. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK, Yrd. Doç. Dr. Saliha EKŞİ hocalarım, bilgi birikimleri ve değerli görüşleri ile katkı sağlayan değerli hocalarım Prof. Dr. Hatice KATI, Yrd. Doç. Dr. Ayşegül SARAL ve Yrd. Doç. Dr. Ülkü KARAMAN'a, çalışmada kullanılan izolatların elde edilmesinde yardımlarını esirgemeyen Giresun Prof. Dr. A. İlhan Özdemir Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına katkılarından dolayı teşekkür ederim. Benim bugünlere gelmemde ellerinden gelen maddi ve manevi yardımı esirgemeyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim çok değerli aileme de teşekkür ederim.

Ayrıca SAĞ-BAP-C-140316-07 numaralı proje ile tezimin yürütülmesinde maddi olanak sağlayan Giresun Üniversitesi BAP koordinatörlüğüne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | |
|--|------|
| TEZ ONAYI | I |
| BEYAN..... | II |
| İTHAF | III |
| TEŞEKKÜR..... | IV |
| İÇİNDEKİLER | V |
| ÖZET | VII |
| ABSTRACT..... | VIII |
| TABLolar DİZİNİ | IX |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | X |
| SİMGELER DİZİNİ | XI |
| KISALTMALAR DİZİNİ | XII |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 2 |
| 2.1. <i>ENTEROBACTERIACEAE</i> AİLESİ | 2 |
| 2.1.1. Taksonomi..... | 2 |
| 2.1.2. Üreme Özellikleri | 5 |
| 2.1.3. Biyokimyasal Özellikleri..... | 7 |
| 2.1.4. Mikrobiyolojik Özellikleri..... | 10 |
| 2.1.5. Epidemiyoloji..... | 10 |
| 2.1.6. Antijenik Yapı | 11 |
| 2.1.7. Virülans ve Patojenite Özellikleri..... | 11 |
| 2.1.8. Dirençlilik | 13 |
| 2.1.9. Plazmidler | 14 |
| 2.1.10. Patogenez | 15 |
| 2.1.11. <i>Enterobacteriaceae</i> Üyelerinin Oluşturduğu Enfeksiyonlar | 15 |
| 2.1.12. Tedavi | 18 |
| 2.2. <i>Enterobacter</i> cinsi | 20 |
| 2.3. <i>Proteus</i> cinsi | 22 |
| 2.4. Hastane Kökenli Gram Negatif Basillerde Direnç | 25 |
| 2.5. Direnç Yayılımının Sınırlandırılması İçin Alınması Gereken Önlemler | 25 |
| 2.6. Antimikrobiyal Tedaviyi Etkileyen Faktörler | 26 |
| 2.6.1. Antibiyotiklerin <i>in vitro</i> Aktivitesi..... | 26 |
| 2.6.1.1. Fenotipik Yöntemler..... | 27 |
| 2.6.1.2. Genotipik Yöntemler..... | 29 |
| 2.7. İlaçların Konak-Mikroorganizma İlişkisi Üzerine Etkileri..... | 30 |
| 2.8. Sinerji Testleri | 30 |

| | | |
|----------|--|----|
| 2.9. | İntegronlar | 30 |
| 2.9.1. | İntegronların Sınıflandırılması | 31 |
| 2.9.2. | İntegronların Yapısı ve Ekspresyonu | 33 |
| 2.9.3. | Gen Kasetleri | 35 |
| 2.9.4. | İntegronların Epidemiyolojisi ve Klinik Önemi | 36 |
| 2.10. | Hastane Enfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji Yöntemlerinin Önemi | 37 |
| 3. | GEREÇ VE YÖNTEMLER | 39 |
| 3.1. | Gereçler | 39 |
| 3.1.1. | Çalışma Grubu ve Örnekler | 39 |
| 3.1.2. | Kullanılan Cihazlar ve Gereçler | 39 |
| 3.2. | Kullanılan Besiyerleri | 40 |
| 3.2.1. | %5 Kanlı Agar Besiyerinin Hazırlanması | 40 |
| 3.2.2. | Eosin Methylene Blue Agar'ın (EMB) Hazırlanması | 40 |
| 3.2.3. | Mueller Hinton Buyyon (MHB) Hazırlanması | 41 |
| 1.2.4 | % 10 Gliserollü MHB'nin Hazırlanması | 41 |
| 3.3. | Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar | 41 |
| 3.3.1. | 10X Tris-Asetat EDTA (TAE) Tamponu Stok Solüsyonu | 41 |
| 3.3.2. | Elektroforez Yürütme Tamponu (1X TAE) | 42 |
| 3.3.3. | Yükleme Tamponu (Loading Buffer) | 42 |
| 3.3.4. | Etidyum Bromid (EtBr) | 42 |
| 3.4. | Hasta Örneklerinin Kültürü ve Değerlendirilmesi | 42 |
| 3.5. | Moleküler Yöntemle İzolatlarda İntegronların Saptanması | 43 |
| 3.5.1. | Saklanan İzolatların Canlandırılması ve Saflaştırılması | 43 |
| 3.5.2. | Kaynatma Yöntemi ile DNA İzolasyonu | 43 |
| 3.5.3. | Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çalışması | 44 |
| 3.5.3.1. | Amplifikasyon Koşulları | 45 |
| 3.5.4. | %1'lik Agaroz Jelin Hazırlanması | 45 |
| 4. | BULGULAR | 49 |
| 4.1. | Klinik Örneklerin Değerlendirilmesi | 49 |
| 4.2. | Antibiyotik Duyarlılıkları | 51 |
| 4.3. | PCR Sonuçları | 53 |
| 5. | TARTIŞMA | 56 |
| 6. | SONUÇ VE ÖNERİLER | 63 |
| 7. | KAYNAKLAR | 65 |
| | ÖZGEÇMİŞ | 78 |

ÖZET

YOĞUN BAKIM ÜNİTELERİNDEN İZOLE EDİLEN *ENTEROBACTER* VE *PROTEUS* SUŞLARINDA İNTEGRON TAŞIYICILIĞININ BELİRLENMESİ

Gram negatif bakteriler hastane enfeksiyonlarına neden olan, birçoğu fırsatçı ve çoklu ilaç direncine sahip önemli patojenler arasında yer almaktadır. Bu çalışmanın amacı, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *Enterobacter* ve *Proteus* izolatlarında integron taşıyıcılığının belirlenmesidir.

Çalışmaya ülkemizde üzerinde çok fazla araştırma yapılmayan 73 adet *Enterobacter* ve 53 adet *Proteus* izolatı dahil edilmiştir. Çalışılan izolatlarda, sınıf 1 ve sınıf 2 integron değişken bölgelerinin varlığı PCR metodu ile araştırılmıştır. Sınıf 1 integron varlığı *Enterobacter* izolatlarında %30,14, *Proteus* izolatlarında ise %39,62 olarak saptanmıştır. Ayrıca *Proteus* izolatlarının %41,50'sinin sınıf 2 integron taşıdığı, ancak *Enterobacter* izolatlarının hiçbirinin sınıf 2 integrona sahip olmadığı tespit edilmiştir.

Çoklu ilaç dirençli *Enterobacteriaceae* türleri önemli halk sağlığı problemi teşkil etmektedir. Bu gibi izolatların hastane ortamında yayılması sonucu tedavisi güç olan enfeksiyonların sayısını da arttıracaktır. İntegron taşıyan izolatların taşıdığı epidemik gücü belirlemek, hızlı tedavi ve uygun antibiyotik seçimi sağlanması açısından integron tespiti ve antibiyotik direnç genlerinin karakterizasyonunu belirlemeye yönelik çalışmaların yapılması oldukça önemlidir.

Anahtar kelimeler: *Enterobacter*, *Proteus*, integron, PCR

ABSTRACT

DETERMINATION OF INTEGRON CARRIAGE IN *ENTEROBACTER* AND *PROTEUS* STRAINS THAT ISOLATED FROM INTENSIVE CARE UNITS

Gram negative bacteria are among the major pathogens that cause nosocomial infections, many of which are opportunistic and have multiple drug resistance. The aim of this study is determination of integron carriage in *Enterobacter* and *Proteus* isolates from various clinical specimens, especially in intensive care patients.

The study included 73 *Enterobacter* isolates and 53 *Proteus* isolates, which have not undergone much research in our country. In the strains studied, the presence of class 1 and class 2 integron variable regions was investigated by PCR method. class 1 integron presence was shown as 30,14% in *Enterobacter* isolates and 39,62% in *Proteus* isolates. It was also found that 41,50 % of the *Proteus* isolates carried class 2 integron but none of the *Enterobacter* isolates had class 2 integron.

Multiple drug resistant *Enterobacteriaceae* species are a major public health problem. The spread of such strains in the hospital environment will also increase the number of infections that are difficult to treat as a result. It is very important to carry out studies based on the characterization of integron detection and antibiotic resistance genes in order to determine the epidemic potential of integron-carrying strains, rapid treatment and selection of appropriate antibiotics.

Key words: *Enterobacter*, *Proteus*, integron, PCR

TABLolar DİZİNİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Tablo 2. 1. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinin sınıflandırılması | 4 |
| Tablo 2. 2. <i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinin Mac Conkey ve koyun kanlı agardaki koloni özellikleri | 6 |
| Tablo 2. 3. <i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinin izolasyonunda en çok kullanılan besiyerleri | 7 |
| Tablo 2. 4. <i>Enterobacteriaceae</i> üyelerinin hızlı identifikasyon değerlendirmeleri | 9 |
| Tablo 2. 5. Çeşitli <i>Enterobacteriaceae</i> cinslerinin sıklıkla neden olduğu enfeksiyonlar | 17 |
| Tablo 2. 6. Çeşitli <i>Enterobacteriaceae</i> türlerinin özel antibiyotik direnç durumu | 18 |
| Tablo 2. 7. <i>Enterobacteriaceae</i> enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilebilecek antibiyotikler | 19 |
| Tablo 2. 8. <i>Enterobacter</i> cinsine ait belirli türlerin <i>K.oxytoca</i> ve <i>K. pneumoniae</i> 'den ayrımı | 21 |
| Tablo 2. 9. <i>Proteaeae</i> ailesinde cins ve belirli türlerin identifikasyonu | 23 |
| Tablo 2. 10. Yeni tanımlanan sınıf 1 integron gen kasetleri ve kodladıkları proteinler | 35 |
| Tablo 3. 1. PCR çalışmasında kullanılan primer dizileri | 44 |
| Tablo 3. 2. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron değişken bölge PCR bileşenleri | 44 |
| Tablo 3. 3. Sınıf 1 integron değişken bölge termal döngü şartları | 45 |
| Tablo 3. 4. Sınıf 2 integron değişken bölge termal döngü şartları | 45 |
| Tablo 4. 1. İzole edilen mikroorganizmaların sayı ve yüzdeleri | 49 |
| Tablo 4. 2. <i>Enterobacter</i> cinsi izolatların servislere ve örnek türüne göre dağılımı..... | 50 |
| Tablo 4. 3. <i>Proteus mirabilis</i> izolatlarının servislere ve örnek türüne göre dağılımı | 51 |
| Tablo 4. 4. İzole edilen <i>Enterobacter</i> türlerinin antibiyotik duyarlılıkları | 52 |
| Tablo 4. 5. İzole edilen <i>Proteus mirabilis</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları | 53 |
| Tablo 4. 6. <i>Enterobacter</i> türleri ve <i>Proteus mirabilis</i> 'te sınıf 1 integron ve sınıf 2 integron dağılımları..... | 54 |
| Tablo 5. 1. Farklı ülkelerde <i>Proteus</i> izolatlarında integron varlığının araştırıldığı çalışmalar | 61 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|--|----|
| Şekil 2. 1. IMVIC testi..... | 9 |
| Şekil 2. 2. Klinik örneklerden izole edilen sınıf 1 integronun yaygın formları..... | 32 |
| Şekil 2. 3. İntegronun yapısı..... | 34 |
| Şekil 3. 1. Kalıplardaki agaroz jele ait görüntü..... | 46 |
| Şekil 3. 2. Ampifikasyon ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi | 47 |
| Şekil 3. 3. Ampifikasyon ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi | 47 |
| Şekil 4. 1. BioLab 100 bp DNA Ladder jel görüntüsü | 54 |
| Şekil 4. 2. Sınıf 1 integron saptanan <i>Enterobacter</i> ve <i>Proteus</i> izolatlarına ait jel görüntüsü | 55 |
| Şekil 4. 3. Sınıf 2 integron saptanan <i>Proteus</i> izolatlarına ait jel görüntüsü | 55 |

SİMGELER DİZİNİ

| | |
|-------------------|----------------------|
| bp | : Base Pair |
| CO ₂ | : Karbondioksit |
| EtBr | : Etidyum Bromür |
| FeCl ₃ | : Ferrik Klorit |
| H ₂ S | : Hidrojen Sülfür |
| KCN | : Potasyum Siyanid |
| kDa | : Kilodalton |
| KOH | : Potasyum Hidroksit |
| M | : Molar |
| mg | : Miligram |
| Mg ⁺² | : Magnezyum |
| µl | : Mikrolitre |
| ml | : Mililitre |
| mM | : Milimolar |
| NaCl | : Sodyum Klorür |
| °C | : Santigrat Derece |
| UV | : Ultraviyole |
| V | : Volt |
| Zn ⁺² | : Çinko |

KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|-------|---|
| AAC | : Aminoglikozid Asetilleyen Enzim |
| AIDS | : Acquired Immune Deficiency Syndrome |
| ANT | : Adenoglikozid Adenilleyen Enzim |
| APH | : Aminoglikozid Fosforilleyen Enzim |
| CLSI | : Clinical and Laboratory Standards Institute |
| CS | : Conserved Segment |
| DNA | : Deoksiribo Nükleik Asit |
| EDTA | : Etilen Diamin Tetraasetik Asit |
| EMB | : Eosin Methylen Blue |
| EPEC | : Enteropatojen <i>Escherichia coli</i> |
| ESBL | : Extended Spectrum Beta-Lactamases |
| ETEC | : Enterotoksijen <i>Escherichia coli</i> |
| GI | : Gastrointestinal |
| HE | : Hektoen Enterik Agar |
| IMOP | : Iron Regulated Outer Membrane Proteins |
| IMVIC | : İndol Reaksiyonu (I), Metil Red Kırmızısı Reaksiyonu (M), Voges-Proskauer Reaksiyonu (V), Sitrat Reaksiyonu (C) |
| KAT | : Kloramfenikol Asetil Transferaz |
| KNS | : Koagülaz Negatif Stafilokok |
| LPS | : Lipopolisakkarit |
| MHB | : Mueller Hinton Broth |
| MİK | : Minimum İnhibitör Konsantrasyon |
| MRSA | : Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> |
| ONPG | : O-nitrofenil-beta-D-galaktozidaz |
| PCR | : Polymerase Chain Reaction |
| PDAB | : Para-Dimetil Amino Benzaldehit |
| PFGE | : Pulsed-Field Gel Electrophoresis |
| TAE | : Tris-Asetat-EDTA |
| TSİ | : Üç Şekerli Demirli Besiyeri |
| XLD | : Xylose Lysine Deoxycholate Agar |

1. GİRİŞ

Yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) bulunan hastalar hastanede en uzun süre yatan, konağın savunma mekanizmasını bozan invaziv yaşam desteğine en çok gereksinim duyan, en fazla antibiyotik uygulanan ve klinik tablosu en ağır olan hasta grubunu oluşturmaktadır. Yaşama yeniden kazandırılmaya çalışılan bu ünitelerdeki hastalar, tanı ve tedavi için uygulanan invaziv girişimler nedeniyle pek çok komplikasyonlarla karşı karşıya kalmaktadırlar. YBÜ'lerde görülen hastane (nozokomiyal) enfeksiyonları, diğer servislerde görülen enfeksiyonların yaklaşık 5-10 katıdır. Çeşitli ve çok sayıda antibiyotik kullanımının sonucu, nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan bakterilerde antibiyotik direnci gelişmektedir. Dolayısıyla nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan bakterilerin antibiyotik direnç genlerinin belirlenmesi, hangi antibiyotiklere karşı direnç geliştirdikleri, bu direnç genlerini birbirlerine nasıl aktardıklarının tespit edilmesi ve buralarda yatan hastalara en kısa zamanda en etkili antibiyotik uygulanması açısından oldukça önemlidir (Özsüt, 1998; İnan ve ark. 2002; Yalçın, 2009; Atalan ve ark. 2012; Çıkman ve ark. 2012; Sarı ve ark. 2015).

Bu tez çalışmasında, Giresun Prof. Dr. A. İlhan Özdemir Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, daha önceden YBÜ'lerde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *Enterobacter* ve *Proteus* izolatlarında sınıf 1 ve sınıf 2 integronlarının varlığının polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile belirlenmesi, elde edilen veriler ışığında direnç epidemiyolojilerinin belirlenmesi, yeni antimikrobiyal stratejilerin geliştirilmesi için gerekli temel bilgilerin elde edilmesi ve hastane enfeksiyon kontrol önlemlerine katkı sağlanması amaçlanmıştır. Literatür taramaları sonucunda ülkemizde *Enterobacter* ve *Proteus* cinsleriyle ilgili integron taşıyıcılığının araştırıldığı az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bunun için çalışma grubu olarak *Enterobacter* ve *Proteus* cinsleri seçilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Özellikle YBÜ'lerde yatan hastalarda nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan Gram negatif bakterilerde antibiyotik direncine neden olan genlerden hangilerinin ilimizde yaygın olduğunun belirlenmesini amaçlayan çalışmaların yapılması önemlidir. Çünkü her geçen gün antibiyotiklerin uygun ve akılcı kullanılmamasına bağlı olarak bakteriler antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedirler. Antibiyotiklere karşı direnç oranları gün geçtikçe artan Gram negatif bakterilerin hangi antibiyotiklere karşı direnç geliştirdiklerinin ve direnç genlerini bakteriler arasında nasıl aktardıklarının araştırılması ve ortaya çıkarılması klinisyenlerin özellikle yoğun bakım hastalarına hangi antibiyotiği kullanmalarının uygunluğu açısından yol gösterici olacaktır. Giresun ilinde, özellikle integronların araştırılacağı bu çalışmanın ilk olarak yapılacak olması çalışmamızın önemini arttırmaktadır. Elde edilecek olan sonuçlar ışığında özellikle YBÜ'lerde yatan hastaların tedavileri açısından bir takım önlemler alınması mortalite oranlarını ve hastanede yatış sürelerini düşüreceği kanaatindeyiz.

2.1. ENTEROBACTERIACEAE AİLESİ

Enterobacteriaceae üyeleri, Gram negatif basiller içinde tıbben en önemli olanlarıdır ve halk sağlığı açısından önemli bir problem oluşturmaktadır. Kırktan fazla cins, yüzlerce tür ve alt türü tanımlanan bu bakteriler, nozokomiyal patojenler arasında ön sırada gelmektedir ve çeşitli mekanizmalar ile yeni geliştirilen birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanmışlardır (Özkaya ve ark. 2013; Barraud ve ark. 2014).

2.1.1. Taksonomi

Enterobacteriaceae üyelerinin sınıflandırma ve adlandırmalarında son zamanlara kadar biyokimyasal, fizyolojik ve antijenik fenotip özellikleri kullanılmaktaydı. Günümüzde bu fenotip özelliklerini güçlendirmek için, DNA benzerlik verileri de kullanılmaktadır. Bunun için DNA-DNA hibridizasyon ve 16S rRNA dizilimlerine bakılmaktadır. *Enterobacteriaceae* ailesinin Ewing tarafından

yapılan sınıflandırması Tablo 2.1’de görülmektedir ve tabloda yer alan türlerin çoğu klinik örneklerde nadiren bulunmaktadır (Ustaçelebi, 1999; Grimont ve ark. 2006).



Tablo 2. 1. Enterobacteriaceae ailesinin sınıflandırılması (Ustaçelebi'den, 1999)

| Aile | Cins | Tür |
|---|--|---|
| I-Escherichieae | 1.Escherichia | <i>E. coli</i> , <i>E. blatae</i> , <i>E. vulneris</i> , <i>E. fergusonii</i> , <i>E. hermannii</i> |
| | 2.Shigella | <i>S. dysenteriae</i> , <i>S. flexneri</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. sonnei</i> |
| II-Edwardsiellae | <i>Edwardsiella</i> | <i>E. tarda</i> , <i>E. hoshina</i> , <i>E. ictaluri</i> |
| III-Salmonelleae | <i>Salmonella</i> | (serotipler), <i>S. typhi</i> , <i>S. choleraesuis</i> , <i>S. paratyphi A</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. gallinarum</i> , <i>S. pullorum</i> |
| IV-Citrobacteriaceae | <i>Citrobacter</i> | <i>C. freundii</i> , <i>C. diversus</i> , <i>C. amalonaticus</i> |
| V-Klebsielleae | 1.Klebsiella | <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. ozananae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> , <i>K. planticola</i> , <i>K. terrigena</i> , <i>K. ornithinolytica</i> |
| | 2.Enterobacter | <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>E. agglomerans</i> , <i>E. amnigenus</i> , <i>E. sakazakii</i> , <i>E. gergoviae</i> , <i>E. dissolvens</i> , <i>E. nimipreeuvalis</i> , <i>E. asburiae</i> , <i>E. taylorae</i> , <i>E. hormaechei</i> |
| | 3.Hafnia | <i>H. alvei</i> |
| | 4.Serratia | <i>S. marcescens</i> , <i>S. lique</i> , <i>S. liquefaciens</i> , <i>S. rubidaea</i> , <i>S. fonticola</i> , <i>S. odorifera</i> , <i>S. plymuthica</i> , <i>S. ficaria</i> |
| VI-Proteeae | 1.Proteus | <i>P. mirabilis</i> , <i>P. vulgaris</i> , <i>P. pennei</i> , <i>P. myxofaciens</i> |
| | 2.Morganella | <i>M. morganii</i> |
| | 3.Providencia | <i>P. alcalifaciens</i> , <i>P. stuartii</i> , <i>P. rettgeri</i> , <i>P. rustigianii</i> |
| VII-Yersinieae | <i>Yersinia</i> | <i>Y. pseudotuberculosis</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. frederiksenii</i> , <i>Y. kristensenii</i> , <i>Y. intermedia</i> , <i>Y. ruckeri</i> , <i>Y. aldovae</i> |
| VIII-Erwinieae | <i>Erwinia</i> | <i>E. amylovora</i> , <i>E. carotovora</i> |
| Herhangi bir aile içine yerleştirilmemiş olan cinsler | <i>Arsenophorus</i> <i>Budvicia</i> <i>Buttiauxella</i> <i>Cedecea</i> <i>Kluyvera</i> <i>Leclercia</i> <i>Leminorella</i> <i>Moellerella</i> <i>Obesumbacterium</i> <i>Pantoea</i> <i>Pragia</i> <i>Rahnella</i> <i>Tatumella</i> <i>Xenorhabdus</i> <i>Yokonella</i> | |

2.1.2. Üreme Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler, NaCl ilave edilmiş peptonlu besiyerinde ya da Mac Conkey agarda iyi ürerler. Hem aerop hem de anaerop ortamların her ikisinde de fakültatif anaerop özelliklerinden dolayı üreyebilirler. Bu bakteriler 35-37 °C ve CO₂'siz ortamda üreyebilirler. Ancak *Serratia* ve *Yersinia* gibi bazı türler 1-2 °C aralığındaki düşük ısılarda da üreyebilirler. Kolonileri 18-24 saat sonra görünür hale gelir. Birçok laboratuvarında *Enterobacteriaceae* üyelerinin üretimi için kanlı ve çikolata agar gibi selektif olmayan ve Mac Conkey agar gibi selektif olan besiyerler kullanılmaktadır. Bu besiyerleri yara, solunum örnekleri, idrar, steril vücut sıvıları ve kandan *Enterobacteriaceae* üyelerini izole etmek için kullanılmaktadır. Çikolata ve kanlı agarda büyük, gri ve düzgün koloniler oluştururlar. Kanlı agarda çoğu suşları hemoliz yapmazken, *E. coli*'nin bazı suşları kuvvetli bir hemolizin ürettiğinden, kanlı agarda hemoliz yaparlar. Mac Conkey agarda laktozu fermente eden türler, laktoz fermentasyonu sonucu oluşan asit nedeniyle pembe-kırmızı koloniler oluştururlar. Kristal viyole çöker ve nötral kırmızısı, asit pH'ta kırmızı renk oluşturur. Laktoz negatifler ise Mac Conkey'de şeffaf ve renksiz koloniler oluştururlar. Gram pozitif bakterilerin üremesini engellemek amacıyla, besiyerine kristal viyole ve safra ilave edilir. Tablo 2.2'de bazı *Enterobacteriaceae* üyelerinin Mac Conkey ve koyun kanlı agarda oluşturdukları kolonilerin özellikleri ve büyüklükleri verilmiştir (Ustaçelebi, 1999; Grimont ve ark. 2006).

