ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İDRAR YOLLARI ENFEKSİYONU HASTALARINDAN GENİŞ SPEKTRUM BETA LAKTAMAZ ÜRETEN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*'NİN MRKD GENİNİN MOLEKÜLER TESPİTİ

Haneen Ibrahim Mhmood SHAHEEN

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2022

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Haneen Ibrahim Mhmood SHAHEEN tarafından hazırlanan **"İdrar Yollari Enfeksiyonu Hastalarindan Geniş Spektrum Beta Laktamaz Üreten *Klebsiella Pneumoniae*'nin MrkD Geninin Moleküler Tespiti"** adlı tez çalışması 22/11/2022 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Okan Ürker

Eş Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Marwa Hameed ALKHAFAJI

Jüri Üyeleri :

Başkan : Dr. Öğr. Üyesi Okan ÜRKER
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Bahadır AKMAN
Tarım Bilimleri Anabilim Dalı
Iğdır Üniversitesi

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Emin BOZKURT
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. İbrahim ÇİFTÇİ

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum **"İdrar Yollari Enfeksiyonu Hastalarindan Geniş Spektrum Beta Laktamaz Üreten *Klebsiella Pneumoniae*'nin MrkD Geninin Moleküler Tespiti"** 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 (22/11/2022).

Haneen Ibrahim Mhmood SHAHEEN

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

İdrar Yollari Enfeksiyonu Hastalarindan Geniş Spektrum Beta Laktamaz Üreten *Klebsiella Pneumoniae*'nin MrkD Geninin Moleküler Tespiti

Haneen Ibrahim Mhmood SHAHEEN

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Okan ÜRKER
Eş Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Marwa Hameed ALKHAFAJI

Bu araştırma, Nisan 2022 ile Eylül 2022 arasındaki dönemde Irak'ın Bağdat Vilayetinde yapılmış olup, Bağdat'taki El-Kadhimiya Hastanesi'ne başvuran hastalardan 9-11 yaş arası 100 erkek çocuktan alınan idrar örneğinden gerçekleştirilmiştir. İzolatlar tanısı konvansiyonel biyokimyasal testlerin yanı sıra MacConkey agar, nutrient agar, morfolojik ve kültürel özelliklerine göre konulmuş ve bu kriterlere bağlı olarak *Klebsiella spp.* ürolojik hastalarda idrar yolları enfeksiyonunda (İYE) göre daha yaygın olarak tespit edilmiştir. *Klebsiella pneumoniae'*den sadece 50 (% 50) izolat elde edilmiştir. Sonuçlar, tüm izolatların (% 100) *MrkD* genine sahip olduğunu göstermiştir. *K. pneumoniae* izolatları için PCR sonuçları, *MrkD* geninin mevcut olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada test edilen 50 *K. pneumoniae* izolatının tamamı biyofilm üretmiştir. Biyofilm üreticileri arasında 30 (% 60) izolat güçlü, 20 (% 40) izolat orta düzeydedir.

2022, 51 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *MrkD*, Biyofilm, İYE , *Klebsiella*, Esbl

ABSTRACT

Master of Science Thesis

Molecular Detection Of MrkD Gene In Extended Spectrum Beta Lactamase Producing *Klebsiella Pneumoniae* From Uti Patients

Haneen Ibrahim Mhmood SHAHEEN

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

Advisor: Asst. Prof. Dr. Okan ÜRKER
Co-Advisor: Asst. Prof. Dr. Marwa Hameed ALKHAFAJI

This research was conducted in Baghdad City Governorate, Iraq, in the period between April 2022 and September 2022, and urine samples were obtained from 100 males aged between 9-11 years patients admitted to Al-Kadhimiya Hospital in Baghdad. Isolates diagnosis was made based on morphological and cultural characteristics of MacConkey agar, nutrient agar as well as conventional biochemical tests. Depending on these criteria, *Klebsiella spp.* was more common in urological patients than in UTI only 50 (50 %) isolates were obtained from *K. pneumoniae*. The results showed that all isolates (100 %) possessed *MrkD* gene. The PCR results for the *Klebsiella pneumoniae* isolates revealed that the *MrkD* gene was present in too. Among 50 *K. pneumoniae* isolates were 50 (100 %) isolates as biofilm producers. Among biofilm producers, 30 (60 %) isolates were strong and 20 (40 %) moderate.

2022, 51 pages

Keywords: *MrkD*, Biofilm, Uti, *Klebsiella*, Esbl

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Okan ÜRKER ve Eş Danışman Dr. Öğr. Üyesi Marwa Hameed ALKHAFAJI ve Anneme; rehberlikleri ve anlayışları teşekkür ederim.

Haneen Ibrahim Mhmood SHAHEEN
Çankırı, Aralık 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vi**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **vii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **viii**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **ix**
1. GİRİŞ **1**
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 İdrar yolu enfeksiyonları (İYE) **3**
2.2 Etiyoloji **3**
2.3 Zatürre **3**
2.4 Taksonomi **5**
2.5 Aksesuar Genom **6**
2.6 Hastalık İlerlemesinde ve Virülansta Aksesuar Genomun Rolü **7**
2.7 Antibiyotik Direncine Genel Bakış **10**
2.8 Akış Pompası **11**
2.9 β-Laktamaz Üreten *K. pneumoniae* **12**
2.10 Genişletilmiş Spektrumlu β-Laktamazlar **13**
2.11Biyofilm **14**
2.12Moleküler Tanımlama **17**
3. MATERYAL VE YÖNTEM **19**
3.1 Kültür ve Ortam **19**
3.1.1 MacConkey agar Ortamı **20**
3.1.2 Nutrient agar **20**
3.1.3 Kan agarı **20**
3.2 Biofilm Oluşum Analizi **21**
3.2.1 Biyofilm **22**
3.3 Kimyasal ve Biyolojik Materyal **24**
3.3.1 Sterilizasyonlar **25**

3.3.2 Biyokimyasal test 25
3.4 DNA Analizleri 26
3.4.1 DNA Ekstraksiyon Protokolü 26
3.4.2 DNA'nın agaroz jel elektroforezi 29
3.4.3 Agaroz jelin hazırlanması 29
3.4.4 DNA'nın Yüklenmesi 29
3.4.5 Primer çözeltisi 30
3.4.6 Çalışmada Kullanılan Primerler 30
3.4.7 Tris borat EDTA tamponu (TBE) 31
3.4.8 Numunenin hazırlanması 31
3.4.9 RedSafe boyama solüsyonu 32
4. SONUÇLAR 33
4.1 Numunelerin Toplanması, İzolasyonu ve Tanımlanması 33
4.2 Doku Kültürü Plakası Kullanılarak Biyofilm Oluşturma Deneyleri 35
4.3 PCR Sonuçları 36
4.3.1 DNA Ekstraksiyonu Sonucun 36
4.3.2 Maxime PCR PreMix kiti (i-Taq) 37
4.3.3 Gen Tanısı 37
5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER 40
KAYNAKLAR 44
ÖZGEÇMİŞ 51

SİMGELER DİZİNİ

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
g	Gram
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Millimetre
α	Alfa
μm	Mikrometre
β	Beta laktamaz
μL	Mikrolitre
nm	Nanometre
v	Volt
Bp	Base pair

KISALTMALAR DİZİNİ

AER	Aerobaktin
BHI	Brain heart infusion
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EPS	Ekzopolisakkarit
EPS	Hücre dışı polimerik maddeler
GSBL	Genişletilmiş spektrumlu β-laktamazlar
İYE	İdrar yolu enfeksiyonları
Kİ-İYE	Kateterle İlişkili İdrar Yolu Enfeksiyonuna
KPS	Kapsüler polisakkarit sentezi
LPS	Lipopolisakkarit
MDR	Çoklu ilaç direnci
MIC	Minimum inhibitör konsantrasyonları
MRSA	Metisiline Dirençli *S. aureus*
MTP	Mikrotitre plakası
NAM	Nutrient Agar ortamı
OD	Optik yoğunluk
ODC	Optik yoğunluk kesme değeri
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
RPM	Dakikadaki devir sayısı
SAl	Salmochelindir
SD	Standart sapma
SHİE	Sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon
T6SS	Tip VI salgı sistemi
TBE	Tris borat EDTA Tamponu
TBE	Tris borat EDTA tamponu
YBT	Yersiniabactin
YBÜ	Yoğun bakım ünitelerindeki

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Biyofilm gelişiminin aşamaları (Moormeier ve Bayles 2017) 17
Şekil 3.1 MacConkey Agar'da *K. pneumoniae* ve ayrıntıları..... 19
Şekil 3.2 Biyofilm plakası..... 23
Şekil 3.3 Otomatik ELISA Okuyucusu PKL PPC 230 23
Şekil 3.4 Tüm DNA ekstraksiyon yöntemlerinde yeralan temel adımlar 28
Şekil 3.5 Elektroforez sisteminin çalışması elektrikli alan ve migrasyon yönü..... 32
Şekil 4.1 Kültür ortamında *K. Pneumoniae*..... 34
Şekil 4.2 Bakterilerden genomik DNA ekstraksiyonunun jel elektroforezi 36
Şekil 4.3 PCR ürünü bant boyutu 382 bp ürün, N: DNA marker (100) 39

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Mikrotitre plaka yöntemi ile bakteri yapışmasının sınıflandırılması (Atshan *et al.* 2012) 22
Çizelge 3.2 Bu çalışmanın tahmini cut-off değerine bağlı biyofilm yoğunluğu 23
Çizelge 3.3 Araştırmada kullanılan kimyasal ve biyolojik araçlar ve aletler 24
Çizelge 3.4 Bu çalışmada kullanılan diğer malzemeler 25
Çizelge 3.5 DNA ekstraksiyonu için kullanılacak kimyasallar 28
Çizelge 3.6 Genin primer dizisi *MrkD* 30
Çizelge 3.7 Maxime PCR PreMix kitinin bileşenleri (i -Taq) 30
Çizelge 3.8 PCR'nin reaksiyon bileşenleri 31
Çizelge 3.9 *MrkD* geni için PCR döngü programı 31
Çizelge 4.1 Biyokimyasal testlerine 34
Çizelge 4.2 Biyofilm sonucu 35
Çizelge 4.3 Tanı geni için spesifik etkileşimin karışımı 37

1. GİRİŞ

Klebsiella pneumoniae, plazmitlerden ve kromozomal gen lokuslarından oluşan geniş bir aksesuar genoma sahip Gram-negatif patojendir. Bu aksesuar genom, *K. pneumoniae* suşlarını fırsatçı, hipervirülent ve çoklu ilaca dirençli gruplara ayırır ve *K. pneumoniae*'yi birbirine yakın iki türden ayırır, *Klebsiella variicola* ve *Klebsiella quasipneumoniae* (Martin ve Bachman 2018).

Klebsiella türleri doğada bitkilerde, hayvanlarda ve insanlarda bulunabilir. Solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları (İYE) ve dolaşım enfeksiyonlarına neden olur. dahil olmak üzere çeşitli enfeksiyonlarının nedenidir. Bu enfeksiyonlar tipik olarak bağışıklığı baskılanmış hastalarda ortaya çıkar. ve rutin olarak β-laktamlar ve Enterobacteriaceae'ye karşı etkili diğer antibiyotiklerle tedavi edilir (Behzadi *et al.* 2020).

K. pneumoniae suşları tüm dünyada antibiyotiğe karşı direnç gösteren hipervirülent olarak ortaya çıkmıştır. Ayrıca, moleküler kapasitelerdeki son gelişmeler, *K. pneumoniae* olarak tanımlanan klinik izolatların bir kısmının aslında diğer *Klebsiella* türleri olduğunu ortaya koymuştur. Ortaya çıkan bu suşların ve türlerin nasıl benzer olduğunu ve birbirlerinden nasıl farklılık gösterdiklerini ve bunların epidemiyolojilerine katkı sağlayan genetik faktörlerin kavranması bu enfeksiyonlarla başarılı bir şekilde mücadele etmek için gereklidir . Bazı *K. pneumoniae* suşları fırsatçı patojenler olarak hareket ederek kritik hastalığı olan ve bağışıklığı baskılanmış hastaları enfekte etmektediretmistir. Klinik bilgiler doğrultusunda, *K. variicola* ve *K. quasipneumonieae, K. pneumoniea*'den ayırt edilemez. Öbür taraftan, diğer *K. pneumoniae* trülerine bakıldığında onlar patojeniktir, sağlıklı insanları enfekte edip sonrasında piyojenik karaciğer apsesi, endoftalmi ve menenjit gibi enfeksiyon türlerine yol açar. Karbapenemazları kodlayarak bunları yüksek oranda antibiyotiğe dirençli hale getirirgetirmistir. Bu suşlarin tedavisi son derece zordur çünkü fırsatçılar gibi davranırlar. Tüm bu *K. pneumoniae* grupları ve ilgili türleri, gastrointestinal sistemi kolonize edebilir ve aksesuar genom, kolonize edici bir suşun asemptomatik kaldığını

veya hastalığa neden olacak şekilde ilerleyip ilerlemediğini tespit edebilir (Harada *et al*. 2019).

Bu incelemede fırsatçı, antibiyotiğe dirençli ve hipervirülent *K. pneumoniae* suşları ile kolonizasyon ve enfeksiyon arasındaki ilişkileri ve bu grupları ve ilgili türleri ayırt etmede aksesuar genomun *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının antibiyotik direnci ve hipervirulant suşlar karşısında tedavisi giderek daha zor hale geldiğinden, bu bakterilerin epidemiyolojisi ve patogenezinin daha iyi anlaşılması icin hayati bir önem taşımaktadır (Lawlor *et al*. 2007).

Bu çalışmada *K. pneumoniae*'nin en önemli virülans faktörü genetik düzeyde ele alınması hedeflenmiştir. Genişletilmiş spektrumlu β laktamaz üretiminin fenotipik tespitinin yanı sıra, *K. pneumoniae*'deki ve biyofilm İYE hastalarından izole edilmesi de amaçlanmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE VE LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 İdrar Yolu Enfeksiyonları (İYE)

Kadınlarda idrar yolunun bakteriyel enfeksiyonları oldukça yaygındır. Kadınların %40 ila %60'ından fazlası, yaşamlarının bir noktasında hastalığa yakalanır ve enfeksiyonların çoğu, kadınlar 16 ila 35 yaşları arasındayken meydana gelir. Hastalığı geçirenlerin yaklaşık yarısı bir yıl içinde hastalığa tekrar yakalanır. Kadınlarda idrar yolu enfeksiyonlarına yakalanma olasılığı erkeklerden en az dört kat daha fazladır (Sakamoto *et al.* 2019). Çoğu komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonu (İYE) kendi kendine iyileşirken birçok kişi de semptomları için tedavi arayışında bulunur (Tang *et al.* 2019).

2.2 Etiyoloji

Kateterle İlişkili İdrar Yolu Enfeksiyonuna (Kİ-İYE) neden olan bakteriler *Enterococcus, Staphylococcus aureus* ayrıca *Pseudomonas, Klebsiella* ve *Candida*'dır (Flores-Mireles *et al.* 2019). Örneğin, Ulusal Sağlık Güvenliği Ağı'na göre, SSI'lere genellikle *S. aureus*, pıhtılaşamayan stafilokoklar, enterokoklar ve *E. Coli* ile *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumonia* gibi bakteriler neden olur (Young ve Khadaroo 2014). *S. aureus* ve *P. aeruginosa* HKP ve VİP için en yaygın patojenlerdir, ancak *E. Coli* ve *Klebsiella pneumonia* çocuklarda daha sık görülür (Babcock *et al.* 2003).

2.3 Zatürre

Yaşlı insanlarda pnömoni (Zatürre), enfeksiyondan kaynaklanan hem morbidite hem de mortalitenin önemli bir nedenidir. Toplumda edinilen pnömoni, 65-69 yaş grubundaki 1000 kişiden yaklaşık 3'ünü ve 85-89 yaş grubundaki 1000 kişiden 22'sini etkiler (Millett *et al.* 2013). 2015 yılında dünya çapında 6,8 milyon hastaneye yatış yaşandı ve hastanelerde klinik pnömoniden yaklaşık 1,1 milyon kişi öldü. Erkeklerin, ileri yaşları nedeniyle hastaneye yatış oranları kadınlardan daha yüksekti. Öksürük, nefes darlığı ve

ateş, göğüs röntgeninde yeni bir sızıntının ortaya çıkması gibi zatürre belirtileridir. Örneğin daha düşük bir sıcaklık eşiği gibi yaşa bağlı atipik semptomlar nedeniyle, yaşlılarda tanı daha zordur. Hastalar sıklıkla aynı anda birden fazla komorbiditenin düşmesi veya dekompansasyonu geçirdikten sonra sıklıkla acil servise başvururlar (Black 2016).

