



**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**

**GENTAMİSİN, SEFTRİAKSON, SİPROFLOKSASİN VE
MEROPENEM'İN *Klebsiella pneumoniae* İZOLATLARINA
KARŞI ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Gülsüm NALBANT

**DANIŞMAN
Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN**

**SAMSUN
2021**

**T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANA BİLİM DALI**



**GENTAMİSİN, SEFTRİAKSON, SİPROFLOKSASİN VE
MEROPENEM'İN *Klebsiella pneumoniae* İZOLATLARINA
KARŞI ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Gülsüm NALBANT

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN

SAMSUN
2021

TEZ KABUL VE ONAYI

Gölsüm NALBANT tarafından, Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN danışmanlığında hazırlanan “Gentamisin, Seftriakson, Siprofloksasin ve Meropenem'in *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarına Karşı Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 9.4.2021 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi Ana Bilim/Ana Sanat Dalı	İmza	Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye (Danışman)	Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Fikriye Milletli Sezgin Amasya Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı		☒ Kabul
			☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görölmüştür.

ONAY

... / ... / ...

Prof. Dr. Ali BOLAT
Enstitü Müdürü

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım yüksek lisans/doktora/sanatta yeterlik tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

İmza

... / ... / 2021

Gülsüm NALBANT

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı: Gentamisin, Seftriakson, Siprofloksasin ve Meropenem'in *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarına Karşı Antibiyofilm Aktivitelerinin Araştırılması

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 15.03.2021 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 8

Tek kaynak oranı : %1 çıkmıştır.

İmza

... / ... / 2021

Kemal BİLGİN

ÖZET

GENTAMİSİN, SEFTRİAKSON, SİPROFLOKSASİN VE MEROPENEM'İN *Klebsiella pneumoniae* İZOLATLARINA KARŞI ANTİBİYOFİLM AKTİVİTELERİNİN ARAŞTIRILMASI

Gülsüm NALBANT

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Yüksek Lisans, Nisan/2021

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN

Klebsiella pneumoniae, hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen fırsatçı patojen bir bakteridir. *K. pneumoniae*'nin da önemli virülas faktörlerinden biri olan biyofilm, mikrobiyal türlerin kendilerini çevresel etkenlerden korunmak ve yaşamsal faaliyetleri için elverişli bir ortam sağlamak amacıyla oluşturdukları bir mikro-ekosistemdir. Çalışmamızda idrar örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneği ve gentamisin, meropenem, seftriakson ve siprofloksasin'in antibiyofilm aktivitesi araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya çeşitli servislerden gönderilen idrar örneklerinden izole edilen 181 *K. pneumoniae* izolatı dahil edildi. İzolatlar konvansiyonel ve otomatize sistemler kullanılarak tanımlandı. Çalışmaya dahil edilen izolatların biyofilm oluşturma yetenekleri mikrotitrasyon plak yöntemi ile çalışıldı ve sonuçlar standart suşlarının absorbans değerleri ile karşılaştırılarak kantitatif olarak skorlandı. Biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatların gentamisin, meropenem, seftriakson ve siprofloksasin için antibiyotik duyarlılık durumları mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak çalışıldı. Bu sonuçlara göre orta derece biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatlar içinden dört antibiyotiğe de duyarlı olan 7 izolatın, tüm antibiyotikler için ayrı ayrı antibiyofilm aktivitesi araştırıldı. Antibiyofilm aktivitesi gösteren antibiyotik ve konsantrasyonlarından seçilen örneklerdeki biyofilm oluşumları elektron mikroskobu kullanılarak görüntülendi.

Çalışmaya dahil edilen 181 izolatın 90 (%49.7)'nda biyofilm oluşumu gözlenmiştir. Bunlardan 27 (%30)'si orta derece 63 (%70)'üde zayıf derecede biyofilm oluşturmuştur. Orta derece biyofilm oluşturanların meropeneme duyarlı olma durumu, zayıf derecede biyofilm oluşturanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülürken, diğer antibiyotiklerde böyle bir sonuç saptanmamıştır. Biyofilm önlenim

Çalışılan izolatlarda gentamisin, meropenem, seftriakson ve siprofloksasin için bazı izolatlarda çeşitli konsantrasyonlarda antibiyofilm aktivitesi saptanmıştır.

Çalışmamız sonunda antibiyotiklerin biyofilm oluşumlarının giderilmesinde kullanılabileceği dūřünülmektedir. Bununla birlikte hangi antibiyotiklerin hangi dozlarda kullanılacağının tespit edilebilmesi için farklı yöntemlerin de kullanıldığı, geniş kapsamlı yeni çalışmalara ihtiyaç olduğu grlmştr.

Anahtar Sözcükler: *K. pneumoniae*, biyofilm, antibiyofilm aktivite

ABSTRACT

INVESTIGATION OF ANTIBIOFILM ACTIVITIES OF GENTAMICIN, CEFTRIAZONE, CIPROFLOXACIN AND MEROPENEM AGAINST *Klebsiella* *pneumoniae* ISOLATES

Gölsüm NALBANT

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of Medical Microbiology

Master, April/2021

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Kemal BİLGİN

Klebsiella pneumoniae is an opportunistic pathogenic bacterium that can cause hospital and community-acquired infections. Biofilm, one of the important virulence factors of *K. pneumoniae*, is a micro-ecosystem created by microbial species to protect themselves from environmental factors and to provide a suitable environment for their vital activities. In our study, it was aimed to investigate the biofilm formation ability of *K. pneumoniae* isolates isolated from urine samples and the antibiotic activity of gentamicin, meropenem, ceftriazone and ciprofloxacin.

The study included 181 isolates of *K. pneumoniae* isolated from urine samples sent from various services. Isolates were identified using conventional and automated systems. According to these results, the antibiotic activity of 7 isolates that were susceptible to four antibiotics, among the isolates that showed moderate biofilm formation, was investigated separately for all antibiotics. Biofilm formations in samples selected from antibiotics and concentrations showing antibiofilm activity were viewed using electron microscopy.

Biofilm formation was observed in 90 (49.7%) of the 181 isolates included in the study. Of these, 27 (30%) formed medium degree and 63 (70%) weak biofilm. While it was observed that susceptibility to meropenem in moderate biofilm forming was statistically significant compared to those forming a weak biofilm, this result was not found with other antibiotics. Various concentrations of antibiofilm activity were detected in some isolates for gentamicin, meropenem, ceftriazone and ciprofloxacin in isolates with biofilm inhibition.

As a result of our study, it is thought that antibiotics can be used in removing biofilm formation. However, it has been observed that different methods are used to

determine which antibiotics and in what doses to use and new complex studies are needed.

Keywords: *K. pneumoniae*, biofilm, antibiofilm activity

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan akademik desteğini her zaman hissettiğim, nezaketi ve çalışma disipliniyle kendime örnek edindiğim, bu süreçte bana yol gösteren değerli danışmanım, sevgili hocam Dr. Öğr. Üyesi Kemal BİLGİN'e en içten duygularıyla teşekkür ederim.

Araştırmalarım boyunca bilgi, ilgi ve yardımseverlikleriyle desteklerini gördüğüm ve her zaman rehberliklerine başvurduğum değerli hocalarım Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Asuman BİRİNCİ, Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Belma DURUPINAR, Doç. Dr. Yeliz TANRIVERDİ ÇAYCI ve Dr. Öğr. Üyesi Demet GÜR VURAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim süresince bana pek çok konuda destek olan Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı asistanları, doktora ve yüksek lisans öğrencileri ile laboratuvar çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren, ömrüm boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen, sevgilerini her anımda hissettiğim, haklarını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim canım annem Birgül NALBANT ve babam İsmet NALBANT'a, beni her zaman motive eden ablalarım Sümeyye NALBANT, Merve ÖZMEN'e ve kardeşim Umut NALBANT'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ailemden uzak olduğum bu süreçte bana abla, arkadaş aynı zamanda öğretmen olan, kendisini tanıdığım için çok şanslı hissettiğim Arş. Gör. İlknur BIYIK'a, bu süreçte bana yardım ve desteğiyle yanımda canım yurt arkadaşım Maysa SEYTİYEVA'ya ve birbirimizden uzakta olsak da hep yanımda hissettiğim, Şüheda BAŞOL'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi tarafından PYO.TIP.1904.20.008 proje numarası ile desteklenmiştir.

Gülsüm NALBANT

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	iii
ABSTRACT	v
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nın Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Etimoloji.....	3
2.1.2. Morfoloji ve Mikrobiyolojik Özellikleri	3
2.1.3. Biyokimyasal Özellikler	4
2.1.4. Virülans Faktörleri	4
2.1.5. <i>K. pneumoniae</i> 'da Biyofilm	5
2.1.6. <i>K. pneumoniae</i> 'nın Neden Olduğu Enfeksiyonlar	6
2.2. İdrar Yolu Enfeksiyonları	6
2.3. Biyofilm	7
2.3.1. Biyofilm Yapısı.....	7
2.3.2. Biyofilm Matriksi.....	8
2.3.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	10
2.3.4. Quorum Sensing Bakteriyel Hücreden Hücreye İletişim (Çoğunluk Algılama).....	12
2.4. Antimikrobiyal Ajanlar	12
2.4.1. Gentamisin	12
2.4.2. Meropenem	13
2.4.3. Seftriakson	13
2.4.4. Siprofloksasin	13
3. MATERYAL VE METOT	15
3.1. Materyal	15
3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen İzolatlar	15

3.2. Metot.....	15
3.2.1. Bakterilerin Tanımlanması	15
3.2.2. Biyofilm Varlığının Araştırılması.....	15
3.2.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi	17
3.2.4. Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi.....	17
3.2.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme	18
3.2.6. İstatistiksel Analiz	19
4. BULGULAR	20
4.1. Biyofilm Sonuçları	20
4.2. Minimum inhibitör Konsantrasyon (MİK) Sonuçları.....	21
4.3. Antibiyofilm Sonuçları	27
4.4. SEM Görüntüleri	29
5. TARTIŞMA	32
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
KAYNAKLAR.....	41
ÖZGEÇMİŞ	49

SİMGELER VE KISALTMALAR

µl: Mikro litre

ATCC: American Type Culture Collection

BİK: Biyofilm inhibisyon konsantrasyonu

CPS: Kapsüler polisakkarit

eDNA: Hücre dışı deoksiribo nükleik asit

EMB: Eozin metilen blue

EPS: Ekstraselüler polimerik madde

EUCAST: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

GSBL: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz

HV: Hipervirülan

İYE: İdrar yolu enfeksiyonu

KAMHB: Katyon ayarlı Mueller-Hinton broth

LPS: Lipopolisakkarit

MBC: Minimum bakterisidal konsantrasyonun

MBEC: Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyon

MDR: Çoklu ilaca dirençli

MİK: Minimum inhibisyon konsantrasyonu

QS: Quorum sensing

SEM: Taramalı elektron mikroskobu

TSB: Triptik soy broth

VİP: Vantilatör ilişkili pnömoni

XDR: yaygın ilaca dirençli

YBÜ: Yoğun bakım ünitesi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. <i>K. pneumoniae</i> izolatlarının servislere göre dağılım grafiği.....	20
Şekil 4.2. Mikrotitrasyon plağında biyofilm oluşturulması.....	21
Şekil 4.3. Antibiyofilm plak çalışma düzeni.....	29
Şekil 4.4. Meropenem'in 54 numaralı izolata antibiyofilm etkisinin SEM görüntüsü.....	30
Şekil 4.5. Seftriakson'un 46 numaralı izolata antibiyofilm etkisinin SEM görüntüsü.....	31

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nın taksonomisi.....	3
Tablo 2.2. <i>Klebsiella</i> türlerinin biyokimyasal reaksiyonları.....	4
Tablo 3.1. Biyofilm formasyon aktivitelerinin belirlenmesi.....	16
Tablo 4.1. Biyofilm oluşturan izolatların MİK değerleri	21
Tablo 4.2. Biyofilm oluşturan izolatların antibiyotik duyarlılık oranları.....	27
Tablo 4.3. Dört antibiyotik için duyarlı olan izolatların antibiyofilm değerleri.....	28

1. GİRİŞ

Klebsiella pneumoniae hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olabilen en önemli mikroorganizmalardan biridir (Follador ve ark., 2016). Bu mikroorganizma Enterobacteriaceae ailesinde bulunan gram negatif ve kapsüllü bir basildir (Vuotto ve ark., 2017). İnsan bağırsak mikrobiyotasının bir parçası olup sağlıklı bireylerde cilt ve nazofarinkste kolonize olabilir. Ayrıca *K. pneumoniae* toprak, bitki örtüsü, su gibi çeşitli çevresel nişlerde ve içme suyu dağıtım sistemlerinde de bulunabilmektedir. Altta yatan bazı hastalıkların varlığında ve bağışıklığı zayıflamış bireylerde, oluşturduğu fırsatçı enfeksiyonların frekansının yüksek olduğu bildirilmiştir (Follador ve ark., 2016; Seifi ve ark., 2016). Genellikle idrar yolu enfeksiyonları (İYE), pnömoni, sepsis ve yara enfeksiyonları ile ilişkili fırsatçı bir patojendir (Singla ve ark., 2013).

K. pneumoniae özellikle kapsül polisakkaridi, hipermukoviskozite, fimbriya, toksinler ve demir alım determinantları gibi pek çok virülans faktörüne sahiptir (Hennequin ve Robin, 2016). Diğer önemli bir virülans faktörü de biyofilm oluşturma yeteneğidir (Kuş ve ark., 2017). Kapsül ve fimbria, bakteri hücre yüzeyinin belirgin yapısal bileşenleridir ve biyofilm oluşumunda önemli bir role sahiptirler (Singla ve ark., 2013). *K. pneumoniae* kateterler ve endotrakeal tüp gibi kalıcı plastik cihazlarda biyofilm oluşturabilir ve daha sonra insan dokusunu kolonize edebilir (Singla ve ark., 2013).

Biyofilm, doğada sıklıkla rastlanılan bir mikrobiyal yaşam formudur ve çeşitli mikrobiyal türlerin kendilerini çevresel etkenlerden korunmak ve yaşamsal faaliyetleri için elverişli bir ortam sağlamak amacıyla oluşturdukları bir mikro-ekosistemdir (Temel ve Erač, 2018).

Biyofilimde hücre dışı polimerik maddeler, bakterileri opsonizasyon ve fagositozdan korur. Ayrıca in vitro deneyler, biyofilmlerdeki bakterilerin, planktonik formda bulunanlara göre antibiyotiklere daha az duyarlı olduğunu göstermektedir (Anderl ve ark., 2000).

Biyofilm içindeki bakteriler, fiziksel ve kimyasal bariyerler nedeniyle antimikrobiyal penetrasyonunda azalma, çoğalma hızında yavaşlama, mikrobiyal heterojenite ve direnç genlerinin aktarımı gibi nedenlerden dolayı antimikrobiyal ajanlara daha dirençlidirler. Ayrıca konakçı immün sistemine ve sıcaklık gibi dış etkenlere karşı planktonik formlara kıyasla daha dirençlidirler (Ashbaugh ve ark.,

2016; Eryılmaz ve ark., 2019). Bu durum kronik ve tedavisi zor enfeksiyonlara neden olabilmekte ve antibiyotik direnci genleri için bir rezervuar oluşturabilmektedir (Ashbaugh ve ark., 2016).

K. pneumoniae'nın biyofilm oluşturma yeteneği, patojeni konakçı bağışıklık tepkilerinden ve antibiyotiklerden korur, epitel dokularında ve tıbbi cihaz yüzeylerinde kalıcılığını artırır (Vuotto ve ark., 2017).

İYE sık görülen hastalıklar olup, üretra kateter ve stentleri gibi tıbbi malzemelerle kombine olduklarında, ciddi sorunlara yol açabilirler. Son yıllarda klinik ekipmanlarda biyofilm oluşumunun engellenmesi için topik antibiyotik kaplamaları, kateterizasyon süresinin azaltılması, manşet yerleştirilmiş kateter kullanılması ve kateterin antimikrobiyal ajanlarla kaplanması gibi bazı stratejiler önerilmiştir (Ceyhan, 2008). Bununla birlikte biyofilmin ortadan kaldırılması ve buna bağlı sistemik enfeksiyonların önlenmesi için uygun antibiyotiklerin seçilmesinde zorluk çekilebilmektedir (Narasimhaswamy ve ark., 2015).

Çalışmamızda idrar yolu enfeksiyonlarına sebep olan *K. pneumoniae*'nın biyofilm oluşturma yeteneğini ve gentamisin, meropenem, seftriakson ve siprofloksasin antibiyotiklerinin oluşan biyofilmi giderme yeteneklerinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Klebsiella pneumoniae*'nin Genel Özellikleri

2.1.1. Etimoloji

Enterobacteriaceae ailesine dahil olan *Klebsiella* cinsi, 1885'te Alman bakteriyolog Theodor Albrecht Edwin Klebs'in ismini almıştır. Klebs, mikroorganizmaların bulaşıcı hastalıklardan sorumlu olduğunu gösteren öncü çalışmaları ile bilinmektedir. Daha sonraki yıllarda *K. pneumoniae*'nin yaptığı ağır öldürücü pnömoni tablosunu araştırmacı Carl Friedlander ayrıntılı biçimde tanımlamasından dolayı *K. pneumoniae* yıllarca 'Friedlander basili' olarak isimlendirilmiştir (Ristuccia ve Cunha, 1984; Ustaçelebi, 1999). *K. pneumoniae*'nin taksonomisi Tablo 2. 1'de gösterilmektedir (Uniport, 2021).

