ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KLİNİK VAKALARDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDE BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİĞE DİRENÇ ARASINDAKİ MOLEKÜLER İLİŞKİ

Mohammed Imad Hammood ABOGHANAIM

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Mohammed Imad Hammood ABOGHANAIM tarafından hazırlanan "**Klinik Vakalardan İzole Edilen Bakterilerde Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotiğe Direnç Arasındaki Moleküler İlişki**" adlı tez çalışması 01/05/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN

Eş Danışman : Doç. Dr. Shaimaa Obaid HASSON

Jüri Üyeleri:

Başkan : Prof. Dr. Ayhan FİLAZİ
Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı
Ankara Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Eldivan Sağlık Hizmetleri MYO
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Müge FIRAT
Eldivan Sağlık Hizmetleri MYO
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR
Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "**Klinik Vakalardan İzole Edilen Bakterilerde Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotiğe Direnç Arasındaki Moleküler İlişki**" 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 (12/06/2023).

Mohammed Imad Hammood ABOGHANAIM

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

KLİNİK VAKALARDAN İZOLE EDİLEN BAKTERİLERDE BİYOFİLM OLUŞUMU VE ANTİBİYOTİĞE DİRENÇ ARASINDAKİ MOLEKÜLER İLİŞKİ

Mohammed Imad Hammood ABOGHANAIM

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Eş Danışman: Doç. Dr. Shaimaa Obaid HASSON

Bu araştırmanın amacı, bakteri izolatları arasında antimikrobiyal direnç ile biyofilm oluşumu arasındaki olası moleküler ilişkinin incelenmesidir. Şubat-Temmuz 2022 tarihleri arasında Necef şehrindeki 3 hastanedeki idrar yolu enfeksiyonu olan 70 hastadan idrar örnekleri toplanmıştır. Örneklerin %87'sinde birden fazla bakteri ürerken %13'ünde hiçbir bakteri üretememiştir. İzolatların çoğunda *Escherichia coli* (%26,2), tespit edilmiştir. Bunu %21,3 ile *Staphylococcus aureus*, %13,2 ile *Pantoea spp*. ve *Pseudomonas spp*., %11,5 ile *Enterococcus faecalis*, %9 ile *Klebsiella spp*., %3,2 ile *Streptococcus spp.* ve %1,6 ile de *Acinetobacter spp*. takip etmiştir. Yaygın olarak kullanılan 27 antibakteriyel ajana karşı dirençliliğin belirlenmesi VITEK 2 kullanılarak gerçekleştirilmiştir. En yüksek direnç oranı %74 ile seftriakson karşıdır. Bunu %72 oranıyla sefiksim, sefotaksim ve amoksisilin+klavulonik asit izlemiştir. Ofloksasin %9,83, efpodoksim %3,27 ve Tigesiklin direnci de %1,63 olarak tespit edilmiştir. *E. coli* izolatlarının tamanında biyofilm direnç genleri olan *fimH*, *papc* ve *pgaC* tespit edilmiştir. *E. coli* bakterilerinin çoğunluğunun birden fazla antibiyotik sınıfına dirençli olduğu izole edilen tüm bakterilerin ise biyofilm ürettiği belirlenmiştir.

2023, 64 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: Antibiyotik direnci, Biyofilm oluşumu, Direnç geni, Biyofilm geni

ABSTRACT

Master of Science Thesis

MOLECULAR RELATION BETWEEN ANTIBIOTIC RESISTANT AND BIOFILM FORMATION BACTERIA ISOLATED FROM CLINICAL CASES

Mohammed Imad Hammood ABOGHANAIM

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

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Özgür KUZUKIRAN
Co-Advisor: Assoc. Prof. Dr. Shaimaa Obaid HASSON

The aim of this study is to investigate the possible molecular relationship between antimicrobial resistance and biofilm formation among bacterial isolates. Urine samples were collected from 70 patients with urinary tract infections in three hospitals in Necef between February and July 2022. In 87% of the samples, more than one type of bacteria was cultured, while in 13% no bacteria were detected. *Escherichia coli* was the most commonly isolated bacterium, identified in 26.2% of cases, followed by *Staphylococcus aureus* (21.3%), *Pantoea spp.* and *Pseudomonas spp.* (13.2%), *Enterococcus faecalis* (11.5%), *Klebsiella spp.* (9%), *Streptococcus spp.* (3.2%), and *Acinetobacter spp.* (1.6%). Resistance to 27 commonly used antibacterial agents was determined using VITEK 2, with the highest resistance rate observed against ceftriaxone (74%), followed by cefixime, cefotaxime, and amoxicillin+clavulanic acid (72% each), ofloxacin (9.83%), efpodoxime (3.27%), and tigecycline (1.63%). The biofilm resistance genes fimH, papc, and pgaC were identified in all E. coli isolates, and the majority of *E. coli* bacteria were found to be resistant to multiple antibiotic classes, with all isolated bacteria producing biofilm.

2023, 64 pages

Keywords: Antibiotic resistance, Biofilm formation, Resistance gene, Biofilm gen

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Özgür KUZUKIRAN ve Doç. Dr. Shaimaa Obaid HASSON'a sabrı, rehberliği ve anlayışları için teşekkür ederim.

Mohammed Imad Hammood ABOGHANAIM

Çankırı, Mayıs 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....i
ABSTRACT.....ii
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR.....iii
İÇİNDEKİLER.....iv
SİMGELER DİZİNİ.....vi
KISALTMALAR DİZİNİ.....vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....ix
1. GİRİŞ.....1
2. LİTERATÜR ÖZETİ.....3
2.1 İdrar Yolu Enfeksiyonları.....3
2.2 Tedavi.....4
2.3 Antibiyotik Direnci.....6
2.3.1 Antibiyotik direncinin mekanizmaları.....8
2.4 Biofilm Oluşumu.....8
2.4.1 Biyofilm oluşumunun aşamaları.....10
2.4.2 Biyofilmin mikrobiyal etiyolojisi.....13
2.4.3 Biyofilm oluşturan bakteriler.....13
2.4.4 Biyofilmin avantajları.....15
2.4.5 Biyofilmle ilişkili antimikrobiyal direnç mekanizmaları.....15
2.4.6 Biyofilm aracılığıyla antibiyotik penetrasyonunun önlenmesi.....16
2.4.7 Biyofilm oluşum hızını ve kapsamını etkileyen faktörler.....17
2.4.8 Biyofilme gömülü bakterilerin antibiyotik direnci.....17
2.4.9 *E. coli* biyofilmlerinde akış pompası işlevi.....18
2.4.10 *E coli* bakterisinde biyofilm oluşumu ile ilgili genler.....18
2.4.11 Biyofilm ve akış pompası inhibitörleri.....20
2.5 Antibiyotik Alımında Azalma.....21
2.6 Enzimatik İnaktivasyon.....21
3.1 Materyaller.....23
3.1.1 Cihazlar ve ekipman.....23

3.1.2 Biyolojik ve kimyasal malzemeler 24
3.1.3 PCR tespit kitleri 25
3.1.4 Kültür ortamı 25
3.1.5 PCR için materyaller 26
3.2 Metotlar 27
3.2.1 Numune toplama ve hazırlama 27
3.2.2 Bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması 28
3.2.3 VITEK 2 compact sistemi ile tanı 28
3.2.4 Bakteriyel süspansiyon hazırlama 29
3.2.5 Bakteriyel inokulum 29
3.2.6 Biyofilmin saptanması 29
3.2.7 Jel elektroforezi 32
3.2.8 İstatistiksel analiz 32
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 33
4.1 Numune İzolasyonu ve Tanımlaması 33
4.2 Antibiyotik Direnci 34
4.3 *E. coli* izolatları için antibiyotik direnci 35
4.4 TCP Kullanılarak Biyofilm Oluşumunun Tespiti 42
4.5 Biyofilm Genlerinin Araştırması 43
4.5.1 Biyofilm oluşturan *E. coli'nin* antibiyotik direnç genlerinin incelenmesi 45
4.6 Üropatojenik *E. coli'*de Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Oluşumu İlişkisi 48
5. SONUÇ VE ÖNERİLER 51
KAYNAKLAR 52
EKLER 61
ÖZGEÇMİŞ 64

SİMGELER DİZİNİ

β	Beta
PPM	Bir million'da bir
ºC	Celsius dereceleri
BP	Çift bazlı
GR	Gram
KDA	Kilodalton
L	Litre
mL	Mililitre
µm	Mikrometre
N	Normal
CFU	Ortam oluşturan birim
VER	Sürüm
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

EPI	Akış pompaları
ARG	Antibiyotik direnç genleri
MDR	Çoklu ilaç direnci
DNA	Deoksiribonukeik deoksiribonükeik asit
D.W	Distile su
TCP	Doku kültürü plakası
WHO	Dünya sağlık organizasyonu örgütü
F	Forward primer
ESBL	Genişletilmiş spektrumlu beta-laktamazlar
eDNA	Hücre dışı DNA
EPS	Hücre dışı polimerik maddeler
CQA	Kafeoilkinik asit
CISI	Klinik ve laboratuvar standartları enstitüsü
MGE	Mobil genetik element
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
PIA	Polisakkarit hücreler arası adezyonu
SDS	Sodyum dodesil sülfat
TBE	Tris-borate-EDTA
ICU	Yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 İYE'ye neden olan patojenler listesi (Fisher *et al.* 2011).....4
Şekil 2.2 Direnç mekanizmaları (Blanquart *et al.* 2018).....7
Şekil 2.3 Biofilm formation stages (Huynh *et al.* 2012). 11
Şekil 2.4 Biyofilm-antibiyotik direnci mekanizması (Al-Quaysi *et al.*2020). 16
Şekil 3.1 Çalışmanın deneysel tasarımı.....27
Şekil 3.2 İdrar yolu enfeksiyonundan izole edilen bakteriyel etkenler. 28
Şekil 3.3 TCP yöntemi kullanılarak biyofilm oluşturan bakterilerin tespiti. 30
Şekil 4.1 İdrar yolu enfeksiyonu örneklerinden izole edilen bakteri türlerinin sıklığı 33
Şekil 4.2 *E. coli* izolatlarında antibiyotik direnci. 36
Şekil 4.3 *S. aureus* izolatı için antibiyotik direnci.....37
Şekil 4.4 *Pantoea spp.* izolatlarının antibiyotik direnci. 38
Şekil 4.5 *Pseudomonas spp.* izolatlarının antibiyotik direnci. 39
Şekil 4.6 *Klebsiella spp.* izolatlarının antibiyotik direnci. 40
Şekil 4.7 *Enterococcus faecalis* izolatlarının antibiyotik direnci.....41
Şekil 4.8 Diğer bakteri türlerinin antibiyotik direnci. 42
Şekil 4.9 *E. coli* izolatlarında (*FimH*) geninin jel elektroforezi görüntüsü. 43
Şekil 4.10 *E.coli* izolatlarında *papC* geninin jel elektroforezi görüntüsü. 43
Şekil 4.11 *E. coli* izolatlarında *pgaC* geninin jel elektroforezi görüntüsü 44
Şekil 4.12 *E. coli* izolatlarında (*BlaCTX-M*) geni jel elektroforezi.....47
Şekil 4.13 *E. coli* izolatlarında *BlaSHV* geni jel elektroforezi sonuçları.....48
Şekil 4.14 *E. coli* izolatlarında *BlaTEM* geni jel elektroforezi sonuçları.....48

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Cihaz ve ekipman listesi. 23
Çizelge 3.2 Kimyasal listesi. 24
Çizelge 3.3 Diğer malzemeler. 24
Çizelge 3.4 PCR tespit kitleri. 25
Çizelge 3.5 Besi yerleri. 25
Çizelge 3.6 *E. coli*'de biyofilm primerlerinin nükleotid dizisi ve ürün boyutu. 26
Çizelge 3.7 PCR primerlerinin nükleotid dizisi ve ürün boyutu. 26
Çizelge 3.9 PCR çözeltilerinin hazırlanışı 31
Çizelge 3.10 Termal döngü 31
Çizelge 4.1 Örneklerdeki bakteriyel üreme. 33
Çizelge 4.2 İYE'den izole edilmiş bakterilerin antibiyotik direnci. 34
Çizelge 4.3 Biyofilm test sonucu 42
Çizelge 4.4 *E. coli* izolatlarında biyofilme ilişkin genler. 44
Çizelge 4.5 İdrar numunelerinde biyofilm ve antibiyotiğe ilişkin genler. 46
Çizelge 4.6 Üropatojenik *E. coli'de* antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumu ilişkisi. 49

1. GİRİŞ

En yaygın rahatsızlık olan idrar yolu enfeksiyonları (İYE) büyük ölçüde bakterilerden kaynaklanmakta ve her yıl dünya genelinde 150 milyon kişiyi etkilemektedir. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde tahmini olarak 10,5 milyon İYE vakası meydana gelmiştir (Öztürk and Murt 2020).

Sağlık harcamaları ve çalışanların iş kaybı, şu anda bu hastalığın toplumsal maliyetini oluşturmakta ve sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde kurumlara yılda yaklaşık 3,5 milyar dolara mal olmaktadır. İYE'ler her iki cinsiyette de (çocuklar, yetişkinler ve yaşlılar) önemli bir hastalıktır (Flores *et al.* 2019). Doğrulanmış İYE vakalarının çoğunda en yaygın bakteri grubu *Enterobacteriaceae* ailesindekilerdir. *E. coli*, günümüzde görülen İYE vakalarının %81'den fazlasından sorumludur. Bunu takiben İYE'ler en yaygın etkenlerin *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* ve *Enterococci spp.* olduğu belirtilmektedir (Ronald 2002).

Hastalığın süresini kısaltmak, üst İYE'leri ve böbrek yetmezliğini önlemek için enfeksiyonu kesin ve hızlı bir şekilde teşhis etmek çok önemlidir (Mortazavi *et al.* 2019). *E. coli*, genetik suş varyasyonları, antibiyotik kullanım çeşitliliği ve yeni, geniş spektrumlu antibiyotiklere sınırlı erişimin bir sonucu olarak dünya çapında çeşitli antibiyotik direnç modellerine sahiptir (Bullens *et al.* 2022).

Antibiyotik direnci, ister kalıtsal ister edinsel olsun, etkili İYE bakımının önünde büyük bir engeldir. Antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimler, geçirgenlik bariyerleri ve spesifik olmayan akış pompaları, genellikle kromozom tarafından kodlanan kalıtsal antibiyotik direncine katkıda bulunan süreçlere birkaç örnektir (Baunoch *et al.* 2021). İYE'ler hafif veya şiddetli olabilmektedir ve asemptomatik sistit, akut sistit, piyelonefrit ve idrar zehirlenmesine neden olabilmektedir. Üropatojenik *E. coli* (UPEC), şu anda antimikrobiyal tedavilerin sıklıkla başarısız olduğu bir *E. coli* türüdür. Biyofilmler üriner kateterler üzerinde, mesane içinde ve mesane epitel hücreleri içinde

görülmektedir. Konakçı bağışıklık sisteminden, antimikrobiyal tedaviden ve çevreden korunma biyofilm gelişimi ile sağlanmaktadır (Costerton and Stewart 2000).

UPEC, solunum için alternatif periferik elektron alıcıları (ATEA'lar) olarak idrardaki bileşikleri kullanabilmektedir. Bakterilerin biyofilm oluşturabilmeleri için başlangıçta yüzeye yapışmaları gerekmektedir. Yapışkan proteinler, fibriller ve eksojen polisakkarit molekülleri dahil olmak üzere çeşitli içsel faktörler UPEC suşlarının yapışmasını etkileyebilmektedir (Eberly *et al.* 2017).

Bu değişkenlerin aktarım ve ekspresyonları bir suştan diğerine farklılık göstermektedir (Kostakioti *et al.* 2013). Biyofilm içinde yaşayan bakteriler yerleşik bakteriler olarak bilinmektedir. Bu bakteriler büyüme evrelerinde ya durağan ya da inaktiftir ve fenotipleri planktonik bakterilerden farklıdır. Biyofilmler içinde bakteriler, başta antibiyotikler olmak üzere çevrenin getirdiği baskılara karşı olağanüstü bir direnç gösterirler. İnsanlarda görülen mikrobik hastalıkların %60-80'inin biyofilm oluşturan bakterilerden kaynaklandığı tahmin edilmektedir. Bu nedenle, biyofilmler halk sağlığı için büyük bir tehlike oluşturmaktadır (Vestby *et al.* 2020).

Bu çalışmanın amacı, idrar yolu enfeksiyonu (İYE) klinik olgularından izole edilen patojenik bakteriler arasında biyofilm oluşumu ile antibiyotik direnci arasındaki moleküler ilişkiyi belirlemektir.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 İdrar Yolu Enfeksiyonları

Solunum sistemi enfeksiyonlarından sonra insanlarda en sık görülen ikinci hastalık İYE'dir. İYE, dünya çapında yılda 150 milyon kişiyi etkileyen ciddi bir halk sağlığı sorunudur. İdrar yolu epitelinde iltihabi bir yanıtı tetikleyen herhangi bir enfeksiyon İYE ile sonuçlanmaktadır (Flores-Mireles *et al*. 2019).

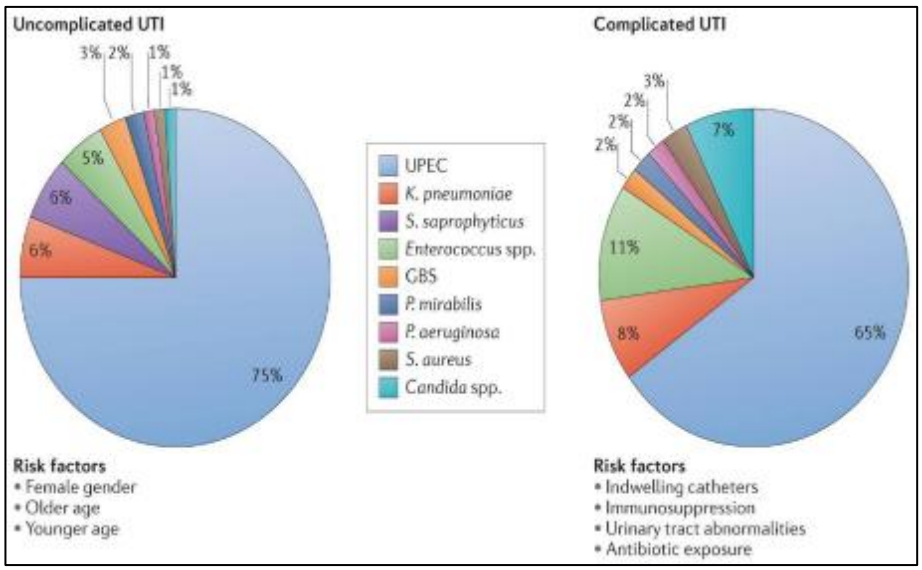
Her yaştan erkek ve kadın İYE'den etkilenmektedir. Kadınların yaklaşık %20'si hayatları boyunca bir kez İYE yaşayabilmektedir. Hastalık baskın olarak kadınları etkilemektedir. İYE, tekrarlayan nüksler, sepsisli piyelonefrit, böbrek hasarı ve erken doğum gibi sosyal hizmet ve tıbbi tedavi masraflarını artıran morbidite ve sekellere önemli bir katkıda bulunmaktadır. İdrar kültürü ile patojen tespiti, miktar tayini ve tanımlanması, İYE'lerin belirlenmesinde altın standarttır. İYEye neden olan çeşitli bakteriler arasında tipik olarak en yaygın olanı *E. coli*'dir (Mortazavi-Tabatabaei *et al*. 2019).

Klinik olarak İYE'ler, genellikle sağlıklı ve idrar yolu yapısallığı olmayan veya komplike olmayan İYE nörolojik sorunları olan kişileri etkileme eğiliminde olan, basit ve komplike kategoriler olarak ayrılabilmektedir. Bu hastalıklar üst ve alt idrar yolu enfeksiyonları olarak sınıflandırılmaktadır (Hooton 2012).

Sistit için risk faktörlerinden bazıları cinsiyet, önceki bir İYE, cinsel aktivite, vajinal enfeksiyon, diyabet, obezite ve genetik yatkınlığıdır (Foxman 2014). Taş, kalıcı kateterler veya diğer drenaj cihazlarının neden olduğu enfeksiyonlar, komplike İYE'lere neden olabilen yabancı cisimlere örnektir (Levison and Kaye 2013). Komplike İYE'lere neden olabilecek diğer faktörler arasında idrar tıkanıklığı, nörolojik hastalıkların neden olduğu idrar retansiyonu, immünosupresyon, böbrek yetmezliği ve böbrek nakli, hamilelik ve idrar tıkanıklığı yer almaktadır. Kalıcı kateterler, ABD'deki kompleks

İYE'lerin %70-80'inden veya yılda 1 milyon enfeksiyondan sorumludur (Lo *et al.* 2014).

İYE'ye hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilerin yanı sıra bazı mantarlar da neden olabilmektedir. UPEC, idrar yolu enfeksiyonlarının hem yaygın hem de nadir formlarının önde gelen nedenidir. UPEC, basit İYE'lere karışan en yaygın ajandır. Enfeksiyon etkenleri sıklığında *Klebsiella pneumoniae* ikinci sırada gelir, bunu *Staphylococcus saprophyticus, Enterococcus faecalis,* B grubu streptokok (GBS), *Proteus mirabilis, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* ve *Candida* türleri izlemektedir (Kline *et al.* 2011).



