



T.C.  
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

**GENİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEN  
*KLEBSIELLA PNEUMONIAE* İZOLATLARININ REP  
- PCR GENOMİK PARMAK İZİ TEKNİĞİ  
KULLANILARAK MOLEKÜLER  
TİPLENDİRİLMESİ**

**NIHAD SHAHADHA ABED**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KIRŞEHİR/2022**



T.C.  
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
İLERİ TEKNOLOJİLER ANABİLİM DALI

**GENİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEN  
KLEBSIELLA PNEUMONIAE İZOLATLARININ REP  
- PCR GENOMİK PARMAK İZİ TEKNİĞİ  
KULLANILARAK MOLEKÜLER  
TİPLENDİRİLMESİ**

**NIHAD SHAHADHA ABED**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
Prof. Dr. ERGİN KARİPTAŞ

**II. DANIŞMAN**  
Doç. Dr. SAFA ABED LATEF ALMEANI

**KIRŞEHİR / 2022**

## **TEZ BİLDİRİMİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

**NIHAD SHAHADHA ABED**



20.04.2022 tarihli Resmî Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi’nin aboneli olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.



## ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans ders ve tez sürecimde sürekli desteği, sabrı, motivasyonu için Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ'a büyük bir içtenlikle teşekkür ederim. Ayrıca bu tez çalışmasında eş danışmanım olan Anbar Üniversitesi Genetik Mühendisliđi ve Biyoteknoloji Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. Safa Abed Latef ALMEANI'e araştırmam boyunca değerli yorumları ve desteği için teşekkür ederim. Son olarak bu tezi araştırma ve yazma sürecim boyunca bana sürekli destek ve teşvik sağlayan aileme çok derin şükranlarımı sunarım.

Mayıs, 2022

**NIHAD SHAHADHA ABED**

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	viii
TABLO LİSTESİ.....	ix
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT .....	xiii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>2. GENEL KISIMLAR .....</b>	<b>3</b>
2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	3
2.1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin Tıbbi Önemi.....	5
2.1.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin Özellikleri.....	5
2.1.3- Patojenite.....	6
2.1.4- Virülans faktörleri.....	6
2.2. <i>K. pneumoniae</i> Antimikrobiyal Direnç .....	8
2.2.1. $\beta$ -Laktam Antibiyotiklere Direnç .....	10
2.2.2. $\beta$ -Laktamaz Üreten <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	12
2.3. $\beta$ -Laktamaz Sınıflandırmaları .....	13
2.4. Genişlemiş Spektrumlu $\beta$ -Laktamaz (ESBL).....	14
2.5. Rep-PCR ve ESBIS enzimleri .....	14
2.6. Enterobakteriyel tekrarlayan intergenik konsensüs (ERIC) PCR .....	15
<b>3. MATERYAL VE YÖNTEM .....</b>	<b>17</b>
3.1. Materyal .....	17
3.1.1. Laboratuvar Ekipman ve Aparatları .....	17
3.1.2. Kullanıma hazır kültür besiyeri .....	19
3.1.3. Kimyasal maddeler ve solüsyonlar .....	19
3.1.4. Antibiyotikler .....	20
3.1.5. Kitler .....	21
3.1.5.1. DNA Ekstraksiyonu .....	21
3.1.5.2. PCR Tespit Kiti .....	21
3.2. Primerler .....	22
3.3. Reaktifler, Solüsyonlar ve Pigmentlerin Hazırlanması .....	22

3.3.1. Reaktifler .....	22
3.3.1.1. Katalaz reaktifi .....	22
3.3.1.2. Kovac'ın reaktifi .....	22
3.3.1.3. Vogas-proskauer reaktifi .....	23
3.3.1.4. Oksidaz reaktifi .....	23
3.3.2. Solüsyonlar .....	23
3.3.2.1 Normal Tuz Solüsyonu .....	23
3.3.2.2 Sodyum Fosfat Tamponu .....	23
3.3.2.3 Tris-Asetat- EDTA Solüsyonu .....	23
3.4. Metodlar .....	24
3.4.1. Çalışma tasarımı .....	24
3.4.2. Ortamın Hazırlanması .....	24
3.4.3. Bakteri kültürü .....	25
3.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin tanımlanması .....	25
3.5.1. Morfolojik İnceleme .....	25
3.5.2. Mikroskopik İnceleme (Gram boyaları).....	25
3.5.3. Biyokimyasal doğrulama testleri (Schaub, 1958).....	25
3.5.3.1- Katalaz testi: .....	25
3.5.3.2- Oksidaz testi .....	25
3.5.3.3- Üre agar tabanı .....	26
3.5.3.4- IMVİC testi .....	26
3.5.3.4.1- İndol Testi .....	26
3.5.3.4.3- Voges-Proskauer Testi: .....	27
3.5.3.4.4- Sitrat kullanım testi .....	27
3.5.3.4.2- Metil Kırmızı Testi: .....	27
3.5.4. Otomatik Teşhis .....	27
3.6. Bakteri izolatlarının bakımı .....	28
3.6.1- Kısa süreli depolama .....	28
3.6.2- Orta süreli depolama .....	28
3.6.3- Uzun süreli depolama .....	28
3.7. Bakteri aşılamanın hazırlanması .....	28
3.8. Antibiyotik duyarlılık testi .....	29
3.9. ESBLs enzimlerinin tespiti .....	30
3.9.1. Fenotipleme Yöntemleri .....	30
3.9.1.1- Modifiye Hodge Testi: .....	30

3.9.1.2- Modifiye Sefalosporin veya Karbapenem İnaktivasyon Yöntemleri	30
3.9.1.3- EDTA Modifiye sefalosporinler İnaktivasyon Yöntemleri	31
3.9.2. Genişlemiş spektrumlu $\beta$ -laktam enzimlerinin tahmini	31
3.10. Moleküler çalışma	32
3.10.1. DNA ekstraksiyonu	32
3.10.2. Polimeraz Zincir reaksiyonu	33
3.10.2.1-Quintus TM Florometre kullanılarak DNA konsantrasyonunun belirlenmesi:	33
3.10.2.2- Primer seyreltmesi	34
3.10.2.3- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):	34
3.11. Jel elektroforezi	35
3.12. ERIC – PCR ürünleri verilerinin analizi	36
3.13. İstatistiksel Analiz	36
<b>4. BULGULAR VE TARTIŞMA</b>	<b>38</b>
4.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin önemini incelemek	38
4.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> İzolasyonu ve Tanımlanması	38
4.2.1. İzolasyon	38
4.2.2. Tanımlama	39
4.2.2.1. Morfolojik özellikler:	39
4.2.2.2. Mikroskopik ve Biyokimyasal test:	40
4.2.2.3. Otomatik Tanılama:	41
4.3. Duyarlılık Testi sonuçları	41
4.4. <i>K. pneumoniae</i> 'de ESBL Tespiti	46
4.4.1. <i>K. pneumoniae</i> 'de ESBL'lerin fenotipik tespiti	46
4.4.1.1. Modifiye Hodge Testi (yonca yaprağı testi):	47
4.4.1.2. Modifiye sefalosporinler inaktivasyon yöntemi	48
4.4.1.3. EDTA Modifiye sefalosporinler inaktivasyon yöntemi	48
4.4.2. <i>K. pneumoniae</i> 'de ESBL Aktivitesi	50
4.5. Ekstraksiyon genomik DNA	50
4.6. DNA konsantrasyonu	50
4.7. Obez Yetişkin Grubunda ve Obez Olmayan Grupta HOMA-IR Düzeyleri...	51
4.8 ERIC-PCR tekniği kullanılarak <i>Klebsiella pneumoniae</i> için moleküler parmak izi yöntemi	51
4.9. ESBL'ler ile ERIC profili arasındaki ilişki	54
<b>5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER</b>	<b>56</b>
5.1. Sonuç	56



