ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLİNİK VE GIDA KÖKENLİ KLEBSİELLA SP. İZOLATLARINDA BİYOFİLM KODLAYAN GENİN GENETİK OLARAK BELİRLENMESİ

Hussam Al Din Sabah MHALHAL

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2021

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Hussam Al Din Sabah MHALHAL tarafından hazırlanan "**Klinik ve Gıda Kökenli Klebsiella Sp. İzolatlarında Biyofilm Kodlayan Genin Genetik Olarak Belirlenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı'nda **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN

Eş Danışman : Dr. Marwa Hameed ALKHAFAJI

Jüri Üyeleri:

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN
Çankırı Karatekin Üniversitesi,
Biyoloji Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Şinasi AŞKAR
Çankırı Karatekin Üniversitesi,
Sağlık Yönetimi Anabilim Dalı

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Recep KALIN
Sivas Cumhuriyet Üniversitesi,
Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalı

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **" Klinik ve Gıda Kökenli Klebsiella Sp. İzolatlarında Biyofilm Kodlayan Genin Genetik Olarak Belirlenmesi"** konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim.

(11/05/2021)

Hussam Al Din Sabah MHALHAL

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KLİNİK VE GIDA KÖKENLİ *KLEBSİELL*A SP. İZOLATLARINDA BİYOFİLM KODLAYAN GENİN GENETİK OLARAK BELİRLENMESİ

Hussam Al Din Sabah MHALHAL

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet SEZGİN
Eş Danışman: Dr. Marwa Hameed ALKHAFAJI

Bu çalışmada, Biofilm oluşturan *K. pneumoniae*, 100 klinik ve gıda örneğinden izole edilmiştir. İzolatların çoğu antibiyotiğe dirençli ve biyofilm üreticisidir. Biyofilm oluşturma yeteneğini belirlemek için üç fenotipik test (Congo Red Agar, Tube metodu veya Christensen'in ve Microtiter plak testi) kullanılmıştır. Sonuçlar 15 (%83,33) klinik ve 16 (%76,19) gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatının biyofilm ürettiğini ortaya koymuştur. Biyofilm kodlama geni mrk A, bu çalışmada tasarlanmış spesifik primerler kullanılarak *K. pneumoniae*'nin hem klinik hem de gıda kaynaklı izolatları için PCR testinde amplifikasyonla tespit edilmiştir. Sonuçlar, tüm klinik izolatların (%100) ve gıda kaynaklı sekiz *K. pneumoniae* izolatının (%53,33), 457 baz çifti amplikon boyutlu PCR amplifikasyonunun sonuçlarına göre biyofilm kodlama genini *mrk A* geni barındırdığını göstermiştir.

2021, 57 Sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Biofilm, Klebsiella, Foodborne, mrkA gene, Clinical

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE GENETIC DETECTION OF BIOFILM CODING GENE AMONG CLINICAL AND FOOD ORIGIN *KLEBSIELLA* SP. ISOLATES

Hussam Al Din Sabah MHALHAL

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Asst. Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Co-Advisor: Dr. Marwa Hameed AlKHAFAJI

In this study, the Biofilm forming *K. pneumoniae* were isolated from 100 clinical and food samples. Most of the isolates were antibiotic resistant and biofilm producers. Three phenotypic tests (Congo Red Agar, Tube method or Christensen's and Microtiter plate assay) were used to determine the biofilm-forming ability. Results revealed that 15 (83.33%) clinical and 16 (76.19%) foodborne *K. pneumoniae* isolates produced biofilms. Biofilm coding gene *mrk A* was detected by amplification in PCR assay for both clinical and food origin isolates of *K. pneumoniae*. The specific primers designated in this study. The results showed that all the clinical isolates (100%) and eight food origin *K. pneumoniae* isolates (53.33%) harbored the biofilm coding gene *mrk A* based on the results of PCR amplification with an amplicon size of 457 base pair.

2021, 57 Pages

Keywords: Biofilm, Klebsiella, Foodborne, mrkA gene, Clinical

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Öncelikle, sonsuz nimetlerini esirgemeyen, bana bu işi bu son hali ile yapma gücü ve niyetini veren Cenab-ı Allah'a şükrederim. Allah'ın selamı Hz.Muhammed (S.A.V) ve O'nun ailesinin üzerinde olsun. Eğer bazı insanların desteği olmasa bu çalışmayı gerçekleştirmem mümkün olamazdı. Bilimsel yaşamım ve gündelik hayatımda yanımda oldukları, bilimsel rehberlikleri, tavsiyeleri, öğütleri, teşvikleri, destekleri, sabırları ve nezaketleri için Danışmanlarım Dr. Mehmet Sezgin ve Dr. Marwa Hameed'e teşekkür ederim.

Ayrıca, çalışmam boyunca desteğini benden esirgemeyen Çankırı Üniversitesi'nin her bir çalışanına minnettar olduğumu belirtmek isterim. Bununla birlikte, Sevgili annem ve babama, değerli kardeşim Abdullah'a ve güzel aileme en içten sevgilerimi, minnettarlığımı ve şükranlarımı sunuyorum. Ayrıca bu naçizane çalışmayı, beni doğru yola yönlendiren kişilere, önderlerime ve öğretmenlerime, Allah'ın Sevgili Peygamberi Hz. Muhammed (S.A.V) ve O'nun ailesine, dört bir yandan bombalar yağsa da kendimi güvende hissettiğim, büyük yuvam, yaralı ülkem Irak'a, beni kendilerinden daha çok seven, bana yaşam verenlere, beni her zaman güzel sözlerle ve güzel işlerle şaşırtanlara, kalbimde yaşayanlara ve kalbimde yer edenlere, ithaf ediyorum.

Hussam Al Din Sabah MHALHAL
Çankırı, Mayıs 2021

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **vi**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **vii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **viii**
1.GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR TARAMASI **3**
2.1 Enterobacteriaceae **3**
2.2 *Klebsiella* **3**
2.2.1 *Klebsiella pneumoniae* **3**
2.2.2 *Klebsiella pneumoniae* yeni suşlarının oluşumu **4**
2.3 Biyofilm **5**
2.3.1 *K. pneumoniae* tarafından biyofilm oluşumu **6**
2.3.2 Biyofilm oluşumundaki adımlar **6**
2.4 Karışık Tür Biyofilmi **7**
2.4.1 Karışık tür biyofilmlerinde hücre-hücre iletişimi **8**
2.5 Biyofilm İnhibisyonu **9**
2.6 Biyofilm Saptama Yöntemleri **12**
2.7. *Klebsiella* Biyofilm Oluşumunun Genetik Belirleyicileri **13**
2.8 Gıda Ortamındaki Biyofilmler **14**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **16**
3.1 Materyal **16**
3.1.1 Cihazlar ve ekipmanlar **16**
3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler **16**
3.1.3 Kültür ortamı (Kültür besiyeri) **17**
3.1.4 McFarland standart solüsyonu **19**
3.1.5 Agaroz jel elektroforezinde ve PCR amplifikasyonunda kullanılan malzemeler **19**
3.2 Yöntem **20**

3.2.1 Numunelerin toplanması 20
3.2.2 Bakteri izolasyonu 20
3.2.3 Tanımlama 21
3.2.4 Bakteriyel koruma 22
3.2.5 Antibiyotik duyarlılık testi 22
3.2.6 Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) tayini 24
3.2.7 *K. pneumoniae* ile yapışkan tabakası ve biyofilm oluşumunun tespiti 24
3.2.8 PCR ile biyofilm kodlama geninin moleküler tespiti 26
3.2.9 İstatistiksel analiz 29
4. BULGULAR 30
4.1 Bakteriyel İzolasyon ve Tanımlama 30
4.2 *Klebsiella* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı 34
4.3 Amoksisilin/klavulanat ve seftriaksonun Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi 35
4.4 Biyofilm Üreten İzolatların Fenotipik Tespiti 35
4.4.1 Kongo kırmızı agar yöntemi 35
4.4.2 Tüp yöntemi ile biyofilm oluşumu tespiti 36
4.3 Mikrotiter Plaka Testi ile Biyofilm Oluşumu 37
4.5. Moleküler Çalışmalar 39
4.5.1 *Klebsiella* izolatlarından DNA ekstraksiyonu 39
4.5.2 Mrk A gen tespiti için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği 39
5. TARTIŞMA VE SONUÇ 42
KAYNAKLAR 46
ÖZGEÇMİŞ 57

SİMGELER VE KISALTMALAR

AMC	Amoksisilin / klavulanat
bp	Baz çifti
CFU/ml	Mililitrede koloni oluşturan birim
CRA	Kongo kırmızı agar
DNA	Deoksiribonükleik asit
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyon
µg/ml	Mililitre başına mikrogram
µl	Mikro Litre
NCCLs	Ulusal klinik laboratuvar standartları komitesi
O.D.	Optik yoğunluk
PBS	Fosfat tamponlu salin
PCR	Polimeraz zincirleme reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
S.S	Salmonella shiglla
TBE	Tris - Borat - EDTA
TSB	Triptik soya suyu
XLD	Ksiloz lizin deoksikolat

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyofilm oluşumundaki adımlar (Shakibaie 2018)..... 7
Şekil 2.2 Karma tür biyofilmlerindeki mekansal dağılımı (Nielsen *et al*. (2000), (b) birlikte toplanma (Rickard *et al*. (2006) (c) katmanlar halinde düzenlenmesi (Hansen *et al*. 2007). 9
Şekil 2.3 Gıda güvenliği, önleme ve uzaklaştırma için anti-biyofilm stratejileri. (Zhao *et al*. 2017)..... 12
Şekil 3.1 Qubit 4.0 ile DNA miktar tayini prosedürü 27
Şekil 4.1 Klinik ve gıda örneklerinden izole edilen laktoz fermente eden bakterilerin ve laktozu fermente etmeyen bakterilerin yüzdeleri. 30
Şekil 4.2 *Klebsiella* izolatı ile kültürlenmiş MacConkey agar üzerinde Laktoz fermentörleri 31
Şekil 4.3 Farklı bakteri izolatları ile kültürlenmiş eosin metilen mavisi agar 31
Şekil 4.4 24 saat (solda) ve 48 saat (sağda) 37 ° C'de inkübasyondan sonra MacConkey agar üzerinde *Klebsiella* spp'nin büyük pembe dışbükey mukoid kolonileri..32
Şekil 4.5 MacConkey agar üzerinde *K. pneumoniae* izolatı K7 için dizi testi ile hipermukoviskozite fenotip tespiti: 32
Şekil 4.6 *Citrobacter spp*. 37 ° C'de 18 saat inkübasyondan sonra izoleler (A. S.S. agar üzerinde siyah merkezli soluk koloniler, B: XLD agar üzerinde sarı koloniler)33
Şekil 4.7 Beş antibiyotik seftriakson, levofloksasin, amoksisilin-klavulanat, nitrofurantoin, sefalotin için klinik ve gıda *K. pneumoniae* izolatlarının antibiyogram sonuçları 34
Şekil 4.8 Kongo kırmızısı agar üzerinde 37 ° C'de 18 saat inkübasyondan sonra *K. pneumoniae* (A: Klinik B: Gıda kaynaklı) izolatları oluşturan biyofilm ile balçık tabakası üretimi..... 35
Şekil 4.9 Bir test tüpünün cam yüzeyine yapıştırılan gıda kaynaklı K30 izolatından üretilen lekeli biyofilm (Christensen'in yöntemi)..... 37
Şekil 4.10 *Klebsiella pneumoniae* tarafından oluşturulan biyofilm: kristal viyole ile boyanmış mikrotitre plakasının ekli polistiren oyukları..... 38
Şekil 4.11 Klinik *K. pneumoniae*'nin mrk A geninin (457bp) amplifiye edilmiş 40
Şekil 4.12 Gıda kaynaklı *K. pneumoniae*'nin mrk A geninin (457bp) amplifiye..... 40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 *K. pneumoniae* biyofilmlerine karşı bazı antibiyofilm ajanları (Ribeiro *et al*. 2016). 11
Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipmanlar ile bunların menşeileri ve üretici şirketleri. 16
Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve biyolojik malzemeler 17
Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kültür ortamı 18
Çizelge 3.4 National Committee for Clinical Laboratory' standartlarına göre inhibisyon bölgelerinin çap yorumlayıcı standartları 23
Çizelge 3.5 Biyofilm üretiminin yorumlanması. Optik yoğunluk kesme değeri (ODc) = negatif kontrolün ortalama OD'si + negatif kontrolün 3x standart sapması (SD) 26
Çizelge 3.6 Belirlenmiş Primerler ve mrkA geninin amplifikasyonu için kullanılan gen dizileri 28
Çizelge 3.7 MrkA genini amplifiye etmek için kullanılan program 29
Çizelge 4.1 Klinik ve gıda örneklerinden izole edilen farklı bakterilerin izolasyon yüzdesi 33
Çizelge 4.2 Hem klinik hem de gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatlarının yapışkan tabaka üreticileri 36
Çizelge 4.3 Klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatları ile Mikrotiter plaka testi kullanılarak biyofilm oluşumu 38
Çizelge 4.4 Klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatlarına göre biyofilm oluşum yüzdesi, üç tespit testi kullanılarak 39
Çizelge 4.5 *K. pneumoniae* izolatlarının *mrk A* gen amplifikasyonu 41
Çizelge 4.6 Mrk A geni varlığı ile biyofilm oluşumu arasında *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının karşılaştırılması 41

1.GİRİŞ

Klebsiella pneumoniae hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonların sık görülen bir nedenidir ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) bunu "öncelikli patojen" olarak ilan etmiştir Çoklu ilaç direnci nedeniyle halk sağlığına "acil bir tehdit" olarak ortaya çıkmıştır (Desai *et al*. 2019). Bakteriler, doğal ve sentetik yüzeyler de dahil olmak üzere neredeyse her tür yüzey üzerinde kolonileşip biyofilm oluşturabilir (Sweet *et al*. 2011, Muhammad *et al*. 2020). Biyofilmler, kronik hastalıklardan ve hastane enfeksiyonlarından, endüstriyel boru kirliliğinden, yiyeceklerin bozulmasından, deniz ürünleri ve süt ürünlerinin kirlenmesinin yanı sıra gemi gövdesi kirlenmesinden sorumludur (Zottola and Sasahara 1994, Khatoon *et al*. 2018). Bakteriyel biyofilmler, esas olarak polisakkaritler, salgılanan proteinler ve hücre dışı DNA'lardan oluşan kendi kendine üretilen polimer matrisler tarafından bir arada tutulan karmaşık yüzeye bağlı bakteri topluluklarıdır, bakteriyel biyofilm oluşumu karmaşık bir süreçtir ve beş ana aşamada tanımlanabilir: (i) bakterilerin yüzeylere spesifik olmayan bir şekilde bağlandığı tersinir bağlanma aşaması; (ii) bakteri hücreleri ile fimbriae ve lipopolisakkarid (LPS) gibi bakteriyel adhezinlerin kullanıldığı bir yüzey arasındaki etkileşimi içeren geri döndürülemez bağlanma fazı; (iii) yerleşik bakteri hücreleri tarafından hücre dışı polimerik maddelerin (EPS) üretimi; (iv) bakteriyel hücrelerin birbirlerinin varlığını algılamak için sinyal moleküllerini sentezlediği ve saldığı, mikrokoloninin oluşumuna ve biyofilmlerin olgunlaşmasına yol açan biyofilm olgunlaşma fazı; ve (v) bakteri hücrelerinin biyofilmlerden ayrıldığı ve bağımsız planktonik yaşam tarzına geri döndüğü dağılma / ayrılma aşaması (Muhammad *et al*. 2020).

Biyofilmler, planktonik hücrelere göre antibiyotikler ve dezenfektanlar gibi antimikrobiyallere karşı daha dirençlidir. Biyofilmlerdeki hücreler de UV ışığına karşı artan direnç sergileyebilir (O'Toole *et al*. 2000). Bu artan direnç, antimikrobiyalin biyofilm içerisinden geç penetrasyonundan, biyofilmdeki hücrelerin büyüme hızının değişmesinden ve biyofilm büyüme modunda meydana gelen diğer fizyolojik değişikliklere bağlı olabilir.

Fonksiyonel olarak, biyofilm popülasyonları, metabolik süreçlere ve hücre bölünmesine göre fizyolojik aktivite açısından farklılık gösterir. Yüksek metabolik aktivitenin yanı sıra hücre bölünmesi ve uykuda olan hücreler ifade eden aktif hücreler, yavaş metabolik süreçlere sahiptir ve herhangi bir bakteri popülasyonunda hücre bölünmesi yoktur, ancak daha fazla hareketsiz hücre bolluğu biyofilmlerde açıkça görülmektedir. Biyofilmdeki hareketsiz hücreler bu nedenle biyofilmlerin antimikrobiyal toleransından sorumlu kalıcı durumda olarak karakterize edilir (Kim *et al*. 2009, Brigitte *et al*. 2012). Olgun biyofilm birkaç milimetre kalınlığındadır ve biyofilm hücrelerini diğer nişlere yayılmak için çevreye salabilir (Myszka and Czaczyk 2011). Bakteriyel biyofilmler, süt ürünleri işleme, kümes hayvanları ve kırmızı et işleme, mayalama, taze ürünler dâhil olmak üzere birçok gıda endüstrisi dalı için sorunludur (Simões *et al*. 2010). Bakteriyel biyofilm, gıda kontaminasyonu ve gıda kaynaklı patojenlerin bulaşma riski oluşturabilir.

Yukarıda bahsedilen gerçeklerle ilgili olarak ve şu anda patojenik bakterilerin çoğunun biyofilm oluşturucuları olmakla birlikte çoklu ilaca dirençli hale geldiği ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* hakkında çok az şey bilinmektedir.

Bu nedenle bu çalışmanın amacı: hastalardan alınan klinik örneklerde *K. pneumoniae* prevalansını tespit etmek ve gıda örneklerinde varlığını tespit etmektir. *K. pneumoniae* izolatlarının klinik ve gıda kaynaklarından tespit edilmesinden sonra; izolatlar, farklı kaynaklardan izole edilen bakterilerdeki antibiyotik direnç yüzdesini tahmin etmek için antibiyotik duyarlılığı açısından test edilecektir. Çalışmanın ikinci amacı, klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatlarının farklı yöntemler kullanarak fenotipik olarak farklı yüzeylerde biyofilm oluşturma yeteneğini değerlendirmektir. Üçüncü amaç, klinik ve gıda kökenli *K. pneumoniae'de* biyofilm kodlama geninin moleküler tespiti için kullanılan spesifik primerleri tasarlamaktır.

2. LİTERATÜR TARAMASI

2.1 Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae, bir Gram negatif, spor oluşturmayan basil ailesidir, bu ailenin fakültatif anaerobik özellikleri katalaz pozitif olmaları, nitratın nitrite indirgemeleri ve glikoz fermentasyonundan asit üretimi olarak sıralanbilmektedir (Octavia and Lan 2013). Enterobacteriaceae ailesi, insanlık tarihindeki en önemli bakteriyel patojenlerden ikisi olan veba basili *Yersinia pestis* ve tifo basili *Salmonella* serotip Typhi içeren en kritik bakteri aileleri arasında göze çarpmaktadır. *Escherichia coli*, *Klebsiella* ve *Yersinia* ayrıca enterik patojenleri içerir; yine de birçok serotipin (suşların) yalnızca birkaçı, bağırsak yolunu enfekte etmelerine veya kolonize etmelerine ve enterotoksin üretmelerine izin veren virülans faktörlerine sahiptir (Farmer *et al*. 2010).