Solunum yolu enfeksiyöz hastalıkları, toplumdaki yaşlılar için bir sağlık kuruluşundan hizmet aldıklarında, bağışıklığı baskılanmış veya altta yatan sorunlardan muzdarip olanlardan daha ciddi etkilere sahiptir. Ayrıca, kapalı bir alanda birlikte yaşadıkları için enfeksiyon riski altındadırlar ve bu da hastalığa karşı savunmasızlıklarını artırır. Damlacıklar ve enfekte bir kişiyle doğrudan ve dolaylı temas, solunum yolu hastalıklarının yayılmasının ana sebeplerindendir. Enfekte bir kişi öksürdüğünde, hapşırdığında, konuştuğunda veya nefes aldığında, tükürük damlacıkları enfekte kişinin solunum yollarından enfeksiyonları yayabilir. Patojenler, su damlacıkları buharlaştıkça oluşur ve bu patojenler, başka bir konakçı tarafından yutulmadan veya tüketilmeden önce uzun süre havada kalabilir. Enfekte bir kişi savunmasız bir kişiyle temas ettiğinde veya duyarlı bir kişi kontamine nesneler veya yüzeylerle temas ettiğinde, bulaş meydana gelir (Sabel *et al*. 2010).

Avrupa Hastalık Önleme ve Kontrol Merkezi'ne (ECDC) göre, Avrupa hastanelerinde ve uzun süreli bakım tesislerinde yılda yaklaşık 8,9 milyon sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonun meydana geldiği tahmin edilmektedir. Avrupa'nın sağlık sistemindeki 15 katılımcı ülke üzerinde yapılan bir araştırmaya göre, NI hastaları en sık *Klebsiella pneumoniae* gibi bakterilerle enfekte olmaktadır. 2017 yılında yoğun bakım ünitesinde iki günden fazla kalan hastaların en az 11,788'inde (%8,3) bir SHİE tespit edilmiştir (European Centre for Disease Prevention ve Control 2019). Bağışıklığı zayıf olan hastaların NI'lere veya SHİE'lere yakalanma olasılığı daha yüksektir, bu da birincil hastalığın üstüne ek zorluklara yol açabilir. Yaş, ameliyat öncesi ve sonrası durum, metabolik değişiklikler (örneğin diyabet) ve elbette bağışıklıktaki bozulmaların tümü enfeksiyonla (doğuştan gelen, immünosupresif ajanların neden olduğu veya AIDS'in belirgin bir örnek olduğu hastalıklar) savaşma yeteneğinin azalmasına sebep olabilir. Hasta rezervuarları NI'lerin en önemli kaynağıdır. Diğer kaynaklar arasında sağlık

çalışanları ve ziyaretçilerin yanı sıra hastane dışı personel de bulunmaktadır (Zaglool *et al.* 2011).

Bir hastanın bağışıklık durumu, toplumdaki çeşitli patojenlerin prevalansı ve hastanedeki enfeksiyon kontrolünün kalitesi, sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyon riskini (SHİE) etkiler. SHİE için risk faktörleri arasında immünosupresyon, ileri yaş, hastanede kalış süresi, altta yatan çeşitli komorbiditeler, sağlık kurumlarına sık ziyaretler, mekanik ventilasyon desteği yakın zamanda yapılan invaziv cerrahiler, kalıcı cihazlar ve yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) hastanede yatış yer alır (Sydnor ve Perl 2011). Çeşitli ilaçlara karşı antimikrobiyal direnç gelişimi için en önemli risk faktörlerinden biri, son zamanlarda intravenöz antibiyotik kullanımıdırkullanilir (Metersky ve Kalil 2017). Akut hastalıkların bakımının önemli bir parçası olarak, hastaneye yatışlar aynı zamanda çok sayıda nozokomiyal ve sıklıkla antimikrobiyal dirençli bakteri için duyarlı hastaların riskini de artırır. Yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) hastaların diğer hastalardan, sağlık personelinden veya tesisten bu hastalıklara yakalanma riski yüksektir. 947 hastanede 231,459 hastayla yapılan bir anket, yoğun bakım ünitesindeki (YBÜ) hastaların %19,5'inin en az bir sağlık hizmeti ilişkili enfeksiyona (SHİE) sahip olduğunu ortaya koymuştur (Stiller *et al.* 2017).

2.4 Taksonomi

Bergey'in Sistematik Bakteriyoloji El Kitabı'na (Bergey 2001) göre *Klebsiella pneumoniae* taksonomisi aşağıdaki gibidir;

- Alem: Bakteri
- Filum: Proteobakteri
- Sınıf: Gammaproteobakteriler
- Sıralama: Enterobacteriales
- Aile: Klebsielladaceae
- Cins: Klebsiella
- Tür: *Klebsiella pneumoniae*

2.5 Aksesuar Genom

Bakteri türleri içerisinde, tipik olarak tüm üyeler arasında korunan bir dizi gen vardır. Bu gen seti, çekirdek genom olarak değerlendirilir. *K. pneumoniae*'de izolatların >%95'inde bulunduğu ortaya konulan çekirdek genomun ~2.000 genden oluştuğu tahmin edilmektedir. İzolatlar arasında değişen genler aksesuar genom olarak adlandırılır. Bu, kromozomal olarak kodlanmış genleri ve plazmitlerdeki genleri kapsar. *K. pneumoniae* genomları tipik olarak 5.000 ila 6.000 gen arasında olduğundan, bu, genomun çoğunluğunun aksesuar genlerden meydana geldiği anlamına gelir. Aksesuar genomundaki genler, nitrojen bağlama gibi spesifik süreçlere yardımcı olabilir. Ayrıca aşağıda tartışılanlar gibi belirli virülans faktörlerini de kodlayabilirler. Aksesuar genom ayrıca çeşitli antibiyotiğe dirençli enzimleri ve mekanizmaları kodlayan genleri de taşımaktadır (Martin ve Bachman 2018).

Çok sayıda izolatta genomik adaların ve hareketli genetik elemanların varlığının gösterdiği gibi, bakteri türleri arasında yatay gen transferi ile aksesuar genler elde edilebilir. Genomik adalarda ifade edilen genler, izolatların belirli enfeksiyon veya kolonizasyon konumlarına uyum sağlamasına izin verebilir. GC içerik hesaplaması ve karşılaştırmalı genomik analiz gibi bir dizi in silico yöntemi, yardımcı genomun öğelerini belirlemek veya tahmin etmek için kullanılabilir. 328 *Klebsiella* izolatı üzerinde yakın zamanda yapılan bir araştırma, mevcut bilinen *Klebsiella* "pangenom"unu öngören yaklaşık 30.000 farklı protein kodlayan gen keşfetti. Yazarlar; henüz tanımlanıp karakterize edilmeyen daha fazla aksesuar gen olduğunu gösterir şekilde ayrıca pangenomun açık olduğunu ortaya koydular (Den Bakker *et al*. 2010).

Hayvan enfeksiyon modellerinde *K. pneumoniae* suşlarının tamamı hastalığa neden olmaz. Benzer şekilde, kolonize edici suşların tümü insanlarda hastalığa neden olmaz. Gerçekte, bu bakterilerin uzun zamandır kommensal ve fırsatçı patojenler olduğu düşünülmüştür (Den Bakker *et al*. 2010). Hastalığa neden olanlardan belirli genler, operonlar ve yersiniabactin'i kodlayan yüksek patojeniteli ada virülans ile ilişkili *K. pneumoniae*'de tanımlanmıştır. Bu, hastalığın ilerlemesinin sadece konağın bağışıklık sisteminden değil (Martin ve Bachman 2018).

2.6 Hastalık İlerlemesinde ve Virülansta Aksesuar Genomun Rolü

K. pneumoniae'nin çekirdek ve aksesuar genomlarındaki genler, virülans faktörlerini kodlar. *K. pneumoniae*'de yerleşik virülans faktörleri arasında kapsül, lipopolisakkarit, siderofor ve siller bulunur (Ares *et al*. 2016). Son yıllarda allantoin kullanımı, ek demir absorpsiyon mekanizmaları, akış pompaları ve tip VI salgılama sisteminin hepsinin virülans faktörleri olduğu keşfedilmiştir. Allantoin kullanımı, diğer demir alım sistemleri, akış pompaları ve tip VI salgılama sistemi son yıllarda virülans faktörleri olarak tanımlanmıştır. Allantoin kullanımı hipervirülent suşlarla tartışılacaktır. Bu genler, enfeksiyonun yoğunluğunu ve dolayısıyla enfekte eden suşun virülansını belirleme yeteneğine sahiptir. Ayrıca, belirli bir suşun patojenik potansiyelini tanımlayarak, kolonize edici bir suşun enfeksiyona ilerleme kabiliyetini de belirleyebilirler. *K. pneumoniae*'nin polisakkarit kapsülü, onun en kritik virülans faktörlerinden biridir. Öncelikle bakterileri opsonofagositozdan ve serum öldürmelerinden koruyarak enfeksiyon sırasında bağışıklık sisteminden kaçmaya yardımcı olmak için kullanılır (Opoku-Temeng *et al.* 2019). Kapsül, *K. pneumonia*e'deki kapsüler polisakkarit sentezi (kps) lokusu tarafından üretilir ve dış zara bağlı bakteri hücresinin dışında uzanan bir yapıdır. Üronik asitlerin yanı sıra dört ila altı şekerin tekrar eden alt birimlerinden oluşur. Serolojik testlere dayanarak, 77 kapsüler tip tanımlanmıştır. Moleküler tekniklerdeki son gelişmeler, tüm serotiplerde cps lokusunun tam sıralamasının yanı sıra *K. pneumoniae* tipleri arasında daha fazla ayrım yapılmasına yol açmıştır. Artan ayrımın bir örneği, cps lokusunun wzi genindeki allelik farklılıklara dayalı türleri tanımlayan wzi tiplendirmesinde görülmektedir. Bu yaklaşım başlangıçta standart serolojik *Klebsiella* tiplerine karşılık gelen 135 farklı wzi çeşidi buldu. Bu şekilde kapsül sentezi, çekirdek ve aksesuar genlerin bir kombinasyonu ile gerçekleştirilir (Opoku-Temeng *et al*. 2019).

Endotoksin olarak da adlandırılan lipopolisakkarit (LPS), gram negatif bakterilerin dış zarını dekore eden ana bileşendir. LPS, yaygın olarak bakteriyel septik şokun en etkili aracısı olarak tanınır. Konak, toll benzeri reseptör aracılığıyla LPS'yi algıladığında inflamatuar kaskadı başlatılır. Sepsis ve septik şokun ölümcül patofizyolojisinden LPS'nin kendisinden ziyade bu konak reaksiyonu sorumludur (Opoku-Temeng *et al*.

2019).

Kısaltılmış veya O-antijensiz (kaba LPS) *K. pneumoniae* izolatları serum tamamlayıcısına duyarlıyken, tam uzunlukta O-antijenli (pürüzsüz LPS) izolatlar serum tamamlayıcısına dirençlidir. LPS varyasyonları ayrıca bakterileri polimiksin ilaçları gibi antimikrobiyal peptitlerden koruyabilir. LPS, *K. pneumoniae*'nin dış zarının ana bileşeni olduğu için temel bir genom bileşeni olarak kabul edilir (Khaertynov *et al*. 2018).

Sideroforlar, bakteriler tarafından demir alımına yardımcı olmak için salınan yüksek afiniteli ve düşük moleküler ağırlığa sahip demir temizleyici moleküllerdir. *K. pneumoniae*, çok sayıda siderofor türü salgılar. *K. pneumoniae* tarafından salgılanan yaygın katekolatlardan biri, *K. pneumoniae* çekirdek genomunda kodlanan enterobaktindir. Enterobaktin yaygın bir siderofor olduğundan, kalıtsal bağışıklık sistemi, Enterobaktin'i bağlamanın bir yolunu geliştirerek bakterilerin demir alımını önler. Buna karşı koymak için bakteriler, yardımcı genomda kodlanmış çeşitli sideroforlar üretmiştir. İkinci bir katekolat siderofor, glukosile edilmiş Ent-türevi, salmochelindir (Sal). Kalıtsal bağışıklık sistemini aşmak için tasarlanmış bir savunma mekanizmasıdır. *K. pneumoniae* ayrıca yersiniabactin (Ybt) ve aerobaktin (Aer) gibi karışık tip sideroforlar salgılar (Khaertynov *et al.* 2018).

Çeşitli sideroforlar, farklı enfeksiyon bölgeleri ve yoğunluğu ile ilişkilidir ve patojenik rolleri, temel demir alımının ötesine geçer (Khaertynov *et al.* 2018). Ybt ilk olarak Yersinia türlerinde tanımlanmış olup, bu molekülün biyosentezini, taşınmasını ve düzenlenmesini kodlayan genler, "yüksek patojenite adası" olarak adlandırılan transpoze edilebilir bir kromozomal kesit üzerinde yer alır. Ybt'nin salınımı ve kullanımı insanlarda solunum yolu enfeksiyonları ile bağlantılıdır ve farelerde pnömoniye neden olmak için yeterlidir. *K. pneumoniae*, Aer enfeksiyonlarının da önemli bir virülans faktörü olduğu keşfedilmiştir. Aer sıklıkla plazmid kodludur. *K. pneumoniae* nüksü için demir sağlamanın yanı sıra, *K. pneumoniae* izolatları, yangı ve bakteri yayılımına neden olan sideroforlar salgılar. Demir şelasyonu ile aktive edilen konakçı transkripsiyonel düzenleyici protein HIF-la, pnömoniden bakteriyemiye gelişim için gereklidir. Bakterinin dış zarı yoluyla demir taşınmasını kontrol eden bir protein

olan TonB, siderofor sistemleri için sıklıkla gereklidir. TonB, *K. pneumoniae*'de bir virülans faktörü olarak işlev görür. TonB, bakteri kromozomundaki bir gen tarafından kodlanır. *K. pneumoniae* arasında korunur ve bu bakterilerde multilokus dizi tiplemesi için referans genlerden biri olarak hizmet eder (Jolley *et al*. 2012). Çekirdek genom Ent ve TonB'yi içerirken, tamamlayıcı genom Sal, Ybt ve Aer'i içerir.

Bakterilerin konak yüzeylere tutunması, enfeksiyona giden yolda hayati bir aşamadır. Bu, *K. pneumoniae*'de sıklıkla sil kullanılarak gerçekleştirilir. Siller, bakteri yüzeyinden uzanan ipliksi yapılardır. On metre uzunluğa ve bir ila on bir nanometre çapa kadar olabilirler. *K. pneumoniae* genellikle iki tür sil içerir: tip (bir) sil ve tip (üç) "*MrkD*" sil. İnsan mukozal veya epitelyal yüzeylere yapışma yetenekleri nedeniyle tip 1 siller'nin patojeniteyi teşvik ettiği düşünülmektedir. Tip 3 siller hücre yüzeylerine aynı şekilde tutunur, ancak bunların aynı zamanda biyofilm büyümesinin anahtar destekleyicileri oldukları da ortaya çıkarılmıştır. Çekirdek genomları *fim* ve *Mrk* sillidir. Her iki sil formunun da üriner kateterleri kolonize ederek kateterle ilişkili İYE'lere katkıda bulunduğu düşünülmektedir. *Fim* ve *Mrk* sillere ek olarak, *K. pneumoniae*, suş başına ortalama sekiz sil kümesi olan çeşitli başka türde sillere sahiptir. Gen frekanslarındaki farklılıklar nedeniyle, birçoğu aksesuar genomun bir parçası gibi görünmektedir (Di Martino 2003).