5.2. Öneri .....	57
<b>KAYNAKLAR</b> .....	<b>58</b>
<b>EKLER</b> .....	
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	



## ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'deki bakteriyel direnç mekanizmaları. Bu görüntü (Varela, M. F. ve diğ., 2021)'dan uyarlanmıştır.....	9
Şekil 2.2. $\beta$ - Laktamazların Sınıflandırılması (Ahmed, S. H. ve diğ., 2021).....	13
Şekil (3.1) : Bakteriyel izolatların izolasyon tasarımı. ....	24
Şekil (3.2) : <i>Klebsiella pneumoniae</i> için Antibiyotik Duyarlılık Yöntemleri. ....	29
Şekil (3.3) : ESBLs üreten- <i>Klebsiella pneumoniae</i> için doğrulama testlerinin fenotipik profili. ....	31
Şekil (3.4) : ERIC ESBLs üreten- <i>Klebsiella pneumoniae</i> 'nin moleküler tespit aşamaları .....	32
Şekil 4.1. <i>K. pneumoniae</i> 'nin izolat kaynaklarına göre dağılımı.....	39
Şekil 4.2. A: Kanlı agar üzerinde <i>K. pneumoniae</i> , B: MacConkey agar.....	40
Şekil 4.3. <i>K. pneumoniae</i> 'de antibiyotikler için Kirby-Bauer Disk Difüzyon Duyarlılık Testi.....	46
Şekil 4.4. AL-Anbar ilinde <i>K. pneumoniae</i> arasında PDR, XDR ve MDR dağılımı. ....	46
Şekil 4.5. (A) MHT, (B) mCIM ve (C) eCIM kullanılarak doğrulama testi. ....	49
Şekil 4.6. ESBL tespiti için doğrulama testlerinin yüzdesi.....	49
Şekil 4.7. ERIC ürün amplifikasyonunun jel elektroforezi. M: Ladder 100bp, 1-15: <i>Klebsiella pneumoniae</i> izolatları, NC: <i>E. coli</i> ATCC 25922 Görünmez bandı.....	52
Şekil 4.8. Anbar hastanelerinden izole edilen 15 <i>K. pneumoniae</i> suşu için ERIC-PCR sonuçlarının dendrogramı.....	52

## TABLO LİSTESİ

Tablo 2.1. Mikrobiyal genomlarda bulunan seçilmiş endojen tekrarlayan diziler.....	16
Tablo 3.1. Bu çalışmada kullanılan aparatlar..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.	
Tablo 3.2. Diğer Laboratuvar Ekipmanları خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.	
Tablo 3.3. Bu çalışmada kullanılan bakteri kültürü besiyeri..... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.	
Tablo 3.4. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve solüsyonlar. خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.	
Tablo 3.5. PCR ve Elektroforez materyallerinin listesi.....	20
Tablo 3.6. Antibiyotik diskleri.....	20
Tablo 3.7. DNA Ekstraksiyon kiti.....	21
Tablo 3.8. PCR ve gerçek zamanlı Tespit Kiti.....	21
Tablo 3.9. Standart bakteri izolatları.....	22
Tablo 3.10. Çalışmada kullanılan primerler. ....	22
Tablo 3.11. ERIC1 ve ERIC2 genleri için hedef DNA'nın amplifikasyonunda kullanılan PCR protokolleri. .... خطأ! الإشارة المرجعية غير معرفة.	
Tablo 3.12. Orijinal PCR reaktifleri ve protokolün son konsantrasyonları. ....	35
Tablo 4.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> bakteri izolatları için morfolojik özellikler ve biyokimyasal testler. ....	41
Tablo 4.2. Kirbey-Bauer AST kart tekniğine göre <i>K. pneumoniae</i> izolatları çalışması için antibiyogram parametresi. ....	42
Tablo 4.3. <i>K. pneumoniae</i> izolatları arasında ESBLs Aktivitesi ....	50
Tablo 4-4 Jel analizörü kullanılarak Suşların Küme Analizi ve Genetik Çeşitliliği. 1-5 216-1971 izolatları, (bç (farklı boyutlar). ....	53
Tablo 4.5. ESBL pozitif taşıyıcılar arasındaki genetik ilişki. ....	55

## SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

<b>Simgeler</b>	<b>Açıklama</b>
%	: Yüzde
°C	: Santigrat derece
dL	: Desilitre
H <sub>2</sub> O	: Su
kg	: kilogram
L	: Litre
mg	: Miligram
Min.	: Minimum
mm	: Milimetre
ng	: Nano gram
β	: Beta

<b>Kısaltmalar</b>	<b>Açıklama</b>
ALA	: Amipli karaciğer apsesi
BP	: Çift bazlı
DME	: Doğrudan mikroskopik inceleme
dMTP	: deoksi Nükleotit
EĞER	: Immünofloresan
ELISA	: Enzim bağlantılı Bağışıklık Sorbent Testi
HKM	: Hastalık Kontrol Merkezi
INP'ler	: Bağırsak parazitleri
mAb'ler	: Monoklonal antikolar
NCBI	: Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
nm	: Nanometre
PCR	: Polimeraz zincirleme reaksiyonu
PH	: Hidrojen İyon Potansiyeli
RBC'ler	: Kırmızı kan hücreleri
RBC'ler	: Kırmızı kan hücreleri
RNA	: Riboz Nükleik Asit
RPH	: Ters pasif hemaglutinasyon
RT-PCR	: Gerçek zamanlı PCR
SNP'ler	: Tek nükleotid gen polimorfizmleri
SPSS	: Sosyal Bilimler İstatistik Paketi
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# GENİŞ SPEKTRUMLU BETA - LAKTAMAZ ÜRETEN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* İZOLATLARININ REP - PCR GENOMİK PARMAK İZİ TEKNİĞİ KULLANILARAK MOLEKÜLER TİPLENDİRİLMESİ

NIHAD SHAHADHA ABED

Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

İleri Teknolojiler Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

Eş Danışman: Doç. Dr. Safa Abed Latif ALMEANI

Enterobakteriyel “tekrarlayan intergenik konsensüs (ERIC) dizi analizi, bakteri türlerinin epidemiyolojik analizi için güçlü bir araçtır. Çoklu ilaç direnci, önemli insan patojenlerinde bu antimikrobiallere karşı içsel ve/veya kazanılmış direncin önemli belirleyicileridir. Bu çalışma, ERIC-PCR yaklaşımı kullanılarak Irak'ın batısındaki Ramadi hastanelerinden elde edilen *K. pneumoniae* suşlarının antimikrobiyal duyarlılığını ve genetik ilişkisini belirlemek için tasarlanmıştır. Bu çalışma ile ilk kez Irak/Anbar'da β-laktama dirençli *Klebsiella pneumoniae* izolatları arasında *K. pneumoniae* suşlarının genetik ilişkisi bildirilmektedir. 51 tane β-laktam – sefalosporin *K. pneumoniae* suşu Anbar Eğitim Hastanelerinin yanık, yara, kan, idrar ve balgam gibi farklı klinik kaynaklarından toplandı. Tüm izolatlar konvansiyonel yöntem ve Vitek-2 sistemi ile tanımlandı. Farklı antibiyotiklere duyarlılık testi AST-kart ile Vitek-2 sistemi ve Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapıldı. *Klebsiella pneumoniae*'nin en yüksek izolasyon oranı sırasıyla idrarda %62.745, balgamda %29.411 iken yara, kan, ve yanık kaynaklarında %5.88, %1.96 ve 5/75 olarak belirlendi. Farklı izolasyon kaynaklarından sırasıyla *Klebsiella pneumoniae*'nin suşları izole edilmiştir. En yüksek izolasyon oranı idrardan %62.745 olmuştur. Balgam %29.411, yara, kan, yanık oranı sırasıyla %5.88, %1.96 ve 5/75 idi. Yapılan bu çalışmada *K. pneumoniae*. suşlarının, direnç yüzdesinin sırasıyla