2.2 *Klebsiella*

Klebsiella spp. Enterobacteriaceae familyasına ait Gram negatif, hareketsiz, genellikle kapsüllenmiş çubuk şeklindeki bakterilerdir. Enterobacteriaceae ailesinin üyeleri genellikle fakültatif anaerobiktir ve genişliği ila 1,0 mm ve uzunluğu 0,6 ila 6,0 mm arasındadır. *Klebsiella* spp. Sıklıkla mukoid kolonilerde görülür. Cins, farklı serogruplara yol açan 77 kapsüler antijenden (K antijeni) oluşur (Janda *et al*. 2006). *Klebsiella* cinsi, klinik mikrobiyolog Edwin klebs'i (1834-1913) onurlandırmak için Trevisan (1885) tarafından adlandırılmıştır. Şimdiye kadar tarif edilen ilk *Klebsiella* türü, Rhinoschleoma hastalarından alınan kapsüle edilmiş bir basildir (Sylvian *et al*. 2009).

2.2.1 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae, memelilerin mukozal yüzeylerinde ve toprakta, bitkilerde ve suda gelişen kapsüllenmiş bir bakteridir. İnsanlarda, *K. pneumoniae* tipik olarak orofarenks ve gastrointestinal sistemi kolonize eder, buradan dolaşıma ve bakteremi, septisemi, cerrahi alan enfeksiyonu, idrar yolu enfeksiyonu ve ventilatörle ilişkili pnömoni gibi

enfeksiyonlara neden olan diğer dokulara kolayca girebilir. Ayrıca mesane nöropatisi veya diabetes mellitus gibi immün sistemi baskılanmış durumlara sahip hastalarda ortaya çıkan yüksek sıklıkta fırsatçı enfeksiyonlara katkıda bulunur (Seifi *et al*. 2016, Ashurst and Dawson 2019). *K. pneumoniae* ayrıca hücre dışı bir matrikste gömülü bakteri toplulukları olan biyofilmler oluşturma kabiliyetiyle de bilinir. Bu matris, proteinler, ekzopolisakkaritler, DNA ve lipopeptitlerden oluşur (Donlan 2002). 1988'de, biyofilm oluşturmaetkinliği *K. pneumoniae*'de ilk kez tanımlandı (LeChevallier *et al*. 1988). *K. pneumonia*, kapsül polisakkaridi, lipopolisakkarit, tip 1 ve tip3 fimbria gibi bazı virülans faktörlerine, dış zar proteinlerine ve demir alımı ve nitrojen kaynağı kullanımına yönelik belirleyicilere sahiptir. *K. pneumoniae* bu virülans faktörlerini hayatta kalmak ve enfeksiyon sırasında bağışıklık sisteminden kaçmak için ve biyofilm oluşumunun kendisi için kullanmıştır (Murphy and Clegg 2012, Li *et al*. 2014). *K. pneumoniae*, bakterilerin canlı veya cansız yüzeylere yapışmasını destekleyen, antibiyotiklerin penetrasyonunu koruyan ve etkilerini azaltan kalın bir hücre dışı biyofilm tabakası oluşturabilir (Vuotto *et al*. 2014, Nirwati *et al*. 2019).

Klebsiella pneumoniae, çoklu ilaca dirençli ve hipervirülan suşların ortaya çıkması nedeniyle hastane ortamlarında acil bir tehdit olarak kabul edilmiştir. *K. pneumoniae* izolatlarının genomik analizleri, çoklu ilaç direnci ve hipervirülansı içeren geniş bir genetik varyasyon yelpazesi göstermiştir (Chung 2016).

2.2.2 *Klebsiella pneumoniae* yeni suşlarının oluşumu

Klebsiella pneumoniae, genel olarak iki alt tipe ayrılabilir; klasik *K. pneumoniae* (cKp) ve klasik olmayan *K. pneumoniae* (ncKp). Bu suşların antimikrobiyal direnç profilleri ve virülans profilleri, kötü şöhretli olarak etiketlenen eski suşlara göre değişir (Gupta 2002). Bununla birlikte, bu ncKp'nin birkaç klonunun, sürekli mutasyonlarından ve dirençli ve öldürücü genler taşıyan plazmitlerin ve transpozonların edinilmesinden dolayı şiddetli ve tedavi edilmesi zor enfeksiyonlara neden olduğu belirtilmiştir; bu, aşağıdakiler gibi suşların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Hipervirülan *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) veya hipermukoviskoz *K. pneumoniae* (HMKP). Bu tür ilk olarak Asya'nın doğu kesiminde tanımlanmış ve o zamandan beri dünya çapında yayılmıştır

(Lee *et al*. 2017). Bu alt tip, kolistin ve karbapenemler gibi yaygın olarak kullanılan antimikrobiyallerin çoğuna dirençli değildir. Bu plazmidlerin ve transpozonların yatay transferi, bu alt tiplerin çoğunun çoklu ilaç direncine (MDR) ve aşırı ilaç direncine (XDR) yol açmıştır. MDR ve XDR *K. pneumoniae* alt tiplerinin yüksek yaygınlık oranı, aşağıdakileri içeren ancak bunlarla sınırlı olmayan çok faktörlü bir yayılma sürecini yansıtır: yüksek riskli küresel çoklu dirençli genetik soyun yayılması (Woodford *et al*. 2011); başarılı çok dirençli plazmitlerin edinimi ve başarılı transpozonlarda bulunan dirençli genlerin edinimi. *Klebsiella*, diğer türlere yüksek genetik transfer (HGT) ile kolaylaştırılan plazmidlerinin yayılmasıyla dünya çapında önemli bir karbapenem direnci kaynağıdır. Bu geniş spektrumlu beta laktamaz (ESBL) ve Karbapenemaz kodlayan plazmitlerin yayılması, bu plazmitlerin edinimi bakterileri MDR ve XDR'ye dönüştürdüğü için büyük bir tehdit oluşturmaktadır (Effah *et al*. 2020).

2.3 Biyofilm

Biyofilmin yapısı ve bileşimi bir çevresel nişten diğerine farklı olduğu için biyofilmin tanımı belirsizdir. Costerton *et al*. (1987), biyofilmi daha yüksek organizmaların dokularına benzer besin kanalları içeren karmaşık bir matris olarak tanımladılar. Carpentier ve Cerf (1993) bunu “bir yüzeye yapışan organik bir polimer matris içine gömülü bir mikrop topluluğu” olarak tanımladı. Percival *et al*. (2000) biyofilmi "homeostatistik olarak düzenlenen, bağımsız bir işleyen ekosistem olarak hareket eden hücre dışı polimerlerin bir matrisinde hareketsizleştirilmiş mikrobiyal hücreler" olarak tanımıştır. Donlan ve Costerton (2002) tarafından mkrobiyal olarak türetilmiş biyofilm topluluğu tanımlanır ve aşağıdaki gibi karakterize edilir:

- Alt tabakaya veya arayüzlere veya birbirine geri döndürülemez şekilde tutturulmuş hücreler.
- Ürettikleri hücre dışı polimerik maddelerin bir matrisine gömülü hücreler ve büyüme hızı ve gen transkripsiyonu açısından değiştirilmiş bir fenotip sergileyen hücreler.

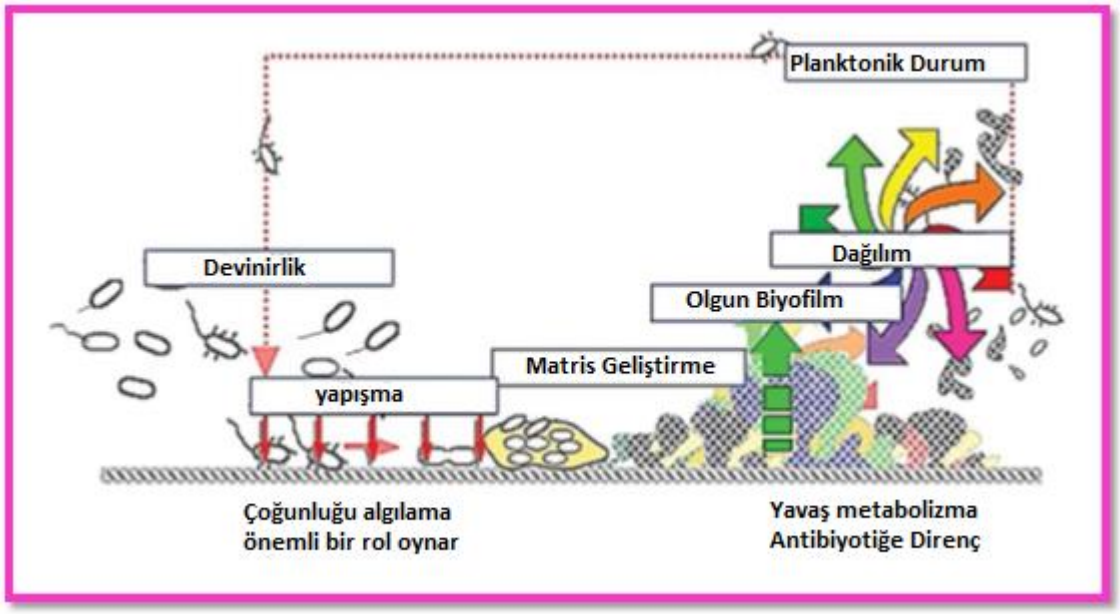
2.3.1 *K. pneumoniae* tarafından biyofilm oluşumu

K. pneumoniae'nin idrar ve solunum yolu enfeksiyonlarına neden olmadaki patojenik başarısı, özellikle kalıcı tıbbi cihazlarda biyofilm oluşturma kabiliyetine bağlanabilir (Hatt and Rather 2008). *K. pneumonia*'da biyofilm oluşumunun da bakteriyel kalıcılığa, yani konağın doğuştan gelen savunma mekanizmaları tarafından öldürmeye duyarlılığın azalmasına katkıda bulunduğu varsayılmıştır (Murphy and Clegg 2012). *K. pneumonia* biyofilmlerinin, ampisilin ve siprofloksasine uzun süre maruz kaldıklarında öldürmeye direndikleri gösterilmiştir (Anderl *et al*. 2000). Tıbbi cihazlardan izole edilen biyofilm oluşturan *K. pneumoniae* suşlarının gentamisin, sefotaksim ve siprofloksasin gibi diğer antibiyotiklere direnci de bildirilmiştir (Bellifa *et al*. 2013). *K. pneumoniae*'de biyofilm oluşumuna katkıda bulunan önemli virülans faktörleri, kapsüler polisakkaritler, tip 1 ve tip 3 fimbriadır (Li *et al*. 2014). Tip 3 fimbria, biyofilm oluşumunu başlatır ve esas olarak MrkA proteininin alt birimlerinden oluşur. Fimbriaların ucunda yer alan MrkD adlı diğer bir bileşen, ekin yapışkan özelliklerini verir ve fimbriyal bağlanma kapasitesini belirler (Murphy and Clegg 2012). Piyojenik karaciğer apsesi (PLA) ile ilişkili *K. pneumoniae* suşlarında, doku invazif olmayan suşlara kıyasla daha yüksek in vitro biyofilm oluşumu gözlenmiştir (Wu *et al*. 2011). Sanchez *et al*. (2013a) çoklu ilaca dirençli *K. pneumoniae*'nin biyofilm oluşturma eğilimini doğrulamıştır. Bununla birlikte, karışık tür biyofilmlerindeki karmaşık türler arası etkileşim ağı hala tam olarak tanımlanmamıştır (Burmolle *et al*. 2014).

2.3.2 Biyofilm oluşumundaki adımlar

Biyofilm oluşumu, hücrelerin bir yüzeyle veya birbirleriyle etkileşimi ile başlatılır. Planktonik bakterilerin, başlangıçta van der Waals kuvvetleri yoluyla zayıf, tersine çevrilebilir yapışma yoluyla yüzeye yapıştığı ve hidrofobik etkilerin toplandığı, ardından hücrelerin hücre dışı bir matris oluşturduğu düşünülmektedir. Bu matris, içindeki hücreleri çevreler ve bunlar arasındaki iletişimi biyokimyasal sinyaller ve genetik değişim yoluyla kolaylaştırır. Mikrobiyal hücreler, ekzopolisakkarit ve su içerir (Sutherland 2001), ve biyofilmde sıklıkla bulunan diğer maddeler arasında hücre dışı DNA, RNA ve toplamda yaklaşık %2'ye ulaşan proteinler bulunur (Pillig *et al*. 2005).

Dispersiyon, biyofilmde son durumdur, dispersiyon anında mikrokoloniler hücre ölümüne ve lizise uğrarlar ve hareketli bakterilerin aktif dağılımıyla içi boş kolonileri geride bırakırlar. Bir biyofilmin büyüme ve dağılma yoluyla dengeyi koruduğu düşünülmektedir. Dağılımın tek hücreler veya küçük mikro koloniler halinde meydana geldiğine inanılmaktadır (Costerton *et al*. 1999) Dispersiyon, biyofilm üreten bakterilerin biyofilm gövdesinden ayrılmasına ve çevreye yayılan başka bir biyofilm mikrokolonisi oluşturmasına yardımcı olur. Biyofilmlerin yapısının, filmdeki belirli organizmalar ve çevre koşulları nedeniyle çarpıcı biçimde farklı olduğu unutulmamalıdır (Bjarnsholt 2013). Biyofilm oluşumundaki adımlar Şekil 2.1 'de gösterilmektedir.



Şekil 2.1 Biyofilm oluşumundaki adımlar (Shakibaie 2018)

2.4 Karışık Tür Biyofilmi

K. pneumoniae dâhil olmak üzere karma mikrobiyal popülasyonların ilk araştırması 1991 yılına dayanmaktadır. Siebel ve meslektaşları, *K. pneumoniae*'nin *P. aeruginosa* ile birlikte in vitro çift tür biyofilm oluşturma yeteneğini gösterdiler. Yazarlar, *K. pneumoniae*'ye özgü hücresel büyüme oranının *P. aeruginosa*'nın beş katı olmasına rağmen, mikrobiyal popülasyona hâkim olmadığını belirlediler. *K. pneumoniae* veya *P. aeruginosa*'nın ne spesifik hücresel ürün oluşum hızının ne de glikoz-oksijen

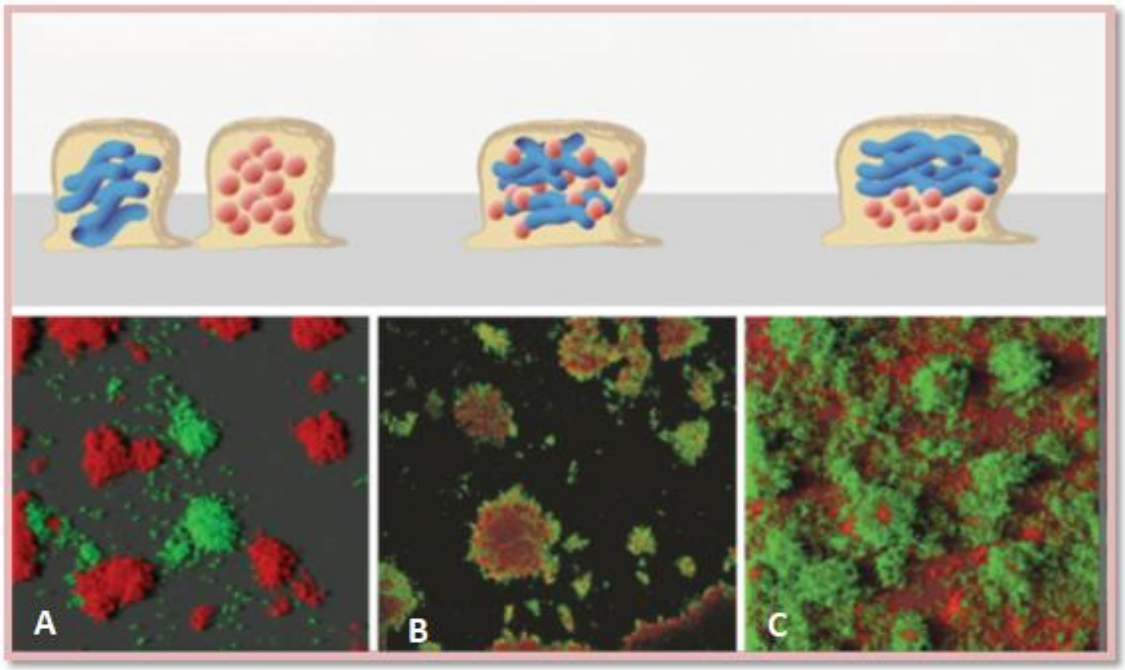
stoikiometrik oranının birlikte büyütüldüğünde diğer türlerin varlığından etkilenmediğini gösteren sonuçlar ortaya konulmuştur. (Siebel and Characklis 1991, Vuotto *et al*. 2014).

Bakteriyel biyofilmlerin günlük yaşamımızın çeşitli yönleri üzerindeki etkisi, son on yılda biyofilmle ilgili çalışmaların sayısının artmasına neden olmuştur. Biyofilmler, farklı topluluk özelliklerine sahip mikro koloniler olarak adlandırılan kümelenmiş yapılar olarak düzenlenmiş, farklılaştırılmış mikroorganizma gruplarıdır (örn. Bakteri ve mantarlar). Özellikle biyofilmler, kimyasal dezenfeksiyona, antimikrobiyal tedaviye ve insan bağışıklık tepkilerine karşı artan direnç gösterir (Costerton *et al*. 1999, Stoodley *et al*. 2004, Hoiby *et al*. 2010). Bununla birlikte, besinler ve fiziksel kaynaklar için iletişim ve/veya rekabet gibi karışık biyofilmler içindeki türler arası dinamikler, tek bir tür popülasyonundan ziyade bir topluluğun dinamiklerini temsil eder. Bu ayrım, biyofilm içindeki tüm topluluğun fenotiplerini kritik olarak etkileyen bir karmaşıklık katmanı oluşturduğundan önemlidir. Karışık tür biyofilmleri şüphesiz doğada baskın formdur ve aynı zamanda insan konakçıda, örneğin kistik fibroz (CF) hastalarının ağız boşluğunda ve akciğerlerinde belirgindir.