Efflux pompaları, İlginç bir şekilde, dışa akış pompası AcrAB, *K. pneumoniae*'nin neden olduğu murin solunum yolu enfeksiyonlarında virülansa katkı sağladığı da tespit edilmiştir. "Diğer bakterilerin, konakçının kalıtsal bağışıklık sisteminin önemli bir unsuru olan konakçı kaynaklı antimikrobiyal peptitlere karşı dirence aracılık etmek için akış pompalarını kullandığı gösterilmiştir (Jolley *et al.* 2012). Bu mekanizmanın *K. pneumoniae* patojenitesine katkıda bulunması muhtemeldir. İlk olarak Vibrio cholerae ile karakterize edilen tip VI salgılama sistemi (T6SS), farklı efektör kimyasalları ve toksinleri diğer hücrelere enjekte etmeye yardımcı olan bakteri hücre zarına şırınga benzeri bir mekanizmadır (Kapitein ve Mogk 2013). Çeşitli gram-negatif türlerde bulunan T6SS'nin hem diğer bakteri hem de ökaryotik hücreleri hedef aldığı, hem rekabette hem de hastalıkta ikili bir rol oynadığı gösterilmiştir. *K. pneumoniae* genomlarının biyoinformatik incelemesi, suş başına en fazla üç lokusta beklenen T6SS

gen kümelerinin varlığını ortaya çıkardı, ancak genlerin miktarı ve içeriği değişiklik gösteriyor. Daha yeni çalışmalar, *K. pneumoniae*'deki T6SS efektörlerini karakterize etmeye başlamıştır. Hipervirülent Kp52.145 suşunda, pnömoni modelinde virülans için fosfolipaz PLD1 gereklidir ve karbapenemaz üreten HS11286 suşunda fosfolipaz Tle1KP türler arası ve içinde türler arası öldürmeyi destekler ve antibiyotikler salgılanmasını indükler. T6SS salgılama sistemleri çekirdek ve aksesuar genomda mevcut gibi görünmektedir, kolonizasyon bölgelerinde diğer bakterilerle rekabeti teşvik etmekte ve enfeksiyon bölgelerinde uygunluğu geliştirmektedir (Kapitein ve Mogk 2013).

2.7 Antibiyotik Direncine Genel Bakış

Antibiyotik, bakterilerin büyümesini engelleyen veya durduran bir maddedir. 1923'te antimikrobiyal ilaçların keşfinden bu yana, birçok bulaşıcı hastalık ortadan kalkmıştır. Antimikrobiyaller genellikle temel metabolik bileşenlere yapışarak, fonksiyonel makromoleküllerin oluşumunu engeller veya normal hücresel aktivitelere müdahale ederek bakterileri öldürür (De Freitas Almeida ve Sundberg 2020).

Antibiyotikler çeşitli şekillerde işlev görür. Bazı antimikrobiyal ilaçlar, bakteri hücre duvarı üretimini engeller. Bu ajanlar, mono laktamlar ve -laktamaz inhibitörlerine ek olarak penisilinler (penisilin G, ampisilin ve metisilin), sefalosporinler ve karbapenemler gibi β-laktam kimyasallarını içerir. Laktamlar, murein üretiminde sondan bir önceki adımı bloke eder. Bilinmeyen bir mekanizma ile bu, murein hidrolazlarının hücreyi parçalamasına neden olur (Vilvanathan 2021). Glikopeptitler, vankomisin ve teikoplanin, hücre duvarı üretiminde ayrı bir fazı inhibe eden benzer bir antibiyotik kategorisinin parçasıdır. Diğer antibakteriyel ilaçlar, antibakteriyel etkilerini gerçekleştirmek için protein sentezini engeller. Aminoglikozitler, tetrasiklinler, makrolidler ve kloramfenikol gibi ribozom fonksiyonunun inhibitörleri bu kategoriyi içerir. Ayrıca kinolonlar, florokinolonlar ve sülfonamidler gibi antibiyotikler DNA sentezini azaltır. Direnç, bir mikroorganizmanın ilaçların veya antiseptikler ve debridman kimyasalları gibi diğer tedavilerin etkilerine dayanma kapasitesini ifade eder. Doğal olarak meydana gelen genetik mutasyon ve doğal seleksiyon süreci sayesinde

bakteri direnci ortaya çıkar. Söz konusu organizma, antibiyotik varlığında öldürme veya büyüme kapasitesi kazanabilir (Paterson 2020). Dört tip antimikrobiyal direnç mekanizması vardır Bunlar;

1- Antibakteriyel substratı bozan veya değiştiren enzimler.

2- Bir florokinolon hedefi olan DNA giraz gibi hedef bölge modifikasyonu.

3-Diğer süreçler tarafından ikame edilen metabolik yolları

4- Penetrasyon önleyici bariyer veya ajanı dışarıda bırakan akış pompaları (Reygaert 2018)

2.8 Akış Pompası

Bakteri hücrelerinin yanı sıra ökaryotik ve prokaryotik hücrelerin antibiyotikler ve diğerleri gibi toksik bileşenlere karşı direnci, akış pompa sistemleri adı verilen özel mekanizmalardan kaynaklanmaktadır (Marquez 2005). Akış pompaları, hücrelerin sitoplazmik zarlarında bulunan protein kompleksleridir. Zararlı maddeleri eleyerek hücre dışına atarlar. Akış pompaları, püskürttükleri malzemeler için oldukça seçicidir. Belirli bir hedefe yönelik farklı kompozisyonlar ve formlar içerirler. Fonksiyonel olarak bazı akış pompaları, diğerleri olmadan belirli bir antikoru pompalamakta uzmanlaşır ve bu durum antibiyotiklere karşı direncin bir kısmını açıklar (Webber 2002).

Bazı sistemler tarafından yayılan maddeler, yükleri, yapıları ve kimyasal işlevleri nedeniyle farklılık gösterir. Pozitif, negatif veya nötr yüklü olabilirler ve çözücüler gibi hidrofobik veya hidrofilik polaritede veya hem hidrofobik hem de hidrofobik kutuplara sahip amfoterik polaritede olabilirler (Pickwell 2013).

Bazı akış pompaları sadece antibiyotik akışıyla sınırlı olmayıp, bunun ötesinde boyaların, toksik maddelerin, dezenfektanların, sterilizatörlerin, kanser önleyici ilaçların, ağır metallerin, organik kirleticilerin ve doğal yan ürünlerin akışından sorumlu olabilirler (Blanco *et al.* 2016).

Ayrıca, antibiyotik direncinin mekanizmaları, hücre dışına atılmaları veya hücre içindeki konsantrasyonlarının azaltılması ile sınırlı değil, aynı zamanda antibiyotik direnç mutasyonlarının birikmesinin teşvik edilmesiyle de sınırlıdır (Sun *et al.* 2014). Akış pompalarının zararlı maddeleri dışarı atmadaki başarısına rağmen, bakterilerin birçok antibiyotiğe karşı dirençleri dünya çapında insanlar için yaşamı tehdit eden birçok hastalık suşunun oluşmasına neden olmuştur haline gelmiş (Du *et al.* 2018).

2.8.1 Bakteriyel akış pompası çeşitleri

Akış pompaları; yapısal özelliklerine, proteini oluşturan amino asitlerin sırasına ve enerji kaynağının yönüne göre beş ana gruba ayrılmıştır (Poole *et al.* 2007).

1- Büyük Kolaylaştırıcı Süper Ailesi.

2- Küçük Çoklu İlaç Direnç Ailesi.

3- Direnç Nodülasyon-Bölünme Ailesi.

4- Çoklu ilaç ve Toksin atıkları Ailesi.

5- ATP bağlayıcı Kaset ailesi.

İlk dört grup akış pompaları, bir enerji kaynağı olarak proteinlerin itici gücüne bağlıyken, son grup ABC ailesindeki ATP'nin hidrolizine bağlıdır (Poole *et al.* 2007).

2.9 β-Laktamaz Üreten *K. pneumoniae*

Bakterilerin β-laktam antibiyotiklere direnci, enfeksiyonları tedavi etmek için penisilin yaygın olarak kullanılmadan önce ortaya çıkmıştır. Alexander Fleming, *E. coli* ve diğer bakterilerin penisilin tarafından inhibe edilmediğini ifade eden ilk kişiydi, bu direnç daha sonra bu bakteriler tarafından üretilen bir enzime atfedildi. β-laktam antibiyotiklere direnç, antibiyotik β-laktam halkasının β-laktamazlar tarafından hidrolizi yoluyla elde edilir.

K. pneumoniae'de, enzim türün çekirdek genomunda kodlandığından, bazı β-laktamlara direnç yerleşiktir. Örneğin, SHV sürekli olarak kromozomda bulunur ve buna karşılık gelen ampisilin direnci türün ayırıcı edici özelliktir (Rice *et al.* 2012). Diğer β-laktamazlar aksesuar genomun bir parçasıdır. 1960'larda ilk plazmit aracılı β-laktamaz, TEM-1, *E. coli*'de keşfedildi. *K. pneumoniae*'nin, çoğu penisilin antibiyotiğine direnç kazandıran AmpC enzimleri gibi plazmit aracılı β-laktamazları da barındırdığı bilinmektedir. β-laktamaz enzimlerinin, ortamdaki seçici basınç nedeniyle penisilin bağlayıcı proteinlerden evrimleştiği değerlendirilmektedir (Rice *et al.* 2012).

2.10 Genişletilmiş Spektrumlu β-Laktamazlar

İmipenem, ertapenem, meropenem ve doripenem gibi karbapenemler, GSBL'ler dahil çoğu β-laktamaza daha dirençli olduğundan, en güçlü β-laktam antibiyotiklerdir. Bu β-laktam, penisilin benzeri beş üyeli halkanın C-1'inde kükürt veya oksijen yerine bir karbon atomunun yanı sıra C-6'da bir trans hidroksietil grubuna sahip olmasıyla diğerlerinden farklıdır (Wiley *et al*. 2007).

Karbapenemler, dış zardan artan penetrasyon güçleri, β-laktamazların etkisine karşı dikkate değer stabiliteleri ve neredeyse tüm PBP'ler için geliştirilmiş afiniteleri nedeniyle Gram-pozitif, Gram-negatif, aerobik ve anaerobik mikroplara karşı etkilidir. Sadece *E. coli, K. pneumonia* ve *P. aeruginosa*'nın neden olduğu zor enfeksiyonlar karbapenemlerle tedavi edilebilir, bu nedenle yaygın olarak kullanılmazlar. MRSA, *E. faecium* ve *Burkholderia cepacia* dahil olmak üzere birçok Gram negatif aerobik çubuk, karbapenemlere dirençlidir (Wiley *et al.* 2007).

Genişletilmiş spektrumlu β-laktamazlar (GSBL), aksesuar genomun bir parçası olan plazmit bazlı direnç mekanizmalarıdır (El Salabi *et al.* 2013). ESBL üreten *K. pneumoniae* 1983 yılında Avrupa'da ve 1989 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde keşfedilmiştir. ESBL'ler, 3 üncü kuşak sefalosporinler ve aztreonam gibi oksiiminosefalosporinleri hidrolize edebilir, klavulanik asit tarafından inhibe edilir. Sıklıkla β-laktamazları kodlayan plazmitler, ağır metallerin yanı sıra diğer antibiyotiklere karşı da direnç genlerine sahiptir. Dolayısıyla, ESBL'ler, içinde

bulundukları suşun uygunluğunu artırabilecek diğer aksesuar genlerle sıkı bir şekilde bağlantılıdır. Ayrıca, plazmit bazlı direnç mekanizmaları, farklı bir aksesuar genoma sahip olabilen spesifik soylarla bağlantılıdır. Örneğin, son zamanlarda yapılan bir çalışma, *K. pneumoniae* klonal grup 307'nin (CG307) ESBL enfeksiyonları ile ilişkili olduğunu tanımlamıştır. Karbapenemler tipik olarak ESBL üreten bakterilerin neden olduğu ciddi enfeksiyonları tedavi etmede tercih edilen ilaç olmuştur (Wiley *et al.* 2007).

2.11 Biyofilm

Biyofilm, bir alt tabakaya, arayüze veya birbirine bağlı hücrelerle karakterize edilen, hücre dışı bir polimerik malzeme matrisine daldırılmış ve çoğalma, gen ifadesi ve protein üretimi açısından değiştirilmiş bir fenotip sergileyen mikrobiyal olarak türetilmiş bir topluluktur (Donlan ve Costerton 2002). Biyofilm üretimi, çeşitli biyotik ve abiyotik yüzeylere bakteriyel yapışmayı sağlar, sert çevresel güçler (örneğin, konakçı bağışıklık tepkileri veya antibiyotikler) karşısında bakteri topluluğunun uyum kabiliyetini iyileştirir ve patojenin çıkarılmasını daha da zorlaştırır (Toth *et al.* 2007). Biyofilmlerin sahip olduğu bu özellikler, bazı durumlarda benzersiz sütun, mantar veya değişik şekillerde yapılar oluşturmasına neden olabilir. Biyofilm kalınlığı, tek bir hücre katmanından, viskoz bir polimerik matris ile kaplanmış önemli bir topluluğa kadar değişebilir (Costerton *et al.* 1999). Biyofilmin en derin katmanlarında bile, karmaşık kanal ağları bu karmaşık yapıların içinden geçerek hayati besinlere bir miktar erişim sağlar. Kalıcı enfeksiyon için biyofilm üretimi gerekli olmasa da biyofilmlerin temizlenmesi zordur ve sıklıkla cerrahi müdahale gerektirir. Abiyotik yüzeylerde, birkaç bakteri türü biyofilm üretebilir (Muhammad 2020).

Bir stafilokok için in vitro koloni biyofilm modelinde dört metabolik aşama gözlemlenir. Bunlar; aerobik, fermentatif, uykuda (çok yavaş gelişen hücreler ve kalıcılar içerir) ve ölü olarak sıralanmaktadır. Üst hava oksijen açısından zengin arayüze ve alt kısımda sıvı-besin açısından zengin arayüze maruz kalan hücreler metabolik olarak aktifken, hücrelerin çoğu inaktif ve anoksik koşullardadır (Rani *et al.* 2007). Bu nedenle, çeşitli hücre duvarı ile ilişkili proteinlerle biyofilm protein ekspresyonunun

değişkenliği ortaya çıkar. Bunlara bağlı olarak hücre düzeyinde diferansiyel ekspresyon saptandığında biyofilm nedeniyle ekspresyonun hücre kümelerinde değiştiği tespit edilmiştir (Brady *et al.* 2007). Karbon, nitrojen ve fosfat gibi çevresel besinler hücre dışı matris tarafından tutulabilir ve konsantre edilebilir (Touhami *et al.* 2004). Konak ve sentetik kaynaklar tarafından üretilen sayısız temizleme mekanizmasından kaçınma yeteneği, biyofilm geliştirmenin diğer bir avantajıdır. Biyofilmleri ortadan kaldırmak için uygulanan antimikrobiyal ve kirlenme önleyici kimyasallar, kesme gerilimi, konak fagositik eliminasyonu, konak radikal ve proteaz savunmalarının tümü başarısız temizleme tekniklerine örneklerdir. Antimikrobiyal dirence, anoksik bir ortama adaptasyon ve gıda kısıtlaması ile oluşturulan uykuda bir fenotip aracılık eder, bu da düşük metabolik seviyelere ve büyük ölçüde azaltılmış hücre bölünme oranlarına neden olur. Bu stresli ortam, yüksek miktarda antibiyotiğe dirençli çok sayıda yavaş büyüyen hücrenin yanı sıra az sayıda kalıcı hücre yani toplam popülasyonun %1'inden azını oluşturur (Touhami *et al.* 2004).

Tohum yayma veya hücresel ayrılma kapasitesi, biyofilm büyümesinin nihai avantajıdır. Mikro koloniler, sıvı mekanik kesme gerilmelerine veya tohum yayılmasını kolaylaştıran genetik olarak belirlenmiş bir reaksiyona tepki olarak ayrılabilir (Boyd ve Chakrabarty 1994). Ayrılmış mikro koloniler, ilk biyofilm topluluğundan konağın enfekte olmayan kısımlarına seyahat eder, yapışır ve metastatik bir kanser hücresi gibi yeni oluşan biyofilm üretimini uyarır. *S. aureus* gibi hareketsiz bakteriler için geçerli olmayan, yapışan mikro koloniden tek, hareketli hücrelerin hareketi ile tohum dağılımına aracılık edilebilir (James *et al.* 2008). Sonuç olarak, bu durum antimikrobiyallere ve konakçı bağışıklık tepkisine dirençli, uzun süreli bir bakteri kaynağı popülasyonunun yanı sıra bakteriyel çoğalmaya yardımcı olmak için sürekli dökülme sağlar.