Tablo 2. 1. *K. pneumoniae*'nin taksonomisi (Uniport, 2021)

Alem: Bacteria
Şube: Proteobacteria
Sınıf: Gammaproteobacteria
Takım: Enterobacterales
Aile: Enterobacteriaceae
Cins: <i>Klebsiella</i>
Tür: <i>Klebsiella pneumoniae</i>

2.1.2. Morfoloji ve Mikrobiyolojik Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesinin genel özelliklerine sahip olan *Klebsiella* cinsi bakteriler, kapsüllü, spor oluşturmayan, gram negatif, ikişer ikişer kısa zincir oluşturan 0.7-1.5 x 2.0-5.0 µm boyutlarında basillerdir. *Klebsiella* cinsi bakteriler değişik biyokimyasal özelliklere sahiptirler ve genellikle hareketsizken bazı türler hareketli olabilirler (Ustaçelebi, 1999; Bilgehan, 2000).

Klebsiella türleri su yüzeyleri, kanalizasyonlar, toprak ve bitkilerin oluşturduğu doğal çevrelere yerleşmiş olarak bulunabilirler. Ayrıca insanlar, atlar veya domuzların mukozal yüzeylerine de kolonize olabilirler. *K. pneumoniae* insanların nazofarenks ve intestinal sistemlerinde saprofit olarak bulunabilir. Gaitada bulunma oranı %5-38 arasında değişiklik gösterirken bu oran nazofarenkste %1-6'dır. Genellikle bu bölgelerde floranın geçici üyeleri olarak kabul edilebilmektedirler (Podschun ve Ullmann, 1998; Cheung, 2013).

2.1.3. Biyokimyasal Özellikler

Klebsiella türlerinin identifikasyonunda çeşitli biyokimyasal testler kullanılmaktadır. *K. pneumoniae* şekerleri (glikoz, laktoz, sükröz, mannitol) asit ve gaz oluşturarak fermente eder. *K. pneumoniae*'nın biyokimyasal özelliklerine bakıldığında üreaz pozitif, indol negatif, metil kırmızısı negatif, Voges-Proskauer (VP) pozitif, sitrat pozitifdir (IMViC - - ++). Ayrıca H₂S üretmez ve fenilalanini deamine etmezler (Procop ve ark., 2017).

Çeşitli *Klebsiella* türlerinin biyokimyasal özellikleri Tablo 2. 2'de toplu olarak gösterilmektedir (Aydoğan, 2000).

Tablo 2. 2. *Klebsiella* türlerinin biyokimyasal reaksiyonları (Aydoğan, 2000)

Özellikler	<i>K. pneumoniae</i>			<i>K. oxytoca</i>	<i>K. terrigena</i>	<i>K. planticola</i>	<i>K. ornithinolytica</i>
	<i>Subsp. pneumoniae</i>	<i>Subsp. ozaneae</i>	<i>Subsp. rhinoscleromatis</i>				
İndol	-	-	-	+	-	D	+
Ornitin dekarboksilaz	-	-	-	-	-	-	+
Lizin dekarboksilaz	+	D	-	+	+	+	+
Pektat dekarboksilaz	-	-	-	+	-	-	-
Laktozdan gaz oluşumu	+	-	-	-	-	-	-
10 °C'de üreme	-	-	-	+	+	+	+
D-melezitozdan asit oluşumu	-	-	-	D	+	-	-
L-sorbozdan asit oluşumu	D			+	+	+	
M-hidroksibenzoat oluşumu	-	-	+	+	-	-	-
Hidroksi-L-proline oluşumu	D			D	D	+	
Malonat oluşumu	+	-	+	+	+	+	+
Metil kırmızısı testi	-	+	+	-	+	D	+
Voges-proskauer reaksiyonu	+	-	-	+	+	+	+

(D) Değişken, (+) Pozitif, (-) Negatif

2.1.4. Virülans Faktörleri

K. pneumoniae virülans faktörleri, hem çekirdek hem de yardımcı genomlardaki genler tarafından kodlanır. Yerleşik virülans faktörleri arasında kapsül, lipopolisakkarit (LPS), sideroforlar ve pili bulunmaktadır (Podschun ve Ullmann, 1998). Başka virülans faktörleri de tanımlanmıştır, ancak tamamen karakterize edilmemiştir. Bu virülans faktörleri, dış zar proteinlerini (OMP'ler), porinleri, efflux

pompaları ve taşıyıcıları içerir (Júnior ve Franco, 2020). Allantoin kullanımı, diğer demir alım sistemleri, akış pompaları ve tip VI salgılama sistemi daha yakın zamanda virülans faktörleri olarak tanımlanmıştır. Allantoin kullanımı hipervirülan suşlarda tartışılmaktadır. Bu genler bir enfeksiyonun şiddetini ve dolayısıyla enfekte edici suşun virülansını belirleyebilir. Ayrıca, belirli bir suşun patojenik potansiyelini tanımlayarak kolonize edici bir suşun enfeksiyona ilerleme yeteneğini de belirleyebilirler (Eng ve Backman, 2018).

K. pneumoniae virülansına katkıda bulunan bazı faktörler vardır. Bunlar bakterilerin konakçıyı istila etmesini sağlayanlar, bakteri tarafından üretilen patogeneze katkıda bulunanlar ve konakçının organizmaları yok etme yeteneğini engelleyenler şeklinde sıralanabilir (Highsmith, ve Jarvis 1985).

K. pneumoniae, fimbrial adezinler, sideroforlar, O antijenleri ve kapsüler antijenler dahil patogeneze katkıda bulunan bir dizi virülans faktörü üretir (Schembri ve ark., 2005). Bu faktörlerden, kapsüler antijenler muhtemelen patojenitenin ana belirleyicileri olarak kabul edilir (Sahly ve ark., 2000). Kapsül, esas olarak bir polisakkarit matriksinden oluşur ve *K. pneumoniae* virülansı için gerekli olduğu bilinmektedir. *K. pneumoniae*'nin tüm suşları bu kapsülleri üretir, ancak patojenitelerini arttıran hipermukovasküler özellikleri ile bilinen hipervirülan suşlarda daha kalındır. Her iki suşun kapsülleri K antijenleri (K1 ve K2) adlı polisakkaritler tarafından oluşturulur. Bütün virülans faktörü genleri, kapsüler kalınlık nedeniyle hipervirülan (HV) suşları için daha belirgin olan bir antimikrobiyal direnç yol açabilir (Júnior ve Franco, 2020). Kapsülün büyüklüğü ve oranı kapsüler polisakkarit (CPS) üretiminin virülansı büyük ölçüde etkilediği gösterilmiştir (Highsmith ve Jarvis, 1985).

Pili veya fimbrialar *K. pneumoniae*'de konakçı hücreye bağlanabilir ve mukozal yüzeye yapışma kapasitesi, bir mikroorganizmanın konağın savunmasını aşma ve enfeksiyona neden olma kabiliyetinde belirleyici bir faktör olabilir (Highsmith ve Jarvis, 1985).

2.1.5. *K. pneumoniae*'da Biyofilm

Bakteriler planktonik hücreler veya biyofilm topluluğu halinde yaşarlar. Hayatta kalabilmek için doğru olan yaşam formunu seçmek önemlidir ve ayrıca patojenler için bu seçimin virülansla ilişkili olduğu bilinmektedir (Cotter ve Stibitz, 2007). Bakteriye biyofilm, yapılandırılmış bir bakteri topluluğudur (Pinna ve ark., 2005). Biyofilm

oluşumu, organizmaların yok edilmesini engelleyen patojenik bir mekanizmadır (Naves ve ark., 2007). İyi kurulmuş biyofilmlerin yüzeylerden uzaklaştırılması zordur. Apatit ve bakteriyel yüzeylerde oluşan ekstraselüler polimerik madde (EPS), ilk mikrobiyal kolonizasyonu ve hücre kümelenmesini destekleyen bir polimerik matris oluşturur. Sürekli EPS üretimi, EPS'nin iç içe geçmiş bakteri hücrelerinin bir çekirdeğini oluştururken matriksi 3 boyutta daha da genişletir; bu çekirdek, mikrokolonilerin gelişimini kolaylaştıran destekleyici bir çerçeve sağlar (Koo ve ark., 2013).

Birçok klinik *Klebsiella* izolatu, konakçı hücre yüzeyine spesifik bağlanmaya aracılık eden ve biyofilm oluşumunu kolaylaştıran fimbrial adhezinlere (tip 1 ve 3 fimbriae) sahiptir (Pinna ve ark., 2005). Bu virülans belirleyicileri bakteriyel bağlara aracılık edebilir ve bunu hücrelerin matriks kaplı biyofilm içinde mikrokoloni oluşumunu izler (Pinna ve ark., 2005).

2.1.6. *K. pneumoniae*'nin Neden Olduğu Enfeksiyonlar

K. pneumoniae, Enterobacteriaceae familyasının gram negatif, kapsüllü, fırsatçı bir patojenidir. Özellikle pnömoni, aynı zamanda menenjit, sepsis ve İYE, karın içi enfeksiyon, piyogenik karaciğer apsesi, cihazla ilişkili ve cerrahi yara yeri enfeksiyonları gibi geniş bir enfeksiyon yelpazesine sahip en yaygın gram-negatif patojen *Escherichia coli*'den sonra ikinci sıradadır (Ribeiro ve ark., 2015; Vading ve ark., 2018).

Florada sınırlı sayıda bulunmasına rağmen kolonizasyonunun, hastanede fazlaca kalmak, operasyon geçirmek, damar içi ve üriner kateter yerleştirilmesi ve antibiyotik tedavileri ile ilişkili olması ile birlikte yatan hastalarda %20 kadar yüksek bir prevalans bildirilmektedir (Temiz ve ark., 2015; Procop ve ark., 2017).

Bu kolonizasyonun genellikle alkolizm, diabetes mellitus ve kronik obstrüktif akciğer hastalığı gibi zayıflatıcı koşulları olan hastalarda ortaya çıkan akciğer enfeksiyonlarının kaynağı olduğu düşünülmektedir (Procop ve ark., 2017).

2.2. İdrar Yolu Enfeksiyonları

Önemli bir sağlık sorunu olan İYE, en yaygın bakteriyel enfeksiyonlardan biri olarak kabul edilmekte ve her yıl milyonlarca insanı etkilemektedir (Foxman, 2002; Lin ve ark., 2010). Nozokomiyal enfeksiyonların en yaygın olanlarından biri olan bu enfeksiyonların çoğu kalıcı idrar sondası ile ilgilidir (Trautner, 2010). İYE artan

mortalite ile birlikte sağlık hizmetlerinde küresel ekonomiyi olumsuz yönde etkilemektedir (Gonzalez ve Schaeffer, 1999).

İYE'ler yeni doğan erkek bebeklerde, yaşı erkeklerde ve kadınlarda her yaşı morbiditeye sebep olan önemli nedenlerdendir. Sıklıkla kullanılan antimikrobiyallerin neden olduğu ciddi sekeller arasında sık nksler, sepsisli piyelonefrit, kk çocuklarda böbrek hasarı, erken doğum, yüksek düzeyde antibiyotik direnci ve *Clostridium difficile* koliti gibi komplikasyonlar bulunur (Flores-Mireles ve ark., 2015).

K. pneumoniae'nin invaziv suşılarında, bir dizi virülans faktörü tanımlanmış olmasına rağmen bu genlerin ve fenotiplerin, İYE ile nasıl ilişkili olduğu yeterince açık değildir (Lin ve ark., 2010).

2.3. Biyofilm

Biyofilmler, eşıtlı mikrobiyal türlerin canlı ya da cansız yüzeyle ve birbirlerine tutunabilen ekstraselüler polimerik yapıdaki matriks içine gömülü hücrelerden oluşıan mikro-ekosistem olarak tanımlanabilir (Gün ve Ekinci, 2009; Temel ve Era, 2018; Eryılmaz ve ark., 2019).

Biyofilmi ilk olarak 1676 yılında Antonie van Leeuwenhoek kendi ilkel mikroskopu ile dişı plağında gözlemlemiştir. 1943 yılında planktonik formdaki bakteriler üzerinde yaptığı bir araştırmada Zobell, mikroorganizmaların bir kısmının yzeyeye tutunmuş halde olduğunu, hatta yzeyeye tutunmuş mikroorganizmaların sayıca daha fazla olduğunu belirlemiştir (Zobell, 1943; Costerton, 1999).

2.3.1. Biyofim Yapısı

Biyofilmler öncelikle mikrobiyal hücreler ve EPS'den oluşıur. EPS, biyofilmlerin toplam organik karbonunun % 50-90'ını oluşıturabilir ve biyofilmin birincil matriks malzemesi olarak kabul edilebilir (Donlan, 2002).

Doğal çevrede sık rastlanabilen bir mikrobiyal yaşıam formu olan biyofilm, eşıtlı mikrobiyal türlerin çevresel etkenlerden korunmak ve yaşıamsal faaliyetleri açısından elverişıli ortamda kalabilmek adına oluşıturdukları bir yapıdır (Temel ve Era, 2018).

Bakterilerin katı yüzeylere yapışabileceği ve ince, kaygan bir kat oluşturabileceği bilinmektedir. Bu bakteriyel biyofilmler, doğada bulunan çoğu ıslak yüzeyde yaygındır ve çevresel sorunlara neden olabilmirler (Costerton ve ark., 1999).

Biyofilm tabakasının en küçük birimleri mikrokolonilerdir. Mikrokoloniler ince biyofilm tabakalarında yatay, kalın biyofilm tabakalarında ise dikey planda düzenlenir. Bu düzenlenmede en önemli etkenler su akış hızı ve yüzey gibi çevre koşullarıdır (Percival, 1999).

Biyofilmlerin yapısı, pek çok faktörden etkilenebilir. Bunlar, hidrodinamik şartlar, besinlerin konsantrasyonları, bakteriyel hareket ve hücre içi iletişim şeklinde sıralanabilir. Ayrıca ekzopolisakkaritler ve proteinlerin, biyofilmin morfolojisini değiştirdiği, EPS'yi eksik sentezleyen mutant bakterilerle çalışılarak da gösterilmiştir. (Watnick ve Kolter, 1999).

Mikroorganizmalar tarafından üretilen EPS, esas olarak polisakkaritlerin yanı sıra proteinler, nükleik asitler, lipitler ve hümitik maddelerden oluşan karmaşık bir biyopolimer karışımıdır. EPS, mikrobiyal agregatların hücreler arası boşluğunu, biyofilm matriksinin yapısını ve mimarisini oluşturur (Flemming ve Wingender, 2010).

2.3.2. Biyofilm Matriksi

Biyofilmde EPS

Genel olarak EPS, biyofilm sistemlerinde hücrelerin ve diğer materyallerin bağlanmasından sıklıkla sorumlu olan mikrobiyal kökenli organik polimerler olarak tanımlanabilir (Wingender ve ark., 1999).

Biyofilm matriksindeki bu EPS bileşenleri, bakteriyel aktif sekresyonu, hücre yüzeyi materyalinin dökülmesi ve hücre lizisinin yanı sıra çevre ortamlardan adsorpsiyonun sonucunda oluşabilir (Wingender ve ark., 1999).

EPS'nin olgun bir biyofilmde %90'ın üzerinde bir paya sahip olduğu, bakteri hücrelerinin ise sadece %10'dan daha azını oluşturduğu tahmin edilmektedir (Flemming ve Wingender, 2010).

EPS sadece biyofilm oluşumu sırasındaki gelişim evrelerine katkıda bulunmakla kalmaz, aynı zamanda gömülü bakteriyel hücreler için önemli avantajlar sağlar. Bu

nedenle, EPS bileşenlerini ve bunların gömülü bakteriler ve biyofilmler için rollerini tam olarak anlamak önemli bir ilgi alanıdır (Flemming ve Wingender, 2010).

Polisakkaritler

Polisakkaritler, biyofilm EPS'nin önemli bir bileşenidir ve biyofilm oluşumu sırasında bakteriyel yapışma, polimer ağının oluşumu, gömülü hücrelerin korunması, su ve besin maddelerinin tutulması dahil olmak üzere önemli işlevler de rol oynarlar (Flemming ve Wingender, 2010).

Su

Biyofilm kütlelerinin %97 gibi büyük bir kısmını su oluşturur (Gün ve Ekinci, 2009). EPS matriksi, biyofilm hücrelerini su potansiyelindeki dalgalanmalara karşı tamponlayan yüksek derecede hidratlı bir ortam sağlar. EPS higroskopiktir ve belirli su bağlama mekanizmaları yerine entropik olarak suyu tutarak çevresinden daha yavaş kurumasını sağlar. Kuruma, biyofilm topluluğuna fayda sağlayan çevresel koşullardan biridir. EPS'yi yoğunlaştırarak birbirleriyle reaksiyona girebilecek spesifik olmayan bağlanma yerlerinin sayısını artırır ve biyofilm hacmini azaltır (Flemming ve Wingender, 2010).

Biyofilm yapısında mikrokolonilerin hem altında hem de arasında su kanallarının bulunduğu gözenekli bir yapı bulunur. Bu kanallar, besinlerin biyofilm tabanına taşınmasını sağlar ve içindeki alanlara oksijen taşır ayrıca hücrel atıkları da gizler (Gün ve Ekinci, 2009).