2.4.1 Karışık tür biyofilmlerinde hücre-hücre iletişimi

Quorum algılama yoluyla komşu bakteriler arasındaki iletişim, tekli ve karışık bakteri toplulukları içinde etkileşimleri mümkün kılan sosyal bir davranıştır. Quorum algılama, hücre yoğunluğunun bir fonksiyonu olarak konsantrasyonu artıran, ancak aynı zamanda fizyolojik koşullara da bağlı olabilen oto indükleyiciler adı verilen kimyasal sinyal moleküllerinin üretilmesini ve salınmasını gerektirir (Ng and Bassler 2009). Quorum sistemi, bakterilerin belirli genleri koordineli bir şekilde eksprese etmesine izin verir (Miller and Bassler 2001, Antunes and Ferreira, 2009). Quorum algılamanın biyofilmlerin gelişiminde önemli bir rol oynadığı gösterilmiştir (Davies *et al*. 1998, Bjarnsholt *et al*. 2010), ancak etkisi, yani biyofilm oluşumunun indüksiyona karşı bastırılması, bakteri türüne bağlı olarak değişmektedir ve çevre koşulları (Hammer and Bassler 2003, Sakuragi and Kolter 2007). Birkaç Quorum algılama sistemi tanımlanmıştır. Bazıları esas olarak tür içi iletişim için kullanılırken, diğerleri türler

arası iletişimi destekleyerek bakterilerin diğer türlerin varlığını algılamasını sağlar. Özellikle, AI-2 sistemi evrensel olarak kabul edilir ve türler arası iletişime aracılık edebilir (Waters and Bassler 2005, Federle 2009). Bu sistem, birçoğu gerçekten de doğal ortamda birbirleriyle yakın temas halinde bulunan birkaç Gram negatif ve Gram pozitif bakteri türünde tanımlanmıştır (McDougald *et al*. 2003) (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Karma tür biyofilmlerindeki mekânsal dağılım Karma biyofilmlerdeki türler birkaç yolla organize edilebilir: (a) ayrı tek tür mikrokolonileri (Nielsen *et al*. 2000), (b) birlikte toplanma (Rickard *et al*. 2006) (c) katmanlar halinde düzenlenmiştir (Hansen *et al*. 2007)

2.5 Biyofilm İnhibisyonu

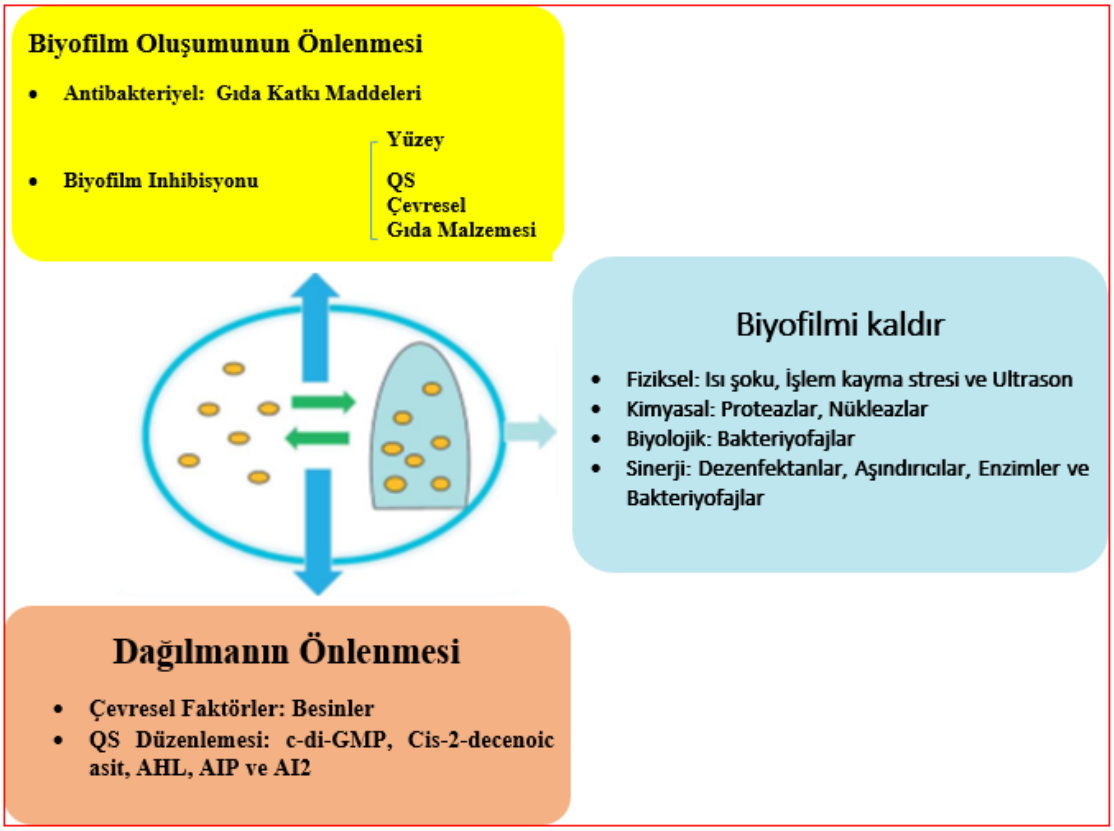
Biyofilm oluşumunun engellenmesi veya önlenmesi uzun zamandır bir çalışma konusu olmuştur. Biyofilm oluşumuna karşı ilk önemli eylem, enfeksiyonu azaltmak için yüzeylere ve konak dokulara bakteri yapışmasını önlemektir (Ofek *et al*. 2003). Bakteriyel yapışmayı önlemek, bakteriyel enfeksiyonu engellemek için çekici bir hedeftir (Bavington *et al*. 2005) ve hücresel reseptörlerin yapışma yüzeylerini tanımasını veya bakteriyel yapışma sürecini engellemeyi içeren birkaç farklı strateji önerilmiştir. Birincil kolonileştiricilerin bloke edilmesi, ilk biyofilm kolonizasyonunu ve ardından biyofilmin kendisinden salınan planktonik hücrelerin ürettiği enfeksiyonu

önleyebilir. Yapışma süreci çeşitli farklı adımlardan oluşur. İlk aşamada, bakteri hücresi, konakçı yüzeyler üzerinde tersinir yapışma etkileşimleri kurarken (Hasty *et al*. 1992), ikinci aşamada, tamamlayıcı bir şekilde bağlanan spesifik molekülleri içeren daha güçlü bir yapışma türü gerçekleştirilir (Ofek *et al*. 2003). Özellikle Gram-negatif bakterilerde yapışma, fimbriae veya pili gibi hücre yüzeyi yapılarıyla ilişkili adhezinler olarak bilinen özel proteinler tarafından aracılık edilir (Kline *et al*. 2009). İlk yapışmanın ardından, sıvı yüzeylerden hidrokinetik kuvvetlerin neden olduğu dislokasyona karşı artan koruma veya konakçı hücreler tarafından salınan besinlere daha iyi erişim dâhil olmak üzere bakterilere bir dizi avantaj sunan karmaşık bir kolonizasyon süreci izler (Zafriri *et al*. 1987). Uzun bir süre, yapışma sürecini engellemek için kullanılan ilk stratejiler, reseptöre bağlanan ve bakteriyel yapışmayı rekabetçi bir şekilde bloke eden adhezin analoglarının kullanımına odaklanmıştır (Ofek *et al*. 2003). Bakteriyel yapışmayı engellemeye yönelik yeni ve ilginç bir yaklaşım, yüzeyin kimyasal özelliklerini değiştiren antimikrobiyal peptidler içeren hücre kaplamalarının kullanılmasından oluşur (Hetrick *et al*. 2006, Tamilvanan *et al*. 2008), böylece bakteriyel yapışmaya müdahale eder ve yüzey bağlanmasını önlemektir. "Pasif" olmasına rağmen, bu yöntem oldukça çekicidir ve yapay tıbbi cihazlardaki biyofilm sorununu ele almak için yeni bir yaklaşım olarak hizmet edebilir. Bununla birlikte, farklı bakteri suşları arasındaki bağlanma değişkenliği nedeniyle şimdiye kadar sınırlı başarılar elde edilmiştir. Birçok aktif polimerik kaplama, yüzeyi bağlamak ve antibiyotikler, bakteriyosinler ve metal iyonları gibi çeşitli antimikrobiyal molekülleri serbest bırakmak için tasarlanmıştır (La *et al*. 2008, Taylor and Webster 2009). Hidrojel kaplı ve serum/hidrojel kaplı silikon kateterlerde *Staphylococcus epidermidis'in* biyofilm oluşumunda önemli bir azalma, ilave edilen divalent katyonlar içeren ve içermeyen polimerden bakteriyofajik faktörlerin salınmasının ardından gözlenmiştir (Curtin and Donlan 2006). Benzer şekilde, piperasilin-tazobaktam kaplı timpanostomi tüplerinin tedavisi, siprofloksasine dirençli *Pseudomonas aeruginosa'nın* (CRPA) biyofilm enfeksiyonunu azaltır (Jang *et al*. 2009). Bu yaklaşımın olumsuz yönü, belirli bir hedef olmaksızın genellikle MIC değerlerinden daha yüksek aktif polimer tarafından kısa sürede yüksek konsantrasyonda antimikrobiyallerin sürekli salımı olabilir. Bununla birlikte, hedef salım polimeri, endüstriyel gıda güvenliği ve paketlemede biyofilm işlemlerinin yeniçağı olarak öngörülebilir (Balasubramanian *et al*. 2009). Son

zamanlarda, biyofilmlerin önlenmesi ve tedavisi için planktonik hücrelerin öldürülmesine yönelik farklı bir yaklaşıma büyük önem verildi. Çizelge 2.1 ve Şekil 2.3 bazı antibiyofilm stratejilerini göstermektedir.

Çizelge 2.1 *K. pneumoniae* biyofilmlerine karşı bazı antibiyofilm ajanları (Ribeiro *et al*. 2016)

Antibiyofilm ajanları	**Grup sınıflandırması**	**Tanımlanan biyofilm eylemi**
Rezerpin, Berberin	Alkaloid	Önleme
Eugenol, Kurkumin	Fenolik bileşik	Önleme
Kitosan	Polisakkarit	Önleme
Bakteriyel ekzopolisakkaritler	Polisakkarit	Önleme
DNaz Dekstranaz Lizozim	Enzim	Biyofilm azaltma
Bakteriyofajlar	Virüs	Biyofilm azaltma
Gümüş nanopartiküller (AgNps)	Nanopartiküller	Önleme
Ag/HPMC Hidrojel	Nanopartiküller	Önleme
Demir oksit C14 nanoyapıları ile stabilize edilmiş Vanilya, paçuli ve Ylang uçucu yağları	Nanopartiküller	Önleme
Linoleik asit	Yağ asidi	Önleme
Cis-2-dekenoik asit	Yağ asidi	Önleme, biyofilm azaltma ve dispersiyon



Şekil 2.3 Gıda güvenliği, önleme ve uzaklaştırma için anti-biyofilm stratejileri. (Zhao *et al*. 2017)

2.6 Biyofilm Saptama Yöntemleri

Biyofilm üretimi birkaç yöntemle değerlendirilebilir. Biyofilmlerin varlığını taramak için standart test, polistiren ve diğer hidrofobik substrat üzerindeki hücrelere bağlanan boyayı ölçerek kristal moru (CV) testidir (Djordjevic *et al*. 2002). Doku Kültür Plakası (TCP) yöntemi (Hassan *et al*. 2011) aynı zamanda en yaygın uygulanan standart yöntemlerden biridir. Kongo Kırmızısı Agar ve Tube method (TM) yöntemine kıyasla daha güvenilir bir işlemdir (Freeman *et al*. 1989, Hassan *et al*. 2011). Biyofilmin saptanması için diğer yöntemler arasında biyolüminesan tahlil, (Sanchez *et al*. 2013b) biyofilm görüntüleme teknolojisindeki ilerlemelerin, biyofilmlerin karmaşıklığını ve dinamiklerini anlamak için çok önemli olduğu kanıtlanmıştır. Bu optik teknikler arasında floresan mikroskobik inceleme, (Zufferey *et al*. 1988) taramalı elektron mikroskobu (SEM), (Singer *et al*. 2006) eş odaklı taramalı lazer mikroskobu (CSLM), ışık mikroskobu, kızılötesi spektroskopi, yansıra spektroskopisi ve biyofilmin varlığını

kontrol etmek ve 3D yapısını görselleştirmek için kullanılabilen optik florometri bulunmaktadır (Wiggli *et al*. 1999, Gomes *et al*. 2011).

Yansıtma testi, abiyotik yüzeylerdeki ve bir dereceye kadar biyotik yüzeylerdeki biyofilmler için yarı kantitatif, ucuz ve tahribatsız bir optik testtir. Bu tahlil, biyofilm oluşumunun durumunu ve morfolojisini inceleyebilir ve ayrıca bakterilerin biyofilm oluşturma yeteneğini ortaya çıkarır (Paquet-Mercier *et al*. 2014). Biyofilmin kimyasını karakterize etmek için NMR ve FTIR kullanıma alınabilir. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) görüntüleme sonuçları, biyofilmler içindeki su dinamiklerini, moleküler dinamikleri ve biyomolekül difüzyonunu gösterir (Hornemann *et al*. 2009).

2.7. *Klebsiella* Biyofilm Oluşumunun Genetik Belirleyicileri

K. pneumoniae'deki biyofilm oluşumu, kapsül biyosentezinden ve yüzey EPS'lerinden sorumlu genlerdeki mutasyonlardan etkilenir (Balestrino *et al*. 2008).

Klebsiella oxytoca, antibiyotikle ilişkili hemorajik kolite neden olan ajanlardan biridir (Hoffmann *et al*. 2010). Öte yandan *Klebsiella spp*. hem *Klebsiella pneumoniae* hem de *K. oxytoca'*da bulunan, çoğunlukla kapsül ve tip 1 ve tip 3 fimbria dahil olmak üzere çeşitli yapışkan yapı türleri (Curiel *et al*. 2013) yoluyla biyofilmler üretir. Tip 3 fimbria alt birimi proteinleri, mrkABCDF (*Klebsiella* spp.'nin mannoz dirençli adezinleri) genleri tarafından kodlanan başlıca bakteriyel adhezinleri oluşturur; bunlardan *mrkA* ve *mrkD*, sırasıyla ana alt birimler ve bağlanma alt birimleridir (Cheryl *et al*. 2010). Tip 3 fimbrial genler, kromozomal, konjugatif plazmidler ve transpozonlar tarafından kodlanır (Ares *et al*. 2016). Bu bağlanma yapıları esas olarak biyofilm üreticisi izolatlar arasında tespit edilmiştir. MrkD alt birimi, bu bölgedeki mutasyonlardan dolayı izolatlar arasında dizi varyasyonlarını içerir (Huang *et al*. 2006). *K. oxytoca* izolatlarının epitel hücrelere bağlanması, biyofilm oluşumuna ve enfeksiyonun kalıcılığına veya enfeksiyonun ortadan kaldırılmasında zorluğa yol açar. Biyofilm kodlama genleri ile izolatların antibiyotik direnç paterni arasındaki ilişki tam olarak ortaya çıkarılmamıştır (Ong *et al*. 2008). Toksin üreten izolatlar, ilgili *npsA* ve *npsB* genlerinin hücre kültürü ve PCR amplifikasyonu ile tanımlanır (Schneditz *et al*. 2014).

Tip 3 fimbrial adezinler *K. pneumonia*'nın endotel hücreleri, solunum yolu epitel hücreleri ve idrar yolu gibi çeşitli insan hücrelerine bağlanmasına aracılık edebilir, MrkD proteini mikroorganizmanın kolajen moleküllerine bağlanmasında önemli bir faktördür (Melo *et al*. 2014). Biyofilm oluşumu ile ilgili adezinlerin (fimH ve mrkD) varlığı da araştırılmıştır (Jarjees 2014). Farklı mikroorganizmalar, hücre dışı polimerik maddeler (EPS) matrisi içinde mikro topluluklar oluşturmak için bir araya gelir ve biyofilm olarak adlandırılır. Bir mikroorganizmanın biyofilm oluşturma yeteneği önemli bir virülans faktörüdür ve bu tür biyofilmler birçok kronik enfeksiyonun ana nedenidir (Swarna *et al*. 2012). Biyofilm oluşumu, diyabetik ayak enfeksiyonları (DFI'ler) ve idrar yolu enfeksiyonları (Poovendran and Ramanathan 2014) gibi kronik yaralarda yaygındır. Biyofilmler, antimikrobiyal ajanlara duyarlılığı azalttığı için büyük bir tıbbi öneme sahiptir. Bir biyofilm içindeki mikrobiyal ajanlara karşı azalan duyarlılık, antimikrobiyal ajanların difüzyonunun fiziksel bozulması, azalmış bakteriyel büyüme oranları ve antimikrobiyal ajanın aktivitesini bozabilen mikroorganizmaların (MO) lokal değişiklikleri dahil olmak üzere birçok faktörden kaynaklanır (Pramodhini *et al*. 2012).

2.8 Gıda Ortamındaki Biyofilmler

Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların, yüzeylerin, besleyicilerin ve suyun bulunduğu hem doğal hem de endüstriyel ortamlarda kendiliğinden meydana gelir, patojenik bakteriler tarafından oluşturulan biyofilmler, gıda güvenliğini önemli ölçüde tehlikeye atabilecekleri için gıda hijyeni bağlamında özel ilgi konusudur (Giaouris and Simões 2018). Bozulma mikroflorası içerenler, gıda kalitesini düşürebilir, ürünlerin raf ömrünü sınırlayabilir ve diğer bazı önemli sorunlara (örn., membranların tıkanması, enerji maliyetlerinde artış, biyolojik kirlenme ve korozyon sorunları) neden olabilir. Biyofilm matrisi, büyük ölçüde, antimikrobiyallerin, difüzyonlarını geciktirerek, onları temizleyerek ve hatta etkisiz hale getirerek ve paralel olarak hücrelerin yerel mikro ortamını değiştirerek, daha yavaş büyüme hızları ve stres adaptasyonları ile sonuçlanan biyofilm kaplı mikroorganizmalara karşı azaltılmış etkinliğini açıklar. Bu genellikle polisakkaritler, proteinler, lipitler ve nükleik asitlerden oluşur.

İkincisi ile ilgili olarak, hücre dışı DNA'nın (e-DNA) mevcudiyeti, son zamanlarda birkaç mikroorganizmanın biyofilm matrislerinin önemli bir bileşeni olarak rapor edilmiştir. Matris, biyofilm stabilitesinde önemli bir rol oynadığından, onu birbirine yakın tutarak ve mikrobiyal hücreleri nemlendirdiğinden, bozunması etkili bir antibiyofilm stratejisini içerebilir. Bu, ana bileşenlerini hedefleyen enzimler kullanılarak sağlanabilir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1 Materyal

3.1.1 Cihazlar ve ekipmanlar

Bu çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipmanlar, Çizelge 3.1'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 Çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipmanlar ile bunların menşeileri ve üretici şirketleri

Cihaz	**Şirket**
Otoklav	Fisher
Santrifüj	C.Cell
Derin Dondurucu	Sanyo
Elektrik Dengeleyici	Precisa
Elisa Okuyucu HS	Bio Tek
Jel elektroforez cihazı	Cleaver
İnkübatör	Nave
Işık Mikroskobu	Olympus
Mikrospin Santrifüj	Hettachi
Mikropipet	Dragon-med
Master Cycler Gradient PCR	Eppendorf
pH metre	Hanna
Buzdolabı	Beko
Çalkalamalı İnkübatör	Gallenkamp
UV Transilluminator dokümantasyon sistemi	Ultra Violet products institute
Vitek Sistemi	Biomerieuk
Vorteks	Memmert
Su Distile	EuroPages
Su Banyosu	Fisher

3.1.2 Kimyasal ve biyolojik malzemeler

Bu çalışmada kullanılan kimyasal ve biyolojik malzemeler Çizelge 3.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2 Çalışmada kullanılan kimyasallar ve biyolojik malzemeler

Kimyasal	Şirket
100 DNA Ladder (DNA Merdiveni)	Gene Dires
Agaroz	ABD
Agar-Agar	Hi-Media
Saf ethanol (%99)	Merk
AccuPower PCR PreMix	Bioneer
Deiyonize steril Distile su	Bioneer
Etil Alkol (Ethanol)	GCC
Kongo Kırmızısı	BDH
Geneaid DNA İzolasyon Kiti (Bakteri)	Geneaid
Gliserol	GCC
Gram Boyama Reaktifleri	ABD
Hidroklorik Asit (HCl)	BDH
RedSafe	ABD
Nükleaz İçermeyen Su	Promega
Serum Fizyolojik (Sterile)	S.D.I
Sodyum Hidroksit (NaOH)	BDH
Tris-Borat-EDTA Tampon (TBE 10X)	Bio Basic INC

3.1.3 Kültür ortamı (Kültür besiyeri)

a) Kültür ortamının kullanıma hazırlanması: Çalışmada kullanılan kültür ortamı Çizelge 3.3'de listelenmiştir.