Augmentin %96, Sefotaksim %92, Seftriakson=Seftazidim %88, Amikasin %48, Levofloksasin %42 ve Meropenem %26 olduğunu gösterdi. Yine bu çalışmada Çoklu İlaç Dirençli (MDR), Yaygın İlaç Dirençli (XDR) ve Pan İlaç Dirençli (PDR) yüzdesi sırasıyla 44 (%88), 4 (%8), 2 (%4) olarak belirlendi. Geniş Spektrumlu  $\beta$ -laktamaz enzimlerinin fenotipik tespiti, Modifiye Hodge Testi, mCIM, eCIM ile gerçekleştirildi. Tüm izolatların sefalosporin gen üreticisi olduğu mCIM ve SBL ile pozitif (%100) ve modifiye Hodg testi (MHT) ile %4'ü için pozitif sonuç verdi. On izolatın %100 oranında ESBLs ürettiği tespit edildi. İzolatların ESBLs değerlerine yönelik enzimatik aktivite değerleri (0.11-0.7) arasında değişmektedir. ERIC-PCR sonuçları ve veri analizi 23 farklı ERIC tipi olduğunu gösterdi. Bu çalışmanın bulguları, incelenen hastanelerde multidirençli *K. pneumoniae* prevalansında bir artış olduğunu göstermektedir. ERIC PCR sonuçları, Anbar Hastanelerinde *K. pneumoniae* izolatlarının poliklonal olduğunu göstermiş olup *K. pneumoniae* suşları arasında yüksek düzeyde genetik çeşitlilik ortaya koydu. Bazı izolatlar benzer ERIC profiline sahip olup iki tanesi idrardan (13, 14), iki tanesi balgamdan (11 ve 12) ve yine iki tanesi idrardan (1,3) olan izolatlar genetik olarak homojen profil gösterdi.

Mayıs 2022, 54 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** Rep-PCR, *Klebsiella pneumoniae*, Beta laktamaz

## ABSTRACT

M.Sc. THESIS

# MOLECULAR TYPING OF EXTENDED -SPECTRUM BETA-LACTAMASE-PRODUCING *KLEBSIELLA PNEUMONIA* ISOLATES USING REP-PCR GENOMIC FINGERPRINTING TECHNIQUE

NIHAD SHAHADHA ABED

Kirsehir Ahi Evran University

Graduate School of Sciences and Engineering

Department of Advanced Technologies

Supervisor: Prof. Dr. Ergin KARİPTAŞ

Co-Supervisor: Assoc. Dr. Safa Abed Latif ALMEANI

Enterobacterial“repetitive intergenic consensus (ERIC) sequence analysis is a powerful tool for epidemiological analysis of bacterial species. Multidrug resistance are important determinants of intrinsic and/or acquired resistance to these antimicrobials in important human pathogens. The present study was designed to study determine the antimicrobial susceptibility” and genetic relatedness of *K. pneumoniae* strains obtained from Ramadi Hospitals, Western Iraq, using the ERIC–PCR approach. For the first time, this study reports genetic relatedness of *K. pneumoniae* strains among  $\beta$ -lactam resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Anbar Governace/ Iraq. Fifty one of  $\beta$ -lactam – cephalosporins *K. pneumoniae* was collected from different clinical sources such as (burns, wounds, sputum, blood and urine isolates) from Anbar Teaching Hospitals. All isolates were identified by conventional method and Vitek-2 System. The susceptibility test to different antibiotics was done by AST- card using Vitek-2 System and Kirby – Bauer disk diffusion method. The highest isolation rate of *Klebsiella pneumoniae* was from urine source 62.745%, sputum 29.411%, while rate wound, blood, burn were 5.88%, 1.96 %, and 5/75, respectively. The current study showed that resistance percentage was Augmentin (96%), Cefotaxime (92%), Ceftriaxone = Ceftazidime (88%), Amikacin (48%), Levofloxacin (42%), and Meropenem (26%). Percentage of Multi - Drug Resistant (MDR), In this study Extensively Drug Resistant (XDR), and Pan Drug Resistant (PDR) in were with ratio 44

(88%), 4 (8%), 2 (4%), respectively. The phenotypic detection of Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases enzymes were performed by Modified Hodge test, mCIM, eCIM. All isolates are cephalosporins gene-producing, (100%) gave positive result with mCIM and SBL, and 4% gave positive result for modified Hodg test(MHT). It was found that ten isolates produced ESBLs in percentage 100%.The enzymatic activity for ESBLs values of isolates ranged between values(0.11-0.7). ERIC-PCR results and data analysis indicate that there are 23 distinct ERIC types. The findings of this study show an increase in the prevalence of multiresistant *K. Pneumoniae* in the hospitals studied. The ERIC PCR results revealed a high level of genetic diversity across *K. Pneumoniae* strains, showing that *K. Pneumoniae* isolates are polyclonal in Anbar hospitals. Some isolates had similar ERIC profile, two from urine (13, 14), two from sputum (11 and 12) and two from urine (1,3) showed genetically homogeneous profile.

May 2022, 54 Pages

**Keywords:** Rep-PCR, *Klebsiella pneumoniae*, Beta lactam



# 1: GİRİŞ

Geniş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL-E) üreten Enterobacteriaceae üyelerinin ve karbapenemazlar (CPE) üreten alt kümelerinin yaygın olarak bulunması tüm dünya için endişe vericidir. *K. pneumoniae*, hastane enfeksiyonlarının en önemli nedeni olan bir organizma olmasının yanı sıra özellikle immün yetmezliği olan hastalarda pnömoni, sepsis ve idrar yolu enfeksiyonlarına neden olur. Bu bakterinin neden olduğu enfeksiyonlar beta-laktamlar ve florokinolonlarla tedavi edilir (1). Geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (ESBL) üreten Enterobacteriaceae üyelerinden, *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (2) farklı pnömonilere neden olan en yaygın organizmalardır. (3)

Hastanelerde yatan hastalarda başta hastane enfeksiyonları olmak üzere halk sağlığını tehdit eden enfeksiyon hastalıklarının önemi göz önüne alındığında, *K. pneumoniae* enfeksiyonlarının durumu, dağılımı ve kaynaklarının anlaşılması oldukça önemlidir. Bu amaçla moleküler tiplendirme yöntemlerinin *K. pneumoniae* suşlarının özelliklerinin ortaya konması açısından faydalı olacağı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır (5). Epidemiyolojik çalışmalarda bakteriyel, ribotipleme, Pulsed-Field Jel Elektrofrezisi ve PCR tabanlı yaklaşımlar dahil olmak üzere çeşitli moleküler tiplendirme yöntemleri kullanılmaktadır. (6).