Hücre Dışı DNA (eDNA)

Türler arasında çok farklı miktarlarda eDNA içeriği bulunup en çok miktarın atık su biyofilmlerinde olduğu bildirilmektedir. eDNA lize edilmiş hücrelerden çıkan artık materyal olsa da matriksin yapısal bileşenlerinden birisidir (Flemming ve Wingender, 2010).

eDNA'nın lokalizasyonu biyofilmler arasında büyük farklılıklar gösterebilir. Izgara benzeri, iplikli bir ağ veya halat şeklinde yapılar oluşturabilen eDNA ayrıca mantar şeklindeki mikrokolonilerde sapın dış kısmında yüksek oranda bulunmaktadır (Flemming ve Wingender, 2010).

eDNA biyofilm oluşumu sırasında çeşitli roller üstlenmektedir. Bunlar arasında mikrobiyal agregasyonu büyük ölçüde artırması, biyofilm matriksinin

stabilizasyonunu sağlaması ve hücreler arası bir bağlayıcı görev görmesi sayılabilmektedir (Chao, 2013).

Sümfaktanlar ve Lipitler

Sümfaktanlar ve lipitler EPS’de bulunan hidrofbik bileşiklerdir (Conrad ve ark., 2003; Flemming ve Wingender, 2010). Sümfaktanlar hem hücreden hücreye, hem de hücreden yüzeye etkileşimi etkileme potansiyeline sahiptir (Davey ve ark., 2003).

Biyosümfaktan üreten bakteriler, hücre yüzeyinde veya hücre zarında glikolipitler, lipopeptit, lipoprotein, yağ asitleri, fosfolipitler, nötr lipidler gibi yüzey aktif maddeler üretebilir (Chao, 2013).

Lipidler biyofilm matriksinde durumunu korur olmasına rağmen, yapılan çalışmalarda biyofilmler olgunlaştıkça lipit içeriğinin başlangıçtaki yoğunluklarından daha fazla olduğu kanıtlanmıştır (Chao ve Zhang, 2011).

Proteinler

EPS matriksinin önemli bir parçası olan proteinler, biyofilm gelişimi için enzimatik aktiviteye sahiptir. Elektron vericisi veya alıcısı gibi fonksiyonları diğer EPS elemanları ile karşılaştırıldığında benzersiz özelliklere sahiptir (Flemming ve Wingender, 2010).

Hücre yüzeyiyle ilişkili ve hücre dışı karbonhidrat bağlayıcı proteinler gibi matristeki enzimatik olmayan proteinler, polisakkarit matris ağının oluşumunda ve stabilizasyonunda rol oynar ve bakteri yüzeyi ile hücre dışı EPS arasında bir bağlantı oluşturur (Flemming ve Wingender, 2010).

2.3.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları

Biyofilm tabakası her ne kadar karmaşık bir dinamiğe sahip olsa da kendi içerisinde biyolojik dönüşümler geçirmektedir (Gün ve Ekinci, 2009).

Biyofilm oluşum basamakları aşağıdaki gibi sıralanabilmektedir;

- 1: Mikrobiyal yapışma,
- 2: Hücrelerin ürettikleri EPS ile yüzeye bağlanması,
- 3-4: Mikrokoloni oluşumu ve biyofilm yapısının olgunlaşması ve
- 5: Olgun biyofilmdeki hücrelerin dağılması (Francolini ve ark., 2020).

Bakterilerin bağlanması

Biyofilm oluşması ilk olarak bakteri hücrelerinin bir yüzeye yapışması ile başlar (Stanley ve Lazazzera, 2004). Hücre ve substratın hidrofobikliği, yüzey yükünün yanı sıra yüzey pürüzlülüğü ve substratın mikro-topografisi bakteriyel hücrenin bağlanması sırasında önemli bir role sahiptir (Husmark ve Ronner, 1992; Palmer ve ark., 2007) .

Bakteriyel hücreler ve substrat arasında gelişen ilk zayıf etkileşimler, tersinir bağlanma olarak adlandırılır. Tersinir bağlanmada bakteri hücreleri alt tabakaya yaklaşır ve ardından ilk tersinir bağlanma, Van der Waals kuvvetleri, elektrostatik kuvvetler ve hidrofobik etkileşimler nedeniyle oluşur (Carpentier ve Cerf, 1993; Palmer ve ark., 2007). Bağlı hücreler, EPS üreterek yüzeye yapışır. Tersinirden tersinmez bağlanmaya dönüşümde, daha güçlü olan kovalent ve hidrojen bağları gibi hidrofobik etkileşimler yer alır (Chao, 2013).

Mikrokoloni ve olgun biyofilm gelişimi

Bakteri hücreleri bir yüzeye tutunduktan sonra, diğer hücrelerin bağlanması ve büyümesi için mikrokolonilere dönüşür. Mikrokoloniye oluşturmak ve bir arada tutmak için klonal büyüme ve stabil hücre-hücre etkileşimlerine ihtiyaç vardır (Dunne, 2002; Stanley ve Lazazzera, 2004).

Su ve besin maddelerinin taşınmasını ve mikrobiyal atıkların uzaklaştırılmasını sağlayan kanallarla bakteri hücresi arasında kümeleri içeren 3 boyutlu bir yapı olan olgun bir biyofilm oluşur. (Annous ve ark., 2009).

Bakteri hücrelerinin dağılması

Olgun biyoofilmin derinliği, maksimum besin alımına izin verecek şekilde düzenlenmiş gibi görünmektedir. Biyofilm oluşumu, muhtemelen hücrelere bir biyofilm içinde bulunmanın büyüme avantajının olmadığı, besin açısından zengin bir ortamda olduklarının bir göstergesi olarak, katabolit baskılama ile inhibe edilir. Hücreler planktonik aşamadayken, besin maddelerine maruz kalan daha büyük hücre yüzey alanı vardır. Yüksek hücre yoğunluğunda besinin sınırlı olduğu koşullarda biyofilm dağılımı optimal besine erişene kadar devam eder (Stanley ve Lazazzera, 2004).

Akış hücrelerinde, büyüyen biyofilmlerin doğal dağılımının, olgun biyofilmlerin merkezinde bulunan bakteriler tarafından başlatıldığı bildirilmiştir. Hücreler

matriksdeki küçük açıklıklar yoluyla biyofilm yapısından koordineli olarak tahliye edilir ve arkalarında büyük boşluklar veya hareketsiz hücrelerden oluşan içi boş yapılar bırakarak çevredeki ortama girebilirler (Rumbaugh ve Sauer, 2020).

2.3.4. Quorum Sensing Bakteriyel Hücreden Hücreye İletişim (Çoğunluk Algılama)

Quorum Sensing (QS); Biyofilm oluşumunda önemli bir mekanizma olan ‘oto-indükleyiciler’ olarak isimlendirilen kimyasal sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını belirlenmesinde ve bu verileri diğerlerine iletmesinde, hücreler arası sinyalleşme için bakteri gen ekspresyonunun hücre yoğunluğuna bağlı regülasyonunun bir mekanizmasıdır (Romeo, 2008; Gün ve Ekinci, 2009).

Quorum sensing, Nealson ve ark. tarafından *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi* biyoluminesansları araştırılırken bulunmuştur. QS mekanizmaları; biyofilm formasyonu, virulans adaptasyonu, antimikrobiyal madde üretimi, hareket ve sporulasyon gibi olaylarda rol almaktadır (Kaya ve Yardımcı, 2014). Biyofilm içinde bakteriler, aktivitelerini bir araya getirmek ve çok hücreli organize bir şekilde hareket etmek için hücre-hücre iletişim sistemlerini kullanırlar (Costerton ve ark. 2003). Bakteri, bu sinyal-yanıt sistemini kullanarak, popülasyon düzeyinde bireysel davranışlarını sekronize eder ve çok hücreli organizma gibi davranır (Kaya ve Yardımcı, 2014).

Bakterinin patogeneğinde çok önemli görev üstlenen QS sisteminde, düşük hücre yoğunluğunda oto-uyaran bazal seviyelerde sentezlenir ve ortama yayılarak yoğunluğu azalır. Hücre yoğunluğu arttıkça, hücre içi oto-uyaran yoğunluğu da belirli bir dereceye kadar artar, kritik konsantrasyona ulaştığında, oto-uyaran kendi özgül R-proteinine bağlar. R-protein/oto-uyaran kompleksi özgül DNA dizilerine bağlanır ve hedef genlerin transkripsiyonunu artırır (Karatuna ve Yağcı, 2008).

2.4. Antimikrobiyal Ajanlar

2.4.1. Gentamisin

1963 yılında Weinstein ve arkadaşları tarafından keşfedilen gentamisin, *Micromonospora purpurea*'nın fermantasyonu ile üretilir (Weinstein ve ark., 1963).

Gram negatif ve sınırlı gram pozitif organizmalara karşı bakterisid etkilidir. Aminoglikozidler etkilerini bakteride 30S ribozoma bağlanarak protein sentezini inhibe ederek gösterirler. Biyokimyasal olarak tümüyle açıklanamamakla birlikte aminoglikozid antibiyotiklerin bakterisid etkilerinde, translasyon sırasında yanlış okuma, membran harabiyeti, elektron transportuna etki ve morfolojik değişiklikler gibi fizyolojik etkilerin de rol oynadığı düşünülmektedir (Hayward ve ark., 2018; Hemmati ve ark., 2020).

2.4.2. Meropenem

Meropenem, hücre duvarı sentezinde yer alan penisilin bağlayıcı proteinlere kovalent olarak bağlanarak bakteriyel hücre ölümüne neden olur. Meropenem, imipeneme etki spektrumu olarak benzemektedir fakat bununla birlikte 1beta metil grup ve 2-tiopirolidinil eki olması sebebiyle DHP-1'e dayanıklı hale gelmiştir ve uygulamada silastatine gerek kalmamıştır. Klinik önemi olan hemen tüm aerobik ve anaerobik mikroorganizmalara karşı etkili olduğu bilinmektedir. Meropenem, stafilokoklarda bulunan bazı enzimler ve gram negatif bakterilerde bulunan karbapenemazlar hariç diğer tüm beta laktamazların hidrolizine karşı dirençlidir. İmipeneme göre direnç gelişimi daha düşüktür (Yılmaz, 2017).

2.4.3. Seftriakson

Seftriakson ilk 1978'de sentezlenmiş bununla birlikte, gram-pozitif ve gram-negatif aerobik bakterilerin neden olduğu geniş bir aktivite spektrumuna sahip üçüncü nesil bir sefalosporindir. Genellikle gram negatif bakterilere karşı önceki kuşaklardan daha etkilidir. Seftriakson, diğer antibiyotiklere cevap veremeyen hastalarda ve normal tedaviye dirençli Enterobacteriaceae'nin neden olduğu idrar yolu enfeksiyonlarında başarıyla kullanılmıştır (Richards ve ark., 1984).

Enterobacteriaceae'ye karşı seftriaksonun gösterdiği değişken aktivite, AmpC β -laktamazları hiper-üretebilen, bastırılmış mutantların ve ayrıca genişlemiş spektrumlu beta laktamaz'ları (GSBL) eksprese eden suşların hızlı ortaya çıkışının bir yansımasıdır (Lamb ve ark., 2002).

2.4.4. Siprofloksasin

Siprofloksasin, in vitro antibakteriyel aktiviteye sahip geniş spektrumlu florlanmış kinolondur. 1980'lerde piyasaya sürülmesinden beri gram-negatif bakterilerin çoğu, in vitro olarak yüksek duyarlılık gösterirken; gram pozitif bakteriler

genellikle duyarlı veya orta duyarlı olmuştur. Siprofloksasin ve diğer kinolonların birincil etki mekanizması, bakteriyel DNA girazı inhibisyonunu içerir. Siprofloksasin, neredeyse tüm Enterobacteriaceae türlerine karşı duyarlılığa sahiptir. Gram-negatif patojenlerin neden olduğu çok çeşitli enfeksiyon tedavisinde etkilidir (Richards ve ark., 1988; Davis ve ark., 1996).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Çalışmaya Dahil Edilen İzolatlar

Bu çalışma, Ondokuz Mayıs Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu B.30.2.ODM.0.20.08./81 sayılı izni ile yürütülmüştür (Ek-1).

Çalışmaya Ağustos 2019 - Mart 2020 tarihleri arasında Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Tıp Fakültesi Hastanesi, Mikrobiyoloji Laboratuvarı'na çeşitli servislerden rutin gönderilmiş olan idrar örneklerinden izole edilen toplam 181 *K. pneumoniae* suşu dahil edilmiştir. Örnekler belirlenirken tekrar izolatların dahil edilmemesine dikkat edilmiştir. Suşlar saklama besiyerinde, çalışılncaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir. Ayrıca bu izolatların hangi servislerden gönderildiği de kaydedilmiştir. Kontrol suşları olarak biyofilm oluşturmadağı bilinen *E. coli* ATCC 25922 ve biyofilm oluşturduğu bilinen *K. pneumoniae* ATCC 700603 standart suşları kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Bakterilerin Tanımlanması

Çalışmaya dahil edilen izolatların tanımlanması, Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı'nda uygulanan rutin işlemlerle yapıldı. Bu işlemler sırasıyla; idrar örneklerinin %5 koyun kanlı agar (bioMérieux, Fransa) ve Eosin Methylene Blue (EMB) (bioMérieux, Fransa) agara ekilmesi; ekimi yapılan besiyerleri 36°C de 18-24 saat inkübasyona bırakılması; inkübasyon işleminin sonucunda üreyen kolonilerin değerlendirilmesi şeklindeydi. Bu değerlendirmeden sonra tür düzeyinde tanımlanma işlemi Vitek-MS (bioMérieux, Fransa) sistemi ile yapıldı.

3.2.2. Biyofilm Varlığının Araştırılması

Mikrotitrasyon Plak Yöntemi

Saklama besiyerinden muhafaza edilen *K. pneumoniae* izolatları kanlı agar besiyerine tek koloniler oluşturacak şekilde pasajlandı ve 36°C de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda saf olduğundan emin olunan kültürlerden %0,25 glukoz içeren Tryptic Soy Broth (TSB) (Biolife, İtalya) besiyerine ekim yapıldı ve 36°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminden sonra her izolat

%0,25 glikoz içeren TSB besiyeri ile 1/20 oranında dilüe edilerek, 96 kuyucuklu düz tabanlı polistren mikrotitrasyon plağının üç kuyucuğuna 200'er µl konuldu ve plaklar 36°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon işleminin sonunda kuyucuklardaki besiyeri aspire edildi ve bu işleminden sonra 3 kez distile su ile nazikçe yıkayarak planktonik hücreler uzaklaştırıldı ve ardından ters çevrilip kurumaya bırakıldı. Bu işlemin ardından %1'lik kristal viyole solüsyonundan 100'er µl tüm kuyucuklara dağıtıldı ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletilerek oluşan biyofilmlerin boyanması sağlandı. Süre dolduktan sonra boya aspire edilip kuyucuklar 3 kez distile su ile yıkandı ve oda ısısında kurutuldu. Bu işlemten sonra boyanın çözünmesini sağlamak için etanol/aseton (80/20) solüsyonu her kuyucuğa 200 µl eklendi ve 10 dk bekletildikten sonra ELISA reader optik okuyucu (Chromate Awareness Technology, ABD) cihazında 492 nm dalga boyunda okutuldu. Elde edilen optik dansite (OD) değerleri yorumlanmak üzere kaydedildi. Çalışmamızda her plakta pozitif kontrol olarak *K. pneumoniae* ATCC 700603, negatif kontrol suşu olarakta *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı (Chrestensen ve ark., 1985).

Sonuçlar Chrestensen ve ark.; Chusri ve ark.'nın çalışmalarında tanımladıkları biyofilm formasyon aktivite değerlendirme ölçeği kullanılarak değerlendirilmiştir (Christensen ve ark., 1985; Chusri ve ark., 2012).

Tablo 3.1. Biyofilm formasyon aktivitelerinin belirlenmesi (Chusri ve ark, 2012)

Optik Dansite	Yapışma	Skor
KOD > MBOD	Yapışma olmayan	0
KOD < MBOD < 2 KOD	Zayıf yapışma	1
2KOD < MBOD < 4 KOD	Orta derece yapışma	2
4KOD < MBOD	Güçlü derecede yapışma	3
KOD: Konrtol Optik Dansitesi MBOD: Mikroorganizma Biyofilmi Optik Dansitesi		

3.2.3. Minimum İnhibitör Konsantrasyonunun (MİK) Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen antibiyotikler; gentamisin, seftriakson, siprofloksasin ve meropenem uygun çözücüler ile çözülerek 4096 µg/ml stoklar halinde hazırlandı ve bu stoklar çalışılncaya kadar -20°C’de saklandı.

Biyofilm ürettiği tespit edilen izolatların her antibiyotik için MİK değerleri mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlendi. Mikrodilüsyon yöntemini uygulayabilmek için steril 96 kuyucuklu U tabanlı plaklar (TPP, Switzerland) kullanıldı. Tüm kuyucuklara 100 µl kasyon ayarlı Mueller-Hinton Broth (KAMHB) (HiMedia, Hindistan) konuldu. İlk kuyucuklara antibiyotikler istenilen final konsantrasyonun 2 katı kadar olacak şekilde hazırlandı ve 100 µl dağıtıldı. Daha sonra 10. kuyucuğa kadar seri dilüsyon yapılarak final konsantrasyonlar hazırlandı. Bu işlem uygulanarak gentamisin ve meropenem için 256-0.5 µg/ml, seftriakson için 128-0.25 µg/ml ve siprofloksasin için de 32-0.06 µg/ml final konsantrasyonlar hazırlanmış oldu. 11. kuyucuk pozitif kontrol, 12. kuyucuklar ise negatif (sterilite) kontrol olarak kullanıldı. Tüm antibiyotikler ayrı plaklar hazırlandı ve çalışana kadar -20 °C de saklandı (Aktaş, 2013).