Çizelge 3.3 Çalışmada kullanılan kültür ortamı

Kültür Ortamı	Bileşimleri	Şirket
BHI Beyin Kalp İnfüzyonu	HM infusin gücü, BHI gücü, Proteoz pepton, Dekstroz, sodyum klorit, Disodyum hidrojen fosfat	Hi-media
Eozin Metilen Mavisi	Pdeptone, Dipotasyum fosfat, Eozin-y, Metilen mavisi, Agar	Hi-media
MacConkey Agar	Peptonlar, Jelatinin pankreas sindirimi, Laktoz monohidrat, Safra tuzları, sodyum klorit, Kristal Menekşe, Nötr kırmızı, Agar	Hi-media
Muller Hinton Agar	HM infusin, Asikaz, nişasta, Agar	Hi-media
Besin Agarı	Typical Formula, Lab-Lemco'gücü, Maya özü, Peptone, sodyum	Oxoid
Nutrient broth (Besin İnfüzyonu)	Lab-Lemco'gücü, Maya özü, Peptone, sodyum klorit	Oxoid
Salmonella Shiglla (S.S) Agar	Proteoz pepton, Safra tuzları karışımı, sodyum tiyosülfat, Ferrik sitrat, Parlak yeşil, Nötr kırmızı, Agar	Hi-media
Triptik soya suyu	Kazeinin pankreas sindirimi, Soya küspesinin papaik sindirimi, sodyum klorit, Dekstroz, Dibazik potasyum fosfat	Hi-media
Ksiloz Lizin Deoksilat (XLD) Agar	Maya özü, L-Lizin, Laktoz, Sakaroz, Ksiloz, sodyum klorit, sodyum tiyosülfat, sodyum deoksikolat, Ferrik amonyum sitrat, Fenol kırmızısı, Agar	Hi-media

Çizelge 3.3'de listelenen tüm ortamlar üreticinin talimatlarına göre hazırlanmıştır, pH 0,1N NaOH veya 0,1N HCl ile 7'ye ayarlanmıştır, sonra 121ºC / 15 pound / inche²'de 15 dakika otoklavlanarak sterilize edilmiştir (sadece kaynatılmış S.S ve XLD hariç), daha sonra hazırlanan ortam steril tüplere ve Petri kaplarına dağıtılmıştır.

a) Kongo kırmızısı agar

Bu kültür ortamı (besiyeri), Bu besiyeri, 37 g beyin kalp infüzyon bulyonunun, 50 g sukroz ve 15 g agar-agar ile 900 ml damıtılmış su içinde çözülmesiyle hazırlanmıştır. Otoklavlanarak 55-60^{o}C'ye soğutulmuş ve kongo kırmızısı solüsyonu ile karıştırılmıştır (0,8 gr Kongo kırmızısı boyasının 100 ml distile suda çözülerek hazırlanmış ve otoklavlanmıştır). Daha sonra kültür ortamı, siteril bir petri kabına aktarılmıştır. Bu

kültür ortamı, bakteriyel yapışkan (slime) tabakası oluşturulma yeteneğinin tespiti için kullanılmıştır.

b) Triptik soya - glikoz

Triptik soya et suyu üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır ve %1 w / v glikoz ilave edilmiştir. Bileşenler 100 mililitre damıtılmış su içinde çözündürülmüştür. Ortam tamamen çözündükten sonra otoklavlanmıştır, ardından triptik soya-glikoz broth, steril tüplere dağıtılmıştır.

3.1.4 McFarland standart solüsyonu

McFarland standardı, test süspansiyonunun bulanıklığını McFarland Standardı ile karşılaştırarak, sıvı süspansiyonundaki yaklaşık bakteri sayısını standardize etmek için kullanılmaktadır. Bir McFarland Standardı, 9,5 mL %1'lik sülfürik aside (H_2SO_4), 0,5 mL %1'lik Baryum Klorür ($BaCl_2$) eklenmesiyle oluşturulan kimyasal çözeltidir. Bu iki kimyasal arasındaki reaksiyon, 1,5x108 CFU / ml içeren bakteriyel süspansiyon ile karşılaştırılabilir bir bulanıklık sağlamak üzere, spesifik optik yoğunluğa sahip Baryum Sülfat çözeltisinin oluşumu ile sonuçlanmaktadır.

3.1.5 Agaroz jel elektroforezinde ve PCR amplifikasyonunda kullanılan malzemeler

a) Tris – Borat – EDTA (TBE) tampon: Tris bazı, borik asit ve EDTA'dan oluşan TBE tamponu (10X) (Bio Basic INC/Kanada) kullanılmıştır. pH 8,3'e ayarlanmıştır. Ardından Jel elektrofezinde kullanılan 1X çözelti elde etmek için 100 mL (10X) TBE, 900 mL D.W'ye eklenmiştir.

b) DNA merdiveni (100 baz çifti): Tedarikçi (GeneDires) tarafından sıvı olarak sağlanan 100 ila 1500 bp'lik çift sarmallı DNA'nın boyutunu belirlemek için özel olarak 100 bp DNA merdiveni elde edilmiştir, DNA örneği Presto Mini gDNA Bacteria Kit ile elde edilmiştir.

c) PCR AccuPower PreMix (PCR ön karışımı): PCR AccuPower PreMix, tedarikçi (BIONEER) ilk reaksiyon karışımı PCR ön karışımı şunlardan oluşmaktadır: 1U taq DNA polimeraz, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1,5 mM $MgCl_2$ ile 1X reaksiyon tamponu, stabilizör ve izleme boyası.

3.2 Yöntem

3.2.1 Numunelerin toplanması

Nisan-Ağustos 2020 arasındaki dönemde toplam yüz Klinik ve gıda numunesi toplanmıştır. Thi Qar (IRAK)'daki AlHussain eğitim hastanesinden idrar, yara ve kateterle ilişkili idrar 50 klinik idrar örneği toplanmıştır.

50 Gıda örnekleri Bağdat vilayetindeki yerel pazarlardan, Irak Standart Kriter No 2/2270'in numune alma (2006) talimatlarına göre rastgele toplanmıştır.

3.2.2 Bakteri izolasyonu

Toplanan klinik ve gıda örnekleri, *Klebsiella*'yı izole etmek için seçici ve farklı besiyerinde kültür edilmiştir.

Klinik numunelerden bakterilerin izole edilmesi: 50 adet klinik numunenin tamamı, MacConkey agar üzerinde inoküle edilmiş ve 37 ^{o}C sıcaklıkta 24 saat inkübe edilmiştir.

Gıda numunelerinden bakterilerin izole edilmesi: Her bir gıda numunesinden 1 gram alınarak, 9 mL DW içerisinde süspanse edilmiş ve 30 dakika bekletilmiştir. Ardından her infüzyon (broth) / numune karşımından 1 mL steril bir pipet ile alınarak steril bir petri kabının ortasına yerleştirilmiştir. Erimiş soğutulmuş MacConkey agarı (yaklaşık 15 mL), seyreltilmiş numuneyi içeren petri kabına eklenmiş ve iyice karıştırılmıştır. Agarın katılaşması ile birlikte, plaka ters çevrilerek 24 – 48 saat aralığında 37 ^{o}C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Son olarak, büyüyen koloniler ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir.

3.2.3 Tanımlama

Bakteriyel izolatlar, MacFaddin'in (2000) belirtiği yönteme göre seçici ve diferansiyel ortamda hem mikroskobik hem de makroskopik özellikler kullanılarak cins düzeyinde tanımlanmıştır. Vitek sistemi ile bu tanımlama tür düzeyinde doğrulanmıştır.

Seçici ve diferansiyel kültür ortamındaki kültür özellikleri

MacConkey, EMB, XLD ve S.S ortamı: Organizmalar, MacConkey Agar ortamında kültürlenmiş ve gece boyunca 37 ^{o}C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonucunda soluk hücreler ihmal edilmiş, pembe koloniler 37 ^{o}C'de subkültüre edilmiş ve *E. coli* (parlak yeşil metalik) ve *K. pneumoniae* (mor) koloniler ayrım yapmak için EMB'de subkültüre edilmiştir. MacConkey agar üzerinde *Klebsiella* büyük, dışbükey, mukoid pembe koloniler olarak görünmüştür. *Citrobacter freundii*, 37^{o}C'de 18 saat sonra XLD'de siyah merkezli ve sarı kolonilere sahip soluk koloniler olarak görünen S.S üzerinde kültürlenerek daha ayrıntılı bir şekilde incelenmiştir (Bettelheim *et al*. 1993).

Mikroskobik inceleme: Bakterilerin morfolojik özelliklerinin incelenmesi ve gram boyasına verecekleri yanıtın gözlenmesi için, pozitif kültürden şüpheli görülen koloninin bir kısmı alınmış ve temiz bir lam üzerine sabitlenmiştir. Bunun ardından gram boyaması yapılmıştır. Daha sonra, yağ ile imersiyon gerçekleştirilmiş ve ışık mikroskobu altında incelenmiştir.

Bakteriyel izolatların vitek – 2 sistemi ile incelenmesi: Bakteri izolatlarının belirlenmesi, duyarlılık testi ve koloni sayımı için Vitek -2 kullanılmıştır. Vitek – 2, İki parçalı kompakt bir sistemdir. Cihaz ve bilgisayardan oluşmaktadır.

Prensip: Vitek – 2, büyüme temeli teknolojisini kullanan otomatik bir mikrobiyoloji sistemidir. Sistem otomatik olarak inkübe edilen ve yorumlanan kolorimetrik (renk ölçümsel) reaktif kartlarına sahiptir. Vitek – 2 kompakt bir florometrik analizdir. Reaktif kartları, her biri ayrı test substratı içereilen 64 çukurcuğa sahiptir. Substratlar, inhibe edici maddelerin varlığında asitleştirme, alkalileştirme, enzim hidrolizi ve büyüme gibi çeşitli metabolik aktiviteleri ölçmektedir. Kartın her iki tarafında bulunan optik olarak saydam bir film uygun düzeyde oksijen iletimi sağlamaktadır. Bu esnada

sızdırmaz bir haznede muhafaza edilmektedir. Bu, organizma – substrat temasını önlemektedir. Her bir kart, inokülasyon için kullanılan önceden yerleştirilmiş bir transfer tüpüne sahiptir. Kartlarda, ürün türü, lot numarası, son kullanma tarihi ve kartın sisteme yüklenmesinden önce veya sonra numuneye bağlanabilen benzersiz bir tanımlayıcı hakkında bilgi içeren barkodlar bulunmaktadır.

String (İpliklenme) Testi: String Testi ile 37 ^{o}C'de gece boyunca büyümeye bırakılan bir agar plakasındaki koloni alınarak bakteriyoloji inokülasyon döngüsü kullanılmıştır. Mukoid ipliklenme oluşumu 5 mm'nin üzerinde olduğu görülmüş ve string testi pozitif tanımlanmıştır.

3.2.4 Bakteriyel koruma

a) Kısa süreli saklama: Her bir bakteriyel izolatın tekli saf kolonisi, besleyici agar kültür plakaları ve besleyici agar eğimleri üzerinde sürme yöntemi ile ekilmiştir ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Buzdolabında 4^{o}C'de plaka ve slantlar için bir ila üç ay arasında saklanmıştır.

b) Uzun süreli saklama:

- **Saplama kültür yöntemi:** Saf izole bir koloni, 18 saat boyunca besleyici agar içine saplanmıştır. Daha sonra 37 °C'de 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve oda sıcaklığında karanlık ortamda muhafaza edilmiştir.
- **B- Gliserol yöntemi:** Sıvı besiyeri, bir gece boyunca saf bakteri kültürünün öze dolusu ile inoküle edilmiş ve 37 ^{o}C sıcaklıkta inkübe edilmiştir. Bunun takiben 18 saat sonra inokülata %15 – 30 derişim oranıyla gliserol eklenmiş ve -20 ^{o}C sıcaklıkta 18 ay süre muhafaza edilmiştir.

3.2.5 Antibiyotik duyarlılık testi

Modifiye Kirby – Bauer yöntemi aşağıdaki şekilde uygulanmıştır (Benson 2001, Morello *et al*. 2006)

a) Test plakasının inokülasyonu:

A. Plaklar steril bir eküvyon çubuğunun (svap), inoküluma batırılması ile inoküle edilmiş ve fazla sıvı besiyeri inokülasyondan önce swabın sıvı seviyesinin üzerinde, tüpün kenarına sıkıcı bir şekilde bastırılması ve döndürülmesi yoluyla svap'tan çıkarılmıştır.

B. Eküvyon çubuğu, her uygulamadan sonra plakaya 60^{o} lik bir açıyla döndürülerek üç kez kültür ortamının yüzeyin sürülmüştür. Son olarak çubuk, agar yüzeyinin kenarından geçirilmiştir.

C. İnokülum, kapağı kapalı olarak birkaç dakika boyunca oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

D. Steril bir forseps kullanılarak antibiyotik diskler inoküle edilemiş plakaya yerleştirilmiştir. Diskler, oda sıcaklığında ısıtılmış ve ardından agar yüzeyine dağıtılmıştıe. Steril forseps ile nazik bir şekilde aşağı doğru bastırılmıştır.

E. Plakalar 30 dakika içinde inkübasyona alınmış ve 18-24 saat boyunca 37 °C sıcaklıkta inkübe edilmiştir

b) Sonuçların okunması: İnkübasyondan sonra, tam inhibisyon bölgesinin çapları not edilmiştir ve milimetre cinsinden ölçülmüştür. Her bir antimikrobiyal ajan için inhibisyon bölgesinin çapı, standart inhibisyon bölgesi, Çizelge 3.4 ile karşılaştırılarak duyarlı, orta ve dirençli kategoriler açısından çevrilmiştir.

Çizelge 3.4 Ulusal Klinik Laboratuvar Komitesi standartlarına göre inhibisyon bölgelerinin çap yorumlayıcı standartları

ID	Antimikrobiyal Ajan	Disk Potansi	İnhibisyon bölgesinin çapı (mm)		
			Hassas	Orta	Dirençli
1	Ceftriaxone (CTX)	30mg	≥23	20-22	≤19
2	Levofloxacin (LEV)	5mg	≥17	14-16	≤13
3	Amoxicillin-clavulanate (AMC)	30mg	≥20	-	≤19
4	Cephalothin (KF),	30mg	≥18	15-17	≤14
5	Nitrofurantoin (NIT)	300mg	≥17	15-16	≤14

3.2.6 Minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) tayini

Amoksisilin / klavulanik asit ve Ceftriaxone'un (Çünkü bu iki tür antibiyotik en yaygın olanıdır) antimikrobiyal etkinliği standart sıvı dilüsyon yöntemi kullanılarak incelenmiştir. MIC, ayarlanmış bakteri konsantrasyonu (1 × 108 CFU / ml, 0,5 McFarland standardı) ile 4 ug / ml ila 500 ug / ml arasında değişen konsantrasyonlarda seri iki kat seyreltmeler kullanılarak sıvı besinyerinde (NB) tespit edilmiştir. Bu çalışmada kullanılan pozitif kontrol, test edilen bakteri konsantrasyonlarına sahip NB ortamını içerirken, negatif kontrol sadece NB besiyerini içermekteydi ve inkübasyon süresi ve sıcaklığı sırasıyla 24 saat ve 37 °C idi. MIC, mikroorganizmaların %99 büyümesini görsel olarak inhibe eden en düşük antimikrobiyal ajan konsantrasyonudur. MIC, inkübasyondan önce ve sonra tüplerin görsel bulanıklığıyla not edilmiştir.