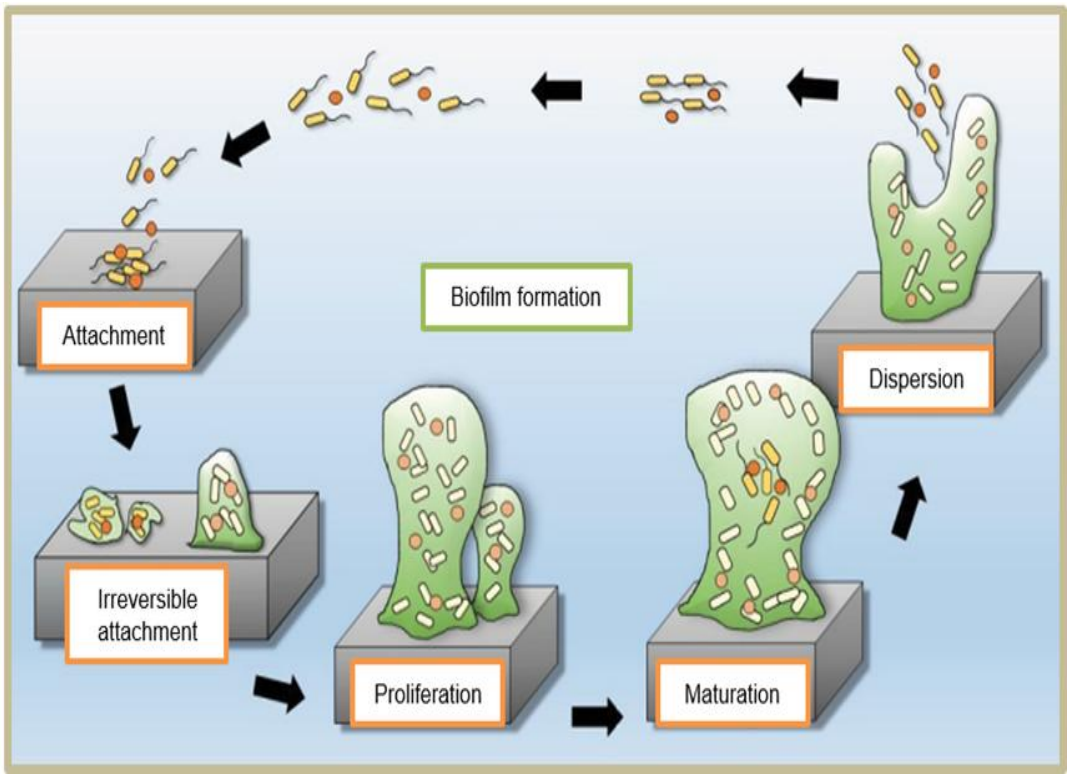
Biyofilm, hücre dışı bir polimerik malzeme matrisine (EPS) daldırılırken bir yüzeye yapışan ve yapılandırılmış bir mikrobiyal popülasyondur (Karygianni *et al.* 2020). EPS'de ekzopolisakkaritler, nükleik asitler (hücre dışı DNA ve eRNA), lipidler, proteinler ve diğer makromoleküller bulunur. Biyotik ve abiyotik yüzeylere mikrobiyal yapışma, hücre dışı polimerik maddeler tarafından desteklenir. Biyofilm matrisi,

fermente olabilen polisakkaritler gibi farklı biyomoleküller için yerel bir beslenme deposu olarak önemli bir kimyasal işleve sahiptir (Reid *et al.* 2001)

Daha sonra, in vitro çalışmalar, *K. pneumoniae*'nin yaklaşık %40'ının sadece idrardan değil, aynı zamanda balgam, kan ve yara sürüntülerinden de izole edildiğini ve İYE'den muzdarip kateterize hastaların idrar numunelerinden *K. pneumoniae* izolatlarının yaklaşık % 63'ünün in biyofilm üretebileceğini kanıtladı.

Son zamanlarda, ventilatörle ilişkili pnömoniden muzdarip hastaların endotrakeal tüplerinden izole edilen *K. pneumoniae* suşlarının büyük bir kısmının in vitro biyofilm oluşturabileceği gösterilmiştir. Atomik kuvvet ve yüksek vakumlu kullanılarak, abiyotik yüzeylerde biyofilm büyümesinin 40 °C'de 35 °C'ye göre daha tutarlı olduğu tespit edilmiştir (May *et al.* 2014).

İlk bağlanma, olgunlaşma (çoğalma, göç, olgunlaşma) ve son ayrılma veya dağılma, biyofilm gelişiminin üç ana aşamasını oluşturmaktadır. Yerleştirmeden kısa bir süre sonra implant yüzeyini kaplayan konakçı matris proteinleri, ilk yapışmadan sorumludur (Otto 2008). Sonuç olarak, mikrobiyal yüzey bileşenleri, matriks proteinlerini algılayabilir ve bunlara bağlanabilir, bu da bakterilerin kolonize olmasına izin verir. Bunu takiben, biyofilm yapışkan proteinler ve ekzopolimerlerin aracılık ettiği hücreler arası agregasyon nedeniyle olgunlaşır ve üç boyutlu bir görünüm alır. Son olarak, tek hücreler veya hücre kümeleri, biyofilm yapısından ayrılarak, konağın farklı kısımlarını yaymalarına ve kolonize etmelerine izin verir (Şekil 2.1) (Ning *et al.* 2019).



Şekil 2.1 Biyofilm gelişiminin aşamaları (Moormeier ve Bayles 2017)

2.12 Moleküler Tanımlama

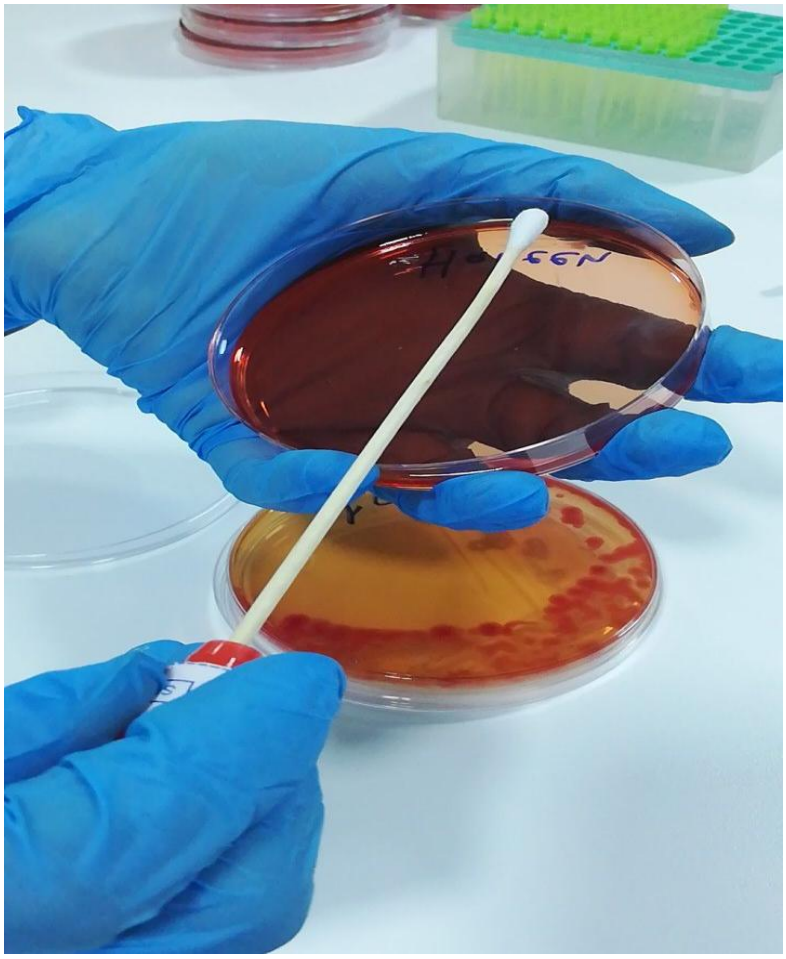
Son yıllarda, farklı mikrobiyal taksonların karakterizasyonunu ve filogenetik sınıflandırmalarını sağlayan bir dizi moleküler belirteç tanımlanmıştır. Filogenetik belirteçler, spesifik protein kodlayan veya yapısal genlerin katılımını, belirli genlerin ve bunların varyantlarının kombinasyonunu, elementlerin eklenmesi ve tekrarlanmasını içermektedir (Srinivasan *et al.* 2015).

Bakteriler ayrıca türleri ayırarak ve fenotipik özelliklerini, özellikle morfolojik kültür ve biyokimyasal etkileşimler için kriter olan gram boyama ile tanımlanırlar (Woo *et al.* 2003). Bununla birlikte, bu geleneksel yöntemlerin bazı dezavantajları vardır. Birincisi, zaman alıcı ve zordur. İkincisi, birçok bağlamsal koşuldan kaynaklanan kültürel farklılıklar belirsiz sonuçlar sağlayabilir. Üçüncüsü, tanımlamanın bozulmamış bir kültüre ihtiyacı vardır, bu da mikroorganizmaların tanımlanmasını zorlaştırır ve çoğu zaman imkânsız hale getirir (Tshikhudo *et al.* 2013). Ek olarak, fenotipik modeller, aynı

türün bireyleri arasında görülen değişen özellikleri hesaba katarak, tekrarlanan deneylerde zayıf doğrulukla sonuçlanabilir (Brisse *et al.* 2002). Fenotipik tekniklere dayalı bir filogenetik ağaç oluşturmak, çok sayıda değişken özelliklerin karşılaştırmasını içerdiğinden ve fenotipik metodolojiye dayalı kladistik çalışmalar yürütmek zor olduğundan daha zor olabilir. 16S rRNA geni türler arasında ve aynı cinsin türleri içinde yüksek oranda korunduğundan, bakteri türlerini tanımlamak için alternatif bir yöntem olarak kullanılabilir (Mukhtar *et al.* 2018). Genotipik bakteri tanımlaması, PCR ürününde karşılık gelen gen (ler)in nükleotid dizi analizi ile başlar, ardından veri tabanında tanınan dizilerle bir karşılaştırma yapar (Mukhtar *et al.* 2018). Son zamanlarda, araştırmacılar bakterileri tespit etmek için moleküler testlere yönelmiştir Direnç geni *MrkD*'nın saptanmasını ve ayrıca gen ekspresyonunun çalışmasını içeren bakterileri saptamak için de PCR kullanılmaktadır (Noor 2019).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu araştırma, Nisan 2022 ile Eylül 2022 arasındaki dönemde Irak'ın Bağdat Vilayetinde yapılmış olup, Bağdat'taki El-Kadhimiya Hastanesi'ne başvuran hastalardan (9-11 yaş arası 100 erkek çocuk) toplamda 100 idrar örneği alınmıştır. İzolatlar tanısı konvansiyonel biyokimyasal testlerin yanı sıra MacConkey agar, nutrient agar, morfolojik ve kültürel özelliklerine göre konulmuştur (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 MacConkey Agar'da *K. pneumoniae* ve ayrıntıları

3.1 Kültür ve Ortam

Bu araştırmada bakteriyolojik kültür besiyeri kullanılmıştır.

3.1.1 MacConkey Agar Ortamı

52 g kuru besiyeri tartılıp bir kaba konulduktan sonra bir litre distile su içinde bir litre MacConkey agar yapmak için çözülür. 10 dakika dinlendirildikten sonra 1 dakika kaynayıncaya kadar düzenli karıştırılarak ısıtılır. Bundan sonra 20 dakika boyunca 121°C'de bir otoklavda sterilize edilir. Otoklavdan çıkarılır ve steril petri kaplarında laminer akış davlumbazı içinde veya Bunsen beki önünde 45°C'ye kadar soğumaya bırakılır. Kullanıma hazır olana kadar 2-8°C'de ters çevrilmiş bir plaka tutucuda sertleşmesine izin verilir. Proteus cinsinin terlemesini durduran MacConkey agar elde etmek için düşük tuzlu MacConkey agar kullanılır (Wallace *et al.* 2010).

3.1.2 Nutrient Agar

1 litre distile suda çözülmüş 28 g besleyici agar tozu, tüm bileşenleri uygun şekilde çözmek için karıştırılarak ısıtılır. Çözünmüş karışımı 121 santigrat derecede 15 dakika otoklavlanır. Daha sonra agarın soğuması sağlanır ancak otoklavlamadan sonra sertleşmemesine dikkat edilmelidir. Her plaka besin agarla doldurulur ve agar sertleşene kadar steril bir yüzeyde bekletilir.

3.1.3 Kan agarı

Agarının üretici firmanın talimatları doğrultusunda 15 dakika boyunca 121°C'lik bir sıcaklıkta otoklav ile steril edilir. Daha sonra Kan agar içeriği 50°C'de bir su banyosuna aktarılır ve ortam eklenir. Ortam soğutulduğunda, oda sıcaklığında kan eklenir (kanın iyi sterilize edildiğinden emin olmak için sterilizasyon filtrelenerek yapılır). Sterilize edilmiş kan agarını inkübe etmek için her tabağa 15 mL dökülür. Nem kaybını önlemek için 2 ile 8 santigrat derece sıcaklıkta, tercihen plastik torbalarda 4 hafta boyunca bozulmadan saklanabilir.

3.2 Mikroskopik İnceleme

K. pneumoniae şekil olarak basildir. kapsüllü, fermantasyon yapabilen bir bakteri turudur. oyuncu hareketi olmayan Genellikle Gram boyamadan sonra mikroskobu MacConkey agarda mukoid laktoz fermenter.

3.3 Biofilm Oluşum Analizi

50 numune test edildi, *K. pneumoniae* izolatı mikrotitre plakası (MTP) yöntemi ile biyofilm oluşturma yetenekleri açısından kantitatif olarak taranmış ve (Christensen *et al*. 1985) tarafından modifiye edilmiştir.

Biyofilm oluşum analizi aşağıdaki basamaklar takip edilerek gerçekleştirilmiştir;

- 96 mikroplakada biyofilm kültürü: Plakanın çukurcukları, 180 µL Brain heart infusion (BHI) ile dolduruldu. Daha sonra, her bir çukurcuğa 20 µL ayarlanmış 0,5 McFarland bakteri süspansiyonu ilave edildi.
- İnoküle edilen plaka kapakla kapatıldı ve aerobik olarak statik koşullar altında 37 °C 24 saat inkube edildi.
- İnkübasyondan sonra plak üç kez distile su ile nazikçe yıkandı ve oda sıcaklığında 15 dakika kurumaya bırakıldı.
- Plaka, oda sıcaklığında 15 dakika boyunca 200 µL %0,1 kristal viyole çözeltisi ile boyandı.
- Fazla boya distile su ile yıkandı
- Plaka 20 dakika boyunca kurutuldu.
- Yapışık hücre 200 µL %95 etanol ile çözündürüldü.
- Her bir çukurcuğun optik yoğunluğu, mikroplaka okuyucu kullanılarak 630 nm'de elde edildi.

3.4 Mikrotitre Plakasında Biyofilm

Üretilen biyofilm, önceki testten elde edilen oyukların destain'ini gidermek için 250 µL etanol-asetik asit (95:5 hacim/hacim) eklenerek nicelendirildiği, ardından her bir oyuktan 100 µL yeni bir mikrotitre plakasına aktarıldı ve optik yoğunluk (OD) çözeltinin 630 nm dalga boyunda bir mikrotitre plaka okuyucusu kullanılarak ölçüldü (Şekil 3.3).

3.4.1 Biyofilm

Verilerin basitleştirilmesi ve hesaplanması için bireyler için elde edilen OD değerlerine dayalı olarak Çizelge 3.1 'de özetlenen bakteri yapışmasının sınıflandırılması kullanılmıştır (Şekil 3.2).

Negatif kontrolü (OD) belirlemek için aşılanmamış ortam kontrol olarak kullanıldı. Sınır değer (ODc), negatif kontrolün ortalama OD değeri+3×negatif kontrolün standart sapması olarak hesaplanmıştır. Deney her bir suş için ayrı ayrı üç kez tekrarlanmış ve ortalama değerler standart ile hesaplanmıştır **(**Şekil 3.2, Şekil 3.3).