Mikrodilüsyon çalışılacak izolatlar kanlı agar besiyerinde taze olarak üretildi ve saf olduğundan emin olunduktan sonra 0.5 McFarland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandı. Bu süspansiyon KAMHB kullanarak 1/10 oranında dilüe edildi ve negatif kontrol hariç tüm kuyulara 5 µl dağıtıldı. İnokülüm işlemi tamamlanan plaklar 37°C’de 18-20 saat inkübe edildikten sonra üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon, MİK değeri olarak değerlendirildi (Dündar, 2013).

Biyofilm üretmi tespit edilen her mikroorganizma için tüm antibiyotikler çalışıldı ve sonuçlar European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)’a göre değerlendirildi ve kaydedildi (EUCAST, 2021).

3.2.4. Antibiyofilm Aktivitesinin Belirlenmesi

Biyofilm oluşumu orta derece (+2) olarak tespit edilen ve çalışmamıza dahil edilen dört antibiyotiğe de duyarlı olan 7 izolat antibiyofilm aktivitesi yönünden çalışılmıştır. Bu 7 *K. pneumoniae* izolatı kanlı agar besiyerine pasajlandı. Saf koloniler oluşturduğu görülen izolatlar %0,25 glukoz içeren TSB besiyerine ekilerek 36°C’ de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra kültürler %0,25 glukoz içeren TSB besiyeri ile 1/20 oranında dilüe edildi. Elde edilen inokülumlar her bir mikroorganizma için mikrotitrasyon plağına 8 sütun X 8 satır olacak şekilde 64

kuyucuğa 200'er µl eklendi. Aynı şekilde hazırlanan pozitif kontrol izolat 9. sütuna, negatif kontrol izolat ise 10. sütuna eklendi ve 11. ve 12. sütunlar blank olarak kullanıldı. Bu şekilde hazırlanan mikrotitrasyon plağı 36°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

İnkübasyonun sonunda kuyucuklardaki besiyeri, oluşmuş olan biyofilme zarar vermeden aspire edildi. Ardından tüm kuyucuklar %0,25 glukoz içeren TSB ile bir kez yıkandı.

Öncede hazırlanmış olan stok antibiyotikler için %0,25 glukoz içeren TSB besiyerinde 32-0.25 µg/ml konsantrasyonlarında sulandırıldı. Her izolat için ayrı ayrı hazırlanan plaklar da her antibiyotik iki sütunda olacak şekilde dizayn edildi. Plak dışında hazırlanan antibiyotik final konsantrasyonları kuyucuklara 200'er µl dağıtıldı. Kontrol ve blank sütunlarındaki besiyerleri aspire edildikten sonra %0,25 glukoz içeren TSB besiyerinden 200'er µl taze olarak eklendi. Ardından plaklar 36°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun sonunda kuyucuklardaki besiyeri nazıkçe aspire edildi ve 3 kez distile su ile yıkanan kuyucuklar kurutuldu. %1'lik kristal viyole solüsyonundan tüm kuyucuklara 100'er µl eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Boyama işleminden sonra aspire edilip 3 kez düstile su ile yıkanan kuyucuklar kurumaya bırakıldı. Etanol/aseton (80/20) solüsyonu hazırlandı ve her kuyucuğa 200µl eklendi ve 10 dk bekletildikten sonra ELISA reader optik okuyucu cihazında 492 nm dalga boyunda okutuldu. OD değerleri her antibiyotik konsantrasyonu için değerlendirildi (Presterl ve ark., 2005; Narasimhaswamy ve ark., 2015; Öcal ve ark., 2017)

3.2.5. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntüleme

Mikrotitrasyon plak yönteminde meropenem ve seftriakson antibiyotiklerinin antibiyofilm aktivitesi gösterdiği 46 numaralı izolat elektron mikroskobu ile antibiyofilm aktivitesinin görüntülenebilmesi için seçildi.

Bu işlem için 46 numaralı *K. pneumoniae* izolatı kanlı agar besiyerine pasajlandı ve bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda oluşan kolonilerden %0,25 glukoz içeren TSB besiyerine ekim yapıldı ve 36°C' de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon işleminden sonra kültürler %0,25 glukoz içeren TSB besiyeri ile 1/20 oranında dilüe edildi. Elde edilen inokulumdan 2 ml 24 kuyucuklu polistrien plaklara dağıtıldı ve önceden otoklavlanarak steril edilen lamel parçaları kuyucuklara yerleştirildi.

Hazırlanan plak 36°C’ de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda besiyeri aspire edildi ve %0,25 glukoz içeren TSB besiyeri ile bir kez yıkandı. Bu işlemden sonra stok meropenem ve seftriakson antibiyotikleri %0,25 glukoz içeren TSB besiyeri kullanılarak 8-0,5 µg/ml ve 16-1 µg/ml arasındaki değerlerde son konsantrasyonlar hazırlanacak şekilde dilüğe edildi ve kuyucuklara 1 ml aktarıldı. Ayrıca pozitif kontrol olarak kullanmak amacıyla hiç antibiyotik olmayan kuyucukta aynı şekilde hazırlandı. Hazırlanan 24 kuyucuklu polistrien plaklara 36°C’ de bir gece inkübasyona bırakıldı. İşlem sonunda kuyucuklardaki besiyeri boşaltıldı ve kuyucuklardak lamel parçaları yıkandı. Yıkama işleminden ardından temiz bir başka 24 kuyucuklu plağa üzerinde biyofilm oluşturulan lameller alt üst edilmeden aktarıldı. Kuyucuklara lamel parçalarını kapatacak şekilde 1 ml %4 glutaraldehit ilave edildi ve 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. Süre sonunda glutaraldehit aspire edildi ve kuyucuklara sırasıyla; %70, %80, %90, %96 ve saf olacak şekilde 1’er ml etil alkol (Isolab, Almanya) eklendi ve her biri için 10 dakika oda ısısında bekletildi. Son alkol solüsyonu aspire edildikten sonra karanlık bir ortamda oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı.

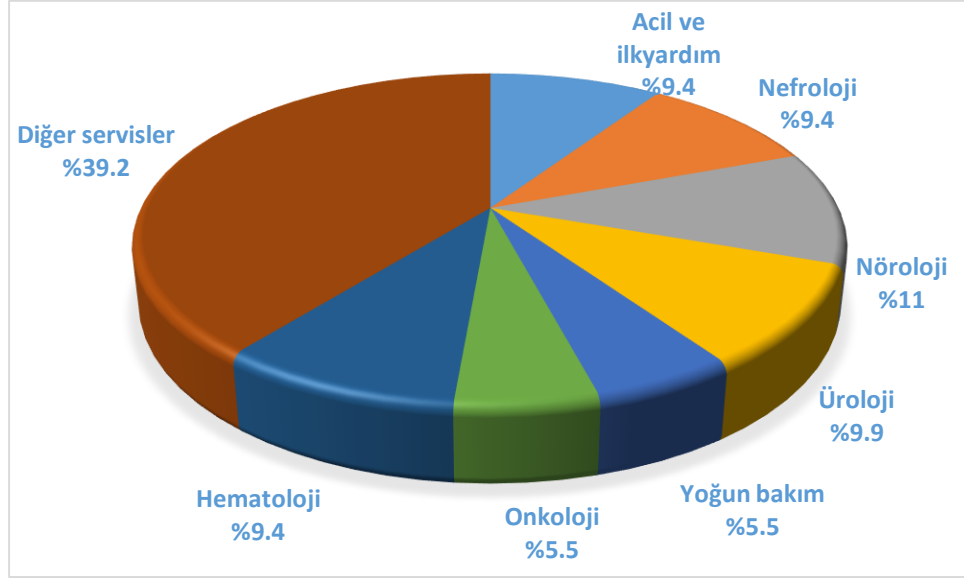
SEM görüntüleme Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Karadeniz İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi’n de yapıldı. Taramalı elektron mikroskopunda (JEOL, ABD) görüntülenmek için lameller çift taraflı karbon bant ile alüminyum saplamalara yapıştırılarak kaplama cihazında altın/pal (Au/Pd) ile kaplandı. Lamel parçaları üzerinde oluşan biyofilm veya farklı antibiyotik konsantrasyonundaki biyofilm önlenimi 1000 ve 5000’lik büyütmelemlerde SEM ile görüntülendi ve görüntüler kaydedildi.

3.2.6. İstatistiksel Analiz

Her antibiyotik için (gentamisin, meropenem, seftriakson, siprofloksasin) ayrı ayrı duyarlı ve dirençli olma durumlarının, biyofilm 1 veya 2 olmaları arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki olup olmadığı Ki Kare testi kullanılarak araştırıldı. Analizler SPSS Statistics versiyon 21 paket program kullanılarak yapıldı. Anlamlılık düzeyi $P < 0,05$ olarak alındı.

4. BULGULAR

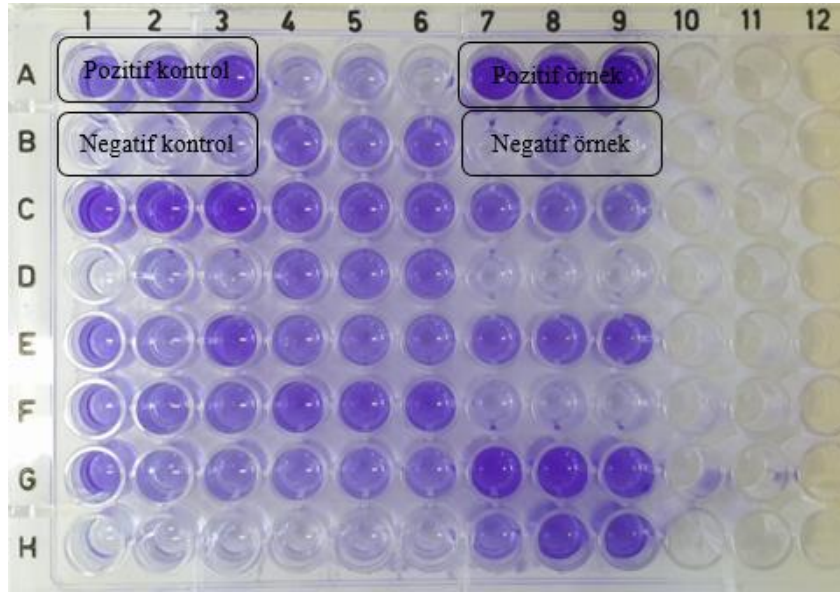
Çalışmamızda dahil edilen 181 *K. pneumoniae*'nın izole edildiği idrar örneklerinin gönderildiği servislerin dağılımı; nöroloji %11 (n=20), nefroloji %9.9 (n=18), üroloji %9.9 (n=18), acil ve ilkyardım %9.4 (n=17), hematoloji %9.4 (n=17), yoğun bakım % 5.5 (n=10), onkoloji %5.5 (n=10) ve diğerleri %39.2 (n=71) şeklinde sıralanmaktadır. İzolatların gönderildiği servislerin dağılımı Şekil 4.1'deki gibidir.



Şekil 4.1. *K. pneumoniae* izolatlarının servislere göre dağılım grafiği (diğer servisler; dahiliye %4.9 (n=9), çocuk sağlığı ve hastalıkları %4.9 (n=9), kardiyoloji %3.8 (n=7), beyin cerrahi %3.8 (n=7), göğüs hastalıkları %3.3 (n=6), çocuk acil %3.3 (n=6), endokrinoloji %2.7 (n=5), gastroenteroloji %2.7 (n=5), genel cerrahi %1.6 (n=3), kalp damar cerrahi %1.6 (n=3), enfeksiyon hastalıkları %1.6 (n=3), fiziksel tıp ve rehabilitasyon %1.6 (n=3), ortopedi ve travmatoloji %0.5 (n=1), psikiyatri %0.5 (n=1), romatoloji %0.5 (n=1), çocuk cerrahi %0.5 (n=1), çocuk enfeksiyon %0.5 (n=1))

4.1. Biyofilm Sonuçları

Çalışmamızda kullanılan izolatların biyofilm oluşumunun mikrotitrasyon plak yöntemiyle incelendi. Mikrotitrasyon plak yöntemi ile çalışılan 181 *K. pneumoniae* izolatının 90 (%49.7) tanesinin biyofilm oluşturduğu görüldü. Biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatlardan 63 (%70) tanesi 1. derece biyofilm oluştururken 27 (%30) tanesi 2. derece biyofilm oluşturdu. Çalışmaya dahil edilen izolatlardan hiç biri 3. derece biyofilm oluşturmadı. Biyofilm oluşumunu araştırıldığı bir mikrotitrasyon plağı görüntüsü Şekil 4.2. de verilmiştir.



Şekil 4.2. Mikrotitrasyon plak görüntüsü

4.2. Minimum inhibitör Konsantrasyon (MİK) Sonuçları

Mikrotitrasyon yöntemi ile biyofilm oluşturduğu tespit edilen 90 izolatın gentamisin, seftriakson, siprofloksasin ve meropenem minimum inhibitör konsantrasyonları sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle çalışılmıştır. Çalışmaya dahil edilen tüm izolatların biyofilm oluşturma dereceleri ve biyofilm oluşturan izolatların dört antibiyotik için MİK değerleri Tablo 4.1. de toplu olarak verilmiştir.

Tablo 4.1. Tüm izolatların biyofilm oluşturma dereceleri ve biyofilm oluşturan izolatların dört antibiyotik için MİK değerleri

No	Biyofilm	Gentamisin	Meropenem	Seftriakson	Siprofloksasin
1	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	> 128	$\leq 0,5$
2	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
3	0	-	-	-	-
4	0	-	-	-	-
5	0	-	-	-	-
6	0	-	-	-	-
7	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	> 128	8
8	1	256	$\leq 0,5$	> 128	32

Tablo 4.1. Devamı

9	1	1	$\leq 0,5$	> 128	$\leq 0,06$
10	0	-	-	-	-
11	0	-	-	-	-
12	0	-	-	-	-
13	0	-	-	-	-
14	0	-	-	-	-
15	2	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
16	0	-	-	-	-
17	1	> 32	256	> 128	> 32
18	2	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	> 128	$\leq 0,25$
19	0	-	-	-	-
20	0	-	-	-	-
21	1	> 256	$\leq 0,5$	> 128	> 32
22	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,250$
23	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,250$
24	2	$\leq 0,5$	> 256	> 128	> 32
25	0	-	-	-	-
26	2	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	> 128	16
27	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	128	> 32
28	0	-	-	-	-
29	2	128	$\leq 0,5$	> 128	16
30	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	0,125
31	0	-	-	-	-
32	0	-	-	-	-
33	0	-	-	-	-
34	0	-	-	-	-
35	0	-	-	-	-
36	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
37	1	256	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	32
38	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	> 128	$\leq 0,25$
39	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	> 128	$\leq 0,06$
40	0	-	-	-	-
41	1	> 256	128	> 128	> 32
42	0	-	-	-	-
43	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	2	0,5
44	1	$\leq 0,5$	32	> 128	32
45	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	> 128	8
46	2	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$

Tablo 4.1. Devamı

47	0	-	-	-	-
48	0	-	-	-	-
49	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	>128	0,5
50	0	-	-	-	-
51	1	>256	>256	>128	>32
52	0	-	-	-	-
53	1	>256	32	>128	>32
54	1	>256	$\leq 0,5$	>128	$\leq 0,06$
55	2	>256	256	>128	>32
56	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
57	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
58	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	>128	2
59	2	128	$\leq 0,5$	>128	$\leq 0,06$
60	0	-	-	-	-
61	0	-	-	-	-
62	1	$\leq 0,5$	1	>128	1
63	0	-	-	-	-
64	0	-	-	-	-
65	2	>256	$\leq 0,5$	>128	>32
66	0	-	-	-	-
67	0	-	-	-	-
68	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	>128	32
69	0	-	-	-	-
70	2	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
71	0	-	-	-	-
72	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	0,5	$\leq 0,06$
73	2	>256	$\leq 0,5$	>128	>32
74	2	>256	>256	>128	>32
75	0	-	-	-	-
76	2	128	32	>128	>32
77	1	128	2	>128	>32
78	0	-	-	-	-
79	2	>256	>256	>128	>32
80	2	64	$\leq 0,5$	32	16
81	0	-	-	-	-
82	2	>256	>256	>128	>32
83	2	>256	256	>128	>32
84	2	>256	32	>128	32
85	0	-	-	-	-
86	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$