Şekil 2.1 İYE'ye neden olan patojenler listesi (Fisher *et al.* 2011)

2.2 Tedavi

Üç günlük trimetoprim/sülfametoksazol iyi bir mini doz tedavisidir. Ancak direnç yaygındır. Birinci nesil sefalosporinler, mini doz tedavisi için uygun bir alternatif sunmaktadır. Nitrofurantoin basit İYE'lerin tedavisi için iyi bir alternatiftir, bakteriyosidal olmaktan ziyade bakteriostatiktir. Özellikle prostatta olmak üzere yüksek doku penetrasyon seviyeleri nedeniyle florokinolonlar, bakterilerin yüksek direnç göstermsine rağmen ürologlar arasında tercih edilmeye devam etmektedir. Bu nedenle

florokinolonlar, prostata ilişkin enfeksiyonlar dışında genellikle tercih edilmemektedir (O'Grady *et al.* 2019).

Fosfomisin *E. coli* kaynaklı komplike olmayan İYE'ler için tek dozluk bir tedavi olarak yakın zamanda FDA tarafından onaylanmıştır. Günlük olarak alınan ek bir fenazopiridin semptomların hafiflemesine yardımcı olabilmektedir (Castro-Sánchez *et al.* 2016).

İlaç kullanılmasa bile, kadınların %20'sinin İYE'si, özellikle de hidrasyonun iyileştirilmesi durumunda, kendiliğinden düzelmektedir. Hamile olmayan sağlıklı bir kadının akut piyelonefrit olma olasılığı çok düşüktür (Hooton 2012).

Asemptomatik bakteriüri oldukça sık görülür ve hamile kadınlar, bağışıklık sistemi baskılanmış olanlar, organ nakli geçirmiş olanlar ve yakın zamanda ürolojik bir ameliyat geçirmiş olanlar dışındaki hastalarda tedavi gerektirmemektedir Yetişkinlerde İYE'leri tedavi etmek ve önlemek için piyasada çok sayıda özel karışım ve bitkisel ilaçlar mevcuttur. İki adet çok bileşenli formülasyon keşfedilmiştir ve hem çocuklar hem de hamile kadınlar üzerindeki etkinlikleri test edilmiştir (Al-Bayati and Samarasinghe 2022).

Canephron® N, kantaron tozu (*Centaurium erythraea Rafn*), selom otu kökleri (*Levisticum officinale Koch*) ve biberiye yaprakları (*Rosmarinus officinalis linné*) içeren iyi bilinen tescilli çok bileşenli bir bitkisel ilaçtır. Bionorica broşüründeki bilgilere göre, tedavi (bitkisel ilaç), 12 yaşından büyük hastalarda "aferent idrar yolunun enflamatuar hastalıkları; böbrek kumunun birikmesini önlemek için idrar yolunun temizlenmesi" ile ilişkili hastalıklar için tamamlayıcı bir tedavi olarak önerilmektedir (Bengtsson- Palme and Heß 2019).

Üç farklı terapötik bitki içerdiğinden ötürü ilaç, diüretik, antinosiseptif, antispazmodik ve yapışma önleyici özelliklere sahiptir (Höller *et al.* 2021). Canephron® N'nin etkinliğine ilişkin olarak yapılan retrospektif araştırmaya göre Canephron® N ilacı, antibiyotik tedavilerine kıyasla tedaviden sonraki 1 yıl içinde daha az sporadik RUTI ve

daha az antibiyotik reçetesi ile ilişkilendirilmiştir (Höller *et al.* 2021). Yazarlar, Canephron® N'yi İYE'ler ve akut sistit için ek semptomatik tedavi olarak önermişlerdir. Yapılan bir faz III çift kör randomize klinik çalışmaya göre ise 18 ila 70 yaşları arasında akut İYE için Canephron® N ile tedavi edilen kadın hastaların %83'ü 1-38. günler arasında başka antibiyotik reçetesi almamıştır (Wagenlehner *et al.* 2018). Fosfomisin alan grupta da benzer sonuçlar görülmüştür. İYE'lere yönelik Canephron® N tedavisi de hamile kadınlar ve çocuklar üzerinde yürütülmüştür (Hudson *et al*. 2022).

2.3 Antibiyotik Direnci

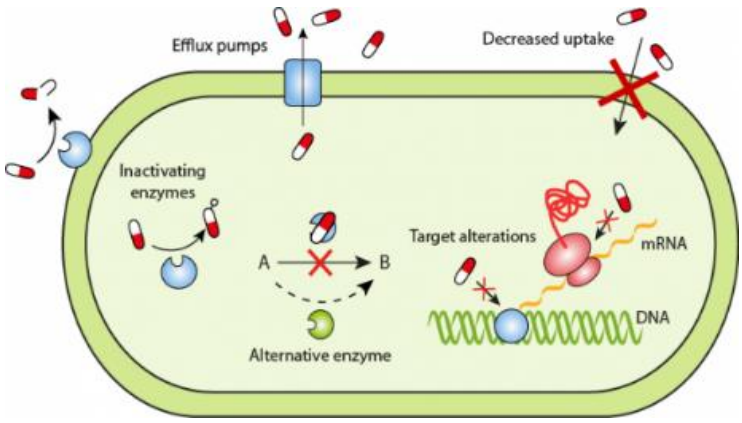
Antibiyotik direnci, mücadele edilmediği takdirde 2050 yılına kadar tüm kanser türlerinde meydana gelenlerin toplamından daha fazla insanı öldürecek olan önemli bir sağlık riskidir (Ozturk and Murt 2020). Günümüzde, müdahale tekniklerinin "tek sağlık" yaklaşımını benimsemesi gerektiğine dair yaygın bir anlayış bulunmaktadır.

Bu yaklaşım, insanlar ve hayvanlar için tıbbi tedavinin yanı sıra çevreyi de kapsamaktadır (Kahn 2017). Takip programlarının ve hastane ortamlarında antibiyotik kullanımının sınırlandırılması yıllar önce başlatılmış olmasına rağmen, çevrenin antibiyotik direncinin gelişimi ve yayılmasındaki rolü yeni yeni anlaşılmaya başlanmıştır (Gaze *et al*. 2013). Antibiyotik direnç genleri (ARG) insanların, çiftlik hayvanlarının arasında ve çevrede yayılabilmektedir (Bengtsson and Heß 2019). Buna ilaveten, ortam bakterilerinden ARG'lerin insan hastalıklarına dahil edildiği süreçler de daha iyi kavranmaktadır (Xiong *et al*. 2017).

Antibiyotik direncinin bulaşmasını ve oluşumunu durdurmaya yönelik etkili önlemler geliştirmek için bu süreçlerin göreceli olarak öneminin belirlenmesi gerekmektedir (Larsson *et al.* 2018). Direnç gelişiminde çevrenin rolüne ilişkin çeşitli hipotezler ileri sürülmüştür. ARG'lerin çevreyle bağlantılı bakteriler, insanlar ve hayvanlar arasında aktarılması da bilinen ilk faydasıdır (Bengtsson-Palme *et al*. 2018).

Ayrıca, dirençli bakteriler ve ARG'ler için bir rezervuar veya aracı da habitat görevi görmektedir. Direnç seçimi için bir ortam ve bakterilerin ARG'leri çekebileceği önemli bir genetik çeşitlilik kaynağı sağladığından ötürü yeni direnç faktörlerinin geliştirilmesinde de önemli bir rol oynayabilmektedir.. Bir plazmid, transpozon veya integron üzerinde bir genin ortaya çıkması, mobil genetik elementin (MGE) bir başka örneğidir ve bu olguyu tanımlamak için "mobilizasyon" terimi kullanılmaktadır. Ortaya çıkan çevresel ARG'ler, yeni konakçılara yayılma potansiyelleri nedeniyle insan ve hayvan sağlığı için ciddi tehditler oluşturmaktadır (Bowler 2018).

Çevrenin direnç gelişiminde kavramsal olarak önemli bir rol oynamasına rağmen kısmen nicel kanıtların yetersizliği nedeniyle gerçek önemi henüz saptanamamıştır (Bengtsson and Heß 2019). Özellikle, yeni ARG'lerin çevrede ortaya çıkıp çıkmayacağı veya ne kadar hızlı yayılıp enfeksiyona dönüşeceği henüz bilinmemektedir. Dolayısıyla, risk senaryolarını değerlendirmek ve yeni ARG'lerin oluşturulmasını amaçlayan potansiyel müdahalelerin önceliklerini belirlemek oldukça zordur (Pittet 2005). Direnç mekanizmaları Şekil 2.2'de verilmiştir.



Şekil 2.2 Direnç mekanizmaları (Blanquart *et al.* 2018).

Antimikrobiyal direncin hem insan hem de hayvan sağlığına yönelik tehlikesi, küresel sağlık sistemleri için hala bir zorluk teşkil etmektedir. Mikroorganizmaların doğal bir özelliği olmasına rağmen, birçok nedenden kaynaklanan AMR klinik açıdan önemli prevalansı, antimikrobiyal ilaçların uygunsuz kullanımı ile daha da kötüleşmiştir. Yeterli sağlık hizmeti ve ilaca erişim, antibiyotiklerin direnç mekanizmaları ve sosyal

süreçler gibi halkın antimikrobiyal kullanım davranışları, birbiriyle ilişkili çeşitli değişkenlerden etkilenmektedir. Toplumun AMR hakkındaki görüşleri, erişilebilir bilginin özelliklerinden de etkilenebilmektedir. Aynı şekilde, insanlar verilen bilgileri etkin şekilde kullanacak yetkinliğe de sahip olmayabilmektedir. Bu nedenlerden dolayı bilimsel ve sağlık politikaları biyofilme karşı direnç gösterilmesine ilişkin olarak bazı antibiyotikleri öne çıkarabilmektedir (Castro *et al.* 2016).

2.3.1 Antibiyotik direncinin mekanizmaları

Ciddi enfeksiyonların tıbbi tedavisi, kliniklerde antibiyotik kullanımını gerektirir, ancak bunların yaygın kullanımı, antibiyotiğe dirençli bakteri suşlarının artmasına ve tedaviyi etkisiz hale getirmesine neden olmuştur. Farklı süreçler antibiyotik direncinin gelişmesine aracılık etmektedir.

Çoklu antibiyotik direnç genlerinin yatay gen transferi ile edinilmektedir. Azaltılmış zar geçirgenliği özelliği ile enzimleri parçalayarak antibiyotiklerin hızlandırılmış sindirimi ve deaktivasyonu tanınmaktadır. Antibiyotiğin hedefe bağlanmasını önleyen hedef modifikasyonları gibi antibiyotikleri modifiye eden ve onları etkisiz hale getiren enzimlerin artan üretimi dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olabilmektedir. Akış pompalarının aşırı ekspresyonuna bağlı olarak hücre içi ilaç konsantrasyonu eksikliği ve hızlı ilaç salımı gibi kısa düzenleyici RNA'ların (sRNA'lar) ifadesi kullanılmaktadır. 16S ve 23S rRNA'yı metile eden metiltransferazlar, antibiyotik bağlanma bölgesini azaltılmış ilaç afinitesi ile oluşturur. rRNA'lardaki değişiklikleri ribozom korumaktadır (Uruén *et al.* 2020).

2.4 Biofilm Oluşumu

Birkaç bakteri türü, karmaşık, çok adımlı (genellikle döngüsel) bir biyofilm geliştirme sürecine katılmaktadır. Hücre dışı polimerik maddeler (EPS) veya polisakkaritler, proteinler (esas olarak D-amino asitlerden oluşur), yağ asitleri ve bakteriyel biyofilmler

tarafından salgılanan çeşitli nükleik asitlerin bir kombinasyonudur (Khatoon *et al*. 2018).

EPS'nin biyofilmlerin yaklaşık %1'ini oluşturduğu tahmin edilmektedir ve biyofilm gelişiminde önemli bir rol oynamasına rağmen çoğu biyofilmde yetersiz tanımlandığı düşünülmektedir. Çoğunlukla su kanallarından oluşan yapışkan bir matris olan EPS, besin ve oksijen transfer kanalı görevi görmektedir. Antikorlar, beyaz kan hücreleri, monositler ve antibiyotikler, EPS yüzeyleri için ana bağlanma platformu görevi görür ve ayrıca bakterileri konak savunma mekanizmalarından korumaktadır (Chang *et al.* 2019). Ek olarak, ortak bakteriyel bileşik, siklik dimerik guanozin monofosfat (c-di-GMP) gibi hücreler arası sinyal moleküllerinin aktivitesini desteklediği gösterilmiştir. Bu sinyal sistemi, belirli bakteri türlerinin büyümesini ve kolonizasyonunu teşvik etmektedir (Khatoon *et al.* 2018).

Bakteriyel biyofilmler, antibiyotiklere ve insan bağışıklık sistemine karşı yüksek düzeyde immünojenisiteleri nedeniyle, kalıcı enfeksiyonlara ve hastane ve ilgili ekipmana neden olabildikleri için klinik ortamlarda önemli bir sorundur, mikrobiyom evrimi, bakteriyel patojenite ile ilişkilidir (Khatoon *et al*. 2018).

Nüks ve kronik hastalığın ana nedenlerinden biri biyofilmlerdeki kalıntı bakterilerdir. Bakteriyel biyofilmler yaygındır ve bakterilerin kendileri tarafından üretilen bir hücre dışı polimer matrisi ile çevrili yerleşik bakterilerden oluşmaktadır. İlaçlara ve vücudun bağışıklık sistemine karşı yüksek direnç göstermeleri nedeniyle uzun süreli enfeksiyonlara ve sistem kaynaklı hastalıklara neden olabilmektedirler. Patojenik olmayan *E. coli*'de biyofilm oluşumu için temel hücre yüzeyi elemanları iyi belgelenmiştir (Gupta *et al.* 2016). Bununla birlikte, biyofilm üretiminde patojen izolatlarının önemine dair çok az kanıt vardır.

Çalışmamız, biyofilm gelişimine dahil olan bazı fenotipler veya genler ile kommensal ve patojenik *E. coli'*nin biyofilmlerini oluşturma yeteneği arasındaki moleküler ilişkiyi göstermektedir. Ayrıca, otomatikleştirilmiş görüntü analizi kullanarak biyofilmlerin niteliksel analizini mümkün kılan ve yüksek verimli analizi kolaylaştıran, yakın

zamanda kurulmuş bir tekniği tartışıyoruz. Sonuçlarımız, *E. coli* biyofilminin daha iyi anlaşılmasına katkıda bulunmaktadır (Høiby *et al.* 2015).

2.4.1 Biyofilm oluşumunun aşamaları

İlk aşama bir yüzeye ilk olarak geri dönüşümlü bağlanma, ardından yüzeye sonraki geri dönüşümsüz bağlanmadır, EPS ve mikro koloniyi çevreleyen hücre dışı matrisin diğer bileşenlerinin yanı sıra bakterilerin çoğaldığı ve bir mikro koloni oluşturduğu olgunlaşma aşaması, EPS ve diğer bileşen bazlı glikokalikse yapışan diğer bakteriler, 100 m kalınlığa kadar çok sayıda katmana sahip olabilen biyofilmin karmaşıklığına ve derinliğine katkıda bulunmaktadır (Luo *et al.* 2022).

Bazı bakterilerin yerleşik biyofilmden salınması, patojenlerin başka yerlere gezinmesine ve yeni biyofilmler oluşturma kapasitesiyle hastalığı yaymasına izin vermektedir. Biyofilm yapısı yaşlandıkça içinde kanallar oluşmaktadır. Bunlar, besin maddelerinin ve sinyal moleküllerinin gradyan bazlı taşınmasını kolaylaştırarak metabolik duruma bağlı olarak düzenli kümelenmeyi ve hücre farklılaşmasını desteklemektedir (Luo *et al.* 2022).

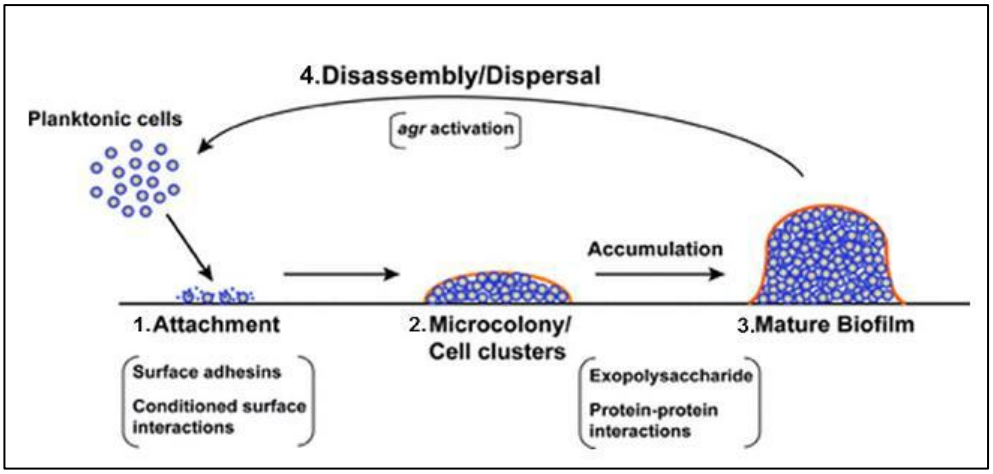
Biyofilmleri başlatmak ve bakteriyel yaşam tarzını planktonik bir durumdan kararlı bir forma dönüştürmek için, bakteriler ile biyotik veya abiyotik yüzeyler arasında fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkileşimler vardır; bunların altında farklı bakteri hücre fenotipleri ve genetik değişiklikler meydana gelmektedir (Bjarnsholt *et al.* 2018).

Bakteriyel hücreler önce uzantıları (örneğin flagella, pilus, pili) tarafından tanımlanan bir yüzeye taşınır ve daha sonra bakteri yapışmasıyla ilişkili van der Waals kuvvetleri dahil olmak üzere fiziksel kuvvetler tarafından yüzeye adsorbe edilmektedir (Liu *et al.* 2016). Bu aşama tersinir bağlanma olarak adlandırılmaktadır. Yüzeye yapışan bakterilerin bir kısmı orada kalır ve kalıcı bir tutunma oluşturmaktadır. Bakteri uzantıları (flagellatlar, flagellalar, filamentler) ve hatta EPS, bakteri hücresi ile yüzey arasındaki kimyasal reaksiyonları katalize ederek bakteri ve yüzey arasında bir köprü

görevi gören ve yüzey etkileşiminin derecesinin hidrofilikliğine ve hidrofobikliğine bağlı olan bağlar oluşturmaktadır (Bjarnsholt *et al.* 2018).

Bakteri hücrelerinin yüzeylere daha uzun süre tutunması, sırasıyla gram negatif asil-homoserin laktonlarda (AHL) ve gram pozitif peptitlerde bulunan ve bakteriler arası iletişim olarak adlandırılan küçük kimyasal bileşiklerin sinyalini vererek birbirleriyle etkileşime girmelerine zemin hazırlamaktadır. Bakteriler daha sonra toplanmaya başlar ve hücreden hücreye temas (eDNA) sonucunda polisakkaritler, lipitler, protein ve hücre dışı DNA'dan oluşan bir EPS matrisi üretmektedir (Neethirajan and Vogt 2014). Besinler için bir rezervuar görevi görmenin yanı sıra, bu matris bakterileri çevreleyerek olumsuz çevresel koşullara (antibiyotik etkisi, biyositler, kuruluk, UV radyasyonu, stres faktörleri ve konakçı bağışıklık sistemi koruması) karşı koruyucu bir bariyer görevi görür. Bu nedenle metabolizma hızını yavaşlatarak ve oksijen ve pH oranını düşürerek bakteri hücrelerini besinlerden ayırarak değişim adaptasyonuna neden olmaktadır (Huynh *et al.* 2012).

Biyofilm oluşum sürecindeki son adım, biyofilm çoğalmasıdır. Biyofilm çoğalmasına neden olan birçok faktör vardır, bunlardan bazıları besin maddesinin tükenmesi, özellikle glikoz eksikliği, bozulmuş EPS, kuam indüksiyonuna müdahale ve sinyal üreterek çoğalma sürecinden sorumlu proteinlere bağlanmadır (Huynh *et al.* 2012). Tüm bu aşamalar Şekil 2.3'de açıkça görülmektedir.



Şekil 2.3 Biofilm formation stages (Huynh *et al.* 2012).

Biyofilmlerde gen ekspresyonu, besinlerin, oksijenin ve elektron alıcıların konsantrasyonlarındaki farklılıklardan farklı derecelerde etkilenmiştir. Sigma faktör proteinleri ve kısa kodlayıcı olmayan RNA'lar (sRNA'lar), bakterilerin uyum sağlamasına yardımcı olmak için bu çevresel ipuçlarına yanıt olarak çok sayıda gene düzenleyici sinyaller iletmektedir (Ghaz *et al.* 2013). Pek çok biyofilm, biyofilm üretimi için gerekli genetik değişiklikleri başlatan anahtar düzenleyici genlerin uyarılmasıyla başlatılıyor gibi görünmektedir.