Doğrudan parmak izi oluşturmak için endonükleaz enzimlerinin kullanılmasına alternatif bir yöntem Rep-PCR tekniğidir. Oligonükleotid primerleri, prokaryotlarda bulunan tekrar eden kısa tekrarlı nükleotidlerin dizilerine dayanan bu yöntem kullanılarak oluşturulur. (7). Bu yöntem hızlı ve tekrarlanabilir olmasının yanı sıra ve çok fazla ayırım gücü sunar. Bu teknikte, her biri üç tip tekrarlayan elemandan birini tamamlayıcı olan üç tip primer dizisi kullanılır: Bunlar BERIC, BOX veya REP. ERIC olarak bilinir.

Irak hastanelerinde, *Klebsiella pneumoniae* nozokomiyal enfeksiyonları, geniş spektrumlu laktamaz (GSBL) insidansı ile karakterize edilir. Çoklu ilaca dirençli bakteriler için bir tedavi seçeneği olarak antimikrobiyal ilaçların azlığı önemli bir problem oluşturmaktadır.

Yapılan bu çalışmanın amacı

- 1- Ramadi Hastanelerinde *K. pneumoniae* izolatlarının GSBL üretimini tespit etmek,
- 2- Ramadi şehrindeki hastanelerden alınan *K. pneumoniae* izolatları arasında ERIC-PCR tekniği kullanılarak genetik akrabalığın saptanması olarak belirlenmiştir.

## 2- GENEL KISIMLAR

### 2.1- *Klebsiella pneumoniae* :

Klebsiella taksonomisi, renkli taksonomik tarihini yansıtan bir isimlendirme ile karakterize edilir. Başlangıçta, Klebsiella cinsinin (Enterobacteriaceae familyası) tıbbi önemi, neden oldukları hastalıklara karşılık gelen üç türe ayrılmasına yol açmıştır: *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* ve *K. rhinoscleromatis*. Numerik taksonomi gibi yeni yöntemlerin geliştirilmesi nedeniyle taksonomi giderek daha iyi hale geldikçe, bu cinsteki tür sınıflandırması sürekli olarak revize edilmiştir (Tablo 2-1).

Tablo 2-1 : *Klebsiella* cinsinin farklı taksonomik sistemlere göre tür sınıflandırması

Classification by:		
Cowan	Bascomb	Ørskov
<i>K. aerogenes</i>	<i>K. edwardsii</i>	<i>K. aerogenes/oxytoca/ edwardsii</i>
		<i>K. pneumoniae</i>
		<i>subsp. pneumoniae</i>
<i>subsp. edwardsii</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>subsp. ozaenae</i>
<i>subsp. atlantae</i>	sensu stricto	<i>subsp. rhinoscleromatis</i>
<i>K. pneumoniae</i>	sensu lato	<i>K. oxytoca</i>
<i>K. ozaenae</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. terrigena</i>
<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. rhinoscleromatis</i>	<i>K. planticola (syn. K. trevisanii)</i>
	<i>K. "unnamed group"</i>	
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>K. ornithinolytica</i>

*Klebsiella pneumoniae* hastanede yatan hastalarda antimikrobiyal dirençli fırsatçı enfeksiyonların yaygın bir nedenidir. Tür, Penisiline doğal olarak dirençlidir ve popülasyonun üyeleri genellikle çoklu antimikrobiyallere karşı kazanılmış direnç taşır. Bununla birlikte, *K. pneumoniae* ekolojisi, popülasyon yapısı veya patojenitesi hakkındaki bilgiler nispeten sınırlıdır. Son on yılda *K. pneumoniae*, geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar ve/veya

Karbapenemazlar üreten çoklu ilaca dirençli suşların neden olduğu sağlık hizmetleriyle ilişkili enfeksiyonların artan prevalansı nedeniyle klinik ve halk sağlığı tehdidi olarak ortaya çıkmıştır. Edinilmiş virülans faktörlerini ifade eden suşlarla ilişkili, "hipervirüent" terimi *K. pneumoniae*'nin neden olduğu ciddi toplum kökenli enfeksiyonlarla bağlantılı olarak ortaya çıkmıştır. Klinik kaygılar, *K. pneumoniae* araştırmalarına ve özellikle genomiklerin uygulanmasına olan ilgiyi yeniden canlandırmıştır (9).

*Enterobacteriaceae* familyasına dahil olan *Klebsiella pneumoniae* sağlıklı insan ve hayvanların gastrointestinal sistem mikrobiyomunun doğal bir üyesidir. Hastanelerde sık görülen fırsatçı bir patojendir ve görülen tüm gram-negatif enfeksiyonların kabaca üçte birini oluşturur. İdrar yolu enfeksiyonları, sistit, pnömoni, cerrahi yara enfeksiyonları ve endokardit ve septisemi gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlar gibi ekstra bağırsak enfeksiyonlarına neden olur. Nekrotizan pnömoni, piyojenik karaciğer apseleri ve endojen endoftalmi, bunların neden olduğu, toplumda ortaya çıkan yıkıcı hastalıklardır (10). Carl Friedlander ilk olarak 1882 yılında *Klebsiella pneumoniae*'yi ölen pnömoni hastalarının akciğerlerinden izole edilen bir bakteri olarak tanımlamıştır. (11)

Normal insanların yaklaşık %5'inin solunum yollarında ve dışkıсында *K. pneumoniae* bulunur. Küçük bir oranda bakteriyel pnömoniyeye neden olur (yaklaşık %1). *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* hastanelerde enfeksiyonlara neden olur (12). *K. pneumoniae*, gram negatif bakteriyeminin *Escherichia coli*'den sonra gelen en büyük ikinci nedenidir. *K. pneumoniae* bakteriyemisi, tüm popülasyonlarda önemli oranda ölüme neden olur. Metastatik hastalıklar, örneğin, piyojenik serebrum kaynaması, menenjit ve endoftalmi *K. pneumoniae*'nin neden olduğu hastalıklardandır (13).

### **2.1.1 *Klebsiella pneumoniae*'nin Tıbbi Önemi:**

Klebsiella türleri, pnömoni, idrar yolu enfeksiyonları (İYE), kan dolaşımı enfeksiyonları ve sepsis gibi çok çeşitli hastalıklara neden olur. Bu enfeksiyonlar özellikle yeni doğanlar, yaşlılar ve bağışıklığı baskılanmış bireyler için önemli bir problemdir. Klebsiella ayrıca önemli sayıda toplum kökenli enfeksiyondan sorumludur. Bu enfeksiyonların tanımlayıcı bir özelliği morbidite ve mortaliteleridir. Bunlarla ilişkili olarak Klebsiella suşları hipervirüent olarak kabul edilir. Çoklu ilaca dirençli suşların artan izolasyonu, Klebsiella enfeksiyonlarının tedavisi için terapötik seçenekleri önemli ölçüde daraltmıştır. Bu patojen d çeşitli kuruluşlar tarafından 'insan sağlığına yönelik acil bir tehdit' olarak belirlenmiştir (14).