3.2.7 *K. pneumoniae* ile yapışkan tabakası ve biyofilm oluşumunun tespiti

Klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae*'nin oluşturduğu biyofilmin fenotipik tespiti üç yöntem kullanılarak sağlanmıştır. Bu yöntemler şu şekilde sıralanmaktadır:

- Kongo Kırmızısı Agar
- Tüp yöntemi (Christensen)
- Mikrotitre Plak Yöntemi

a) Kongo kırmızısı agar ile yapışkan tabaka üretiminin tespit edilmesi: 37 adet klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatı biyofilm Kongo Kırmızısı Agar (2.1.3.1.1) oluşturma yetenekleri açısından test edilmiştir. KKA, bakteriyel izolatlar ile aşılanmış ve plakalar, aerobik olarak 24-48 saat 37 °C'de inkübe edilmiştir. Kuru kristal kıvamına sahip siyah koloniler pozitif sonuç verirken, pembe koloniler yapışkan olmayan tabaka üreticileri olarak kabul edilmiştir. Kolonilerin koyulaşması, lakin kuru kristalin kolonyal morfolojinin olmaması, belirsiz bir sonuca işaret etmiştir.

b) Tüp yöntemi (TM) (Christensen metodu): Görünür film oluşumunun bir sonucu olarak biyofilm üretici mikroorganizmanın tespiti için kalitatif bir tahlil olan tüp yöntemi (TM) Christensen *et al.* tarafından (1985) yılında tanımlanmıştır. Bu yöntem

kullanılarak, izolatlar, TSB içeren cam test tüpüne inoküle edilmiş ve 24 saat 37 ° C'de inkübe edilmiştir. Cam deney tüpü duvarlarında biyofilm oluşan sesil (uzantısız) izolatlar 1 saat safranin ile boyanmıştır. Planktonik hücreler fosfat tamponlu salin (PBS) ile iki kez durulanarak boşaltılmıştır. Daha sonra, safranin lekeli cam test tüpü, lekeyi boşaltmak için PBS ile iki kez durulanmıştır. Test tüpünün hava ile kurutulmasından sonra, gözle görülür film oluşumu tüp duvarları ve tüpün dibinde biyofilm üretimini göstermektedir.

c) Mikrotitre plak yöntemi: Mikrotitre plak yöntemi, daha önce yapılan çalışmalarda da açıklanan kantitatif bir testtir (Coffey and Anderson 2014). Bu yönem, biyofilm oluşumunu tespit etmek için altın standart teknik (Bu, izolatların farklı yüzeylere yapışma yeteneğini test etmek içindir) olarak kabul edilmektedir. Taze agar plakalarından izole edilen bakteriyel izolatlar, %1 g / h glukoz (madde hazırlandığı gibi) ile 10 ml triptik soya infüzyonu (TSB) içinde inoküle edilmiş ve 37ºC'de 24 saat süreyle inkübe edilmiştir. Kültür daha sonra taze ortam ile 1: 100 oranında seyreltilmiştir; steril 96 oyuklu düz tabanlı polistiren doku kültürü plakasının her bir gözüne kuyucuğuna eklenmiştir. Negatif kontrol kuyucukları sadece steril infüzyon ile doldurulmuştur. Plakalar 24 saat boyunca 37° C'de inkübe edilmiş, inkübasyondan sonra her kuyucuğun içeriği hafif vurma darbeleri ile çıkarılmıştır. Kuyucuklar, serbest yüzen bakterileri yok etmek için bir kez steril damıtılmış su ile yıkanmıştır. Yapışan bakterilerin oyuklara oluşturduğu biyofilm kristal viyole (%0,1) w / v ile boyanmıştır. Fazladan kalan lekeler, damıtılmış su kullanılarak temizlenmiş ve plaka kurumaya bırakılmıştır. 630 nm dalga boyunda mikro ELISA oto okuyucu (model 680, Biorad, İNGİLTERE) boyalı yapışkan biyofilmin optik yoğunluğunu (OD) tespit etmek için kullanılmıştır. Deney üç kez yapılmış ve üç kez tekrarlanmıştır. Hem klinik hem de gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatları biyofilm oluşturma yetenekleri açısından test edilmiştir. Suşlar şu şekilde sınıflandırılmıştır: OD ≤ OD c = biyofilm üreticisi değil; OD c <OD ≤ (2 × ODc) = zayıf biyofilm üreticisi; (2 × OD c) <OD ≤ (4 × OD c) = orta biyofilm üreticisi ve (4 × OD c) <OD = güçlü biyofilm üreticisi. Burada OD c, bakteri inokülasyonu olmayan ortam içeren kontrol oyuklarıdır (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 Biyofilm üretiminin yorumlanması. Optik yoğunluk kesme değeri (ODc) = negatif kontrolün ortalama OD'si + negatif kontrolün 3x standart sapması (SD)

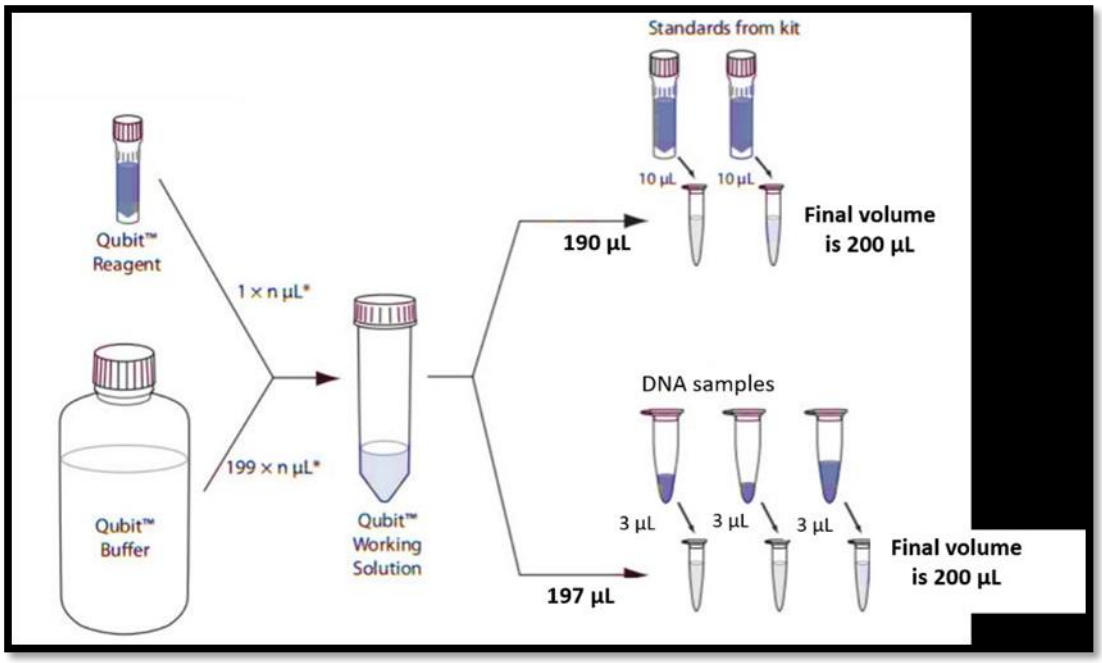
Ortalama OD Değeri	Biyofilm Üretimi
≤ OD /ODc < ~ ≤ 2x ODc	Yok / zayıf
2*OD c < OD t ≤ 4*OD c	Orta
4*OD c < OD t	Güçlü

3.2.8 PCR ile biyofilm kodlama geninin moleküler tespiti

a) DNA ekstraksiyonu: Genomic DNA mini kit (Geneaid, Tayland) protokolü kullanılarak ekstrakte edilen DNA gram negatif bakteriler için şu adımlar izlenilmiştir.

1. 1,5 ml'lik bir bakteri infüzyon hacmi, 1,5 ml'lik bir mikro santrifüj tüpüne aktarılmıştır ve 16.000 rpm'de 1 dakika santrifüjlendikten sonra süpernatan atılmıştır. 180 ul GT Tamponu ilave edilmiştir, ardından hücre pelleti vortekslenerek yeniden süspanse edilmiştir. Bunu takiben 20 µl Proteinaz K ilave edilmiştir. Ardından 60ºC'de 15 dakika inkübe edilmiştir.
2. GB tampon (200µL) 5 saniye süreyle kuvvetli bir şekilde çalkalanarak eklenmiştir, ardından 70˚C'de 10 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sırasında, tüpler her 3 dakikada bir ters çevrilmiştir.
3. Saf etanol (200uL) ilave edilmiş ve kuvvetlice çalkalanarak karıştırılmıştır, daha sonra bir mini kolona aktarılmışt ve 2 dakika boyunca 13000 rpm'de santrifüjlenmiştir.
4. Toplama tüpü atıldı ve GD kolonunu yenisine yerleştirilmiştir.
5. W1 tamponu (400uL) eklendi, ardından 13000 rpm'de 30 saniye süreyle santrifüjlenmiştir.
6. Yıkama tamponu (600 uL) ilave edildi, 13000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir.
7. Kolon matrisini kurutmak için GD kolonu 13000 rpm'de 3 dakika santrifüjlenmiştir.
8. 8. Daha önce 70˚C'de 10 dakika inkübe edilmiş elüsyon tamponu (100µL) GD kolonuna eklenmiş, ardından temiz bir mikrofüj tüpüne aktarılmış ve 3-5 dakika bekletilmiştir. Daha sonra 13000 rpm'de 30 saniye santrifüjlenmiştir.
9. DNA, PCR analizi yapılana kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

b) Qubit 4.0 ile DNA miktar tayini: Test, RNA üzerinden çift sarmallı DNA (dsDNA) için oldukça seçicidir ve 10 pg / µL ila 100 ng / µL arasındaki ilk numune konsantrasyonları için doğrudur. Test, oda sıcaklığında gerçekleştirilir ve sinyal 3 saat boyunca stabildir. Tuzlar, serbest nükleotidler, çözücüler, deterjanlar veya protein gibi yaygın kirleticiler testte iyi tolere edilir. Şekil 3.1 'de gösterilen standart ve kısa prosedür ile gerçekleştirilmektedir.



Şekil 3.1 Qubit 4.0 ile DNA miktar tayini prosedürü

- Qubit® çalışma solüsyonu, Qubit® dsDNA HS Reaktifi 1: 200'ü Qubit® dsDNA HS tamponunda seyrelterek hazırlandı.
- Standart olarak tasarlanmış her bir tüpe Qubit® çalışma solüsyonundan 190 µL hacim eklenmiş, ardından sağlanan her standart solüsyondan 10 µl tüplere eklendi ve son olarak vortekslenmiştir.
- Numune için hazırlanan her bir tüpe 197 µL olarak Qubit® çalışma solüsyonu eklenmiş ve ardından 3 µL numune ayrı ayrı eklenmiştir.
- Elde edilen tüm karışımlar vortekslenmiş ve oda sıcaklığında 3 dakika inkübe edilmiştir.
- Konsantrasyon eğrisi oluşturmak için Qubit cihazına standart tüpler yerleştirilmiştir.

- Her numunedeki dsDNA konsantrasyonunu okumak için numuneler için tüpler birer birer eklenmiştir.

c) (MrkA) biyofilm kodlama geninin PCR amplifikasyonu:

K. pneumoniae biyofilm kodlama genini (*mrkA*) tespit etmek için kullanılan primerler bu çalışmada belirlenmiştir. İzole edilmiş klinik ve gıda kökenli K.pneumoniae'de bu genin varlığını araştırmak için PCR tekniği ile analiz edilmiştir (Çizelge 3.6).

Çizelge 3.6 Belirlenmiş Primerler ve mrkA geninin amplifikasyonu için kullanılan gen dizileri

Primer Adı	**Diziler (´5 ⟶ ´3)**	**Tm (°C)**	**Boyut (bp)**
mrkA-HM F	TGTCACCCGGGATGATTTTGTTG	61,6	457 bp
mrkA-HM R	AAAAAGGTTCTTCTCTCTGCAGCA	60,9	

Bu primerler liyofilize formda sağlanmıştır. Steril deiyonize damıtılmış su içinde çözülerek sağlayıcı tarafından önerildiği gibi 100 pmol/µL'lik bir nihai konsantrasyon elde edilmiştir ve PCR amplifikasyonunda kullanılana kadar derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Ekstrakte edilen DNA, primerler ve PCR ön karışımı 4^{o}C'de çözülmüş, vortekslenmiş ve içeriği tüplerin dibine çökeltmek için kısa süre santrifüjlenmiştir. PCR karışımı, 12,5 µL PCR ön karışımını içeren toplam 25µL hacimde oluşturulmuş, her primerden 1,5 µL ve 4µL template DNA kulanılmıştır. Geri kalan hacim, steril deiyonize edilmiş damıtılmış su ile tamamlanmış ve ardından vortekslenmiştir. Negatif kontrol, şablon DNA dışındaki tüm materyali içeriyordu, bu nedenle bunun yerine damıtılmış su ilave edilmiştir. PCR reaksiyon tüpleri, karışımın sağlanması ve içerikleri tüplerin dibine çökeltmek amacıyla için kısa bir süre santrifüjlenmiştir. Çizelge 3.7'de gösterildiği gibi DNA'nın amplifiye edildiği Termocycler PCR cihazına yerleştirilmiştir.

Çizelge 3.7 MrkA genini amplifiye etmek için kullanılan program

Aşama	Sıcaklık ^{o}C	Süre	
İlk denatürasyon	94	3 dakika	
Denatürasyon	94	30 saniye	Döngü Sayısı 35
Tavlama (Öze Dönü)	53	45 saniye	
Uzantı	70	30 saniye	
Son uzantı	70	5 dakika	

d) PCR ürün özgünlüğünün belirlenmesi: PCR amplifikasyonundan sonra, amplifikasyonun varlığını doğrulamak için %1,5 agaroz jel elektroforezi uygulanmıştır. 100 ml 1X TBE tamponu içinde 1,5 gr agaroz tozu çözülerek ve kaynatılarak PCR özgüllüğünü belirlemek için %1,5 konsantrasyonda agaroz jel hazırlanmıştır, ardından agaroz 50-60^{o}C'ye soğutulmuştur, 5 µL bromür boyası eklenmiş ve kabarcık oluşumunu önlemek için karıştırılarak, jel kavanozuna agaroz sökülmüştür, ardından 20 ^{o}C'ye soğutulmuştur. Agaroz jel döküldüğünde, jelin ucundan yaklaşık 5-10 mm uzakta jelin bir tarafında bir tarakla dikkatlice birkaç oyuk oluşturulmuştur; son katılaşmadan sonra tarak dikkatlice çıkarılmış ve elektroforez tankına koyun elektroforez tankına konmuştur. 100 bp DNA merdiveninin 6 mikrolitresi agaroz elektroforez jelinin ilk sol kuyucuğuna veya ortasına yerleştirilmiştir, ardından her PCR ürününden 10 µL agaroz jelinin kalan kuyucuklarına konulmuştur. Daha sonra elektroforez tankı özel kapağıyla kapatılmış ve elektrik akımı eşleştirme işlemi yapılmıştır. (1,5 saat için 70 volt). Jeldeki kırmızı güvenli lekeli bantlar, Jel dokümantasyon sistemi kullanılarak görselleştirilmiştir.

3.2.9 İstatistiksel analiz

Çalışma parametrelerindeki farklılık faktörlerinin etkisini tespit etmek için kullanılmıştır. Bu çalışmada yüzde (0,05 ve 0,01 olasılık) arasında anlamlı bir karşılaştırma yapmak için ki-kare testi kullanılmıştır.

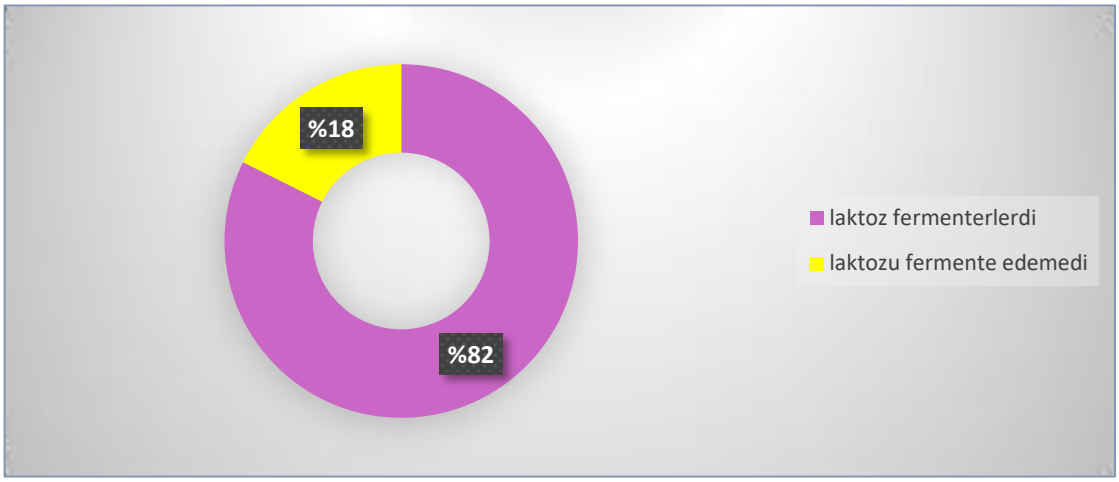
4. BULGULAR

4.1 Bakteriyel İzolasyon ve Tanımlama

Toplanan klinik ve gıda örnekleri, *Klebsiella*'yı diğer bakteriyel izolatlardan izole etmek ve ayırt etmek için seçici ve farklı besiyerinde kültürlendi, tüm izolatlar ABC sürme yöntemi ile saflaştırılmıştır. Bu besiyerindeki makroskopik karakteristiğe ek olarak, mikroskobik inceleme Gram boyanabilirliğini, şeklini ve düzenlemesini belirlemek için kullanılmıştır.

Tüm örnekler, 37°C'de 18 saat inkübasyondan sonra MacConkey agar üzerinde kültür edilmiştir., İki tip koloni elde edilmiştir. Bunlar, laktoz fermentör pembe koloniler ve laktoz olmayan fermentör soluk kolonilerdir.

Bakteriyel izolatların çoğu laktoz %82 oranında fermente olurken, geri kalan kısım fermente olamamıştır (Şekil 4.1).



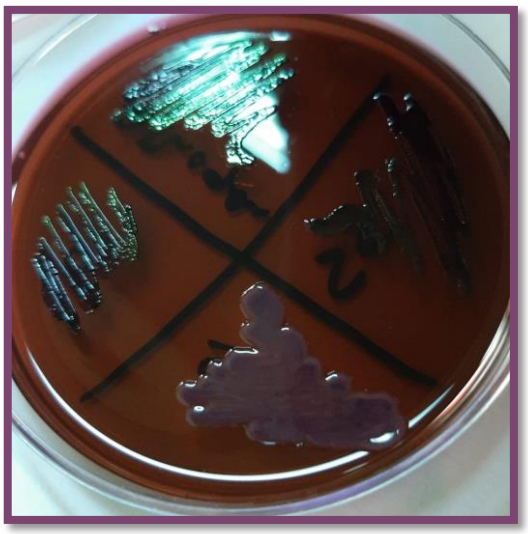
Şekil 4.1 Klinik ve gıda örneklerinden izole edilen laktoz fermente eden bakterilerin ve laktozu fermente etmeyen bakterilerin yüzdeleri

Pembe koloniler daha fazla araştırma için EMB ve S.S agar üzerinde kültürlendi, *Klebsiella* MacConkey agar üzerinde büyük mukoid dışbükey pembe koloniler olarak görünürken, Escherichia coli küçük kuru düzleştirilmiş pembe kolonilerdi (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 *Klebsiella* izolatı ile kültürlenmiş MacConkey agar üzerinde Laktoz fermentörleri**:** Büyük pembe dışbükey mukoid koloniler (sağda) ve ***E. coli* izolatı**: 24 saat 37 ° C'de inkübasyondan sonra küçük pembe düzleştirilmiş koloniler (solda)

E. coli, koyu mor koloniler olarak görünen *Klebsiella*'dan daha farklı olarak, yeşil metalik parlaklık ile koyu renkte görünmüştür (Şekil 4.3).



Şekil 4.3 Farklı bakteri izolatları ile kültürlenmiş eosin metilen mavisi agar**:** ***E. coli*** izolatları, 24 saat 37 ° C'de inkübasyondan sonra *Klebsiella* spp agarın yeşil metalik parlak kolonileri ve büyük mor konveks mukoid kolonileri olarak görünmüştür

Klebsiella pneumoniae'nin iki ayırt edici özelliği vardır: MacConkey'de laktoz fermentasyonu ve *Klebsiella* spp'nin kapsüllenmiş suşları olan kolonilerin viskozitesi bu cinsin suşlarının bir özelliği olan görünüşte mukoiddir (Şekil 4.4).