Tablo 2. 2. *Enterobacteriaceae* üyelerinin Mac Conkey ve koyun kanlı agardaki koloni özellikleri (Ustaçelebi'den, 1999)

| Cins veya tür | Tipik görünüm ve büyüklük | |
|----------------------------------|--|---|
| | Mac Conkey agar | Koyun kanlı agar |
| <i>Salmonella, Shigella</i> | Renksiz, düzgün, 2-3mm | Düzgün, 2-3mm |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | Renksiz, <1mm | Düzgün, <1mm |
| <i>E. coli</i> | Pembe-kırmızı, genellikle presipite olmuş safra ile çevrelenmiş, 2-3mm | Düzgün (bazı suşları beta-hemolitik), 2-3mm |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> | Pembe, mukoid, 3-4mm | Mukoid, 3-4mm |
| <i>Enterobacter</i> | Pembe, <i>Klebsiella</i> kolonileri kadar mukoid değil | Düzgün, 3-4mm |
| <i>P. vulgaris, P. mirabilis</i> | Renksiz, yassı, hafifçe yayılabilen, 2-3mm | Dalgalı, yayılarak petriyi kaplayan koloniler |
| <i>Providencia, Morganella</i> | Renksiz, yassı, 2-3mm | Yassı, 2-3mm |

Dışkı örneklerinden *Enterobacteriaceae* üyelerinin izolasyonu için Mac Conkey veya Eozin Metilen Blue (EMB) agara ek olarak daha fazla seçici ve ayırt edici özelliğe sahip, Hektoen Enterik Agara (HE) veya Xylose Lysine Deoxycholate Agara (XLD) ekim yapılmaktadır. HE agarda, laktoz pozitif türler sarı koloniler oluştururlarken; laktoz negatif olan türler ise yeşil koloni oluştururlar. *Proteus*'un (laktoz negatif) H₂S üreten suşları yeşil, ortası siyah koloniler oluşturur. *Citrobacter freundii*, sarı, ortası siyah koloniler oluşturur. XLD agarda lizin dekarboksilaz oluşturan, ancak laktoz negatif olan *Salmonella*'lar kırmızı, ortası siyah koloniler oluştururlar. HE ve XLD agarda sodyum tiyosülfat ve ferrik amonyum sitrat vardır. H₂S üreten suşlar siyah renk koloniler oluştururlar. *Enterobacteriaceae* üyelerinin izolasyonunda en çok kullanılan besiyerleri Tablo 2.3'te verilmiştir (Ustaçelebi, 1999).

Tablo 2. 3. *Enterobacteriaceae* üyelerinin izolasyonunda en çok kullanılan besiyerleri (Ustaçelebi'den, 1999)

| Besiyeri | | Karbonhidratlar | H ₂ S İncelenmesi |
|--|-----------------|-------------------------|------------------------------|
| Çoğu türlerin üremesi için ayırtıcı besiyerleri | Mac Conkey Agar | Laktoz | - |
| | EMB | Laktoz, Sükroz | - |
| Enterik patojenlerin dışkıdan izolasyonu için selektif besiyerleri | HE | Laktoz, Sükroz, Salisin | + |
| | XLD | Laktoz, Sükroz, Ksiloz | + |

2.1.3. Biyokimyasal Özellikleri

Enterobacteriaceae üyeleri fakültatif anaerop mikroorganizmalardır. Hepsi oksidaz negatiftir; glukozu fermente ederler; nitrati nitrite indirgerler ancak alginatı eritemezler. Glukozun metabolize edilmesi sonucu, düşük pH (pH 4.4) oluşturan, asitli son ürünler açığa çıkar. Metil kırmızısı testi, düşük pH oluşturan asit son ürünlerini ortaya koymaya yarar; ortama metil kırmızısı eklenince kırmızı renk oluşur.

Metil kırmızısı testi:

Glukoz → Pirüvik asit → Asit fermentasyonu (pH 4.4)

↓
Metil kırmızısı indikatörü
Kırmızı renk

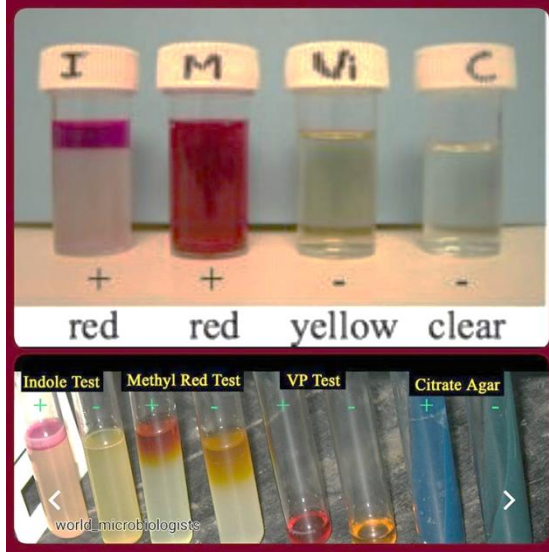
Klebsiella, *Enterobacter*, *Serratia* cinslerine ait türler glukoz fermentasyonunda, butanediol fermentasyonu yolunu kullanarak, yan ürün olarak asetoin oluştururlar. Bundan dolayı, bu grubun Voges-Proskauer reaksiyonu pozitifdir.

Voges-Proskauer reaksiyonu:

Glukoz → Pirüvik asit → Asetoin → Butilenglikol

↓
Diasetil + KOH + α-naftanol
Kırmızı renk

Enterobacteriaceae ailesindeki cinslerin ve türlerin karbonhidrat fermentasyonu farklıdır. Fermente edebildikleri karbonhidratların ya da fermentasyon sonucu oluşan son ürünlerin farklı olması, cins ve tür tespiti amacıyla kullanılır. *Enterobacteriaceae* ailesindeki cinslerin ve türlerin identifikasyonunda, indol oluşumu ve sitrat kullanımı da değerlendirilir. İndol, triptofan aminoasitinin yıkım ürünlerindedir; triptofanaz enzimi olan bakteriler triptofanı deamine eder. Ara ürün olarak amonyak, indol, pirüvik asit oluşur. Para-dimetilaminobenzaldehit (PDAB) ilavesi sonucu kırmızı renk oluşur. Mikroorganizmanın, metabolizması için karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığını görmek amacıyla sitrat testi yapılır. Sitratın kullanılması ile alkali pH oluşur. Bu da sitratlı besiyerindeki bromtimol indikatörünün, yeşil renkten mavi renge dönmesine neden olur. *Enterobacteriaceae* üyelerinin identifikasyonunda, çok eski yıllardan beri kullanılan bir test de IMVIC testidir. IMVIC testi; indol reaksiyonu (I), metil red kırmızısı reaksiyonu (M), Voges-Proskauer Reaksiyonu (V), sitrat reaksiyonu (C) olmak üzere dört reaksiyondan oluşur. Pozitif reaksiyon sonucu besiyerlerindeki renk değişimi Şekil 2.1'deki gibidir. Örneğin; *E. coli*'nin IMVIC testi (++--), *Klebsiella*'nın IMVIC testi (--++)'dir. Tablo 2.4'te *Enterobacteriaceae* ailesindeki belirli cinslerin hızlı identifikasyon değerlendirmeleri özetlenmiştir (Ustaçelebi, 1999).



Şekil 2. 1. IMVIC testi

(http://www.imgrum.org/media/1281295796985358606_1926032627)

Tablo 2. 4. *Enterobacteriaceae* üyelerinin hızlı identifikasyon değerlendirmeleri (Ustaçelebi'den, 1999)

| Hızlı laktoz fermentasyonu yapanlar | Yavaş laktoz fermentasyonu yapanlar | Laktozu fermente etmeyenler |
|---|--|--|
| <i>E. coli</i> : Mac Conkeyde pembe-kırmızı, düzgün, visköz olmayan koloniler, hareketli | <i>Edwardsiella</i> <i>Serratia</i> | <i>Shigella</i> : Hareketsiz, glukozdan gaz oluşturmaz |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> : Mac Conkeyde pembe, düzgün, visköz koloniler, hareketli | <i>Citrobacter</i> <i>Arizona</i> | <i>Salmonella</i> : Hareketli, glukozdan asit ve gaz oluşturur |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> : Mac Conkeyde pembe, mukoid, çok visköz koloniler, hareketsiz | <i>Providencia</i> <i>Erwinia</i> | <i>Proteus</i> : Kanlı agarda dalgalı ürer, üreyi hızla hidrolize eder (Amonyak kokusu oluşur) |

Enterobacteriaceae üyelerinin çabuk ve kolay identifikasyonu için, küçültülmüş, standardize edilmiş test serileri, ticari olarak satılmaktadır ve bunlar konvensiyonel tüp testlerine benzeyen, ancak küçültülerek hazırlanmış kitlerdir.

2.1.4. Mikrobiyolojik Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler 0,5 - 3,0 µm boyutunda, Gram negatif, sporsuz basillerdir. Hareketli olanlarda peritriş kirpikler (flagella) bulunur (Borman ve ark. 1944).

Enterobacteriaceae üyeleri, çok sayıda ortak yapısal özelliklere sahiptir:

- ✓ Sitoplazma zarını saran sert hücre duvarı,
- ✓ Çift sarmallı DNA'dan oluşan tek kromozom,
- ✓ Ökaryotik ribozomlardan daha küçük ve daha az karmaşık ribozomlar,
- ✓ Oksidatif metabolizma için mitokondri bulunmaması,
- ✓ Protein sekresyonu için endoplazmik retikulum bulunmaması

Hücre duvarı çok katlı bir yapı gösterir ve hücre duvarını meydana getiren lipoprotein, peptidoglikan, protein, fosfolipid ve lipopolisakkaritler (LPS) tabakalar halinde düzenlenmiştir. Peptidoglikan-lipoprotein tabakası hücre duvarının %20'sini oluşturur. Peptidoglikan organizmaya sertliğini ve şeklini veren çapraz bağlanmış polimerlerdir. Kalan %80'lik bölüm de lipopolisakkarit, transportta görevli olan multimerik porin proteinleri ve iki katlı fosfolipid tabakadan oluşmaktadır. LPS, taşıdıkları özel polisakkarit yan zincirler sayesinde çeşitli cinslerin antijenitesini belirler. Ayrıca LPS hücrenin endotoksik aktiviteden sorumlu olan kısmıdır. Bakteride, hücre duvarından dışarı doğru uzanan ve flagella olarak adlandırılan organel bulunur. Bu, hareket organelidir ve iç zardaki bazal yapıdan köken alır. Çoğu cins ve türlerde fimbria (veya pili) bulunur ve diğer bakterilere, konak hücrelere, bakteriyofajlara tutunmada görevlidir. Seks fimbriyası konjugatif (bulaşıcı) plazmid taşıyan bakterilerde görülür ve plazmid DNA'sının konjugasyonla aktarılmasında görevlidir. Bunlar bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç kazanmasında önemli etmenlerdir (Ustaçelebi, 1999; Mokracka ve ark. 2012).

2.1.5. Epidemiyoloji

Enterobacteriaceae üyeleri su, toprak ve bitkilerde yaygın olarak bulunmasının yanı sıra insan ve hayvan bağırsaklarına da yerleşirler. İnsanların gastrointestinal (GI) yolunun %99'dan çoğunu anaerob bakteriler oluşturmaktadır ve bunların çoğunluğu da *Bacteroides*'lerdir. Ancak dışkı kültürleri aerob ortamlarda inkübe edildiğinde en çok

Enterobacteriaceae üyeleri üremektedir. Dışkıda en çok bulunan fakültatif anaerob mikroorganizma *E. coli*'dir. Deniz, göl, akarsu, kuyu, şebeke, içme suyu gibi sularda *E. coli* ya da diğer *Enterobacteriaceae* üyelerinin (*Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* gibi) varlığı, suların kanalizasyonla kirlendiğini belirleyici bir bulgu olarak kabul edilmektedir. *Enterobacteriaceae* üyeleri doğada yaygın olmakla birlikte bazı türleri sınırlı ekolojik bölgelerde bulunmaktadır. Örneğin; *Salmonella typhi*, tifo hastalığına neden olup yalnızca insanda bulunmaktadır. *K. pneumoniae* ise yaşadığımız çevrede çok yaygın olup doğada biyokimyasal ve jeokimyasal olaylara katılmaktadır. Ayrıca *K. pneumoniae* insanlarda solunum sistemi, bağırsak ve üriner yolda belirtisiz yerleşim gösterir ve ölümlerle sonuçlanabilen ağır enfeksiyonlara neden olmaktadır (Baron, 1996; Ustaçelebi, 1999; Grimont ve ark. 2006; Davin ve Pages, 2015).

2.1.6. Antijenik Yapı

Enterobacteriaceae üyelerinin somatik (O), kirpik (flagella) (H) ve kapsül (K) antijenleri, ailenin serolojik olarak tiplendirilmesinde kullanılan ana antijenlerdir. Ayrıca bunlar dışında bakteri hücresinin dış yüzeyinde bulunan ve ECA (*Enterobacteriaceae* Common Antigen) olarak adlandırılan antijen, bütün *Enterobacteriaceae* üyelerinde bulunan ortak bir antijendir (Ustaçelebi, 1999).

2.1.7. Virülans ve Patogenite Özellikleri

- 1. Adezinler:** Birçok Gram negatif bakteride fimbria ya da pili denilen yüzey organelleri bulunur. Bu organeller, bakteri hücresinin yüzeyinden bütün yönlere doğru ışınsal uzanan ve sayıları çok olan yapılardır. Heliks şeklinde düzenlenmiş protein parçalarından oluşmuşlardır ve bakterilerin mukozalara tutunmalarını sağlarlar. Mikroorganizmaların konak dokuya yerleşmesindeki temel basamaktır (Ustaçelebi, 1999; Bilgehan, 2008).
- 2. Endotoksin:** Hücre duvarı lipopolisakkaritinin (LPS) Lipid A bölümü, toksik aktiviteden sorumludur; hayvanlara enjeksiyonundan sonra, hayvanda çeşitli etkilere neden olur. Ateş, öldürücü şok, lökositte değişiklikler, tümörlerin gerilemesi, enfeksiyonlara karşı konak yanıtının değişmesi, Sanarelli-Shwartzman reaksiyonu ve çeşitli metabolik değişiklikler meydana gelir. Üriner yol ya da yara

enfeksiyonlarındaki rolü belirgin değildir. Ancak bakteriyemili hastalarda ölümlere neden olabilir. Enterik bakteriyemili hastaların %30'unda endotoksik şok gelişmekte ve bu hastaların %40-90'ı ölmektedir (Bilgehan, 2008).

3. **Enterotoksin:** Çoğunlukla ince bağırsağı etkileyen, bağırsak lümeninde bol sıvı atılımına ve buna bağlı olarak da diyareye neden olan bu toksinler kolera toksinine benzerler. Bazı *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter freundii* ve *Enterobacter* suşları tarafından salgılanmaktadır. *Salmonella* ve *Shigella* enfeksiyonlarında, enterotoksinin rolü net değildir. Bu hastalıkların patogeneğinde, dokuya penetrasyon önemlidir. Bağırsak içinde sinirsel reseptörleri stimüle eder ve refleks etkisi ile beraber kusma ve bağırsak hareketlerinin azalması sonucu besin zehirlenmesi tablosu oluşturur (Bilgehan, 2008).
4. **Shigatoksin ve Shigatoksin benzeri (Shigalike) toksinler:** Bazı *Shigella* suşları memeli hücrelerinin protein sentezini bozan ve shigatoksin olarak adlandırılan toksinler oluştururlar. Benzer etkili toksinler, bazı *E. coli* suşlarınca salgılanmaktadır. Bu toksinlerin etkisi ilk olarak vero (Afrika yeşil maymunu) doku hücrelerinde gösterildiği için verotoksin olarak da adlandırılırlar. Verotoksin salgılayan *E. coli* suşları hemolitik diyare ve hemolitik üremik sendroma neden olurlar (Ustaçelebi, 1999).
5. **Hemolizinler:** Bazı *Enterobacteriaceae* üyelerine ait izolatların salgıladığı hücre dışı ürünlerdir. *E. coli*'nin neden olduğu bazı hastalıklarda önemli olduğu gösterilmiştir. Bağırsak dışı enfeksiyonlardan izole edilen *E. coli* suşlarının yarısından fazlası hemolizin salgılar. Ancak GI yol enfeksiyonuna neden olan *E. coli* suşlarının sadece %10'u hemolizin yapar. Üropatojen *E. coli*'lerin çoğunda, hem P fimbria, hem de hemolizin bulunur. Hemolizinlerin sitotoksik etkileri yalnızca eritrositlerle sınırlı değildir. Alfa hemolizinler, lenfositlere daha etkin olan sitotoksinlerdir. Beta hemolizinler ise, nötrofillerin kemotaksisini ve fagositozunu önlemektedirler. Hemolitik bakteri enfeksiyonlarından sonra hemoglobinüri ve kansızlık görülebilir ancak bu bir kural değildir (Ustaçelebi, 1999; Bilgehan, 2008).
6. **Sideroforlarla Demir Kazanımı:** Demir esansiyel bir gelişme faktörüdür. Dokularda ve mukozalarda serbest demirin düşük yoğunlukta olması, *Enterobacteriaceae* üyelerinin oluşturduğu bağırsak dışı enfeksiyonlarda konak savunmasının ilk belirtilerinden ve bakteri üremesini önleyici faktörlerden biridir. *Enterobacteriaceae* üyeleri konak organizmada canlı kalabilmek ve bağırsak dışı

dokulara yayılabilmek için, demir sağlamak üzere çeşitli mekanizmalar geliştirirler. Bunlardan biri demir bağlamaya çok büyük eğilim gösteren, siderofor denen düşük molekül ağırlıklı bileşiklerdir. Bakteriler konak organizmada transferrin ya da laktoferrin gibi demir bağlanmış olan moleküllerden, siderofor aracılığıyla demir kazanırlar. Sentezlenen ve sonra salgılanan sideroforların yakaladığı demir, hücre duvarındaki özel dış zar proteinleri aracılığı ile hücre içine alınır. Demir düzenleyici dış zar proteinleri (Iron Regulated Outer Membrane Proteins, IMOPs) genellikle demir-siderofor kompleksi için reseptör görevi yapar ve bakterilerin sideroforlar aracılığı ile demir alabilmesi için gereklidir. Bu proteinlerin büyüklüğü 74-84 kDa arasında değişmektedir. Bakteriler bu proteinleri demirden yoksun ortamlarda daha bol oluştururlar. *E. coli*'de Fe⁺³-enterobaktin kompleksi için 81 kDa'lık bir protein reseptör olarak çalışır. Birçok *Enterobacteriaceae* üyesi (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter*) iki tip siderofor (fenolat siderofor enterobaktin ve hidrosamat siderofor aerobaktin) sentezlerler. *Enterobacteriaceae* üyeleri için, virülans faktörü olarak, hidrosamat tipi siderofor aerobaktin üretimi, fenolat tipi siderofor enterobaktin sentezinden daha önemlidir. Hastane enfeksiyonuna neden olan mikroorganizmaların kaynağı, bulaş yollarının belirlenmesi ve kontrol önlemlerinin alınmasında rol oynayan epidemiyolojik çalışmalar, invaziv enfeksiyon hastalıklarına yol açan suşlarda aerobaktin insidansının oldukça yüksek olduğunu göstermiştir. Ancak ağır ishallere neden olan EPEC ve ETEC (enteropatojen ve enterotoksijen *E. coli*), yalnızca enterobaktin üretirler (Ustaçelebi, 1999; Güler ve ark. 2011).

- 7. Kapsül:** Antikorların bakteriye bağlanma ve lökositlerin bakteriyi fagosite etme özelliğini azaltarak bakterinin virülansına yardımcı olur. Polisakkarit yapısı kapsülün oldukça hidrofilik olmasını sağlar. Bu hidrofobik hücre yüzeyini iten hidrofilik kapsül antijenleri sayesinde bakteri fagositozdan korunur (Ustaçelebi, 1999).

2.1.8. Dirençlilik

Enterobacteriaceae üyeleri sporsuzdur. Çoğu germisid ya da dezenfektanların düşük konsantrasyonları ile ve ısı ile kolaylıkla inaktive olurlar. Ancak *Enterobacter* türleri, diğer *Enterobacteriaceae* üyelerine göre dezenfektan ve antibiyotiklere daha

dirençli olan nozokomiyal patojenlerdir. Fenol türevleri, formaldehit, beta glutaraldehit, halojenli bileşikler bakterisid etkilidir. Fakat dörtlü amonyum bileşikleri, bakteriyostatik etki gösterebilirler (Poole, 2005; Mirnejad ve ark. 2013). Enterik patojenlerin kontrolünde, suların klorlanması etkilidir. *Enterobacteriaceae* üyeleri kuruluğa kısmen duyarlıdır. Ancak yeterli nem bulunduğunda, çok uzun zaman canlı kalabilirler. Hastanelerde solunum cihazları ve anestezi aletleri *Enterobacteriaceae* üyelerinin enfeksiyon kaynağıdır. *Enterobacteriaceae* üyeleri, kardan ve buzdan izole edilmiştir; gıdalarda kontrolü, pastörizasyon ya da doğrudan pişirme ile sağlanır. Ayrıca, bu bakterilerle oluşan enfeksiyonların önlenmesinde, kişisel hijyen kurallarına uymak ve el yıkama alışkanlığı da önemlidir (Ustaçelebi, 1999; Ögünç ve ark. 1999; Kang ve ark. 2004).

2.1.9. Plazmidler

Bakteri hücresinde kendi kendine replike olabilen plazmidler, kromozom parçası olmadıklarından kromozom dışı DNA parçaları olarak bilinirler. Gram negatif bakterilerde sık karşılaşılan plazmidler direnç plazmidleridir (R Plazmid). Bunlar, antibiyotik direncinden sorumludur. İlaç direnci, R plazmid üzerinde bulunan transpozon adı verilen gen paketlerinde bulunur. Tıpta, ziraatte ve veterinerlikte, aşırı ölçüde antimikrobiyal madde kullanımı sonucu, R plazmidleri çok sayıda transpozona sahip olmuşlardır. Bu da bakteriye çok sayıda ilaca direnç fenotipi kazandırmıştır. Çoğu R plazmidi taşıyan suşlar, diğer suşlara ve türlere konjugasyonla plazmidlerini aktarabilmektedir. Böylece, ilaç direnci kolayca yayılır. Enterotoksin, kolonizasyon faktörleri ve hemolizin gibi virülans faktörlerini kodlayan genler de plazmidlerde bulunur. Virülans faktörleri ve ilaç direnci genleri aynı plazmidde bulunabilir. Bu nedenle, R plazmidi üzerindeki baskı ile virülans faktörleri de yayılım gösterir. İlaç direnci olmasa da, birkaç virülans faktörü aynı plazmidde bulunabilir. Örneğin; plazmidi bulunan ETEC suşlarının, enterotoksin yapımı ve kolonizasyon faktör antijeni genlerini taşıdıkları gösterilmiştir. Ayrıca, *Enterobacteriaceae* üyelerinin plazmidleri epidemiyolojik amaçlarla incelenmektedir. Bir bakteri klonunun taşıdığı plazmidlerin sayısı ve büyüklükleri, başka bir klonun plazmidleri ile karşılaştırılarak enfeksiyonların kaynağı ve bulaşma yolları izlenmektedir. Bu sayede, çeşitli *Enterobacteriaceae* cinslerine ait çok sayıda salgın aydınlatılmıştır. Ancak, plazmid analizleri,

biyotiplendirme, serotiplendirme, faj ve bakteriyosin tiplendirmesi gibi fenotipik tiplendirme yöntemleri ile birlikte kullanıldığı zaman yöntemlerin ayırım gücü daha da artar. Epidemiyolojik çalışmalar türlerin hızlı ayırımı, salgın olup olmadığına karar verme ve hastane enfeksiyonları kontrol araştırmaları için önemli veriler sağlamaktadır. Epidemik klonu epidemiyolojik olarak ilişkisiz olan izolatlardan ayırmak amacıyla yapılır (Ustaçelebi, 1999; Güler ve ark. 2011; Kırca ve ark. 2014; Malek ve ark. 2015; Baylan ve Erdoğan, 2017).

2.1.10. Patogenez

Bakteriyel enfeksiyonlar birbirleri ile ilişkili birkaç basamaktan oluşur. İlk basamak bakterinin organizmaya girişidir. *Enterobacteriaceae* üyelerinin ilk adımı, mukoza reseptörlerine tutunma ve GI yola yerleşmektir. Enfeksiyonun belirtili döneminde, toksin salınımından dokuya invazyon ve hücrelerde hasara kadar gelişen durumlarla ilgili belirtiler gelişir. Sonuçta, konağın bakterinin her bir ürününe karşı gösterdiği cevap iyileşmeyi sağlar. Aynı zamanda enflamatuvar cevap hastalığın seyrini ve ağırlığını düzenler (Ustaçelebi, 1999).

2.1.11. *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Oluşturduğu Enfeksiyonlar

Enterobacteriaceae üyeleri GI yol dışında, vücudun başka bölgelerinde normalde bulunmazlar. Gastroüriner sistem gibi GI yol dışındaki bulaştığı ve yerleştiği yerlerde önemli enfeksiyonlar yapabilirler. *Shigella* türleri, GI yol dışında çok nadir enfeksiyonlara yol açarlar. *Shigella* türleri hariç *Enterobacteriaceae* üyelerinin birçok türü, sıklıkla bağırsaklar dışında enfeksiyonlara neden olurlar. Bu enfeksiyonlardan üriner yol enfeksiyonları (öncelikle sistit) en sık görülenidir. Buna ek olarak, solunum sistemi, kan, yara ve merkezi sinir sisteminde menenjit, pnömoni, septisemi ve apselere neden olurlar (Tablo 2.5). Sepsis ve menenjit hayatı tehdit edecek kadar ağır seyredir. GI dışındaki enfeksiyonlara en çok neden olan *Enterobacteriaceae* türleri;

- *Escherichia coli*,
- *Klebsiella oxytoca*,
- *K. pneumoniae*,
- *Proteus mirabilis*,

- *Enterobacter aerogenes*,
- *E. cloacae*,
- *Citrobacter türleri*,
- *Serratia marcescens* 'dir.

Enterobacteriaceae ailesine ait çeşitli mikroorganizmalar, aynı zamanda insanlarda ve hayvanlarda önemli bağırsak enfeksiyonlarına neden olurlar. Çoğu cinslere ait suşlar diyareye neden olmakla beraber, asıl diyare etkeni olan türler başlıca dört *Enterobacteriaceae* cinsi içinde toplanmaktadır;

- Çeşitli *Escherichia coli* serotipleri,
- *Shigella* türleri,
- *Salmonella* serotipleri,
- *Yersinia enterocolitica*.