Gerçekten de, gen ifadesindeki birçok değişiklik, yüksek derecede koruma göstermektedir. Çoğu adezyonla ilişkilidir ve ilgili yüzeylere adapte olma özelliği gösterir, bu da hücrelerde farklı aşamalarda bulunmalarına yol açmaktadır. Biyofilm hücreleri, uykuda veya ölü fermantasyon yoluyla yavaş büyürken, biyofilm dışındaki hücreler metabolik ve aerobik aktivite ile büyümektedir (Neethirajan *et al*. 2014).

Biyofilm sürecinin her adımı gen aileleri tarafından düzenlenir ve her bir etken mikroorganizma spesifik genlere sahiptir. Biyofilm oluşumu için gerekli bir gen (nedensel genler): icaADBC (hücreler arası adezin) gibi adezyon adımından sorumlu çok sayıda gen, *Staphylococcus spp*. ve özellikle *Staphylococcus aureus'un* katı yüzeye yapışmasına ve biyofilm oluşturmak için hücreleri birbirine bağlamasına yardımcı olan polisakkarit hücreler arası adezyonu (PIA) sentezlemek için hareket etmektedir (Neethirajan and Vogt 2014).

Biyofilm oluşumunun yapışma kısmını ve *Pseudomonas* bakterilerinde bakteriler arası iletişim sinyalini sentezlemede rol oynayan lasI gibi sinyali sentezlemek için bakteriler arası iletişimi düzenleyen birçok gen vardır (Lebeaux *et al*. 2014).

Biyofilm sürecini farklı şekilde düzenleyen genler (etkili genler) olarak adlandırılırken, biyofilmi kodlayan genlerin çoğu dış çevresel koşullardan etkilenerek biyofilm oluşturmak için bazı genlerin ifadesini değiştirebilmektedir, bu değişiklik gen ifadesinde yukarı veya aşağı olabilmektedir ve daha sonra biyofilmin olgunlaşmasına yol açmaktadır (Lebeaux *et al*. 2014).

2.4.2 Biyofilmin mikrobiyal etiyolojisi

Tek veya birden fazla bakteri türü biyofilm oluşturabilmektedir. Biyofilmler, gram-pozitif ve gram-negatif bakteriler, mayalar ve mantarlar dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. Bu mikroorganizmaların bazıları diğerlerinden daha kolay biyofilm oluşturabilmektedir ve pili, fimbria ve flagella gibi hücre dışı organellere sahiptir (Neethirajan *et al*. 2014). Bir bakteri hücresi, su ve besin alımını ve atık bertarafını düzenlemek için sürü tanıma gibi işbirliği içinde iletişim kurmaktadır. Bu da koruma seviyesini arttırır ve böylece bakteriyel biyofilmin antibiyotik direncini açıklamaktadır (Lebeaux *et al*. 2014).

2.4.3 Biyofilm oluşturan bakteriler

Çoğu bakteri türü biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir.

2.4.3.1 Gram-negatif bakteriler

Gram-negatif bakterilerin çoğunluğu, İYE enfeksiyonlarıyla bağlantılı hastane enfeksiyonları olarak yaygındır ve kateterlere bağlıdır (CAUTI). Gram-negatif bir bakteri olan *Pseudomonas aeruginosa*, biyofilm enfeksiyonlarıyla bağlantılıdır. Özellikle kateterize hastaların idrar yolları *Proteus, Serratia, E. coli, Klebsiella* ve diğer *Enterobacteria* tarafından fırsatçı bir şekilde enfekte edilmektedir. Bakterilerin bazıları patojenitesiyle bağlantılı olan ve klinik tedavinin başarısı için çok önemli olan biyofilm oluşturma kapasitesine sahiptir (Lebeaux *et al*. 2014).

Kateter kullanımıyla ilişkili bakteriler büyük oranda hastaların bağırsak mikrobiyotasından kaynaklanmaktadır (Kline and Lewis 2017). Son zamanlarda bazı bakteriyel türler dünya biyofilmine girmiştir ve bu bakteri (*Pantoea spp.)* 1972 yılında ilk kez yayınlanmıştır. *Enterobacteria* ailesinin bir üyesidir. İnsanlarda hastane ya da yara enfeksiyonlarına neden olabilen fırsatçı bir patojendir (Dutkiewicz *et al.* 2016).

Hastanelerdeki hastalar, özellikle de bağışıklık sistemi zayıf olanlar, kontamine sıvılar veya ekipman yoluyla enfeksiyon kapma riskiyle karşı karşıyadır. *Pantoea spp.* ile en yüksek hastane enfeksiyonu vakaları 1970-1971 yılları arasında ABD'deki bir hastanede 378 vakadan 152'sinde septisemi vakası görülmüş ve ölüm oranı %13,4 olmuştur (Maki *et al.* 1976). *Pantoea spp.* idrar yolu da dahil olmak üzere vücudun çeşitli bölgelerinden izole edildiğinde, son zamanlarda bildirilen vakalarda bir artış olmuştur.

2010 yılında, antibiyotik tedavisine olumlu yanıt verilmesi için birkaç vaka sayısının azalması gerekirdi. Ancak 2012 yılında hemodiyaliz hastaları arasında nozokomiyal bir salgın ve yeni KBH vakaları olarak yeniden ortaya çıkmıştır (Kazancioglu *et al.* 2014).

2.4.3.2 Gram-pozitif bakteriler

Gram pozitif bakteriler tarafından biyofilm üretimi gram negatif bakterilere göre daha az sıklıkta görülmüştür. Birlikte kümelenme, biyofilm oluşturma veya antibiyotiklerin etkilerine direnme kapasitesi gibi çok sayıda virülans özelliği, bu mikropların patojenitesinin artmasına katkıda bulunmaktadır. MRSA ve genişlemiş spektrumlu β-laktamaz (ESBL, a*mpC*) üreten bakterilerin her ikisi de potansiyel olarak tehlikelidir (Cortese *et al.* 2018).

Cihazla ilişkili biyofilmlerde bulunan gram-pozitif bakteriler arasında *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Staphylococcus aureus* bulunmaktadır. *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* ve diğer türler üriner kateterlerde nozokomiyal enfeksiyonların en yaygın nedenleridir ve biyofilm oluşumunda önemli bir faktör olduğu düşünülen biyofilmlerle ilişkilidir. Abiyotik veya biyotik yüzeyler üzerinde üç boyutlu bir biyofilm oluşturarak yüzey kolonizasyonu, bu bakterilerin patojenitesinin önemli bir bileşenidir. Stafilokoklar çoğalmadan ve birincil olarak N-asetilglukozaminden oluşan amorf bir hücre dışı malzemeye gömülmüş çok katmanlı hücre kümelerinde birikmeden önce hücre duvarı teikoik asitlerine, DNA'ya ve konakçı ürünlere erişmek için konakçı dokuya veya bir tıbbi cihazın yüzeyine yapışmalıdır (Archer *et al.* 2011).

2.4.4 Biyofilmin avantajları

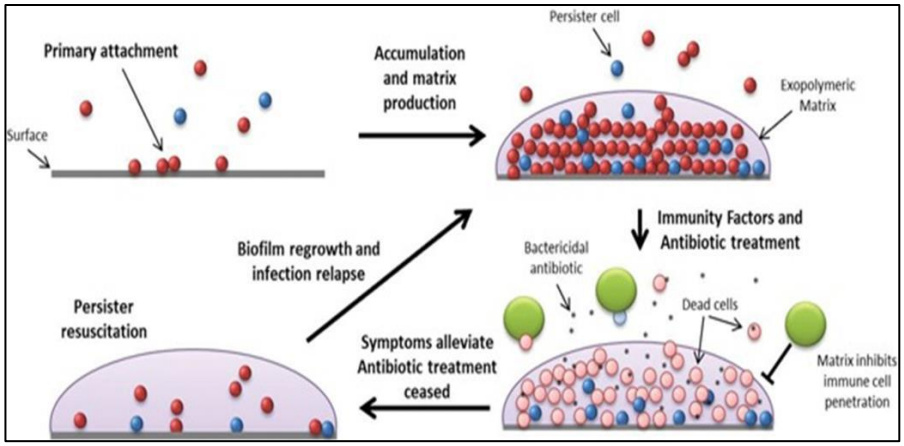
Bakteri hücresi biyofilm oluşturarak birçok avantaj sağlayabilmektedir. Bunların başlıcaları, dezenfektan, antiseptik ve antibiyotiklere karşı direnç, bağışıklık sistemi tepkisinden kaçınma ve çevre koşullarından korunmadır (Archer *et al.* 2011).

2.4.5 Biyofilmle ilişkili antimikrobiyal direnç mekanizmaları

Bakteriyel biyofilmler antibiyotiklere çok faktörlü direnç göstermiştir ve bu dirençle ilgili dört baskın teori vardır. Birincisi, EPS'nin çevre ile bakteriler arasında mekanik bir bariyer görevi görmesi ve antibiyotiklerin çok katmanlı matrislerden penetrasyonunu önleyerek bakterilerin çevresel antimikrobiyal maddelere maruz kalmasını en aza indirmesidir. Örneğin, *P. aeruginosa*'nın EPS tarafından antibiyotik tobramisine karşı korunduğu görülmektedir. Başka bir hipotez, EPS'nin, antibiyotiklerin aktif sindirimini, ilaçların bakteriyel enzim modifikasyonunu ve bazı antibiyotiklere karşı bir akış pompasını etkinleştiren beta-laktamazlar dahil olmak üzere EPS matrisinde konsantre bir dizi antimikrobiyal peptit tuttuğunu öne sürmektedir (Burmolle *et al.* 2014). Bu fikri destekleyen bir çalışmada, *S. epidermidis* EPS ekstraktlarının teikoplanin ve vankomisinin antibakteriyel aktivitesini inhibe ettiği bulunmuştur (Akbarian *et al*. 2022).

Üçüncü hipoteze göre, düşük besin, oksijen ve kimyasal gradyanlardan oluşan mikro çevre, düşük metabolik aktiviteye ve hücre bölünmesinde yavaşlamaya neden olmaktadır, bu da büyümenin yavaşlamasına veya hiç olmamasına yol açmakta ve aktif bakteri hücrelerini yarı uykuda hücrelere dönüştürmektedir (Van *et al.* 2014). Bakteriler biyofilmlerde hareketsiz olduğundan, hücre döngüsünü bozan ilaçların onlar üzerinde hiçbir etkisi yoktur. Biyofilmin yüksek yoğunluğunun bir sonucu olarak atık oluşumu, antibiyotiklerin ne kadar iyi çalıştığını değiştirebilmektedir (Roy e*t al*. 2018).

Moleküler düzeyde, başka bir teori, antibiyotiklere karşı bakteriyel biyofilm direncini, gen ekspresyon modellerindeki değişiklikleri veya antibiyotik direncini artıran mobil genetik elementlerle genleri bozan sıkıca kümelenmiş bakteri hücreleri arasındaki yatay gen transferini açıklayabilmektedir. Bu teorilerden bazıları Şekil 2.4'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4 Biyofilm-antibiyotik direnci mekanizması (Al-Quaysi *et al.* 2020).

2.4.6 Biyofilm aracılığıyla antibiyotik penetrasyonunun önlenmesi

Ampisilin gibi birçok antibiyotik, biyofilmdeki bakterileri çevreleyen EPS'ye nüfuz etmekte zorlanır, ancak siprofloksasin gibi bazıları biyofilm matrisinden geçebilmektedir. Tobramisin gibi aminoglikozid sınıfından pozitif yüklü antibiyotikler, negatif yüklü polisakkaritler, özellikle Pel polisakkarit ve *Pseudomonas aeruginosa*'nın alginatı, bunları etkili bir şekilde tutabilmektedir. Sonuç olarak, antibiyotikler biyofilmin daha derin seviyelerine ulaşamamaktadır. EPS'nin bu özelliği biyofilmdeki bakterileri çinko, bakır ve kurşun gibi metallere karşı da dirençli hale getirmektedir (Roy et *al*. 2018).

Ek olarak, biyofilmlerin hücre dışı matrise saldığı hücre dışı DNA'nın (eDNA), katyonik şelatlama özellikleri nedeniyle antimikrobiyal peptitlerin ve tobramisin gibi ilaçların etkilerini bloke etme yeteneğine sahip olduğu gösterilmiştir (Wilton *et al.* 2016).

2.4.7 Biyofilm oluşum hızını ve kapsamını etkileyen faktörler

Biyofilm oluşumunun ilk aşamasında, bakteriler uzun süre açıkta kalan uç yüzeyine geri dönüşümsüz olarak tutunmalıdır. Bağlanma oranı üç faktöre bağlıdır; akan sıvıdaki bakteri hücrelerinin sayısı, sıvının akış hızı ve yüzeyin fiziksel ve kimyasal özellikleri. Ayrıca, sıvının bileşimi yüzey karakterizasyonunu ve dolayısıyla bağlanma oranını etkileyebilmektedir (Garrett *et al.* 2008). Bakteri hücreleri geri dönüşümsüz olarak bağlandığında ve hücre dışı matris ürettiğinde, büyüme oranı besinin bileşimi, akış hızı, ortam sıcaklığı ve antibiyotik konsantrasyonundan etkilenmektedir (Garrett *et al.* 2008).

2.4.8 Biyofilme gömülü bakterilerin antibiyotik direnci

Antibiyotik direnci ve tedavi başarısızlığı büyük ölçüde enfeksiyonların biyofilm oluşturmasından kaynaklanmaktadır (Sharma *et al.* 2019). Bakteriler, biyofilm içinde kendilerini çevreleyen EPS tarafından tehlikeli ve yıkıcı dış unsurlardan korunmaktadır. (Vestby *et al.* 2020).

Planktonik gelişen hücrelerle karşılaştırıldığında, biyofilmlere gömülü bakteriler antimikrobiyal tedavilere karşı sıklıkla daha dirençlidir. Bu durumun bir dizi yorumu vardır. Benzersiz mimarileri nedeniyle biyofilmler son derece kalıcıdır ve hem bağışıklık sistemine hem de antibiyotikler gibi zararlı unsurlara karşı dirençlidir. Bir biyofilmdeki bakteriler, gen ekspresyonunu ve metabolizmasını değiştirerek anoksik bir ortama ve gıda yoksunluğuna uyum sağlamakta, bu da metabolik aktivitenin azalmasına, hücre çoğalmasının azalmasına ve besin tutmanın iyileştirilmesine neden olmaktadır (Vestby *et al.* 2020). Ek olarak, biyofilmlerin gelişimi mutasyon oranlarındaki artışla bağlantılıdır ve biyofilmlere daldırılmış hücrelerin yakınlığı, direnç genlerinin bakteriler arasında yatay transferini teşvik etmektedir (Kapoor *et al.* 2017). Biyofilm içine gömülü bir bakteriden biyofilm matrisine β-laktamaz salınımı, hücre enzimi üretmese bile β-laktam antibiyotiklerin çevredeki hücre üzerindeki etkisini durdurabilmektedir. Sonuç olarak, antibiyotik direncinin pasif olarak aktarılması mümkündür (Kapoor *et al.* 2017).

2.4.9 *E. coli* biyofilmlerinde akış pompası işlevi

Dünyada en çok çalışılan *Enterobacteria E. coli*'dir. İnsan midesinde kommensal bir mikrop olarak bulunmaktadır. Ancak septik şok, sepsis ve İYE dahil olmak üzere bir dizi hastalığa neden olan bir patojen de olabilmektedir. Çalışmalar, *E. coli* biyofilmlerinin antibiyotiklere planktonik hücrelerden daha dirençli olduğunu ve biyofilmlerin ayrıca birkaç geni planktonik hücrelerden daha yüksek seviyelerde ifade ettiğini göstermektedir (Kapoor *et al.* 2017).

Klinik izolatların, tüm *E. coli* akış pompaları arasında en iyi karakterize edilen RND ailesinin bir üyesi olan AcrAB-TolC sistemini aşırı ifade ettiği bulunmuştur. Bu pompa tarafından eksprese edilen substratlar arasında kloramfenikol, florokinolonlar, fusidik asit, rifampisin, tetrasiklin, etidyum, bromür, safra tuzları, SDS ve diğer kimyasallar bulunmaktadır. AcrAB-TolC dışa akış pompası gen ekspresyonunun, çeşitli antibiyotiklere ve biyofilm oluşumuna maruz kalmaya tepki olarak arttığı bulunmuştur (Baugh *et al.* 2012).

Hem gelişmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde giderek artan bir enterik patojen, enteroagregatif *E. coli*'dir (EAEC). Bu patojenin kültürde Hep-2 hücrelerine toplanma ve bağlanma yeteneği birincil özelliklerinden biridir ve bağırsak mukozasında bir biyofilm oluşturmasıdır. TolC proteini, antibiyotikler de dahil olmak üzere çok sayıda bileşiğin dış membran üzerinden ihracı için bir kanal işlevi görmektedir. Ayrıca EAEC'de yapışma ve biyofilm gelişimi için de gereklidir. Agregatif fimbria üretiminin azalması tolC gen mutantlarında yapışma ve biyofilm oluşumunun azalması ile ilişkilendirilmiştir 56 AcrAB proteinleri ile birlikte bu protein akış pompasını oluşturmaktadır. AcrAB-TolC sisteminin bakteriyel kolonizasyon ve kalıcılığa dahil olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte, bazı araştırmalar, AcrAB ekspresyonunun, biyofilm üreten *E. coli*'yi yalnızca düşük doz siprofloksasine karşı koruduğunu göstermiştir (Imuta *et al.* 2008).

2.4.10 *E coli* bakterisinde biyofilm oluşumu ile ilgili genler

Laboratuvar dışında, bakteriler tipik olarak biyofilm olarak bilinen organize, agregatif kolonilerin bir bileşeni olarak bulunur klinik çalışmalar, enfeksiyonların yaklaşık %80'inin bir biyofilm bileşeni içerdiğini ortaya koymuştur biyofilmle ilişkili enfeksiyonlar, antimikrobiyallere karşı doğal dirençleri nedeniyle daha da kötüleşmekte, bu da onları tedavi edilmesi zor ve sıklıkla kronik hale getirmektedir. Biyofilmler tipik olarak planktonik koşullarda karşılık gelen suşlara göre antibiyotiklere 10-1000 kat daha az duyarlıdır çünkü içlerindeki hücreler planktonik kültürdekilere göre daha yavaş büyür ve bu daha yavaş metabolik aktivite oranı antimikrobiyallere toleransla ilişkilendirilmiştir (Bjarnsholt *et al.* 2018).

Biyofilmlerin klinik ortam dışında atık su arıtımı ve biyoişleme gibi çok sayıda avantajlı kullanım alanı vardır. Bir biyofilmin yaşam döngüsü tipik olarak bir yüzeye ilk yapışmayı, hücre dışı matris bileşenlerinin oluşumu ile zaman içinde büyümeyi ve olgunlaşmayı ve ardından diğer yüzeylerin kolonizasyonuna yardımcı olmak için planktonik hücrelerin yayılmasını içermektedir (Wang *et al.* 2017).

Planktonik büyüme koşulları yerine, planktonik ve biyofilm yaşam tarzları arasındaki geçiş, yaşam döngüsü boyunca gen ifadesinde ve bakteri topluluğunun desteklenmesinde önemli değişiklikleri teşvik eden çevresel faktörler tarafından yönlendirilmektedir. Başarılı biyofilm oluşumu için uygun zaman ve yerde doğru gen ekspresyonu şarttır (Wang *et al.* 2017).

Polisakkarit selüloz, hücre dışı DNA ve amiloid protein curli, *E. coli*'deki biyofilm hücre dışı matrisinin üç önemli unsurudur. Curli biyosentezi ile ilgili genler, farklı operonlar *csgBAC* ve *csgDEFG* tarafından transkribe edilir ve *CsgD* bunların ekspresyonunu kontrol etmektedir. *BcsRQABZC* ve *BcsEFG* selüloz biyosentetik mekanizmasını kodlar ve c-di-GMP sentezini kontrol etmektedir. Matris üretiminin düzenlenmesinin, *fimH* geni de dahil olmak üzere bir dizi gen tarafından düzenlendiği bilinmektedir. *PgaC* geni, *papC* geni ve diğer genler (Thorn *et al.* 2021). DNA varlığının, *Pseudomonas aeruginosa, Bacillus cereus* ile birlikte *E. coli* dahil olmak üzere bir dizi Gram-negatif bakteri tarafından üretilen biyofilmlerin biyokütlesi

üzerinde zararlı bir etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Biyofilm matrisinin bir diğer kilit unsuru da hücre dışı DNA'dır (Vilain *et al*. 2009).

2.4.11 Biyofilm ve akış pompası inhibitörleri

Akış pompası inhibitörleri adı verilen bir ilaç sınıfı, akış pompalarının (EPI) aracılık ettiği moleküllerin etkisini durdurmaktadır. Bu akış pompaları, antibiyotik akış inhibitörlerini içeren kombinasyon terapisinin geliştirilmesi için önemli terapötik hedefler olarak kabul edilmektedir. EPI'ler genellikle insanların iyi kullanabileceği basit, güvenilir ve ucuz kimyasallardır. EPI bileşikleri bazı gereklilikleri karşılamalıdır. Pompa substratlarının aktivitesini arttırılıp akış pompası mutantlarında aktif olmamalıdırlar. Sitoplazmik membran boyunca proton gradyanını korumak için gereklidir. Daha azını dışarı atarken daha fazla akış pompası substratı biriktirmeleri gerekmektedir (Wang *et al.* 2017).