Çizelge 3.1 Mikrotitre plaka yöntemi ile bakteri yapışmasının sınıflandırılması (Atshan *et al.* 2012)

ORTALAMA OD	BİYOFİLM YOĞUNLUĞU
OD <= ODc*	Yapışkansız
2ODc> OD> ODc	Zayıf
4ODc> OD> 2ODc	Orta
OD > 4 ODc	Güçlü

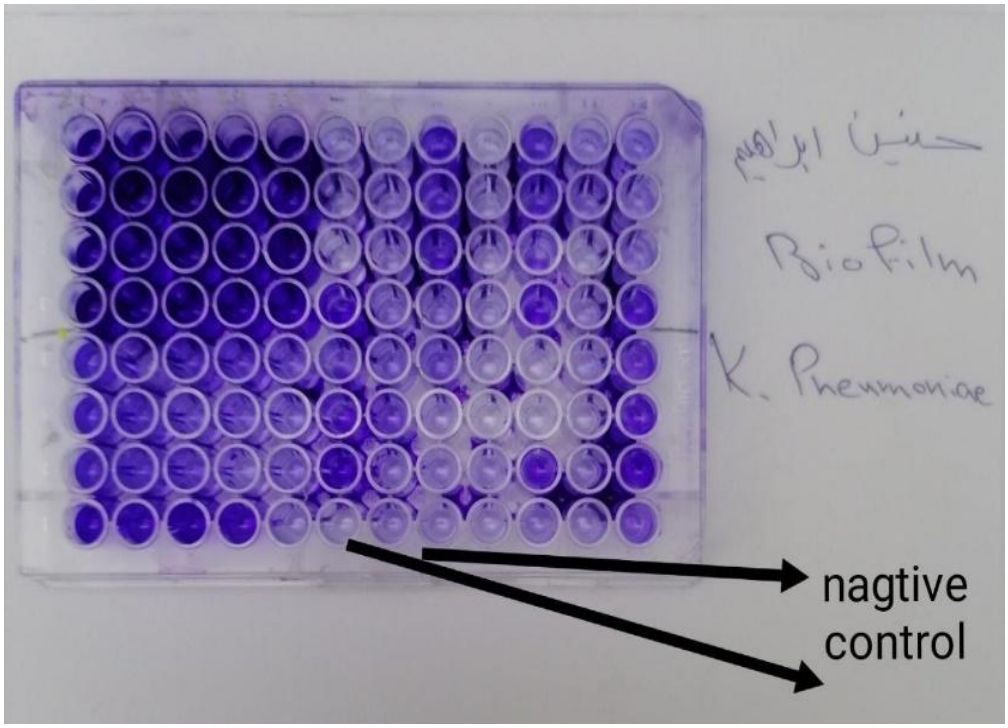
* Cut-off (ODc)= negatif kontrolün ortalama OD'si + (3*Standart Sapmalar)

ODc tüm bakteri izolatları ve negatif kontrol için biyofilm oluşturma kapasitesi hesaplandıktan sonra oluşturulmuştur (Çizelge 3.2). Negatif kontrolün ortalama OD'sinin üzerinde üç standart sapma (SS) olarak tanımlanır.

Cut-off = 0.197 (kontrol OD 630 artı 3* standart sapmanın ortalaması olarak tanımlanır)

Çizelge 3.2 Bu çalışmanın tahmini cut-off değerine bağlı biyofilm yoğunluğu

BİYOFİLM YOĞUNLUĞU	OD 630 LİMİT
1- biyofilm üreticisi olmayan	197<0
2-zayıf	394-0.1970
3-orta	788-0.3940
4-güçlü	788>=0



Şekil 3.2 Biyofilm plakası



Şekil 3.3 Otomatik ELISA Okuyucusu PKL PPC 230.

3.5 Kimyasal ve Biyolojik Materyal

Çizelge 3.3 ve 3.4'de yukarıda bahsedilen öğeler ve ekipman durumu özetlenmiştir.

Çizelge 3.3 Araştırmada kullanılan kimyasal ve biyolojik araçlar ve aletler

ALETLER	ŞİRKET ADI
Manyetik Karıştırıcı	Gallenkamp/İngiltere
Etil Alkol %70	Tiebah/Irak
Kristal Viyole	Denkapharma/Almanya
Biopette Değişken Hacim 2-20 µL	Almanya
Biyolojik Tehlike Güvenlik Kabini Sınıf II B	Genex/ABD
Mikropipet	Brand/Almanya
Mikrodalga	Gosonic/Çin
Bileşik Işık Mikroskobu	Olympus/Japonya
Otoklav	Express/Almanya
Damıtıcı	GFL/Almanya
Hassas Terazi	GFL/ İngiltere
Terazi	Kernpfb/Almanya
İnkübasyon	Jrad/Çin
McFarland Tüp No.5	Biome'rieux/Fransa
Tahta Çubuk	Biozoek/Hollanda
Agaroz	Conda/ABD
Kırmızı Güvenli Boyama Çözeltisi	Intron/Kore
6X Yükleme Boyası	Intron/Kore
Marker 100 bp	Intron/Kore
Ön Karıştırma PCR	Intron/Kore
TBE buffer 10 X	Conda/ABD
Astar	Alpha DNA/ABD/Kanada

Çizelge 3.4 Bu çalışmada kullanılan diğer malzemeler

NO	ŞİRKET	MENŞEİ	APARAT
1	Euroclone	İtalya	AURA TM PCR Kabin
2	Bio San	Almanya	Microspin 12, Yüksek Hızlı Mini Santrifüj
3	Digsystem	Almanya	V-1 Plus, Tüpler İçin Kişisel Vorteks
4	Bio San	Almanya	Bio TDB-100, Kuru Blok Termostatlı
5	Labnet	Almanya	Değişken Hacimli Biyopet 2-20 mL 0,5-10 mL 20-200 mL 10-100 mL 100-1000 mL
6		Çin	Mini-Güç Kaynağı 300V, 2200V
7	Labnet	ABD	Multigeneoptimax Gradyan Termal Döngüleyici
8	CBS, Scientific	ABD	Elektroforez
9	Labnet	ABD	Belge Sistemi
10	Vilber Lourmat	Fransa	UV İletimi
11	Biosan	Litvanya	Mikrospin
12	Biosan	Litvanya	Kombi-Spin
13	Kernpfb	Almanya	Terazi

3.5.1 Sterilizasyonlar

Hazırlanan ve sentetik besiyerleri 121 °C sıcaklık ve 15 kg/inç basınçta 10-15 dakika süreyle üretici firmanın talimatlarına göre otoklavlanmıştır. Daha sonra 37°C 18 saat boyunca bir kapta tutularak, kullanılana kadar buzdolabında saklanarak kontaminasyondan arındırılmıştır.

3.5.2 Biyokimyasal test

Çalışma izolatlarını teşhis etmek için biyokimyasal testler kullanıldı. Bu testler aşağıda açıklanmıştır.

3.5.2.1 Katalaz testi

Katalaz enzimini tespit etmek için %3'lük bir konsantrasyonda hidrojen peroksit çözeltisi H_2O_2 kullanılmistir. Reaktif %2 5 ile 88 mL damıtılmış su konsantrasyonunda 12 mL H_2O_2 ilave edilmistir ve kullanılana kadar 4°C'lik bir sıcaklıkta steril bir şişede tutalarak muhafaza edilmistir.

3.5.2.2 Oksidaz testi

Filtre kağıdına % 1 sulu tetrametil-para-fenilen diamin dihidroklorür çözeltisi uygulamistirı. Bakteri kültürlerini filtre kağıdına yaymak için bir cam çubuk kullanıldı. Mor koyu rengin ortaya çıkması kültür oksidazın pozitif olduğunu gösterdi.

3.5.2.3 Üreaz testi

Test, üre ortamına sürme yöntemiyle katı MacConkey ortamı üzerinde büyüyen bakterilerin aşılanmasıyla gerçekleştirilir. Bu işlemden sonra 37°C'de 48 saat inkübasyon yapılır. Ortamın renginin pembeye dönmesi, besiyerinde bulunan fenol kırmızısı reaktifinin rengindeki değişiklikten dolayıdır. Bu durum testin pozitif olduğunun kanıtıdır ve üreaz enziminin varlığını gösterir (Forbes 2007).

3.6 DNA Analizleri

3.6.1 DNA Ekstraksiyon Protokolü

Genomik DNA ekstraksiyonunu gerçekleştirmek için uygulanacak olan aşamalar aşağıda belirtilmiştir. Bu aşamalarda kullanılacak kimyasal maddeler de Çizelge 3.5'da gösterilmektedir (Şekil 3.4).

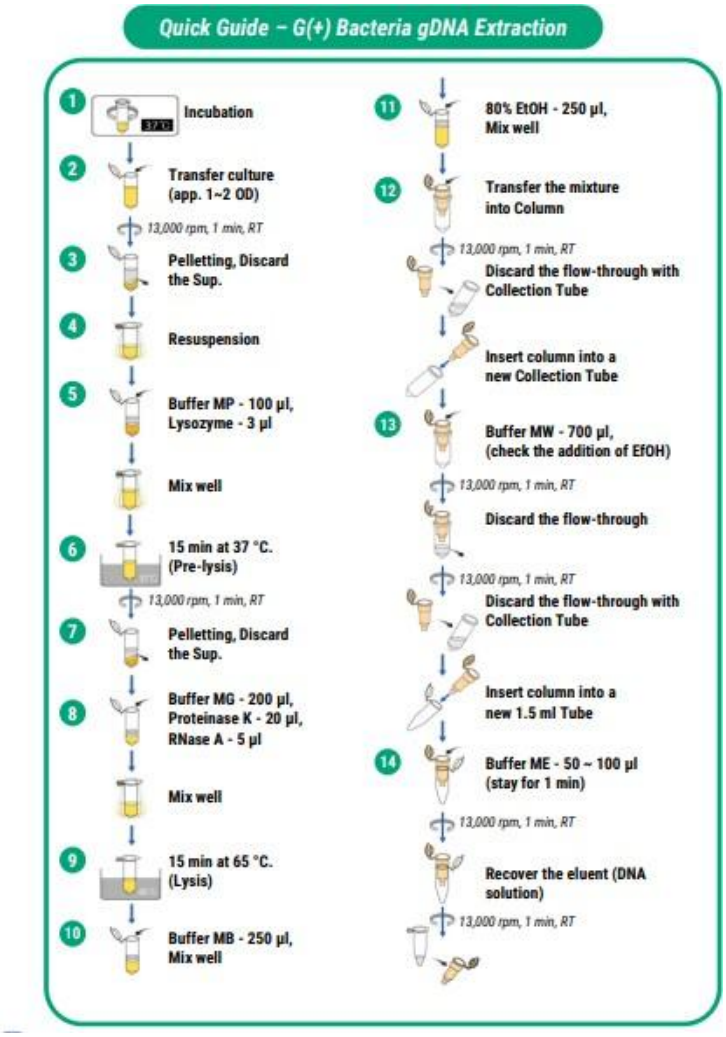
- Pelet bakterileri 1 dakika süreyle 13.000 rpm'de santrifüj edildi, ardından 50 mL süpernatant dışında tümü atılarak kalan süpernatant tekrar vorteksleme yoluyla

süspanse edilmistir.

- Numune tüpü 100 mL Tampon MP ve 3 mL lizozim çözeltisi ile doldurulduve 30 saniye boyunca vortekslendi. Daha sonra pipetlenerek yeniden süspanse edildi.
- Elde edilen izolat 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- İzolat oda sıcaklığında 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlendi ve süpernatant atıldı. Tüm sıvının uzaklaştırıldığından emin olundu. Daha sonra hücre peleti tamamen parçalanana kadar vortekslenerek veya dokunarak yeniden yerleştirildi.
- 200 mL Buffer MG, 20 mL Proteinaz K ve 5 mL RNase A solüsyonunu numune tüpüne yerleştirildi ve yeniden süspanse etmek için hızla vortekslendi.
- Lizat 65°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- Tam lizizden sonra lizata 250 mL Buffer MB eklendi ve pipetleme veya hafifçe ters çevirerek 5 ile 6 kez karıştırıldı.
- Lizata 250 mL %80 etanol eklendi ve pipetleme yapılarak veya hafifçe ters çevrilerek 5-6 kez karıştırıldı.
- Döndürme kolonunda bulunan toplama tüpüne 8 adımdaki karışımdan 750 mL pipetlendi. Akış ve toplama tüpleri çıkarıldı ve 1 dakika boyunca 13.000 rpm'de (RT) santrifüjlendi.
- Döndürme kolonu yeni 2,0 mL'lik bir toplama tüpüne aktarıldı. 700 mL Buffer MW eklendi ve 1 dakika 13.000 rpm'de santrifüjlendi. Membranı kurutmak için akış çıkarıldı ve 1 dakika daha santrifüjlendi.
- DNA'yı ayrıştırmak için, doğrudan kolon matrisine 50 µL Tampon ME ilave edildi ve 1 dakika boyunca 13.000 rpm'de santrifüj edildi.

Çizelge 3.5 DNA ekstraksiyonu için kullanılacak kimyasallar

No	İçerikler	50 sütun
1	Tampon MYP (Yeast Pre-Lysis Buffer için)	12 mL ×1
2	Tampon MP (Lizis Öncesi Tampon)	7 mL ×1
3	Tampon MG	15 mL ×1
4	Tampon MB	15 mL ×1
5	Tampon MW (Konsantrasyon)	10 mL ×1
6	Tampon ME	20 mL l ×1
7	Döner Kolon (Mavi Renkli O-Ring)	50 Sütun
8	Toplama Tüpü	100 tüp
9	RNaz A liyofilize	6 mg ×1 tüp
10	Proteinaz K liyofilize	12 mg ×1 tüp
11	Lizozim liyofilize	30 mg ×1 tüp
12	Manuel	1



Şekil 3.4 Tüm DNA ekstraksiyon yöntemlerinde yeralan temel adımlar

3.6.2 DNA'nın agaroz jel elektroforezi

Elektroferez, PCR'nin agaroz jeli üzerindeki etkileşiminin sonucunun demet boyutunu ayırt etmek için ekstraksiyon işleminden sonra DNA parçalarını belirlemek veya standart DNA varlığında PCR etkileşiminin sonucunu saptamak için uygulanmıştır (Şekil 3.5).

3.6.3 Agaroz jelin hazırlanması

- 1,5 g agaroz tozu 100 mL'lik bir balonda 100 mL 1x TBE içinde çözülerek, sıcak bir blokta agarozun çözelti berraklaşıncaya kadar eritilmesi ve daha sonra eşit soğutma sağlamak için şişenin düzenli olarak döndürülmesiyle agaroz çözeltisi oluşturuldu.
- Isıtılmış jele 3 mL kırmızı boya eklendikten sonra döküm tepsisinin uçlarını kapatmak için iki kalınlıkta bant kullanıldı.
- Taraklar jel döküm tepsisine yerleştirildi.
- Döküm tepsisi erimiş agaroz solüsyonu ile dolduruldu.
- Jelin içine konulduğunda elektroforez TBE (1x) tamponu ile dolduruldu ve agarozun oda sıcaklığında sertleşmesi için eklendikten sonra tarak nazikçe çıkarılıldı.
- DNA örnekleri
- (5 mL) üzerine 3 mL DNA yükleme tamponu eklenerek agaroz jel kuyularına konuldu.
- Agaroz jel elektroforezi 70V, 65Amp'de 1 saat çalıştırıldı.
- Daha sonra elde edilen DNA, bir UV transillüminatör kullanılarak incelendi.

3.6.4 DNA'nın Yüklenmesi

DNA (5 mL), elektroforez için yükleme boyası (3 mL) ile birleştirildikten sonra jel kuyucukları doldurulduu. Ekstraksiyondan sonra DNA bantlarını ve PCR ile virülans geninin saptanmasından sonra PCR ürününü gözlemlemek için elektroforez 1 saat ve 70

volt çalıştırıldı. Negatif elektrotlardan pozitif elektrotlara aktarılan DNA ve PCR ürünü ve jel üzerindeki DNA bantları, UV transillüminatör (537 nm) aracılığıyla görüntülenidi

3.6.5 Primer çözeltisi

10 pmol/L'lik Alfa DNA primer konsantrasyonu yapmak için,10 litre stok çözeltisi 90 litre serbest ddH_2O su içinde çözülür ve daha sonra elde edilen çözelti 100 litrelik bir hacme dönüştürmek için filtrelendi. Daha sonra, primerler kurutularak 100 pmol/L'lik bir nihai konsantrasyon elde etmek için elde edilen 100 litrelik stok çözeltisi içinde çözüldü.