Enterobacteriaceae üyeleri içinde önemli özel enfeksiyonlara neden olan türler de bulunmaktadır. Bunlardan *S. typhi* tifo hastalığına; *Yersinia pestis* ise veba hastalığına neden olur. Günümüzde *Enterobacteriaceae* üyeleri, hastane enfeksiyonlarının en büyük sorumlularıdır. Hastanede yatan hastalar, çeşitli faktörlerden dolayı *Enterobacteriaceae* üyelerinin yerleşmesine ve sonra enfeksiyon oluşmasına çok duyarlıdırlar. Hastane enfeksiyonlarına yol açan *Enterobacteriaceae* üyeleri içinde *E. coli* en baştaadır. Sıklık sırasına göre hastane enfeksiyonlarından izole edilen *Enterobacteriaceae* üyeleri;

- *E. coli*,
- *Enterobacter* türleri,
- *K. pneumoniae*,
- *P. mirabilis*,
- *Citrobacter* türleri,
- *S. marcescens* 'tir.

Tablo 2. 5. Çeşitli *Enterobacteriaceae* cinslerinin sıklıkla neden olduğu enfeksiyonlar (Ustaçelebi'den, 1999)

| Bakteri türü | Enfeksiyonlar |
|------------------------------|---|
| <i>E.coli</i> | Üriner enfeksiyon, sepsitemi, neonatal sepsis, menenjit ve diyare |
| <i>Shigella</i> | Dizanteri, diyare |
| <i>Edwardsiella</i> | Diyare, yara enfeksiyonu, sepsitemi, menenjit, tifo benzeri tablo |
| <i>Salmonella</i> | Tifo, sepsitemi, diyare |
| <i>Citrobacter</i> | Yara ve üriner enfeksiyon (fırsatçı ve hastane enfeksiyonları) |
| <i>Klebsiella</i> | Üriner enfeksiyon, pnömoni, sepsitemi |
| <i>Enterobacter</i> | Yara enfeksiyonu, sepsitemi, üriner enfeksiyon (fırsatçı ve hastane enfeksiyonları) |
| <i>Serratia</i> | Yara enfeksiyonu, sepsitemi, üriner enfeksiyon (fırsatçı ve hastane enfeksiyonları) |
| <i>Proteus</i> | Yara enfeksiyonu, sepsitemi, üriner enfeksiyon |
| <i>Providencia</i> | Yara enfeksiyonu, sepsitemi, üriner enfeksiyon (fırsatçı ve hastane enfeksiyonları) |
| <i>Morganella</i> | Fırsatçı ve hastane enfeksiyonları |
| <i>Yersinia pestis</i> | Veba |
| <i>Y. pseudotuberculosis</i> | Mesenterik adenit, diyare |
| <i>Y. enterocolitica</i> | Mesenterik adenit, diyare |
| <i>Erwinia</i> | Yara enfeksiyonu |
| <i>Pectobacterium</i> | Yara enfeksiyonu |

Tablo 2. 6. Çeşitli *Enterobacteriaceae* türlerinin özel antibiyotik direnç (intrinsik direnç) durumu (Ustaçelebi'den, 1999)

| Türler | Çoğu suşların dirençli olduğu antibiyotikler |
|-----------------------------------|---|
| <i>Buttiauxella</i> | Sefalotin |
| <i>Cedecea</i> türleri | Polimiksinler, Ampisilin, Sefalotin |
| <i>Citrobacter amalonaticus</i> | Ampisilin |
| <i>Citrobacter freundii</i> | Sefalotin |
| <i>Citrobacter diversus</i> | Sefalotin, Karbenisilin |
| <i>Edwardsiella tarda</i> | Kolistin |
| <i>E. cloacae</i> | Sefalotin |
| <i>E. aerogenes</i> | Sefalotin |
| Diğer <i>Enterobacter</i> türleri | Sefalotin |
| <i>Escherichia hermannii</i> | Ampisilin, Karbenisilin |
| <i>Ewingella americana</i> | Sefalotin |
| <i>Hafnia alvei</i> | Sefalotin |
| <i>K. pneumoniae</i> | Ampisilin, Karbenisilin |
| <i>Kluyvera ascorbata</i> | Ampisilin |
| <i>Kluyvera cryocrescens</i> | Ampisilin |
| <i>P. mirabilis</i> | Polimiksinler, Tetrasiklin, Nitrofurantoin |
| <i>P. vulgaris</i> | Polimiksinler, Ampisilin, Nitrofurantoin, Tetrasiklin |
| <i>Morganella morganii</i> | Polimiksinler, Ampisilin, Sefalotin |
| <i>Providencia rettgeri</i> | Polimiksinler, Sefalotin, Nitrofurantoin, Tetrasiklin |
| Diğer <i>Providencia</i> türleri | Polimiksinler, Nitrofurantoin |
| <i>S. marcescens</i> | Polimiksinler, Sefalotin, Nitrofurantoin |
| <i>Serratia fonticola</i> | Ampisilin, Karbenisilin, Sefalotin |
| Diğer <i>Serratia</i> türleri | Polimiksinler, Sefalotin |

2.1.12. Tedavi

Yeni antibiyotiklerin keşfine rağmen, *Enterobacteriaceae* üyelerinin oluşturduğu enfeksiyonların yeterli tedavisi halen zordur. Bu enfeksiyonların tedavisini zorlaştıran birçok faktörden bir tanesi, hastanın altta yatan hastalığının tedaviyi güçleştirmesidir. Altta yatan hastalık ile ilgili ölümler gerçekleşmektedir. Tedaviyi güçleştiren bir başka faktör de, dirençli *Enterobacteriaceae* üyelerinin varlığı ve oranının giderek artmakta oluşudur. Yeterli olmayan ya da yanlış antibiyotik kullanımları bakterilerde direnç oranını arttırdığı gibi, direncin duyarlı organizmalara yayılmasına da neden olur. Antibiyotik kullanma alışkanlığına ve tercih edilen antibiyotiklere bağlı olarak her ortam kendine özgü bakteri dağılımını ve antibiyotik direncini oluşturur. Yeni

kullanıma giren bir antibiyotiğe bakteri başlangıçta oldukça duyarlı iken, özellikle uygun olmayan antibiyotik kullanımı sonucu direnç gelişimine bağlı olarak tedavide başarısızlıklarla karşılaşmaktadır. Ayrıca *Enterobacteriaceae* üyelerinde, cinse ve türe özgü antibiyotik dirençleri de (intrinsik direnç) yaygındır. Tablo 2.6’da, çeşitli *Enterobacteriaceae* türlerinin özel olarak direnç gösterdiği bazı antibiyotikler görülmektedir. Tablo 2.7’de de, *Enterobacteriaceae* üyelerinin oluşturduğu enfeksiyonlarda seçilebilecek antibiyotiklerin listesi görülmektedir. Tedavi planlanırken, mikroorganizmanın antibiyotik duyarlılığı, enfeksiyon bölgesi, enfeksiyon tipi ve hastanın durumuna uygun antibiyotik seçimi dikkate alınmalıdır (Ustaçelebi, 1999; Yaylı ve Aksoy, 2003).

Tablo 2. 7. *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarının tedavisinde tercih edilebilecek antibiyotikler (Ustaçelebi’den, 1999)

| | |
|--|--|
| Penisilinler Amoksisilin Ampisilin Karbenisilin Mezlosilin Pipersilin Tikarsilin | Polimiksinler Kolistin Polimiksin B |
| Betalaktamaz inhibitörü penisilinler Amoksisilin-Klavulanikasit Ampisilin-Sulbaktam Tikarsilin-Klavulanikasit | Kinolonlar |
| Sefalosporinler | Sulfonamidler |
| Aminoglikozidler Amikasin Gentamisin Kanamisin Netilmisin Tobramisin | Tetrasiklinler |
| | Diğer Antibiyotikler Kloramfenikol İmipenem Nitrofurantoin Trimetoprim/Sulfametoksazol |

2.2. *Enterobacter* cinsi

Enterobacter spp.'nin bugüne kadar 11 türü belirlenmiştir. *Enterobacter* cinsinde bulunan türler:

- *E. aerogenes*,
- *E. cloacae*,
- *E. agglomerans*,
- *E. amnigenus*,
- *E. sakazakii*,
- *E. gergoviae*,
- *E. dissolvens*,
- *E. nimipressuralis*,
- *E. asburiae*,
- *E. taylorae*,
- *E. hormaechei* türleridir.

Klinik örneklerden en sık izole edileni sırası ile *E. cloacae* ve *E. aerogenes*'tir. 1960'lara kadar *Enterobacter*'ler *Klebsiella-Aerobacter* sınıfında yer almış ve *Klebsiella* ile aralarında küçük bir ayrım yapılmıştır. *Enterobacter* cinsi ilk kez 1960 yılında Hormaeche ve Edwards tarafından adlandırılmıştır. *Klebsiella*'nın aksine, *Enterobacter* hareketlidir (peritriş kirpikli) ve yalnızca belirli *Enterobacter* suşlarının ince bir kapsülü vardır. Ayrıca *Enterobacter*'ler TSİ agarda H₂S oluşturmazlar. IMVIC testi (--++)'dir. Potasyum siyanid (KCN) varlığında üreyebilen ve laktozu fermente eden bakterilerdendir. Lizin, arjinin, ornitin dekarboksilasyon testleri ile *E. cloacae*, *E. agglomerans* (*Pantoea agglomerans*) ve *K. pneumoniae* ayrımı yapılır (Tablo 2.8) (Ustaçelebi, 1999; Gür, 2000; Grimont ve ark. 2006).

Tablo 2. 8. *Enterobacter* cinsine ait belirli türlerin *K.oxytoca* ve *K. pneumoniae*'den ayrımı (Ustaçelebi'den, 1999)

| Biyokimyasal test | <i>Klebsiella</i> | | <i>Enterobacter</i> | |
|-------------------|----------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | <i>K. pneumoniae</i> | <i>K. oxytoca</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>E. cloacae</i> |
| İndol | - | + | - | - |
| Hareket | - | - | + | + |
| Lizin | + | + | + | - |
| Arjinin | - | - | - | + |
| Ornitin | - | - | + | + |
| DNase (25 °C) | - | - | - | - |
| Jelatinaz (22 °C) | - | - | - | - |
| Fermentasyonlar: | | | | |
| Laktoz | + | + | + | + |
| Sükroz | + | + | + | + |
| Sorbitol | + | + | + | + |
| Adonitol | + | + | + | d (%25 +) |
| Arabinoz | + | + | + | + |

Enterobacter'ler fırsatçı patojenlerdir. Nadiren primer insan hastalığına neden olurlar. Klinik örneklerden izole edilen *Enterobacter*'ler;

- *E. cloacae*,
- *E. aerogenes*,
- *E. agglomerans*,
- *E. gergoviae*,
- *E. sakazakii*,
- *E. hormaechi*'dir.

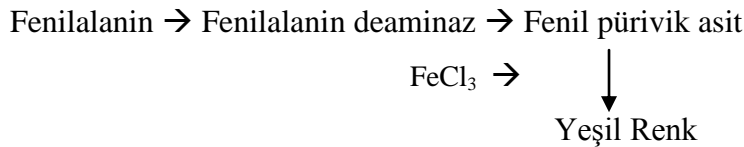
İnsanlarda hastalık etkeni olarak nadir izole edilen bu bakteriler, hayvan ve insanların bağırsaklarında, toprakta, sularda, kanalizasyon atıklarında ve süt ürünlerinde bulunurlar. Klinik örnek olarak, balgam (sıklıkla antibiyotik tedavisinden sonra), idrar (sıklıkla hastane kaynaklı üriner yol enfeksiyonunda), yara, kan ve BOS'tan izole edilirler. Genellikle sekonder patojen (altta yatan bir başka hastalığa eklenen enfeksiyon etkeni) olduğu düşünülür. Hastanede yatan kişileri, yanık ve yara yeri olan hastaları, solunum ve üriner enfeksiyonlarla ilgili antibiyotik tedavisi alanları sıklıkla kolonize ederler. Bazen hiçbir enfeksiyona yol açmadan, konak organizmada bulunabilirler (kommensalizm). Bu mikroorganizmalar hastane ortamında yatay yayılım kapasitesine

sahiptir. Hasta bakımının gelişmesi ve invaziv girişimlere giderek daha fazla başvurulması, antibiyotik direncinin yayılımını kolaylaştırmaktadır. Çoğu fırsatçı *Enterobacteriaceae* üyelerinin yayılmasında olduğu gibi, asepsiye uymayan, ellerini yıkamayan hastane personeli elleriyle hastalar arasında enfeksiyonu yayabilmektedir. Yani, enfeksiyon direkt olarak hastadan hastaya, indirekt olarak personelin elleri ile veya kontamine olmuş çevresel yüzeylerden ve hasta bakım setlerinden yayılmaktadır (Keller ve ark. 1998; Ustaçelebi, 1999; Aktaş ve ark. 2007; Budak ve ark. 2012).

E. cloacae ve *E. aerogenes* en sık izole edilen türlerdir. *E. agglomerans* da kontamine IV (intravenöz, damarıçi) sıvılar nedeniyle salgınlara neden olmuştur. *E. gergoviae*, solunum yolu örneklerinden izole edilebilir. *E. sakazakii*, yenidoğanlarda menenjit ve bakteriyemilerden sorumludur. Beyin apsesi, solunum yolu ve yara enfeksiyonlarından izole edilmiştir. *E. cloacae*'nin de yenidoğan ünitelerindeki salgın suşlarından izole edilen önemli bir nozokomiyal patojen olduğu rapor edilmiştir (Davin ve ark. 1996; Ustaçelebi, 1999; Dalben ve ark. 2008).

2.3. *Proteus* cinsi

Enterobacteriaceae ailesinin *Proteeae* kabilesinde sınıflandırılan üç cinsten biridir. Diğer ikisi de, *Morganella* ve *Providencia* cinsleridir. *Proteeae* kabilesindeki bazı türlerin identifikasyonu için, Tablo 2.9'da verilen özellikleri kullanılmaktadır. Bu kabiledaki cinslerin, fenilalanin deaminaz enzimleri vardır ve bu özellikleriyle *Enterobacteriaceae* ailesindeki diğer cinslerden ayrılırlar. Fenilalanin deaminaz enzimi olan diğer bakteriler, fenilalanini deamine ederek, fenil pürivik asit oluştururlar. Fenilalanin pürivik asit olmuşsa, üzerine ferriklorit ($FeCl_3$) damlatıldığında yeşil renk meydana gelir.



Proteus cinsinde bulunan türler;

- *P. mirabilis*,
- *P. vulgaris*,
- *P. penneri*,
- *P. myxofaciens*'tir.

Tablo 2. 9. *Proteeae* ailesinde cins ve belirli türlerin identifikasyonu (Ustaçelebi, 1999'den)

| <i>Proteaceae</i> ailesi | <i>Proteus</i> cinsi | | | <i>Morganella</i> cinsi | <i>Providencia</i> cinsi | | | Proteae ailesi |
|--------------------------|----------------------|--------------------|--|-------------------------|--------------------------|--------------------|-------------------------|----------------|
| | <i>P. mirabilis</i> | <i>P. vulgaris</i> | | | <i>P. stuartii</i> | <i>P. rettgeri</i> | <i>P. alcalifaciens</i> | |
| TSİ' de alkali/asit | Alk/A | Alk/A | | Alk/A | Alk/A | Alk/A | | |
| Glukozdan gaz | + | +/- | | + | - | +/- | | |
| H ₂ S | + | + | | - | - | - | | |
| Metil kırmızısı | + | + | | + | + | + | | |
| Voges-Proskauer | +/- | - | | - | - | - | | |
| İndol | - | + | | + | + | + | | |
| Sitrat | +/- | -/+ | | - | + | + | | |
| Fenilalanin deaminaz | + | + | | + | + | + | | |
| Üre | ++ | ++ | | ++ | + | - | | |
| Hareket | + | + | | + | + | + | | |
| Lizinin | - | - | | - | - | - | | |
| Arjinin | - | - | | - | - | - | | |
| Ornitin | + | - | | + | + | - | | |
| ONPG | - | - | | - | - | - | | |

Proteus cinsine ait olan türlere toprak, su ve kanalizasyon atıklarında sık olmak üzere çevrede hemen her yerde rastlanmaktadır. *P. vulgaris* ve *P. mirabilis*, insanlar için fırsatçı patojen olarak kabul edilen türlerdir ve sıklıkla idrar, yara, kulak, bakteriyemilerden izole edilebilirler. Klinik örneklerden sıklıkla izole edilen Gram

negatif bakterilerden olan *P. mirabilis* ve *P. vulgaris*, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kolayca izole edilebilirler (Çopur ve ark. 2013). Bu türler, seçici olmayan koyun kanlı agar gibi katı besiyerlerine ekildiklerinde, yüzeye yayılan koloniler oluştururlar. Agar üzerinde dalgalar oluşturarak yayılırlar (swarming). Ayrıca yanık kokusu gibi kendilerine özgü kokuları da vardır. Türlerin her ikisi de bol miktarda H₂S oluştururlar. Üreyi çok hızlı bir şekilde hidrolize ederler. *P. vulgaris* indol yapar, ancak *P. mirabilis* indol yapmaz. Ayrıca ornitin reaksiyonlarının farklılığı da, bu türün birbirlerinden ayrılmasını sağlar. İndol negatif *P. mirabilis*, diğer türlerden farklı olarak ampicilin, penisilin G, aminoglikozidler, trimetoprim/sulfametoksazol (TMP/SMX) başta olmak üzere birçok antibiyotiğe duyarlıdır. *P. penneri* türünün de “swarming” yapan suşları vardır. *P. myxofaciens* de bol miktarda slaym tabakası oluşturur (Ustaçelebi, 1999; Naas ve ark. 2000).

P. mirabilis ve *P. vulgaris*, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında, *E. coli*'den sonra en sık izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerindedir. Özellikle üriner sistem enfeksiyonlarında, idrar kültürlerinden yüksek oranlarda izole edilirler. *Proteus*'ların üriner sistemde patojenliklerine katkıda bulunan birkaç özelliği vardır. Alkali idrarda taş oluşumu çok kolaylaşır, taşlar yabancı cisim gibi davranarak, üriner akımı engeller ve kronik üriner enfeksiyonlara yatkınlık oluştururlar. Sonuç olarak, *Proteus* enfeksiyonlarında kronikleşme eğilimi görülür. Ayrıca, üreazın idrarı alkalileştirerek, doğrudan böbrek tübülüslerine toksik etki yaptığı da gösterilmiştir. *Proteus*'lar, üriner sistem epiteline tutunmak için fimbrialara sahiptir. Kirpikleri ile çok hareketli olmaları, üriner sistemde ilerlemeye ve yayılmaya katkıda bulunur. Ayrıca, üropatojen *Proteus* suşlarında virülans önemli rol oynayan birkaç farklı hemolizin de bulunmuştur. Çoğu *Proteus* enfeksiyonu, *P. mirabilis* ile ilişkilidir. Komplikasyonsuz üriner yol enfeksiyonlarının %10'dan fazlasına bu tür neden olmaktadır. Ayrıca yara yeri enfeksiyonlarından, pnömoni ve septisemi olgularından da sıklıkla izole edilirler. Bunlara ek olarak, *Proteus*'ların yol açtığı çoğu hastane enfeksiyonlarından indol pozitif *Proteus*'lar sorumludur. İndol pozitif türler aminoglikozidlere dirençlidir. Bu yüzden, tedavilerinde amikasin, yeni betalaktamlar ve kinolonlar kullanılmalıdır. *P. vulgaris*'in klinik mikrobiyolojide başka bir önemi daha bulunmaktadır. *P. vulgaris*'in bazı O antijenleri (OX2, OX19 ve OXk) çeşitli *Riketsiya* enfeksiyonları geçirmekte olan hastaların serumları ile aglütine olurlar. Bu non spesifik özelliğinden, *Riketsiya*'ların enfeksiyon tanısında yararlanır. Bu antijenlerin kullanıldığı tüp aglütinasyonu

geliştirilmiştir. Bu aglütinasyona Weil-Felix aglütinasyonu denilir. Ancak, bu aglütinasyon spesifik tanı yöntemlerinin hızla geliştiği günümüzde kullanılmamaktadır (Ustaçelebi, 1999; Çopur ve ark. 2013).

2.4. Hastane Kökenli Gram Negatif Basillerde Direnç

Gram negatif basiller nozokomiyal patojenler arasında ön sırada gelmektedirler. Çeşitli mekanizmalar ile yeni geliştirilen birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanmışlardır. Hastane kökenli *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarının yüksek oranda ESBL üretmesi, üçüncü kuşak sefalosporinlerin ve monobaktamların kullanımını kısıtlamaktadır. Ayrıca, *Pseudomonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia* ve *P. vulgaris* suşları tarafından kromozomal kökenli, indüklenebilir beta-laktamazlar da üretilmektedir. Bunlar, beta-laktam ajanların varlığında yapıldıklarından, *in vitro* olarak saptanmalarında sorun oluşabilmektedir. Bunlara ek olarak, özellikle yoğun bakım hastalarında kinolon dirençli *Acinetobacter* türleri ile karbapenem dirençli *S. maltophilia* suşları ile gelişen enfeksiyonların sıklığının arttığı da izlenmektedir (Ustaçelebi, 1999; Escudero ve ark. 2014).

2.5. Direnç Yayılımının Sınırlandırılması İçin Alınması Gereken Önlemler

Antibiyotiklerin dikkatli kullanımı ilk kural olmasına karşın, uyulması en zor olan kuraldır. Bu yüzden, bazı enfeksiyonların tedavisinde son seçenek olan antibiyotiklerin yaygın kullanımı engellenmelidir. Uygun olmayan dozlarda ve gereksiz antibiyotik kullanımından da kaçınılmalıdır. Besi hayvanlarında antibiyotik kullanımının kontrol edilmesi de gereklidir. Hastane ve toplumda, direnç gelişimini izleyebilmek için, daha iyi sürveyans sistemleri geliştirilmelidir. Dirençli bakterilerin klonal yayılımını engelleyecek önlemler uygulanmalıdır. Antibiyotik tedavisi esnasında, doku ya da kan düzeylerinin yetersiz olmasını önleyecek, hasta uyumunu arttıracak stratejilerin geliştirilmesi gereklidir. Örneğin, yarı ömrü daha uzun, bu nedenle günde bir kez uygulanabilen bir ajan, hasta uyumunu arttırabilmektedir. Antimikrobiyal ajanlar için yeni hedeflerin belirlenmesi, yeni ajanlar geliştirilmesi için araştırmalar yapılmalıdır (Ustaçelebi, 1999).

2.6. Antimikrobiyal Tedaviyi Etkileyen Faktörler

Öncelikle enfeksiyon etkeni tanımlanmalı ya da en azından bulgular değerlendirilerek tahmin edilebilmelidir. Enfeksiyon etkeninin antibiyotik duyarlılığı (*in vitro* aktivite) bilinmelidir. İlacın *in vivo* aktivitesini etkileyecek konak faktörleri, enfeksiyonun yeri, ilaca ait farmakokinetik özellikler düşünülmelidir (Ustaçelebi, 1999).

2.6.1. Antibiyotiklerin *in vitro* Aktivitesi

Antimikrobiyal ajanın etken mikroorganizma üzerine *in vitro* aktivitesi, tedavi seçiminde göz önüne alınması gereken özelliklerden biridir. *In vitro* antimikrobiyal etkinliğin ölçülme nedenleri;

- Çözeltideki antimikrobiyal ilaç gücünün ölçümü,
- Vücut sıvıları ve dokularındaki ilaç yoğunluğunun belirlenmesi,
- Mikroorganizmanın duyarlı olduğu ilaç yoğunluğunun saptanması (Ustaçelebi, 1999).

Bir antibiyotiğin antimikrobiyal aktivitesinin saptanması için uygulanan *in vitro* işlemler duyarlılık testleri olarak adlandırılırlar. Duyarlılık testleri, klinik açıdan önemli, hızlı üreyen aerop ve fakültatif anaerop bakterilerin sağaltımında uygulanacak antibakteriyel ajana duyarlılığın öngörülemediği durumlarda yapılmalıdır. Yani, mikroorganizmanın sağaltımında, ilk seçenek olan antibiyotiğe duyarlı olduğu biliniyorsa test uygulanması gerekmez. Örneğin; *Streptococcus pyogenes* suşlarının tümü penisiline duyarlı olduğundan, bu antibiyotiğe duyarlılığın *in vitro* testlerle değerlendirilmesi gereksizdir. Ancak, aşırı duyarlılık gibi bir nedenle penisilin kullanılmıyorsa, direnç bulunabilmesi nedeniyle ikinci seçenek olan eritromisine karşı duyarlılık saptanması uygun olur. Normal florada bulunan veya kontaminant olduğu düşünülen bir bakteri üretildiğinde de genellikle duyarlılık testi uygulanmaz. Bu durumdaki ayrıcalık immün sistemi baskılanmış hastalardır. Bu kişilerde, flora bakterileri ve kontaminant mikroorganizmalar da etken olabileceğinden duyarlılık testleri uygulanmalıdır. Bunlar dışında duyarlılık testleri, epidemiyolojik çalışmalar ve yeni antimikrobiyal ajanların incelenmesi amacıyla da kullanılabilir (Ustaçelebi, 1999).

Anaerop bakteriler için duyarlılık testleri olası ise özel merkezlerde ve belirli durumlarda uygulanmalıdır; yeni geliştirilen ilaçlara duyarlılık özelliklerinin incelenmesi, belirli bir merkezdeki duyarlılık özelliklerinin izlenmesi ve osteomyelit, beyin apsesi, tekrarlayan bakteriyemi, sağaltıma yanıtızsızlık gibi özel klinik tablolarda duyarlılığın belirlenmesi gibi. Bu grup bakteriler için agar dilüsyon ve mikrodilüsyon yöntemleri geliştirilmiştir. Anaerop bakterilerin büyük çoğunluğunun halen beta-laktam-beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları, kloramfenikol, karbapenemler ve metronidazole duyarlı olduğu bilinmektedir. Tüm dünyada AIDS epidemisine paralel olarak, dirençli *M. tuberculosis* sıklığında artış olması nedeniyle, bu tür için duyarlılık testi uygulama kriterleri değiştirilmiştir. Günümüzde, hastadan üretilen ilk izolatın duyarlılık özelliklerinin belirlenmesi ve üç aylık sağaltıma rağmen kültürde üreme devam ediyorsa, testlerin tekrarları önerilmektedir. Antibiyotiklere karşı duyarlılık birçok yöntem ile saptanabilmektedir ve bunlar iki genel başlık altında toplanırlar; fenotipik ve genotipik yöntemler (Ustaçelebi, 1999).