Dünya Sağlık Örgütü yakın zamanda Klebsiella'yı yeni tedavilere acilen ihtiyaç duyulan kritik mikroorganizmalar listesine dahil etmiştir. Klebsiella patogenezi hala önemli boşluklar içermektedir. Bu nedenle, Klebsiella'ya karşı konak savunmasının mekanizmasını aydınlatmak ve bu patojenin nedne olduğu enfeksiyonlarla mücadele için önleyici ve yeni terapötik önlemlerin geliştirilmesi yüksek öncelik göstermektedir (15).

### **2.1.2 *Klebsiella pneumoniae*'nin Özellikleri**

*Klebsiella pneumoniae*, Gram negatif, kapsüllü, hareketsiz, fakültatif anaerobik bir bakteridir (16). *Klebsiella* türleri arasında *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleroma* ve önemli klinik etkiler gösteren, fırsatçı ve iyatrogenik enfeksiyöz olan *K. pneumoniae* yer alır (17). Tipik olarak, dairesel veya hafif sivri uçlu düz çubuklardır. Tek tek çiftler veya küçük zincirler halinde bulunmaların yanı sıra (18) besiyerinin basıncına ve yapısına bağlı olarak değişken kubbe şeklinde, parlak formda koloniler oluşturur (19).

### 2.1.3- Patojenite

*Klebsiella* enfeksiyonları, hastanelerde en yaygın kişiden kişiye temas yoluyla yayılır. *Klebsiella* enfeksiyonları, bakterilerin kolayca kişiye bulaşması mümkün olduğundan sağlık bakım ortamlarında en yaygın olanıdır. Ventilatörler, kateter veya cerrahi yaraları bulunan hastalar bu tehlikeli enfeksiyona karşı daha savunmasızdır (20).

İnsanlarda bulaşıcı dozajı bilinmemektedir. Kuluçka süresi de tam olarak belirlenmemiştir ancak birkaç gün olduğu düşünülmektedir. (21) *Klebsiella* cinsine ait bakterileri toprakta ve suda yayılış göstermektedir. *K. pneumoniae*, endişe verici derecede yüksek seviyelerde olmasa da insanlarda sindirim sistemi tipik mikrobiyotasında bulunur.(22) Ayrıca, ağızda ve deride bulunabilirler. *K. pneumoniae* enfeksiyonları akciğerlerde meydana gelir ve akciğer dokusunda nekroz, iltihaplanma ve kanamaya neden olur. Orofaringeal bakterilerin alt solunum yollarına aspire edilmesi buna neden olur. İdrar yolu, alt solunum yolu, safra yolları ve cerrahi yaraların tümü *K. pneumoniae* tarafından kolonileşme için kullanılır (23).

### 2.1.4- Virülans faktörleri

Hastanede yatan hastalarda, *Klebsiella pneumoniae* antimikrobiyal dirençli fırsatçı enfeksiyonların yaygın bir kaynağıdır (24). Bakteri, insan vücudunun hemen hemen her alanını enfekte edebilir, ancak en tipik olarak idrar ve solunum sistemlerinde görülür (25).

Kapsüller polisakkarit, lipopolisakkarit tip 1 ve tip 3, fimbria, dış zar proteinleri, demir alımı ve azot kaynağı kullanımını *K. pneumoniae*'de bulunan virülans faktörleri arasındadır. Bu virülans faktörleri, *K. pneumoniae* tarafından enfeksiyon sırasında ve ayrıca biyofilm oluşturmak ve bağışıklık sisteminden kurtulmak için kullanılmaktadır. (26)

*K. pneumoniae*'nin en önemli virülans bileşeni kapsüler polisakkarittir (CPS). Bakterinin fagositlere ve seruma karşı direncinin yanı sıra inflamasyon ve sepsis oluşturmaktan sorumludur (27). Bakteriler, bakteri kapsülü ile konağın mukoza tabakasına yapışarak mukoza zarlarını kolonize olurlar (28).

Ferrik demir için seçici olan ve böylece bakteri hücrelerine demir veren küçük (MW 500-1000) ligandlar olan sideroforlar, yüksek afiniteli demir asimilasyon sistemleri sağlamak için *Klebsiella pneumoniae*'de evrimleşmiştir. Bakterilerde, sideroforlar ve siderofor bazlı şelasyon, önemli miktarda demir absorpsiyonundan sorumludur. Enterobacteriaceae'de üç ana siderofor sistemi vardır: Bunlar Enterobactin, Aerobaktin ve Yersiniabaktin'dir (29).

*Escherichia coli* ve *Salmonella* türlerinin neredeyse tüm klinik izolatları, Enterobacterial'in ana demir alım yolu gibi görünen bu sideroforu üretir. (30). Büyük molekül ağırlıklı antibiyotikler dış zar gözenek proteinlerinden geçemezler, bu nedenle Siderofor-antibiyotik konjugatları, bakteriyel ilaç direnciyle mücadele etmek için "Truva atı" stratejisi olarak bilinen bir taktik olan bakteri hücrelerine antibiyotik taşınmasına yardımcı olmak için geliştirilmiştir (29).

Lipopolisakkarit (LPS), Gram-negatif bakterilerin dış zarının ana bileşenidir ve lipid A, bir çekirdek oligosakarit ve bir uzun zincirli polisakaritten (O-antijen) oluşur. *K. pneumoniae*'nin virülans faktörleri lipopolisakkarit (LPS) ve fimbrialarının sırasıyla bakterinin mukus tabakasına ve epitel hücrelerine yapışmasından sorumlu olduğu bilinmektedir. (20).

*K. pneumoniae* ayrıca hücre dışı bir matrise gömülü bakteri popülasyonları olan biyofilmler oluşturmasıyla da bilinir. Proteinler, ekzopolisakkaritler, DNA ve lipopeptitler bu matrisi oluşturur. Biyofilm üretimi, antibiyotik tedavisine daha fazla dirençle

ilişkilendirilmiştir. *K. pneumoniae*'nin biyofilmleri, özellikle hastane ortamlarında ve kateterlerde keşfedilmiştir. *K. pneumoniae* biyofilm sayesinde antibiyotik tedavilerinden korunur. Bir zamanlar antibiyotik moleküllerinin sınırlı penetrasyonundan kaynaklandığı düşünülen bu koruma, aslında biyofilmin merkezdeki hücrelerin gecikmeli çoğalmasından kaynaklanmaktadır. (26)

## **2.2- *K. pneumoniae* Antimikrobiyal Direnç:**

*K. pneumoniae*'de antibiyotik direncinden sorumlu mekanizmalardan biri akış pompaları olarak tanımlanmıştır. (32) Gram negatif bakterilerde, ilaç akışı temel bir direnç mekanizmasıdır. Çözünenler bu sistemler tarafından hücre dışına pompalanır. Antimikrobiyal ajanlar, metabolitler ve çekirdek algılayıcı sinyal moleküllerinin tümü, mikropların iç ortamlarını düzenlemesine izin veren akış pompaları tarafından uzaklaştırılır (32). *K. pneumoniae*'de 100'den fazla farklı kazanılmış antibiyotik direnç geni keşfedilmiştir. Ampisilin, Amoksisilin ve Tikarsilin'e karşı direnç, kromozom üzerinde SHV-1 Penisilinaz varlığı ile sağlanır (33).