Bazı EPI'ler bakteriyel biyofilmlerin gelişimini de önleyebilmektedir. Bu nedenle, akış pompası inhibitörleri olarak sınıflandırılan kimyasallar arasında aril piperazin NMP, Phe-Arg -naftilamid (PAN) ve tiyoridazin bulunmaktadır. Bu maddelerin çeşitli bakterilerde biyofilm oluşumunu, *P. putida, Klebsiella pneumonia, S. aureus* ve *E. coli* de dahil olmak üzere bir dizi bakteride önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir. Tanımlanan ilk EPI olan florokinolonlarla birleştiğinde, PA-N, AcrAB-TolC, MexAB-OprM, MexCD-OprJ ve MexEF-OprN inhibitör etkinliğe sahip pompalar. PAN ve CCCP 78 (bir proton hareket kuvveti ayrıştırıcısı), akış pompalarını bloke ederek biyofilm oluşumunu azaltmada güçlü bir yetenek göstermiştir (Maharjan *et al*. 2018).

Ek olarak, doğal EPI'ler antibiyofilm aktivitesi göstermiştir. *S. aureus* ve *Enterococcus faecalis*'in biyofilm canlılığı, *Artemisia absinthium*'dan elde edilen doğal EPI kafeoilkinik asit (CQA), inhibitör altı konsantrasyonlarda etidyum bromür ve moksifloksasin ile birleştirildiğinde azalmaktadır. Bu EPI, çeşitli maddelerin öldürücü potansiyelini artırmaktadır (Hazra *et al*. 2018).

Dolayısıyla EPI'ler, özellikleri nedeniyle biyofilm tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin güçlendiricileri olarak kullanılabilmektedir (Baugh *et al.* 2012).

Bu nedenle, biyofilm direncindeki rolleri şu anda tam olarak anlaşılmadığından, bakteriyel biyofilmlerdeki akış pompalarının işlevini aydınlatmak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Bununla birlikte, mevcut araştırma, akış pompalarının antibiyotik ilaç geliştirme için birincil aday olabileceğini göstermektedir (Maharjan *et al*. 2018).

2.5 Antibiyotik Alımında Azalma

Gram-negatif dış hidrofobik membran, belirli moleküllerin bakteri hücresine değişen derecelerde seçicilikle geçmesini sağlayan proteinler (porinler) oluşturan çeşitli ağlar içermektedir. *E.coli*'de dış membran için spesifik olmayan porin, diğer birçok gram-negatif bakteriye göre basit bir geçirgenlik oranı gerektirmektedir. *E. coli*'nin düşük geçirgenliği, organizmanın çeşitli antibiyotiklere karşı yüksek doğal direncine yol açmaktadır (Livermore 2012).

OprD-protein mutantları ile yapılan deneyler, sefotaksim ve karbenisilin gibi ilaçlara karşı duyarlılıkta dramatik bir artış olduğunu göstermiştir. Bu porinler genellikle iki sınıfa ayrılır: genellikle hidrofilik moleküllerin belirli bir boyutun altında difüzyonuna izin veren spesifik olmayan porinler ve stereospesifik bağlanma bölgeleri aracılığıyla spesifik substratların aynı difüzyonunu destekleyen özel porinler (Maharjan *et al*. 2018).

2.6 Enzimatik İnaktivasyon

Antibiyotik etkisizleştirici enzimler iki ana kategoriye ayrılmaktadır. Bunlar, antibiyotiğin bozunmasını sağlayan β-laktamaz ve proteinleri inaktive eden enzimlerdir (Castro-Sánchez *et al.* 2016).

Bu hücre dışı enzim aslında gelişmiş üreticilerin parçalanması sonucu akciğerlerde salınmaktadır. Bu, yerel β-laktam antibiyotik konsantrasyonlarını azaltarak düşük seviyeli üreticileri korumaktadır. β-laktamaz-ampc'nin aşırı üretimi sefalosporinler için özel bir tehdittir (Cstro-Sánchez *et al.* 2016).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyaller

3.1.1 Cihazlar ve ekipman

Çizelge 3.1'de mevcut çalışmada kullanılan cihazlar ve ekipman gösterilmektedir.

Çizelge 3.1 Cihaz ve ekipman listesi

Ekipman tipi	**Üretici firma (Menşe)**
Otoklav	Üretici firma /Menşe
Vorteks	Griffin /Almanya
ELISA okuyucu	Biotec /ABD
Jel Elektroforez	Labner /Tayvan
Jel dokünmantasyon sistemi	Biometra /Almanya
Mikrosantrifüj Tüp Rafı Çift Panel PCR Santrifüj Tüp Tutucu	P-ABC/Amerika Birleşik Devletleri
Yüksek hızlı santrifüj	Hettich /Almanya
Hücre Bozucu Genie vorteks	Scientific Industries/ABD
Vorteks karıştırıcı	Talboys/ABD
PCR ısıl döngüleyici T100	BioRad/ABD
PCR sistemi	Gene Amp /Singapur
Spektrofotometre	Orient research /ABD
VITEK 2	Bio Mérieux /Fransa

3.1.2 Biyolojik ve kimyasal malzemeler

Çizelge 3.2 ve 3.3'de bu çalışmada kullanılan biyolojik ve kimyasal bileşenler listelenmektedir.

Çizelge 3.2 Kimyasal listesi

Malzemeler	**Üretici firma (Menşe)**
Gliserol ($C_3H_8O_3$)	Fluka (İsviçre)
İzopropil asetat	Mast Diagnostic /ABD
Lizozem	Sigma
Metil kırmızısı	BDH
Serbest nükleaz su	BioLabs/ İngiltere
Fenol	Scharlau
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	AppliChem /İngiltere
Sodyum klorür (NaCl)	BDH
Tris-HCl çözeltisi	AppliChem /İngiltere
TBE tamponu	Promega
Tris-EDTA (TE) tamponu	Promega
Mavi Tripan	Uppsala Pharmacia Fine Chemical / İsveç

Çizelge 3.3 Diğer malzemeler

Malzemeler	**Üretici firma (Menşe)**
Agaroz	Promega /ABD
Kloroform	BDH /İngiltere
DNA yükleme tamponu	Promega
DNA ladder (100-2000 bp)	Bioneer/ Kore
RedSafe	INTRON Biotechnology /ABD
Etanol (%96)	CHEM-LAB/ Belçika
Kristal viyole	Merk/ Almanya

3.1.3 PCR tespit kitleri

Çizelge 3.4, bu çalışmada kullanılan PCR tespit kitlerinin yanı sıra bunların üreticileri ve menşe ülkeleri göstermektedir.

Çizelge 3.4 PCR tespit kitleri

No.	Set	Şirket	Ülke
1	**Bakteri PrestoTM Mini gDNA Kit**	**Gen aid**	**Tayvan**
	Tampon + Gram		
	GT için liziz tamponu		
	GB tamponu için bağlayıcı tampon		
	Proteinaz K		
	W1 tamponu		
	Yıkama tamponu		
	Elüsyon tamponu		
	GD kolonu		
	2 ml toplama tüpü		
2	Master Mix GoTaq®	Promega	ABD
	DNA polimeraz Taq		
	dNTPs /dATP, dCTP, dGTP, Dttp		
	pH 9.0 Tris-HCl, KCl ve $MgCl_2$		
	Yükleme için stabilizör ve boya		

3.1.4 Kültür ortamı

Çizelge 3.5 çalışmada kullanılan besi yerlerini göstermektedir.

Çizelge 3.5 Besi yerleri

Orta	Üretici /Menşe
Kanlı Agar	Himedia/ Hindistan
Beyin ve kalp infüzyonu suyu	Himedia
Mannitol Salt Agar	Himedia
Muller-Hinton Agar	Himedia
Nutrient Broth	Himedia
Nutrient Agar	Himedia
Tryptic Soy Broth	Biolife/ İtalya

3.1.5 PCR için materyaller

Bu çalışmada, *E. coli* biyofilmi ile ilişkili çeşitli genlerin ve bazı beta laktam antibiyotik direnç genlerinin moleküler tespiti için PCR primerleri geliştirmek üzere Primer 3 Plus ve NCBI Genbank veri tabanı kullanılmıştır. E. coli biyofilm primerleri Çizelge 3.6'de verilmiştir.

Çizelge 3.6 *E. coli*'de biyofilm primerlerinin nükleotid dizisi ve ürün boyutu

	5'-3' Sekansı		**Ürün boyutu**	**Genbank**
fimH geni	F	CAAAACCTGGTCGTGGATCT	547bp	JF289169.1
	R	ACGCGGTATTGGTGAAAATC		
papC geni	F	CAGTAACCAGTGGTCGCTGT	678 bp	DQ010312.1
	R	AGTCCACCGCCACTGTTAAG		
pgaC geni	F	GCGTTATTAGACCGCGATGC	469bp	NC_000913.3
	R	GCGGCCACATTCGAAAGTTT		

Çizelge 3.7'de ise *E. coli*'de beta laktam direnç genlerinin tespiti için kullanılan PCR primerlerinin nükleotid dizisi ve ürün boyutu gösterilmiştir.

Çizelge 3.7 PCR primerlerinin nükleotit dizisi ve ürün boyutu

	5'-3' Sekansı		**Ürün boyutu**	**Genbank**
BlaCTX-M	F	AGCGATAACGTGGCGATGAA	247bp	OM326869.1
	R	TCATCCATGTCACCAGCTGC		
blaSHV	F	CCGCCATTACCATGAGCGAT	410bp	OL906381.1
	R	AATCACCACAATGCGCTCTG		
blaTEM	F	GGTGCACGAGTGGGTTACAT	531bp	ON221404.1
	R	TGCAACTTTATCCGCCTCCA		

3.2 Metotlar

3.2.1 Numune toplama ve hazırlama

Bu çalışmada Irak'taki üç hastanede İYE teşhisi konmuş her iki cinsiyetten, farklı yaş gruplarına dahil toplam 70 hastadan Şubat-Temmuz 2022 tarihleri arasında idrar örnekleri toplanmıştır.

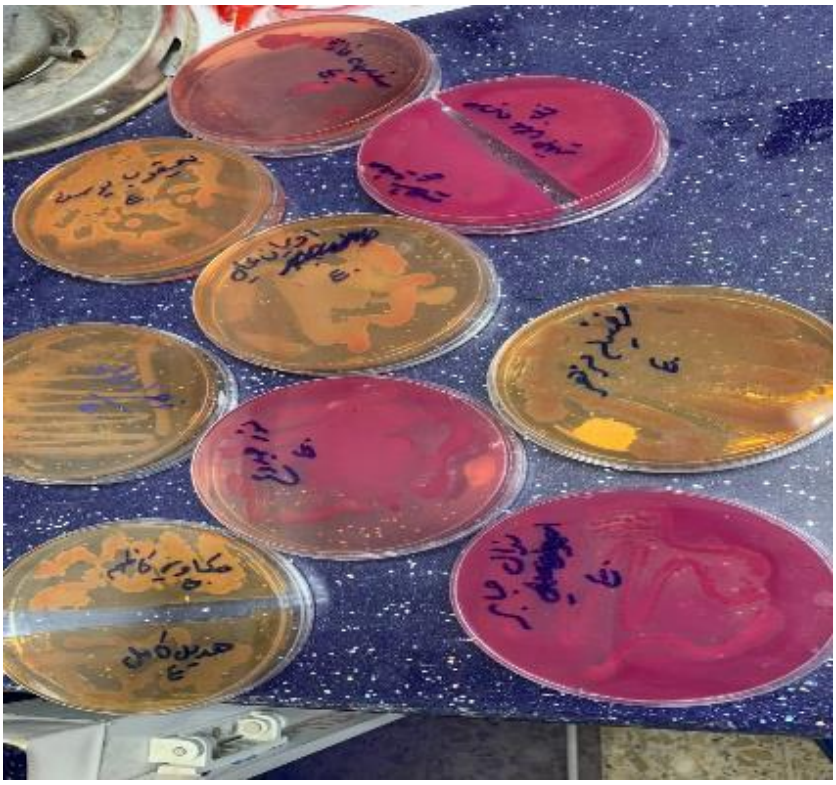
İYE hastalarından alınan idrar örnekleri steril kapaklı tüplere alınarak soğuk zincirde hızla laboratuvara nakledildi. İdrar örnekleri kültür besiyerlerine (nutrient, kanlı ve mackonky agar) ekilip 37°C'de 48 saat inkübe edildikten sonra bakteriyel izolatların tanımlanması yapıldı. Çalışmanın deneysel tasarımı Şekil 3.1'de verilmiştir.



Şekil 3.1 Çalışmanın deneysel tasarımı

3.2.2 Bakterilerin izolasyonu ve tanımlanması

İdrar numuneleri beyin kalp infüzyon suyu zenginleştirme besiyerinde 37 ^{o}C'de 24 saat boyunca kültüre edildi. Bakteri üremesi daha sonra düzenli olarak kanlı, MacConkey ve besleyici agarlarda 37 ^{o}C'de 24 saat boyunca ekildi. Bir idrar örneği 10^5 CFU/ml'den fazla bakteri içerdiğinde bakteriürik olarak değerlendirildi. Daha sonra boyama, mikroskobik analiz ve biyokimyasal testler yapılmıştır. Bakteriyel izolatların kesin teşhisi ve tanımlanması otomatik VITEK 2 ile yapıldı (Şekil 3.2).



Şekil 3.2 İdrar yolu enfeksiyonundan izole edilen bakteriyel etkenler

3.2.3 VITEK 2 compact sistemi ile tanı

Üreticiye göre sistem birçok önemli parça ve açıklama içeriyor. Mikrobiyal teşhisin etkinliğini artırmak için devam eden tüm rutin tespit testleri için genişletilmiş bir tespit veri tabanı ile yapılandırılmıştır ve hem test hem de çalışma güvenliğini sağlamak için ek testlere olan ihtiyacı azaltmaktadır. Tüm temel adımlar da üreticinin talimatlarına

göre gerçekleştirilmiştir. 3 mL salin, sadece bir blok bakteri kültürü plakası içeren bir test tüpüne yerleştirildi ve inoküle edildi. Aden kontrol makinesine yerleştirilen tipik bir çözelti (1,5 x 10^8 hücre/ml), standart bir McFarland test tüpündeki bir koloni olmalıdır. Standartlaştırılmış inokulum bir kartuşa yerleştirildi.

Numune tanımlama numarası daha sonra barkod aracılığıyla bilgisayar programına girildi. Üretim sırasında kartın üzerine basılan seri numarası, VITEK 2 kart tipini okumak için kullanıldı. Kart, numune numarası kimliği ile ilişkilendirildi. Son olarak, kartlar doldurulduğunda kaset okuyucu/inkübatör modülüne taşındı.

3.2.4 Bakteriyel süspansiyon hazırlama

Yeterli sayıda saf bakteri kolonisi steril bir çubuk kullanılarak hücrelerin askıda kalabileceği (%0,45-0,5 NaCl) konsantrasyonunda 3 ml steril tuzlu su içeren plastik bir test tüpüne aktarıldı. Density Checker (bulanıklık ölçer) okumaları 0,50-0,63 bulanıklık seviyelerini gösterdi, bu da 1,5 × 10^8 CFU/ml Gr^+ ve Gr^- 23'e eşittir (Pincus 2006).

3.2.5 Bakteriyel inokulum

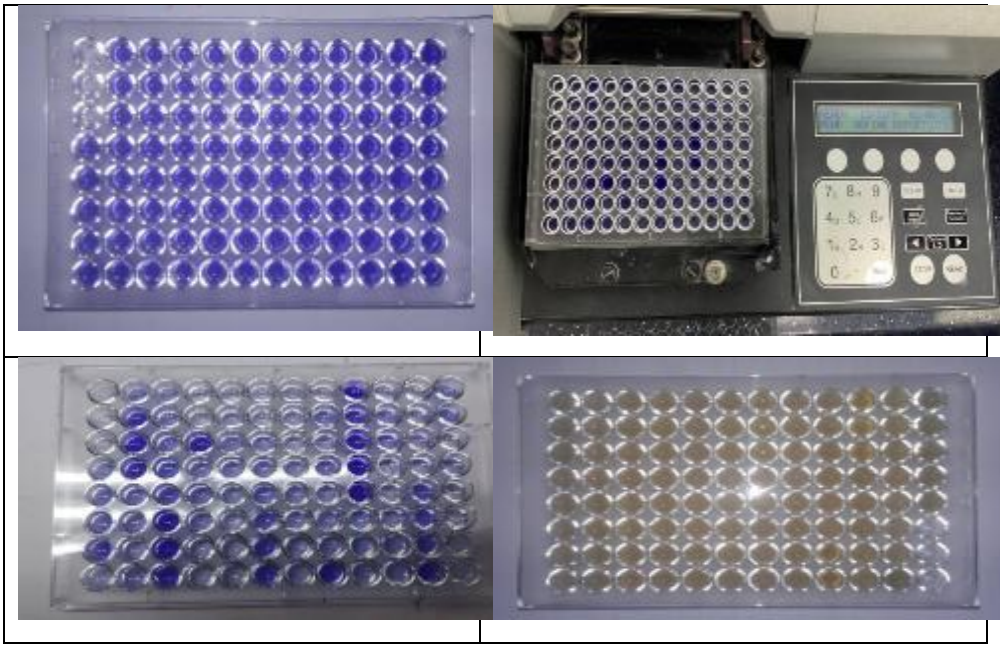
Bakteri hücresi süspansiyonları plastik test tüplerine özel bir raf içinde yerleştirilirken, tanımlama kartları veya kaset karşı yuvaya yerleştirildi. Ardından transfer tüpü süspansiyon bakteri hücresini tüm test kuyucuklarını dolduracak şekilde tanımlama kartlarına aktarıldı. Kartlar en fazla 15 test içermekteydi. Daha sonra transfer tüpü kesilerek kartlar kapatıldı ve 24 saat boyunca 37°C'deki iç inkübatöre yerleştirildi (Ligozzi *et al*. 2002). Sonuçlar VITEK 2 kompakt sistemine bağlı bir monitörde dijital olarak okundu.

3.2.6 Biyofilmin saptanması

Yarı kantitatif mikroplaka okuyucu testi (biyofilm tarama testi) olarak da bilinen doku kültürü plakası (TCP) testi kullanıldı (Christensen *et al.* 1985).

Bu yöntem, taze triptik sıvı besiyerinde (TSB 1:100) izole edilmiş bir bakteriyel patojeni bir gecelik triptik soya suyu kültürüyle seyreltmek için kullanıldı. Her bir bakteri süspansiyonunun üç kuyucuğu, 96 çukurlu steril düz tabanlı bir plastik doku tepsisinde 0.2 ml ile doldurulduu. Bakteri numunesi içermeyen steril et suyu içeren bir negatif kontrol kullanıldı. Plakalar aerobik olarak kapatıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra her kuyucuğun içeriği aspire edilmiş ve üç kez fizyolojik steril salinle yıkandı. Bu özdeş plaka, kendisine yapışmayan herhangi bir mikroorganizmayı uzaklaştırmak için kuvvetlice çalkalandı. Kuyucuk başına 0.2 ml 0 metanol kullanılarak, geriye kalan bağlı bakteriler, metanol çıkarılmadan ve kuyucukların kurumasına izin verilmeden önce 15 dakika sabitlendi.

0,2 ml yüzde 0,2 kristal viyole solüsyonu ile plakalar beş dakika boyandıktan sonra akan musluk suyu ile fazla boya için durulandı. Plakaların hava ile kurumasına izin verildi. (160 µL %30'luk glasiyal asetik asit) ile, öncelikle yapışık hücrelere bağlı olan aynı boya çözülmüştür. Otomatik plaka okuyucu kullanılarak, her bir kuyucuk 630 nm'de değerlendirilen bir optik yoğunluğa (OD) sahip oldu (Şekil 3.3).



Şekil 3.3 TCP yöntemi kullanılarak biyofilm oluşturan bakterilerin tespiti

3.2.7 Moleküler çalışma

Bakteriyel DNA ekstraksiyon yöntemi: bakteriyel nükleik asidi ekstrakte etmek için kullanılan teknik, ekstraksiyon kitinin üretim metodolojisine uygun olarak gerçekleştirildi (Geneaid USA).

PCR çözeltilerinin hazırlanışı Çizelge 3.9'da verilmiştir.

Çizelge 3.9 PCR çözeltilerinin hazırlanışı

Bileşenler	Konsantrasyon	(25 I) Hacim
G2 Yeşil Master Mix GoTaq®	1X	l2 µL
Gelecek için primer	l0 µm/µL	l.5 µL
Ters primer	l0 µm/µL	l.5 µL
ddH2O	-	7 µL
DNA	40 µg	3 µL

Her bir PCR ürünü yaklaşık 5 l hacminde %1,5'lik jel üzerindeki deliğin ortasına enjekte edildi. PCR ürünlerinin boyutunu değerlendirmek için bir işaretleyici olarak, jel çizgilerindeki ilk deliğe 5 mikrolitre Safe-Green 100bp Opti-DNA marker eklendi (Çizelge 3.10).