2.6.1.1. Fenotipik Yöntemler

Genel olarak, inhibitör aktivite ile ilgili testler ve baterisidal aktivite ile ilgili testler olmak üzere ikiye ayrılır. İnhibitör aktivite ile ilgili testler; katı ya da sıvı besiyerlerinde sulandırım (dilüsyon) yöntemleri, disk difüzyon yöntemi, E test ve antibiyotikleri inaktive eden enzimlerin saptanması gibi testleri içine almaktadır (Ustaçelebi, 1999).

Sulandırım yöntemleri, katı ya da sıvı besiyerinde uygulanabilir. *In vitro* duyarlılık testlerinden “altın standart” olarak kabul edilmektedir. Standart sayıda bir inokulum, iki katlı dilüsyonlar şeklinde değişen yoğunluklarda antimikrobiyal ajan ile karıştırılır. İnkübasyon süresi (18 saat) sonunda gözle görülür üremeyi engelleyen en düşük antibiyotik yoğunluğu tespit edilir. Bu minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) olarak adlandırılır ve mg/ml şeklinde ifade edilir. MİK değerinin duyarlılığı mı yoksa direnci mi temsil ettiğini belirlemek amacıyla, bulunan konsantrasyon duyarlılık sınırı adı verilen bir değer ile karşılaştırılır. MİK, bu sınırdan düşük ise, mikroorganizma söz konusu ajana karşı “duyarlı” olarak değerlendirilir. Duyarlılık sınırı, sağaltım sırasında ulaşılan serum düzeyleri ile duyarlılık özelliği kesin olarak bilinen bakterilerin, MİK değerleri göz önüne alınarak belirlenmektedir. Her antimikrobiyal ajan için ayrı bir sınır

değeri söz konusudur. Genel olarak sağaltıma başlanabilmesi için MİK değerinin serum düzeyine kıyasla 4-16 kat düşük olması istenmektedir. Sulandırım temeline dayanan testler kantitatif sonuç verdiklerinden dolayı tercih edilmektedirler. Ancak teknik zorlukları nedeniyle diğer yöntemler de geliştirilmiştir. Günümüzde MİK değerlerini otomatik olarak saptayabilen sistemler bulunmaktadır. Ancak otomatize sistemlerde kullanılan inokulum yoğunluğunun az olması nedeniyle, bazı silik direnç mekanizmaları (örneğin ESBL üretimi veya heterorezistans vb) atlanabilmektedir. Sıvı besiyerinde sulandırım yöntemleri, tüpte uygulanıyorsa makro dilüsyon; mikrotitrasyon plaklarında, küçük hacim kullanılarak uygulanıyorsa mikrodilüsyon olarak isimlendirilir (Ustaçelebi, 1999).

Disk difüzyon yönteminde, belli bir miktar antimikrobiyal ajan içeren kağıt diskler, test mikroorganizması kullanılarak hazırlanan standart süspansiyonun yayıldığı agar plakları yüzeyine yerleştirilir. Diskteki antibiyotik agar içerisine yayılır ve bakteriyeye etkili olduğu düzeylerde üremeyi engeller. Sonuç olarak, disk çevresinde bakterilerin üremediği dairesel bir inhibisyon alanı meydana gelir. Bu alanın çapı ölçülerek her antibiyotik için farklı olabilen, duyarlılık sınırı değerleri ile karşılaştırılır. İnhibisyon alanının büyüklüğüne göre, “duyarlı”, “orta duyarlı” ya da “dirençli” şeklinde duyarlılık kategorisi belirlenir. Bunlarla ilgili sınır değerleri, her antimikrobiyal ajan için, MİK ve ulaşılabilir serum düzeyleri göz önüne alınarak saptanır. Disk difüzyon yöntemi, sulandırım temelli yöntemlere kıyasla daha kolay ve ucuzdur. Bu yüzden, rutin laboratuvar uygulamalarında sık olarak kullanılmaktadır. Gerek sulandırım yöntemleri ve gerekse disk difüzyon testi, uluslararası standartlara göre ve kalite kontrolü yapılarak uygulanmalıdır (Ustaçelebi, 1999).

E testi, yayılım temeline dayanan ancak, disk yerine plastik çubuklar üzerinde bulunan antimikrobiyal ajanın MİK değerinin saptanabildiği antimikrobiyal duyarlılık yöntemidir. Çubuğun bir tarafında ilaç, belirli ve sürekli bir konsantrasyon değişimi olacak şekilde ve kurutulmuş şekilde bulunmaktadır. Diğer yüzünde de antimikrobiyal ajanın çubuğun ucundan olan uzaklığa karşılık gelen konsantrasyonları cetvel gibi sıralanmıştır. Standart bakteri inokulumu katı ve test için uygun besiyeri yüzeyine yayıldıktan sonra, çubuklar yerleştirilir. İnkübasyon süresi sonunda, elips şeklindeki inhibisyon alanını çubuğu kestiği konsantrasyon, MİK değeri olarak belirlenir. Özellikle *H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *N. gonorrhoeae* gibi güç üreyen bakteri türlerinin ve

bazı anaerop bakterilerin MİK değerlerinin saptanmasında bu yöntem önerilmektedir (Ustaçelebi, 1999).

Antimikrobiyal ajanları inaktive eden enzimlerin saptanmasına, beta-laktamaz ve kloramfenikol asetil transferaz aktivitesinin saptandığı tarama testleri örnek olarak verilebilir (Ustaçelebi, 1999).

Bakterisidal aktivite ile ilgili testler;

- Bir mikroorganizmayı öldürmek için gereken minimal konsantrasyonun (Minimal Bakterisidal Konsantrasyon; MBK),
- İlaç varlığında, zamana bağlı mikroorganizma ölüm hızının,
- Mikroorganizmayı öldürmek için gerekli hasta serumu titresinin (serum bakterisidal konsantrasyon) saptanması ile belirlenir.

Bakterisidal testler, özellikle tolerans saptanması ya da endokardit, osteomyelit, septik artrit, ampiyem, bakteriyemi gibi klinik tablolarda antimikrobiyal tedaviye hasta yanıtının incelenmesinde kullanılmaktadır. Tolerans, MBK ve MİK değerleri arasında, 16 kattan fazla fark bulunması şeklinde tanımlanır. Özellikle stafilokok türlerinde beta-laktam ajan varlığında görülebilen bir olaydır. Özellikle metallo-betalaktamazların tespiti için E test ya da disk sinerji testleri ve bu enzimlerin etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) ya da 2-merkaptopropiyonik asit (2-MPA) gibi metal şelatörler varlığında inhibe olma özelliklerinden faydalanılarak fenotipik olarak tanımlamaları yapılmaktadır (Ustaçelebi, 1999; Ulusoy ve ark. 2011).

2.6.1.2. Genotipik Yöntemler

Doğrudan direnç genlerinin saptanabildiği yöntemlerdir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda birçok antibiyotik direnç geni tanımlanmıştır. Bu genlerin ekspresyonu sonucunda, klinik sağaltımda kullanılan tüm antibiyotiklere direnç gelişebilmektedir. Genotipik yöntemler, direnç özelliklerinin kısa sürede saptanmasına olanak verir ve böylelikle hızla ve doğru tedavi başlanması, taşıyıcıların tanımlanması ve sağaltımı söz konusu olmaktadır. Genotipik yöntemlerin günümüzde çoğunlukla araştırma amacıyla uygulanmasına karşın, yakın bir gelecekte özellikle *M. tuberculosis* suşlarının rifampin (*rboB* geni) ve izoniyazid (*inhA* ve *katG* genleri), *S. aureus* suşlarının metisilin (*mecA* geni) ve *H. influenzae* suşlarının ampisilin (*bla_{TEM}* ve *bla_{ROB}*) direnci ile ilgili genetik

değişimlerin saptanmasında tercih edilen yöntemler olacağı belirtilmektedir (Ustaçelebi, 1999; Temiz ve ark. 2008).

2.7. İlaçların Konak-Mikroorganizma İlişkisi Üzerine Etkileri

Antimikrobiyal tedavi, konak-mikroorganizma ilişkisini değiştirebilmektedir. Bunlardan bazıları; doku yanıtının değiştirilmesi, lokal ve sistemik yangısal reaksiyon, antimikrobiyal ilaç-immün sistem etkileşimi, normal mikrobiyal floranın değişmesidir (Ustaçelebi, 1999).

2.8. Sinerji Testleri

Kombine olarak denenen çeşitli antibiyotiklerin etkileşimlerinin anlaşılabilmesi için uygulanan tüm *in vitro* duyarlılık işlemlerine verilen addır. Sinerji, tek başına bir antibiyotiğin MİK değerine oranla, aynı antibiyotiğin kombinasyon MİK değerinde en az dört kat düşüş olması anlamına gelmektedir (Ustaçelebi, 1999).

2.9. İntegronlar

Genlerin farklı kromozomal bölgeler arasında hareket edebileceği ilk kez, 1940'larda McClintock tarafından gösterilmiştir. Yaklaşık 30 yıl sonrasında da bakterilerde transpozal elemanların keşfi ile hareketli genetik elemanların varlığı bilim insanları tarafından kabul edilmiştir. Genom içerisinde, gen düzeni değişmeksizin ortaya çıkan kromozomal çiftler arasındaki genlerin yeniden düzenlenmesi homolog rekombinasyon olarak adlandırılır ve dizi homolojisi gösteren herhangi bir bölgede meydana gelmektedir. Bu etkileşimi sağlayan başlıca unsur, özgül DNA hedef dizilerini tanıyan proteinlerdir (Köseoğlu, 2004; Heir ve ark. 2004).

Bölgeye özgü rekombinasyon (site specific recombination) bu kavramdan daha farklıdır; bunun için prototip olarak lambda bakteriyofajı gösterilmektedir. Lambda fajı, *E. coli*'yi enfekte ettiğinde, ya hücreyi lizise götüren bir replikasyon gerçekleşir ya da bakteriyel kromozoma girerek profaj haline geçer. Bu olay lizojeni olarak adlandırılır ve uygun koşullarda litik enfeksiyona dönüşebilir. DNA'ya eklenme sırasında ters dönerek lambda DNA'sı bakteri kromozomundan ayrılır ve litik viral replikasyon başlar.

Burada, lambda DNA'sının eklenmesi ve ayrılması viral ve konak hücre DNA dizileri arasında yer alan bölgeye özgü rekombinasyon olarak tanımlanmaktadır (Köseoğlu, 2004; Kor ve ark. 2013; Baylan ve Erdoğan, 2017).

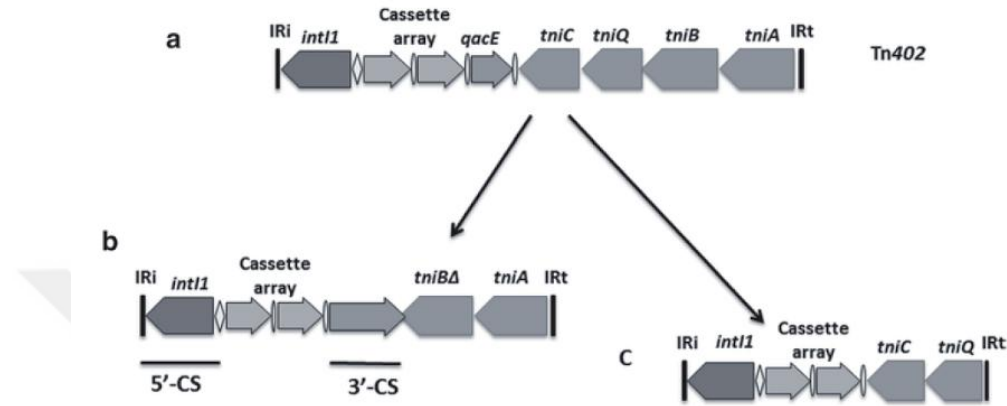
E. coli DNA'sı ve lambda DNA'sı tutunma bölgeleri adı verilen özgül bölgelerde birleşirler. *E. coli*'de *attB*, lambda fajında ise *attP* birleşme bölgeleri bulunmaktadır. Bunlar, sırasıyla 25 ve 240 nükleotit uzunluğundadır. Bu işlem, bir lambda proteini olan integras (*int*) tarafından gerçekleştirilmekte olup, bu enzim özgül olarak *attP* ve *attB*'ye bağlanmaktadır. *Int*, ilk olarak *attP* ile bağlanır ve *attP* DNA'sı *int* proteini etrafında katlanıp paketlenildikten sonra oluşan *int-attP* kompleksi *attB*'ye bağlanır. Daha sonra faj ve bakteri, *attB* ve *attP* çevresinde yer alan, 15 nükleotitlik bir çekirdek dizisi içerisinde zincirlerinde yer değişikliği yapar. *Int* proteini, bu bölgede zincir değişikliği yaparak, kırılan zincirlerin tekrar bağlanmasını sağlayan bir rekombinaz görevi görür. Bölgeye özgü rekombinasyon, yalnız bakteri-konak ilişkisinde değil, aynı zamanda hücre genomunda yer alan programlanmış gen düzenlemelerinde de görülür (Köseoğlu, 2004; Gillings ve ark. 2008; Kor ve ark. 2013).

2.9.1. İntegronların Sınıflandırılması

İlk kez Stokes ve Hall (1989) tarafından tanımlanmıştır. Direnç integronları ve süper-integronlar olmak üzere iki ana gruba ayrılırlar. Direnç integronları, antibiyotik ve dezenfektanlara karşı direnci kodlayan gen kasetlerini taşıyan, kromozom ya da plazmidler üzerinde bulunabilir. Direnç integronları sınıf 1, 2 ve 3 olmak üzere üç sınıfa ayrılır. Daha önce, sınıf 4 olarak adlandırılan integron ise *Vibrio cholerae* süper-integronu olarak yeniden adlandırılmıştır. Yani, süper-integronlar ilk kez *V. cholerae*'da tespit edilmiştir (Mazel ve ark. 1998; Collis ve ark. 2001; Deng ve ark. 2015; Escudero ve ark. 2015). Değişik fonksiyonlar gösteren, gen kasetlerini taşıyan kromozomal yerleşimli büyük integronlar, süper-integronlar grubunda yer almaktadırlar (Köseoğlu, 2004; Fluit ve Schmitz, 2004; Coleman ve Holmes, 2005; Budak ve ark. 2012).

Her integron sınıfında farklı bir *int* geni bulunmaktadır. Gram negatif bakterilerin %50'den fazlasının sınıf 1 integron taşıdığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Gophna, 2013). *Enterobacteriaceae* ailesinin üyeleri içindeki klinik suşlarda sınıf 1 integronlar yaygındır (Koczura ve ark. 2014). Sınıf 1 integronların tanımlandığı birçok Gram negatif bakteri türü arasında; *Acinetobacter*, *Aeromonas*,

Alcaligenes, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Vibrio* bulunmaktadır. Ayrıca, Gram pozitif bakterilerde de sınıf 1 integronlar tespit edilmiştir. Klinik örneklerden izole edilen sınıf 1 integronun yaygın formları Şekil 2.2’de gösterilmiştir (Köseoğlu , 2004; Gophna, 2013).



Şekil 2. 2. Klinik örneklerden izole edilen sınıf 1 integronun yaygın formları.

(Elmas şekli *attI1* bölgesini, oval şekil ise *attC* bölgesini göstermektedir. **a.** İntegron, *tni* transpozisyon bölgesinin tamamını içeren Tn402 (Tn5090 olarak da bilinir) içinde bulunur. Transpozon/integron 25 bp’lik ters tekrarlar (inverted repeats) ile sınırlıdır (IRi, integraz sonu; IRt, *tni* sonu). **b.** Sınıf 1 integronun en tipik genel yapısı, *tni*’nin kısmen kaybına neden olan 3’-CS’de bulunur. 3’-CS *qacEΔ1*, *sulI* ve *orf5* genlerini içermektedir. **c.** Bazı klinik izolatlarda ikinci bir işlevsiz Tn402-benzeri transpozon sınıf 1 integron ile bağlıdır (IRi, ters tekrar sonu; IRt, ters tekrar transpozon sonu)) (Gophna’dan, 2013).

Sınıf 1 integronlar, Tn21 gibi transpozonlar üzerinde tespit edilen ve prototip sayılan integronlardır (Daly ve Fanning, 2004; Biskri ve ark. 2005; Dakic ve ark. 2007). Yapısında bir 5’- ve 3’- korunmuş segment (5’-CS ve 3’-CS) ve bir de değişken bölge bulunur; 5’- korunmuş segment *intI* geni (integraz) ve insert olan gen/genlerin ekspresyonu için kullanılan bir promotor bölgeden meydana gelmektedir. İntegraz geni, integrondaki gen kasetlerinin rekombinasyonunu katalize eder (Collis ve Hall, 1995; Ploy ve ark. 1998, Barlow ve ark. 2004; Cagle ve ark. 2011). 3’- korunmuş segment ise, dörtlü amonyum bileşiklerine (örn: benzalkonium klorid) direnç geni (antiseptik direnç geni) olan *qacEΔ1* ve sulfonamidlere direnç sağlayan *sulI* geni içerir (Şekil 2.2). İki korunmuş bölge arasında bulunan değişken bölge, antibiyotik direnç gen kasetlerinin girmesi için rekombinasyon yerini oluşturur ve rekombinasyon mekanizmasına katılan, 59 bp olarak adlandırılan *attC* geni ihtiva eder (Poole, 2002; Dale ve Park, 2003; Biskri ve Mazel, 2003; Fluit ve Schmitz, 2004; Bouvier ve ark. 2005; Çolakoğlu ve ark. 2010; Cagle ve ark. 2011; Larouche ve Roy, 2011). İntegronun değişken bölgesi bir ya da daha fazla antibiyotik direnç geni taşımaktadır (Collis ve Hall, 1992). Sınıf 1 integronun

en yaygın formu Şekil 2.2.b'de gösterilmiştir. Bu genlerin, ayrı birer mobil gen kasetlerinin birer parçası olduğu düşünülmektedir (Gophna, 2013; Kor ve ark. 2013).

Tn7 transpozon ailesinde yer alan ve *Acinetobacter*, *Shigella* ve *Salmonella* türlerinde tespit edilen sınıf 2 integronlar dihidrofolat redüktaz gen kaseti içermektedir. Sırasıyla trimetoprim, streptotrisin ve streptomisin/spektinomisine direnç sağlayan *dfrA1*, *sat2*, *aadA1* gibi gen kasetlerini taşıyan integronlardır. Sınıf 2 integronlar, sınıf 1 integronlara göre daha az yayılım gösterirler (Köseoğlu, 2004; Çolakoğlu ve ark. 2010; Gophna, 2013; Mengeloğlu ve ark. 2014).

Sınıf 3 integronlar ise, ilk kez 1993'te Japonya'da karbapenem dirençli *S. marcescens* suşundan izole edilmiş ve *bla_{IMP}* gen kaseti ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca, *P. aeruginosa*, *Alcaligenes xylosoxidans*, *P. putida* ve *K. pneumoniae* izolatlarında gösterilmiştir (Köseoğlu, 2004; Gophna, 2013; Deng ve ark. 2015).

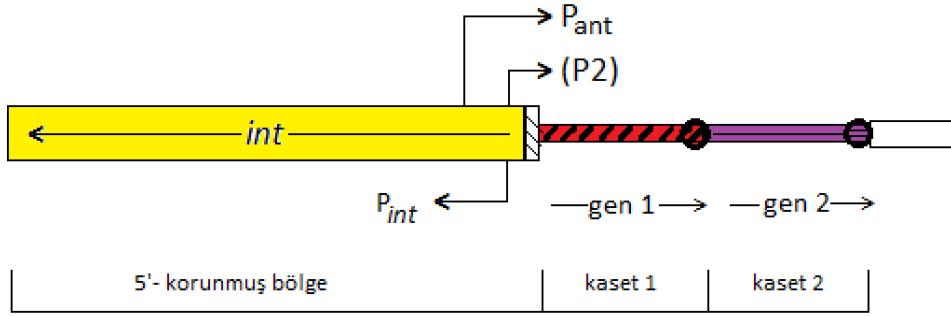
Daha sonraki çalışmalarda da integraz gen dizilerine bakılarak, 6 tip integron tanımlanmıştır. Ancak, Gram negatif bakterilerin klinik izolatlarında en çok sınıf 1 integronlara rastlanmıştır (Freijo ve ark. 1998; Dolapçı ve ark. 2010). İntegronlar, *Enterobacteriaceae* ve diğer Gram negatif bakterilerde tanımlanmış olmakla beraber, bir Gram pozitif bakteri olan *Corynebacterium glutamicum*'da ve ayrıca *Mycobacterium fortuitum*'da da bildirilmiştir (Köseoğlu, 2004).

2.9.2. İntegronların Yapısı ve Ekspresyonu

Kendi kendilerine hareket etme yetenekleri olan integronların, bakteriyel genom içerisinde gen kasetlerini transpozon ya da plazmidler aracılığı ile aktarabilme yetenekleri de bulunmaktadır. Sınıf 1 integronlar içerisinde 60'tan fazla farklı antibiyotik direnç geni tespit edilmiştir. Bir integron içinde, beş farklı gen kaseti yer alabilmekte ve çoklu ilaç direncine neden olabilmektedir. Sıklıkla aynı bakteri hücresi içinde birden fazla integron bulunabilmektedir. Bu da, gen kasetlerinin çok yüksek oranda aktarımının olduğunu bir kanıtıdır (Köseoğlu, 2004; Cambray ve ark. 2010; Gophna, 2013; Kargar ve ark. 2014).

İntegronlar, 5' korunmuş bölgede (CS) bulunan, gen kasetlerinin eklenip çıkarılmasını sağlayan integraz ailesine bağlı bölgeye özgü rekombinaz enzimi kodlayan *int* geni ve buna komşu olarak bulunan primer rekombinasyon bölgesi olan *attI* olmak üzere iki ana öğeden oluşur. Şekil 2.3'te integronun yapısı basitçe verilmiştir

(Ploy ve ark. 1998; Barlow ve ark. 2004; Köseoğlu, 2004; Fluit ve Schmitz, 2004; Yan ve ark. 2010; Çopur ve ark. 2013).



Şekil 2. 3. İntegronun yapısı.

(*int*; integraz geni, P_{ant} ; tüm integronlarda bulunan ortak promotor, P_2 ; bazı integronlarda bulunan ikinci promotor, P_{int} ; integraz geninin promotoru. Gen 1 ve gen 2; eklenen gen kasetleri. İşaretli halkalar; her bir gen kasetinin sonunda bulunan 59 baz çiftlik eleman. İşaretli dikdörtgen; *attI*)

İntegron ekspresyonu, 5'-CS korunmuş bölgesinde bulunan promotor P_{ANT} üzerinde gerçekleşmektedir. Sınıf 1 integronlar, iki ayrı promotor olan P_1 (P_{ANT}) ve P_2 'yi içermektedir. P_2 genellikle etkisiz bir promotordur. Beş farklı P_1 , iki farklı P_2 promotor bölgesi bulunmaktadır. Bir gen kasetinin integron içinde bulunduğu yer ile direnç düzeyi arasında yakın bir ilişki olduğu bilinmektedir. Eğer bir gen kaseti 5'-CS korunmuş bölgesinin hemen arkasında yer alıyorsa, gen kaseti o derece yüksek oranda direnç paterni göstermektedir (Collis ve Hall, 1995; Köseoğlu, 2004; Cagle ve ark. 2011).

Tablo 2. 10. Yeni tanımlanan sınıf 1 integron gen kasetleri ve kodladıkları proteinler (Köseoğlu'ndan, 2004)

| Gen Kaseti | Kodlanan Protein |
|--|--|
| Beta-laktam antibiyotiklere direnç <i>bla</i> _{CEF-1} <i>bla</i> _{GES-1} , <i>bla</i> _{GES-2} <i>bla</i> _{IBC-1} , <i>bla</i> _{IBC-2} <i>bla</i> _{IMP-1} , <i>bla</i> _{IMP-8} <i>bla</i> _{VEB-1} , <i>bla</i> _{VEB-3} <i>bla</i> _{VIM-1} , <i>bla</i> _{VIM-2} <i>oxa-10</i> <i>oxa-11</i> , <i>oxa-13</i> <i>oxa-15</i> , <i>oxa-19</i> <i>oxa-28</i> , <i>oxa-31</i> , <i>oxa-32</i> | ESBL ESBL ESBL Karbapenemaz ESBL Karbapenemaz ESBL asetil transferaz ESBL ESBL ESBL |
| Aminoglikozidlere direnç <i>addA4</i> , <i>addA5</i> , <i>addA6</i> , <i>addA8</i> , <i>addA10</i> <i>aac(3)Ib/acc(6')-Ild</i> <i>aac29a</i> , <i>aac29b</i> <i>aacA1b/orfG</i> <i>aphA15</i> | Adenil transferaz Asetil transferaz Asetil transferaz Asetil transferaz Fosfo transferaz |
| Kloramfenikol direnci <i>cmlA4</i> , <i>cmlA5</i> | Atım pompası |
| Rifampisin direnci <i>arr-2</i> | ADP-ribozilasyon |
| Trimetoprim direnci <i>dfr13</i> , <i>dfr17</i> , <i>dfr17A</i> | Dihidrofolat redüktaz |
| Kinolon direnci <i>qur</i> | Bilinmiyor |

2.9.3. Gen Kasetleri

Serbest çembersel moleküler yapıda bulunurlar. Kökenleri bilinmemektedir. Bir integron içine özellikle *attI* rekombinasyon bölgesinde *intI* geninin 104 bp yukarı akımında girmektedir. İntegrone eklenen gen kasetleri, kendi promotor bölgelerine sahip olmaları nedeniyle, ortak promotor bölgeden eksprese olurlar. Gen kasetlerinde, promotor bölgenin bulunmaması, bunların ters transkripsiyon ile mRNA'dan kaynaklandıklarını düşündürmektedir. İntegraz enzimi, 3'-CS korunmuş bölgesinde bölgeye özgü rekombinasyondan sorumlu 59 bp'lik bir dizi sayesinde, bu bölge içerisine yeni gen kasetleri eklemektedir. Böylece yabancı genler integron içine

girmektedir. Eklenen her bir genin kendine özgü 59 bp'lik eklenme dizisi bulunmaktadır. Aynı zamanda, bu bölgenin RNA yapımını sonlandırma özelliği de bulunmaktadır. Bir gen kasetinin promotor bölgeye yakınlığı, o denli fazla ürün ortaya çıkarmasına neden olmaktadır (Collis ve Hall, 1992; Collis ve ark. 2001; Barlow ve ark. 2004; Köseoğlu, 2004; Yan ve ark. 2010).