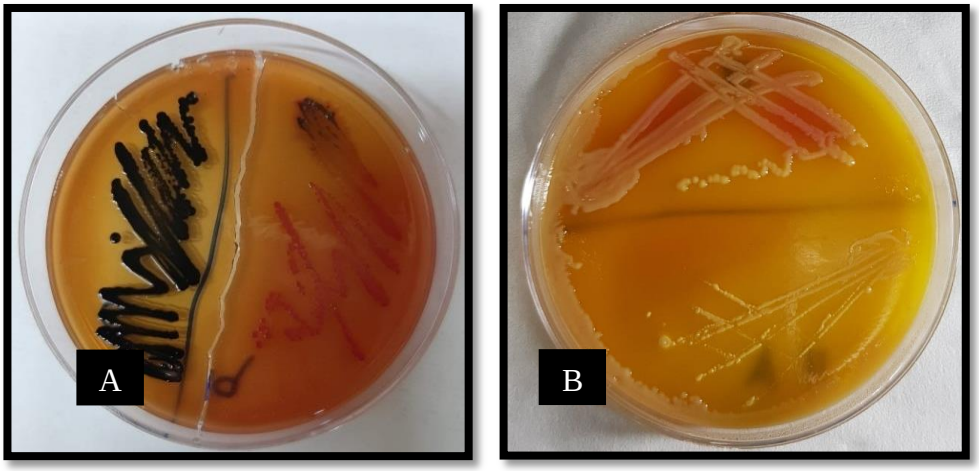
Şekil 4.4 24 saat (solda) ve 48 saat (sağda) 37 ° C'de inkübasyondan sonra MacConkey agar üzerinde *Klebsiella spp*'nin büyük pembe dışbükey mukoid kolonileri

Hipermukoviskozite fenotipi sicim testi kullanılarak tespit edildi ve sonuçlar izolatların %45'inin sicim testine pozitif olduğunu göstermiştir (Şekil 4.5).



Şekil 4.5 MacConkey agar üzerinde *K. pneumoniae* izolatı K7 için dizi testi ile hipermukoviskozite fenotip tespiti: uzunluğu 15 mm'den büyük viskoz bir dizi olarak pozitif bir sonuç ortaya çıkmıştır

Citrobacter, EMB üzerinde kahverengi koloniler olarak, H_2S üretme yeteneklerinden (Bunun nedeni, "Klebsiella" ya eşlik eden ve Fenotipik özellikler de benzer olan bir bakteri olmasıdır) dolayı S.S agar üzerinde siyah merkezli küçük soluk düzleştirilmiş koloniler olarak görünürken, XLD ortamında sarı koloniler olarak görünmüştür (Gwida *et al*. 2014) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6 *Citrobacter* spp. 37 ° C'de 18 saat inkübasyondan sonra izoleler (A. S.S. agar üzerinde siyah merkezli soluk koloniler, B: XLD agar üzerinde sarı koloniler)

Klinik ve gıda örneklerinden izole edilen bakteriyel izolatların yüzdesi Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

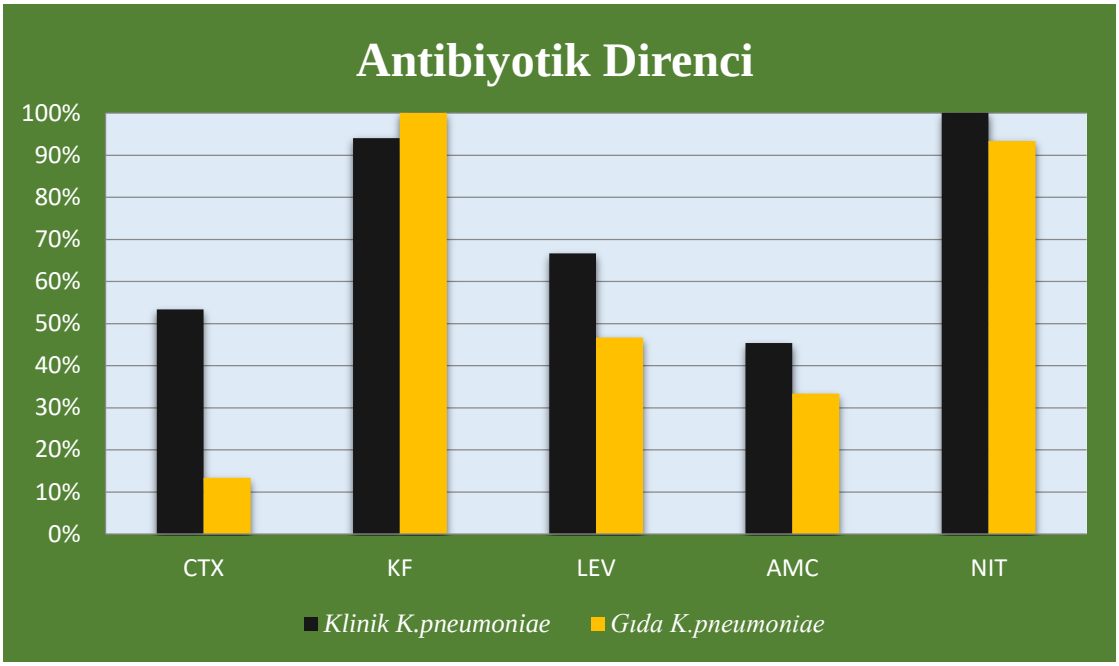
Çizelge 4.1 Klinik ve gıda örneklerinden izole edilen farklı bakterilerin izolasyon yüzdesi

Bakteriyel İzolat	**Klinik numunelerden alınan izolatların sayısı**	**Yüzde (%)**	**Gıda örneklerinden elde edilen izolat sayısı**	**Yüzde (%)**
K.pneumoniae	18	%38,30	21	%38,18
E. coli	16	%34,04	22	%40,00
Citrobacter	2	%4,26	5	%9,09
Laktozsuz fermentörler	11	%23,40	7	%12,73
Toplam	47	%100	55	%100
Ki-kare (χ^2)	---	9,026 **	---	9,763 **
**** (P≤0,01)**				

Klebsiella spp. Tanımlamasını doğrulamak için Vitek -2 sistemi kullanılmıştır. Sonuç, bu çalışmada izole edilen bakterinin *Klebsiella pneumoniae* olduğunu göstermiştir.

4.2 *Klebsiella* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı

K.pneumoniae izolatlarının, Ceftriaxone (CTX), Nitrofurantoin (NIT), Amoxicillin-clavulanate (AMC), Levofloxacin (LEV) ve Sefalothin (KF) antibiyotiklerine duyarlılığı, Ulusal Klinik Laboratuvar Standartları Komitesi (NCCL'ler) tarafından tavsiye edilen şekilde, difüzyon yöntemi kullanılarak tespit edilmiştir. Klinik ve gıda kaynaklı örneklerden izole edilen bu izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Şekil 4.7'de açıklanmıştır.



Şekil 4.7 Beş antibiyotik seftriakson, levofloksasin, amoksisilin-klavulanat, nitrofurantoin, sefalotin için klinik ve gıda *K. pneumoniae* izolatlarının antibiyogram sonuçları

Bu çalışma ile elde edilen antibiyotik duyarlılık sonuçları, tüm klinik *K. pneumoniae* izolatlarının (%100) nitrofurantoine dirençli olduğunu, %53,33'ünün seftriaksona dirençli olduğunu göstermiştir. Klinik izolatlar %94 gibi yüksek oranda sefalotine ve %66,6 levofloksasine dirençli iken, klinik izolatların %45'i amoksi-klavulanata direnç göstermiştir. Gıda kökenli *K. pneumoniae* izolatlarında sefalotine %100, ardından

nitrofurantoin (%93), levofloksasin (%46,66), amoksi-klavulanata %33,33 ve seftriaksona %13,33 oranında yüksek direnç göstermiştir.

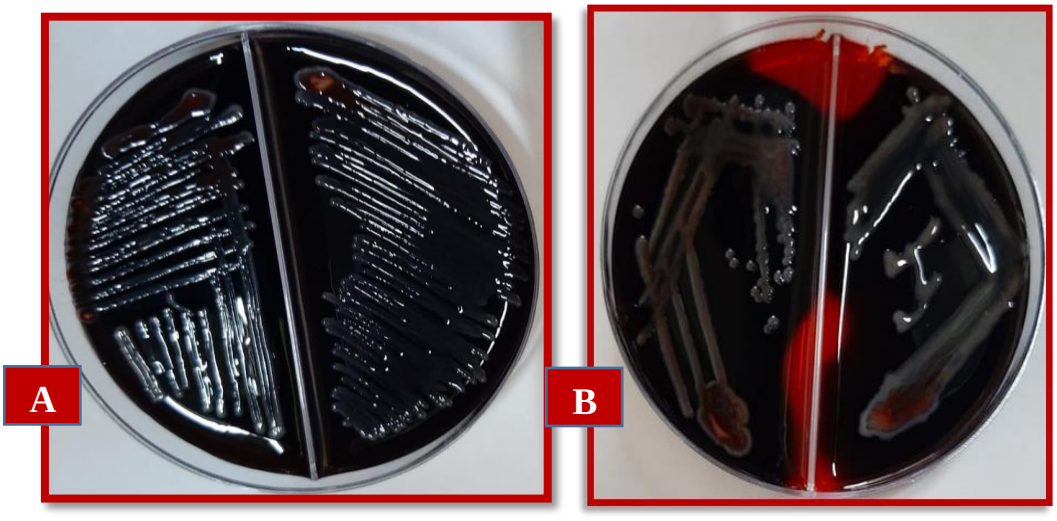
4.3 Amoksisilin/klavulanat ve seftriaksonun Antibakteriyel Aktivitesinin Değerlendirilmesi

Amoksisilin / klavulanatın gıda kaynaklı ve *K. pneumoniae* klinik izolatlarına karşı antibakteriyel aktivitesi, Standart Broth Dilüsyon Yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. AMC'nin klinik izolatlara karşı MİK değerleri, gıda kaynaklı test edilen antibiyotiklerin 4µg / ml'si, klinik *K. pneumoniae* izolatları için ise 8µg / ml AMC ve 15µg / ml Ceftriaxone olarak belirlenmiştir.

4.4 Biyofilm Üreten İzolatların Fenotipik Tespiti

4.4.1 Kongo kırmızı agar yöntemi

Hem klinik hem de gıda kaynaklı izolatlar için yapışkan tabaka üretimi tespiti, Kongo Kırmızı Agar yöntemi kullanılarak incelendi ve klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatlarında yapışkan üretimi tespit edilmiştir (Şekil 4.8 ve Çizelge 4.2).



Şekil 4.8 Kongo kırmızısı agar üzerinde 37 ° C'de 18 saat inkübasyondan sonra *K. pneumoniae* (A: Klinik B: Gıda kaynaklı) izolatları oluşturan biyofilm ile balçık tabakası üretimi

Çizelge 4.2 Hem klinik hem de gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatlarının yapışkan tabaka üreticileri

No	***K. pneumonia* Gıda kaynaklı izolatlar**	**Yapışkan tabaka üretimi**	**No**		**Yapışkan tabaka üretimi**
1	KF 7	+++	1	K1	++
2	KF 9	+++	2	K2	+++
3	KF 10	+++	3	K3	-
4	KF 16	+	4	K4	+++
5	KF23	+++	5	K5	+++
6	KF 27	+++	6	K6	-
7	KF28	+++	7	K7	+++
8	KF29	++	8	K8	+++
9	KF30	+++	9	K9	+++
10	KF 32	+++	10	K10	+++
11	KF34	+++	11	K11	-
12	KF35	+++	12	K12	-
13	KF36	+++	13	K13	+++
14	KF37	+++	14	K14	+++
15	KF38	+	15	K15	+++
16	KF39	+	16	K16	+++
17	KF40	-	17	K17	+++
18	KF41	-	18	K18	+++
19	KF42	-			
20	KF43	-			
21	KF44	-			

Hem gıda kaynaklı hem de klinik *K. pneumoniae* izolatlarının yapışkan (slime) tabaka oluşturma ve biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip olduğunu gösyeren bu çalışmadan elde edilen sonuçlar.

4.4.2 Tüp yöntemi ile biyofilm oluşumu tespiti

Bir test tüpünün cam yüzeyinde biyofilm oluşturmak için klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatlarını tespit etmek için tüp yöntemi veya Christensen'in kullanıldığı yöntem uygulanmıştır ve sonuçlar 12 klinik izolatın (%66,66) biyofilm üreticisi olduğunu gösterirken yirmi bir gıda kaynaklı izolat arasında; 11 izolat (%52,38) cam yüzeye yapıştırılarak biyofilm oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.9).



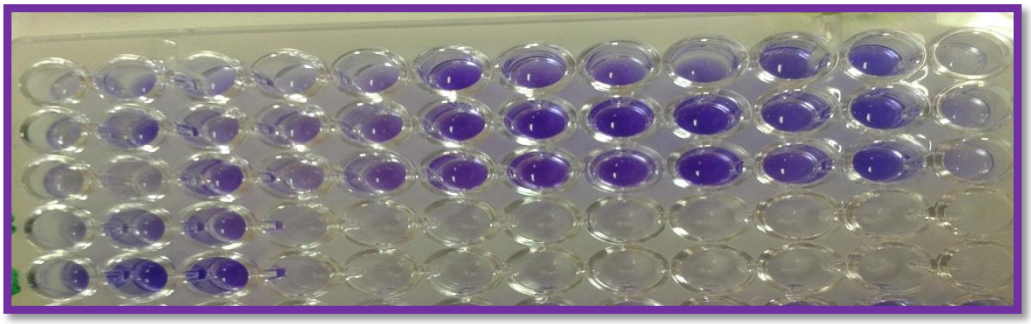
Şekil 4.9 Bir test tüpünün cam yüzeyine yapıştırılan gıda kaynaklı K30 izolatından üretilen lekeli biyofilm (Christensen'in yöntemi)

4.3 Mikrotiter Plaka Testi ile Biyofilm Oluşumu

Hem klinik hem de gıda kaynaklı biyofilm oluşturma yeteneğini saptamak için kullanılan mikrotitre plaka testi *K. pneumoniae*; sonuçlar 15 klinik izolatın (%83,33) biyofilm üreticisi olduğunu, yirmi bir gıda kaynaklı izolat arasında; 16 izolat (%76,19) polistiren yüzeye yapışarak biyofilm üretti (Çizelge 3.4, Şekil 4.10).

Çizelge 4.3 Klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatları ile Mikrotiter plaka testi kullanılarak biyofilm oluşumu

No	*K. pneumonia* Gıda kökenli izolatlar	Biyofilm oluşumu için Eliza sonuçları	No	*K. pneumoniae* Klinik izoaltlar	Biyofilm oluşumu için Eliza sonuçları
1	KF 7	0,638	1	K1	0,487
2	KF 9	0,498	2	K2	0,995
3	KF 10	1,814	3	K3	0,192
4	KF 16	0,710	4	K4	0,904
5	KF23	0,418	5	K5	0,498
6	KF 27	0,626	6	K6	0,045
7	KF28	0,364	7	K7	1,050
8	KF29	0,513	8	K8	0,792
9	KF30	0,476	9	K9	0,774
10	KF 32	0,118	10	K10	0,786
11	KF34	0,430	11	K11	0,043
12	KF35	0,939	12	K12	0,051
13	KF36	0,210	13	K13	0,807
14	KF37	0,461	14	K14	0,323
15	KF38	0,734	15	K15	0,498
16	KF39	0,269	16	K16	0,784
17	KF40	0,065	17	K17	0,821
18	KF41	0,058	18	K18	0,289
19	KF42	0,070	Kontrol –ve: 0,030		
20	KF43	0,055			
21	KF44	0,043			



Şekil 4.10 *Klebsiella pneumoniae* tarafından oluşturulan biyofilm: kristal viyole ile boyanmış mikrotitre plakasının ekli polistiren oyukları

Hem klinik hem de gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatları tarafından biyofilm oluşturma kabiliyetinin tespiti için üç standart testin sonuçları Çizelge 4.4 ile açıklanmıştır.

Çizelge 4.4 Klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatlarına göre biyofilm oluşum yüzdesi, üç tespit testi kullanılarak

İzolat Kaynak No	Farklı tespit analizleri ile biyofilm üreticileri			Biyofilm üretici olmayanlar	Ki-kare (χ^2)
	Kırmızısı agar	Christensen metodu	Doku kültür plakası		
Klinik 18 (%100)	14 (%77,77)	12 (%66,66)	15 (%83,33)	3 (%16,66)	13,394**
Gıda (21)	16 (%76,19)	11 (%52,38)	16 (%76,19)	5 (%23,80)	10,076**
Ki - kare (χ^2)	0,368 NS	5,271 *	0,0855 NS	0,0855 NS	---
* (P≤0,05), ** (P≤0,01), NS: Önemsiz					

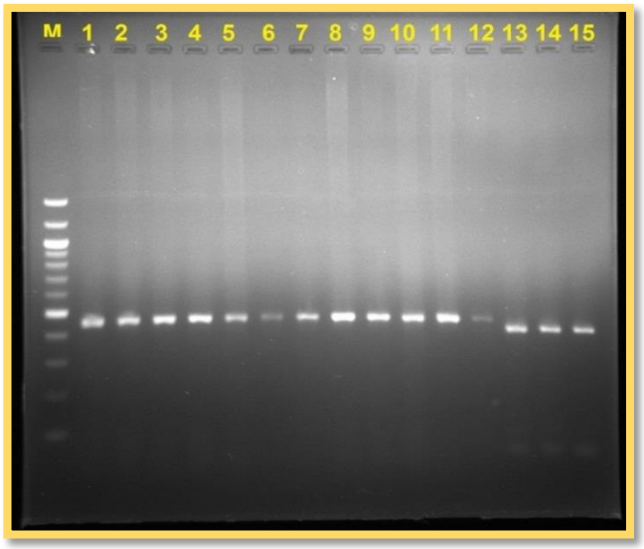
4.5. Moleküler Çalışmalar

4.5.1 *Klebsiella* izolatlarından DNA ekstraksiyonu

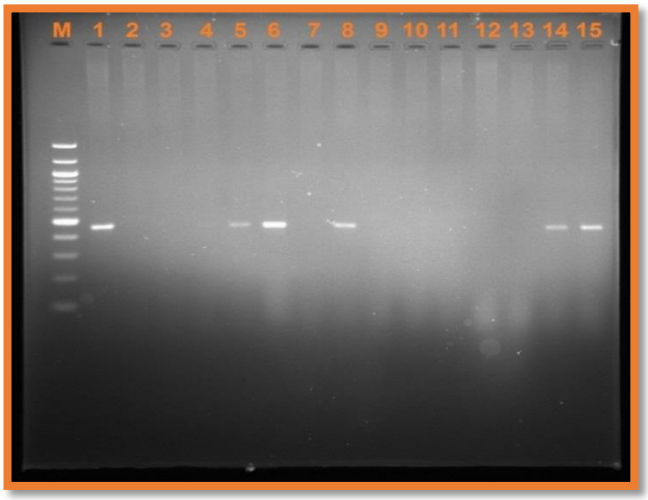
DNA, genomik DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak otuz *Klebsiella* izolatından ekstrakte edildi ve ekstrakte edilen DNA örnekleri, saflık ve kalitelerini sağlamak için qubit 4.0 testi kullanılarak karakterize edildi ve sonuçlar, ekstrakte edilen tüm DNA örneklerinin 458 ng / µl' den fazla konsantrasyonla saf olduğunu ortaya koymuştur.