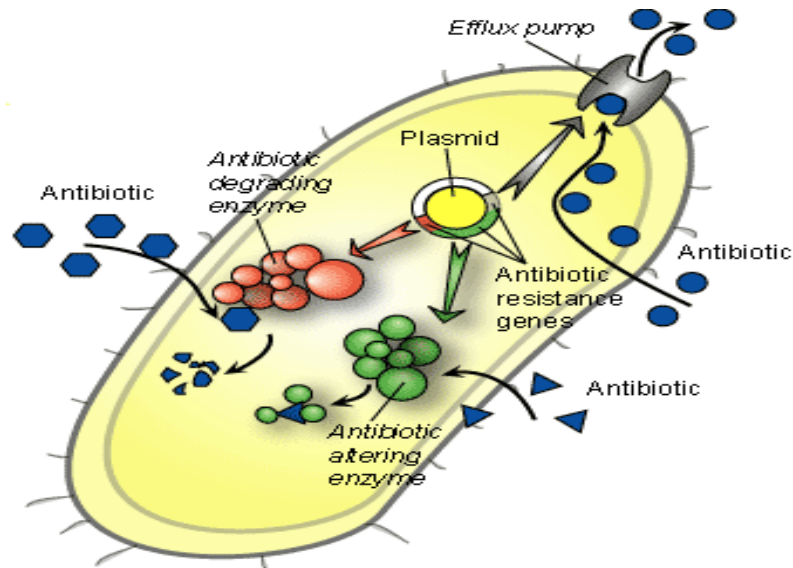
Laktamazları kodlayan genlerin varlığı, laktam ilaçlara Enterobakteriyel direnç ile bağlantılıdır (34). Bu laktamazlar genellikle bla genleri tarafından kodlanır ve tümü farklı hidrolitik özelliklere sahip olan CTX-M, TEM, SHV ve OXA ailelerinin üyeleridir (33). *K. pneumoniae*, son yıllarda çok çeşitli antibiyotik direnç mekanizmaları geliştirerek, neden olabileceği hastane enfeksiyonlarını daha da tehlikeli hale getirmiştir. Bu, dirençli suşların tanımlanmasını ve neden olduğu enfeksiyonun tedavisini daha da zorlaştırmaktadır (35).

Günümüzde, Antimikrobiyal direnç (AMR), tüm dünyada hızla büyüyen bir sorundur. *Klebsiella pneumoniae* gibi patojenik bakteriler, hızla gelişen çoklu ilaca dirençli (MDR) suşlar olup, tam olarak tedavi edilmemesinden dolayı artan ölüm riski nedeniyle hastalar için büyük bir tehlike oluşturmaktadır. (14)



Geniş Spektrumlu Laktamazlar (ESBL'ler) ve Karbapenemazlar gibi enzimlerin sentezi sayesinde, *K. pneumoniae*'nin çoğu bakteriden daha kolay antibiyotik direnci geliştirdiği görünmüştür. (36) *K. pneumoniae* ortamdaki bakterilerden antibiyotik direnç genlerinin, klinik olarak önemli patojenlere geçişinde rol oynar. (37). *K. pneumoniae*'nin çeşitli antibiyotik ailelerine karşı direnci gün geçtikçe artmaktadır. Bu antibiyotik direnç mekanizmalarının (AMR) çoğu, yatay gen transferi (HGT) yoluyla elde edilmiş ve bu bakterilere laktam ve kinolon sınıflı antibiyotiklere karşı önemli düzeyde direnç kazandırmıştır. (38).

Şekil 2-1'e göre, *Klebsiella pneumoniae*'de bakteri hücrelerinin çoklu ilaç direnci kazandığı dört ana süreç vardır.(i) Antibiyotiklerin hücrelere girmesini önlemek için hücrel geçirgenliğin değiştirilmesi; (ii) antibiyotik hedeflerini etki edemeyecekleri şekilde değiştirmek; (iii) antibiyotikleri etkisiz hale getirmek için enzimatik modifikasyon kullanması; ve (iv) antibiyotikleri hücre içinden dışarı pompalamak için dışa akış pompalarının kullanması. (39).



Şekil 2-1: *Klebsiella pneumoniae*'deki bakteriyel direnç mekanizmaları. Bu görüntü (39)'dan uyarlanmıştır.

### 2.2.1- $\beta$ -Laktam Antibiyotiklere Direnç

Sefalosporinler, monobaktamlar, Penisilinler ve Karbapenemler, moleküler yapılarında bir laktam halkası bulunan geniş bir antibiyotik sınıfı olan laktam antibiyotiklerin en bilinen örnekleridir.(40). Bunlar, bakteri hücre duvarının oluşumunu engelleyerek mikroorganizmaların parçalanmasına ve ölmesine neden olarak çalışan en yaygın kullanılan antibiyotiklerdir. Bakteriler, yaygın kullanımlarının bir sonucu olarak, esas olarak laktam antibiyotiklerin laktam halkasını hidrolize eden ve onları etkisiz hale getiren laktamaz enzimlerinin aracılık ettiği bu antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları geliştirmiştir. Son araştırmalar, laktamazların etkilerine karşı koymak için laktam antibiyotikleri ve laktamaz inhibitörlerinin bir kombinasyonunun kullanılmasının olduğunu göstermiştir. Laktam antibiyotik direnci ise 1940'lardan 2020'ye kadar olan dönemde ciddi bir sağlık sorunu haline gelmiştir (Şekil 2-2). Bugüne kadar, enterik enfeksiyonlar arasında yüzlerce farklı laktamaz evrimleşmiş, *K. pneumoniae* de dahil olmak üzere şaşırtıcı bir miktara (>2000) ve çeşitliliğe ulaşmıştır. (41).

Porinlerin ve hedeflerin modifikasyonu, inaktive edici enzimlerin (beta-laktamazlar) üretilmesi ve otolitik enzim salınımının inhibisyonu, beta-laktam antibiyotiklere karşı bakteriyel direncin örnekleridir. Ayrıca bakteriler, yeni beta-laktam antibiyotik tedavilerine uyum sağlamak için karmaşık genetik yollar geliştirmiştir. (42).

Bakterilerin beta-laktamların bakterisidal etkisinden kaçınması için dört ana mekanizma vardır: Penisiline bağlanan ancak -laktam antibiyotikler için zayıf bir afiniteye sahip olan değiştirilmiş proteinler, *Staphylococcus aureus* PBP 2-(PBP2a) ve PBP 2x *Streptococcus pneumoniae* buna iki örnektir. Penisilinler, nispeten dirençli oldukları için bu PBP'leri etkisiz hale getiremezler ve bir kez devre dışı bırakıldıklarında diğer PBP'lerin rollerini üstlenebilirler. Gram negatif bakterilerde, dış zar proteinleri (OMP) ekspresyonu

azalır veya yoktur. Beta-laktamlar, PBP'lere erişmek için dış zardaki porin kanallarından geçmelidir; bununla birlikte, azalmış OMP üretimi, belirli beta-laktamların gram-negatif bakterilerin periplazmik boşluğuna girmesini önleyerek, iç zardaki PBP'lere erişimlerini sınırlandırır. Sırasıyla OmpK36 ve OMP D2'nin kaybı, *Klebsiella pneumoniae* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da imipenem direncine yol açabilir. (43). CarO OMP'nin silinmesinin, çok ilaca dirençli *Acinetobacter baumannii*'nin bazı izolatlarında Meropenem ve İmipenem'e karşı direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Porin kodlayan genlere bir dizinin eklenmesi veya mutasyonu, hücreye beta-laktam difüzyonunu azaltan azaltılmış aktiviteye sahip proteinlerin sentezi ile sonuçlanabilir. 59 Direnç fenotipi elde etmek için sadece porini yok etmenin yetersiz olduğu düşünülmektedir. Bu mekanizma sıklıkla beta-laktamaz üretimiyle bağlantılıdır. (44).