Sınıf 1 integronlarda bulunan antibiyotik direnç genleri, beta-laktam, aminoglikozid, kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim, sulfonamid, rifampisin, antiseptik ve dezenfektanlara karşı dirençten sorumludur. Tablo 2.10'da sınıf 1 integronlara ait yeni tanımlanan gen kasetlerinden bazıları verilmiştir. Kloramfenikole direnç asetil transferaz, adenil transferaz ve fosfo transferazı kodlayan gen kasetlerinden biri ya da atım pompasını kodlayan üç gen kasetinden biri tarafından gerçekleştirilmektedir. Ayrıca bakterilerde bulunan *cml* direnç genleri kloramfenikole dirençten sorumludur (Mengeloğlu ve ark. 2014). İntegrona bağlı, beta-laktamaz kodlayan birçok gen kaseti de tanımlanmıştır (Köseoğlu, 2004).

2.9.4. İntegronların Epidemiyolojisi ve Klinik Önemi

İntegronlar, özellikle Gram negatif bakterilerde antibiyotik direncinin yayılımından sorumlu olan elemanlardır. Farklı Gram negatif izolatlar arasında yaygın olmaları ve birçok direnç gen kasetlerine ekleme, çıkarma ve yerlerini değiştirme yeteneklerinin bulunması, hastane ortamındaki bakterilerde çoklu ilaç direncinin yayılımına neden olmaktadır. Bu durum, birçok geniş spektrumlu antibiyotiğin kullanımını hem hastane hem de toplum bazında kısıtlayarak, direnç problemi ile başa çıkmayı zorlaştırmaktadır (Reyes ve ark. 2003; Köseoğlu, 2004; Hartl ve Jones, 2005; Kargar ve ark. 2014).

Antibiyotik direnç genlerinin horizontal yolla aktarımı, klinik bakteri izolatlarında çoklu antibiyotik direncinin hızla yayılımına neden olmaktadır. Hareketli gen kaseti, birçok mekanizma ile horizontal yayılıma neden olmaktadır. İntegrona ait integras tarafından gen kasetinin alınması, integron tarafından taşınması, daha büyük transpozonlara yayılması ve integronları içeren konjugatif plazmidlerin farklı bakteri türleri arasında hareketi buna örnek olarak verilebilir. Bu yüzden, klinik Gram negatif bakteri izolatları arasında, integron içinde gen kasetlerine ait antibiyotik direnç genlerinin taşınması beklenen bir sonuçtur. Bu, fenotipik olarak duyarlı suşların,

integrona bağılı rekombinasyon yoluyla klinikte kullanılan antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde genetik bir kaynak olmalarını sağlamaktadır (Freijo ve ark. 1998; Barlow ve ark. 2004; Heir ve ark. 2004; Köseoğlu, 2004; Çolakoğlu ve ark. 2010; Kor ve ark. 2013).

İntegronların, hastane ortamındaki kaynaklarının neler olduğu tam olarak bilinmemektedir. Ancak, toplumun potansiyel bir kaynak olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, çiftlik hayvanlarından izole edilen bakterilerde tespit edilen sınıf 1 integronlar ile antibiyotik direnci arasında ilişki olduğu da gösterilmiştir. Sınıf 1 integronlar, sığır, tavuk, balık ve köpeklerden izole edilen bakterilerde de saptanmış ve bunun yanı sıra çevresel kaynaklarda da tespit edilmiştir (Köseoğlu, 2004; Mokracka ve ark. 2012).

Bölgeye özgü rekombinasyon mekanizması ile antimikrobiyal direnç genlerinin kendilerine entegre olmalarını sağlayan ve doğal ekspresyon vektörleri olan integronların yaygın olarak bulunması, türler arasında horizontal geçişlerin özellikle plazmid ve transpozonlar aracılığıyla gerçekleşmesi, birinci derecede kullanımda olan antibiyotiklerin tedavideki etkinliğini azaltacaktır. Plazmid aracılı beta-laktamazlarda bulunan TEM-1 geni (*bla_{TEM-1}*) Tn3 transpozonu ile taşınır ve *Enterobacteriaceae* ailesindeki türlere de yayılmıştır (Reyes ve ark. 2003; Barlow ve ark. 2004; Köseoğlu, 2004; Çolakoğlu ve ark. 2010).

2.10. Hastane Enfeksiyonları Kontrolünde Moleküler Mikrobiyoloji Yöntemlerinin Önemi

Moleküler tanı yöntemleri, mikrobiyoloji alanında gün geçtikçe gelişmekte olan teknolojinin sunduğu en önemli buluşlardan biridir. Hastaneye yatan hastalar, altta yatan sebeplerden dolayı enfeksiyonlara eğilim göstermektedirler. Hastane ortamı, dirençli mikroorganizmaların enfeksiyon oluşturmaları için zemin hazırlamaktadır. Dünyada her yıl 17 milyondan fazla insan, çoğu bakteriyel kökenli olan enfeksiyon hastalıklarından dolayı hayatını kaybetmektedir. Ayrıca, nozokomiyal enfeksiyonlar, hastane giderlerini de önemli ölçüde artırmaktadır. Bu yüzden, nozokomiyal enfeksiyonlarda korunma ve kontrol oldukça önemli bir konudur. Bakteriyel enfeksiyonların kontrolü, klinik mikrobiyoloji laboratuvarında etiyolojik ajanın saptanma yeteneğine bağlıdır (Çetinkaya ve Ayhan, 2012; Eser, 2012).

Moleküler yöntemler; bakteri topluluklarının yapılarını ve çeşitliliklerini araştırmak, bazen kökenler arasındaki ilişkiyi araştırarak salgınlar hakkında bilgi edinmek (moleküler tiplendirme yöntemleri) için oldukça kıymetli araçlardır. Kültürü yapılabilen ve yapılamayan mikroorganizmalar için kullanılabilen yöntemlerdir. Kültür bağımlı olmayan teknikler, çevresel örneklerden izole edilen nükleik asit ekstraksiyonunu temel alır. Kültür bağımlı yöntemler, mikroorganizmaların saptanmasında ve tanımlanmasında sıkça kullanılmaktadır (Davin ve ark. 1996; Durmaz ve ark. 2007; Doğruöz, 2015).



3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. Gereçler

3.1.1. Çalışma Grubu ve Örnekler

Giresun Prof. Dr. A. İlhan Özdemir Devlet Hastanesi yoğun bakım ünitelerinde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden (balgam, idrar, kan, plevra sıvısı, püy-apse, trakeal aspirat, yara) Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen daha önce izole edilmiş olan ve %10 Gliserollü Mueller Hinton Buyyona alınarak -80°C’de derin dondurucuda (Wisd, Kore) saklanan Gram negatif bakterilere ait örneklerden 73 adet *Enterobacter* ve 53 adet *Proteus* izolatu çalışmaya dahil edilmiştir. Aynı hastadan birden çok izole edilen izolatlardan sadece bir tanesi çalışma kapsamına alınmıştır (Tablo 4.1).

3.1.2. Kullanılan Cihazlar ve Gereçler

Tez çalışması Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında bulunan araç ve gereçler kullanılarak yapılmıştır.

Hassas Terazî: Kimyasal maddelerin tartımında (Precisa, İsviçre) kullanıldı.

Vorteks (Mekanik Karıştırıcı): PCR işlemleri sırasında örneklerin ve PCR komponentlerinin karıştırılması için (Boeco, Almanya) kullanıldı.

Santrifüj: Örneklerin santrifüj edilmesi ve PCR işlemleri sırasında santrifügasyon işleminin gerekli olduğu durumlarda çözelti ve karışımların çöktürülmesi amacıyla (Nüve, Türkiye) kullanıldı.

Etüv: Besiyerlerine ekimleri yapılan bakterilerin inkübasyonu için (JEIO TECH, Kore) kullanıldı.

Otoklav: Besiyerlerinin ve solüsyonların sterilizasyonu için (ALP, Japonya) kullanıldı.

Pastör Fırını: Cam tüplerin sterilizasyonu için (JSR, Kore) kullanıldı.

Steril Laminar Akımlı Güvenlik Kabini: DNA ekstraksiyonu ve PCR’nin steril bir ortamda gerçekleştirilebilmesi için (ESCO, ABD) kullanıldı.

Buzdolabı: Besiyerlerinin, DNA ekstraksiyonunda kullanılan çözeltilerin ve PCR sonucu elde edilen ampliconların saklanması için (Arçelik, Türkiye) kullanıldı.

Otomatik Pipetler: Tek kanallı otomatik pipetler PCR işlemleri sırasında (NICHIRYO, Japonya) kullanıldı.

Thermal Cycler: PCR işlemlerinin yapılmasında programlanabilen üst kapak ısıtmalı thermal cycler cihazları (Bio Rad, ABD; Thermo Fisher Scientific, Almanya) kullanıldı.

Elektroforez Tankı ve Güç Kaynağı: Agaroz jel elektroforez işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla kullanıldı (Wisd, Kore).

Jel Görüntüleme ve Analiz Sistemi: UV translüminatörlü (Bio Rad, ABD) bilgisayarlı jel dökümantasyon sistemi, elde edilen jeldeki bantların görüntülenmesinde kullanıldı.

3.2. Kullanılan Besiyerleri

3.2.1. %5 Kanlı Agar Besiyerinin Hazırlanması

Derin dondurucuda saklanan izolatların canlandırılması için kanlı agar besiyerine ekimleri yapıldı. Dehidrate toz haldeki kanlı agardan (Lab M, İngiltere) 37 gr tartılarak 2 L'lik balon jeye konuldu ve 1 L distile su ilave edilerek iyice karıştırıldı. Balon jenin ağzı uygun bir spanç hazırlanarak kapatıldı. Besiyeri otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika bekletilerek steril edildi. Otoklavlanan besiyeri ısısı yaklaşık 45-50°C'ye geldikten sonra 50 ml'lik enjektör yardımıyla 50 ml kan köpürtmeden yavaşça karıştırılarak ilave edildi. Besiyeri 90 mm çapındaki steril plastik petrilere kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldükten sonra, kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı.

3.2.2. Eosin Methylene Blue Agar'ın (EMB) Hazırlanması

Derin dondurucuda saklanan izolatların canlandırılması için EMB agar besiyerine ekimleri yapıldı. Dehidrate toz haldeki EMB agardan (Merck, Almanya) 36 gr tartılarak 1 L distile su ile 2 L'lik balon jeye iyice karıştırıldı. Balon jenin ağzı uygun bir spanç hazırlanarak kapatıldı. Besiyeri otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika bekletilerek steril edildi. Otoklavlanan besiyerleri 90 mm çapındaki

steril plastik petrilere kalınlığı 4 mm olacak şekilde döküldükten sonra, kullanılmaya kadar +4°C’de buzdolabında saklandı.

3.2.3. Mueller Hinton Buyyon (MHB) Hazırlanması

Bakteri DNA’sının elde edilmesi için MHB besiyerine ekim yapıldı. Dehidrate toz haldeki Mueller Hinton buyyondan (BD, Fransa) 22 gr tartılarak 1 L distile su ile 2 L’lik balon jöjede iyice karıştırıldı. Balon jöjenin ağzı uygun bir spanç hazırlanarak kapatıldı. Besiyeri otoklavda 121°C’de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika bekletilerek steril edildi. Otoklavlanan besiyerleri kullanılmaya kadar +4°C’de buzdolabında saklandı.

1.2.4 % 10 Gliserollü MHB’nin Hazırlanması

İzolatları derin dondurucuda saklamak için MHB besiyeri %10’u gliserol olacak şekilde hazırlandı. Dehidrate toz haldeki Mueller Hinton buyyondan (BD, Fransa), 250 ml’lik erlende 2,2 gr 100 ml distile su ve 10 ml gliserol eklenerek iyice karıştırıldı. Erlenin ağzı uygun bir spanç hazırlanarak kapatıldı. Besiyeri otoklavda 121°C’de 1 atmosfer basınç altında 15 dakika bekletilerek steril edildi. Otoklavlanan besiyerleri 2 ml’lik ependorf tüplerine steril enjektör yardımıyla 1,50 ml kadar konulup ağzı parafilm ile sıkıca kapatıldı. Kullanılmaya kadar +4°C’de buzdolabında saklandı.

3.3. Elektroforez İçin Kullanılan Solüsyonlar

3.3.1. 10X Tris-Asetat EDTA (TAE) Tamponu Stok Solüsyonu

| | |
|----------------------|---------|
| Tris | 4.84 gr |
| Glasiyal asetik asit | 1.14 ml |
| EDTA (0.5 M) | 2.00 ml |

Kimyasallar tartıldıktan sonra distile su ile 1 L’ye tamamlanarak çözüldü ve oda sıcaklığında saklandı.

3.3.2. Elektroforez Yürütme Tamponu (1X TAE)

1X TAE tamponu hazırlamak için, 10X TAE tamponu stok solüsyonundan 100 ml alınarak üzerine 900 ml distile su eklenip dilüe edildi.

3.3.3. Yükleme Tamponu (Loading Buffer)

Ticari olarak hazır 6X yükleme boyası (6XGel Loading Dye Blue, BioLab, #B7021S, İngiltere) kullanıldı.

3.3.4. Etidyum Bromid (EtBr)

Stok EtBr'den alınarak 10 mg/ml'lik olacak şekilde hazırlandı.

3.4. Hasta Örneklerinin Kültürü ve Değerlendirilmesi

Hasta örneklerinin ekimleri uygun besiyerlerine yapıldı. Kan kültürü için örnekler BACTEC kan kültür şişelerine alındı ve otomatik kan kültür cihazına (BACTEC, ABD) konularak 5 gün boyunca takip edildi. Süre sonunda üreme saptanan şişelerden Gram boyama yapılarak kanlı agar ve EMB besiyerlerine pasaj yapıldı. Apse, yara, idrar, balgam, trakeal aspirat ve plevra sıvısı gibi örnekler kanlı agar, EMB besiyerlerine ekim yapılarak etüvde 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası koloni morfolojileri incelenen örneklerin Gram boyamaları yapıldı. Kligler iron agar, sitrat, üre, indol, hareket besiyerlerine ekimler yapılarak identifikasyonları yapıldı.

Gerekli durumlarda otomatize bakteri identifikasyon sistemi (BD Phoenix, ABD) kullanıldı. Bunun için 0,5 Mac Farland bulanıklığına eşdeğer homojen bakteri süspansiyonları hazırlandı. Ertesi gün cihaz tarafından üremeler değerlendirilerek bakterinin tanımlaması yapıldı.

Antibiyotik duyarlılık testlerinin bir kısmı otomatize sistemde (BD Phoenix, ABD) yapılırken bir kısmı da Mueller Hinton agar besiyeri kullanılarak Kirby-Bauer disk difüzyon testi yapıldı. Bunun için de 0,5 Mac Farland bulanıklığına eşdeğer homojen bakteri süspansiyonları hazırlanarak Mueller Hinton agar besiyerine yaygın ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri (BD Phoenix, ABD) sefepim (30 µg), seftazidim (30

µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), gentamisin (10 µg), amikasin (30 µg), levofloksasin (5 µg), siprofloksasin (5 µg), trimetoprim / sulfametoksazol (25 µg), amoksisilin / klavulanik asit (20/10 µg), aztreonam (30 µg), seftriakson (30 µg) diskleri yerleştirildi. Etüvde 37°C'de 18 saatlik inkübasyon sonrası zon çapları ölçülerek CLSI 2014 kriterlerine göre değerlendirildi.

3.5. Moleküler Yöntemle İzolatlarda İntegronların Saptanması

3.5.1. Saklanan İzolatların Canlandırılması ve Saflaştırılması

Derin dondurucudan çıkarılan arşiv izolatları öncelikle -20°C'de bir gün bekletildi. Ertesi günü +4°C'de buzdolabında 6 saat bekletildikten sonra saklama besiyerinden EMB ve kanlı agar besiyerlerine bakterilerin canlandırma pasajları yapıldı. Etüvde plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası saflık kontrolleri yapılan örnekler DNA izolasyon aşamasına alındı.

3.5.2. Kaynatma Yöntemi ile DNA İzolasyonu

DNA ekstraksiyonu ve PCR'nin temiz bir ortamda gerçekleştirilebilmesi için laminar akımlı güvenlik kabininde çalışıldı. Bakteri DNA'sının elde edilmesi için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

- Saflık kontrolleri yapılan izolattan steril öze yardımıyla bir koloni alınarak 3 ml MHB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi.
- İnkübasyondan 24 saat sonra, kültürün 1,5 ml'si ependorf tüpüne alınarak, 10.000 rpm'de 5 dk santrifüj işlemi yapıldı.
- Süpernatant steril pipetle alınarak dışarı atıldı.
- Çökelti üzerine 1000 µl steril distile su eklendi ve yavaşça vortekslendi.
- Tekrar 10.000 rpm'de 1 dk santrifüj işlemi yapıldı.
- Süpernatant tekrar dışarı atıldı ve 1000 µl steril distile su eklenerek vortekslendi.
- Tüpler 100°C'de 10 dk kaynatılarak bakteri hücrelerinin parçalanması sağlandı.
- Ependorf tüpler 13.000 rpm'de 10 dk santrifüj işlemi yapıldı.
- Santrifüj işleminden sonra, içerisinde bakteri DNA'sı bulunan süpernatanttan 500'er µl alınıp yeni bir ependorf tüpe aktararak -20°C'de saklandı.

3.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Çalışması

İzolatların sınıf 1 integron taşıyıcılıkları, 5'-CS ve 3'-CS primerleri kullanılarak ve korunmuş bölgelerle sınırlanmış değişken bölgeleri içeren kromozomal DNA kısmı amplifiye edilerek çalışıldı. Sınıf 2 integron taşıyıcılıkları ise, hep 51 ve hep 74 primerleri kullanılarak çalışıldı (Tablo 3.1).

Tablo 3. 1. PCR çalışmasında kullanılan primer dizileri

| Primer | Hedef | Nükleotid Dizisi | Amplikon Büyüklüğü | Kaynak |
|------------------|--|---|--------------------|-------------------------------|
| 5'-CS 3'-CS | Sınıf 1 integron değişken bölge | 5'-GGCATCCAAGCAGCAAG-3' 5'-AAGCAGACTTGACCTGA-3' | Değişken | (Levesque ve ark. 1995) |
| hep 51 hep 74 | Sınıf 2 integron değişken bölge | 5'-GATGCCATCGCAAGTACGAG-3' 5'-CGGGATCCCGGACGGATGCACGATTTGTA-3' | Değişken | (White ve ark. 2001) |

Sınıf 1 ve sınıf 2 integron değişken bölgelerin taranması amacıyla PCR içeriği her bir örnek için son hacim 50 µl olacak şekilde 30 µl steril distile su, 5 µl 1X PCR Buffer (Fermentas, ABD), 3 µl MgCl₂ (25 mM) (Fermentas, ABD), 2,5 µl dNTP miks (4 mM) (Fermentas, ABD), 2'şer µl primer (25 pmol/µl), 0,5 µl Taq DNA Polimeraz (2.5 U/ µl) (BioLab, İngiltere) ve 5 µl ekstrakte edilen DNA konularak hazırlanmıştır (Tablo 3.2) (Çopur ve ark. 2013).

Tablo 3. 2. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron değişken bölge PCR bileşenleri

| Reaksiyon İçeriği | Miktarı |
|-------------------------------|--------------|
| 1X PCR Buffer | 5 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 3 µl |
| dNTP miks (4 mM) | 2,5 µl |
| İleri Primer (25 pmol/µl) | 2 µl |
| Geri Primer (25 pmol/µl) | 2 µl |
| Taq DNA Polimeraz (2.5 U/ µl) | 0,5 µl |
| DNA | 5 µl |
| Steril distile su | 30 µl |
| Toplam hacim | 50 µl |

3.5.3.1. Amplifikasyon Koşulları

Sınıf 1 integron değişken bölge için; 1 siklus 94°C’de 2 dakikalık denatürasyonun ardından, 35 siklus olarak 94°C’de 45 sn denatürasyon, 56°C’de 1 dk bağlanma, 72°C’de 3 dk uzama ve 1 siklus 72°C’de 5 dk son uzama şeklinde uygulandı (Tablo 3.3). Sınıf 2 integron değişken bölge için; 1 siklus 94°C’de 3 dakikalık denatürasyonun ardından, 35 siklus olarak 94°C’de 1 dk denatürasyon, 56°C’de 1 dk bağlanma, 72°C’de 2,50 dk uzama ve 1 siklus 72°C’de 5 dk son uzama şeklinde uygulandı (Tablo 3.4) (Çopur ve ark. 2013).

Tablo 3. 3. Sınıf 1 integron değişken bölge termal döngü şartları

| Reaksiyon Koşulları | | Siklus Sayısı |
|---------------------|----------------------|---------------|
| 94°C 2 dk | İlk Denatürasyon | 1 |
| 94°C 45 sn | Denatürasyon | 35 |
| 56°C 1 dk | Bağlanma (Annealing) | |
| 72°C 3 dk | Uzama | |
| 72°C 5 dk | Son Uzama | 1 |

Tablo 3. 4. Sınıf 2 integron değişken bölge termal döngü şartları

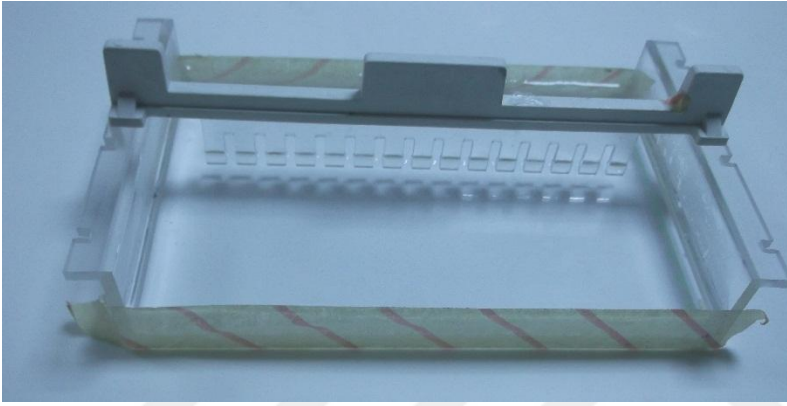
| Reaksiyon Koşulları | | Siklus Sayısı |
|---------------------|----------------------|---------------|
| 94°C 3 dk | İlk Denatürasyon | 1 |
| 94°C 1 dk | Denatürasyon | 35 |
| 56°C 1 dk | Bağlanma (Annealing) | |
| 72°C 2,50 dk | Uzama | |
| 72°C 5 dk | Son Uzama | 1 |

3.5.4. %1’lik Agaroz Jelin Hazırlanması

Amplifiye edilmiş PCR ürünlerinin gözlenmesi için agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için sırasıyla aşağıdaki işlemler yapıldı:

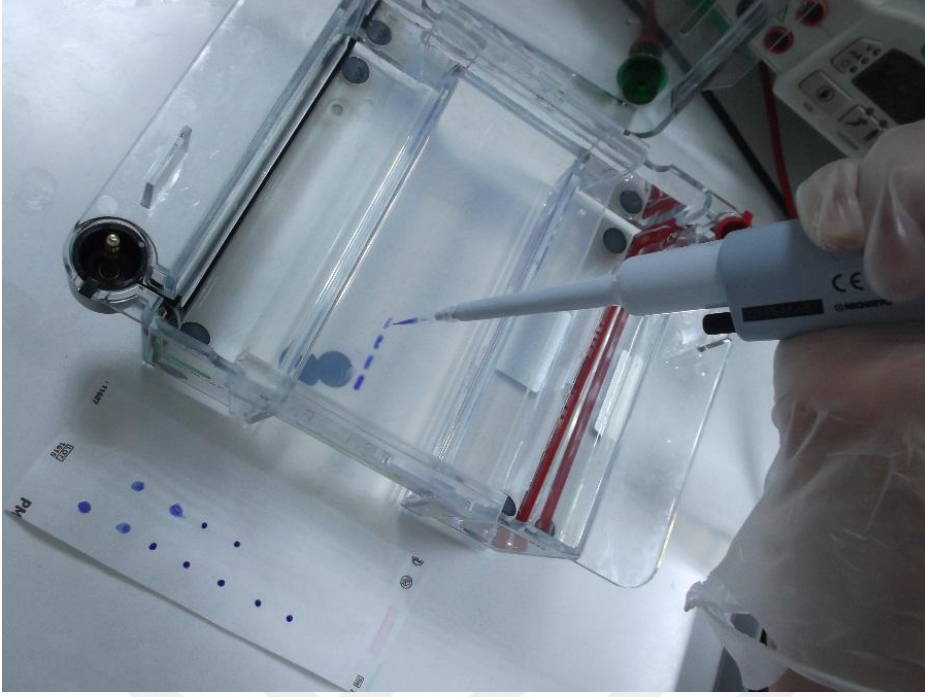
- 1 gr agaroz (BioShop, Kanada) tartıldı ve 250 ml’lik erlen mayer içerisine konuldu. Üzerine 100 ml 1X TAE tamponu eklenerek çözüldü ve bek alevinde ısıtılarak (1-2 dakika) agarozun tamamen erimesi sağlandı.
- Agaroz eridikten sonra eli yakmayacak sıcaklığa gelinceye kadar soğumaya bırakıldı.