3.6.6 Çalışmada Kullanılan Primerler

Hedef gen primer 10 pmol konsantrasyonda hazırlanmıştır. Çizelge 3.6, Çizelge 3.7 ve Çizelge 3.8 sırasıyla primerlerin dizisini, Maxime PCR PreMix kitini ve PCR'nin Reaksiyon bileşenlerini göstermektedir. Primerler liyofilize edilmiş, stok çözelti olarak 100 pmol/µL'lik nihai bir konsantrasyon verecek şekilde serbest ddH2O içinde çözülmüş ve iş primeri askıya alındığında 10 pmol/µL konsantrasyon hazırlamak için stoku -20 °C'de tutup, 100 µL nihai hacme ulaşmak için 90 µL serbest ddH2O su içinde 10 µL stok solüsyonu (Alph DNA/ABD/Kanada) tarafından araştırılmıştı (Vuotto *et al.* 2014) .

Çizelge 3.6 Genin primer dizisi *MrkD*

PRİMER	DİZİN	TM (C°)	GC (%)	ÜRÜN BOYUTU
Forward	5'-GTTAACGGCGGCCAGGGCAGCGA- 3'	80	78	382 bp
Reverse	5'-AGGTGAAACGCGCGCCATCA - 3'	72	64	

Çizelge 3.7 Maxime PCR PreMix kitinin bileşenleri (i -Taq)

Bileşen	Reaksiyon boyutu 20 µL
i -Taq TM DNA Polimeraz(5U/ µL)	2,5 U
DNTP'ler	Her biri 2,5 mM
Reaksiyon Tamponu (10x)	1x
Jel Yükleme tamponu	1x

Çizelge 3.8 PCR'nin reaksiyon bileşenleri

Bileşen	25 µL (Son hacim)
Taq PCR Ön Karışımı	5 µL
İleri primer	10 pikomol/µL (1 µL)
Ters primer	10 pikomol/µL (1 µL)
DNA	1,5 µL
Distile su	16,5 µL

MrkD geni için, bir dizi deney sonra PCR aşamlarından olan ilk denatürasyon ve tavlama için optimum şartlar ele alındığında sıcaklık tüm numuneler için 60,62,65,69 Çizelge 3.9.

Çizelge 3.9 *MrkD* geni için PCR döngü programı

No.	Faz	Tm (^oC)	Süre	Döngü sayısı
1-	İlk Denatürasyon	94 C^o	5 dak.	1 döngü
2-	Denatürasyon -2	94C^o	45 san	35 döngü
3-	Tavlama	69C^o	45 san	
4-	Uzatma-1	72C^o	45 san	
5-	Uzatma -2	72C^o	7 dak.	1 döngü

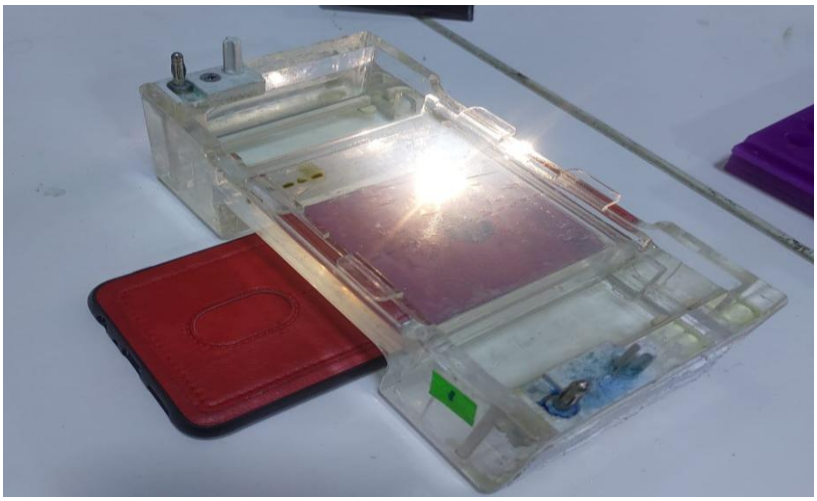
3.6.7 Tris borat EDTA tamponu (TBE)

Jel Elektroforez deneyleri yapılırken TBE solüsyonu, 10x konsantrasyonlu 100 mL TBE solüsyonu ile 900 mL steril distile su karıştırılarak, Dart Transfer konsantrasyonu solüsyonu elde edilecek şekilde (%1) TBE solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan konsantrasyon kullanılana kadar buzdolabında saklandı.

3.6.8 Numunenin hazırlanması

3 µL işlemci yükleme tamponu (Intron/Kore) 5 µL elektroforez (boya yükleme) olduğu varsayılan DNA ile karıştırılmıştır, karıştırma işleminden sonra artık jelin deliklerine yükleme işlemine geçilmiştir. Tentür jelin diğer tarafına ulaşana kadar 1-2 saat 7 v\c2'lik bir Elektrik akımına maruz bırakılmıştır. Jel, 30 µL Kırmızı güvenli Nükleik

asit boyama solüsyonu ve distile sudan 500 mL içeren havuza konduktan sonra 336 nm UV kaynağı ile test edilmiştir.



Şekil 3.5 Elektroforez sisteminin çalışması elektrikli alan ve migrasyon yönü

3.6.9 RedSafe boyama solüsyonu

RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), agaroz jellerdeki nükleik asidi saptamak için geleneksel etidyum bromür (EtBr) boyamasına bir alternatif olan yeni ve güvenli nükleik asit boyamadır. DNA veya RNA'ya bağlandığında yeşil floresan renk yaymaktadır. Bu boya, biri 309 nm'de ve diğeri 419 nm'de merkezlenmiş nükleik aside bağlandığında iki floresan uyarma maksimumuna sahiptir. Ek olarak, 514 nm'de bir görünür uyarım vardır. DNA'ya bağlı Red Safe'in floresan emisyonu 537 nm'de ortalanır. RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), EtBr kadar hassastır. Red Safe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x) için boyama protokolü EtBr için olana benzerdir. Güçlü mutajen olarak bilinen EtBr ile karşılaştırıldığında, RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), Ames testinde çok daha az mutasyona neden olur. Ayrıca RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x), fare iliği kromofil eritrosit mikronükleus testi ve fare sperma spermatosit kromozomal sapma testinde negatif sonuca sahiptir. Bu nedenle, agaroz jellerdeki nükleik asidi saptamak için EtBr yerine RedSafe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (20,000x) seçmek daha uygundur.

4. SONUÇLAR

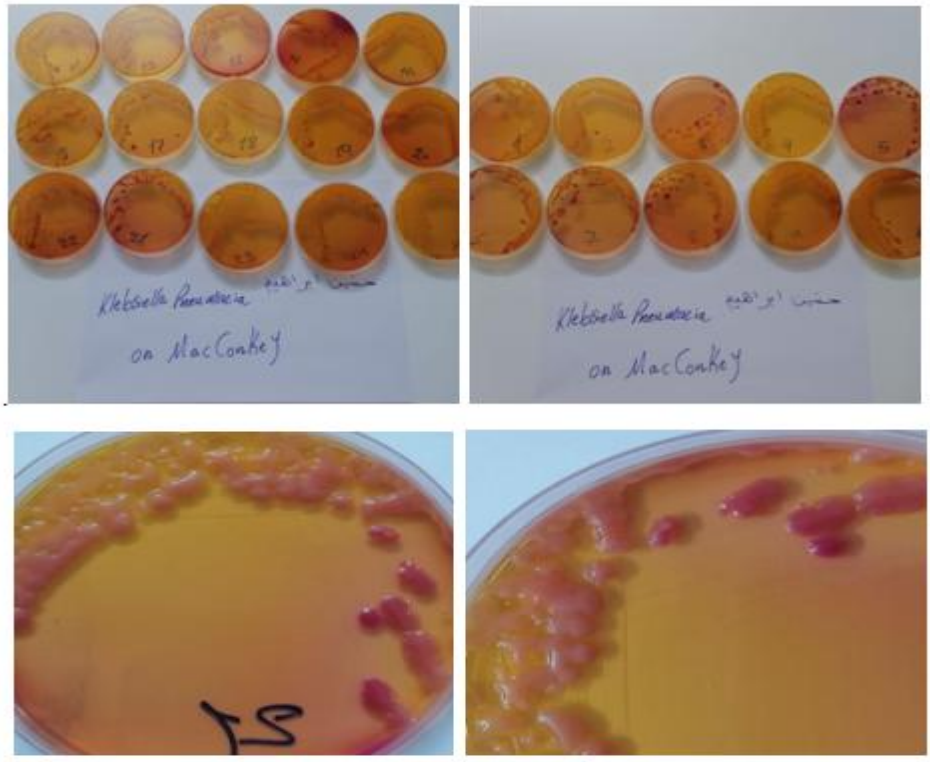
4.1 Numunelerin Toplanması, İzolasyonu ve Tanımlanması

Alınan 100 idrar örneği içerisinden sadece 80 örnekte bakteri üremesinin ortaya çıktığı MacConkey agar üzerinde kültürlenmiştir. İdrar örneklerinde bakteri üremesi bu kriterler kullanılarak sadece 50 izolat *K. pneumoniae* bulunmuş ve geleneksel biyokimyasal teste ek olarak MacConkey agar ve nutrient agar'ın fiziksel ve kültürel özellikleri kullanılarak tanı konulmuştur.

MacConkey agar, üzerinde pozitif bakteriler üremediğinden, Gram-pozitif bakteriler ve Gram-negatif bakteriler arasında bir ayrım olarak ele alınmıştır. Bu agar üzerinde bakterilerin üremediği Şekil 4.1'te gösterilmiştir.

K. pneumoniae karmaşık beslenme gereksinimlerine sahip değildir ve Nutrient Agar ortamı (NAM) gibi sıradan ortamlarda kolayca büyür. Genellikle NAM ve MacConkey agar, laboratuvarda *K. pneumoniae* kültivasyonu için kullanılır.

K. pneumoniae kısa, dolgun, düz çubuk şeklinde (basil) bir bakteridir. Hücrelerin düzenlenmesi – *K. pneumoniae* tek tek, çiftler halinde veya kısa zincirler halinde ve bazen de kümeler halinde düzenlenir (Şekil 4.1). *K. pneumoniae* 15-40 °C arasında değişir, ancak suşların çoğu için optimum sıcaklık 37 °C'dir ve genellikle laboratuvarlarda bu sıcaklıkta yetiştirilir. *K. pneumoniae* alkali pH'ta hayatta kalabilir ancak asidik pH'ta yaşayamaz ve organizmanın maksimum büyümesi 7,0'de, örneğin nötr pH'ta gözlemlenir. Ayrıca, pH gereksinimi, *K. pneumoniae* aerobik bakterinin suşuna göre değişir, yani oksijen varlığında en iyi şekilde büyür ve aynı zamanda fakültatif (istemli koşula bağlı) bir anaerobik organizmadır, yani düşük oksijen ortamında büyüyebilir.



Şekil 4.1 Kültür ortamında *K. Pneumoniae*

K. pneumonia'nın karakteristik biyokimyasal testlerine gelince, bu tür diğer cinslerden farklıdır. Cam slaytlara aktarılan bakteri çubuklarına farklılaşmak için bakteriler benimsendi. Eklenen hidrojen peroksitin H2O2'yi ayrıştırma kabiliyeti ve pozitif sonuç Üç test, katalaz enziminin üretimi ve oksidaz testi içerir. Negatif sonuç, üreaz testi neşeli sonuç Çizelge 4.1.

Çizelge 4.1 Biyokimyasal testlerine

No	**Biyokimyasal Testlerine**	***K. pneumoniae***
1.	Oksedaz test	-
2.	Üreaz testi	+
3.	Katalaz testi	+

4.2 Doku Kültürü Plakası Kullanılarak Biyofilm Oluşturma Deneyleri

Biyofilm oluşumu için 96 kuyu plakası kullanılarak mikrotitre plakası testi kullanılmıştır. Her izolat, 37C'de 18 saat boyunca Luria suyunda kültürlendi, daha sonra her bir kuyucuğa 200 µl triptikaz soya suyu (TSB) aktarıldı. Daha sonra, 24 saatlik kültürden izolatların mikrobiyal süspansiyonunun 10 mikrolitresi, kuyulara 0.5 McFarland bulanıklığına ulaştı ve 24 saat boyunca 37 ° C'de inkübe edildi. Daha sonra her kuyu boşaltıldı ve 3 kez tuzlu suyla yıkandı. Sonra da oda sıcaklığında 20 dakika boyunca inkübe edilen kuyucuklara 200 µL%10 kristal menekşe döküldü. Bundan sonra, normal salin ile 3 kez yıkandı ve kurutuldu, her bir oyuğa 200 µL dimetil sülfoksit (DMSO) eklendi ve plaka ELISA okuyucu tarafından 630 nm'de değerlendirildi. Biyofilm oluşumunun ölçümü için, test OD'si kontrol OD'si ile karşılaştırıldı: OD>0,65, güçlü biyofilm anlamına gelir, 0,5>OD>0,3, orta düzeyde biyofilm anlamına gelir, OD 0,15, biyofilm oluşumunun olmadığı anlamına gelir.

Tüm bakteri izolatları ve negatif kontrol için biyofilm oluşturma kapasitesinin hesaplanmasından sonra;

Biyofilm üreticileri arasında 30 (60%) izolat güçlü, 20 (40%) izolat orta dereceli olarak bulunmuştur (Çizelge 4.2).

Biyofilm oluşturma kapasitesi her izolattan farklı çıkmıştır, çünkü genel olarak *K. pneumoniae'*nin fizikokimyasal özelliği, bileşenler arasındaki fiziksel etkileşim, biyofilmin tutunduğu yüzeyin türü, sıcaklık ve pH gibi çeşitli faktörler kapasiteyi etkilemektedir (Vuotto *et al.* 2014).

Çizelge 4.2 Biyofilm sonucu

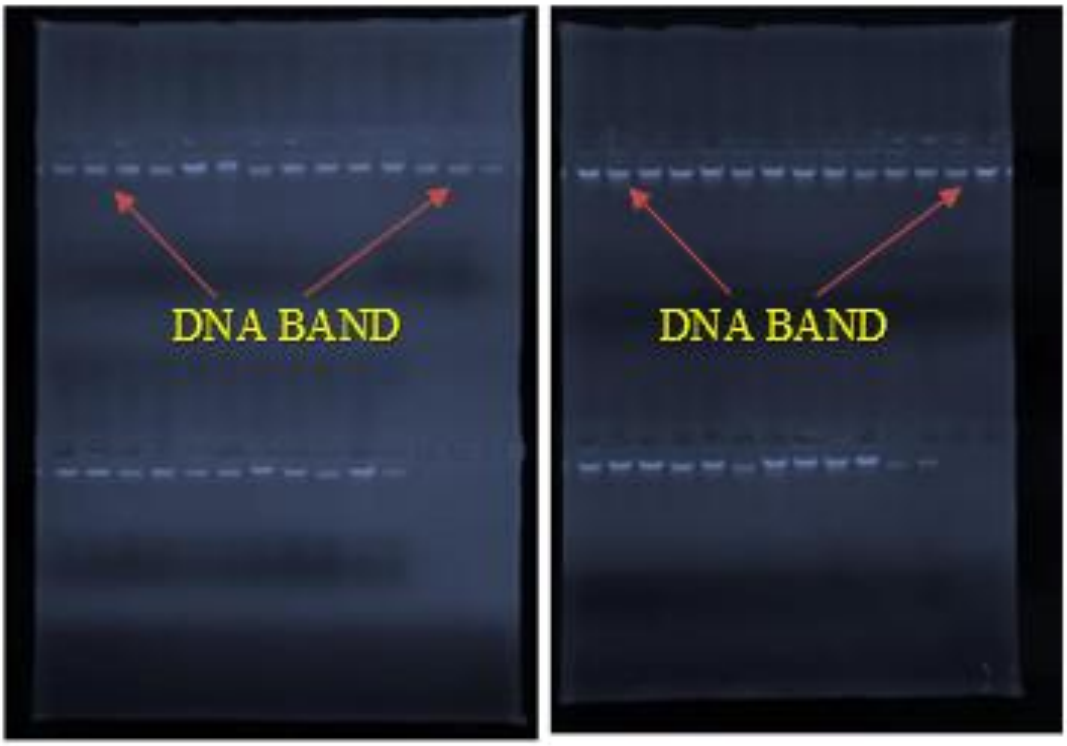
	BİYOFİLM YOĞUNLUĞU	**TCP N (%)**
NO. OF ISOLATE (50)	Güçlü	30 (60%)
	Orta	20 (40%)
	Zayıf	0

4.3 PCR Sonuçları

4.3.1 DNA Ekstraksiyonu Sonucun

50 örnekten DNA ekstraksiyon kiti Genomic DNA Mini Kit, ABD, Katalog no: 17045 üreticinin protokolüne göre *MrkD* geninin tespiti, *MrkD* geninin amplifikasyonu için primerler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. *MrkD*'nin 382 bp'lik bir parçası, IDT (Integrated DNA Technologies) şirketi tarafından sağlanan bir ileri primer kullanılarak amplifiye edilmiştir.