Çizelge 3.10 Termal döngü

Aşama	(Tm ^{o}C)	Süre	Döngü
Başlangıçtaki denatürasyon	94 ^{o}C	5 dk	lX
Denatürasyon	94 ^{o}C	30 sn.	35X
Tavlama	50, 55, 56,58 ^{o}C	30 sn.	
Ekstraksiyon	72 ^{o}C	l dk.	
Son ekstraksiyon	72 ^{o}C	5 dk	lX

3.2.7 Jel elektroforezi

Agaroz jel hazırlığı, 1 g agaroz içeren 100 ml 1X TAE tamponunun çözüldüğü ve karışımın kaynama noktasına kadar mikrodalgada ısıtıldığı Briefly tekniğine uygun olarak gerçekleştirildi (Al-Qaisi *et al.* 2020). 45-50 ^{o}C'de soğutma işleminin ardından, jele RedSafe nükleik asit boyama çözeltisi eklenip jel kalıbına döküldü. Yaklaşık 30 dakika katılaşmaya bırakıldı. Jel plakası jel tankına yerleştirildi ve jel yüzeyini kaplamak için 1X TAE tamponu eklendi.

Örnekler yüklendikten sonra Safe-Green 100bp Opti-DNA Marker ve elektroforez ekipmanı 90 Volt, sürekli akım, 42 dakika olacak şekilde ayarlandı. Süre sonunda jel UVP sistemine taşınarak PCR ürünleri 320nm UV ışık kaynağı altında görüntülendi. Son olarak bir dijital kamera ve Cleaver jel kayıt sistemi kullanılarak jelin fotoğrafları çekildi.

3.2.8 İstatistiksel analiz

GraphPad Prism V.6 programı yardımıyla istatistiksel bir analiz gerçekleştirildi. Araştırmada farklı örnekler arasındaki karşılaştırma Fisher'in kesin testi kullanılarak gerçekleştirildi. Anlamlılık eşiği 0,05 olarak belirlendi ve bundan daha düşük olan p-değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

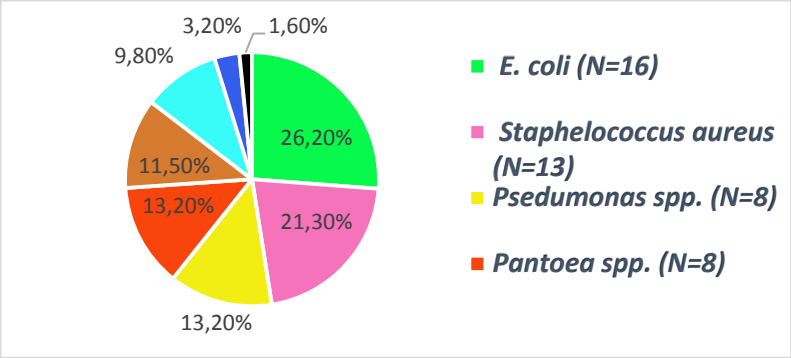
4.1 Numune İzolasyonu ve Tanımlaması

Toplanan örneklerden 61'inde (%87) bakteri üremesi olmuş, 9'unda (%13) ise üreme olmamıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1 Örneklerdeki bakteriyel üreme

Kültür sonuçları	Numune sayısı	Oran (%)
Üreme var	61	87%
Üreme yok	9	13%
Toplam	70	100%

Üreme olan örneklerde *E. coli* %26.2, *S. aureus* %21.3, *Pantoea spp.* %13.2, *Pseudomonas spp.* %13.2, *Klebsiella spp.* %9.8, *E. faecalis* %11.5, *Streptococcus* %3.2, *Acinetobacter spp.* %1.6 oranlarında bulunmuştur (Şekil 1.4).



Şekil 4.1 İdrar yolu enfeksiyonu örneklerinden izole edilen bakteri türlerinin sıklığı

Mevcut çalışmada *E. coli*, İYE'ye neden olan en yaygın bakteri olarak tespit edilmiştir. Bu sonuç Halimi and Nabavizadeh (2014)'nin çalışması ile uyumludur.

4.2 Antibiyotik Direnci

İzole edilen 8 bakteri türü için 27 antibiyotiğe karşı direnç incelenmiştir (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2 İYE'den izole edilmiş bakterilerin antibiyotik direnci.

	(%) Antibiyotik direnci							
A. sınıfı	**A. adı**	***E. coli* n=16**	***S. aureus* n=13**	***Pseudomonas* n=8**	***Pantoea* n=8**	***E. faecalis* n=7**	***Klebsiella* n=6**	**Diğer türler n=3**
B-laktam Karbapenem	Meropenem	%6.2	%84.6	%50	%0	%42.8	%16.6	%0
	Imipenem	%6.2	%0	%37.5	%0	%42.8	%0	%0
Kinolon	Levofloksasin	%56.2	%61.5	%75	%37.5	%14.2	%33.3	%66.6
	Siprofloksasin	%68.7	%53.8	%75	%37.5	%42.8	%33.3	%0
	Norfloksasin	%75	%61.5	%75	%50	%42.8	%16.6	%66.6
Sefalosporinler	Seftazidim	%68.7	%0	%12.5	%25	%0	%16.6	%0
	Sefritakson	%62.5	%84.6	%87.5	%75	%85.7	%50.	%66.6
	Sefepim	%43.7	%92.3	%50	%12.5	%28.5	%66.6	%33.3
	Sefoksitin	%50	%76.9	%87.5	%37.5	%100	%66.6	%33.3
	Sefiksim	%62.5	15.3	%87.5	%75	%71.4	%50.	%66.6
	Sefotaksim	%68.7	%15.3	%87.5	%87.5	%42.8	%50	%66.6
	Sefpodoksim	%0	%0	%12.5	%12.5	%0	%0	%0
Linkozamid	Klindamisin	%0	%15.3	%25	%12.5	%42.8	%0	%0
Monobaktam	Aztreonam	%31.2	%0	%25	%25	%0	%16.6	%0
Penisilin	Tikarsilin-klavulanik asit	%43.7	%7.69	%25	%50	%0	%16.6	%0
	Piperasilin-tazobaktam	%31.2	%0	%62.5	%12.5	%28.5	%0	%0
	Amoksisilin-klavulanik asit	(%68.7	%76.9	%100	%87.5	%42.8	%50	%66.6
Aminoglikozit	Amikasin	%6.25	%30.7	%50	%0	%42.8	%16.6	%33.3
	Tobramisin	%37.5	%61.5	%50	%25	%100	%50	%33.3
	Gentamisin	%31.2	%56.2	%37.5	%25	%285	%33.3	%33.3

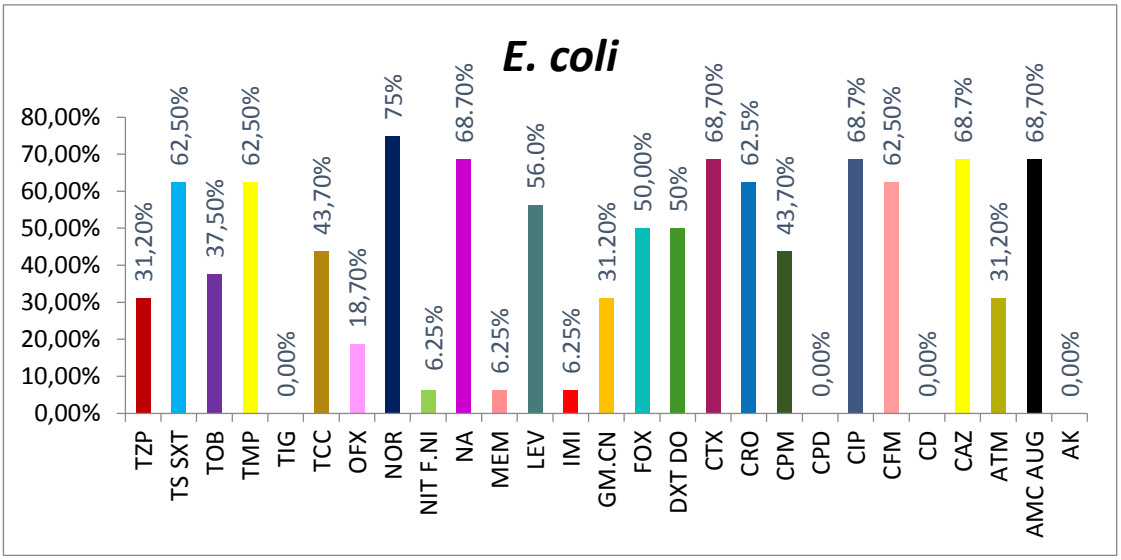
Çizelge 4.2 İYE'den izole edilmiş bakterilerin antibiyotik direnci (devam)

A. sınıfı	**A. adı**	***E. coli* n=16**	***S. aureus* n=13**	***Pseudomonas* n=8**	***Pantoea* n=8**	***E. faecalis* n=7**	***Klebsiella* n=6**	**Diğer türler n=3**
	Trimetoprim-sülfametoksazol	%62.5	%46.1	%87.5	%37.5	%42.8	%50	%66.6
Floro kuinolonlar	Nalidiksik asit	%68.7	%7.69	%100	%50	%0.	%16.6	%0
	Ofloksasin	%18.7	%0	%25	%12.5	%0	%0	%0
Tetrasiklin	Tigesiklin	%0	%0	%12.5	%0	%0	0%0	%0
	Doksisiklin	%50	%53.8	%100	%37.5	%42.8	%83.3	%66.6
Nitrofuranlar	Nitrofurantoin	%6.25	%7.69	%75	%25	%28.5	%50	%33.3
Sulfonamidler	Trimetoprim	%62.5	%23	%87.5	%37.5	%14.2	%33.3	%0

4.3 *E. coli* izolatları için antibiyotik direnci

E. coli diğer bakteri türleriyle karşılaştırıldığında en yaygın hastalık nedeni olduğundan, 16 *E. coli* izolatı üzerinde VITEK 2 yöntemi kullanılarak bir antibakteriyel duyarlılık testi yapıldı. Bu test, *E. coli* izolatlarının idrar yolu enfeksiyonlarını tedavi etmek için kullanılan antibiyotiklerin çoğuna karşı önemli düzeyde direnç gösterdiğini ortaya koydu. En yüksek direnç nalidiksik asite karşıydı.

E. coli'nin yüksek antibiyotik direnci önceki çalışmalarla uyumlu çıkmıştır. Bununla birlikte, *E. coli*, direnç genlerini, çoğunlukla yatay gen transferi yoluyla elde etme konusunda yüksek bir kapasiteye sahiptir. Ancak bu bakteri pratik ve klinik açıdan yararlı önemli antibiyotiklere esas olarak duyarlıdır. *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılığı Şekil 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.2 *E. coli* izolatlarında antibiyotik direnci (TZP = Piperasilin-tazobaktam: TS STX = Trimetoprim- sülfametoksazol: TOB =Tobramisin; TMP= Trimetoprim: TIG= Tigesiklin: Tikarsilin / klavulanik asit: OFX= Ofloksasin: NOR= Norfloksasin: NIT F.NI= Nitrofurantoin: NA= Nalidiksik asit: MEM=Meropenem; LEV= Levofloksasin: IMI=Imipenem; GM.CN= Gentamisin; FOX= Sefoksitin: DXT DO= Doksisiklin: CTX= Sefotaksim: CRO= Sefritakson; CPM =Sefepim; CPD= Sefpodoksim: CIP = Siprofloksasin: CFM= Sefiksim: CD= Klindamisin: CAZ= Seftazidim; ATM =Aztreonam; AMC AUG= Amoksisilin-klavulanat ve AK = Amikasin)

S. aureus, Şekil 4.3'te gösterildiği gibi Sefepim (%92.3), Seftriakson ve Meropenem (%84.6) için yüksek direnç göstermiştir.

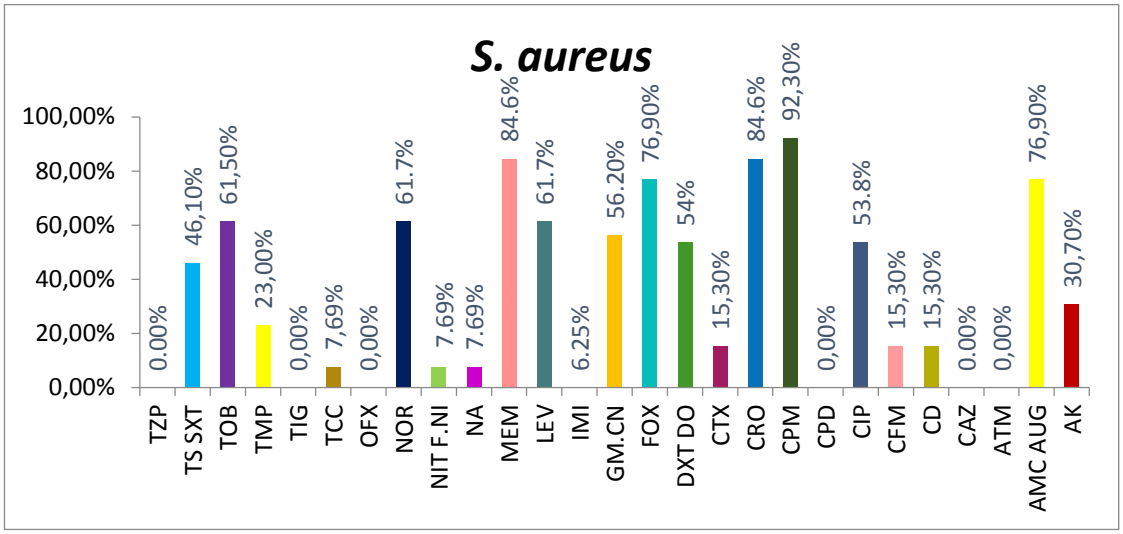
Yakın zamanda yapılan bir araştırmanın bulgularına göre, *S. aureus* ile ilişkili yara enfeksiyonlarının %82.28'i MRSA ile ilişkiliydi. Buna göre, izolatlar ayrıca siprofloksasin ve gentamisine karşı sırasıyla %15 ve %94 oranında antibiyotik direnci sergilemiştir Mama *et al*. (2019) tarafından yapılan bir başka araştırmada ise siprofloksasin ve gentamisine karşı direncin sırasıyla %32.4 ve %30.2 olarak tespit edilmiştir.

Bir başka çalışmada *S. aureus*'un şu antibiyotiklere duyarlı olduğu bulunmuştur: tetrasiklin, siprofloksasin, ofloksasin, levofloksasin, seftriakson, gentamisin, amoksisilin/klavulanat, streptomisin, eritromisin, kloramfenikol ve kotrimoksazol

(Onwubiko and Sadiq 2011). Yapılan bir çalışmaya göre, popülasyonun %32.4'ünde siprofloksasin ve %30.2'sinde gentamisin direnci bulunmuştur.

Bulgular tetrasiklin, klindamisin, kloramfenikol ve rifampisine karşı sırasıyla %18, %5, %19 ve %3 oranlarında direnç olduğunu göstermiştir. Mevcut çalışmanın bulguları, klindamisin ve kloramfenikole karşı düşük oranda direnç bildiren ile tutarlıdır (Dilnessa and Bitew 2016).

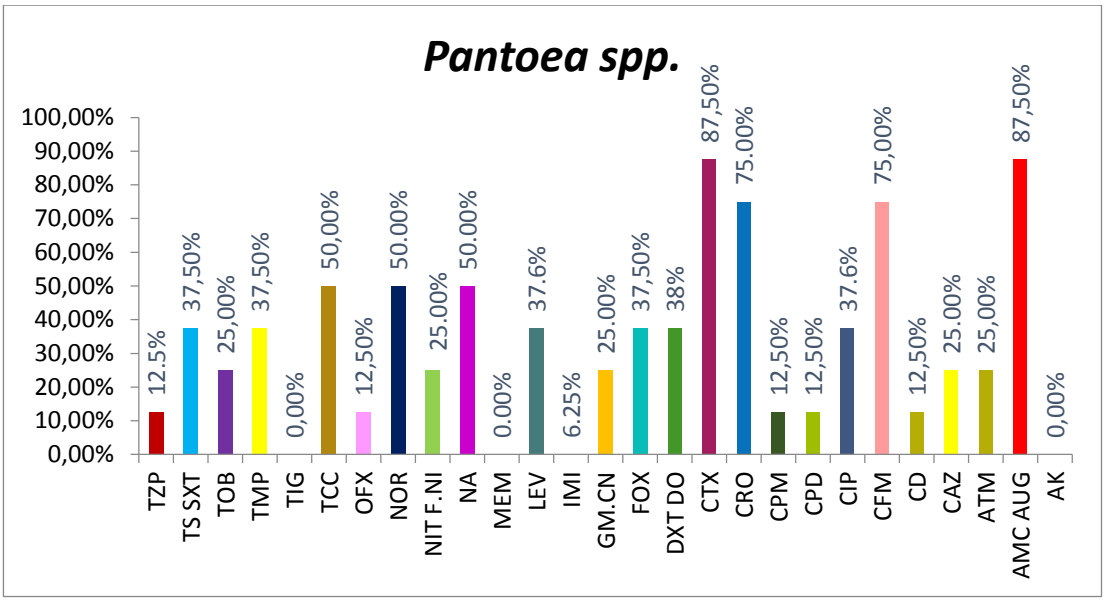
Başka bir çalışmada *S. aureus*'un ampisilin, penisilamin, rifampisin, klindamisin ve eritromisin gibi antibiyotiklere önemli oranda direnci olduğunu göstermiştir. *S. aureus*'un diğer ilaçlara karşı direncinin ise nispeten daha az (%70) olduğu gösterilmiştir. En duyarlı olduğu gösterilen antibiyotikler ipenem (%96,7), levofloksasin (%86,7), kloramfenikol (%83,3), sefoksitin (%76,7), siprofloksasin (%66,7), gentamisin (%63,3), tetrasiklin (%63,3) ve siprofloksasindir (%66,7) (Akanbi *et al*. 2017).



Şekil 4.3 *S. aureus* izolatlarının antibiyotik direnci (TZP = Piperasilin-tazobaktam: TS STX = Trimetoprim- sülfametoksazol: TOB =Tobramisin; TMP= Trimetoprim: TIG= Tigesiklin: Tikarsilin / klavulanik asit: OFX= Ofloksasin: NOR= Norfloksasin: NIT F.NI= Nitrofurantoin: NA= Nalidiksik asit: MEM=Meropenem; LEV= Levofloksasin: IMI=Imipenem; GM.CN= Gentamisin; FOX= Sefoksitin: DXT DO= Doksisiklin: CTX= Sefotaksim: CRO= Sefritakson; CPM =Sefepim; CPD= Sefpodoksim: CIP = Siprofloksasin: CFM= Sefiksim: CD= Klindamisin: CAZ= Seftazidim; ATM =Aztreonam; AMC AUG= Amoksisilin-klavulanat ve AK = Amikasin)

Öte yandan *Pantoea spp.*, Şekil 4.4'te gösterildiği gibi Sefritakson (%75), Sefikzim (%75) Sefotaksim (%87.5) ve Amoksisilin-klavulanat (%87.5) için yüksek direnç göstermiştir (Hasson *et al.* 2018) çalışmasında idrardan izole edilen *Pantoea*'nın test edilen antibiyotiklerin çoğuna dirençli olduğu bulunmuştur.

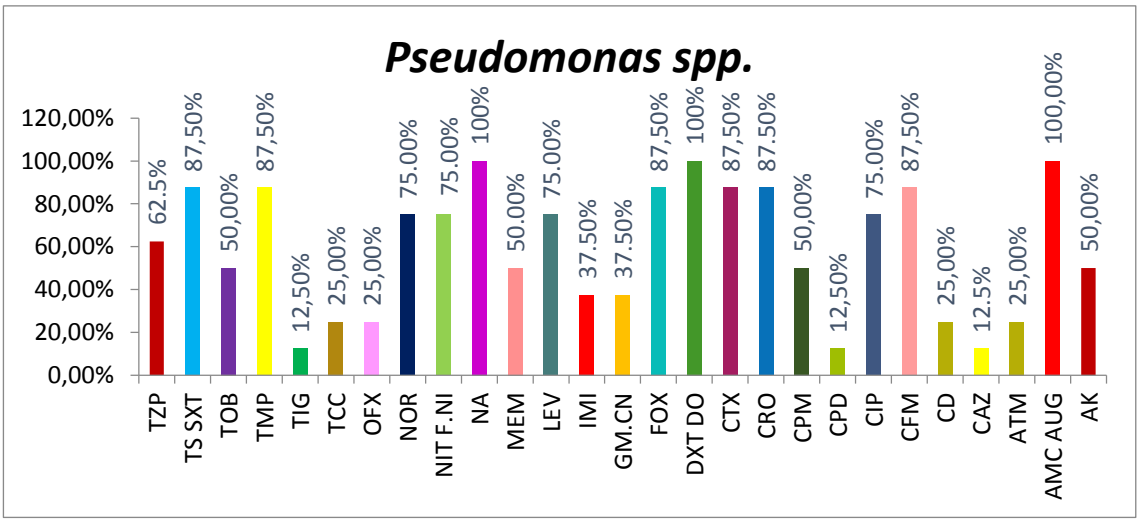
Gajdács (2019) tarafından yapılan önceki bir çalışma *Pantoea spp.*nin insidansını ve antibiyotik duyarlılığını değerlendirmeyi amaçlayan çalışma, izolatların çoğunun uygun antibiyotiklere duyarlı olduğunu keşfetmiştir. Ampisilin, 68 hastanın 61'ine verilen ilk antibiyotik olmuştur. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz pozitif izolat bulunmamıştır; bu da mevcut araştırmanın bulgularıyla uyumludur. Amoksisilin-klavulanik asit ve sefotaksimin en yüksek direnç seviyelerine sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.4 *Pantoea spp.* Izolatı için antibiyotik direnci. (TZP = Piperasilin-tazobaktam: TS STX = Trimetoprim- sülfametoksazol: TOB =Tobramisin; TMP= Trimetoprim: TIG= Tigesiklin: Tikarsilin / klavulanik asit: OFX= Ofloksasin: NOR= Norfloksasin: NIT F.NI= Nitrofurantoin: NA= Nalidiksik asit: MEM=Meropenem; LEV= Levofloksasin: IMI=Imipenem; GM.CN= Gentamisin; FOX= Sefoksitin: DXT DO= Doksisiklin: CTX= Sefotaksim: CRO= Sefritakson; CPM =Sefepim; CPD= Sefpodoksim: CIP = Siprofloksasin: CFM= Sefiksim: CD= Klindamisin: CAZ= Seftazidim; ATM =Aztreonam; AMC AUG= Amoksisilin-klavulanat ve AK = Amikasin)

İzole edilen *Pseudomonas spp*. Şekil 4.5'te gösterildiği gibi amoksisilin/klavulanik asit (%100), nalidiksik asit (%100), doksisiklin (%100), sefotaksim (%87.5) ve trimetoprim (%87.5) için yüksek direnç göstermiştir. Bu, Shah (2018) tarafından yapılan önceki çalışma ile uyumludur.