4.5.2 Mrk A gen tespiti için polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği

Hem klinik (15 izolat) hem de gıda kaynaklı (15 izolat) (Bu, en verimli biyofilm ürünlerini almak için) otuz *K. pneumoniae* izolatı, Monoplex PCR tekniği kullanılarak elde edilen sonuçlar, tüm klinik *K. pneumoniae* izolatlarının (%100) *mrk A* geni taşıdığını, sekiz gıda kökenli *K.pneumoniae* izolatının (%53,3) mrk A pozitif olduğunu ortaya çıkarmıştır. Amplifiye edilmiş mrk A geni ve 457bp'lik PCR ürünü, agaroz jel elektroforezi kullanılarak saptandı ve ultraviyole (UV) transillüminatör kullanılarak fotoğraflandı (Şekiller 4.11, 4.12, Çizelge 4.5).



Şekil 4.11 Klinik *K. pneumoniae*'nin mrk A geninin (457bp) amplifiye edilmiş PCR ürününün Agaroz Jel Elektroforezi: agaroz (%1,5), TBE (1x), RedSafe ile boyanmış 1 saat boyunca 5v / cm. M: DNA moleküler ağırlık markörü (100bp) merdiveni, izolatların 1-15 *mrkA* pozitif PCR ürünleri: sırasıyla K1, K2, K3, K4, K5, K7, K8, K9, K10, K13, K14, K15, K16, K17 ve K18



Şekil 4.12 Gıda kaynaklı *K. pneumoniae*'nin *mrk A* geninin (457bp) amplifiye PCR ürününün Agaroz Jel Elektroforezi: agaroz (%1,5), TBE (1x), RedSafe ile boyanmış 1 saat boyunca 5v / cm. M: Gıda kaynaklı izolatların DNA moleküler ağırlık markörü (100bp) merdiveni, 1,4,5,6,8,14,15 *mrkA* pozitif PCR ürünleri: KF7, KF9, KF23, KF27, KF29, KF35, KF39, dinlenme şeritleri, kontrrole negatif olan şerit 13 dışında *mrkA* için negatifti

Çizelge 4.5 *K. pneumoniae* izolatlarının *mrk A* gen amplifikasyonu

Id	*K. pneumonia* Gıda orijinli izolatlar	*mrk A* gen amplifikasyonu	Id	*K. pneumoniae* klinik izolatlar	*mrk A* gen amplifikasyonu
1	KF 7	+	1	K1	+
2	KF 9	+	2	K2	+
3	KF 10	-	3	K3	+
4	KF 16	-	4	K4	+
5	KF23	+	5	K5	+
6	KF 27	+	6	K7	+
7	KF28	-	7	K8	+
8	KF29	+	8	K9	+
9	KF30	+	9	K10	+
10	KF34	-	10	K13	+
11	KF35	+	11	K14	+
12	KF36	-	12	K15	+
13	KF37	-	13	K16	+
14	KF38	-	14	K17	+
15	KF39	+	15	K18	+

Çizelge 4.6 *Mrk A* geni varlığı ile biyofilm oluşumu arasında *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının karşılaştırılması

Toplam *K.pneumoniae* İzolatı sayısı	**Biyofilm oluşumu için pozitif olanların sayısı**		**mrk A geni barındırma için pozitif olanların sayısı**	
30 (%100)	Gıda 15 +ve (%100)	Klinik 15 +ve (%100)	Gıda 8+ve (%53,3)	Klinik 15+ve (%100)
Ki - kare (χ^2)	NS		10,362 **	
**** (P≤0,01), NS: Anlamsız**				

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada *Klebsiella pneumoniae* klinik ve gıda örneklerinden izole edilmiştir. Bu patojeni gıdalardan ve klinik örneklerden de izole eden birkaç tane yerel ve uluslararası çalışma vardır. Klaif ve arkadaşları (2019) tarafından yapılan yerel bir çalışma, Iraklı hastalardan ve sığır etinden alınan gıda örneklerinden izole edilmiş *K.pneumoniae*'yi oluşturdu. Başka bir yerel çalışmada, Qader ve AlKhafaji (2019) tavuk eti örneklerinden *K.pneumoniae*'yi izole etmiştir. Küresel olarak Çin'de *K.pneumoniae* perakende gıdalardan izole edilmiş, *K. pneumoniae*'nin süt ürünleri, et ve perakende gıda dâhil olmak üzere farklı gıda ürünlerinde yüksek sayıda olduğu bulunmuştur (Zhang *et al.* 2018). Malezya'da bir çalışma, 78 sokak yemeği örneğini *K. pneumoniae* varlığı açısından taradı ve incelenen gıdaların %32'sinde buldu (Haryani *et al*. 2007). *K.pneumoniae* sadece hastanede edinilen önemli bir patojen değil, aynı zamanda insanlarda septisemi, karaciğer apseleri ve ishale neden olabilen önemli bir gıda kaynaklı patojendir (Zhang *et al.* 2018).

Bu çalışmada *Escherichia coli* ve *K. pneumoniae* gıda ve klinik örneklerden izole edildi. AlKhafaji ve diğerleri (2016) tarafından yapılan çalışma gibi, *E. coli*'yi diğer enterobacteriaceae ailesinin üyeleriyle izole eden yerel çalışmalar da vardı. Bu çalışmada yazarlar, Iraklı hastalardaki gıda örneklerinden ve klinik örneklerden E. coli'yi izole etmişlerdir. Başka bir yerel çalışmada, E. coli'yi gıda örneklerinden izole edilmiştir (AlKhafaji *et al*. 2017). Küresel olarak, Nijerya'da yapılan bir çalışmada E. coli oldukça yüksek oranda izole edilmiştir (%43,4) (Adeyanju and Ishola 2014). Akbar *et al.* (2014) tarafından yapılan başka bir çalışmada, kirletici bakterilerin %25'inde kanatlı etinden *E. coli* izole edilmiştir.

Bu çalışmada *E. coli*'nin gıda ve klinik örneklerden izolasyonu, sağlıklı insan ve hayvanların bağırsaklarında normal flora olması nedeniyledir. Birkaç çeşit *E.coli* vardır çoğu türü zararsızdır veya nispeten hafif ishale neden olur, ancak *E.coli* O157: H7 gibi özellikle kötü suşlardan birkaçı şiddetli karın ağrısına, kanlı ishale ve kusmaya neden olabilir (Money *et al.* 2010).

Bu çalışmada enterobacteriaceae familyasına ait başka bir laktoz fermentör bakteri Citrobacter izole edilmiştir. Qader ve Alkhafaji (2019) tarafından yapılan yerel bir çalışmada, Citrobacter'i gıda örneklerinden izole etmişler. Başka bir yerel çalışma da C. freundii'yi Irak'taki tavuk eti örneklerinden izole etmiştir (Hashim and Alkhafaji, 2018).

Citrobacter, gıda kaynaklı hastalıklara neden olan bir ajandır ve genellikle yiyecek ve su yoluyla bulaşır (Ifeadike *et al*. 2012). Kötü hijyene sahip dikkatsiz yemek işleyicileri, bu bakterilerin neden olabileceği bir enfeksiyon kaynağı olabilir. *Citrobacter* ile kontamine olmuş yiyeceklerin neden olduğu gıda zehirlenmesi ve ishal bildirilmiştir (Doulgeraki *et al*. 2011, Giammanco *et al*. 2011).

Bu antibiyotik duyarlılığı çalışmasının sonuçları klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatlarının antibiyotiklere dirençli olduğunu göstermiştir. Tüm klinik *K. pneumoniae* (%100) nitrofurantoine ve %53,33'ü seftriaksona dirençliydi. Klinik *K. pneumoniae* izolatları yüksek oranda (%94) sefalotine dirençliydi. Bu çalışmanın sonuçlarına göre klinik *K. pneumoniae* izolatlarının %66,6 oranında levofloksasine dirençli olduğu, klinik izolatların ise %45'inin amoksi-klavulanata dirençli olduğu ortaya çıkmıştır. Bu çalışmanın sonuçları, Yaseen ve Al-Mathkhury (2015) tarafından yapılan yerel çalışmanın sonuçlarına benzer, izolatların amoksi-klavulanata %54 dirençli olduğunu ortaya çıkarmıştır.

Bakteriyel izolatlar arasında β-laktam antibiyotik direnç izolatlarındaki bu artış, çoğu durumda β-laktam halkasını yok eden ve onu inaktive eden β-laktamaz enziminin üretimiyle açıklanabilir ve bu enzim, suşlar arasında aktarımı kolay olan plazmid tarafından kodlanmıştır (Brooks *et al.* 2007).

Tüm gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatları sefalotine (%100), ardından nitrofurantoin (%93), ardından levofloksasin (%46,66), amoksi-klavulanata %33,33 ve seftriaksona %13,33 dirençli bulundu. Gıda kaynaklı bakteri izolatları arasında antibiyotik direnci yerel bir önceki çalışmada tespit edilmiştir (AlKhafaji *et al*. 2016). *Klebsiella* izolatları arasında beta-laktam antibiyotiklere karşı bu artan direnç, çoğu durumda beta-laktam halkasını yok eden ve onu inaktive eden beta-laktamaz enziminin üretimiyle

açıklanabilir. Bu enzim, bakteriler arasında aktarılması kolay bir plazmid üzerinde taşındı (Bush 2018).

Klinik ve gıda kaynaklı *K. pneumoniae* izolatları, üç yöntem kullanılarak cam ve polistirenin farklı yüzeylerinde biyofilm oluşumu açısından test eidilmiştir. Hem gıda kaynaklı hem de klinik *K. pneumoniae* izolatlarının slime tabakası oluşturma ve biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip olduğunu düşündüren bu çalışma ile elde edilen sonuçlar:
Slime üreten bakteriler ve kongo kırmızısı boyası arasındaki etkileşim, biyofilm oluşumunu taramak için yaygın olarak kullanılan siyah bir koloni, kongo kırmızı agar ile sonuçlanmıştır, bu çalışmanın sonuçları bu test için %77,77 pozitiftir. Singhai *et al.* (2012) çalışma sonuçların *K. pneumoniae*'nin %61,1'i pozitiftir.

Gıda işleme ortamları, çeşitli seviyelerde gıda bileşenlerini tutan sıvılarla temas eden gıda etkileşim yüzeyleri sağlar. Bu koşullar altında şartlandırma, gıda parçacıklarının yüzeye adsorpsiyonu yoluyla bakteri hücrelerinin paslanmaz çeliğe bağlanmasını etkiler (Hood and Zottola 1997).

Klebsiella pneumoniae'nin virülan bir mikroorganizma olduğu bilinmektedir, kısmen biyofilm oluşturma kabiliyeti nedeniyle insanda hastalığa neden olur. Bu biyofilm oluşturma yeteneği, bu patojenin, bakteriler solunduğunda idrar yolu enfeksiyonlarına ve yara enfeksiyonlarına ve pnömoniye neden olmasını sağlamıştır (Mirkar *et al*. 2016).

Bu çalışmanın *Klebsiella pneumoniae* izolatları, çok önemli bir virülans faktörü olduğu için hipermukoviskozite fenotipi için sicim testi kullanılarak test edildi ve bu çalışma ile elde edilen sonuçlar klinik ve gıda kaynaklı izolatların hipermukoviskoz olduğunu göstermiştir. Vuotto ve arkadaşları (2017), antibiyotik direnç profilleri ile biyofilm oluşturma yetenekleri arasındaki olası korelasyonları anlamak için *K. pneumoniae* izolatlarının bazı virülans faktörlerini analiz etmiştir. Biyofilmler, ancak hiçbiri hipermukovizöz fenotip sunmadı. Analiz, aktif dışa akımla ilgili genler, hücre dışı polimerik matris (EPS) üretimi (pgaA), yeter sayı-algılama (QS) sistemi (luxS), LPS

üretimi (wzm ve wbbM) ve tip 3 fimbriae (*mrkA*) güçlü bir biyofilm oluşturma kabiliyetleri göstermiştir.

Biyofilm kodlama geni *mrkA*'nın moleküler tespiti klinik ve gıda kökenli *Klebsiella pneumoniae* izolatları için PCR tekniği kullanılarak yapıldı ve sonuçlar mrk A geninin tüm klinik izolatlar tarafından taşındığını gösterdi. Yerel bir çalışma, idrar yolu enfeksiyonlarından izole edilen tüm biyofilm üreten *K. pneumoniae*'de mrk genini tespit etmiştir (Mahmood *et al*. 2015).

K. pneumoniae'da biyofilm oluşumuna katkıda bulunan önemli virülans faktörleri, kapsüler polisakkaritler, tip 1 ve tip 3 fimbriadır (Li *et al*. 2014). Tip 3 fimbria, biyofilm oluşumunu başlatır ve esas olarak protein mrkA'nın alt birimlerinden oluşur (Murphy and Clegg 2012). Fimbriae tip 1 ve tip 3, *K. pneumoniae* biyofilm ile ilişkili üriner enfeksiyonlar için bir başka önemli kolonizasyon faktörü olarak işlev görür (Murphy *et al*. 2013). Bu çalışma ile elde edilen sonuçlardan hem klinik hem de gıda kaynaklı *Klebsiella pneumoniae*'nin cam ve polistiren gibi farklı yüzeylerde biyofilm oluşturma kabiliyetine sahip olduğu sonucuna varılmıştır. Bu kadar güçlü bir topluluk oluşturma potansiyeli; biyofilm; birkaç gene atfedilir bunlardan biri *mrkA* genidir. Bu gen, bu çalışmada klinik izolatlarda baskındır. Gıda kaynaklı izolatlar, *mrkA* genini daha düşük oranda taşırken aralarında önemli farklılıklar vardı. Bu, gıdalardan izole edilen *K. pneumoniae* kontaminasyon kaynağının klinik *K. pneumoniae* gibi olmayan insan kaynaklı olmadığını düşündürmektedir. Gıda kökenli *K. pneumoniae* biyofilmini kodlayan genler, *mrkA* genine ek olarak başka genler olabilir. Klinik izolatlarda *mrkA* geni baskındır. Biyofilm oluşumunun antibiyotik direncini artırması, klinik izolatların gıda kaynaklı izolatlardan daha fazla antibiyotik ve dezenfektan gibi strese maruz kalması nedeniyle stres koşulları altında biyofilm üretmektedir ve bu da tüm klinik *K. pneumoniae* izolatlarının biyofilm kodlama geni mrkA'ya sahip olmasının nedeni olabilir. Birçok gıda kökenli izolat, mutasyonlar yoluyla veya gıda ortamında şidetli muamelelere maruz kaldıkları için gen mrkA'sını kaybedebilir.

KAYNAKLAR

Adeyanju, G.T. and Ishola, O. 2014. Salmonella and Escherichia coli contamination of poultry meat from a processing plant and retail markets in Ibadan, Oyo State, Nigeria. Springerplus, 3, 1-9.

Akbar, A., Sitara, U., Ali, I., Khan, M.I., Phadungchob, T. and Anal, A.K. 2014. Presence of Escherichia coli in poultry meat: a potential food safety threat. International Food Research Journal, 21, 941-945.

AlKhafaji M.H.M., Tawfeeq, H.K. and Mahdii, B.A. 2016. Effect of combination of d-glycin and antibiotics on biofilm formation by clinical, food and environmental isolates of Escherichia coli. World J Exp Biosci 4, 112-117.

AlKhafaji, M.H., Abdul Majeed, S. M. and Basi, R. K. 2017. Biosynthesis of Silver Nanoparticles by Food-Origin E. coli and Candida Species and Testing Its Antimicrobial Activity against Pathogenic Bacteria and Fungi. IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences, 12 (3), 29-34.

Anderl, J. N., Franklin, M.J. and Stewart, P.S. 2000. Role of antibiotic penetration limitation in Klebsiella pneumoniae biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. Antimicrob Agents Chemother, 44, 1818–24.

Antunes, L. C. M. and Ferreira, R. B. R. 2009. Intercellular communication in bacteria. Crit Rev Microbiol, 35, 69–80.

Ares, M. A., Fernández-Vázquez, J. L., Rosales-Reyes, R., Jarillo-Quijada, M., von Bargen, K. and Torres, J. 2016. H-NS nucleoid protein controls virulence features of Klebsiella pneumoniae by regulating the expression of type 3 pili and the capsule polysaccharide. Front Cell Infect Microbiol, 6, 13.

Ashurst, J.V. and Dawson, A. 2019. Klebsiella Pneumoniae. In: StatPearls. Treasure Island (FL). Web: http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

Balasubramanian, A., Rosenberg, L. E., Yam, K. I. T. and Chikindas, M. L. 2009. Antimicrobial packaging: Potential vs. reality- A review. The Journal of Applied Packaging Research, 3(4), 193-221

Balestrino, D., Ghigo, J. M., Charbonnel, N., Haagensen, J. A. and Forestier, C. 2008. The characterization of functions involved in the establishment and maturation of Klebsiella pneumoniae in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. Environ Microbiol, 10, 685–701.

Bavington, C. and Page, C. 2005. Stopping bacterial adhesion: A novel approach to treating infections. Respiration, 72(4), 335-344.

Benson, J.M. 2001. Microbiological Applications: Laboratory Manual in General Microbiology, 8th ed., McGraw Hill. USA.

Bettelheim, K., Evangelidis, H., Pearce, J., Sowers, E. and Strockbine, N. A. 1993. Isolation of a Citrobacter freundii strain which carries the Escherichia coli O157 antigen. Journal of clinical microbiology, 31(3), 760-761.

Bjarnsholt, T., Jensen, P. Ø., Jakobsen, T. H., Phipps, R., Nielsen, A. K., Rybtke, M. T., and Scandinavian Cystic Fibrosis Study Consortium. 2010. Quorum sensing and virulence of Pseudomonas aeruginosa during lung infection of cystic fibrosis patients. PloS one, 5(4), e10115.

Bjarnsholt, T. 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. APMIS Suppl, 136, 1-51.

Brigitte, C., Elissa, K., Olivier, F. and Souad, C. 2012. Bacterial persistence and transient survival on open surface. JHED, 1, 54–56.

Brooks, G. F., Caroll, K. C. and Morse, S. A. 2007. Staphylococcus (Jawetz). Melnick and Adelberg's, Medical Microbiology, 24th Ed., The McGraw-Hill. New York.

Brooks, G.F., Carroll, K.C. Butel, J.S. and Morse, S.A. 2007. Jawetz, Melnick and Adelbergs Medical Microbiology. 24th.ed. The McGraw-Hill Companies, Inc., New York.Bjarnsholt.

Burmølle, M., Ren, D., Bjarnsholt, T. and Sørensen, S. J. 2014. Interactions in multispecies biofilms: do they actually matter?. Trends in microbiology, 22(2), 84-91.

Bush, K. 2018. Past and present perspectives on β-lactamases. Antimicrob Agents Chemother, 62, e01076-18.

Cheryl, Y. O., Beatson, S.A., Totsika, M., Forestier, C., McEwan, A. G., and Schembri, M. A. 2010. Molecular analysis of type 3 fimbrial genes from Escherichia coli, Klebsiella and Citrobacter species. BMC Microbiol, 10, 183.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F. and Melton, D. M. 1985. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: A quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. Journal of Clinical Microbiology, 22, 996-1006.

Chung, P. Y. 2016. The emerging problems of Klebsiella pneumonia infections: carbapenem resistance and biofilm formation. FEMS Microbiology Letters, 363(20).