K. pneumoniae izolatlarının PCR sonuçları, DNA bandı mevcut olduğunu ortaya koymuştur (Şekil 4.2).



Şekil 4.2 Bakterilerden genomik DNA ekstraksiyonunun jel elektroforezi

4.3.2 Maxime PCR PreMix kiti (i-Taq)

İntron'un Maxime PCR PreMix Kiti, deneyim amacına göre sadece çeşitli PreMix Kit çeşitlerine değil, aynı zamanda 2X Master mix çözümüne de sahiptir. Maxime PCR Pre Mix Kit (i-Taq), her bileşenin karıştırıldığı üründür: Çizelge 4.3'de 1 rxn PCR için i-Taq DNA Polimeraz, dNTP karışımı, reaksiyon tamponu ve benzeri tek bir tüpte tanı geni için spesifik etkileşimin karışımı özetlenmiştir. Bu ürün, en rahat sistemle en iyi sonucu alabilen üründür. İlk neden, PCR için tüm bileşenlere sahip olmasıdır, bu nedenle sadece bir şablon DNA, primer seti ve distile su ile PCR yapılabilmesidir. İkinci neden ise elektroforez yapmak için jel yükleme tamponuna sahip olmasıdır, böylece herhangi bir işleme gerek duymadan jel yüklemesi yapılabilir. Hızlı ve basit kullanım yöntemi ile çeşitli numune deneylerinde uygundur.

Çizelge 4.3 Tanı geni için spesifik etkileşimin karışımı

BİLEŞENLER	KONSANTRASYON
Taq Polimeraz zincirleme reaksiyonu PreMix	5 µL
Forward primer	10 pmol/µL (1µL)
Reverse primer	10 pmol/µL (1µL)
DNA	1,5 µL
Distile su	16,5 µL
Nihai hacim	25 µL

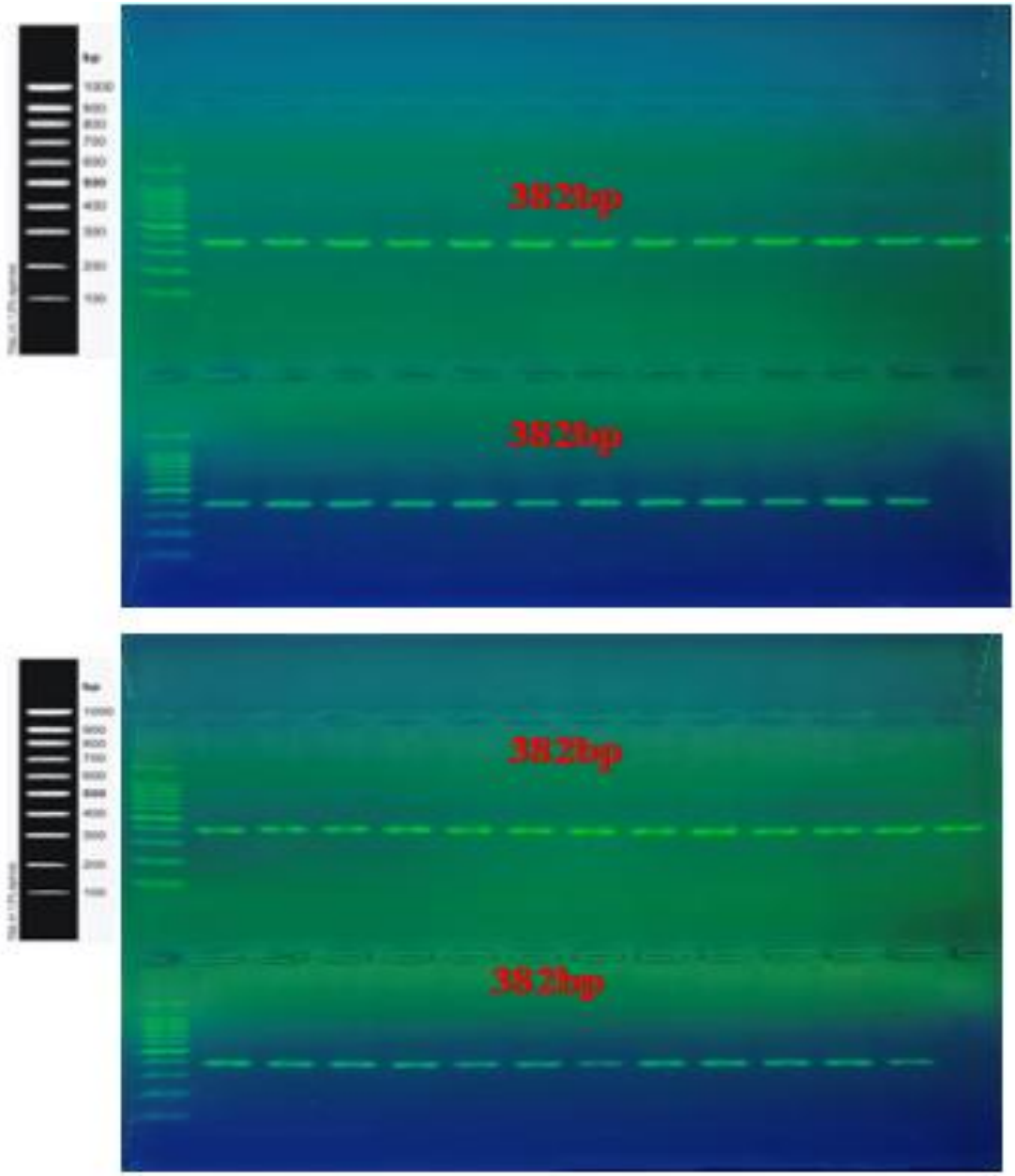
4.3.3 Gen Tanısı

Bu gen, Forward ve Reverse primerlerinden 10 pikomole/µL konsantrasyonunda 1 µL ve DNA şablonundan 1,5 µL kullanıldığında optimal etkileşim koşulunun belirlenmesi yoluyla tanımlanmıştır. Etkileşimi başlatmak amacıyla, bir döngü için 3 dakika boyunca 94°C'lik bir başlangıç sıcaklığının yanı sıra, 40 döngü için 1 dakika boyunca 60°C'lik bir sıcaklık kullanan (García-Fernández *et al.* 2010)'a bağlı olarak 45 saniye boyunca tavlama aşamasında (62°C) kullanılan çeşitli sıcaklıklarda gradyan PCR çalışması yapıldı. Ürün elektriksel olarak ayrıldığında, 382 bp paketi için ürün ve markör DNA'sını gösteren tavlama primerinin optimum sıcaklığının 60°C olduğu ortaya çıktı.

PCR amplifikasyonu, 1,5 µL DNA, 5 µL Taq Master Mix PCR, her bir primer 10 pmol'den 1 µL içeren toplam 25 µL'lik bir hacimde gerçekleştirildi, daha sonra damıtılmış su, toplam 25 µL hacimli bir tüp içine ilave edildi. PCR amplifikasyonu aşağıdaki koşullar altında gerçekleştirildi: 94°C'de 3 dakika, ardından 45 saniye boyunca 94°C'de, bunu takiben 45 saniye boyunca 62°C, 45 saniye boyunca 72°C'de 35 döngü ve Labnet tarafından yapılan bir termal döngüleyici kullanılarak 7 dakika boyunca 72°C'lik son bir uzantı yapıldı (Labnet ınternational, Inc, MultiGene OptiMax, Katalog no D600, ABD). PCR ürünleri %1,5 agaroz jel elektroforezi ile ayrıldı ve etidyum bromür boyamadan sonra 382 nm ultra düşük ışığa maruz bırakılarak görselleştirilmistir (Yong *et al*. 2009).

DNA ekstraksiyonundan sonra elektroforez kullanılır. Agaroz jeli, daha önce yapılmış 100 mL TBE tamponunda 1,5 g agaroz eritilerek %1,5 yoğunlaştırmada hazırlanmıştır. Agaroz kaynama noktasına kadar ısıtılmış ve daha sonra (45-50^{o}C) soğumaya bırakılmıştır.

Laminin bağlayıcı proteini kodlayan *MrkD* geninin moleküler tespiti: sonuçlar tüm izolatların *MrkD* genine (Şekil 4.3) sahip olduğunu ve tüm bakteri izolatları için aynı seviyede bir demetin ortaya çıkmasıyla 100/100'e ulaştığını göstermiştir. Markör, hacimsel indeks ile karşılaştırıldığında 382 baz çiftinden oluşan demetlerin moleküler ağırlığına eşittir.



Şekil 4.3 PCR ürünü bant boyutu 382 bp ürün, N: DNA marker (100)

5. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

K. pneumoniae, özellikle idrar yolu enfeksiyonları olan hastalarda veya özel bakımda dirençli hastane enfeksiyonlarının gelişmesi nedeniyle son yıllarda çok dikkat çeken önemli bir insan patojenidir (Zheng 2018 *et al*, Gupta 2018).

MrkD güçlü veya orta derecede biyofilm içeren tüm izolatlar ve zayıf biyofilm bulunamadı. Bu adezyon genlerinin varlığı biyofilm ile anlamlı korelasyon gösterdi. Bu genleri içeren izolatların çoğu güçlü biyofilmlere sahipti. *MrkD* genine sahip 30 izolatta güçlü biyofilm ve 20 izolatta orta derecede biyofilm vardı.

Bazı çalışmalarda, klinik örneklem grubundan, bu çalışma ile tutarlı olarak (%57.09) *K. pneumoniae* için%56,4'ü pozitifti ve Hindistan'da imipenem direncinin yaklaşık %10,10 olduğu bildirilmiştir, ancak bu çalışmada, imipenem direnci%24,07 olarak bildirilmiştir, Dolaysıyla bu da Hindistan raporundan daha yüksektir. Coğrafi alan ve antibiyotik kullanım düzenindeki farklılıklar bu fark prevalansının nedeni olabilir (Ravichitra 2014). Zira İran çalışmasında karbapenem direnç geninin prevalansı %4,9 idi. Biyofilm izolatları üretme yeteneği, antibiyotiklere karşı direncin artmasına, buna takiben tedavi başarısızlığına, tedavi maliyetlerinin artmasına ve mortalitenin artmasına neden olur (16-18).

K. pneumoniae'de *MrkD* geni (alt birim), biyofilm oluşumu için gerekli olan hücre dışı matrikse bağlanmaya aracılık eden tip 3 fimbriae yapışmalarını kodlar. *K. pneumoniae* izolatlarının yaklaşık%100'ü biyofilm oluşumu yeteneğine sahiptir, zira bu çalışmada PCR'nin sonuçları, *MrkD* genlerine sahip tüm izolatların güçlü veya orta derecede biyofilme sahip olduğunu göstermiştir. Çalışmanın sonuçları, adezyon genlerinin varlığının, direnç genlerinin varlığı ile anlamlı derecede ilişkili olduğunu, İzolatlardan *MrkD* en yaygın virülans geniydi (%100), biyofilm oluşumunun ilaca dirençli genlerin ve adrenerjik genlerin varlığına bağlı olabileceğini göstermiştir. Dolayısıyla her iki gen kümesinin aynı anda varlığı, daha güçlü biyofilm oluşumuna yol açabilir. *K. pneumoniae*'nin patojenitesi, kolonizasyonu ve doku invazyonunu destekleyen adezinler gibi farklı doğuştan gelen virülans faktörlerinden kaynaklanır. Ajezin geninin (*MrkD*)

dağılımı, hastane ve toplum kökenli enfeksiyonları olan hastalardan farklı klinik kökenli suşlar arasında benzerdi ve bu da idrardan *K. pneumoniae* izolatları hakkındaki önceki bir raporun bulgularıyla tutarlıydı (El Fertas 2013). Fimbria tip 1 ve 3'ü kodlayan suşlarımızdaki yüksek *fimH* (%94) ve *MrkD* (%95,3) sıklığı, virülansını göstermektedir, zira fimbria tip 1 İYE'lerde önemli bir belirteçtir (Struve 2008) ve tip 3 böbrek, akciğer ve mesane dokusuna yapışmaya aracılık eder (Braun 2001).

K. pneumoniae, kapsüler polisakkarit, adezyonlar ve sideroforlar gibi bu bakterilerin patojenitesine katkıda bulunan birçok virülans faktörüne sahiptir. *K. pneumoniae*'de virülans faktörlerinin varlığı önemlidir, çünkü antibiyotik tedavisine başlamadan önce hastalarda en belirgin ölüm nedenidir. Tip 3 fimbrial adezinler, *K. pneumoniae*'nin endotel hücreleri, solunum yollarının epitel hücreleri ve idrar yolu gibi çeşitli insan hücrelerine bağlanmasına aracılık edebilir. Fimbrial ilişkili gen *MrkD*, mikroorganizmanın kollajen moleküllerine bağlanmasında önemli bir faktördür. Bir mikroorganizmanın biyofilm oluşturma yeteneği önemli bir virülans faktörüdür ve bu tür biyofilmler birçok kronik enfeksiyonun ana nedenidir. Bu çalışmada, PCR testi, *K. pneumoniae* izolatlarının %100'ünün *MrkD* tarafından fenotipik olarak biyofilm üreten bu geni barındırdığını ortaya koymuştur.

Benzer sonuçlar (Wu *et al*. 2014) tarafından yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir, Öte yandan, Shakib *MrkD* geninin prevalansı için daha düşük oranlar belirtilmiştir. Mevcut bulgulara göre, biyofilm oluşumu ile *MrkD* geninin varlığı arasında güçlü bir ilişki vardı, çünkü biyofilm üreten *K. pneumoniae* izolatlarının %95.7'si *MrkD* genini taşırken, biyofilm üretmeyen *K. pneumoniae*'nin sadece %33.3'ünde oldukça anlamlı istatistiksel farka sahip gen vardı ($P<0.001$). Biyofilm oluşturan izolatların%100'ünü ve biyofilm oluşturmayan izolatların sadece%27,3'ünü *MrkD* pozitif izolatlar olarak belgeleyen (Mahmood 2020) ile aynı fikirde. Ayrıca, (Liu *et al*. 2015) 40, biyofilm üreten *K. pneumoniae* izolatlarının%95,8'inin *MrkD* geni taşıdığını fark etmiştir.

Tip 3 fimbrial adezin kodlayan genin *MrkD* ekspresyonu, *K. pneumoniae* klinik izolatları arasında biyofilm oluşumu ve değişken antibiyotiklere direnç ile önemli ölçüde ilişkiliydi. Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlara yönelik önleme ve kontrol

planlarının uygulanması ve özellikle hastane ortamlarında enfeksiyonların eradikasyonu şarttır. Tip 3 fimbrialar başlangıçta tanenle işlenmiş eritrositleri hemaglütine etme yetenekleriyle karakterize edildi. Tip 3 saçaklı filamanın sentezi için en az altı *Mrk* geni gereklidir; bunlardan *MrkA* geni majör fimbrilini kodlar ve *MrkD* hemaglutinini kodlar. Son kanıtlar, *Klebsiella* tip 3 fimbrialarının en az iki varyantta meydana geldiğini göstermiştir, biri plazmitle kodlanmış ve biri kromozomal olarak kodlanmış. Varyantlar ilk olarak *K. pneumoniae* IA565'te tarif edildi ve kromozomal olarak kodlanan varyantın hemaglütinasyon kapasitesinin yanı sıra *MrkD* geninin olmamasıyla farklılık gösteriyor. *MrkD* geni, plazmid kaynaklı *Mrk* gen kümesinde bulunur ve hemaglütinasyon kapasitesinden sorumludur.