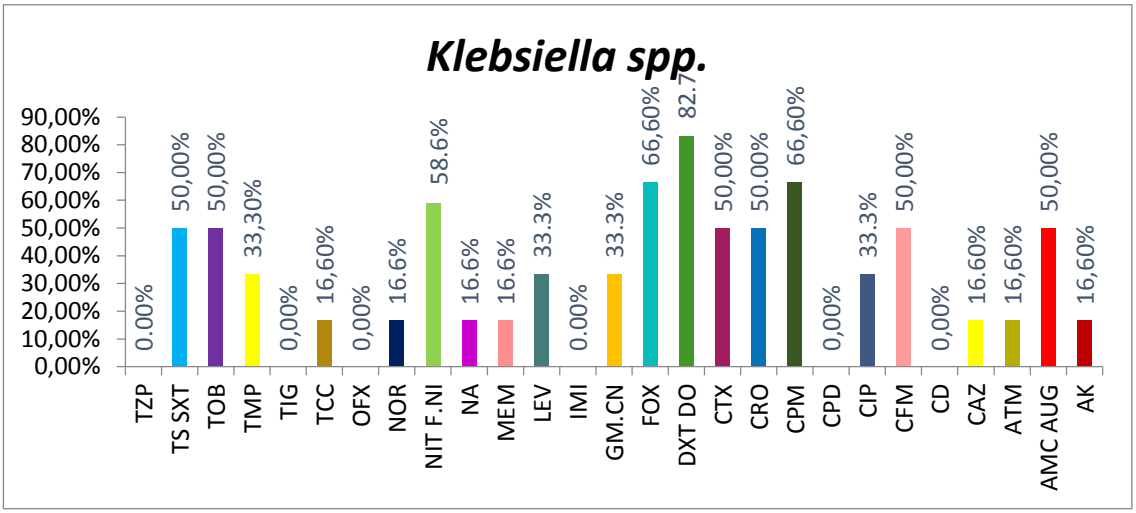
Pseudomonas spp.'de antibiyotik direnci doğuştan gelen, edinilmiş veya adaptif mekanizmalarla ortaya çıkan çok yönlü bir durumdur. Antibiyotik direnç mekanizmaları çeşitlilik göstermekte, bu da çoklu ilaca dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmakta ve standart antibiyotikleri *Pseudomonas spp.* enfeksiyonlarının tedavisinde kullanışsız hale getirmektedir (Pang *et al.* 2019).



Şekil 4.5 *Pseudomonas spp.* Izolatı için antibiyotik direnci (TZP = Piperasilin-tazobaktam: TS STX = Trimetoprim- sülfametoksazol: TOB =Tobramisin; TMP= Trimetoprim: TIG= Tigesiklin: Tikarsilin / klavulanik asit: OFX= Ofloksasin: NOR= Norfloksasin: NIT F.NI= Nitrofurantoin: NA= Nalidiksik asit: MEM=Meropenem; LEV= Levofloksasin: IMI=Imipenem; GM.CN= Gentamisin; FOX= Sefoksitin: DXT DO= Doksisiklin: CTX= Sefotaksim: CRO= Sefritakson; CPM =Sefepim; CPD= Sefpodoksim: CIP = Siprofloksasin: CFM= Sefiksim: CD= Klindamisin: CAZ= Seftazidim; ATM =Aztreonam; AMC AUG= Amoksisilin-klavulanat ve AK = Amikasin)

Klebsiella spp. Şekil 4.6'da gösterildiği gibi sefepim (%66.6), sefoksitin (%66.6) ve doksisiklin (%83.3) için yüksek direnç göstermiştir. Bu önceki çalışma ile uyumludur (Sohail 2015).

Önceki çalışmada *Klebsiella spp.* izolatlarının çoğunun antibiyotiklere karşı aşırı dirençli olduğu belirtilmiştir. *Klebsiella spp.* izolatlarının oranı %54.49'dur. Ayrıca, 148 (%85.63) izolat biyofilm üreticisi olup, 45 (%26.95) izolat güçlü, 48 (%28.74) izolat orta ve 50 (%29.94) izolat zayıftır (Senobar *et al.* 2021).

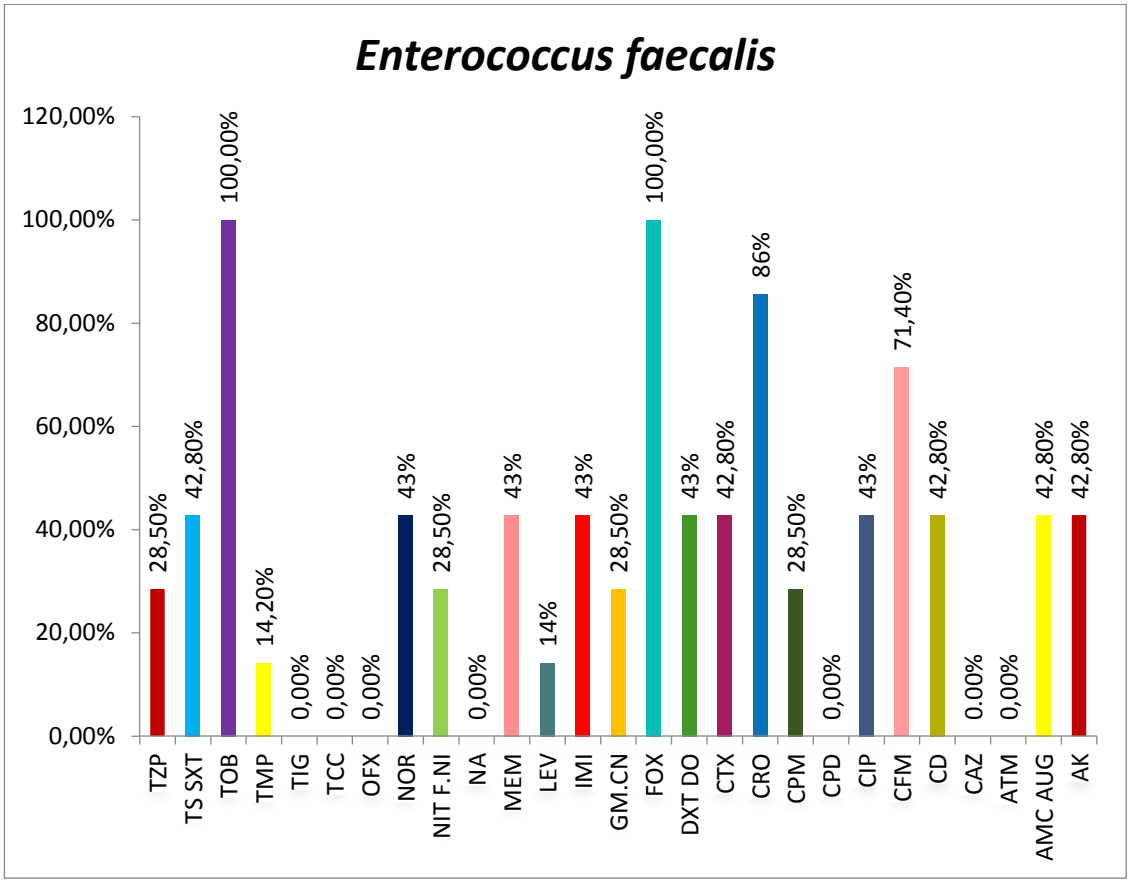


Şekil 4.6 *Klebsiella spp.* Izolatı için antibiyotik direnci (TZP = Piperasilin-tazobaktam: TS STX = Trimetoprim- sülfametoksazol: TOB =Tobramisin; TMP= Trimetoprim: TIG= Tigesiklin: Tikarsilin / klavulanik asit: OFX= Ofloksasin: NOR= Norfloksasin: NIT F.NI= Nitrofurantoin: NA= Nalidiksik asit: MEM=Meropenem; LEV= Levofloksasin: IMI=Imipenem; GM.CN= Gentamisin; FOX= Sefoksitin: DXT DO= Doksisiklin: CTX= Sefotaksim: CRO= Sefritakson; CPM =Sefepim; CPD= Sefpodoksim: CIP = Siprofloksasin: CFM= Sefiksim: CD= Klindamisin: CAZ= Seftazidim; ATM =Aztreonam; AMC AUG= Amoksisilin-klavulanat ve AK = Amikasin)

E. faecalis Şekil 4.7'de gösterildiği gibi Tobramisin (%100), Sefoksitin (%100) ve Seftriakson (%85.7) için yüksek direnç göstermiştir.

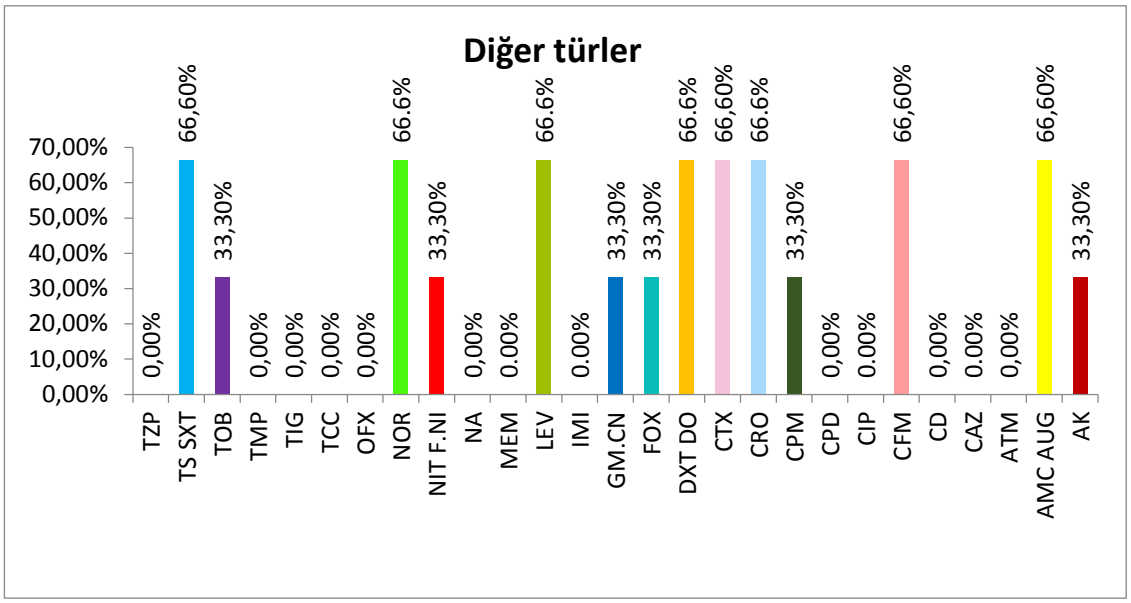
Çoklu ilaca dirençli (MDR) enterokoklar önemli nozokomiyal enfeksiyonlardır ve yeni ortaya çıkan bir klinik problemdir. Bu organizmalar, klinik pratikte kullanılan hemen hemen tüm antibiyotiklere karşı çeşitli genetik tekniklerle direnç geliştirmiştir. MDR *Enterococci*'de antibiyotik direncinin mekanizmaları, antibiyotik hedeflerinin değiştirilmesi, terapötik ajanların etkisizleştirilmesi, akış pompalarının aşırı ekspresyonu ve hem konakçı hem de hastane ortamında hayatta kalmaya yardımcı olan

hücre zarfının karmaşık bir adaptif yanıt dahil olmak üzere çeşitlidir (Miller *et al*. 2014).



Şekil 4.7 *Enterococcus faecalis* izolatlarının antibiyotik direnci (TZP = Piperasilin-tazobaktam: TS STX = Trimetoprim- sülfametoksazol: TOB =Tobramisin; TMP= Trimetoprim: TIG= Tigesiklin: Tikarsilin / klavulanik asit: OFX= Ofloksasin: NOR= Norfloksasin: NIT F.NI= Nitrofurantoin: NA= Nalidiksik asit: MEM=Meropenem; LEV= Levofloksasin: IMI=Imipenem; GM.CN= Gentamisin; FOX= Sefoksitin: DXT DO= Doksisiklin: CTX= Sefotaksim: CRO= Sefritakson; CPM =Sefepim; CPD= Sefpodoksim: CIP = Siprofloksasin: CFM= Sefiksim: CD= Klindamisin: CAZ= Seftazidim; ATM =Aztreonam; AMC AUG= Amoksisilin-klavulanat ve AK = Amikasin)

Belirtilen türler dışında izole edilen bakteriler ise doksisiklin, sefotaksim, sefiksim, seftriakson, levofloksasin ve amoksisilin-klavulanat olmak üzere farklı gruplardan antibiyotiklere karşı direnç göstermiştir.



Şekil 4.8 Diğer bakteri türlerinin antibiyotik direnci (TZP = Piperasilin-tazobaktam: TS STX = Trimetoprim- sülfametoksazol: TOB =Tobramisin; TMP= Trimetoprim: TIG= Tigesiklin: Tikarsilin / klavulanik asit: OFX= Ofloksasin: NOR= Norfloksasin: NIT F.NI= Nitrofurantoin: NA= Nalidiksik asit: MEM=Meropenem; LEV= Levofloksasin: IMI=Imipenem; GM.CN= Gentamisin; FOX= Sefoksitin: DXT DO= Doksisiklin: CTX= Sefotaksim: CRO= Sefritakson; CPM =Sefepim; CPD= Sefpodoksim: CIP = Siprofloksasin: CFM= Sefiksim: CD= Klindamisin: CAZ= Seftazidim; ATM =Aztreonam; AMC AUG= Amoksisilin-klavulanat ve AK = Amikasin)

4.4 TCP Kullanılarak Biyofilm Oluşumunun Tespiti

İYE'den izole edilen en eski bakteri *E. coli* olduğu için çalışmayı tamamlamak üzere bu bakteri seçilmiştir. Çizelge 4.3'de gösterildiği gibi, 620 nm dalga boyundaki optik yoğunluğuna göre değerlendirilen biyofilm testinin sonucunda 8 izolatta zayıf, 20 izolatta orta ve 35 izolatta da güçlü biyofilm oluşumu tespit edilmiştir.

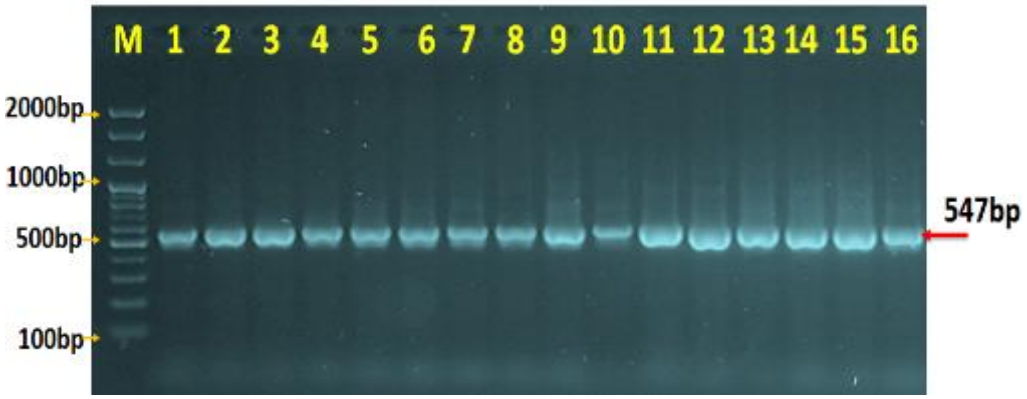
Çizelge 4.3 Biyofilm test sonucu

630 nm'de OD değerlerinin ortalaması (normal kontrol = 0,1)	**Biyofilm oluşumu**	**Sıklık (%)**
≤ 0,1	Yok	%0
>0,1 ve ≤ 0,2	Zayıf	%17
>0,2 ve ≤ 0,4	Orta	2%32

0,4 üzeri	Güçlü	%51

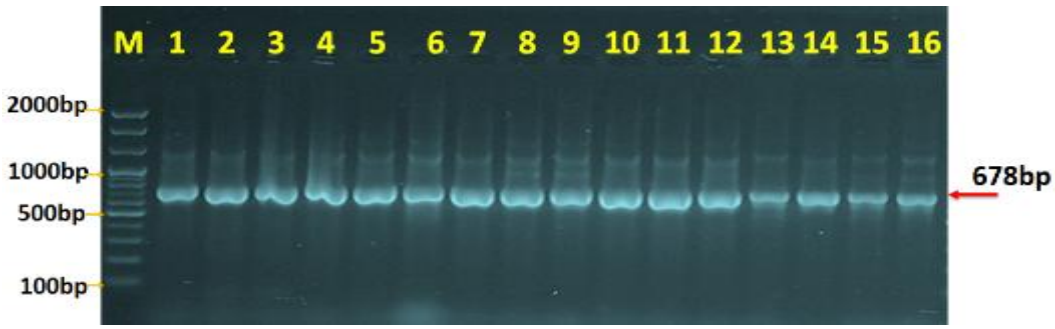
4.5 Biyofilm Genlerinin Araştırması

PCR yaklaşımı, *E. coli* izolatlarının toplam DNA'sından biyofilmle ilişkili genlerin dağılımını değerlendirmek için kullanılmıştır. Bulgular, sırasıyla 547 bp, 678 bp ve 469 bp'lik ürünlerle *fimH* geni, *papC* geni ve *pgaC* geni için primerler kullanılarak çoğaltılan PCR amplifikasyon sonuçları Şekil 4.9, 4.10 ve 4.11'da verilmiştir. İzole edilen her bir numune (*fimH* geni, *papC* geni ve *pgaC* geni) için pozitif test edilmiştir (Çizelge 4.4).



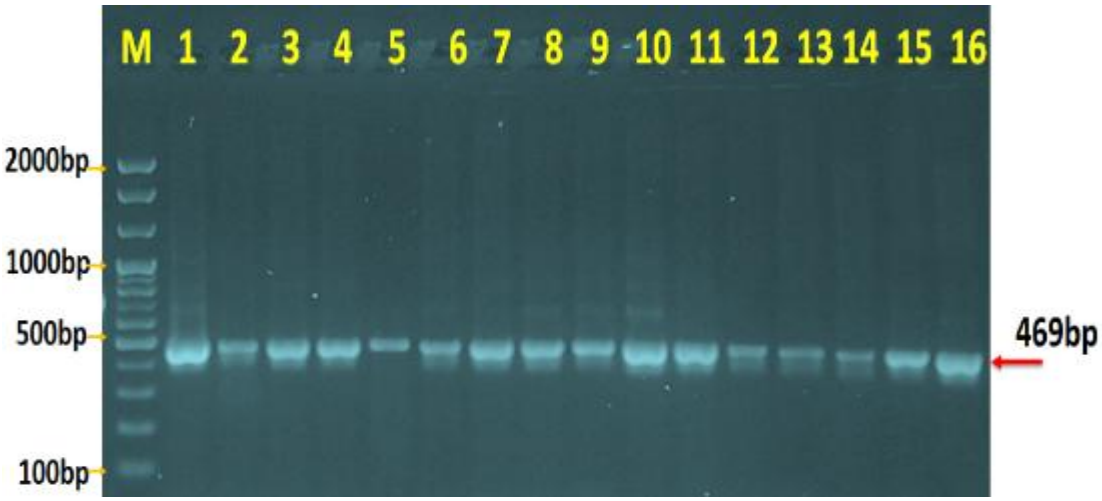
Şekil 4.9 *E. coli* izolatlarında *FimH* geninin gel elektroforezi görüntüsü

Tüm *E. coli* izolatlarında *papC* geni yanında Tarchouna *et al*. (2013) bulgularıyla benzer şekilde *fimA* ve *papC* genleri de sıkça tespit edilmiştir.



Şekil 4.10 *E.coli* izolatlarında *papC* geninin gel elektroforezi görüntüsü

Naves *et al*. (2008), tarafından yapılan bir araştırmaya göre, virülansla ilgili beş genin sağlam biyofilm gelişimine dahil olduğu bulunmuştur: *papC* ve *papG* aIees, sfa/focDE, *focG*, *hyA* ve *cnf1*, bunlardan ikisi (*papC* ve *hyA*) daha yaygındır (p 0,05). Biyofilm üretimi, *papC* geni ifade edildiğinde (%100) ifade edilmediğinden (%86) önemli ölçüde yüksek olduğu tespit edilmiştir (p=0,010) .