Tablo 4.1. Devamı

87	0	-	-	-	-
88	1	64	$\leq 0,5$	>128	2
89	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	0,5
90	2	>256	>256	>128	>32
91	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
92	2	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	8	0,25
93	2	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	0,5	0,25
94	0	-	-	-	-
95	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	>128	>32
96	0	-	-	-	-
97	1	128	1	>128	>32
98	0	-	-	-	-
99	0	-	-	-	-
100	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	>128	$\leq 0,06$
101	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	2	$\leq 0,06$
102	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
103	2	$\leq 0,5$	32	>128	>32
104	0	-	-	-	-
105	0	-	-	-	-
106	0	-	-	-	-
107	0	-	-	-	-
108	0	-	-	-	-
109	0	-	-	-	-
110	0	-	-	-	-
111	0	-	-	-	-
112	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
113	0	-	-	-	-
114	0	-	-	-	-
115	2	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	>128	32
116	1	>256	1	>128	>32
117	1	1	$\leq 0,5$	8	0,125
118	2	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$
119	0	-	-	-	-
120	0	-	-	-	-
121	0	-	-	-	-
122	0	-	-	-	-
123	0	-	-	-	-
124	0	-	-	-	-
125	0	-	-	-	-
126	0	-	-	-	-
127	0	-	-	-	-

Tablo 4.1. Devamı

128	0	-	-	-	-
129	0	-	-	-	-
130	0	-	-	-	-
131	0	-	-	-	-
132	0	-	-	-	-
133	0	-	-	-	-
134	0	-	-	-	-
135	0	-	-	-	-
136	0	-	-	-	-
137	0	-	-	-	-
138	0	-	-	-	-
139	2	≤0,5	≤0,5	≤0,25	≤0,06
140	0	-	-	-	-
141	0	-	-	-	-
142	0	-	-	-	-
143	0	-	-	-	-
144	0	-	-	-	-
145	0	-	-	-	-
146	1	1	2	≤0,25	≤0,06
147	1	128	≤0,5	>128	>32
148	0	-	-	-	-
149	0	-	-	-	-
150	0	-	-	-	-
151	0	-	-	-	-
152	0	-	-	-	-
153	0	-	-	-	-
154	1	128	2	>128	2
155	1	128	≤0,5	>128	2
156	0	-	-	-	-
157	0	-	-	-	-
158	1	≤0,5	≤0,5	>128	1
159	0	-	-	-	-
160	1	≤0,5	≤0,5	>128	0,5
161	1	64	≤0,5	>128	0,25
162	1	128	≤0,5	>128	0,11
163	1	≤0,5	≤0,5	>128	4
164	1	≤0,5	≤0,5	>128	1
165	1	≤0,5	≤0,5	4	4
166	1	2	64	>128	>32
167	1	64	≤0,5	128	8
168	1	≤0,5	≤0,5	≤0,25	≤0,06

Tablo 4.1. Devamı

169	1	64	$\leq 0,5$	>128	0,25
170	1	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	>128	0,25
171	1	64	$\leq 0,5$	>128	0,125
172	1	>256	64	64	32
173	0	-	-	-	-
174	0	-	-	-	-
175	1	>256	256	>128	>32
176	1	>256	>256	>128	>32
177	2	>256	>256	>128	32
178	1	>256	>256	>128	>32
179	2	>256	256	>128	>32
180	0	-	-	-	-
181	2	$\leq 0,5$	$\leq 0,5$	$\leq 0,25$	$\leq 0,06$

Biyofilm derecesi zayıf (1) olan izolatlardan gentamisine dirençli olan %27.7 (n=25), duyarlı olan ise %42.2 (n=38) oranında bulunmuştur. Biyofilm derecesi orta (2) olan izolatlardan gentamisine dirençli olan %15.5 (14), duyarlı olan ise %14.4 (13) oranında bulunmuştur. Biyofilm zayıf (1) oluşturanlarda gentamisine duyarlı olma durumu biyofilm orta (2) oluşturanlara göre; $p=0,286$ bulunduğu için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Biyofilm derecesi zayıf (1) olan izolatlardan meropeneme dirençli olan %11.1 (n=10), duyarlı olan ise %58.8 (n=53) oranında bulunmuştur. Biyofilm derecesi orta (2) olan izolatlardan meropeneme dirençli olan %13.3 (n=12), duyarlı olan ise %16.6 (n=15) oranında bulunmuştur. Biyofilm zayıf (1) oluşturanlarda meropeneme duyarlı olma durumu biyofilm orta (2) oluşturanlara göre $p=0,004$ bulunduğu için istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür.

Biyofilm derecesi zayıf (1) olan izolatlardan seftriaksona dirençli olan %50 (n=45), duyarlı olan ise %20 (n=18) oranında bulunmuştur. Biyofilm derecesi orta (2) olan izolatlardan seftriaksona dirençli olan %22.2 (n=20), duyarlı olan ise %7.7 (n=7) bulunmuştur. Biyofilm zayıf (1) oluşturanlarda seftriaksona duyarlı olma durumu biyofilm orta (2) oluşturanlara göre $p=0,797$ bulunduğu için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Biyofilm derecesi zayıf (1) olan izolatlardan siprofloksasine dirençli olan %35.5 (n=32), duyarlı olan ise %34.4 (n=31) oranında bulunmuştur. Biyofilm derecesi orta

(2) olan izolatlardan siprofloksasine dirençli olan %18.8 (n=17), duyarlı olan ise %11.1 (n=10) bulunmuştur. Biyofilm zayıf (1) oluşturanlarda siprofloksasine duyarlı olma durumu biyofilm orta (2) oluşturanlara göre p=0,288 bulunduğu için istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Biyofilm oluşturduğu tespit edilen izolatların, biyofilm oluşturma derecesine göre antibiyotik duyarlılıklarının sonuçları toplu olarak Tablo 4.2.'de verilmektedir.

Tablo 4.2. Biyofilm oluşturan izolatların antibiyotik duyarlılık oranları

Biyofilm Derecesi	Gentamisin		Meropenem		Seftriakson		Siprofloksasin	
	Dirençli (%)	Duyarlı (%)	Dirençli (%)	Duyarlı (%)	Dirençli (%)	Duyarlı (%)	Dirençli (%)	Duyarlı (%)
Zayıf (1)	25 (27.7)	38 (42.2)	10 (11.1)	53 (58.8)	45 (50)	18 (20)	32 (35.5)	31 (34.4)
Orta (2)	14 (15.5)	13 (14.4)	12 (13.3)	15 (16.6)	20 (22.2)	7 (7.7)	17 (18.8)	10 (11,1)
Toplam	39 (43.2)	51 (56.6)	22 (24.4)	68 (75.4)	65 (72.2)	25 (27.7)	49 (54.3)	41 (45.5)

4.3. Antibiyofilm Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 15 numaralı izolatın gentamisin, meropenem ve siprofloksasin için her üç denemede de BİK değeri tespit edilememiştir. Seftriakson için üçüncü denemenin bir sırasında BİK değeri 4 µg/ml bulunmuştur.

46 numaralı izolatın gentamisin için her üç denemede de BİK değerleri için tespit edilememiştir. Meropenem için ilk denemenin iki sırasında da BİK değeri 2 µg/ml ve ikinci denemenin iki sırasında da BİK değeri 16 µg/ml bulunmuştur. Seftriakson için birinci denemenin iki sırasında da BİK değeri 4 µg/ml bulunmuştur. Siprofloksasin için ikinci denemenin bir sırasında BİK değeri 16 µg/ml bulunmuştur.

70 numaralı izolatın gentamisin için ikinci denemenin bir sırasında BİK değeri 16 µg/ml, diğer sırasında 32 µg/ml bulunmuştur. Meropenem için ilk denemenin iki sırasında da BİK değeri 2 µg/ml ve ikinci denemenin iki sırasında da BİK değeri 4 µg/ml bulunmuştur. Seftriakson için birinci denemenin iki sırasında da BİK değeri 8 µg/ml bulunmuştur. Siprofloksasin için ikinci denemenin iki sırasında da BİK değeri 4 µg/ml bulunmuştur.

93 numaralı izolatın üçüncü denemesinin iki sırasında da BİK değeri 32 µg/ml bulunmuştur. Meropenem için üçüncü denemenin bir sırasında BİK değeri 8 µg/ml bulunmuştur. Seftriakson ve siprofloksasin için her üç denemede de BİK değeri tespit edilememiştir.

118 numaralı izolatın gentamisin, seftriakson ve siprofloksasin için her üç denemede de BİK değeri tespit edilememiştir. Meropenem için birinci denemenin iki sırasında da BİK değeri 2 µg/ml, üçüncü denemenin bir sırasında BİK değeri 32 µg/ml bulunmuştur.

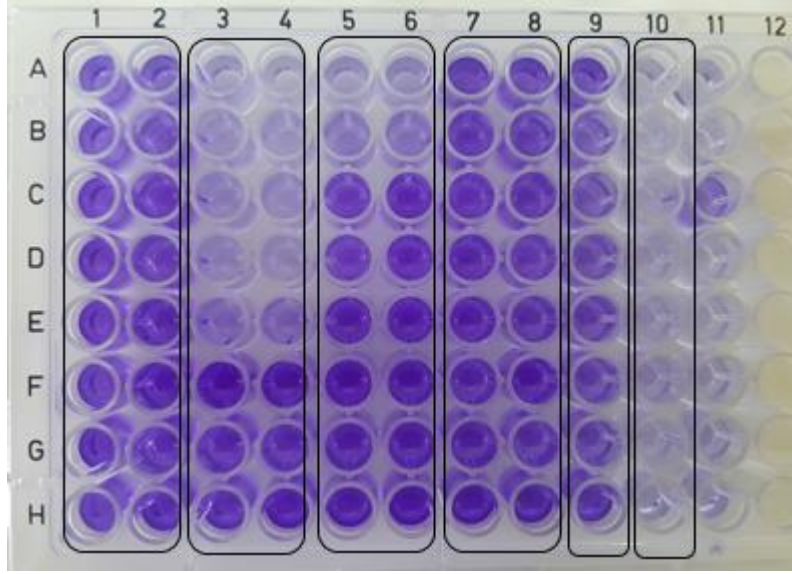
139 numaralı izolatın gentamisin için her üç denemede de BİK değerleri için tespit edilememiştir. Meropenem için ilk iki denemenin bir sırasında BİK değeri 2 µg/ml, ikinci sırasında 4 µg/ml ve üçüncü denemenin bir sırasında 4 µg/ml bulunmuştur. Seftriakson için ilk denemenin bir sırasında BİK değeri 8 µg/ml ve ikinci denemenin bir sırasında 4 µg/ml, diğer sırasında 16 µg/ml bulunmuştur. Siprofloksasin için ikinci denemenin iki sırasında da BİK değeri 4 µg/ml bulunmuştur.

181 numaralı izolatın gentamisin, meropenem, seftriakson ve siprofloksasin için her üç denemede de BİK değeri tespit edilememiştir. Tüm antibiyofilm aktivitesi sonuçları Tablo 4.3. toplu olarak verilmektedir.

Tablo 4.3. Dört antibiyotik için duyarlı olan izolatların antibiyofilm değerleri

			15	46	70	93	118	139	181
Gentamisin	MİK		≤0,5	1	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
	BİK	1. Deneme	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		2. Deneme	-/-	-/-	16/32	-/-	-/-	-/-	-/-
		3. Deneme	-/-	-/-	-/-	32/32	-/-	-/-	-/-
Meropenem	MİK		≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
	BİK	1. Deneme	-/-	2/2	2/2	-/-	2/2	2/4	-/-
		2. Deneme	-/-	16/16	4/4	-/-	-/-	2/4	-/-
		3. Deneme	-/-	-/-	-/-	-/8	-/32	-/4	-/-
Seftriakson	MİK		≤0,25	≤0,25	≤0,25	0,5	≤0,25	≤0,25	≤0,25
	BİK	1. Deneme	-/-	4/4	8/8	-/-	-/-	-/8	-/-
		2. Deneme	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	16/4	-/-
		3. Deneme	-/4	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Siprofloksasin	MİK		≤0,06	≤0,06	≤0,06	0,25	≤0,06	≤0,06	≤0,06
	BİK	1. Deneme	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
		2. Deneme	-/-	-/16	4/4	-/-	-/-	8/8	-/-
		3. Deneme	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
BİK: Biyofilm inhibisyon konsantrasyonu									
- : BİK tespit edilemedi.									

Çalışmaya dahil edilen dört antibiyotiğin antibiyofilm aktivitesi çalışılan izolatlar için örnek görüntü Şekil 4.3.'de verilmiştir.

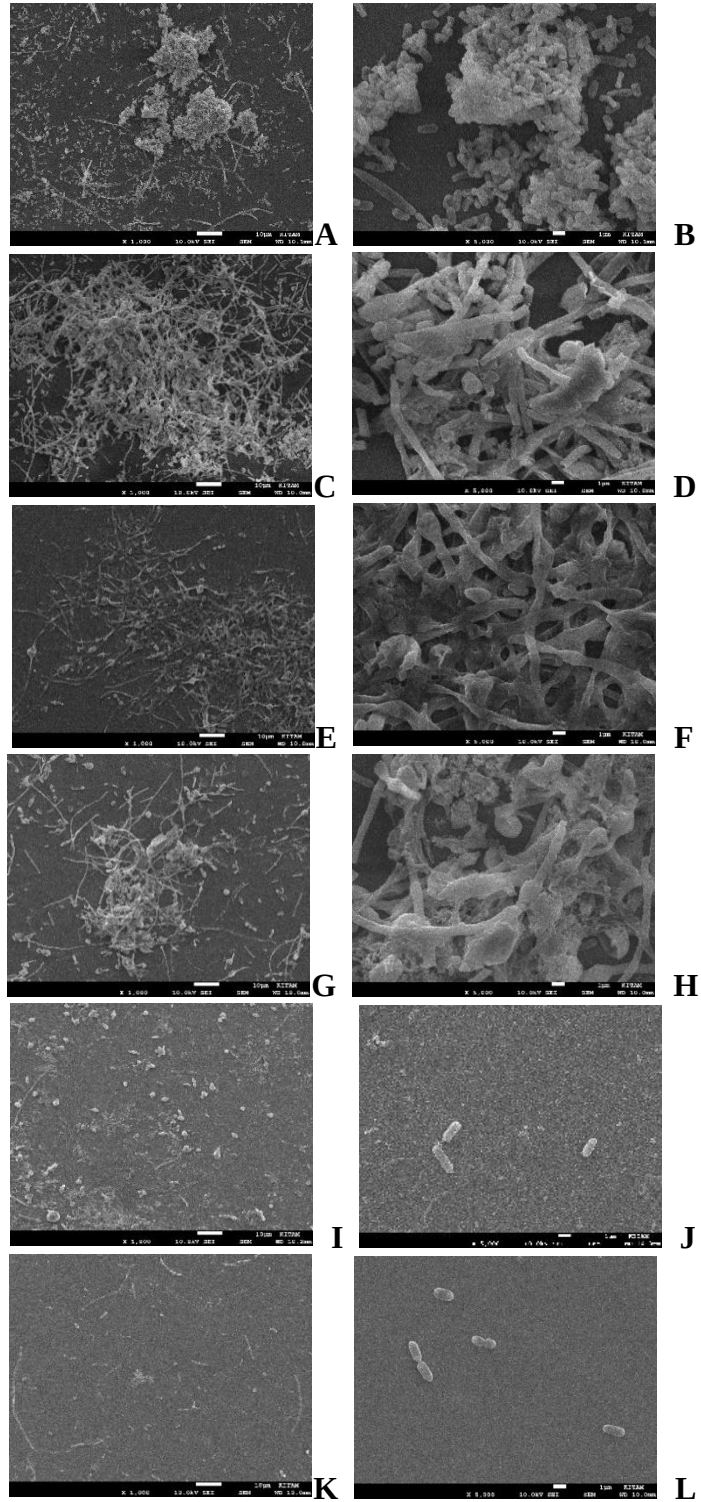


Şekil 4.3. Antibiyofilm plak çalışma düzeni

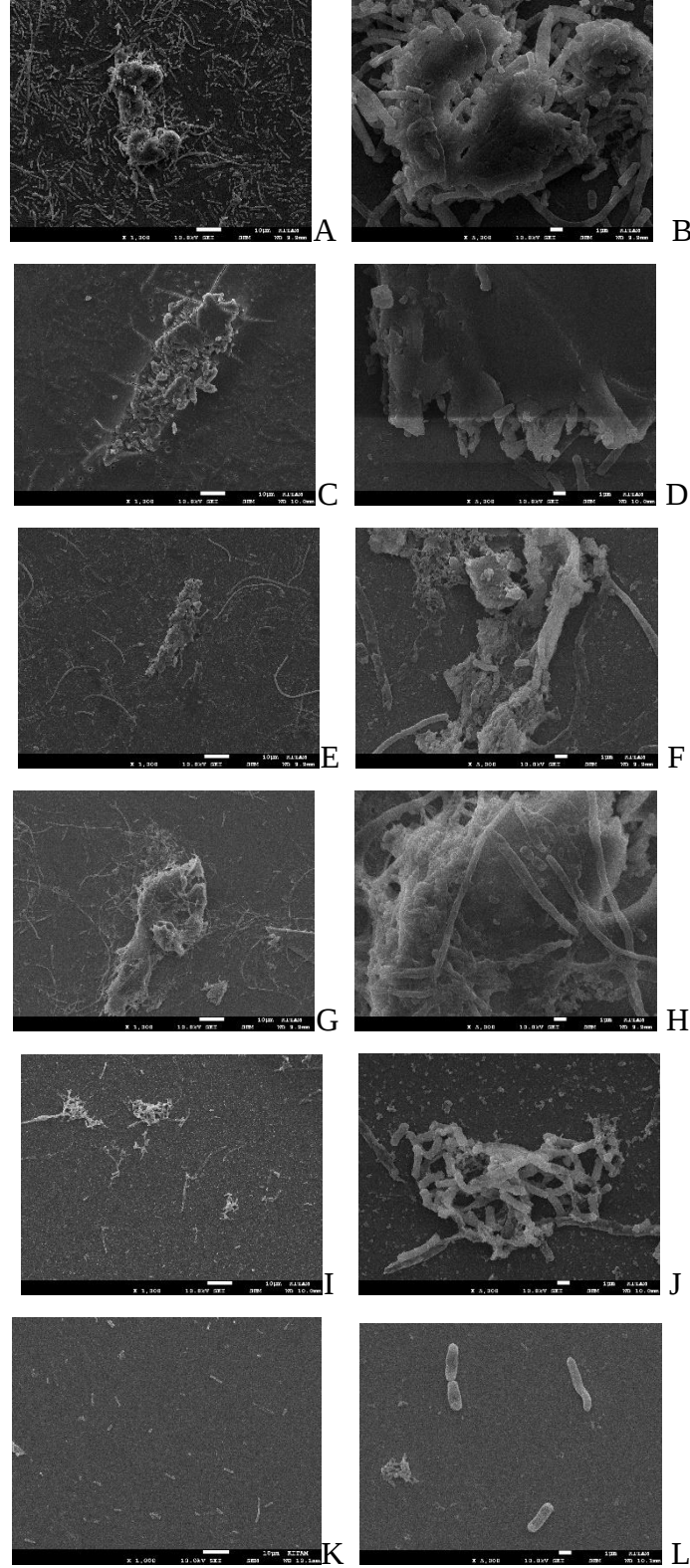
4.4. SEM Görüntüleri

Elektron mikroskobu ile 46 numaralı izolatta meropenem için 8 - 0.5 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda 1000'lik ve 5000'lik büyütmelelerdeki görüntüler Şekil 4.4 de verilmektedir. Görüntüler incelendiğinde antibiyotik bulunmayan (A, B) ve 0.5 - 1- 2 $\mu\text{g/ml}$ meropenem konsantrasyonlarında (C, D, E, F, G, H) biyofilm oluşumu gözlenirken, 2 – 4 $\mu\text{g/ml}$ meropenem konsantrasyonlarında (I, J, K, L) biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.