Klonlanmış *MrkD, MrkD* eksikliği olan kromozomal olarak kodlanmış varyantı tamamlar ve fimbrialarn yapışkan özelliklerini geri yükler. Plazmid kaynaklı varyantın *MrkD* adezininin, renal tubüllerin bazolateral yönlerinde ve damar duvarlarında tip V kollajenine bağlandığına dair kanıtlar sunduk. Bu yapışkanlık, klebsiellaların hasarlı doku bölgelerinde, kateterize idrar yollarında veya akciğerdeki hasarlı bölgelerde bulaşıcılığını artırabilir.

Yapışkan olmayan suşlar bu koşullar altında slaytlarda büyüyemedi. Zira *MrkD* proteininin HBE hücrelerinin ECM'sindeki herhangi bir spesifik kollajen türü ile etkileşime girdiğini doğrudan göstermemiş olsak da kolajenin in vitro hücreler tarafından sentezlenen matrisin ayrılmaz bir bileşeni olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, HBE hücreleri tarafından üretilen ECM'nin bileşimi ayrıntılı olarak araştırılmamıştır. *MrkD* adezinin ECM'lerde aderansı ve müteakip büyümeyi kolaylaştırma yeteneği, ticari olarak temin edilebilen, saflaştırılmış insan ECM'si kullanılarak doğrulanmıştır. Bu materyal üzerinde kapsamlı ve eksiksiz biyofilm oluşumu sadece *MrkD* molekülünü ifade eden suş kullanılarak gözlemlenmiştir.

Yukarıda belirtildiği gibi, *MrkD* adezininin odalardaki HBE hücre zarlarına doğrudan bakteriyel bağlanmaya aracılık etmediğine inanıyoruz. Bununla birlikte, *MrkD* adezininin HBE tarafından üretilen matrise bağlandığını doğrulamak için, HBE hücreleri tarafından ortaya konan herhangi bir materyali ortaya çıkarmak için kapak

kapaklarından bir HBE hücresi katmanını çıkarmak mümkündü. Bu durumda geniş biyofilm oluşumu sadece *MrkD*-pozitif bakterilerle gözlenmiştir. *MrkD*'ye sahip fimbriaların in vitro kültürlenmiş epitel hücrelerinin altta yatan matrisinde büyüme yeteneği, tip 3 fimbreat bakterilerinin konakçı yüzeylerde büyümesi için sağlam bir epitel yüzeyinin bozulmasının gerekli olduğunu kuvvetle düşündürmektedir. Bu, *K. pneumoniae*'ye bağlı hastane kökenli enfeksiyonlarla ilişkili klinik gözlemlerle tutarlıdır (Liu *et al.* 2015).

Bu artan direncin nedenlerinden biri biyofilm oluşumu olabilir. İzolatlarda biyofilm oluşumu antibiyotiğin bakterilere ulaşamamasına neden olur, bunun sonucu olarak artan antibiyotik direnci tedavi süresini uzatacaktır. Ayrıca, artan biyofilm üretimi, çoklu ilaç direncinin ortaya çıkmasıyla ilişkili görünmektedir. Bu nedenle, *K. pneumoniae* biyofilminin oluşumu ile ilgili diğer antibiyotiklerin direnç modelini bulmak için Irak'ta daha fazla çalışma yapılmalıdır.

KAYNAKLAR

Ares, M. A., Fernández-Vázquez, J. L., Rosales-Reyes, R., Jarillo-Quijada, M. D., von Bargen, K., Torres, J., González-y-Merchand, J. A., Alcántar-Curiel, M. D., & de la Cruz, M. A. 2016. H- NS nucleoid protein controls virulence features of *Klebsiella pneumoniae* by regulating the expression of type 3 pili and the capsule polysaccharide. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 6: 13.

Atshan, S. S., Shamsudin, M. N., Thian Lung, L. T., Sekawi, Z., Ghaznavi-Rad, E., & Pei Pei, C. 2012. Comparative characterisation of genotypically different clones of MRSA in the production of biofilms. Journal of Biomedicine and Biotechnology.

Babcock, H. M., Zack, J. E., Garrison, T., Trovillion, E., Kollef, M. H., & Fraser, V. J. 2003. Ventilator-associated pneumonia in a multi-hospital system differences in microbiology by location. Infection Control & Hospital Epidemiology, 24(11): 853-858.

Behzadi, P., Urbán, E., Matuz, M., Benkő, R., & Gajdács, M. 2020. The role of gram-negative bacteria in urinary tract infections: current concepts and therapeutic options. Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health, 35–69.

Black, A. D. 2016. Non-infectious mimics of community-acquired pneumonia. Pneumonia, 8(1): 1-5.

Blanco, P., Hernando-Amado, S., Reales-Calderon, J. A., Corona, F., Lira, F., Alcalde-Rico, M., & Martinez, J. L. 2016. Bacterial multidrug efflux pumps: much more than antibiotic resistance determinants. Microorganisms, 4(1): 14.

Boyd, A., & Chakrabarty, A. Á. 1994. Role of alginate lyase in cell detachment of Pseudomonas aeruginosa. Applied and environmental microbiology, 60(7): 2355-2359.

Brady, S. M., Orlando, D. A., Lee, J. Y., Wang, J. Y., Koch, J., Dinneny, J. R., & Benfey, P. N. 2007. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. Science, 318(5851): 801-806.

Braun, V. 2001. Iron uptake mechanisms and their regulation in pathogenic bacteria. International journal of medical microbiology, 291(2): 67-79.

Brisse, S., Stefani, S., Verhoef, J., Van Belkum, A., Vandamme, P., & Goessens, W. 2002. Comparative evaluation of the BD Phoenix and VITEK 2 automated

instruments for identification of isolates of the Burkholderia cepacia complex. Journal of Clinical Microbiology, 40(5): 1743-1748.

Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284(5418): 1318-1322.

De Freitas Almeida, G. M., & Sundberg, L. R. 2020. The forgotten tale of Brazilian phage therapy. The Lancet Infectious Diseases, 20(5): e90-e101.

Den Bakker, H. C., Cummings, C. A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R. H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M. R., & Wiedmann, M. 2010. Comparative genomics of the bacterial genus Listeria: genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. BMC Genomics, 11(1): 1–20.

Di Martino, P., Cafferini, N., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. 2003. Klebsiella pneumoniae type 3 pili facilitate adherence and biofilm formation on abiotic surfaces. Research in microbiology, 154(1): 9-16.

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clinical microbiology reviews, 15(2): 167-193.

Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., Van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J., & Luisi, B. F. 2018. Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. Nature Reviews Microbiology, 16(9): 523-539.

El Salabi, A., Walsh, T. R., & Chouchani, C. 2013. Extended spectrum β-lactamases, carbapenemases and mobile genetic elements responsible for antibiotics resistance in Gram-negative bacteria. Critical Reviews in Microbiology, 39(2): 113–122.

Flores-Mireles, A., Hreha, T. N., & Hunstad, D. A. 2019. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. Topics in spinal cord injury rehabilitation, 25(3): 228-240.

Forbes, J. M. 2007. Voluntary food intake and diet selection in farm animals. Cabi.

García-Fernández, A., Miriagou, V., Papagiannitsis, C. C., Giordano, A., Venditti, M., Mancini, C., & Carattoli, A. 2010. An ertapenem-resistant extended-spectrum-β-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae clone carries a novel OmpK36 porin variant. Antimicrobial agents and chemotherapy, 54(10): 4178-4184.

Gupta, V., Garg, R., Kumaraswamy, K., Datta, P., Mohi, G. K., & Chander, J. 2018. Phenotypic and genotypic characterization of carbapenem resistance mechanisms

in *Klebsiella pneumoniae* from blood culture specimens: A study from North India. Journal of Laboratory Physicians, 10(02):125-129.

Harada, S., Aoki, K., Yamamoto, S., Ishii, Y., Sekiya, N., Kurai, H., Furukawa, K., Doi, A., Tochitani, K., & Kubo, K. 2019. Clinical and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bloodstream infections in Japan: occurrence of hypervirulent infections in health care. Journal of Clinical Microbiology, 57(11): e01206-19.

James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, E. D., Secor, P., Sestrich, J., & Stewart, P. S. 2008. Biofilms in chronic wounds. Wound Repair and regeneration, 16(1): 37-44.

Jolley, K. A., Bliss, C. M., Bennett, J. S., Bratcher, H. B., Brehony, C., Colles, F. M., Wimalarathna, H., Harrison, O. B., Sheppard, S. K., & Cody, A. J. 2012. Ribosomal multilocus sequence typing: universal characterization of bacteria from domain to strain. Microbiology, 158(Pt 4): 1005.

Kapitein, N., & Mogk, A. 2013. Deadly syringes: type VI secretion system activities in pathogenicity and interbacterial competition. Current Opinion in Microbiology, 16(1): 52– 58.

Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. 2020. Biofilm matrixome: extracellular components in structured microbial communities. Trends in Microbiology, 28(8): 668-681.

Khaertynov, K. S., Anokhin, V. A., Rizvanov, A. A., Davidyuk, Y. N., Semyenova, D. R., Lubin, S. A., & Skvortsova, N. N. 2018. Virulence factors and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from neonates with sepsis. Frontiers in Medicine, 5: 225.

Lawlor, M. S., O'connor, C., & Miller, V. L. 2007. Yersinia bactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. Infection and Immunity, 75(3): 1463– 1472.

Marquez, B. 2005. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. Biochimie, 87(12): 1137-1147.

Martin, R. M., & Bachman, M. A. 2018. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8: 4.

May, R. M., Hoffman, M. G., Sogo, M. J., Parker, A. E., O'Toole, G. A., Brennan, A. B., & Reddy, S.T. 2014. Micro-patterned surfaces reduce bacterial colonization and biofilm formation in vitro: Potential for enhancing endotracheal tube designs. Clinical and Translational Medicine, 3(1): 1–9.

Millett, E. R., Quint, J. K., Smeeth, L., Daniel, R. M., & Thomas, S. L. 2013. Incidence of community-acquired lower respiratory tract infections and pneumonia among older adults in the United Kingdom: a population-based study. PloS one, 8(9): e75131.

Muhammad, D. H. 2020. Implementasi Pendidikan Humanisme Religiusitas Dalam Pendidikan Pendidikan Agama Islam Di Era Revolusi Industri 4.0. Edumaspul: Jurnal Pendidikan, 4(2): 122-131.

Mukhtar, A. A., Abd Alfadil, N. A., Mohamed, M. S., Altayb, H. N., Elzak, S. G., & Hassan, M. S. 2018. Identification of Proteus mirabilis on banknotes using 16s rRNA gene in Khartoum State. Sudan Journal of Medical Sciences, 13(3): 175-186.

Ning, B., Han, Q. L., & Zuo, Z. 2019. Practical fixed-time consensus for integrator-type multi-agent systems: A time base generator approach. Automatica, 105: 406-414.

Noor, J. A. 2019. "Bacteriological and Molecular Study of *Staphylococcus aureus* Isolated from Different Clinical Sources" a thesis submitted to the council of the college of education for pure Sciences/ Ibn Al-Haitham University of Baghdad.

Opoku-Temeng, C., Kobayashi, S. D., & De Leo, F. R. 2019. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines. Computational and Structural Biotechnology Journal, 17: 1360–1366.

Otto, K. 2008. Volumetric modulated arc therapy: IMRT in a single gantry arc. Medical physics, 35(1): 310-317.

Paterson, G. K. 2020. Genomic epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus sciuri carrying a SCCmec-mecC hybrid element. Infection, Genetics and Evolution, 79: 104148.

Pickwell, K. M., Siersma, V. D., Kars, M., Holstein, P. E., Schaper, N. C., & Eurodiale Consortium. 2013. Diabetic foot disease: impact of ulcer location on ulcer healing. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 29(5): 377-383.

Poole, K. 2007. Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms. Annals of medicine, 39(3): 162-176.

Rani, S. A., Pitts, B., Beyenal, H., Veluchamy, R. A., Lewandowski, Z., Davison, W. M., & Stewart, P. S. 2007. Spatial patterns of DNA replication, protein synthesis, and oxygen concentration within bacterial biofilms reveal diverse physiological states. Journal of bacteriology, 189(11): 4223-4233.

Ravichitra, K. N., Prakash, P. H., Subbarayudu, S., & Rao, U. S. 2014. Isolation and antibiotic sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* from pus, sputum and urine samples. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci, 3(3): 115-119.

Reid, G., Howard, J., Gan, B.S. 2001. Can Bacterial Interference Prevent Infection? Trends Microbiol, 9/9: 424–428.

Reygaert, W. C. 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. AIMS microbiology, 4(3): 482.

Rice, L.B. 2012. Mechanisms of resistance and clinical relevance of resistance to β-lactams, glycopeptides, and fluoroquinolones. Mayo Clinic Proceedings, 87(2): 198–208.

Sabel, C., Pringle, D., & Schoerstrom, R. 2010. Infectious disease diffusion. A companion to health and medical geography, 111: 132.

Sakamoto, S., Miyazawa, K., Yasui, T., Iguchi, T., Fujita, M., Nishimatsu, H., & Ichikawa, T. 2019. Chronological changes in epidemiological characteristics of lower urinary tract urolithiasis in Japan. International Journal of Urology, 26(1): 96-101.

Srinivasan, R., Karaoz, U., Volegova, M., MacKichan, J., Kato-Maeda, M., Miller, S., & Lynch, S. V. 2015. Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens. PloS one, 10(2): e0117617.

Struve, C., Bojer, M., & Krogfelt, K. A. 2008. Characterization of Klebsiella pneumoniae type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. *Infection and immunity*, *76*(9): 4055-4065.

Sun, J., Deng, Z., & Yan, A. 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and biophysical research communications, 453(2): 254-267.

Tang, M., Quanstrom, K., Jin, C., & Suskind, A. M. 2019. Recurrent urinary tract infections are associated with frailty in older adults. Urology, 123: 24-27.

Toth, A. L., Varala, K., Newman, T. C., Miguez, F. E., Hutchison, S. K., Willoughby, D. A., & Robinson, G. E. 2007. Wasp gene expression supports an evolutionary link between maternal behavior and eusociality. Science, 318(5849): 441-444.

Touhami, A., Jericho, M. H., & Beveridge, T. J. 2004. Atomic force microscopy of cell growth and division in Staphylococcus aureus. Journal of bacteriology, 186(11): 3286-3295.

Tshikhudo, P., Nnzeru, R., Ntushelo, K., & Mudau, F. 2013. Bacterial species identification getting easier. African Journal of Biotechnology, 12(41).

Vuotto, C., Longo, F., Balice, M. P., Donelli, G., & Varaldo, P. E. 2014. Antibiotic resistance related to biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*. *Pathogens*, *3*(3): 743–758.

Vilvanathan, S. 2021. Penicillins, Cephalosporins, and Other β-Lactam Antibiotics. In Introduction to Basics of Pharmacology and Toxicology (pp. 821-834). Springer, Singapore.

Wallace, P. R. J., Oleszek, W., Franz, C., Hahn, I., Baser, K. H. C., Mathe, A., & Teichman, K. 2010. Dietary plant bioactives for poultry health and productivity. British Poultry Science, 51(4): 461-487.

Webber, M. A., & Piddock, L. J. V. 2003. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. Journal of antimicrobial chemotherapy, 51(1): 9-11.

Wiley, J. 2007. Sons, Ltd: Hoboken, NJ, USA, 2013.

Yong, D., Toleman, M. A., Giske, C. G., Cho, H. S., Sundman, K., Lee, K., & Walsh, T. R. 2009. Characterization of a new metallo-β-lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(12): 5046-5054.

Young, P. Y., & Khadaroo, R. G. 2014. Surgical site infections. Surgical Clinics, 94(6): 1245-1264.

Zaglool, D. A., Khodari, Y. A., Othman, R. A. M., & Farooq, M. 2011. Prevalence of intestinal parasites and bacteria among food handlers in a tertiary care hospital. Nigerian medical journal: journal of the Nigeria Medical Association, 52(4): 266.

Zheng, J. X., Lin, Z. W., Chen, C., Chen, Z., Lin, F. J., Wu, Y., ... & Deng, Q. W. 2018 . Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG. Frontiers in cellular and infection microbiology, 8: 21.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı	Haneen Ibrahim Mhmood SHAHEEN	

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-Halen
Lisans	Al-Farabi Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	2015-2019