- Agarozun içerisine, jel içindeki DNA'yı görünür hale getirmek için 10 µl EtBr (10 mg/ml) eklendi ve buhar solumadan çalkalanarak tamamen karışması sağlandı.
- Jel kalıbına taraklar yerleştirildikten sonra jelin akmaması için her iki tarafı bant ile yapıştırılarak kapatıldı, hazırlanan agaroz kalıp içerisine döküldü ve oda sıcaklığında 30-45 dakika katılaşmaya bırakıldı (Şekil 3.1).



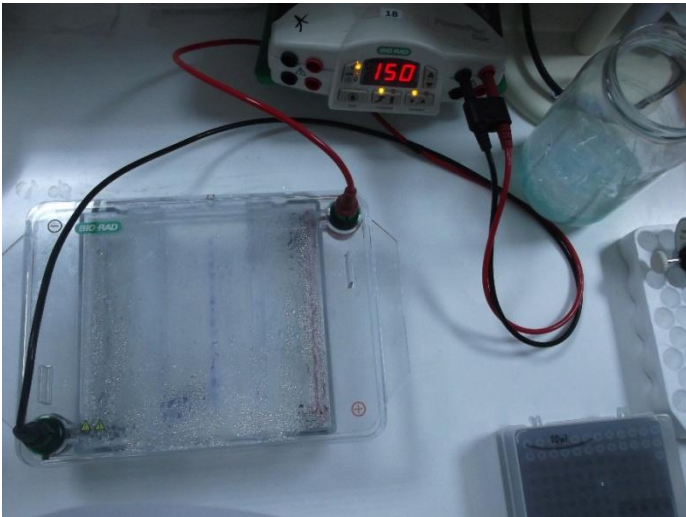
Şekil 3. 1. Kalıptaki agaroz jele ait görüntü

- Agaroz jel donduktan sonra tarak dikkatlice çıkarıldı. Elektroforez tankına yerleştirilen jelin üzerini kapatacak şekilde 1X TAE tamponu eklendi.
- Agaroz jele yükleme yapmak için 0,2 ml'lik ependorf tüplere, 10 µl amplifikasyon ürünü ve 2 µl bromfenol mavisi (6XGel Loading Dye Blue, BioLab, #B7021S, İngiltere) eklenerek iyice karıştırıldı ve otomatik mikropipet yardımıyla kuyucuklara dikkatlice yüklendi (Şekil 3.2).



Şekil 3. 2. Ampifikasyon ürünlerinin agaroz jele yüklenmesi

- Ayrıca her jel yüklenirken DNA örneklerinin yanına bir kuyucuğa DNA ladder marker (100 bp DNA Ladder, BioLab, #N3231S, İngiltere), bir kuyucuğa da daha önce sınıf 1 integron pozitif bulunmuş bir örnek pozitif kontrol olarak yüklendi.
- Elektroforez güç kaynağı (Bio Rad, PowerPac Basic, ABD) 150 Volt'a ayarlandı. Örnekler yaklaşık 45 dk elektroforeze tabi tutularak jelde yürütüldü (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. Ampifikasyon ürünlerinin elektroforezde yürütülmesi

- Süre sonunda EtBr içeren jel, tanktan alınarak jel görüntüleme cihazında (Wisd, Kore) bantların varlığı gözlemlendi.
- Pozitif kontrol (*Pseudomonas aeruginosa* izolatu; Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Laboratuvarından temin edilmiştir) ve DNA marker standardı ile kıyaslanarak örneğin pozitif veya negatif olduğu belirlendi ve fotoğraflanarak kayıt altına alındı.



4. BULGULAR

4.1. Klinik Örneklerin Değerlendirilmesi

Tez çalışmasında Giresun Prof. Dr. A. İlhan Özdemir Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında daha önce yoğun bakım ünitesinde yatan yaşları 11 ay ile 98 yaş arasında değişen 57 kadın 69 erkek toplam 126 hastanın çeşitli klinik örneklerinden (balgam, idrar, kan, plevra sıvısı, pü-y-apse, trakeal aspirat, yara) izole edilmiş olan ve %10 Gliserollü Mueller Hinton Buyyona alınarak -80°C'de derin dondurucuda saklanan Gram negatif bakterilere ait izolatlardan 73 adet *Enterobacter* ve 53 adet *Proteus* izolatu çalışmaya alındı.

Bakteri izolatlarının tanımlanması geleneksel yöntemler (Gram boyama, oksidaz testi, sitrat testi, şeker kullanım testi, indol testi, üreaz testi) ve Phoenix (BD Diagnostic Systems, ABD) otomatize bakteri tanımlama sistemiyle üretici firmaların önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Buna göre, 28 *Enterobacter cloacae*, 23 *Enterobacter aerogenes* ve 22 *Enterobacter spp.* olmak üzere toplam 73 *Enterobacter* cinsi ve 53 *Proteus mirabilis* olmak üzere toplam 53 *Proteus* cinsi izolat tanımlanmıştır (Tablo 4.1).

Tablo 4. 1. İzole edilen mikroorganizmaların sayısı ve yüzdeleri (n: Test edilen izolat sayısı)

| Mikroorganizma | n | % |
|----------------------------------|----|-------|
| <i>Enterobacter</i> cinsi | 73 | 100 |
| <i>E. cloacae</i> | 28 | 38,36 |
| <i>E. aerogenes</i> | 23 | 31,50 |
| <i>Enterobacter spp.</i> | 22 | 30,14 |
| <i>Proteus mirabilis</i> | 53 | 100 |

Enterobacter spp. izole edilen klinik örneklerin kliniklere ve örnek türüne göre dağılımı Tablo 4.2'de verilmiştir. Klinik örneklerin dağılımına bakıldığında *Enterobacter* izolatlarının 30'u (%41,10) idrar, 16'sı (%21,92) yara, 12'si (%16,44) kan, 6'sı (%8,22) balgam, 4'ü (%5,48) trakeal aspirat, 3'ü (%4,10) plevra sıvısı, 2'si (%2,74) pü-y-apse örneklerinden elde edilmiştir. *Enterobacter* izolatlarının kliniklere göre dağılımı, 21'i (%28,77) DYBÜ, 15'i (%20,55) Nöroloji YBÜ, 15'i (%20,55)

Cerrahi YBÜ, 13'ü (%17,80) GYBÜ, 5'i (%6,85) Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ünitesi, 2'si (%2,74) Koroner YBÜ, 2'si (%2,74) Kalp Damar Cerrahi YBÜ olarak belirlenmiştir.

Aynı şekilde *Proteus mirabilis* izole edilen klinik örneklerin kliniklere ve örnek türüne göre dağılımı da Tablo 4.3'te verilmiştir. Klinik örneklerin dağılımına bakıldığında *Proteus mirabilis* izolatlarının 41'i (%77,36) idrar, 4'ü (%7,55) trakeal aspirat, 4'ü (%7,55) yara, 3'ü (%5,66) kan, 1'i (%1,88) balgam örneklerinden elde edilmiştir. *Proteus mirabilis* izolatlarının kliniklere göre dağılımı ise, 34'ü (%64,15) DYBÜ, 10'u (%18,87) GYBÜ, 6'sı (%11,32) Nöroloji YBÜ, 2'si (%3,77) Cerrahi YBÜ, 1'i (%1,89) Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ünitesi şeklindedir.

Tablo 4. 2. *Enterobacter* cinsi izolatların servislere ve örnek türüne göre dağılımı

| Servisler | Örnek Türü | | | | | | | Toplam (%) |
|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|
| | İdrar | Yara | Kan | Balgam | TA | Plevra SIVISI | Püy-Apse | |
| DYBÜ | 11 | 3 | 0 | 3 | 0 | 3 | 1 | 21 (28,77) |
| Nöroloji YBÜ | 7 | 2 | 0 | 3 | 2 | 0 | 1 | 15 (20,55) |
| Cerrahi YBÜ | 8 | 7 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 15 (20,55) |
| GYBÜ | 2 | 2 | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 | 13 (17,80) |
| Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ü. | 1 | 1 | 3 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 (6,85) |
| Koroner YBÜ | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 (2,74) |
| Kalp Damar Cerrahi YBÜ | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 2 (2,74) |
| Toplam (%) | 30 (41,10) | 16 (21,92) | 12 (16,44) | 6 (8,22) | 4 (5,48) | 3 (4,10) | 2 (2,74) | 73 (100) |

(DYBÜ: Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi, GYBÜ: Genel Yoğun Bakım Ünitesi, TA: Trakeal Aspirat)

Tablo 4. 3. *Proteus mirabilis* izolatlarının servislere ve örnek türüne göre dağılımı

| Servisler | Örnek Türü | | | | | Toplam (%) |
|----------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| | İdrar | TA | Yara | Kan | Balgam | |
| DYBÜ | 32 | 0 | 1 | 1 | 0 | 34 (64,15) |
| GYBÜ | 4 | 4 | 0 | 1 | 1 | 10 (18,87) |
| Nöroloji YBÜ | 5 | 0 | 1 | 0 | 0 | 6 (11,32) |
| Cerrahi YBÜ | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 (3,77) |
| Anesteziyoloji ve Reanimasyon Ü. | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 (1,89) |
| Toplam (%) | 41 (77,36) | 4 (7,55) | 4 (7,55) | 3 (5,66) | 1 (1,88) | 53 (100) |

(DYBÜ: Dahiliye Yoğun Bakım Ünitesi, GYBÜ: Genel Yoğun Bakım Ünitesi, TA: Trakeal Aspirat)

4.2. Antibiyotik Duyarlılıkları

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Enterobacter* cinsine ait izolatların *in vitro* antibiyotik duyarlılıkları ve yüzdeleri sırayla en dirençliden en duyarlıya doğru Tablo 4.4'te verilmiştir. *Enterobacter* cinsi izolatların en dirençli olduğu antibiyotikler %100'ü klavulanat/amoksisilin, %91,55'i ampisilin olarak saptanmıştır. Antibiyotik duyarlılık testi Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) önerileri doğrultusunda veya Phoenix otomatize sistemi ile yapılmıştır. Antibiyotik duyarlılık testleri laboratuvarında o anda bulunan mevcut antibiyotik disk ve panel olanaklarına göre yapılmıştır.

Tablo 4. 4. İzole edilen *Enterobacter* türlerinin antibiyotik duyarlılıkları

| Antibiyotik | Dirençli İzolat / Toplam İzolat | | | Toplam (%) |
|-------------|---------------------------------|---------------------|-------------------|--------------|
| | <i>Enterobacter spp.</i> | <i>E. aerogenes</i> | <i>E. cloacae</i> | |
| AMC | 20/20 | 1/1 | - | 100 |
| AMP | 20/20 | 21/23 | 24/28 | 91,55 |
| NOR | 4/6 | 4/7 | 3/8 | 52,38 |
| LEV | 10/20 | - | - | 50 |
| PRL | - | 6/14 | 8/20 | 41,18 |
| TZP | 10/22 | 9/23 | 10/28 | 39,73 |
| CRO | - | 10/23 | 10/28 | 39,22 |
| CAZ | 10/22 | 10/23 | 5/28 | 34,25 |
| CIP | 8/16 | 6/23 | 6/28 | 29,85 |
| SXT | 9/22 | 6/23 | 3/28 | 24,66 |
| GEN | 9/22 | 6/23 | 2/28 | 23,29 |
| FEP | - | 4/22 | 6/28 | 20 |
| MEM | 0/19 | 0/23 | 1/28 | 1,43 |
| AK | 0/22 | 0/23 | 0/28 | 0 |
| IPM | 0/22 | 0/22 | 0/28 | 0 |

(AMC: Klavulanat/Amoksisilin, AMP: Ampisilin, NOR: Norfloksasin, LEV: Levoflaxcin, PRL: Piperasilin, TZP: Piperasilin/Tazobaktam, CRO: Ceftriaxone, CAZ: Ceftazidime, CIP: Ciprofloxacın, SXT: Trimetoprim/Sulfametoksazol, GEN: Gentamisin, FEP: Sefepim, MEM: Meropenem, AK: Amikasin, IPM: İmipenem)

Çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Proteus mirabilis* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları ve yüzdeleri Tablo 4.5'te verilmiştir. Buna göre yapılan antibiyogram sonucunda izolatların %55'i ampisiline, %48'i klavulanat/amoksisiline ve %39,62'si trimetoprim/sulfametoksazole dirençli olarak bulunmuştur.

Tablo 4. 5. İzole edilen *Proteus mirabilis* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları

| Antibiyotik | Dirençli İzolat / Toplam İzolat | |
|-------------|---------------------------------|-------|
| | <i>Proteus mirabilis</i> | (%) |
| AMP | 22/40 | 55 |
| AMC | 12/25 | 48 |
| SXT | 21/53 | 39,62 |
| NOR | 7/21 | 33,33 |
| CIP | 11/42 | 26,19 |
| GEN | 7/53 | 13,21 |
| TOB | 2/22 | 9,09 |
| CAZ | 4/50 | 8 |
| MEM | 2/45 | 4,44 |
| CRO | 5/52 | 3,85 |
| AK | 2/52 | 3,85 |
| TZP | 2/53 | 3,77 |
| FEP | 1/28 | 3,57 |
| IPM | 0/24 | 0 |

(AMP: Ampisilin, AMC: Klavulanat/Amoksisilin, SXT: Trimetoprim/Sulfametoksazol, NOR: Norfloksasin, CIP: Ciprofloxacın, GEN: Gentamisin, TOB: Tobramisin, CAZ: Ceftazidime, MEM: Meropenem, CRO: Ceftriaxone, AK: Amikasin, TZP: Piperasilin/Tazobaktam, FEP: Sefepim, IPM: İmipenem)

4.3. PCR Sonuçları

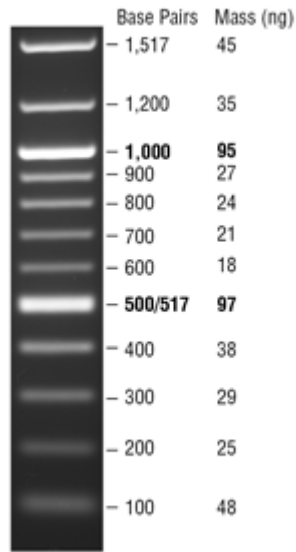
İzolatların, sınıf 1 integron taşıyıcılıkları, 5'-CS ve 3'-CS primerleri kullanılarak ve korunmuş bölgelerle sınırlanmış değişken bölgeleri içeren kromozomal DNA kısmı amplifiye edilerek çalışıldı. Sınıf 2 integron taşıyıcılıkları ise, hep 51 ve hep 74 primerleri kullanılarak çalışıldı.

Enterobacter cinsine ait 73 izolattan 22'sinde (%30,14) sınıf 1 integron bulunurken, hiçbirinde sınıf 2 integrona rastlanmadı. *Proteus mirabilis*'e ait 53 izolattan 21'inde (%39,62) sınıf 1 integron, 22'sinde (%41,50) sınıf 2 integrona rastlandı. Ayrıca çalışılan *Proteus mirabilis* izolatlarının 11'inin (%20,75) hem sınıf 1 hem de sınıf 2 integronların her ikisini birden taşıdığı tespit edildi (Tablo 4.6). Amplikonlar jelde

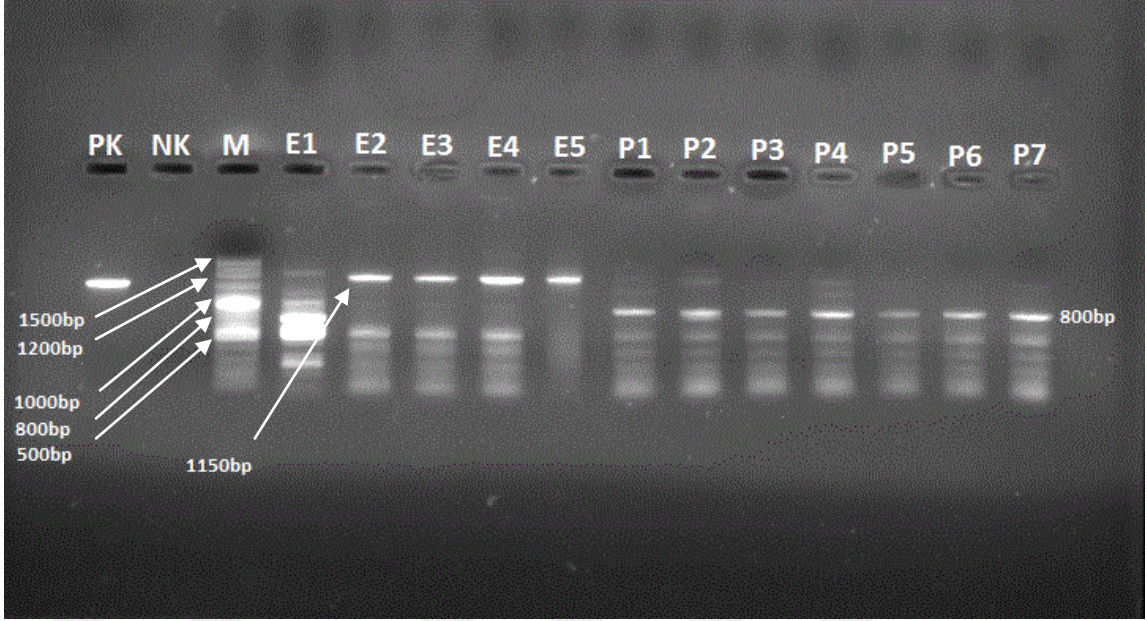
yürütüldüğünde sınıf 1 integrona ait yaklaşık 800 ve 1150 bp büyüklüğünde bantlar, sınıf 2'ye ait yaklaşık 1300 bp büyüklüğünde bantlar olduğu görüldü (Şekil 4.2 ve 4.3).

Tablo 4. 6. *Enterobacter* türleri ve *Proteus mirabilis* 'te sınıf 1 integron ve sınıf 2 integron dağılımları

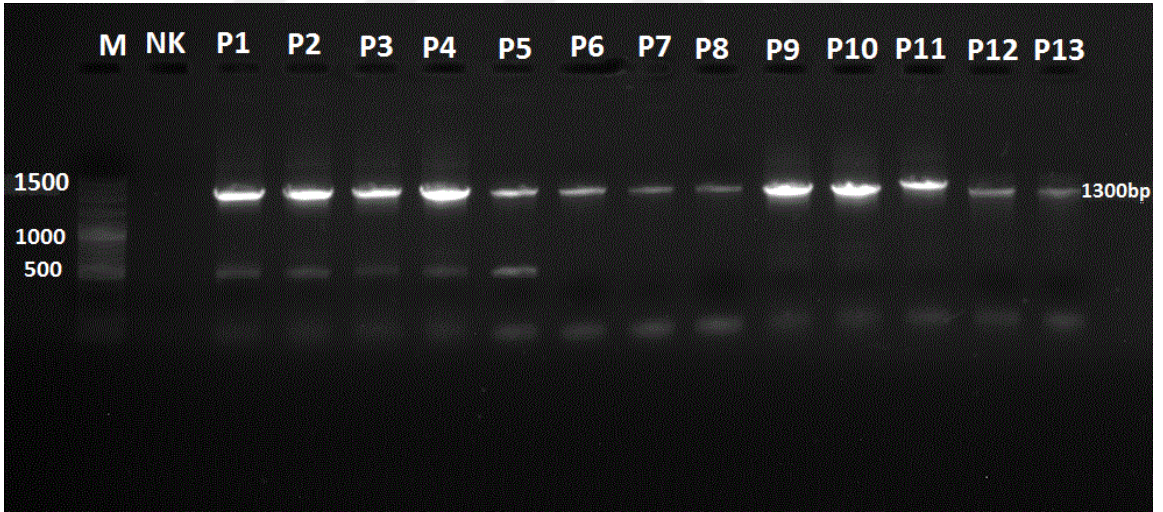
| Mikroorganizma | Sadece sınıf 1 integron taşıyanlar (%) | Sadece sınıf 2 integron taşıyanlar (%) | Hem sınıf 1 hem de sınıf 2 integron taşıyanlar (%) | Sınıf 1 veya sınıf 2 integron taşımayanlar (%) |
|---------------------------|--|--|--|--|
| <i>Enterobacter spp.</i> | 22 (30,14) | - | - | 51 (69,86) |
| <i>Proteus mirabilis.</i> | 10 (18,87) | 11 (20,75) | 11 (20,75) | 21 (39,63) |



Şekil 4. 1. BioLab 100 bp DNA Ladder jel görüntüsü
(<https://www.neb.com/products/n3231-100-bp-DNA-ladder> adresinden alınmıştır)



Şekil 4. 2. Sınıf 1 integron saptanan *Enterobacter spp.* ve *Proteus mirabilis* izolatlarına ait jel görüntüsü (1.kuyucuk PK: Pozitif kontrol, 2.kuyucuk NK: Negatif kontrol, 3.kuyucuk M: Marker, 4-8. kuyucuk *Enterobacter* izolatları, 9-15. kuyucuk *Proteus mirabilis* izolatları)



Şekil 4. 3. Sınıf 2 integron saptanan *Proteus mirabilis* izolatlarına ait jel görüntüsü (1. kuyucuk M: Marker, 2.kuyucuk NK: Negatif kontrol, 3-15. kuyucuk *Proteus mirabilis* izolatları)

5. TARTIŞMA

Değişen koşullara hızla uyum sağlayabilme yetenekleri sayesinde geliştirilen her yeni antibiyotikten kaçacak bir yol bulabilen mikroorganizmalar bu yetenekleri sayesinde yeryüzünün en eski canlıları olmayı başaramışlardır. Bu yüzden enfeksiyonlarla savaşta en önemli sorun bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdiği dirençtir (Demirtürk ve Demirdal, 2004).

Antibiyotiklerin bakteri hücre duvarı sentezini önleme, protein sentezini baskılama, nükleik asit sentezine etki ve bakterinin metabolik yollarının baskılanması şeklinde bakterilere karşı etki mekanizmaları bulunmaktadır (Somer, 2010). Bir mikroorganizma türünün bazı izolatlarının antibiyotiklerden etkilenmemesi ya da antibiyotiğe duyarlı bir izolatın çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile dirençli hale gelmesi antibiyotik direnci olarak bilinmektedir. Antibiyotik direnci, mikroorganizmanın genetik özelliği olan doğal direnç şeklinde görülebileceği gibi kazanılmış antibiyotik direnci şeklinde de karşımıza çıkabilir. Gram negatif bakteriler, hücre yapılarından dolayı vankomisine, zorunlu anaeroplara aminoglikozidlere, mikoplazma beta-laktam antibiyotiklere karşı doğal dirençlidir. Penisilin gibi, hedefi bakterinin hücre duvarı olan bir antibiyotiğin hücre duvarına sahip olmayan bakteriye etki gösterememesi de doğal dirence örnek verilebilir (Ustaçelebi, 1999; Demirtürk ve Demirdal, 2004; Çiftçi ve Aksoy, 2015).

Kazanılmış antibiyotik direnci mikroorganizma kromozomunda oluşan mutasyonlarla ya da dirençli olan mikroorganizmanın direnç genini duyarlı olan mikroorganizmalara aktarması sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunlar, bakteriyel kromozomun bir bölgesindeki geniş DNA bölümlerinin bir diğer bölgesine inversiyon, duplikasyon, insersiyon, delesyon ya da transpozisyonu şeklinde olmaktadır. Bu düzenlemeler integron, transpozon ve insersiyon sekansları olarak adlandırılan özel genetik elemanlar ile gerçekleşmektedir (Somer, 2010).

Antibiyotik direnci gelişimi ile transpozon ve konjugatif plazmidler gibi birçok hareketli doğal elemanlar keşfedilmiş ve bu elemanların karşılaştırmalı dizi analizleri sonucunda integronların varlığı ortaya çıkarılmıştır. Dirence sebep olan genlerin, bölgeye özgü rekombinasyon mekanizmasıyla bakteri genomuna girebilen ve bakteriden bakteriye direnç genlerinin transferinde görevli integronların varlığı tespit edilmiştir.

İntegronlar, bölgeye özgü rekombinasyon sistemine sahip hareketli, gen kasetleri içeren DNA elemanları olarak bilinmektedirler. Ancak, integronların plazmid ya da transpozonlara bağlı olarak hareket ettikleri düşünülmektedir. Antibiyotiklere karşı oluşan direncin, izolatlar arasındaki epidemiyolojik yayılma potansiyelinin, integronlar aracılığı ile olduğu düşünülmektedir (Köseoğlu, 2004; Coleman ve Holmes, 2005; Gophna, 2013; Keskin ve ark. 2014; Rizi ve ark. 2015). İntegron taşıyan izolatlara gün geçtikçe artan oranda rastlanması, antibiyotik direnç oranlarındaki artışı göstermektedir. Antibiyotik direnç geni taşıyan integronlara, başka direnç genlerinin de girmesi sonucu çoklu dirençli suşlar ortaya çıkmaktadır. Bu nedenle, moleküler yöntemlerle integron bölgelerinin belirlenmesini temel alan çalışmaların yapılması önemlidir (Heir ve ark. 2004; Dolapçı ve ark. 2010).

Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnç genlerinin mobilizasyonu birçok mekanizmadan oluşmaktadır. Plazmidlerin transferi (transformasyon ve konjugasyon) ve faj transferi (transdüksiyon) direnç genlerinin horizontal transferi için anahtar faktör olarak bilinmektedir. İntegron ve gen kasetleri de plazmidler aracılığıyla taşınmaktadır. Ayrıca, transfer kolaylığından dolayı plazmidler, farklı bakteri cins ve türleri arasında antimikrobiyal direnç yayılımına en çok katkıda bulunan genetik elemanlardır (Freijo ve ark. 1998; Coleman ve Holmes, 2005; Poirel ve ark. 2009; Usta ve ark. 2015).

Plazmidler aracılığıyla da taşınan beta laktamazlar, *Enterobacteriaceae* üyelerinde görülen direncin en önemli kaynağıdır (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter*). Ülkemizde yapılan değişik çalışmalarda GSBL pozitiflik oranları *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* için sırası ile %2-32, %34-48, %14-28 arasında bulunmuştur. (Gençer ve ark. 2001; Demirtürk ve Demirdal, 2004).

Enterobacteriaceae ailesindeki türlerinden bazıları, hastanelerde yaygın enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkan dirençli bakteriler arasında yer alır. Bakterilerde antibiyotik direncinin bulunması tedavide başarısızlıklara neden olmaktadır. Bunun sonucunda, özellikle kritik yoğun bakım hastalarında hastanede yatış süresinin uzaması, morbidite ve mortalitede artış ve buna bağlı daha pahalı antibiyotik kullanımını gerektirmektedir. Ampirik tedavi başarısızlıkları sonucu dirençli bakterilerin etken olduğu kan akımı enfeksiyonlarında mortalitede artış meydana gelmektedir (Demirtürk ve Demirdal, 2004; Somer, 2010; Ertürk ve ark. 2012).

Genel durumu kötü olan kritik hastaların takip edildiği YBÜ'ler, hastane geneline göre invaziv girişimlerin daha sık uygulandığı dirençli mikroorganizmaların

daha çok izole edildiği birimlerdir. Hastane genelinde hastane enfeksiyon oranı %5-10 iken, YBÜ'de bu oran %20-25 olarak bildirilmektedir. Tüm nozokomiyal pnömoni ve bakteriyemilerin yaklaşık %45'i yoğun bakım hastalarında saptanmaktadır. Prematüre ve yenidoğanlar, yaşlılar, operasyon geçirenler, immünespresifler, yanıklı ve travmalı hastalar, metabolik bozukluğu olan ve malignitesi olan hastalar hastane enfeksiyonları için asıl risk grubunu oluşturmaktadır. Kateterizasyon süresi, drenaj torbasının kolonizasyonu, antibiyotik kullanımı, Diabetes Mellitus (DM), kadın cinsiyette olma, cerrahi girişim nedeniyle kateter konulması, keratinin yüksekliği ve kateter bakımında aksama hastane enfeksiyonuna yol açan risk faktörleri arasındadır (İnan ve ark. 2002; Orucu ve Geyik, 2008; Ertürk ve ark. 2012).

Genellikle, YBÜ'de yatan hastalara yatışları süresince geniş spektrumlu antibiyotik verilmekte ve yoğun antibiyotik kullanımı sonucu bakterilerde direnç gelişmektedir. Yanlış antibiyotik kullanımı tedavi başlanan hastaların üçte birinde görülmekte olup; hastane mortalite oranı ve yatış süresi ile ilişkilidir. Buna karşılık, uygun antibiyotiklerin erken uygulanması septik şok geçiren hastaların hayatta kalma şansını artırmaktadır (Çıkman ve ark. 2012, Tojo ve ark. 2014). YBÜ'de en sık görülen hastane enfeksiyonları; ventilatör ilişkili pnömoniler, üriner sistem enfeksiyonları, bakteriyemi ve kateter enfeksiyonları ile cerrahi alan enfeksiyonlarıdır (Orucu ve Geyik, 2008).

Özellikle immünyetmezlikli, multipl travmalı, büyük cerrahi girişimler veya yabancı cisim implantasyonu yapılan hastalarda ortaya çıkan enfeksiyonlarda antibiyotik tedavisinin dikkatli ve iyi planlanması gerekmektedir. Bu tür hastalarda uzun süreli antibiyotik kullanımı sonucunda farklı bakteri türlerine karşı direnç gelişebilmektedir. Yani antibiyotik kullanımı ile antibiyotik direnci arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır (Durmaz ve ark. 1997; Yaylı ve Aksoy, 2003). YBÜ'de yatan hastaların yaklaşık %80'inde 48-72 saat içerisinde hastane enfeksiyonu ortaya çıkmaktadır. Buradaki etken mikroorganizmaların ve antibiyotik duyarlılık profillerinin bölgesel olarak ve zaman içinde farklılık gösterdiği de tespit edilmiştir (Sesli ve ark. 2007). Yeni antibiyotiklerin tedaviye girmesi sonucu bunlara dirençli mikroorganizmalar da ortaya çıkmaktadır. Son zamanlarda YBÜ'de ve immün sistemi baskılanmış hasta sayılarındaki artma nedeniyle yoğun antimikrobiyal ilaç kullanımı ve gıda endüstrisinde antibiyotik uygulaması sonucu mikroorganizmalardaki antibiyotik direnci de artmaktadır. Direnç nedeni ile tedavi başarısızlıklarını en aza indirgeyebilmek

için bakterilerin antibiyotik direnç profillerinin iyi bilinmesi, antibiyotiklerin dikkatle, uygun zaman ve dozlarda kullanımının sağlanması gerekmektedir (Ekşi ve ark. 2007).

İnsan bağırsak florasında bulunan heterojen bir bakteri grubu olan *Enterobacteriaceae* ailesi, patojen olarak klinik örneklerden sıklıkla izole edilmektedir. Mikrobiyoloji laboratuvarlarında, klinik önemi olan suşların %50'sini, laboratuvarında izole edilen Gram negatif basillerin yaklaşık %80'ini, bakteriyel gastroenteritlerin %65-70'ini, septisemilerin %50'sini, üriner yol izolatlarının %70'den fazlasını *Enterobacteriaceae* üyeleri oluşturmaktadır. Bu bakteriler basit enfeksiyonlardan daha komplike tedavisi zor enfeksiyonlara kadar geniş klinik tablolar oluşturabilirler (Ustaçelebi, 1999).

Enterobacteriaceae türlerinde direncin ortaya çıkması ve yayılması ciddi nozokomiyal enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. Dünyadaki *Enterobacteriaceae* üyelerinde görülen direncin önlenmesi için daha sıkı antibiyotik yönetimi ve enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması gerekmektedir. *Enterobacter* türlerinde 1980'lerde beta-laktamazlar, 1990'larda sefalosporinazlar ve 2010'larda da karbapenemazlar tespit edilmiştir. ABD'de YBÜ'deki *Enterobacter spp.* enfeksiyonlarının yaklaşık %31'i üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç göstermektedir (Paterson, 2006; Davin ve Pages, 2015).

Fırsatçı patojen olan *Enterobacter*'ler, nadiren primer insan hastalığına neden olurlar. Klinik örneklerden en sık izole edilen türleri *E. cloacae* ve *E. aerogenes*'tir. Hayvan ve insan bağırsağında, toprak, su ve kanalizasyon atıkları ve süt ürünlerinde bulunabilen bu bakteriler, çoğunlukla balgam, idrar, yara, kan ve BOS'tan izole edilmektedirler. Bu tez çalışmasında *Enterobacter* cinsi izolatlar sırasıyla %41,10 (30/73) idrar, %21,92 (16/73) yara ve %16,44 (12/73) oranıyla kandan izole edilmiştir. *Enterobacter* türleri, özellikle de YBÜ'deki kökenleri, birinci ve üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençlidir (Sümerkan, 2010). İran'da 2014 yılında 110 *Enterobacter spp.* izolatı ile yapılan bir çalışmada, izolatlardan %97,8'inin klavulanat/amoksisiline, %71,1'inin sefoksitine, %62,2'sinin de trimetoprim/sulfametoksazole dirençli olduğu tespit edilmiştir (Rizi ve ark. 2015). Bu tez çalışmasında da *Enterobacter* cinsi izolatların en dirençli olduğu antibiyotikler %100 klavulanat/amoksisilin, %91,55 ampisilin ve %52,38 norfloksasin olarak saptanmıştır. Özellikle *E. cloacae*'nin son yıllarda antibiyotik kullanımının seçici baskısına paralel olarak önemli bir nozokomiyal patojen haline geldiği bilinmektedir.

Proteus türlerine de *Enterobacter* türleri gibi toprak, su ve kanalizasyon atıklarında sık olmak üzere çevrede rastlanmaktadır. İnsanlar için fırsatçı patojen olarak kabul edilen türlerden *P. mirabilis* ve *P. vulgaris*, sıklıkla idrar, yara, kulak ve bakteriyemilerden izole edilmektedir (Çopur ve ark. 2013). Çalışmamızda *P. mirabilis* izolatları %77,36 (41/53) oranıyla en çok idrardan izole edilmiştir. *P. mirabilis* izolatlarının en dirençli olduğu antibiyotikler %55 ampisilin, %48 klavulanat/amoksisilin, %39,62 trimetoprim/sulfametoksazol olarak saptanmıştır.

Üriner kateterli hastalarda ilk 30 gün içinde bakteriüri gelişmektedir. Kısa süreli ve uzun süreli kateterizasyonlarda *P. mirabilis* sık rastlanılan etkenlerden biridir (Orucu ve Geyik, 2008).

Çopur ve ark. (2013) bir hastanın idrar örneğinden izole ettikleri *P. mirabilis* (TRP41) izolatının Sınıf 1 integron taşıdığını ancak sınıf 2 integron taşımadığını tespit etmişlerdir. Yaptıkları DNA sekans analizi sonucunda 2086 bp büyüklüğündeki sınıf 1 integronun yeni bir *bla_{OXA}* variantı taşıdığını tespit etmişler ve *bla_{OXA-320}* olarak adlandırmışlardır.

Antibiyotikler 20. yüzyılın en büyük keşiflerindedir. Ancak antibiyotiklere karşı direnç de antibiyotik çağının ilk yıllarında ortaya çıkmıştır. Antibiyotik direnç sorunu ile mücadele edilmesine rağmen direnç giderek artmaya devam etmektedir. Antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde en önemli faktörlerden biri de lateral gen transferidir (Stokes ve Gillings, 2011). Gram negatif bakterilerde antibiyotik dirençlilikleri sıklıkla ortak bir havuzdan mobil direnç genlerinin edinimi ile olmaktadır. Çoklu dirençli izolatlarda mobil genler, plazmid ya da kromozom üzerinde karmaşık yapılar olarak bir arada bulunabilirler (Partridge, 2011; Malek ve ark. 2015).

Klinik bakteri izolatları arasında birçok integron sınıfı bulunmuştur. *Enterobacteriaceae* ailesi içinde en yaygın olanının sınıf 1 integronlar olduğu gösterilmiştir (Dakic ve ark. 2007; Avşaroğlu ve ark. 2008; Dolapçı ve ark. 2010; Budak ve ark. 2012). İntegronlar, gen kasetlerinin içine gömülü genlerin ekspresyonu ve edinimini teşvik eden bakteriyel genetik elemanlardır (Coleman ve Holmes, 2005; Stalder ve ark. 2012).

Güney Çin’de 2004 yılında Gram pozitif ve Gram negatif toplam 118 adet klinik izolat kullanılarak yapılan çalışmada, sınıf 1 integron %76,3 (90/118) ve sınıf 2 integron %0,8 (1/118) oranında tespit edilmiş; 4 adet izolatın da hem sınıf 1 hem de sınıf 2 integrona sahip olduğu rapor edilmiştir. Sınıf 3 integrona ise hiçbir izolatta

rastlanmamıştır (Yan ve ark. 2010). Tanzanya’da 2004-2005 yılları arasında toplanan 13 *Enterobacter cloacae*’de sınıf 1 integron varlığı araştırılmış ve %84,62 oranında bulunmuştur (Manyahi ve ark. 2017). İran’da 2014’te 110 *Enterobacter* izolatın %41’inde sınıf 1 , %8,18’inde hem sınıf 1 hem sınıf 2 aynı anda tespit edilirken, sınıf 3 integrona rastlanmamıştır (Rizi ve ark. 2015). Çalışmamızda, *Enterobacter* cinsine ait şuşların %30,14’ünde (22/73), *P. mirabilis*’e ait izolatların %39,62’sinde (21/53) sınıf 1 integrona rastlanmıştır. *Enterobacter* cinsine ait izolatların hiçbirinde sınıf 2 integron saptanmazken, *P. mirabilis*’e ait izolatların %41,50’sinde (22/53) sınıf 2 integron tespit edilmiştir. Değerlendirilen 53 *P. mirabilis* izolatından 11’inin (%20,75) hem sınıf 1 hem de sınıf 2 integron taşıdığı tespit edilmiştir. Tablo 5.1’de farklı ülkelerde *Proteus* izolatlarında integron varlığının araştırıldığı çalışmaların sonuçları verilmiştir.

Tablo 5. 1. Farklı ülkelerde *Proteus* izolatlarında integron varlığının araştırıldığı çalışmalar

| Araştırma ekibi | Yeri | Dönemi | İzolat | Örnek sayısı | Kaynak | İntegron / (%) |
|-----------------|------------|-----------|---------------------|--------------|------------------------|---|
| Soliman ve ark. | Mısır | 2014-2015 | <i>P.mirabilis</i> | 2 | (Soliman ve ark. 2017) | sınıf 1/%100 |
| Malek ve ark. | Mısır | 2012-2014 | <i>Proteus spp.</i> | 9 | (Malek ve ark. 2015) | sınıf 1/%44,44, sınıf 2/%0 |
| Wei ve ark. | Çin | 2011-2012 | <i>Proteus spp.</i> | 153 | (Wei ve ark. 2014) | sınıf 1/%63, sınıf 2/%66 |
| Liu ve ark. | Çin | 2009-2010 | <i>Proteus spp.</i> | 8 | (Liu ve ark. 2010) | sınıf 1/%16,7 |
| Manyahi ve ark. | Tanzanya | 2004-2005 | <i>P.mirabilis</i> | 6 | (Manyahi ve ark. 2017) | sınıf 1/%83,33 |
| Reyes ve ark. | Şili | 1998-2000 | <i>P.mirabilis</i> | 30 | (Reyes ve ark. 2003) | sınıf 1 ve sınıf 2/%56,67, sınıf 2 / %13,33, sınıf 3/%0 |
| White ve ark | Avustralya | 1988-1999 | <i>Proteus spp.</i> | 13 | (White ve ark. 2001) | sınıf 1/%15,38, sınıf 2/%30,77 |

Malezya’da tez çalışmamıza benzer şekilde 5’-CS/3’-CS ve hep 74/hep 51 primerleri kullanılarak yapılan çalışmada, çoklu antibiyotiklere dirençli *Enterobacteriaceae* ve *Pseudomonas* türlerinde integron varlığı araştırılmış ve çalışılan 147 örneğin %45,6’sının sınıf 1, %2’sinin ise sınıf 2 integron taşıdığı tespit edilmiştir. Sınıf 3 integron da araştırılmış ancak tespit edilememiştir. Ayrıca, 150 bp’lik amplikonların gen kaseti taşımayan integronlar olduğu tespit edilmiştir. Mokracka ve ark. da (2011, 2012) *E. cloacae* izolatlarında gen kaseti taşımayan 180 bp’lik değişken

bölgeler tespit etmişlerdir (Mokracka ve ark. 2011; 2012; Kor ve ark. 2013). Bu tez çalışmasında ise, sınıf 1 integron varlığı %37,30 (47/126), sınıf 2 integron varlığı ise %17,46 (22/126) oranında tespit edilmiştir.

Sınıf 1 integronun β -laktam, bütün aminoglikozitler, trimetoprim, kloramfenikol, fosfomisin, makrolidler, rifampin, kinolon gibi 130'dan daha fazla gen kaseti içerdiği bilinmektedir (Escudero ve ark. 2015). *Enterobacteriaceae* ailesine ait farklı türlerin dahil edildiği bir çalışmada sınıf 1 integrona ait 800, 1000, 1500 bp büyüklerde bantlar olduğu görülmüştür. 800 bp'lik integronun *aacA4*, 1000 bp'lik integronun *aadA* ve 1500 bp'lik integronunda *dfrI* ve *aadA1* gen kasetlerine sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Her bant için promotör dizilerinin aynı olduğunu rapor etmişlerdir. Bu da, integronların promotör bölgelerinin sabit ve korunduğunu göstermektedir. Böylelikle direnç genlerinin bir bakteriden diğerine aktarılması kolaylaşmaktadır (Martinez ve ark. 1999). Bu tez çalışmasında da, sınıf 1 integrona ait 800 ve 1150 bp olmak üzere iki farklı bölgede bant varlığı belirlenmiştir. Bu da bize izolatlardan bazılarının birden fazla gen kaseti taşıyor olabileceğini göstermektedir.

Toplum kökenli ve klinik izolatlardan elde edilen çok ilaca dirençli *Enterobacteriaceae* izolatlarında sınıf 1 integronun yaygın olduğu gösterilmiştir. İntegronların antibiyotik direnç genleri taşıdıkları bilinmektedir (Leverstein-van Hall ve ark, 2003). *Enterobacteriaceae* türlerinde görülen direnç ile mücadelede multidisipliner yaklaşım oldukça önemlidir. Bu mücadelede önem verilmesi gereken unsurlar; sürveyans ve geri bildirim, antimikrobiyal kullanımının kontrolü ve akılcı enfeksiyon kontrol önlemleridir (Beşirbellioğlu, 2010).

2011-2012 yıllarında yapılan bir çalışmada 137 *Enterobacter* spp. klinik izolatlarından 83'ünün (%61) çok ilaca dirençli olduğu ve bu dirençli izolatlardan 52'sinin (%63) sınıf 1 integron taşıdığı tespit edilmiş olup, çok ilaca direnç saptanması ile sınıf 1 integron taşıyıcılığı arasında bir ilişkili olduğu saptanmıştır (Peymani ve ark. 2014). Sonuç olarak çok ilaca dirençli *Enterobacteriaceae* türleri önemli halk sağlığı problemi teşkil etmektedir. Bu gibi suşların hastane ortamında yayılması sonucu tedavisi güç olan enfeksiyonların sayısı da artacaktır. İntegron taşıyan izolatların taşıdığı epidemik gücü belirlemek, hızlı tedavi ve uygun antibiyotik seçimi sağlanması açısından integron tespiti ve antibiyotik direnç genlerinin karakterizasyonunu temel alan çalışmaların yapılması oldukça önemlidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

YBÜ'ler fizyolojik açıdan durumu stabil olmayan ve hastanede yatan hastalar arasında en ağır klinik tablosu olan hastaların tedavilerinin yapıldığı birimlerdir. Gram negatif bakterilerin özellikle YBÜ olmak üzere hastane enfeksiyonlarına neden olduğu bilinmektedir. Ancak bakteriler arasında hızla yayılan antibiyotik direnci tedaviyi zorlaştırmaktadır. Bunun için bakterilerin hangi antibiyotiklere dirençli olduğu ve bu direncin bakteriler arasında nasıl yayıldığı iyi bilinmeli ve en etkili, en doğru antibiyotik kullanımı sağlanmalıdır.

Bu çalışma ile Giresun Prof. Dr. A. İlhan Özdemir Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında, çeşitli YBÜ'lerde yatan hastaların çeşitli klinik örneklerinden izole edilen *Enterobacter spp.* ve *Proteus mirabilis* izolatlarında, sınıf 1 ve sınıf 2 integron değişken bölgelerinin varlığı PCR metodu ile araştırılmıştır. Çalışma ile sınıf 1 integron varlığının *Enterobacter* izolatlarında %30,14, *P. mirabilis* izolatlarında ise %39,62 olduğu gösterilmiştir. Ayrıca *P. mirabilis* izolatlarının %41,50'sinin sınıf 2 integron taşıdığı ancak *Enterobacter spp.* izolatlarının hiçbirinin sınıf 2 integrona sahip olmadığı tespit edilmiştir. Çalışılan *P. mirabilis* izolatlarının 11'inin (%20,75) hem sınıf 1 hem de sınıf 2 integronların her ikisini birden taşıdığı tespit edilmiştir.

Günümüzde hastane enfeksiyonlarında ve toplum kökenli enfeksiyonlarda antibiyotik direnci giderek artmaktadır. Penisiline karşı dirençli pnömokoklar, metisilin dirençli *S. aureus*'lar (MRSA), koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), vankomisin dirençli enterokoklar (VRE), ESBL pozitif *Enterobacteriaceae* grubu bakteriler ve çoklu ilaç direnci gösteren Gram negatif basiller tedavide sorun yaratan mikroorganizmalar olarak karşımıza çıkmaktadırlar. Ancak, gün geçtikçe çoğalan antibiyotik direnci nedeniyle, bu durumun daha da kötüye gideceği düşünülmektedir.

Gelecekte tümüyle dirençli Gram negatif basiller, vankomisin dirençli *S. aureus* gibi daha sorunlu mikroorganizmalarla da karşılaşacağımız bir gerçektir. Antibiyotik direncinin yayılmasının önlenmesinde, uygun antibiyotik kullanımı ve rehberlere uyumun yanı sıra yeni antimikrobiyal sınıflarının da geliştirilmesi gerekmektedir.

Literatür taramaları sonucunda ülkemizde *Enterobacter* ve *Proteus* cinsleriyle ilgili integron taşıyıcılığının araştırıldığı az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Bu bakteriler

ile yapılacak ileri çalışmalarla dirence neden olan mekanizmalar, integronların taşıdıkları gen kasetlerinin tespiti, integronlara ilişkin epidemiyolojik veriler ve risk faktörleri daha iyi ortaya koyulabilecektir. Böylece özellikle YBÜ'lerde enfeksiyon kontrolü ve tedavi protokolleri daha da etkin ve verimli olarak gerçekteőebilecektir. Giresun'da, direnç genlerinin transferinde rol alan integronların varlığının araştırıldığı ilk çalışma olması ağıısından bir başlangıç olma niteliğindeki bu çalışmanın, bundan sonraki yapılacak olan çalışmalara ışık tutacağı kanaatindeyiz.



7. KAYNAKLAR

Aktaş Z., Diyarbakırlı P., Bal Ç., Gürlü N., Keser M., Somer A., Salman N. (2007) Vankomisine Dirençli *Enterococcus faecium* Suşlarının Fenotipik ve Genotipik Olarak İncelenmesi. *Mikrobiyol Bülteni*, 41: 347-356.

Atalan N., Fazlıoğulları O., Şitilci T., Başaran C. (2012) Yoğun Bakım Ünitesinde Saptanan Hastane İnfeksiyonu Etkenleri ve Direnç Profilinin Değerlendirilmesi. *GKDA Derg*, 18(2): 46-51.

Avşaroğlu M.D., Akkoç N., Guerra B., Akçelik M., Bozoğlu F., Helmuth R. (2008) Antibiyotik Dirençli *Salmonella enterica* Serotiplerinde Sınıf-1 İntegron Varlığının Araştırılması. *Türkiye 10. Gıda Kongresi*. Erzurum. 19-22.

Barlow R.S., Pemberton J.M., Desmarchelier P.M., Gobius K.S. (2004) Isolation and Characterization of Integron-Containing Bacteria without Antibiotic Selection. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 48(3): 838-842.

Baron S (Ed). (1996) *Medical Microbiology*. Univesity of Texas Medical Branch at Gaveston. 4th Edition. Galveston.

Barraud O., Francois B., Chainier D., Vignaud J., Ploy M.C. (2014) Value of integron detection for predicting antibiotic resistance inpatients with Gram-negative septicaemia. *International Journal of Antimicrobial Agent*, ANTAGE-4364; 3.

Baylan O. ve Erdoğan Ö (Ed). (2017) *Burton Sağlık Bilimlerinde Mikrobiyoloji*. İstanbul Tıp Kitabevleri, Onuncu Baskı, İstanbul.

Beşirbellioğlu B. (2010) Dirençli Gram Negatif Bakteri Sorunu. *Yoğun Bakım Dergisi*, 9(4): 173-181.

- Bilgehan H. (2008) *Temel Mikrobiyoloji ve Başıkklık Bilimi (Uygulama Konuları İle)*. 12. Baskı. Barış Yayınları, İzmir.
- Biskri L., Mazel D. (2003) Erythromycin Esterase Gene *ere(A)* Is Located in a Functional Gene Cassette in an Unusual Class 2 Integron. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(10): 3326-3331.
- Biskri L., Bouvier M., Guerout A.M., Boissard S., Mazel D. (2005) Comparative Study of Class 1 Integron and The *Vibrio cholerae* Superintegron Integrase Activities. *Journal of Bacteriology*, 187(5): 1740-1750.
- Budak F., Kasap M., Kolaylı F., Karadenizli A., Vahaboğlu M.H. (2012) Integron-Associated Resistance Genes Among Multidrug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolated From Clinical Specimens. *Turk J Med Sci*, 42(1): 149-156.
- Budak S., Aktaş Z., Erdem H. (2012) Enterik Gram-Negatif Bakterilerde Laboratuvarıdan Kliniğe Karbapenemazlar. *Mediterr J Infect Microb Antimicrob*, 1(1): 1-11.
- Borman E.K., Stuart C.A., Wheeler K.M. (1944) Taxonomy of The Family *Enterobacteriaceae*. *J Bacteriol*, 48(3):351-367.
- Bouvier M., Demarre G., Mazel D. (2005) Integron Cassette Insertion: A Recombination Process Involving A Folded Single Strand Substrate. *The EMBO Journal*, 24(24): 4356-4367.
- Cagle C.A., Shearer J.E.S., Summers A.O. (2011) Regulation of The Integrase and Cassette Promoters of The Class 1 Integron by Nucleoid-Associated Proteins. *Microbiology*, 157: 2841-2853.
- Cambray G., Guerout A.M., Mazel D. (2010) Integrons. *Annual Review of Genetics*, 44: 141-166.