Elektron mikroskobu ile 46 numaralı izolatta seftriakson için 16 - 1 $\mu\text{g/ml}$ konsantrasyonlarda 1000'lik ve 5000'lik büyütmelelerdeki görüntüler Şekil 4.5 de verilmektedir. Görüntüler incelendiğinde antibiyotik bulunmayan (A, B) ve 1 - 2 – 4 - 8 $\mu\text{g/ml}$ seftriakson konsantrasyonlarında (C, D, E, F, G, H, I, J) biyofilm oluşumu gözlenirken, 16 $\mu\text{g/ml}$ seftriakson konsantrasyonunda (K, L) biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.



Şekil 4.4. 46 numaralı izolat için farklı konsantrasyonlardaki meropenemin antibiyofilm etkisinin SEM görüntüsü (A: 0 µg/ml 1000'lik büyütme; B: 0 µg/ml 5000'lik büyütme; C: 0,5 µg/ml 1000'lik büyütme; D: 0,5µg/ml 5000'lik büyütme; E: 1 µg/ml 1000'lik büyütme; F: 1µg/ml 5000'lik büyütme; G: 2 µg/ml 1000'lik büyütme; H: 2 µg/ml 5000'lik büyütme; I: 4 µg/ml 1000'lik büyütme; J: 4 µg/ml 5000'lik büyütme; K: 8 µg/ml 1000'lik büyütme; L: 8 µg/ml 5000'lik büyütme)



Şekil 4.5. 46 numaralı izolat için farklı konsantrasyonlardaki seftriaksonun antibiyofilm etkisinin SEM görüntüsü (A: 0 $\mu\text{g/ml}$ 1000'lik büyütme; B: 0 $\mu\text{g/ml}$ 5000'lik büyütme; C: 1 $\mu\text{g/ml}$ 1000'lik büyütme; D: 1 $\mu\text{g/ml}$ 5000'lik büyütme; E: 2 $\mu\text{g/ml}$ 1000'lik büyütme; F: 2 $\mu\text{g/ml}$ 5000'lik büyütme; G: 4 $\mu\text{g/ml}$ 1000'lik büyütme; H: 4 $\mu\text{g/ml}$ 5000'lik büyütme; I: 8 $\mu\text{g/ml}$ 1000'lik büyütme; J: 8 $\mu\text{g/ml}$ 5000'lik büyütme; K: 16 $\mu\text{g/ml}$ 1000'lik büyütme; L: 16 $\mu\text{g/ml}$ 5000'lik büyütme)

5. TARTIŞMA

Nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan önemli mikroorganizmalardan *K. pneumoniae* fırsatçı bir patojendir (Diancourt ve ark., 2005; Vuotto ve ark., 2017).

Hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonların ana nedenlerinden biri olan *K. pneumoniae* karbapenem direnciyle mortalite ve morbidite artışı tehlikesini ortaya çıkarabilmektedir (Cassini, 2018; David, 2019).

Hastane enfeksiyonlarına neden olan patojenlerin görülme sıklığı değişiklik gösterebilmektedir (Kang ve ark., 2006). Özçetin ve ark. yaptıkları çalışmada ilk iki sırada *E. coli* %22.9 ve *Klebsiella* türlerini %15.6 oranında olduğunu saptamışlardır (Özçetin ve ark., 2019).

2009 ve 2012 yılları arasında yoğun bakım ünitelerindeki (YBÜ) hastane enfeksiyonları araştırmalarında YBÜ’de *K. pneumoniae*; 2009’da %5’iken 2012 yılında artarak %7.5’e yükselmiş, vantilatör ilişkili pnömonide (VİP) baskın mikroorganizmalar içinde %5.3 ile beşinci sırada iken %8.5’e yükselerek üçüncü sıraya çıkmış, üretral katater ile ilişkili idrar yolu enfeksiyonlarında %5’den %5.8’e yükselmiştir (Zaragoza ve ark., 2014).

Kuş ve ark. çalışmalarında kullandıkları 53 *K.pneumoniae* izolatının 12 (%22.6)’si reanimasyon yoğun bakım ünitesi, 8 (%15.1)’i tıbbi onkoloji servisi, 7 (%13.2)’si yenidoğan yoğun bakım ünitesi ve 26 (%49)’sı diğer kliniklerde yatan hastalardan izole edildiğini bildirmiştir (Kuş ve ark., 2017).

Müller-Schulte ve ark. çalışmalarına dahil ettikleri 107 *K. pneumoniae*’nın %29 (n=31)’u pediatri, %24.3 (n=26)’ü dahiliye, %14 (n=15)’ü yoğun bakım ünitesi, %10.3 (n=11)’ü üroloji ve %22.4 (n=24)’ü diğer servislerden izole edildiğini bildirmiştir (Müller-Schulte ve ark., 2020).

Bizim çalışmamızda çeşitli servislerden gönderilen ve idrar örneklerinden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarının dağılımlarına bakıldığında nöroloji %11 (n=20), nefroloji %9.9 (n=18), üroloji %9.9 (n=18), acil ve ilkyardım %9.4 (n=17), hematoloji %9.4 (n=17), yoğun bakım % 5.5 (n=10), onkoloji %5.5 (n=10) ve diğerleri %39.2 (n=71) şeklinde sıralanmaktadır.

Karagün ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, hastane enfeksiyonlarının çocukluk yaş grubunda en sık bakteriyemi ve pnömoni, yetişkin yaş grubunda ise üriner sistem

ve cerrahi alan enfeksiyonu şeklinde görüldüğünü ve ayrıca *Klebsiella* spp.'nin %29.5 oranıyla en sık izole edilen mikroorganizma olduğunu bildirmişlerdir (Karagün ve ark., 2020).

Üriner sistem enfeksiyonları bir dizi patojenin sebep olduğu, dünya çapında her yıl yaklaşık 150 milyon kişiyi etkileyen bakteriyel enfeksiyonlardan biri olup ciddi bir halk sağlığı sorunudur (Flores-Mireles ve ark., 2015). En sık bildirilen hastane kaynaklı enfeksiyon vakalarının %17.2'sine katater ilişkili üriner sistem enfeksiyonları sebep olmaktadır (Percival ve ark., 2015).

Ott ve ark. çalışmalarında üriner sistem enfeksiyonlarının nozokomiyal enfeksiyonlarda %16 oranında, toplum kaynaklı enfeksiyonlarda ise %9 oranında olduğunu bildirmiştir (Ott ve ark., 2013).

Kateterle ilişkili İYE'ler, hastanede edinilen tüm enfeksiyonların %40'ını oluşturur ve bu nedenle en yaygın nozokomiyal enfeksiyon türüdür. Genel olarak, kısa süreli kateterizasyonu olan hastaların yaklaşık %10'u enfeksiyon geliştirir (Stamm ve Norrby, 2001).

Flores-Mireles ve ark. üriner sistem enfeksiyonlarının epidemiyoloji ve enfeksiyon mekanizmalarını araştırdıkları çalışmada *K. pneumoniae*'nin komplike enfeksiyonlarda %8, komplike olmayanlarda %6 oranında ve ikinci sırada olduğunu bildirmişlerdir (Flores-Mireles ve ark., 2015).

Subramanian ve ark. çalışmalarında üropatojenler arasında *K. pneumoniae*'nin %16 oranıyla ikinci sırada olduğunu bildirmiştir (Subramanian ve ark., 2012).

K. pneumoniae tıbbi cihazlar, kataterler ve enfekte doku yüzeylerine yapışarak çoğalması ile konak immün sistemine ve antimikrobiyal tedavilere rağmen uzun süre eradikasyonu sağlanamayan biyofilmler üretir (Curiel ve ark., 2018).

Dünya genelinde *K. pneumoniae*'nin antibiyotiğe dirençli suşları ortaya çıkmaktadır. GSBL üreten ve karbapenemaza dirençli suşların artan sıklıkta izole edilmesi endişeye neden olmaktadır. Ayrıca patojenin üriner kateter gibi yerleştirilmiş cihazlarda biyofilm oluşturma yeteneği, günümüzde kullanılan antibiyotiklere karşı artan dirence ek olarak, nozokomiyal edinilmiş kalıcı enfeksiyonlarda önemli bir mekanizma olarak görülmektedir (Chung, 2016).

Biyofilmin ortadan kaldırılması ve sistemik enfeksiyonların önlenmesi için uygun antibiyotiklerin seçilmesinde zorluk çekilebilmektedir (Nagalakshmi ve ark. 2015). Ayrıca biyofilm bünyesinde bulunan bakterilerin artan antibiyotik direnci, serbest yaşayan planktonik bakteri hücrelerinden 1000 kat daha fazla olabilmektedir (Singla ve ark. 2013).

Antimikrobiyal tedavilerinde, antibiyotik konsantrasyonları planktonik formlara göre belirlenerek, biyofilm yapıları göz ardı edilir. Bundan dolayı tedaviyle, tamamen ortadan kaldırılamayan etken ile hastalık devam edebilmektedir. Bu sorunlar ile mücadele edebilmek için biyofilm yapısının ve moleküler mekanizmalarının tümü araştırılarak ortaya çıkarılmalıdır (Dianni ve ark., 2016)

“Biyofilmlerin en bilinen özelliği, antibiyotiklere karşı yüksek düzeyde dirençtir. Direnci belirleyen en önemli faktör bakteri üreme durumudur. Bir biyofilmin "iç çekirdeği" içinde, bakteriler açlığa ve düşük oksijene adapte olurlar, bu da büyümenin durmasına neden olur ve bu da metabolik olarak aktif ve bölünen hücreleri hedefleyen antibiyotiklerin etkinliğini azaltır” (Piperaki, 2017).

Castelijns ve ark. çalışmalarında biyofilm oluşturma davranışının sıcaklık ve kültür ortamı gibi çevresel koşullardan etkilendiği, aynı zamanda suş kaynağıyla da ilişkili olduğu sonucunu bildirmişlerdir (Castelijns ve ark., 2012)

Lenchenko ve ark. *K. pneumoniae* biyofilminin adezyon özelliklerini ve morfolojisini araştırdıkları çalışmalarında bu mikroorganizmanın yüksek yapışma aktivitesiyle birlikte güçlü biyofilm oluşturdıkları sonucuna ulaşmışlardır (Lenchenko ve ark., 2020).

Maharjan ve ark. çalışmalarında katater ilişkili üriner sistem enfeksiyonlarından sorumlu olan patojenler arasında *K. pneumoniae*'nin %15 oranıyla ikinci sırada olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu çalışmaya dahil edilen *K. pneumoniae* izolatlarının %30'unun biyofilm ürettiği tespit edilmiştir (Maharjan ve ark., 2018).

K. pneumoniae izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneği ile GSBL üretimi arasında önemli bir ilişki olduğunu gösteren Yang ve Zhang çalışmalarında balgam, idrar ve kan gibi klinik izolatların %45.3'ünün GSBL ürettiğini bunların içinde idrar örneklerinin %54.2 oranda GSBL ürettiğini bildirmişlerdir. Test edilen izolatların %44.7'si biyofilm oluşturduğunu ve bunların arasında idrar örneklerinin %54.2 oranda biyofilm oluşturduğunu bildirmişlerdir. Yaşlılarda %54.2'iken gençlerde

%19.5 oranında olduğunu dolayısıyla biyofilm enfeksiyonlarının yaşlılarda daha sık olabileceğini ortaya koymuşlardır (Yang ve Zhang, 2008).

Rahdar ve ark. yaptıkları çalışmalarına dahil ettikleri 160 *K. pneumonia* izolatının %42.5'inde karbapenemaz aktivitesi saptamışlardır. Ayrıca bu izolatların %52.5'inde güçlü, %38.1'inde orta, %9.3'ü ise zayıf dereceli biyofilm ürettiği saptanmıştır (Rahdar ve ark., 2019).

Domenico ve ark. çalışmalarında *K. pneumoniae* izolatlarının GSBL üreten suşlarının %66.7'sinin ve GSBL üretmeyenlerin %50'sinin biyofilm ürettiği ve bunların hiçbirinin güçlü biyofilm üreticisi olmadığını ortaya koymuşlardır. GSBL üretenlerin %35'i biyofilm oluşturmazken %50'si zayıf, %15'i orta derece biyofilm oluşturmıştır. GSBL üretmeyenlerin ise %50'si biyofilm oluşturmazken %25'i orta %25'i ise zayıf biyofilm oluşturmıştır (Domenico ve ark., 2017).

Türkel ve ark. çalışmalarında 100 adet GSBL üreten *K. pneumoniae* izolatlarında %99 oranında biyofilm oluşumu tespit etmişler ve bunların %16'sı zayıf, %17'si orta ve %66'sı güçlü biyofilm üreticisi olduğunu bildirmişlerdir (Türkel ve ark., 2018).

Ammar ve ark. kantitatif mikrotitre plak yöntemini kullandıkları çalışmada *K. pneumoniae* izolatlarının %81.8'ini biyofilm üreticisi olduğu ve bunların %33.3, %22.2 ve %44.4'ünü sırasıyla güçlü, orta ve zayıf biyofilm üreticisi olduğunu ve izolatların % 18.2'inin biyofilm üreticisi olmadığını bildirmiştir (Ammar ve ark., 2020).

Shadkam ve ark. çalışmalarında 100 *K. pneumoniae* izolatlarının %75'inin biyofilm üreten izolatlar olduğunu ortaya koymuştur. İzolatların %31, %25 ve %19'u sırasıyla zayıf, güçlü ve orta derecede biyofilm üreten suşlar olup %25'i biyofilm üretmediği bildirilmiştir. çoklu ilaca dirençli (MDR) (%51) izolatlarında biyofilm oluşum prevalansı, MDR olmayan (%24) izolatlara göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur (Shadkam ve ark., 2020).

Nirwati ve ark. yaptıkları çalışmaya dahil ettikleri 167 *K. pneumoniae*'nin 45 (%26.9)'i güçlü, 48 (%28.7)'i orta, 50 (%29.9)'si zayıf biyofilm oluşturmıştır. İzolatların %54.5'i MDR olarak bulunurken, MDR ile biyofilm üretim kapasitesi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığını tespit etmişlerdir (Nirwati ve ark., 2019).

Seifi ve ark. çeşitli klinik örneklerden izole edilmiş 94 *K. pneumoniae* izolatu kullandıkları çalışmada 58'i idrar örneklerinden izole edilmiştir. Tüm izolatların %93.6'sının biyofilm oluşturduğunu bildirdikleri çalışmada, %52.1'i orta derecede %33'ü güçlü biyofilm oluştururken, %8.5'i zayıf biyofilm üreten suşlar olarak kategorize edildiği ve suşların %6.4'ü biyofilm üretmediğini bildirilmiştir. İdrar örneklerinde ise %20.7 güçlü, %68.9 orta, %6.9 zayıf biyofilm oluşturmuşken %3.5'i biyofilm oluşturmamıştır (Seifi ve ark., 2016).

Çalışmamıza dahil ettiğimiz 181 *K. pneumonia* izolatının 90 (%49.7)'si biyofilm oluştururken, 91 (%50.3)'ünün biyofilm oluşturmadığı tespit edilmiştir. Biyofilm oluşturan izolatların 27 (%30) tanesi orta derece biyofilm, 63 (%70) tanesi ise zayıf biyofilm oluşturduğu görülmüştür. Çalışmamıza dahil edilen izolatların hiçbirisi güçlü biyofilm oluşturmamıştır.