Akış pompaları, doğuştan gelen veya edinilmiş direnç fenotipinin bir bileşenidir. Efflux pompaları, hücrenin periplazmasından dış dünyaya çeşitli substratları taşıma yeteneğine sahiptir. Gram negatif bakterilerde, özellikle *P. aeruginosa*'da, bu pompalar çoklu ilaç direncinin belirleyicisidir. Sefalosporinler, penisilinler, tetrasiklinler, kinolonlar ve kloramfenikol gibi birkaç beta-laktam antibiyotiğe karşı duyarlılığın azalması, mexA-mexB-OprD geninin aşırı ekspresyonu ile kombinasyon halinde daha düşük dış zar geçirgenliğine atfedilebilir. (45).

**Laktamazların üretimi:** Bakteriler, beta-laktam halkasını hidrolize eden ve antibiyotiği PBP hedefine ulaşmadan önce etkisiz hale getiren Beta-laktamaz adı verilen enzimler geliştirir. Beta-laktamazların PBP'lerle yapısal bir ilişkisi olduğundan, beta-laktamları hidrolize etmek ve inaktive etmek için su moleküllerini bağlayabilir, açılabilir ve kullanabilirler. Beta-laktamların beta-laktamazlar tarafından inaktivasyonu, gram-negatif bakterilerdeki en önemli direnç mekanizmasıdır. (46).

### 2.2.2. $\beta$ -Laktamaz Üreten *Klebsiella pneumoniae*

*K. pneumoniae*'nin tek bir suşu çok sayıda laktamaz geni içermektedir.ve patojenin seçici başarısına katkıda bulunabilir. Bu türün çok çeşitli  $\beta$ -Laktamaz genlerine sahip olduğu bulunmuştur (47).

Birkaç antibiyotiğe dirençli plazmit taşımak veya aynı plazmit üzerinde birden fazla ARG'yi kodlayan transpozonları edinmek buna neden olabilir. *bla*NDM-1 ve *bla*OXA-232 genleri iki farklı plazmit üzerindedir ve New York şehrinde hastanede yatan bir hastanın balgamından bir suş bulunmuştur. *K. pneumoniae*'nin örtüşen enzim aktivitesinin evrimsel yararına çok az önem veriyoruz. Son derece güvenilir dirençte birkaç laktamaz rol oynayabilir. -laktam antibiyotiklerden IMP, VIM ve NDM Karbapenemazlar sadece aztreonama duyarlıdır (48).

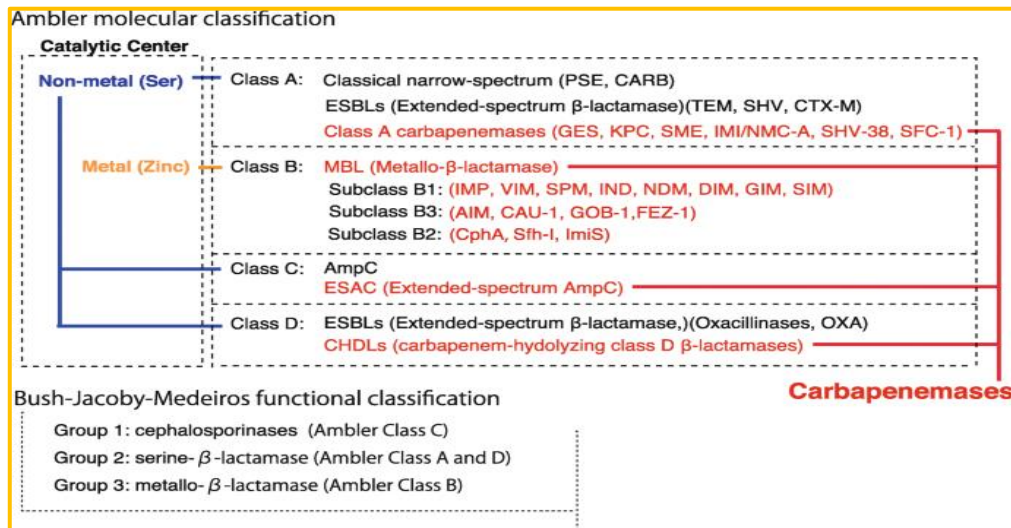
Fazladan gen kopyaları, daha yüksek antibiyotik konsantrasyonlarına karşı bakterilerin daha yüksek direnç seviyeleri ile tepkiler verdiği arasında ilişki olduğu ifade edilmektedir. Laktamaz sinerjizmi hakkında daha fazla araştırma gereklidir. Beta-laktam antibiyotiklere direnç, antibiyotik -laktam halkasını hidrolize eden -laktamazlarla sağlanır. Bazı -laktamlara direnç, *K. pneumoniae*'nin çekirdek DNA'sında kodlanmıştır. Ampisilin direnci türün ayırt edici özelliklerinden biridir (49). Ek genom daha fazla  $\beta$ -laktamaz içerir. 1960'larda TEM-1'i orijinal olarak geliştiren *E. coli* idi. *K. pneumoniae*'nin ayrıca, Penisilin antibiyotiklerinin çoğuna direnç veren AmpC enzimleri gibi plazmit aracılı -laktamazlara sahip olduğu bulunmuştur. Ortamdaki seçici basınç nedeniyle -laktamaz enzimlerinin Penisilin bağlayıcı proteinlerden geliştiği varsayılır (50).

### 2.3. $\beta$ -Laktamaz Sınıflandırmaları

1980 yılında Ambler tarafından kurulan ve o zamandan beri birçok kez revize edilen dizi tabanlı yaklaşım, en yaygın olarak kullanılan kategorizasyondur. Amino asit dizilerine göre yapılan bu sınıflandırma, -laktamazları dört sınıfa (A, B, C ve D) ayırır (51).

Ambler Metallo-laktamazı, aktivite için aktif bölgede serin gerektiren sınıf A ve eylem için çinko ( $Zn^{+2}$ ) gerektiren Metallo-laktamazlar içeren sınıf B olmak üzere iki sınıfa ayırmıştır (Bahr, G. ve diğ., 2021). AmpC olarak da bilinen C sınıfı ve D sınıfı daha sonra keşfedilmiştir ve aktif bölge Serin-laktamazlar olarak sınıflandırılmıştır. Ancak dizi açısından serin sınıf A enzimi ile çok az ortak noktaları vardır (52).

Grup 1, Sefalosporinaz (sınıf C); grup 2, Serin-laktamaz (sınıf A ve D); ve grup 3, Metallolaktamaz (sınıf B) (Somboro, A. M. ve diğ., 2018). Şekil 2.2'ye göre, A, C ve D sınıflarındaki -laktamazların aktif çekirdeği serin içerirken, B sınıfındakiler çinko iyonları içerir. Bush-Jacobi-Medeiros yöntemi, -laktamazları substrat parçalanmasına ve inhibitör aktivitesine göre 1 ila 3 arasında gruplara ayırır



Şekil 2.1.  $\beta$  - Laktamazların Sınıflandırılması (53).

## 2.4- Geniş Spektrum $\beta$ -Laktamaz (ESBL):

Spektrum geniş laktamazlar, laktamazın üçüncü en yaygın formu olup, ilk olarak 1980'lerin ortalarında Batı Avrupa'da keşfedilmiştir. O zamandan beri oluşumları giderek artmıştır ve sefalosporinlerin yaygın kullanımıyla bağlantılı. ESBL izolatları ilk olarak hastanelerdeki *Klebsiella* pnömoni enfeksiyonlarında keşfedilmiştir.