Şekil 4.11 *E. coli* izolatlarında *pgaC* geninin gel elektroforezi görüntüsü

Çizelge 4.4 *E. coli* izolatlarında biyofilme ilişkin genler

İzolat No.	***fimH* geni**	***papC* geni**	***pgaC* geni**
1	+	+	+
2	+	+	+
3	+	+	+
4	+	+	+
5	+	+	+
6	+	+	+
7	+	+	+
8	+	+	+
9	+	+	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	+	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	+	+
16	+	+	+
Toplam pozitif	16	16	16
Yüzde %	100.00	100.00	100.00

İleri mikroskobik incelemeler ve *E. coli'*nin çeşitli statik ve dinamik biyofilm deney ortamlarında geliştirilmesi, çok çeşitli adezinlerin keşfedilmesinin yanı sıra biyofilm yaşam tarzında yer alan düzenleyici ağlar arasında karmaşık bağlantılar olduğunu göstermiştir. *E. coli'*nin bir biyofilm içinde işlev görmek için kullanabileceği daha önce bilinmeyen fizyolojik yetenekleri ve kullanılmayan biyolojik kaynaklarını da ortaya çıkarmıştır. Bu durum, *E. coli* K-12'den yabani kommensal ve patojenik suşlara aşamalı bir geçişin ardından tespit edilmiştir (Lebeaux *et al.* 2014). *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae'*yi içeren enterobakteriler, biyofilm gelişimi olarak bilinen önemli bir özellik ile ayırt edilmektedir. Biyofilmlerin gelişimi, hastanelerde ve hastane hastalarında yaşayan bakterilerin hayatta kalmasına yardımcı olmakta ve bu da hastaların hastane enfeksiyonlarına yakalanma riskini artırmaktadır (Iebeaux *et al.* 2014, Percival *et al.* 2015).

CRE'nin neden olduğu bakteriyel hastalıklar için klinik risk faktörlerinin yeterli düzeyde tutulduğuna dair raporlara rağmen, CRE'nin neden olduğu enfeksiyonlar için bakteriyel risk faktörleri, özellikle antibiyotik duyarlılığı hakkında bilgi eksikliği vardır. Bu nedenle, biyofilmler gibi bakterilerin özelliklerinin anlaşılması, CRE patojenlerinin neden olduğu biyofilme reaktif enfeksiyonların tedavisinde son derece önemlidir. Bunun nedeni, bu patojenlerle ilişkili kötü klinik sonuçlar ve sınırlı tedavi seçenekleridir (Al-Bayati and Samarasinghe 2022).

4.5.1 Biyofilm oluşturan *E. coli'nin* antibiyotik direnç genlerinin incelenmesi

Biyofilmle bağlantılı belirli genlerin analizine odaklanmanın yanı sıra, antibiyotiklere dirençle ilgili genlerin ek bir önemli yönüne özel dikkat gösterildi. Buna ek olarak, bu çalışmada *BlaCTX-M*, *BlaSHV* ve *BlaTEM* dahil olmak üzere bir dizi kritik geni araştırmak ve taramak için belirli primerlerin birlikte çalışması kullanılmıştır. Bu araştırmanın sonuçları, all biyofilm oluşturan *E. coli'*nin çeşitli antibiyotik direnç genlerini test ettiğini, ancak bu genlerin miktarı ve yüzdesinin çeşitli klinik *E. coli* izolatları arasında büyük farklılıklar gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu durum, standart PCR ekipmanı kullanılarak elde edilen verilerle belirlenmiştir. Pozitif amplifikasyon

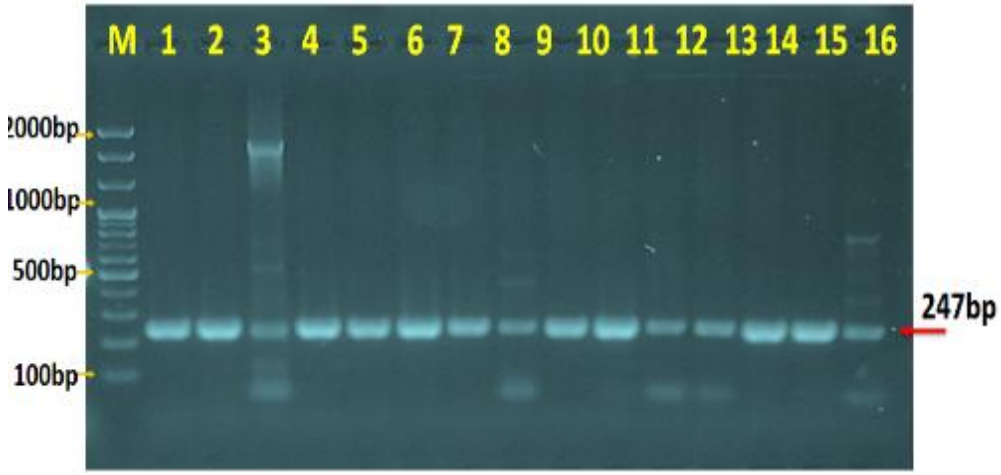
oranlarının Şekil 4.12, 4.13 ve 4.14 ile Çizelge 4.5'te %100, %50 ve %87.50 değerlerine sahip olduğu görülmektedir.

ESBI-EC olarak da bilinen ESBI üreten *E. coli* halk sağlığı açısından endişe kaynağıdır çünkü bu bakterilerin neden olduğu enfeksiyonlar penicillin ve sefalosporin gibi antibiyotiklerle tedaviye yanıt alınamamasına yol açabilmektedir. Bu da ölüm riskinin artmasına ve gerekli tedavinin gecikmesine neden olmaktadır. Sefalosporinler ve penicillinlerin beta-laktamaz inhibitörleri ile belirli kombinasyonları ESBI-EC enfeksiyonlarına karşı etkili olabilse de, bu ilaçlar *E. coli* enfeksiyonları için nadiren ilk tedavi hattı olarak kullanılmaktadır (Gundran *et al*. 2019). Erbil talasemi hastalarından ESB üreten *K. pneumoniae* ve *E. coli'de bIaTEM, baSHV* ve *baCTX-M* genlerinin yaygınlığı üzerine yapılan bir çalışmada, ESB üreten *E. coli* suşlarının %81'inde, *baSHV* genlerinin %16.2'sinde ve *baCTX-M* genlerinin %32.4'ünde *bIaTEM* genlerinin mevcut olduğu tespit edilmiştir. Antibiyotik direncinin *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları arasında toplam 20 farklı antibiyotiğe karşı çok çeşitli olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, birçok ilacın *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarına karşı dirençli (MDR) olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *K. pneumoniae* izolatlarının %87.5'inde ve *E. coli* izolatlarının %75'inde MDR fenotipi gözlenmiştir (Çizelge 4.5) (Pishtiwan and Khadija 2019).

Çizelge 4.5 İdrar numunelerinde biyofilm ve antibiyotiğe ilişkin genler

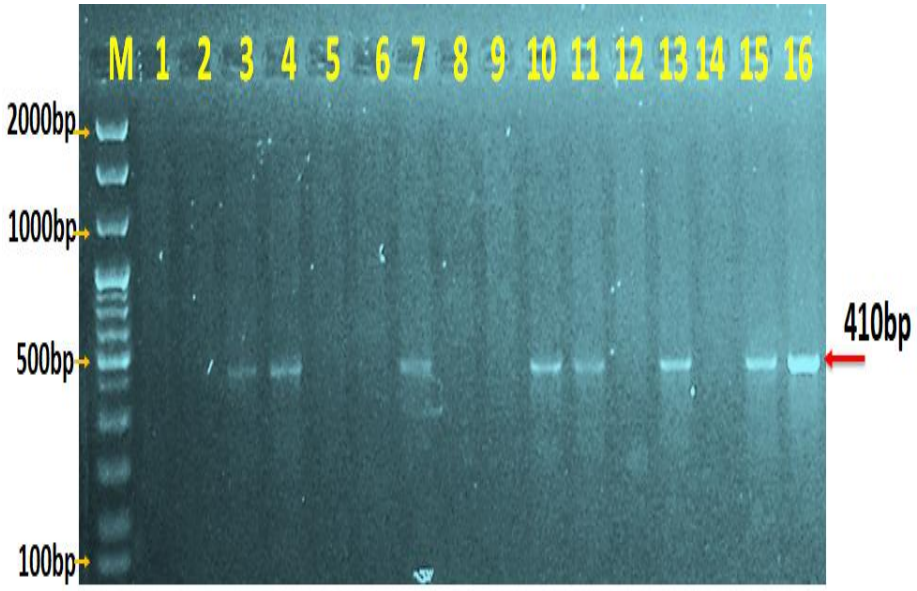
Antibiyotiğe ilişkin genler			
Izolat No.	***BlaCTX-M***	***BlaSHV***	***blaTEM***
1	+	-	+
2	+	-	+
3	+	+	-
4	+	+	+
5	+	-	+
6	+	-	+
7	+	+	+
8	+	-	-
9	+	-	+
10	+	+	+
11	+	+	+
12	+	-	+
13	+	+	+
14	+	+	+
15	+	-	+
16	+	+	+
Toplam pozitif	16	8	14
Yüzde %	100.00	50.00	87.50

BlaCTX-M geni, İYE'den izole edilen all *E. coli* izolatlarında pozitif bulunmuştur. *BlaCTX-M* geni, *E. coli'*deki beta-laktamaz direncinin çoğundan sorumlu olan Sefotaksim (CTX-M-aces) enzimlerini kodlamaktadır. Mevcut çalışmanın sonucu, Şekil 4.12'de gösterildiği gibi tarafından yapılan önceki çalışma ile uyumludur (Akond *et al.* 2009).

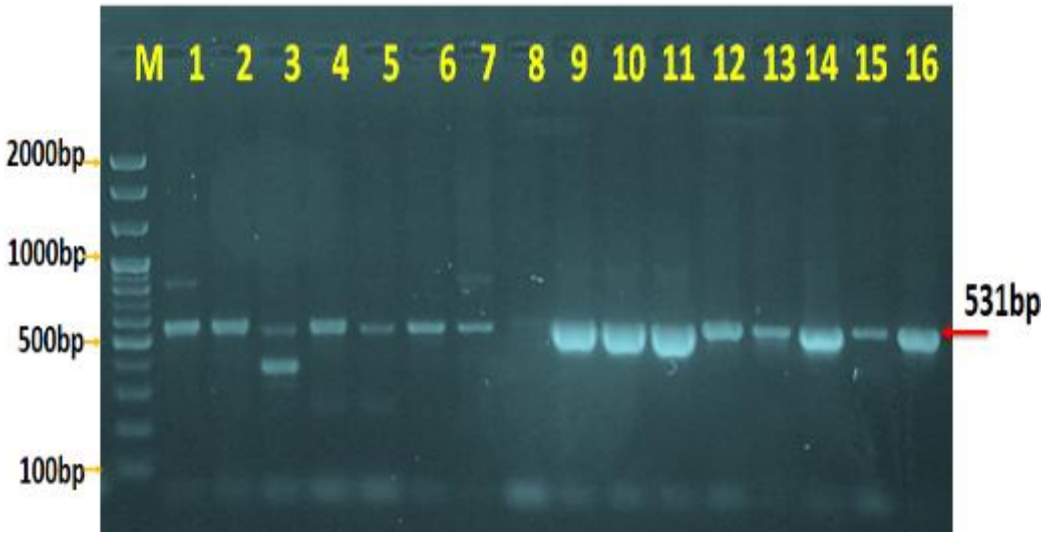


Şekil 4.12 *E. coli* izolatlarında (*BlaCTX-M*) geni agaroz jel elektroforezi

Toplam 16 izolatın 8'inde (%50'sinde) *BIaSHV* tespit edilmiştir. Atasal enzimler olan *baTEM*-1, *baTEM*-2 ve *baSHV*-1'i kodlayan genlerdeki mutasyonlar nedeniyle ESBL'ler, *Enterobacteria*'nin üçüncü ve dördüncü nesil sefalosporinlere karşı direncinin ana nedenidir. Mevcut çalışmanın sonucu, Şekil 4.12'de gösterildiği gibi önceki çalışma Hashim *et al.* (2020) ile uyumludur.



Şekil 4.13 *E. coli* izolatlarında *BlaSHV* geni agaroz jel elektroforezi sonuçları



Şekil 4.14 *E. coli* izolatlarında*BlaTEM* geni agaroz jel elektroforezi sonuçları

4.6 Üropatojenik *E. coli*'de Antibiyotik Direnci ve Biyofilm Oluşumu İlişkisi

Önceki sonuçlara göre, tüm izolatların biyofilm genlerine (*fimH, papC* ve *pgaC* genleri) sahip olduğu ve bu genler olmadan *E. coli*'nin konağın epiteline tutunamayacağı ortaya çıkmıştır. *BlaCTX-M* de tüm izolatlarda pozitif çıkarken, Çizelge 4.6'te gösterildiği gibi *BlaSHV* ve *BlaTEM* sırasıyla %50 ve %87 oranında pozitif çıkmıştır. Mevcut çalışmada genler (*fimH* geni, *papC* geni ve *pgaC* geni) ile *BlaCTX-M* geni arasında ilişki vardır.

Zhao *et al*. (2020) tarafından yapılan önceki çalışmada CAZ, IPM, MEM: CIP, FEP, CRO, AN ve GM dahil olmak üzere çeşitli sınıflardan antibiyotiklerin çoğunun biyofilm sentezi ve antimikrobiyal direnç arasında istatistiksel olarak anlamlı (p 0,05) bir bağlantı olduğu, ancak SXT ve CTX ile olmadığı gösterilmiştir.

Antimikrobiyal direnç ve biyofilm oluşturma yeteneğinin, türler arasında değişen çeşitli şekillerde etkileşime girdiği gösterilmiştir. Gentamisin ve seftazidim, piperasilin /tazobaktam ve kolistine karşı *Pseudomonas aeruginosa* ve siprofloksasin direnci, *E. coli* biyofilm oluşumu ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, biyofilm oluşumu ile küresel veya çoklu ilaç direnci arasında bir bağlantı gösterilmemiştir (Çizelge 4.6).

Çizelge 4.6 Üropatojenik *E. coli'de* antibiyotik direnci ve biyofilm oluşumu ilişkisi

Biyofilme ilişkin genler				**Antibiyotiğe ilişkin genler**		
Izolat No.	***fimH* geni**	***papC* geni**	***pgaC* geni**	***BlaCTX-M***	***BlaSHV***	***blaTEM***
1	+	+	+	+	-	+
2	+	+	+	+	-	+
3	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	-	+
6	+	+	+	+	-	+
7	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	-	-
9	+	+	+	+	-	+
10	+	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	-	+
13	+	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	-	+
16	+	+	+	+	+	+
Toplam pozitif	16	16	16	16	8	14
Yüzde(%)	100.00	100.00	100.00	100.00	50.00	87.50
P.değeri	0.001					
X^2	12.6					

Önceki sonuçlara göre biyofilm oluşturan UPEC iki biyofilm veya üç antibiyotik direnç genine sahip olduğunu ortaya koymuştur.

EPS biyofilm matrisi sayesinde bakteri toplulukları yakın bir şekilde bir arada bulunabilmektedir (Jian *et al.* 2021). Antibiyotik direncini kodlayan plazmidlerin hücre içi transferi için olası bir depo sunmakta, böylece bakteriyel direncin yayılmasını artırmaktadır. Biyofilm yoluyla bakteriler arasındaki yatay gen transferinin, serbest yaşayan, planktonik bakteriler arasındaki gen transferinden 700 kat daha başarılı olduğu gösterilmiştir (Jian *et al.* 2021).

Kronik enfeksiyonların başlıca nedeni, genellikle hem antibiyotiğe dirençli hem de fenotipik olarak toleranslı bakterileri içeren çeşitli ve karışık bakteri toplulukları ile ayırt edilen biyofilmdir (Bowler 2018). Hem tedavi sonuçları hem de bakteri plazmidinin yaygınlığı açısından bu, son derece korkutucu bir klinik durumdur (Wolcott *et al.* 2010). Antibiyotik tedavisinin daha etkili olduğu 24-48 saatlik bir terapötik pencere ortaya çıkarmıştır.

Bu, biyofilmi kırmak için tasarlanan yaklaşımların antibiyotik etkinliğini artırabileceğini göstermektedir. Avrupa Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Derneği (ESCMID) 2014 "Biyofilm çözücü ilaçlarla yeni antibiyotik kombinasyonlarına" duyulan ihtiyaç, biyofilm tanımlama ve tedavisine ilişkin kılavuzlarda belirtilmiştir. Bu durum biyofilmin yönetilmesi ve antibiyotiklerin etkinliğinin artırılması için çok önemli bir strateji olarak giderek daha yaygın bir şekilde kabul görmektedir. Bakteriyofaj ve siprofloksasinin son zamanlarda bakteri biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde etkili olduğu gösterilmiştir (Chang *et al.* 2019).

Mevcut çalışma, biyofilmin direnç genlerini yayma eğilimi ve ayrıca antibiyotiklere karşı doğal fenotipik toleransı nedeniyle "biyofilm" kelimesinin "antibiyotik direnci" kelimesiyle eşanlamlı olarak kullanılması gerektiği sonucuna varmıştır. Biyofilm, antimikrobiyal tedavinin mevcut tanımının dışında olmasına rağmen, sağlık uzmanları arasında varlığının, yaygınlığının ve etkisinin daha iyi anlaşılması, hijyen uygulamalarının iyileştirilmesi ve sağlık bakım ortamlarında antibiyotik direncinin gelişmesinin ve yayılmasının önlenmesi için kritik öneme sahiptir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Mevcut bulgulara göre, İYE'li hastalardan alınan örneklerde 8 farklı bakteri türü izole edilmiştir. Bunlar içerisinde en yaygın tür ise *E. coli*'dir. Yapılan antibiyotik direnç testlerinde *E. coli* izolatlarının MDR olduğu belirlenmiştir. Bu izolatların dirençli olduğu antibiyotikler içinde en yüksek oran %75 ile siprofloksasin ve norfloksasine karşı görülmüştür. En düşük direnç oranı ise %6 ile meropenem ve imipeneme karşıdır. Klindamisine karşı hiç direnç tespit edilememiştir.

Bununla birlikte E. coli izolatlarının %87.5'inin biyofilm oluşturduğu ve %80'den fazlasının da biyofilm üretiminde rol oynayan bakteriler arası iletişim genlerini (*BlaCTX*-M, *blaSHV*, *blaTEM*) taşıdığı belirlenmiştir.

Bu sonuçlar ışığında İYE tedavisine başlanmadan önce etken izolasyon ve identifikasyonu ile antibiyotik direnç tespitinin yapılmasının tedavi başarısı için elzem olduğu ortaya konmuştur. Bununla birlikte etkenlerin biyofilm oluşturma yeteneklerinin de tespit edilmesinin tekrarlayan İYE enfeksiyonlarıyla mücadelede önem kazandığı ve gelişecek antibiyotik dirençliliğini ötelemek adına faydalı olacağı değerlendirilmektedir.

KAYNAKLAR

Akanbi, O. E., Njom, H. A., Fri, J., Otigbu, A. C., and Clarke, A. M. 2017. Antimicrobial susceptibility of Staphylococcus aureus isolated from recreational waters and beach sand in Eastern Cape Province of South Africa. International Journal of Environmental Research and Public Health, 14 (9): 1001.

Akbarian, M., Chen, S. H., Kianpour, M., Farjadian, F., Tayebi, L., and Uversky, V. N. 2022. A review on biofilms and the currently available Antibiofilm approaches: Matrix-destabilizing hydrolases and anti-Bacterial peptides as promising candidates for the food industries. International Journal of Biological Macromolecules, 219: 1163-1179.

Akond, M. A., Alam, S., Hassan, S. M. R., and Shirin, M. 2009. Antibiotic resistance of Escherichia coli isolated from poultry and poultry environment of Bangladesh. Internet Journal of Food Safety, 11: 19-23.

Al-Bayati, M. and Samarasinghe, S. 2022. Biofilm and Gene Expression Characteristics of the Carbapenem-Resistant Enterobacter*Enterobacter*ales, Escherichia coli IMP, and Klebsiella*Klebsiella* pneumoniae NDM-1 Associated with Common Bacterial Infections. International Journal of Environmental Research and Public Health, 19 (8): 4788.

Al-Qaysi, M. N., Al-Ouqaili, M. T., and Al-Meani, S. A. 2020. Molecular Analysis for Azoospermia Factor Microdeletions in the Y chromosome for Azoospermic and Severe Oligospermic Infertile Iraqi Patients. Systematic Reviews in Pharmacy, 11(8).

Archer, N. K., Mazaitis, M. J., Costerton, J. W., Leid, J. G., Powers, M. E., and Shirtliff, M. E. 2011. Staphylococcus aureus biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. Virulence, 2(5): 445-459.

Baugh, S., Ekanayaka, A. S., Piddock, L. J., and Webber, M. A. 2012. Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of Salmonella enterica serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(10): 2409-2417.