Pramodhini ve ark. idrar örneklerinden izole edilen çeşitli patojenlerin %60 oranında biyofilm oluşturduğunu tespit ettikleri çalışmada *K. pneumonia* izolatlarının %63 oranında biyofilm oluşturduğunu açıklamışlardır. Çalışmada tüm izolatların gentamisin direnci %40 bulunurken biyofilm oluşturanların %36, oluşturmayanların ise %45 oranında gentamisine dirençli olduğu bildirilmiştir (Pramodhini ve ark., 2012).

Domenico ve ark. çalışmalarında 135 izolatın %27.5'i yüksek, %26'sı orta ve %29.2'si zayıf biyofilm üreticileri olarak sınıflandırmış. Ayrıca *K. pneumoniae*'yi %60 oranında MDR fenotipine sahip olup gentamisine %66.7, meropeneme %33.3 ve siprofloksasine %83.3 oranında dirençli bulunmuştur. Bununla birlikte hem MDR %74.4 hem de MDR olmayan %78.9 suşlarında biyofilm üretme konusunda karşılaştırıldığında, iki grup arasında anlamlı bir fark olmadığını bildirmişlerdir (Domenico ve ark., 2017).

Sanchez Jr ve ark. çalışmalarında çeşitli örneklerden izole edilmiş 54 MDR *K. pneumoniae* izolatının %76'sının orta derece biyofilm oluşturduğunu bildirmiştir. İzolatların %93'ü gentamisine dirençli olup bunların %79'u biyofilm oluşturmuş, %7'si gentamisine duyarlı olup bunların %71'i biyofilm oluşturmuştur. İzolatların %87'si seftriakson için dirençli olup bunların %73'ü biyofilm oluşturmuştur, %13'ü seftriaksona duyarlı bulunmuş ve bunlar %69 oranında biyofilm oluşturmuş. Meropenem için tüm izolatlar duyarlı bulunmuş ve izolatların %70'i biyofilm

oluşturmuş. Siprofloksasine direnç %63 olup bu izolatların %79'u biyofilm oluşturmuş, %37'si siprofloksasine duyarlı olup bunların biyofilm oranı %45 olarak bildirilmiştir (Sanchez Jr ve ark., 2013).

Cusumano ve ark. antimikrobiyal direnç ile biyofilm arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmada 139 *K. pneumoniae* izolatının 47'si zayıf, 46'sı orta ve 46'sı güçlü biyofilm oluşturduğunu bulmuşlardır. 81 MDR izolatında zayıf biyofilm oluşturanlar %97.9 oranında, güçlü biyofilm oluşturanlar %76.1 oranında bulunmuş ve 25 yaygın ilaca dirençli (XDR) izolatında biyofilm oluşturma oranı %25.5 iken oluşturmayanlarda %28.3 ile benzer olduğunu bildirmiştir (Cusumano ve ark., 2019).

Cepas ve ark. *K. pneumoniae*'nin %37,6'sının biyofilm oluşturduğu çalışmada izolatların %38'i MDR olarak bulunduğunu ve idrar örneklerinin gentamisine %36.8 duyarlı, %9.4 dirençli bulunurken siprofloksasine %29.1 duyarlı, %17.1 dirençli olarak bulduklarını bildirmişlerdir (Cepas ve ark., 2019).

Vuotto ve ark. çalışmalarında 40 izolatı MDR ve 56 izolatı XDR olarak bulmuşlardır. Duyarlı izolatların %70.8'i güçlü biyofilm üreticileri olarak, %12.5 orta biyofilm üreticileri olarak ve %16.7 zayıf biyofilm üreticileri olarak tespit etmişler ve MDR izolatlarının %67.5'i güçlü %25'i orta derecede ve %7.5 zayıf biyofilm üreticisi olarak bildirilmiştir (Vuotto ve ark., 2017).

Shadkam ve ark. meropenem, seftriakson, gentamisin ve siprofloksasin antibiyotikleri için güçlü biyofilm oluşturanların direnç oranları sırasıyla %56, %52, %32, %68 biyofilm oluşturmayan izolatların direnç profili ise sırasıyla %32, %32, %12, %40 şeklinde bulunup biyofilm üreten *K. pneumoniae* suşları arasında antimikrobiyal direnç, biyofilm üretmeyen *K. pneumoniae* suşlarına göre anlamlı derecede yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir (Shadkam ve ark., 2020).

Türkel ve ark. 100 GSBL üreten *K. pneumoniae* ile yaptıkları çalışmada tüm izolatlar seftriakson için dirençliken siprofloksasin direncini %54 olarak tespit etmişleridir. Siprofloksasine duyarlı izolatların dirençli izolatlara göre daha güçlü biyofilmler oluşturduğunu analiz etmişlerdir (Türkel ve ark., 2018).

Çalışmamızda biyofilm oluşum dereceleri ve antibiyotik duyarlılıkları karşılaştırıldığında duyarlı izolatlarda zayıf biyofilm oluşturanlar sırasıyla meropenem, gentamisin, siprofloksasin ve seftriakson için %58.8 (n=53), %42.2 (n=38), %34.4 (n=31) ve %20 (n=18) oranları bulundu. Orta derece biyofilm oluşturan

izolatlarda da sırasıyla %16.6 (n=15), %14. (n=13) 4, %11,1 (n=10), %7.7 (n=7) oranları bulundu. Dirençli izolatlarda zayıf biyofilm oluşturanlar aynı sırasıyla %11.1 (n=10), %27.7 (n=25), %35.5 (n=32), %50 (n=45) oranları bulundu. Orta derece biyofilm oluşturan izolatlarda yine sırasıyla %13.3 (n=12), %15.5 (n=14), %18.8 (n=17), %22.2 (n=20) oranları bulundu. Zayıf biyofilm (1) oluşturan izolatlarda meropeneme duyarlı olma durumu orta derecede (2) biyofilm oluşturanlara göre istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür. Bununla birlikte gentamisin, siprofloksasin ve seftriakson antibiyotikleri istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

VİP, kritik hastalarda en sık görülen nozokomiyal enfeksiyonlardan biridir. Geçtiğimiz birkaç yıl içinde *K. pneumoniae* dünya çapında VİP'in ana nedensel ajanlarından biri haline gelmiştir. Ruiz ve ark. meropenem için MİK değerini 8 mg/L buldukları çalışmada 24 saatte meropenemin 4 mg/L'de %64.7, 8 mg/L'de %58.4 ve 16 mg/L'de %65.5 oranında biyofilm inhibisyonu gösterdiğini bildirmişlerdir (Ruiz ve ark., 2019).

Cadavid ve ark. çalışmalarında biyofilmin %50'sini ortadan kaldırmak için gereken antibiyotik konsantrasyonlarının gentamisin için 0.12 µg/mL, siprofloksasin için 0.03 µg/mL olduğunu bildirmişler ve biyofilmin, siprofloksasine kıyasla gentamisine karşı dört kata kadar daha dirençli olduğunu ve siprofloksasinin biyofilmleri geçme kabiliyeti ve böylece gömülü bakteriler üzerinde antibiyotik etkisinin olduğunu bildirmişlerdir (Cadavid ve ark., 2018).

Chaudhary ve Payasi GSBL üreten *K. pneumoniae* izolatlarını kullandıkları çalışmada meropenemin MİK değerini 64-256 µg/ml olduğunu ve minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonunun (MBEC) 2048-4096 µg/ml olduğunu ve sonuçlarının planktonik mikroorganizmaların ve biyofilmlerin antibiyotiğe karşı farklı davrandığını göstermekte olduğunu bildirmişlerdir (Chaudhary ve Payasi 2012).

Aires ve Batista çalışmalarında *K. pneumoniae* 'nin planktonik hücrelerinde MIC ve minimum bakterisidal konsantrasyonun (MBC)'nin sırasıyla 0.016 µg/ml ve 0.032 µg/ml olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca seftriaksona duyarlı izolatların biyofilmin olgunlaşmasıyla etkinliğinin azaldığını bildirmişlerdir. Genç biyofilmine etkili olan seftriaksonun 100 µg/ml ve 300 µg/ml konsantrasyonun planktonik formdan 6 bin kat fazla olduğunu fakat bu konsantrasyonun olgun biyofilmi yok etmek için ise yeterli olmadığını bildirmişlerdir (Aires ve Batista, 2017).

Gentamisinin antibiyofilm aktivitesinin çalışıldığı 70 numaralı izolatın bir denemesinde 16/32 µg/ml ve 93 numaralı izolatın bir denemesinde de 32/32 µg/ml BİK değeri saptanmıştır. Gentamisin için 15, 46, 118, 139 ve 181 nolu izolatlarda BİK değeri tespit edilememiştir.

Meropenem antibiyofilm aktivitesinin çalışıldığı 46 numaralı izolatın bir denemesinde 2/2 µg/ml, bir diğer denemesinde de 16/16 µg/ml; 70 numaralı izolatın bir denemesinde 2/2 µg/ml, bir diğer denemesinde de 4/4 µg/ml; 93 numaralı izolatın bir denemesinde -/8 µg/ml; 118 numaralı izolatın bir denemesinde 2/2 µg/ml, bir diğer denemesinde de -/32 µg/ml; 139 numaralı izolatın bir denemesinde 2/4 µg/ml, bir diğer denemesinde de 2/4 µg/ml, bir diğer denemesinde de -/4 µg/ml BİK değeri saptanmıştır. Meropenem için 15 ve 181 nolu izolatlarda BİK değeri tespit edilememiştir.

Seftriakson antibiyofilm aktivitesinin çalışıldığı 15 numaralı izolatın bir denemesinde -/4 µg/ml; 46 numaralı izolatın bir denemesinde 4/4 µg/ml; 70 numaralı izolatın bir denemesinde 8/8 µg/ml; 139 numaralı izolatın bir denemesinde -/8 µg/ml, bir diğer denemesinde de 16/4 µg/ml BİK değeri saptanmıştır. Seftriakson için 93, 118 ve 181 nolu izolatlarda BİK değeri tespit edilememiştir.

Siprofloksasin antibiyofilm aktivitesinin çalışıldığı 46 numaralı izolatın bir denemesinde -/16 µg/ml; 70 numaralı izolatın bir denemesinde 4/4 µg/ml; 139 numaralı izolatın bir denemesinde 8/8 µg/ml BİK değeri saptanmıştır. Siprofloksasin için 15, 93, 118 ve 181 nolu izolatlarda BİK değeri tespit edilememiştir.

Elektron mikroskobu ile 46 numaralı izolatla 0.5 – 1 - 2 µg/ml meropenem konsantrasyonlarında biyofilm oluşumu gözlenirken, 4 µg/ml de mikrokolonilerin oluşumlarının başladığı ve 8 µg/ml meropenem konsantrasyonunda biyofilm oluşumu olmadığı gözlenmiştir. Seftriakson için 1 - 2 - 4 - 8 µg/ml konsantrasyonlarında biyofilm oluşumu gözlenirken, 16 µg/ml seftriakson konsantrasyonunda biyofilm olmadığı gözlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

- Çalışmaya dahil edilen ve idrar örneklerinden izole edilen 181 *K. pneumoniae*'nin 90 (%49.7)'nda biyofilm oluşumu gözlemlendi.
- Biyofilm oluşturan izolatların 63 (%70)'ü zayıf, 27 (%30)'si orta derecede biyofilm oluşturmıştır. Hiçbir izolatta güçlü biyofilm oluşumu gözlenmemiştir.
- Biyofilm oluşturan izolatların 39 (%43.2)'u gentamisine, 22 (%24.4)'si meropeneme, 65 (%72.2)'i seftriaksona, 49 (%54.4)'u siprofloksasine dirençli bulundu.
- Biyofilm oluşturan izolatların 51 (%56.6)'i gentamisine, 68 (%75.4)'i meropeneme, 25 (%27.7)'i seftriaksona, 41 (%45.5)'i siprofloksasine duyarlı bulundu.
- Zayıf biyofilm oluşturanlarda meropeneme duyarlı olma durumu orta derece biyofilm oluşturanlara göre istatistiksel olarak anlamlı bulundu.
- Oluşmuş biyofilmin giderilebilmesi için antibiyotikler kullanılabilmekle birlikte uygun antibiyotik ve dozların belirlenmesi için farklı yöntemlerin kullanıldığı karşılaştırmalı çalışmalara ihtiyaç vardır.
- Oluşmuş biyofilm yapılarının giderilebilmesinde strateji geliştirilebilmesi için mikroorganizmaya bağlı faktörlerin de bilinmesinin çok önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aires, C. P., Batista, M. J. A., & Pitondo-Silva, A. (2017). Decrease of ceftriaxone susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* according to biofilm maturation. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9, 126-127.
- Aktaş E. (2013). Sıvı mikrodilüsyon MİK plaklarının hazırlanması. Başustaoğlu A, Yıldırım Ş.T., Editörler. *Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı* (Çeviri). 3. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık.; 5.15.
- Alcántar-Curiel, M. D., Ledezma-Escalante, C. A., Jarillo-Quijada, M. D., Gayosso-Vázquez, C., Morfín-Otero, R., Rodríguez-Noriega, E., Cedillo-Ramírez, M. L., Santos-Preciado, J. I., Girón, J. A. (2018). Association of antibiotic resistance, cell adherence, and biofilm production with the endemicity of nosocomial *Klebsiella pneumoniae*. *BioMed Research International*, 2018, 9.
- Ammar, A. M., El-Aziz, A., Norhan, K., & Mohamed, S. S. (2020). Biofilm formation and its correlation with antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Zagazig Veterinary Journal*, 48(4), 366-377.
- Anderl, J. N., Franklin, M. J., & Stewart, P. S. (2000). Role of antibiotic penetration limitation in *Klebsiella pneumoniae* biofilm resistance to ampicillin and ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1818-1824.
- Ashbaugh, A. G., Jiang, X., Zheng, J., Tsai, A. S., Kim, W. S., Thompson, J. M., Miller, Wang, Y., Dillen, C. A., Ordonez, A. A., Chang, Y. S., Jain, S. K., R. J., Shahbazian, J. H., Jones, L. J., Sterling, R. S., Mao, H. K., Miller, L. S. (2016). Polymeric nanofiber coating with tunable combinatorial antibiotic delivery prevents biofilm-associated infection in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(45), E6919-E6928.
- Bilgehan, H. (2000). *Klinik mikrobiyoloji-Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları*. İzmir: Barış yayınları.
- Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S. R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P. Ø., Høiby, N. (2013). The in vivo biofilm. *Trends in microbiology*, 21(9), 466-474.
- Cadavid, E., Robledo, S. M., Quiñones, W., & Echeverri, F. (2018). Induction of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13884 by several drugs: the possible role of quorum sensing modulation. *Antibiotics*, 7(4), 103.
- Campoli-Richards, D. M., Monk, J. P., Price, A., Benfield, P., Todd, P. A., & Ward, A. (1988). Ciprofloxacin. *Drugs*, 35(4), 373-447.
- Carpentier, B., & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of applied bacteriology*, 75(6), 499-511.
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., Cotinat, C. M., Kretzschmar M. E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D. A., Oliveira, T. C., Struelens, m. J., Suetens, C., Monnet, D. L., (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet infectious diseases*, 19(1), 56-66.
- Castelijin, G. A., van der Veen, S., Zwietering, M. H., Moezelaar, R., & Abee, T. (2012). Diversity in biofilm formation and production of curli fimbriae and cellulose of *Salmonella Typhimurium* strains of different origin in high and low nutrient medium. *Biofouling*, 28(1), 51-63.
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., Xercavins, M., Horcajada, J. P., Bosch, J., Soto, S. M. (2019). Relationship between biofilm formation and

- antimicrobial resistance in gram-negative bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 25(1), 72-79.
- Ceyhan, N. (2008). Klinikte biyofilmlerin önlenmesi için antibiyofilm stratejileri. *İnfek Derg*, 22, 227-240.
- Chao, Y., & Zhang, T. (2011). Optimization of fixation methods for observation of bacterial cell morphology and surface ultrastructures by atomic force microscopy. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(2), 381-392.
- Chao, Y. (2013). Studies of biofilm development by advanced microscopic techniques and high-throughput sequencing. *HKU Theses Online (HKUTO)*.
- Chaudhary, M., & Payasi, A. (2012). Role of EDTA and CSE1034 in curli formation and biofilm eradication of *Klebsiella pneumoniae*: a comparison with other drugs. *The Journal of Antibiotics*, 65(12), 631-633.
- Cheung, Y. Y. (2013). Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *HKU Theses Online (HKUTO)*.
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & 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.
- Chung, P. Y. (2016). The emerging problems of *Klebsiella pneumoniae* infections: carbapenem resistance and biofilm formation. *FEMS Microbiology Letters*, 363(20).
- Chusri, S., Phatthalung, P. N., & Voravuthikunchai, S. P. (2012). Anti-biofilm activity of *Quercus infectoria* G. Olivier against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Letters in Applied Microbiology*, 54(6), 511-517.
- Costerton, J. W., Geesey, G. G., & Cheng, K. J. (1978). How bacteria stick. *Scientific American*, 238(1), 86-95.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994). Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*, 176(8), 2137.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., & Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(10), 1466-1477.
- Cotter, P. A., & Stibitz, S. (2007). c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation. *Current Opinion in Microbiology*, 10(1), 17-23.
- Cusumano, J. A., Caffrey, A. R., Daffinee, K. E., Luther, M. K., Lopes, V., & LaPlante, K. L. (2019). Weak biofilm formation among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 95(4), 114877.
- Davey, M. E., & O'toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847-867.
- David, S., Reuter, S., Harris, S. R., Glasner, C., Feltwell, T., Argimon, S., Abudahab, K., Goater, R., Giani, T., Errico, G., Aspbury, M., Sara Sjunnebo, S., Feil, E. J., Rossolini, G. M., Aanensen, D. M., Grundmann, H. (2019). Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread. *Nature Microbiology*, 4(11), 1919-1929.
- Davis, R., Markham, A., & Balfour, J. A. (1996). Ciprofloxacin. *Drugs*, 51(6), 1019-1074.

- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A., & Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(8), 4178-4182.
- Dianni, M. (2016). İnsan ve hayvan sağlığı açısından risk oluşturan enterokokal biyofilm yapısının doğası. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 73, 71-80.
- Domenico, D. E. G., Farulla, I., Prignano, G., Gallo, M. T., Vespaziani, M., Cavallo, I., Sperduti, I., Pontene, M., Bordignon, V., Cilli, L., Santis, A. D., Salvo, F. D., Pimpinelli, F., Parola, I. L. L., Toma, L., Ensoli, F. (2017). Biofilm is a major virulence determinant in bacterial colonization of chronic skin ulcers independently from the multidrug resistant phenotype. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(5), 1077.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Dunne, W. M. (2002). Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 155-166.
- Dündar, D. (2013). Sıvı mikrodilüsyon MİK testi. Başustaoğlu A, Yıldırım Ş.T., Editörler. *Klinik Mikrobiyoloji Yöntemleri El Kitabı* (Çeviri). 3. Baskı, Ankara, Atlas Kitapçılık.; 5.2
- Eng, C. H., Backman, T. W. H., Bailey, C. B., Magnan, C., García Martín, H., Katz, L., Baldi, P., Keasling, J. D. (2018). ClusterCAD: a computational platform for type I modular polyketide synthase design. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D509-D515.
- Eryılmaz, M., Kart, D., & Gürpınar, S. S.(2019) Investigation of Antibiofilm Activities of *Lactobacillus* sp. Metabolites Isolated from Vaginal Flora. *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg*, 49(3):169-174
- Flemming, H. C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*, 8(9), 623-633.
- Flemming, H. C., Neu, T. R., & Wozniak, D. J. (2007). The EPS matrix: the “house of biofilm cells”. *Journal of Bacteriology*, 189(22), 7945-7947.
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, 13(5), 269-284.
- Follador, R., Heinz, E., Wyres, K. L., Ellington, M. J., Kowarik, M., Holt, K. E., & Thomson, N. R. (2016). The diversity of *Klebsiella pneumoniae* surface polysaccharides. *Microbial Gmienomics*, 2(8).
- Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American Journal of Medicine*, 113(1), 5-13.
- Goller, C. C., & Romeo, T. (2008). Environmental influences on biofilm development. *Bacterial Biofilms*, 37-66.
- Gonzalez, C. M., & Schaeffer, A. J. (1999). Treatment of urinary tract infection: what's old, what's new, and what works. *World Journal of Urology*, 17(6), 372-382.
- Gün, İ., & Ekinci, F. Y. (2009). Biyofilmler: yüzeylerdeki mikrobiyal yaşam. *Gıda*, 34(3), 165-173.
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(3), 228-233.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95-108.

- Hayward, R. S., Harding, J., Molloy, R., Land, L., Longcroft-Neal, K., Moore, D., & Ross, J. D. (2018). Adverse effects of a single dose of gentamicin in adults: a systematic review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 84(2), 223-238.
- Hemmati, F., Salehi, R., Ghotaslou, R., Kafil, H. S., Hasani, A., Gholizadeh, P., & Rezaee, M. A. (2020). The assessment of antibiofilm activity of chitosan-zinc oxide-gentamicin nanocomposite on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 163, 2248-2258.
- Hennequin, C., & Robin, F. (2016). Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(3), 333-341.
- Highsmith, A. K., & Jarvis, W. R. (1985). *Klebsiella pneumoniae*: selected virulence factors that contribute to pathogenicity. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 6(2), 75-77.
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Givskov, M., Molin, S., & Ciofu, O. (2010). Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35(4), 322-332.
- Husmark, U., & Rønner, U. (1992). The influence of hydrophobic, electrostatic and morphologic properties on the adhesion of *Bacillus* spores. *Biofouling*, 5(4), 335-344.
- Júnior, D. O.N. G., & Franco, O. L. (2020). Promising strategies for future treatment of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiology*, 15(1), 63-79.
- Kang, C. I., Kim, S. H., Bang, J. W., Kim, H. B., Kim, N. J., Kim, E. C., Oh, M. D., Choe, K. W. (2006). Community-acquired versus nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features, treatment outcomes, and clinical implication of antimicrobial resistance. *Journal of Korean Medical Science*, 21(5), 816.
- Karagün, B. Ş., Akyıldız, Ö., Onaç, H., Kaya, F., Erdemler, F., Çetin, T. Ö., Antmen, B., Soyupak, B., Alhan, E. (2020). Adana Acıbadem Hastanesinde Hastane Enfeksiyonları Surveyansı: Bir Yıllık Analiz Sonuçları. *ACU Sağlık Bil Derg*, 11(3):478-482
- Karatuna, O. ve Yağcı, A. (2008). *Pseudomonas aeruginosa*'da virülans faktörleri ve quorum sensing. *Türk Mikrobiyol Cemiy Derg*, 38(1), 42-51.
- Kaya, İ. B., & Yardımcı, H. (2014). Quorum Sensing. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 25(1), 25-31.
- Koo, H., Falsetta, M. L., & Klein, M. I. (2013). The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *Journal of dental research*, 92(12), 1065-1073.
- Kuş, H., Arslan, U., & Fındık, D. (2017). Investigation of various virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from nosocomial infections. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 51(4), 329-339.
- Lamb, H. M., Ormrod, D., Scott, L. J., & Figgitt, D. P. (2002). Ceftriaxone. *Drugs*, 62(7), 1041-1089.
- Lenchenko, E., Blumenkrants, D., Sachivkina, N., Shadrova, N., & Ibragimova, A. (2020). Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Veterinary world*, 13(1), 197.
- Lin, W. H., Wang, M. C., Tseng, C. C., Ko, W. C., Wu, A. B., Zheng, P. X., & Wu, J. J. (2010). Clinical and microbiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing community-acquired urinary tract infections. *Infection*, 38(6), 459-464.
- Maharjan, G., Khadka, P., Siddhi Shilpakar, G., Chapagain, G., & Dhungana, G. R. (2018). Catheter-associated urinary tract infection and obstinate biofilm producers. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2018.

- Müller-Schulte, E., Tuo, M. N., Akoua-Koffi, C., Schaumburg, F., & Becker, S. L. (2020). High prevalence of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in clinical samples from central Côte d'Ivoire. *International Journal of Infectious Diseases*, 91, 207-209.
- Narasimhaswamy, N., Bairy, I., Manuel, A., Mathew, J., Shenoy, G., & Bairy, L. (2015). In-vitro bactericidal activity of recombinant lysostaphin on biofilm producing methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Curr Microbiol App Sci*, 4(1), 822-830.
- Naves, P., del Prado, G., Huelves, L., Gracia, M., Ruiz, V., Blanco, J., Dahbi, G., Blanco, M., del Carmen Ponte, M., Soriano, F. (2008). Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microbial pathogenesis*, 45(2), 86-91.
- Nirwati, H., Sinanjung, K., Fahrurissa, F., Wijaya, F., Napitupulu, S., Hati, V. P., Hakim, M. S., Meiala, A., Aman, A. T., Nuryastuti, T. (2019, December). Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. In *BMC proceedings*, Vol. 13, No. 11, pp. 1-8.
- Ott, E., Saathoff, S., Graf, K., Schwab, F. ve Chaberny, IF (2013). Bir üniversite hastanesinde nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonların yaygınlığı: gözlemsel bir çalışma. *Deutsches Ärzteblatt International*, 110 (31-32), 533.
- Öcal, D. N., Dolapçı, İ., Gençtürk, Z., & Tekeli, A. (2017). In vitro effect of vancomycin and daptomycin on biofilm formation of coagulase-negative *staphylococci* strains. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 51(3), 220-235.
- Özçetin, M., Saz, E. U., Karapınar, B., Özen, S., Aydemir, Ş., & Vardar, F. (2009). Hastane enfeksiyonları; sıklığı ve risk faktörleri. *J Pediatr Inf*, 3(3), 49-53.
- Palmer, J., Flint, S., & Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 577-588.
- Percival, S. L. (1999). The effect of molybdenum on biofilm development. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(2), 112-117.
- Percival, S. L., Suleman, L., Vuotto, C., & Donelli, G. (2015). Healthcare-associated infections, medical devices and biofilms: risk, tolerance and control. *Journal of medical microbiology*, 64(4), 323-334.
- Pinna, A., Sechi, L. A., Zanetti, S., & Carta, F. (2005). Detection of virulence factors in a corneal isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Ophthalmology*, 112(5), 883-887.
- Piperaki, E. T., Syrogiannopoulos, G. A., Tzouveleakis, L. S., & Daikos, G. L. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *The Pediatric infectious disease journal*, 36(10), 1002-1005.
- Podschun, R., & Ullmann, U. (1998). *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(4), 589-603.
- Presterl, E., Grisold, A. J., Reichmann, S., Hirschl, A. M., Georgopoulos, A., & Graninger, W. (2005). Viridans streptococci in endocarditis and neutropenic sepsis: biofilm formation and effects of antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(1), 45-50.
- Procop, G. W., Church, D. L., Hall, G. S., & Janda, W. M., Koneman, E. W., Schreckenberger, P. C., Woods, G. L., 'Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic'. Başustaoglu, A. ve Dürdal Us, A. ed. Başustaoglu, A. ve Dürdal Us, A Enterobacteriaceae Ailesi çev. Nevreste Çelikkilek vd. 7. Baskı, Ankara, Hipokrat Yayınevi. ss.229-290
- Rahdar, H. A., Malekabad, E. S., Dadashi, A. R., Keikha, M., Kazemian, H., & Karami-zarandi, M. (2019). Correlation between biofilm formation and carbapenem resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 29(6).

- Ribeiro, S. M., Cardoso, M. H., Candido, E. D. S., & Franco, O. L. (2016). Understanding, preventing and eradicating *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Future Microbiology*, 11(4), 527-538.
- Ristuccia, P. A., & Cunha, B. A. (1984). *Klebsiella*. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 5(7), 343-347.
- Ruiz, J., Sanjuan, E., Amaro, C., Gordon, M., Villarreal, E., Castellanos-Ortega, Á., & Ramirez, P. (2019). In vitro study of antimicrobial activity on *Klebsiella Pneumoniae* biofilms in endotracheal tubes. *Journal of Chemotherapy*, 31(4), 202-208.
- Rumbaugh, K. P., & Sauer, K. (2020). Biofilm dispersion. *Nature Reviews Microbiology*, 18(10), 571-586.
- Sahly, H., Podschun, R., Oelschlaeger, T. A., Greiwe, M., Parolis, H., Hasty, D., Kekow, J., Ullmann, U., Ofek, I., Sela, S. (2000). Capsule impedes adhesion to and invasion of epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 68(12), 6744-6749.
- Sanchez, C. J., Mende, K., Beckius, M. L., Akers, K. S., Romano, D. R., Wenke, J. C., & Murray, C. K. (2013). Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infectious Diseases*, 13(1), 1-12.
- Schembri, M. A., Blom, J., Krogfelt, K. A., & Klemm, P. (2005). Capsule and fimbria interaction in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and Immunity*, 73(8), 4626-4633.
- Seifi, K., Kazemian, H., Heidari, H., Rezagholizadeh, F., Saei, Y., Shirvani, F., & Houri, H. (2016). Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 9(1).
- Shadkam, S., Goli, H. R., Mirzaei, B., Gholami, M., & Ahanjan, M. (2021). Correlation between antimicrobial resistance and biofilm formation capability among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Iran. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 20(1), 1-7.
- Singla, S., Harjai, K., & Chhibber, S. (2013). Susceptibility of different phases of biofilm of *Klebsiella pneumoniae* to three different antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 66(2), 61-66.
- Stamm, W. E., & Norrby, S. R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *The Journal of infectious diseases*, 183, S1-S4.
- Stanley, N. R., & Lazizzera, B. A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Molecular Microbiology*, 52(4), 917-924.
- Subramanian, P., Shanmugam, N., Sivaraman, U., Kumar, S., & Selvaraj, S. (2012). Antibiotic resistance pattern of biofilm-forming uropathogens isolated from catheterised patients in Pondicherry, India. *The Australasian Medical Journal*, 5(7), 344.
- Temel, A., & Eraç, B. (2018). Bakteriyel biyofilmler: saptama yöntemleri ve antibiyotik direncindeki rolü. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 48(1), 1-13.
- Temiz, H., Özbek, E., Vural, D. G., & Özekinci, T. (2015). *Klebsiella* İzolatlarının Antimikrobiyal Direnç Oranlarının Değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 45(2), 68-74.
- The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 11.0, 2021. (<http://www.eucast.org>.)
- Trautner, B. W. (2010). Management of catheter-associated urinary tract infection (CAUTI). *Current Opinion in Infectious Diseases*, 23(1), 76.
- Türkel, İ., Yıldırım, T., Yazgan, B., Bilgin, M., & Başbulut, E. (2018). Relationship between antibiotic resistance, efflux pumps, and biofilm formation in extended-spectrum β -

- lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Chemotherapy*, 30(6-8), 354-363.
- Uniprot, (2021), 8 Mart 2021 tarihinde (<https://www.uniprot.org/taxonomy/573>) adresinden erişildi.
- Ustaçelebi, Ş. (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Ankara: Güneş kitabevi.
- Vading, M., Naucmér, P., Kalin, M., & Giske, C. G. (2018). Invasive infection caused by *Klebsiella pneumoniae* is a disease affecting patients with high comorbidity and associated with high long-term mortality. *PloS One*, 13(4).
- Vuotto, C., Longo, F., Pascolini, C., Donelli, G., Balice, M. P., Libori, M. F., Tiracchia, V., Salvia, A., Varaldo, P. E. (2017). Biofilm formation and antibiotic resistance in *Klebsiella pneumoniae* urinary strains. *Journal of Applied Microbiology*, 123(4), 1003-1018.
- Watnick, P. I., & Kolter, R. (1999). Steps in the development of a *Vibrio cholerae* El Tor biofilm. *Molecular Microbiology*, 34(3), 586-595.
- Wei, Q., & Ma, L. Z. (2013). Biofilm matrix and its regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *International journal of molecular sciences*, 14(10), 20983-21005.
- Weinstein, M. (1963). Gentamicin, a new antibiotic complex from *Micromonospora*. *J. Med. Chem.*, 122, 463-464.
- Wingender, J., Neu, T. R., & Flemming, H. C. (1999). What are bacterial extracellular polymeric substances?. *Springer*, (pp. 1-19).
- Yang, D., & Zhang, Z. (2008). Biofilm-forming *Klebsiella pneumoniae* strains have greater likelihood of producing extended-spectrum β -lactamases. *Journal of Hospital Infection*, 68(4), 369-371.
- Yılmaz, M. (2017) *E.coli ve K. pneumoniae suşlarında VITEK-2, çift disk sinerji ve kombine disk yöntemi ile araştırılması ve 3 testin karşılaştırılması*, (Tıpta Uzmanlık tezi). Sağlık Bilimleri Üniversitesi Kartal Dr Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, 20, İstanbul. Ulusal Tez Merkezi.
- Zaragoza, R., Ramírez, P., & López-Pueyo, M. J. (2014). Infección nosocomial en las unidades de cuidados intensivos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 32(5), 320-327.
- Zobell, C. E. (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1), 39.



T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Sayı: B.30.2.ODM.0.20.08/81

28.02.2020

Sayın Dr. Öğretim Üyesi Kemal BİLGİN

Etik Kurulumuza sunmuş olduğunuz Gentamisin, Seftriakson, Siprofloksasin, ve Meropenem'in Klebsiella pneumoniae İzolatlarına Karşı Antibiyofilim Aktivitelerinin Araştırılması başlıklı OMÜ KAEK 2020/70 Karar nolu Mikrobiyoloji çalışması nitelikli araştırma projeniz amaç, gerekçe, yaklaşım ve yöntemle ilgili açıklamaları, Klinik Araştırmalar Etik kurulu yönergesine göre 27.02.2020 tarihli Etik Kurulumuzda incelenmiş etik açıdan uygun bulunmuştur. Ancak araştırma bütçesinin maddi desteği henüz sağlanamadığından projeye bütçe desteği sağlanıp, tarafımıza bildirilmesinden sonra başlanmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinize arz/rica ederim.

Prof. Dr. Ramis COLAK
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Gülsüm Nalbant

Doğum Yeri: Ankara

Doğum Tarihi: 08.10.1996

Medeni Hali: Bekar

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

Eğitim Durumu: Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi-Biyoloji 2018/Mezun

OMÜ LEE Tıbbi Mikrobiyoloji Yüksek Lisans 2021/Devam

İletişim Bilgileri

E mail: 96.gulsum.nalbant@gmail.com

Telefon: 5074757472

ORCID ID: 0000-0002-1862-2882