Coffey, B. M. and Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. In Pseudomonas methods and protocols (pp. 631-641). Humana Press, New York, NY.

Costerton, J. W., Stewart, P.S., Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Science, 284, 1318-1322.

Curtin, J. J. and Donlan, R. M. 2006. Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by Staphylococcus epidermidis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50(4), 1268-1275.

Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. W. and Greenberg, E. P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. Science, 280(5361), 295–298.

Desai, S., Sanghrajka, K. and Gajjar, D. 2019. High Adhesion and Increased Cell Death Contribute to Strong Biofilm Formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens, 8(4), 277.

Djordjevic, D., Wiedmann, M. and McLandsborough, L. A. 2002. Microtiter plate assay for assessment of Listeria monocytogenes biofilm formation. Applied Environ Microbiol, 68, 2950-2958.

Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis, 8(9), 881–90.

Doulgeraki, A.I., Paramithiotis, S., and Nychas, G., John E. 2011. Characterization of the Enterobacteriaceae community that developed during storage of minced beef under aerobic or modified atmosphere packaging conditions. International journal of food microbiology, 145, 77-83.

Effah, C. Y., Sun, T., Liu, S. and Wu, Y. 2020. Klebsiella pneumoniae: an increasing threat to public health. Ann Clin Microbiol Antimicrob 19(1), 1-9.

Farmer, I. J., Farmer, M. and Holmes, B. 2010. The Enterobacteriaceae: General characteristics. Topley Wilson's Microbiology Microbial Infections, 10th ed., 969-997.

Federle, M. J. 2009. Autoinducer-2-based chemical communication in bacteria: complexities of interspecies signaling. Contrib Microbiol, 16, 18–32.

Freeman, D. J., Falkiner, F. R. and Keane, C. T. 1989. New Method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. J. Clin. Pathol, 42, 872-874.

Giammanco, G.M., Aleo, A., Guida, I. and Mammina, C. 2011. Molecular epidemiological survey of Citrobacter freundii misidentified as Cronobacter spp. Enterobacter sakazakii and Enterobacter hormaechei isolated from powdered infant milk formula. Foodborne pathogens disease, 8, 517-525.

Giaouris, E. and Simões, M. 2018. Pathogenic biofilm formation in the food industry and alternative control strategies. In Handbook of Food Bioengineering, Foodborne Diseases Holban, A.M., Grumezescu, A.M., Eds. Academic Press (Elsevier): Amsterdam, The Netherlands, 15, 11, 309–377.

Gomes, F., Teixeira, P., Cerca, N., Azeredo, J. and Oliveira, R. 2011. Effect of farnesol on structure and composition of Staphylococcus epidermidis biofilm matrix. Curr Microbiol, 63, 354-359.

Gupta, A. 2002. Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit-Klebsiella pneumoniae. Semin Perinatol, 26(5), 340–5.

Hammer, B. K. and Bassler, B. L. 2003. Quorum sensing controls biofilm formation in Vibrio cholerae. Mol Microbiol, 50, 101–104.

Hansen, S. K., Rainey, P. B., Haagensen, J. and Molin, S. 2007. Evolution of species interactions in a biofilm community. Nature, 445, 533–536.

Haryani, Y., Noorzaleha, A., Fatimah, A., Noorjahan, B., Patrick, G., Shamsinar, A., Laila, R., and Son, R. 2007. Incidence of Klebsiella pneumonia in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD–PCR analysis. Food Control, 18, 847-853.

Hashim, M.H., and AlKhafaji, M.H. 2018. Isolation and identification of Citrobacter freundii from chicken meat samples using cultural and molecular techniques. Iraqi Journal of Science, 59, 1216-1224.

Hassan, A., Usman, J., Kaleem, F., Omair, M., Khalid, A. and Iqbal, M. 2011. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. Braz J Infect Dis, 15, 305-11.

Hasty, D. L., Ofek, I., Courtney, H. S. and Doyle, R. J. 1992. Multiple adhesins of streptococci. Infection and Immunity, 60 (6), 2147.

Hatt, J. K. and Rather, P. N. 2008. Role of bacterial biofilms in urinary tract infections. Curr Top Microbiol Immunol, 322, 163–92.

Hetrick, E. M. and Schoenfisch, M. H. 2006. Reducing implant-related infections: Active release strategies. Chemical Society Reviews, 35(9), 780-789.

Hoffmann, K. M., Deutschmann, A., Weitzer, C., Joainig, M., Zechner, E., Högenauer, C. and Hauer, A. C. 2010. Antibiotic-associated hemorrhagic colitis caused by cytotoxin-producing Klebsiella oxytoca. Pediatrics, 125(4), e960-e963.

Hoiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S. and Ciofu, O. 2010. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. Int J Antimicrob Agents, 35, 322–332.

Hood, S. K. and Zottola, E. A. 1997. Growth media and surface conditioning influence the adherence of Pseudomonas fragi, Salmonella typhimurium, and Listeria monocytogenes cells to stainless steel. J Food Protection, 60, 1034-1037.

Hornemann, J. A., Codd, S. L., Fell, R. J., Stewart, P. S. and Seymour, J. D. 2009. Secondary flow mixing due to biofilm growth in capillaries of varying dimensions. Biotechnol Bioengineering, 103, 353-60.

Huang, Y.J., Wu, C. C, Chen, M. C., Fung, C.P. and Peng, H. L. 2006. Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesins: possible role of the MrkD containing an RGD motif. Biochem Biophys Res Commun, 350, 537–42.

Ifeadike, C., Ironkwe, O., Adogu, P., Nnebue, C., Emelumadu, O., Nwabueze, S., and Ubajaka, C. 2012. Prevalence and pattern of bacteria and intestinal parasites among food handlers in the Federal Capital Territory of Nigeria. Nigerian medical journal: journal of the Nigeria Medical Association, 53, 166.

Jang, C. H., Park, H., Cho, Y. B., Choi, C. H. and Park, I. Y. 2009. The use of piperacillin– tazobactam coated tympanostomy tubes against ciprofloxacin-resistant Pseudomonas biofilm formation: An in vitro study. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 73(2), 295-299.

Jarjees, R.K. 2014. Detection of virulence factors and synergistic effect of some medical plants and antibiotics on uropathogenic Escherichia coli. Ph.D. Thesis. Salahaddin University, Erbil, Iraq.

Khatoon, Z., Mctiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T. F. and Alarcon, E. I. 2018. Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. Heliyon, 4, 1067-1060.

Kim, J., Hahn, J. S., Franklin, M. J., Stewart, P. S. and Yoon, J. 2009. Tolerance of dormant and active cells in Pseudomonas aeruginosa PA01 biofilm to antimicrobial agents. J Antimicrob Chemother, 63, 129–35.

Klaif, S.F., Naser, H.H. and Sadeq, J.N. 2019. The genetic relationship for Klebsiella pneumoniae isolated from human urinary tract and beef. Iraqi Journal of Veterinary Sciences, 33 (1), 75-80.

Kline, K. A., Flker, S., Dahlberg, S., Normark, S. and Normark, B. 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. Cell Host & Microbe, 5(6), 580-592.

La, A. S., Ercolini, D., Marinello, F. and Mauriello, G. 2008. Characterization of bacteriocin-coated antimicrobial polyethylene films by atomic force microscopy. Journal of Food Science, 73(4), 48-54.

LeChevallier, M. W., Cawthon, C. D. and Lee, R. G. 1988. Factors promoting survival of bacteria in chlorinated water supplies. Appl Environ Microbiol, 54(3), 649–54.

Lee, C. R., Lee, J. H., Park, K. S., Jeon, J. H., Kim, Y. B., Cha, C.J., Jeong, B. C. and Lee, S. H. 2017. Antimicrobial resistance of hypervirulent Klebsiella pneumoniae: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms. Front Cell Infect Microbiol, 21(7), 483.

Li, B., Zhao, Y. and Liu, C. 2014. Molecular pathogenesis of Klebsiella pneumoniae. Future Microbiol, 9, 1071–81.

MacFaddin, J. F. 2000. Biochemical tests for identification of medical bacteria, 3rd ed., Lipincott Williams and Wilkins USA.

Mahmood, M. T. and Abdullah, B. A. 2015. The relationship between biofilm formation and presence of fimH and mrkD genes among E. coli and K. pneumoniae isolated from patients in Mosul. Mosul Nursing Journal, 1(3), 34-42.

McDougald, D., Srinivasan, S., Rice, S. A. and Kjelleberg, S. 2003. Signal-mediated cross-talk regulates stress adaptation in Vibrio species. Microbiology, 149, 1923–1933.

Melo, R., Barros, E.M., Loureiro, N.G., Melo, H.R., Maciel, M.A. and Lopes, A.C. 2014. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2 producing Klebsiella pneumoniae isolates in Recife-PE, Brazil. Curr. Microbiol, 10, 1-8.

Miller, M. B. and Bassler, B. L. 2001. Quorum sensing in bacteria. Annu Rev Microbiol, 55, 165–199.

Mirkar, K., Rawat, A. and Satish, R. 2016. Effect of Environmental Factors on Biofilm Formation. Indian J. L. Sci., 5 (2), 53-64.

Money, P., Kelly, A. F., Gould, S. W. J., Denholm P, J., Threlfall, E. J., and Fielder, M. D. 2010. Cattle, weather and water: mapping Escherichia coli O157: H7 infections in humans in England and Scotland. Environmental microbiology, 12(10), 2633-2644.

Morello, J. A., Mizer, H. E., and Granato, P. A. 2006. Laboratory Manual and Workbook in Microbiology Applications to Patient Care, 18th ed., McGraw Hill. USA.

Muhammad, M.H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X. and Huang, T. 2020. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. Front Microbiol, 11, 928.

Murphy, C. N. and Clegg, S. 2012. Klebsiella pneumoniae and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. Future Rev Microbiol, 7, 991–1002.

Murphy, C. N., Mortensen, M. S., Krogfelt, K. A. and Clegg, S. 2013. Role of Klebsiella pneumoniae type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of catheter-associated urinary tract infections. Infection and immunity, 81(8), 3009-3017.

Myszka, K. and Czaczyk, K. 2011. Bacterial biofilms on food contact surfaces – a review. Pol J Food Nutr Sci, 61, 173–180.

Nielsen, A. T., Tolker-Nielsen, T., Barken, K. B. and Molin, S. 2000. Role of commensal relationships on the spatial structure of a surface-attached microbial consortium. Environ Microbiol, 2, 59–68.

Nirwati, H., Sinanjung, K., Fahrunissa, F., Wijaya, F., Sarastiav and Napitupulu, S. 2019. Biofilm formation and antibiotic resistance of Klebsiella pneumoniae

isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. BMC Proceedings, 13, 11- 20.

Niveditha, S., Pramodhini, S., Umadevi, S., Kumar, S. and Stephen, S. 2012. The Isolation of the Biofilm Formation of Uropathogens in the Patients with Catheter Associated Urinary Tract Infections (UTIs). J Clin Diagn Res, 6(9), 1478-1482.

O'Toole, G. Kaplan, H.B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial development. Annual Review of Microbiology, 54, 49-79.

Octavia, S., and Lan, R. 2013. The Family Enterobacteriaceae. Springer, Heidelberg, 4th ed. Berlin, 225-286.

Ofek, I., Hasty, D. L. and Sharon, N. 2003. Antiadhesion therapy of bacterial diseases: Prospects and problems. FEMS Immunology and Medical Microbiology, 38(3), 181-191.

Ong, C. L. Y., Ulett, G. C., Mabbett, A. N., Beatson, S. A., Webb, R. I., Monaghan, W. and Schembri, M. A. 2008. Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic Escherichia coli reveals a role in biofilm formation. Journal of bacteriology, 190(3), 1054-1063.

Paquet, F., Safdar, M., Parvinzadeh, M. and Greener, J. 2014. Emerging Spectral Microscopy Techniques and Applications to Biofilm Detection. Microscopy: Advances in Scientific Research and Education. Formatex Research Center, 2, 638–49.

Pillig, S., Davies, D. G. and Sauer, K. 2005. Characterization of temporal protein production in pseudomonas aeruginosa biofilms. J Bacteriol, 187, 8114-8126.

Poovendran, P. and Ramanathan, N. 2014. In vitro study on antibiotic susceptibility pattern of biofilm producing uropathogenic Escherichia coli isolates and their molecular characterization. Asian J. Pharm. Clin. Res., 7(3), 181-185.

Pramodhini, S., Niveditha, S., Umadevi, S., Kumar, S. and Stephen, S. 2012. Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogenes isolated from catheterized patients in Pondicherry, India. Austra. Med. J., 5(7), 344-348.

Qader, M. B. and AlKhafaji, M. H. 2019. Detection of bacterial contamination of imported chicken meat in Iraq. Iraqi Journal of Science, 60(9), 1957-1966.

Ribeiro, S. M., Cardoso, M. H., Cândido, E.D. and Franco, L. 2016. Understanding, preventing and eradicating Klebsiella pneumoniae biofilms. Future Microbiology, 11(4), 527-38.

Rickard, A. H., Palmer Jr, R. J., Blehert, D. S., Campagna, S. R., Semmelhack, M. F., Egland, P. G. and Kolenbrander, P. E. 2006. Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. Molecular microbiology, 60(6), 1446-1456.

Sakuragi, Y. and Kolter, R. 2007. Quorum-sensing regulation of the biofilm matrix genes (pel) of Pseudomonas aeruginosa. J Bacteriol, 189, 5383–5386.

Sanchez, C. J., Mende, K., Beckius, M. L., Akers, K. S., Romano, D. R., Wenke, J. C. and Murray, C. K. 2013a. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. BMC infectious diseases, 13(1), 1-12.

Sanchez, M. C., Palacios, A., Marin, M. J., Figuero, E., Leion, R., Blanc, V., Herrera, D. and Sanz, M. 2013b. Validation of ATP bioluminescence as a tool to assess antimicrobial effects of mouth rinses in an in vitro sub-gingival biofilm model. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 18, 86-92.

Schneditz, G., Rentner, J., Roier, S., Pletz, J., Herzog, K. A., Bücker, R. and Zechner, E. L. 2014. Enterotoxicity of a nonribosomal peptide causes antibiotic-associated colitis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(36), 13181-13186.

Seifi, K., Kazemian, H., Heidari, H., Rezagholizadeh, F., Saee, Y., Shirvani, F. and Houri, H. 2016. Evaluation of biofilm formation among Klebsiella pneumoniae isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. Jundishapur J Microbiol, 9(1), e30682.

Shakibaie, M. R. 2018. Bacterial Biofilm and its Clinical Implications. Ann Microbiol Res, 2(1), 45-50.

Siebel, M. A. and Characklis, W. G. 1991. Observations of binary population biofilms. Biotechnol. Bioeng, 37, 778–789.

Simões, M., Simões, L. C. and Vieira, M. J. 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. LWT–Food Sci Technol, 43, 573–583.

Singer, G., Besemer, K., Heodl, I., Chlup, A., Hochedlinger, G. and Stadler, P. 2006. Microcosm design and evaluation to study stream microbial biofilms. Limnol Oceanogr Methods, 4(11), 436-47.

Singhai, M., Malik, A., Shahid, M., Malik, M. A. and Goyal, R. 2012. A study on device-related infections with special reference to biofilm production and antibiotic resistance. Journal of global infectious diseases, 4(4), 193.

Stoodley, H. L., Costerton, J. W. and Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. Nat Rev Microbiol, 2, 95–108.

Sutherland, I. W. 2001. The biofilm matrix-an immobilized but dynamic microbial environment. Trends Microbiol, 9, 222-227.

Swarna, S.R., Madhavan, R., Gomathi, S. and Thamaraiselvi, S. 2012. A study of biofilm on diabetic foot ulcer. Inter. J. Res. Pharma. Biomed. Sci., 3(4), 1809-1814.

Sweet, M. J., Croquer, A., and Bythell, J. C. 2011. Development of bacterial biofilms on artificial corals in comparison to surface-associated microbes of hard corals. PLoS One, 6 (6), 1-14.

Tamilvanan, S., Venkateshan, N. and Ludwig, A. 2008. The potential of lipid-and polymer-based drug delivery carriers for eradicating biofilm consortia on devicerelated nosocomial infections. Journal of Controlled Release, 128(1), 2-22.

Taylor, E. N. and Webster, T. J. 2009. The use of superparamagnetic nanoparticles for prosthetic biofilm prevention. International Journal of Nanomedicine, 4, 145.

Vuotto, C., Longo, F. and Pascolini, C. et al. 2017. Biofilm formation and antibiotic resistance in Klebsiella pneumoniae urinary strains. J. Appl. Microbiol., 123(4), 1003–1018.

Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G. and Varaldo, P.E. 2014. Antibiotic resistance related to biofilm formation in Klebsiella pneumoniae. Pathogens, 3(3), 743–58.

Waters, C. M. and Bassler, B.L. 2005. Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. Annu Rev Cell Dev Biol, 21, 319–346.

Wiggli, M., Smallcombe, A. and Bachofen, R. 1999. Reflectance spectroscopy and laser confocal microscopy as tools in an ecophysiological study of microbial mats in an alpine bog pond. J Microbiological Methods, 34, 173-82.

Woodford, N., Turton, J. F. and Livermore, D. M. 2011. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev, 35(5), 736–55.

Wu, M., Lin, T. and Hsieh, P. 2011. Isolation of genes involved in biofilm formation of a Klebsiella pneumoniae strain causing pyogenicvliver abscess. PLoS One, 6 (8), 1-11.

Yaseen, N. and Al-Mathkhury, H. 2015. Effectiveness of Some β-lactamase Encoding Genes on Biofilm Formation and Slime Layer Production by Uropathogenic Escherichia coli. World J Exp Biosci, 3, 61-68.

Zafriri, D., Oron, Y., Eisenstein, B. I. and Ofek, I. 1987. Growth advantage and enhanced toxicity of Escherichia coli adherent to tissue culture cells due to restricted diffusion of products secreted by the cells. The Journal of Clinical Investigation, 79(4), 1210-1216.

Zhang, S., Yang, G., Ye, Q., Wu, Q., Zhang, J., and Huang, Y. 2018. Phenotypic and genotypic characterization of Klebsiella pneumoniae isolated from retail foods in China. Frontiers in microbiology, 9, 289.

Zhao, X., Zhao, F., Wangb, J. and Zhongc, N. 2017. Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. RSC Adv, 7, 36670-36683.

Zottola, E. A., and Sasahara, K. C. 1994. Microbial biofilms in the food processing industry–should they be a concern? Int. J. Food Microbiol., 23, 125–148.

Zufferey, J., Rime, B., Francioli, P. and Bille, J. 1988. Simple method for rapid diagnosis of catheter-associated infection by direct acridine orange staining of catheter tips. J Clin Microbiol, 26, 175-7.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı Soyadı	:	Hussam Aldeen Sabah MAHLHAL
Medeni Hali	:	Evli
Yabancı Dili	:	Arapça- Türkçe- İngilizce

Eğitim

Lise:	Alyarmook Lisesi
Lisans:	Thı Qar Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Ananilim Dalı

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl

Irak Sağlık Bakanlığı / 2010