Baunoch, D., Luke, N., Wang, D., Vollstedt, A., Zhao, X., Ko, D. S. and Sirls, L. T. 2021. Concordance Between Antibiotic Resistance Genes and Susceptibility in Symptomatic Urinary Tract Infections. Infection and Drug Resistance, 14: 3275.

Bengtsson- Palme, J., and Heß, S. 2019. Strategies to reduce or eliminate resistant pathogens in the environment. Antibiotic Drug Resistance, 24: 637-673.

Bengtsson-Palme, J., Kristiansson, E., and Larsson, D. J. 2018. Environmental factors influencing the development and spread of Antibiotic resistance. FEMS Microbiology Reviews., 42(1): 68-80.

Bjarnsholt, T., Buhlin, K., Dufrêne, Y. F., Gomelsky, M., Moroni, A., Ramstedt, M. and Römling, U. 2018. Biofilm formation–what we can learn from recent developments. Journal of Internal Medicine, 284(4): 332-345.

Blanquart, F., Lehtinen, S., Lipsitch, M., and Fraser, C. 2018. The evolution of Antibiotic resistance in a structured host population. Journal of The Royal Society Interface, 15(143): 20180040.

Bowler, P. G. 2018. Antibiotic resistance and biofilm tolerance: a combined threat in the treatment of chronic Infections. Journal of Wound Care, 27(5): 273-277.

Bullens, M., de Cerqueira Melo, A., Raziq, S., Lee, J., Khalid, G. G., Khan, S. N. and Williams, A. 2022. Antibiotic resistance in patients with urinary tract Infections in Pakistan. Public Health Action, 12(1): 48-52.

Burmolle, 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.

Castro-Sánchez, E., Chang, P. W., Vila-Candel, R., Escobedo, A. A., and Holmes, A. H. 2016. Health literacy and infectious diseases: why does it matter?. International Journal of Infectious Diseases, 43: 103-110.

Chang, R. Y. K., Das, T., Manos, J., Kutter, E., Morales, S., and Chan, H. K. 2019. Bacteriophage PEV20 and ciprofloxacin combination treatment enhances removal of *Pseudomonas* aeruginosa biofilm isolated from cystic fibrosis and wound patients. The AAPS Journal, 21(3): 1-8.

Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., and Beachey, E. H. 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(6): 996-1006.

Cortese, Y. J., Wagner, V. E., Tierney, M., Devine, D., and Fogarty, A. 2018. Review of catheter-associated urinary tract infections and in vitro urinary tract models. Journal of Healthcare Engineering, 2018.

Costerton, J. W., and Stewart, P. S. 2000. Biofilms and device- related Infections. Persistent Bacterial Infections, 423-439.

Dutkiewicz, J., Mackiewicz, B., Lemieszek, M. K., Golec, M., and Milanowski, J. 2016. Pantoea agglomerans: a mysterious bacterium of evil and good. Part IV. Beneficial effects. Annals of Agricultural and Environmental Medicine, 23(2).

Eberly, A. R., Floyd, K. A., Beebout, C. J., Colling, S. J., Fitzgerald, M. J., Stratton, C. W. and Hadjifrangiskou, M. 2017. Biofilm formation by Uropathogenic Escherichia coli is favored under oxygen conditions that mimic the bladder environment. International Journal of Molecular Sciences, 18(10): 2077.

Fisher, J. F., Kavanagh, K., Sobel, J. D., Kauffman, C. A., and Newman, C. A. 2011. Candida urinary tract Infection: Pathogenesis. Clinical Infectious Diseases, 52 (6): 437-451.

Flores-Mireles, A., Hreha, T. N. and Hunstad, D. A. 2019. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation, 25(3): 228-240.

Foxman, B. 2014. Urinary tract Infection syndromes: occurrence, recurrence, Bacteriology, risk factors, and disease burden. Infectious Disease Clinics, 28(1): 1-13.

Gajdács, M. 2019. Epidemiology and antibiotic resistance trends of Pantoea species in a tertiary-care Teaching hospital: A 12-year retrospective study. Developments in Health Sciences, 2(3): 72-75.

Garrett, T. R., Bhakoo, M., and Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. Progress in Natural Science, 18(9): 1049-1056.

Gaze, W. H., Krone, S. M., Larsson, D. J., Li, X. Z., Robinson, J. A., Simonet, P. and Zhu, Y. G. 2013. Influence of humans on evolution and mobilization of environmental Antibiotic resistome. Emerging Infectious Diseases, 19(7): e120871.

Ghaz-Jahanian, M. A., Khodaparastan, F., Berenjian, A. and Jafarizadeh-Malmiri, H. 2013. Influence of small RNAs on biofilm formation process in bacteria. Molecular Biotechnology, 55(3): 288-297.

Gundran, R. S., Cardenio, P. A., Villanueva, M. A., Sison, F. B., Benigno, C. C., Kreausukon, K. and Punyapornwithaya, V. 2019. Prevalence and distribution of blaCTX-M, blaSHV, blaTEM genes in extended-spectrum β-lactamase-producing E. coli *E. coli* isolates from broiler farms in the Philippines. BMC Veterinary Research, 15(1): 1-8.

Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., and Tribedi, P. 2016. Biofilm, Pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. Archives of Microbiology, 198(1): 1-15.

Halimi-Asl, A., Hosseini, A. H. and Nabavizadeh, P. 2014. Can procalcitonin reduce unnecessary voiding cystoureterography in children with first febrile Urinary tract Infection. Iranian Journal of Pediatrics, 24(4): 418.

Hashim, K. S., Ali, S. S. M., AlRifaie, J. K., Kot, P., Shaw, A., AlKhaddar, R. and Gkantou, M. 2020. Escherichia coli inactivation using a hybrid ultrasonic–electrocoagulation reactor. Chemosphere, 247: 125868.

Hasson, S. O., Al-Hamadani, A. H., and Al-Azawi, I. H. 2018. Occurrence of biofilm formation in *Serratia* fonticola and Pantoea sp. isolates among urinary catheterized patients. Nano Biomed. Eng., 10(3): 295-304.

Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C., Bassi, G. L., Coenye, T., Donelli, G. and Zimmerli, C. E. E. W. 2015. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. Clinical Microbiology and Infection, 21: 1-25.

Hooton, T. M. 2012. Uncomplicated Urinary tract Infection. New England Journal of Medicine, 366(11): 1028-1037.

Höller, M., Steindl, H., Abramov-Sommariva, D., Wagenlehner, F., Naber, K. G. and Kostev, K. 2021. Treatment of urinary tract Infections with Canephron® in Germany: a retrospective database analysis. Antibiotics, 10(6): 685.

Hudson, R. E., Job, K. M., Sayre, C. L., Krepkova, L. V., Sherwin, C. M., and Enioutina, E. Y. 2022. Examination of Complementary Medicine for Treating Urinary Tract Infections Among Pregnant Women and Children. Frontiers in Pharmacology, 1541.

Huynh, T. T., McDougald, D., Klebensberger, J., Al Qarni, B., Barraud, N., Rice, S. A. and Schleheck, D. 2012. Glucose starvation-induced dispersal of *Pseudomonas* aeruginosa biofilms is cAMP and energy dependent. Plos One, 7(8): e42874.

Imuta, N., Nishi, J., Tokuda, K., Fujiyama, R., Manago, K., Iwashita, M. and Kawano, Y. 2008. The Escherichia coli efflux pump TolC promotes aggregation of enteroaggregative E. coli *E. coli* 042. Infection and Immunity, 76(3): 1247-1256.

Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L. and Dou, T. 2021. Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. Journal of Basic Microbiology, 61(12): 1049-1070.

Kahn, L. H. 2017. Antimicrobial resistance: a One Health perspective. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 111(6): 255-260.

Kapoor, G., Saigal, S., and Elongavan, A. 2017. Action and resistance Mechanisms of Antibiotics: A guide for Clinicians. Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology, 33(3): 300.

Kazancioglu, R., Buyukaydin, B., Iraz, M., Alay, M., and Erkoc, R. 2014. An unusual cause of peritonitis in peritoneal dialysis patients: Pantoea agglomerans. The Journal of Infection in Developing Countries, 8(07): 919-922.

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(12): e01067.

Kline, K. A., and Lewis, A. L. 2017. Gram- positive uropathogens, polymicrobial Urinary tract Infection, and the emerging Microbiota of the urinary tract. Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management, 459-502.

Kline, K. A., Schwartz, D. J., Lewis, W. G., Hultgren, S. J., and Lewis, A. L. 2011. Immune activation and suppression by group B Streptococcus Streptococcus in a murine model of Urinary tract Infection. Infection and Immunity, 79(9): 3588-3595.

Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M. and Hultgren, S. J. 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of the postantibiotic era. Cold Spring Harbor perspectives in Medicine, 3(4): a010306.

Larsson, D. J., Andremont, A., Bengtsson-Palme, J., Brandt, K. K., de Roda Husman, A. M., Fagerstedt, P. and Wernersson, A. S. 2018. Critical knowledge gaps and

research needs related to the environmental dimensions of Antibiotic Resistance. Environment International, 117: 132-138.

Lebeaux, D., Ghigo, J. M., and Beloin, C. 2014. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 78(3): 510-543.

Levison, M. E., and Kaye, D. 2013. Treatment of complicated Urinary tract Infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. Current Infectious disease reports, 15(2):109-115.

Ligozzi, M., Bernini, C., Bonora, M. G., De Fatima, M., Zuliani, J., and Fontana, R. 2002. Evaluation of the VITEK 2 system for identification and antimicrobial susceptibility testing of medically relevant gram-positive cocci. Journal of Clinical Microbiology, 40(5): 1681-1686.

Liu, F., Guo, D. D., Tu, Y. H., Xue, Y. R., Gao, Y. and Guo, M. L. 2016. Identification of reference genes for gene expression normalization in safflower (Carthamus tinctorius). Revista Brasileira de Farmacognosia, 26: 564-570.

Livermore, D. M. 2012. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. The Korean Journal of Internal Medicine, 27(2): 128.

Lo, E., Nicolle, L. E., Coffin, S. E., Gould, C., Maragakis, L. L., Meddings, J. and Yokoe, D. S. 2014. Strategies to prevent catheter-associated Urinary tract Infections in acute care hospitals: 2014 update. Infection Control and Hospital Epidemiology, 35 (5): 464-479.

Luo, A., Wang, F., Sun, D., Liu, X., and Xin, B. 2022. Formation, development, and cross-species interactions in biofilms. Frontiers in Microbiology, 12: 3982.

Maharjan, G., Khadka, P., Siddhi Shilpakar, G., Chapagain, G., and Dhungana, G. R. 2018. Catheter-associated Urinary tract Infection and obstinate biofilm producers. Canadian Journal of Infectious diseases and Medical Microbiology, 2018(1): 7.

Maki, D. G., Rhame, F. S., Mackel, D. C., and Bennett, J. V. 1976. Nationwide epidemic of septicemia caused by contaminated intravenous products: I. Epidemiologic and clinical features. The American Journal of Medicine, 60(4): 471-485.

Mama, M., Manilal, A., Gezmu, T., Kidanewold, A., Gosa, F. and Gebresilasie, A. 2019. Prevalence and associated factors of Urinary tract Infections among diabetic patients in Arba Minch Hospital, Arba Minch province, South Ethiopia. Turkish Journal of Urology, 45(1): 56.

Mortazavi-Tabatabaei, S. A. R., Ghaderkhani, J., Nazari, A., Sayehmiri, K., Sayehmiri, F., and Pakzad, I. 2019. Pattern of Antibacterial resistance in Urinary tract Infections: A systematic review and meta-analysis. International Journal of Preventive Medicine, 10.

Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J. and Soriano, F. 2008. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by Escherichia coli strains. Microbial Pathogenesis, 45(2): 86-91.

Neethirajan, S., Clond, M. A. and Vogt, A. 2014. Medical biofilms-Nanotechnology approaches. Journal of Biomedical Nanotechnology, 10(10): 2806-2827.

O'Grady, M. C., Barry, L., Corcoran, G. D., Hooton, C., Sleator, R. D. and Lucey, B. 2019. Empirical treatment of Urinary tract Infections: how rational are our guidelines. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 74(1): 214-217.

Onwubiko, N. E. and Sadiq, N. M. 2011. Antibiotic sensitivity pattern of Staphylococcus aureus from Clinical isolates in a tertiary health institution in Kano, Northwestern Nigeria. Pan African Medical Journal, 8(1).

Ozturk, R. and Murt, A. 2020. Epidemiology of Urological Infections: a global burden. World Journal of Urology, 38(11), 2669-2679.

Pang, Z., Raudonis, R., Glick, B. R., Lin, T. J. and Cheng, Z. 2019. Antibiotic resistance in Pseudomonas aeruginosa: mechanisms and alternative therapeutic strategies. Biotechnology Advances, 37(1): 177-192.

Pincus, D. H. 2006. Microbial identification using the bioMérieux Vitek® 2 system. Encyclopedia of Rapid Microbiological Methods. Bethesda, MD: Parenteral Drug Association, 1-32.

Pishtiwan, A. H. and Khadija, K. M. 2019. Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M genes among ESBL-producing Klebsiella*Klebsiella* pneumoniae and Escherichia coli isolated from thalassemia patients in Erbil, Iraq. Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases, 11(1).

Pittet, D. 2005. Infection control and quality health care in the new millenium. American Journal of Infection Control, 33(5): 258-267.

Ronald, A. 2002. The Etiology of Urinary tract Infection: traditional and emerging pathogens. The American Journal of Medicine, 113(1): 14-19.

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., and Tiwari, V. 2018. Strategies for combating Bacterial Biofilms: A focus on Anti-biofilm agents and their mechanisms of action. Virulence, 9(1): 522-554.

Senobar Tahaei, S. A., Stájer, A., Barrak, I., Ostorházi, E., Szabó, D., & Gajdács, M. 2021. Correlation between biofilm-formation and the antibiotic resistant phenotype in Staphylococcus aureus isolates: a laboratory-based study in Hungary and a review of the literature. Infection and Drug Resistance, 1155-1168.

Sharma, D., Misba, L. and Khan, A. U. 2019. Antibiotics versus biofilm: an emerging battleground in microbial communities. Antimicrobial Resistance and Infection Control, 8(1): 1-10.

Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W. and Boukadida, J. 2013. Distribution of uropathogenic virulence genes in Escherichia coli isolated from patients with urinary tract Infection. International Journal of Infectious Diseases, 17(6): e450-e453.

Thorn, C. R., Howell, P. L., Wozniak, D. J., Prestidge, C. A., & Thomas, N. 2021. Enhancing the therapeutic use of biofilm-dispersing enzymes with smart drug delivery systems. Advanced Drug Delivery Reviews, 179: 113916.

Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., and Arenas, J. 2020. Biofilms as promoters of Bacterial Antibiotic resistance and tolerance. Antibiotics 10: 3.

Vestby, L. K., Gronseth, T., Simm, R. and Nesse, L. L. 2020. Bacterial Biofilm and its role in the Pathogenesis of disease. Antibiotics, 9(2): 59.

Vilain, S., Pretorius, J. M., Theron, J. and Brözel, V. S. 2009. DNA as an adhesin: Bacillus cereus requires extracellular DNA to form Biofilms. Applied and environmental Microbiology, 75(9): 2861-2868.

Wagenlehner, F. M., Abramov-Sommariva, D., Höller, M., Steindl, H. and Naber, K. G. 2018. Non-antibiotic herbal therapy (BNO 1045) versus antibiotic therapy (Fosfomycin Trometamol) for the treatment of acute lower uncomplicated Urinary

tract Infections in women: a double-blind, parallel-group, randomized, multicentre, non-inferiority phase III trial. Urologia Internationalis, 101(3): 327-336.

Wang, H., Tay, M., Palmer, J. and Flint, S. 2017. Biofilm formation of Yersinia enterocolitica and its persistence following treatment with different sanitation agents. Food Control, 73: 433-437.

Wilton, M., Charron-Mazenod, L., Moore, R., and Lewenza, S. 2016. Extracellular DNA acidifies biofilms and induces aminoglycoside resistance in *Pseudomonas* aeruginosa. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60(1): 544-553.

Xiong, J., Zhu, J., Dai, W., Dong, C., Qiu, Q. and Li, C. 2017. Integrating gut Microbiota Immaturity and disease- discriminatory taxa to Diagnose the initiation and severity of shrimp Disease. Environmental Microbiology, 19(4): 1490-1501.

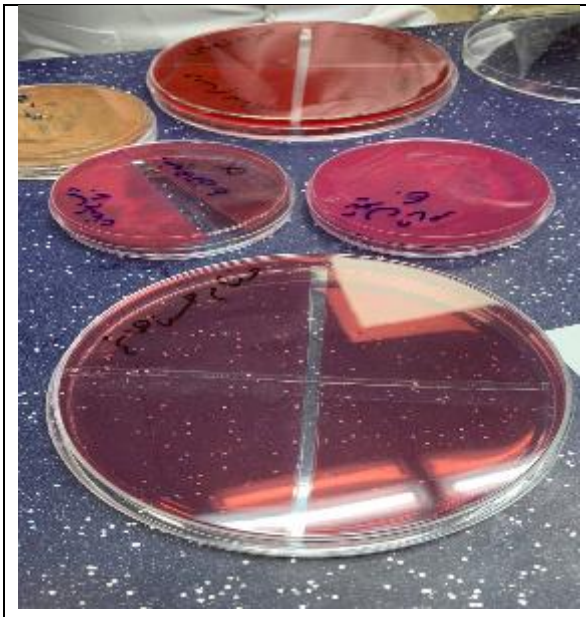
Zhao, F., Yang, H., Bi, D., Khaledi, A. and Qiao, M. 2020. A systematic review and meta-analysis of antibiotic resistance patterns, and the correlation between biofilm formation with virulence factors in uropathogenic E. coli *E. coli* isolated from urinary tract Infections. Microbial Pathogenesis, 144: 104196.

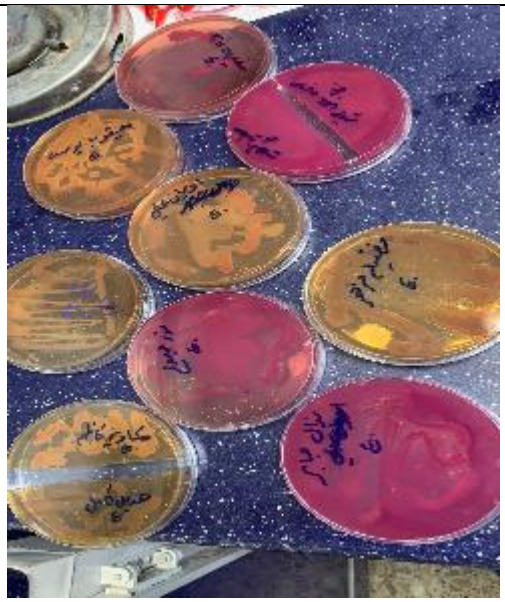
EKLER

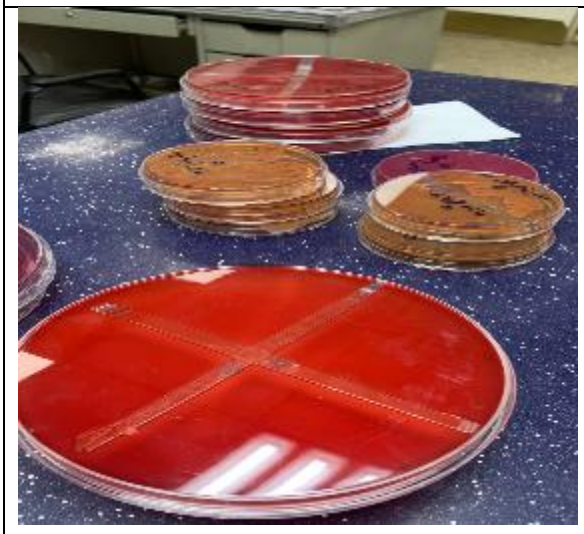
Ek 1. Çalışmada kullanılan bakteri çoğaltma kültürü besiyerleri

Ek 2. Çalışmada kullanılan bazı biyolojik ve kimyasal materyaller

Ek 1 Çalışmada kullanılan bakteri çoğaltma kültürü besiyerleri





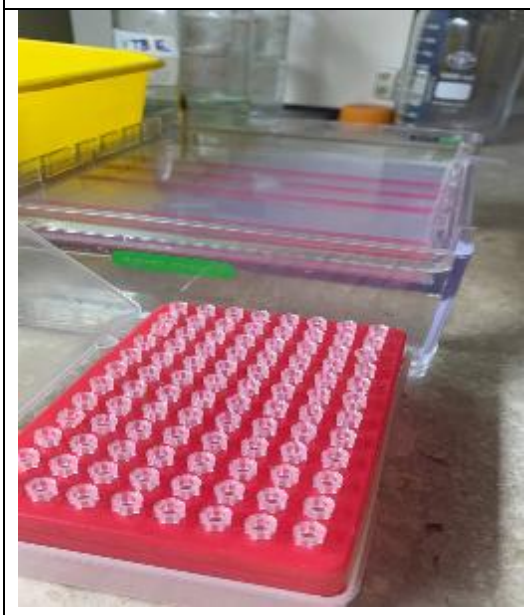




Ek 2 Çalışmada kullanılan bazı biyolojik ve kimyasal materyaller









ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Mohammed Imad Hammood ABOGHANAIM

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2020 – 2023
Lisans	Kufa Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Biyoloji Bölümü	2009 - 2013