- Coleman N.V., Holmes A.J. (2005) The Native *Pseudomonas stutzeri* Strain Q Chromosomal Integron Can Capture and Express Cassette-Associated Genes. *Microbiology*, 151: 1853-1864.
- Collis C.M., Hall R.M. (1992) Site-Specific Deletion and Rearrangement of Integron Insert Genes Catalyzed by the Integron DNA Integrase. *Journal of Bacteriology*, 174(5): 1574-1585.
- Collis C.M., Hall R.M. (1995) Expression of Antibiotic Resistance Genes in the Integrated Cassettes of Integrons. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1): 155-162.
- Collis C.M., Recchia G.D., Kim M.J., Stokes H.W., Hall R.M. (2001) Efficiency of Recombination Reactions Catalyzed by Class 1 Integron Integrase Int1. *Journal of Bacteriology*, 183(8): 2535-2542.
- Copur Cicek A., Ozad Duzgun A., Saral A., Sandalli C. (2013) Determination of A Novel Integron-Located Variant (*bla_{OXA-320}*) of Class D β -Lactamase in *Proteus mirabilis*. *Journal of Basic Microbiology*, 54: 1030-1035.
- Çetinkaya E., Ayhan K. (2012) Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1): 53-62.
- Çıkman A., Gündem N.S., Karakeçili F., Korkmaz E., Çıkman Ö. (2012) Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastaların Çeşitli Klinik Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 26(3): 131-136.
- Çiftçi A., Aksoy A. (2015) Antibiyotiklere Karşı Oluşan Direnç Mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri*, 1(2): 1-11.
- Çolakoğlu F., Özgümüş O.B., Sandalli C., Çelik Sevim E., Alpay Karaoğlu Ş. (2010) Deniz Suyu Kökenli Koliformlarda Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegron Gen Kasetleri ve Antibiyotik Direncinin Karakterizasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 40(2): 97-108.

- Çopur Çiçek A., Karagöz A., Köksal E., Ertürk A., Özgümüş O.B., Köksal Z.S., Durmaz R. (2013) A single clone *Acinetobacter baumannii* outbreak in a state hospital in Turkey. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 66: 245-248.
- Çopur Çiçek A., Saral A., Düzgün A.O., Çizmeçi Z., Kayman T., Balcı P.O., Dal T., Fırat M., Yazıcı Y., Sancaktar M., Ozgumus O.B., Sandallı C. (2013) Screening of Class 1 and Class 2 Integrons in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Collected from Seven Hospitals in Turkey: A Multicenter Study. *Open Journal of Medical Microbiology*, 3: 227-233.
- Dakic I., Lilakos D., Svabic-Vlahovic M., Christofilopoulou S., Poggas N., Charvalos E. (2007) Integron-associated antimicrobial resistance in isolates of members of *Enterobacteriaceae* causing community-acquired urinary infections. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 19: 201-206.
- Dalben M., Varkulja G., Basso M., Krebs V.L.J., Gibelli M.A., Heijen I., Rossi F., Duboc G., Levin A.S., Costa S.F. (2008) Investigation of an outbreak of *Enterobacter cloacae* in a neonatal unit and review of the literature. *Journal of Hospital Infection*, 70: 7-14.
- Dale J.W., Park S.F. (2003) *Molecular Genetics of Bacteria*. 4th Edition. Wiley, UK.
- Daly M., Fanning S. (2004) Integron Analysis and Genetic Mapping of Antimicrobial Resistance Genes in *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Methods Mol Biol*, 268: 15-32.
- Davin-Regli A., Monnet D., Saux P., Bosi C., Charrel R., Barthelemy A., Bollet C. (1996) Molecular Epidemiology of *Enterobacter aerogenes* Acquisition: One-Year Prospective Study in Two Intensive Care Units. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(6): 1474-1480.
- Davin-Regli A., Pages J.M. (2015) *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Frontiers in Microbiology*, 392(6).

- Demirtürk N., Demirdal T. (2004) Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5(2): 17-21.
- Deng Y., Bao X., Chen L., Liu J., Miao J., Chen D., Bian H., Li Y., Yu G. (2015) Resistance Integrons: Class 1, 2 and 3 Integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 14(45): 1-11.
- Durmaz R., Otlu B., Çalışkan A., Gürsoy N. (2007) *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Türlerinin Moleküler Tiplendirilmesinde Kullanılabilecek Kısa Süreli “Pulsed-Field Gel” Elektroforez (PFGE) Protokolü. *ANKEM Derg*, 21(2): 113-117.
- Durmaz B., Özerol İ.H., Şahin K., Tekerekoğlu M.S., Köroğlu M. (1997) *Enterobacteriaceae* Üyesi ve *Pseudomonas* Cinsi Bakterilerin β -Laktam Antibiyotiklerine Direnci. *Journal of Turgut Ozal Medical Center*, 4 (2): 93-96.
- Doğruöz Güngör N. (2015) Doğal Çevrelerdeki Mikrobiyal Çeşitliliğin Belirlenmesi İçin Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Mühendislik ve Fen Bilimleri Dergisi*, 33: 54-64.
- Dolapçı İ., Karahan Z.C., Mumcuoğlu İ., Us E., Çöloğlu D., Ulusoy M., Tekeli A. (2010) Klinik Örneklerden İzole Edilen Karbapeneme Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Sınıf 1 İntegron Taşıyıcılığının Araştırılması. *Mikrobiyol Bülteni*, 44: 547-552.
- Ekşi F., Özer G., Balcı İ. (2007) *E. coli* ve *Klebsiella sp.* Klinik İzolatlarında GSBL Sıklığının ve Antibiyotik Direncinin Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 41: 447-452.
- Ertürk A., Çopur Çiçek A., Köksal E., Şentürk Köksal Z., Özyurt S. (2012) Yoğun Bakım Ünitesinde Yatan Hastaların Çeşitli Klinik Örneklerinden İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *ANKEM Derg*, 26(1): 1-9.

- Escudero J.A., Loot C., Nivina A., Mazel D. (2014) The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol Spectr*, 3: 1-22.
- Escudero J.A., Loot C., Nivina A., Mazel D. (2015) The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiology Spectrum*, 3(2): 1-22.
- Eser Ö. (2012) Moleküler Tanı Testlerinin Direnç Tayininde Kullanımı: Gram Negatif Bakteriler İçin Hızlı Moleküler Tanı Yöntemleri. *ANKEM Derg*, 26(2): 86-91.
- Fluit A.C., Schmitz F.J. (2004) Resistance Integrons and Super-Integrons. *Clin Microbiol Infect*, 10: 272-288.
- Freijo P.M., Fluit A.C., Schmitz F.J., Grek V.S.C., Verhoef J., Jones M.E. (1998) Class I Integrons in Gram-Negative Isolates from Different European Hospitals and Association with Decreased Susceptibility to Multiple Antibiotic Compounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42: 689-696.
- Gençer S., Benzonana N., Özer S., Kuzu İ., Özyurt Y. (2001) Cerrahi Yoğun Bakım Ünitesinden İzole Edilen Bakteriler ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *Yoğun Bakım Dergisi*, 1(2): 131-137.
- Gillings M., Boucher Y., Labbate M., Holmes A., Krishnan S., Holley M., Stokes H.W. (2008) The Evolution of Class 1 Integrons and The Rise of Antibiotic Resistance. *Journal of Bacteriology*, 190(14): 5095-5100.
- Grimont F., Grimont P.A.D. (2006) The Genus *Enterobacter*. Prokaryotes. Springer. 2th Edition. New York, NY, USA.
- Güler İ., Kılıç H., Atalay M.A., Perçin D., Erçal B.D. (2011) Klinik Örneklerden İzole Edilen Hastane Kaynaklı Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Suşlarının Rep-PCR ile Genotiplendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 45(4): 581-591.
- Gür D. (2000) Hastane İnfeksiyonları ve Antimikrobiyal İlaçlara Çoğul Dirençli Gram-Negatif Bakteriler. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 4: 218-221.

Gophna U. (Ed). (2013) *Lateral Gene Transfer in Evolution*. Springer, Israel.

Hartl D.L., Jones E.W. (2005) *Genetics Analysis of Genes and Genomes*. Sixth Edition. Jones and Bartlett Publishers.

Heir E., Lindstedt B.A., Meegaard T.M., Gjernes E., Kapperud G. (2004) Prevalence and Characterization of Integrons in Blood Culture *Enterobacteriaceae* and Gastrointestinal *Escherichia coli* in Norway and Reporting of A Novel Class I Integron-Located Lincosamide Resistance Gene. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 3(12): 1-9.

İnan D., Saba R., Keskin S., Ögünç D., Çiftçi C., Günseren F., Namıkoğlu L., Gültekin M. (2002) Akdeniz Üniversitesi Hastanesi Yoğun Bakım Ünitelerinde Hastane Enfeksiyonları. *Yoğun Bakım Dergisi*, 2(2): 129-135.

Kang C., Kim S.H., Park W.B., Lee K.D., Kim H.B., Oh M., Kim E.C., Choe K.W. (2004) Bloodstream Infections Caused by *Enterobacter* Species: Predictors of 30-Day Mortality Rate and Impact of Broad-Spectrum Cephalosporin Resistance on Outcome. *Clinical Infectious Disease*, 39: 812-818.

Kargar M., Mohammadalipour Z., Doosti A., Lorzadeh S., Japoni-Nejad A. (2014) High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health Res Perspect*, 5(4): 193-198.

Keller R., Pedroso M.Z., Ritchmann R., Silva R.M. (1998) Occurrence of Virulence-Associated Properties in *Enterobacter cloacae*. *Infection and Immunity*, 66(2): 645-649.

Keskin H., Tekeli A., Dolapçı İ., Öcal D. (2014) Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* Suşlarında Beta-Laktamaz Kaynaklı Direncin Moleküler Karakterizasyonu. *Mikrobiyol Bul*, 48(3): 365-376.

- Kırca Yılmaz Ş., Acuner İ.Ç., Strommenger B., Bek Y., Witte W. (2014) Türkiye'nin Orta Karadeniz Bölgesinde Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* Kökenlerinin Enfeksiyözite-Rezistotip-Genotip Kümelenmesi. *Mikrobiyol Bul*, 48(1): 14-27.
- Koczura R., Przyszlakowska B., Mokracka J., Kaznowski A. (2014) Class 1 Integrons and Antibiotic Resistance of Clinical *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* Complex in Poznan, Poland. *Curr Microbiol*, 69: 258-262.
- Kor S.B., Choo Q.S., Chew C.H. (2013) New Integron Gene Arrays from Multiresistant Clinical Isolates of Members of The *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* from Hospitals in Malaysia. *Journal of Medical Microbiology*, 62: 412-420.
- Köseoğlu Ö. (2004) İntegronlar. *Mikrobiyol Büil*, 38(3): 305-312.
- Larouche A., Roy P.H. (2011) Effect of *attC* Structure on Cassette Excision by Integron Integrases. *Mobile DNA Journal*, 2(3): 1-13.
- Leverstein-van Hall M.A., Blok H.E.M., Donders R.T., Paauw A., Fluit A.C., Verhoef J. (2003) Multidrug Resistance among *Enterobacteriaceae* Is Strongly Associated with the Presence of Integrons and Is Independent of Species or Isolate Origin. *The Journal of Infectious Diseases*, 187: 251-259.
- Levesque C., Piche L., Larose C., Roy P.H. (1995) PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(1): 185-191.
- Liu H., Wang H., Huang M., Mei Y., Gu B., Wu R., Huang Y., Chen Y., Xu Y., Wang T. (2013) Analysis of antimicrobial resistance and class I integrons among strains from upper respiratory tract of healthy adults. *J Thorac Dis*, 5(2): 149-155.
- Manyahi J., Tellevik M.G., Ndugulile F., Moyo S.J., Langeland N., Blomberg B. (2017) Molecular Characterization of Cotrimoxazole Resistance Genes and Their

Associated Integrons in Clinical Isolates of Gram-Negative Bacteria from Tanzania. *Microbial Drug Resistance*, 23(1): 1-7.

Malek M.M., Amer F.A., Allam A.A., El-Sokkary R.H., Gheith T., Arafa M.A. (2015) Occurrence of Classes I and II Integrons in *Enterobacteriaceae* Collected from Zagazig University Hospitals, Egypt. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1-6.

Martinez-Freijo P., Fluit A.C., Schmitz F.J., Verhoef J., Jones M.E. (1999) Many Class I Integrons Comprise Distinct Stable Structures Occurring in Different Species of Enterobacteriaceae Isolated from Widespread Geographic Regions in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(3): 686-689.

Mazel D., Dychinco B., Webb V.A., Davies J. (1998) A Distinctive Class of Integron in The *Vibrio cholerae* Genome. *Science*, 280: 605–608.

Mengeloğlu F.Z., Çopur Çiçek A., Koçoğlu E., Sandallı C., Budak E.E., Özgümüş O.B. (2014) Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Sınıf 1 ve 2 İntegron Taşıyıcılığı ve Yeni Bir Gen Kaseti Birlikteliği: *bla_{oxa-11}-cmlA7*. *Mikrobiyol Bul*, 48(1): 48-58.

Mirnejad R., Mostofi S., Masjedian F. (2013) Antibiotic Resistance and Carriage Class 1 and 2 Integrons in Clinical Isolates of *Acinetobacter baumannii* from Tehran, Iran. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(2): 140-145.

Mokracka J., Koczura R., Kaznowski A. (2012) Multiresistant *Enterobacteriaceae* with Class 1 and Class 2 Integrons in A Municipal Wastewater Treatment Plant. *Water Research*, 46: 3353-3363.

Mokracka J., Koczura R., Pawlowski K., Kaznowski A. (2011) Resistance Patterns and Integron Cassette Arrays of *Enterobacter cloacae* Complex Strains of Human Origin. *Journal of Medical Microbiology*, 60: 737-743.

Naas T., Benaoudia F., Massuard S., Nordmann P. (2000) Integron-Located VEB-1 Extended-Spectrum β -Lactamase Gene in A *Proteus mirabilis* Clinical Isolate from Vietnam. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46: 703-711.

- Orucu M., Geyik M.F. (2008) Yoğun Bakım Ünitesinde Sık Görülen Enfeksiyonlar. *Düzce Tıp Fakültesi Dergisi*, 1: 40-43.
- Öğünç D., Gültekin M., Günseren F., Çolak D., Öngüt G., Namıkoğlu L. (1999) Nozokomiyal *Enterobacter* Suşlarının Antibiyotik Duyarlılık Özellikleri. *ANKEM Derg*, 13(1): 33-38.
- Özkaya E., Aydın F., Bayramoğlu G., Buruk C.K., Sandallı C. (2013) Klinik Örneklerden İzole Edilen Trimetoprim-Sulfametoksazole Dirençli *Stenotrophomonas maltophilia* Suşlarında İntegron, *sul1-2* ve *dfr* Genlerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2014; 48(2): 201-212.
- Özsüt H. (1998) Yoğun Bakım Ünitesinde Enfeksiyon Sorunu. *Hastane İnfek Derg*, 14: 1-5.
- Partridge S.R. (2011) Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 35: 820-855.
- Paterson D. (2006) Resistance in Gram-Negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. *AMJ Infect Control*, 34: 20-28.
- Peymani A., Naserpour Farivar T., Ghoraiian P., Najafipour R. (2014) Association between Class 1 Integrons and Multidrug Resistance Pattern among *Enterobacter spp.* Isolated from Qazvin and Tehran Teaching Hospitals. *JQUMS*, 18(2): 30-38.
- Ploy M.C., Courvalin P., Lambert T. (1998) Characterization of In40 of *Enterobacter aerogenes* BM2688 a Class 1 Integron with Two New Gene Cassettes, *cmlA2* and *gacF*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(10): 2557-2563.
- Poirel L., Carrer A., Pitout J.D., Nordmann P. (2009) Integron Mobilization Unit as a Source of Mobility of Antibiotic Resistance Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2492-2498.

- Poole K. (2005) Efflux-Mediated Antimicrobial Resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56: 20-51.
- Poole K. (2002) Mechanisms of Bacterial Biocide and Antibiotic Resistance. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92: 55-64.
- Reyes A., Bello H., Dominguez M., Mella S., Zemelman R., Gonzalez G. (2003) Prevalence and Types of Class 1 Integrons in Aminoglycoside-Resistant *Enterobacteriaceae* from Several Chilean Hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51: 317-321.
- Rizi K.S., Peerayeh S.N., Bakhshi B., Rahbar M. (2015) Prevalence of Integrons and Antimicrobial Resistance Genes Among Clinical Isolates of *Enterobacter spp.* from Hospitals of Tehran. *Int Enteric Pathog*, 3(1): 1-6.
- Sarı B., Baran I., Alaçam S., Mumcuoğlu İ., Kurşun Ş. (2015) Nozokomiyal Çok İlaça Dirençli *Acinetobacter baumannii* İzolatlarında Oksasilinaz Genlerinin Multipleks PCR ile Araştırılması ve Klonal İlişkilerinin Rep-PCR ile Değerlendirilmesi. *Mikrobiyol Bul*, 49(2): 249-258.
- Sesli Çetin E., Kaya S., Pakbaş E., Demirci M. (2007) Yoğun Bakım Ünitelerinde Yatan Hastalardan İzole Edilen Mikroorganizmalar ve Antibiyotik Duyarlılıkları. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 14 (2): 69-73.
- Soliman A.M., Ahmed A.M., Shimamoto T., Domany R.A., Nariya H., Shimamoto T. (2017) First report in Africa of two clinical isolates of *Proteus mirabilis* carrying *Salmonella* genomic island (SGI1) variants, SGI1-PmABB and SGI1-W. *Infection, Genetics and Evolution*, 51: 132-137.
- Stalder T., Barraud O., Casellas M., Dagot C., Ploy M. (2012) Integron Involvement in Environmental Spread of Antibiotic Resistance. *Front Microbiol*, 9; 3: 119.
- Stokes H.W., Gillings M.R. (2011) Gene Flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiol Rev*, 35: 790-819.

Stokes H.W., Hall R.M. (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3: 1669-1683.

Sümerkan B. (2010) Yoğun Bakım Ünitesinde Gram-Negatif Mikroorganizmalar ve Direnç Sorunu. *Yoğun Bakım Dergisi*, 2003; 3(2)129-134.

Somer A. (2010) Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Türk Pediatri Arşivi Dergisi*, 45: 45-49.

Temiz H., Akkoç H., Gül K. (2008) Laboratuvarımızda İdrar Kültürlerinden İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerde Antibiyotiklere Direnç. *Dicle Tıp Dergisi*, 35(4): 234-239.

Tojo M., Fujita T., Ainoda Y., Nogamatsu M., Hayakawa K., Mezaki K., Sakurai A., Masvi Y., Yazaki H., Takahashi H., Miyoski-Akiyama T., Totsuka K., Kirikae T., Ohmagari N. (2014) Evaluation of an Automated Rapid Diagnostic Assay for Detection of Gram-Negative Bacteria and Their Drug-Resistance Genes in Positive Blood Cultures. *Plos One*, 9(4): 1-9.

Ulusoy Al M., Mumcuoğlu İ., Aksu N., Dolapçı İ., Karahan Z.C., Baran I., Kurşun Ş. (2011) İmipenem Dirençli *Acinetobacter* Suşlarında Metallo-Beta-Laktamaz Üretiminin Fenotipik ve Genotipik Yöntemlerle Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg.* 41(1): 29-36.

Usta E., Eroğlu C., Yanık K., Karadağ A., Güney A.K., Günaydın M. (2015) Klinik *Stenotrophomonas maltophilia* İzolatlarında Sınıf 1, 2, 3 İntegron Varlığının ve Antibiyotik Direnci ile İlişkilerinin Araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 49(1): 35-46.

Ustaçelebi Ş (Ed). (1999) *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi. Ankara.

Yalçın A.N. (2009) Yoğun Bakım Ünitesinde Antibiyotik Kullanımı ve Direnç Sorununa Genel Bakış. *ANKEM Derg.* 23(2): 136-142.

Yan H., Li L., Zong M., Alam M.J., Shinoda S., Shi L. (2010) Occurrence and Characteristics of Class 1 and Class 2 Integrons in Clinical Bacterial Isolates from Patients in South China. *Journal of Health Science*, 56(4): 442-450.

Yaylı G., Aksoy S. (2003) Hastane İnfeksiyonlarından İzole Edilen *Acinetobacter* Suşlarının Antibiyotiklere Duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 33: 61-63.

Wei Q., Hu Q., Li S., Lu H., Chen G., Shen B., Zhang P., Zhou Y. (2014) A Novel Functional Class 2 Integron in Clinical *Proteus mirabilis* Isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69: 973-976.

White P.A., McIver C.J., Rawlinson W.D. (2001) Integrons and Gene Cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9): 2658-2661.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER:

Adı Soyadı : Büşra KIR
Doğum Yeri ve Tarihi : Giresun – 1990
Yabancı Dil : İngilizce (YÖKDİL:70)
Telefon : 0 541 319 18 90
E-mail : busrakir@yahoo.com

EĞİTİM BİLGİLERİ:

| Derece | Okul Adı/Bölüm | Bitirme Yılı |
|--------|--|--------------|
| Lise | Giresun Atatürk Lisesi/Sayısal | 2007 |
| Lisans | Karadeniz Teknik Üniversitesi/Biyoloji | 2012 |

İŞ DENEYİMİ:

Özel Giresun Ada Hastanesi / Tıbbi Sekreter (Kardiyoloji Polikliniği-Koroner Yoğun Bakım / 27.09.2014-13.03.2015)

Uluslararası dergilerde yayınlanan makaleler:

1. Uzunoğlu E., Oğuz I.D., Kır B., Akdemir C. Clinical and Epidemiological Features of Paederus Dermatitis among Nut Farm Workers in Turkey. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 201; 96(2): 483-487.
2. Uzunoğlu E., Polat E., Oğuz I.D., Kır B., Mutlu D., Babat S., Akdemir C. Tick Bite Cases among Hazelnut Farm Workers in Giresun. Cumhuriyet Medical Journal, 2017; 39(2): 473-478.

Uluslararası bilimsel toplantılarda/kongrelerde sunulan posterler:

1. Direkel S., **Kir B.** Fear of Blood Donation. XII. AATM Congress-IX. BBTST Congress, (2-6 April 2016. Antalya): PP-053.
2. Direkel S., Uzunoglu Karagoz E., Tezcan Ulger S., Emecen O., **Kir B.** Prevalence of Parvovirus B19 in Healthy Blood Donors From Giresun Province, Turkey. XII. AATM Congress-IX. BBTST Congress, (2-6 April 2016. Antalya): OP-03.
3. Uzunoglu E., Oguz I.D., **Kir B.**, Akdemir C. Paederus dermatitis among nut farm workers. 13. Congress of The European Society of Contact Dermatitis, (14-17 September 2016. Manchester).
4. **Kir B.**, Kacmaz G., Karaman Ü., Direkel S. Comparison of The Modified Trichrome Stain Method With Wheatley's Trichrome Stain Methods. International Symposium on Parasitic Zoonoses, (16-20 Kasım 2016. Antalya).
5. Direkel S., Karaman Ü., Kaya Y., Kacmaz G., **Kir B.** Investigation of *Toxoplasma gondii* IgM, Ig G and *Brucella abortus* antibodies in women older than twenty years old. International Symposium on Parasitic Zoonoses, (16-20 Kasım 2016. Antalya).

Ulusal bilimsel toplantılarda/kongrelerde sunulan posterler:

1. Uzunoğlu E., Akdemir C., **Kir B.**, Mutlu D. Giresun Yöresinde Kene Tutma Şikayeti ile Acil Servise Başvuran Fındık İşçilerinden Çıkarılan Kenelerin Cins ve Tür Dağılımı. 3.Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, (18-22 Kasım 2015. Antalya): PS451.
2. Uzunoğlu E., Akdemir C., **Kir B.**, Oğuz I.D. Giresun Yöresinde Fındık İşçileri Arasında Görülen Paederus Dermatiti Olguları. 3. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, (18-22 Kasım 2015. Antalya): PS450.
3. Aytekin K., Direkel Ş., **Kir B.**, Uysal M., Yıldız Aytekin F., Duygu F., Esenyel C.Z. Ortopedi ameliyatlarında cerrahi sahanın örtülmesinde steril poşet kullanımının enfeksiyon açısından etkinliği 26. Ulusal Türk Ortopedi ve Travmatoloji Kongresi, (25-30 Ekim 2016, Antalya).
4. Baldemir A., Karaman Ü., Direkel Ş., Güçlüer İldız N., **Kir B.**, Kaçmaz G. *Helianthemum canum*'un Antileishmanial Aktivitesinin Araştırılması. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, (16-20 Kasım 2016. Antalya).

Proje Deneyimi:

| Proje No | Proje Adı | Proje Yılı |
|---------------------|--|-------------------|
| SAĞ-BAP-A-200515-40 | Giresun'da Tüketilen Yöresel Peynirlerin Mikrobiyolojik Kalitesinin Değerlendirilmesi | 2015- |
| SAĞ-BAP-C-140316-07 | Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Gram negatif bakterilerde integron gen kasetlerinin ve antibiyotik direnç genlerinin moleküler karakterizasyonu | 2016- |
| SAĞ-BAP-A-160317-86 | Yoğun bakım ünitelerinden izole edilen Gram negatif bakterilerde Pulsed Field Gel Elektroforezi ile klonal ilişkinin araştırılması ve antibiyotik direnç genlerinin moleküler karakterizasyonu | 2017- |

Bilimsel Kuruluşlara Üyelikler:

1. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti

Katıldığım Toplantılar:

1. Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbi Eğitim Sempozyumu (25 Ekim 2016, Trabzon)
2. 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi (16-20 Kasım 2016, Antalya)
3. 9. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (18 Kasım 2016, Antalya)
4. International Symposium on Parasitic Zoonoses (18-19 Kasım 2016, Antalya)