ESBL enzimleri plazmitle kodlanır ve ESBL üreten bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisini zorlaştırabilen aminoglikozitler gibi diğer antibiyotiklere direnci kodlayan genlerin varlığı ile ayırt edilir. (54).

Üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler de dahil olmak üzere çoğu laktam ilacı, ESBL üreten bakterilere dirençlidir ve ESBL'lerin neden olduğu enfeksiyonların tedavi seçeneklerini ciddi şekilde sınırlar. Yine de klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi laktamaz inhibitörleri bazı ESBL üreten patojenleri bloke edebilmektedir. (55).

## 2.5 Rep-PCR ve ESBLs enzimleri :

Geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz (ESBL) üreten *Klebsiella pneumoniae* tüm dünyada giderek yaygınlaşmaktadır. ESBL üreticilerinde virülans faktörlerinin varlığı enfeksiyonun patojenitesini ve şiddetini artırarak ampirik tedaviyi zorlaştırır ve potansiyel olarak tedavi başarısızlığına yol açar. (56).

Geniş Spektrumlu Beta-laktamaz (ESBL) üreten *K. pneumoniae*, yeni terapötiklere acilen ihtiyaç duyulan altı ilaca dirençli bakteriden biridir. *K. pneumoniae* birinci basamak ilaçlara karşı daha dirençli hale geldiğinden, İYE'leri ve diğer enfeksiyonları tedavi etmek daha zor hale gelmiştir. (57).

Versaloviç et al. (80), tarafından bakteri genomlarında bulunan tekrarlayan DNA dizilerinin PCR amplifikasyonundan türetilen türe özgü desenlere dayalı olarak bakteri genomlarının parmak izini oluşturmak için yeni bir yöntem ortaya koymuştur. İki temel yinelenen bileşen kümesi vardır: REP öğeleri “(tekrarlayan ekstragenik palindromik), altı dejenere lokasyona ve korunmuş bir palindromik gövdenin her iki tarafı arasında 5 bp'lik değişken bir halkaya sahip 38-bp dizileridir. (71). REP dizileri, çeşitli bağırsak bakterilerinde bulunmuştur. (28, 33, 66, 71, 92).

## **2.6-“Enterobakteriyel tekrarlayan intergenik konsensüs (ERIC) PCR”**

Sağlıkla ilişkili enfeksiyonların yayılmasını önlemek ve enfeksiyon kontrolünü iyileştirmek için önemli noktalardan biri de patojenler arasındaki genetik akrabalığın belirlenmesidir. Tekrarlayan element dizisine dayalı polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bakteri genomu içindeki tekrarlayan nükleotid dizilerini araştıran ve bakteri suşlarını kümeleyen moleküler bir yöntemdir. Enterobakteriyel tekrarlayan intergenik konsensüs (ERIC), bakteri genomunda desen ve sayının farklı olduğu tekrarlayan unsurlardan biridir (Tablo 2.1). Enterobakteriyel tekrarlayan intergenik konsensüs polimeraz zincir reaksiyonu (ERIC PCR) tekniği, Enterobacteriaceae familyasının moleküler tiplendirilmesi için hızlı, güvenilir ve uygun maliyetli bir yöntemdir ve suşlar arasındaki genetik çeşitliliği ayırt eder. (6).

Bu yöntemin, kolay, uygun maliyetli ve gerçekleştirilmesi için fazla beceri gerektirmeyen, bir yöntem olması avantaj oluştururken ayırım gücü, tekrarlanabilirlik ve tip yeteneği, PFGE, MLST ve DNA dizilimine kıyasla daha düşük olması bir dezavantajdır. Birkaç PCR temelli yöntem arasında, Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) PCR, farklı suş türlerini ayırt etmek için basit ve uygun maliyetli bir genotipleme teknolojisidir. ERIC'ler, Minyatür Ters Transposable Elements (MITE'ler) ile bağlantılı

olarak mobil DNA parçacıkları olarak tanınır. ERIC dizileri, *Klebsiella pneumoniae* cinsinin bağlı olduğu dahil Enterobacteriaceae familyası üyeleri de olmak üzere çok sayıda bakteri genomunda bulunur. Ayrıca, bakteri türleri arasında farklı sayıda ERIC dizi kopyası vardır.

**Tablo 2-1.** Mikrobiyal genomlarda bulunan seçilmiş endojen tekrarlayan diziler.

<b>Dizi'nin adı</b>	<b>Tekrarlayan dizi türü</b>	<b>Referans</b>
BIME	Mozaik tekrarlayan elemanlar	Gilson et al. (1991)
BOXa	Mozaik tekrarlayan elemanlar	Martin et al. (1992)
ERICa	Büyük tekrarlayan eleman	Hulton et al. (1991)
HRS1	İnseriyon dizisi	Judd and Sadowsky (1993)
(GTG) <sub>5a</sub>	Polinükleotid tekrarı	Doll et al. (1993)
IRU	Büyük tekrarlayan eleman	Sharples and Lloyd (1990)
IS6110	İnseriyon dizisi	Thierry et al. (1990)
MPTR	Polinükleotid tekrarı	Hermans et al. (1992)
REPa	Polinükleotid tekrarı	Stern et al. (1984); Tobes and Ramos (2005)
RLEP	Büyük tekrarlayan eleman	Woods and Cole (1990)
RSRj $\alpha$ , RSRj $\beta$	İnseriyon dizisi	Kaluza et al. (1985)
STRR	Polinükleotid tekrarı	Mazel et al. (1990)



### 3: MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1- Materyal

##### 3.1.1- Laboratuvar Malzemeleri ve Cihazları:

Bu çalışmada kullanılan malzeme ve cihazlar Tablo 3.1 ve 3.2' de listelenmiştir.

**Tablo 3.1: Çalışmada kullanılan cihazlar.**

No.	Malzeme	Firma	Kaynak Ülke
1	Otoklav	Daikyo	Japonya
2	Brülör	Memmert	Almanya
3	DensiCHEK	BioMérieux	Fransa
4	Damıtıcı	Elga	İngiltere
5	Elektrik Denge	Sartorius	Almanya
6	Elektroforez sistemi	Thermo	ABD
7	Elisa Okuyucu	Jlassco (India)	Hindistan
8	Davlumbaz (duman dolabı)	Lab tech	Hindistan
9	Sıcak tabak	Takashima	Japonya
10	İnkübatör makinesi	Carbolite	İngiltere
11	Işık mikroskobu	Olympus	Japonya
12	Santrifüj	Memmert	Almanya
13	Fırın	Gallenkamp	İngiltere
14	pH ölçer	Jlassco (India)	Hindistan
15	Kuantus DNA sistemi	Promega	ABD
16	Buzdolabı	Admiral	Japonya
17	Çalkalamalı inkübatör	Gallen Kamp	İngiltere
18	Spektrofotometre	Unico	ABD
19	döndürmeli santrifüj	Eppendorf	Almanya
20	Termal ısı döngüleyici	Esco	ABD
21	UV ışığı (transillüminatör)	Viber lourmat	AET
22	Vitek-2 sistemi	BioMérieux	ABD
23	Girdap çalkalayıcı	Vortex – genie	ABD
24	Su banyosu	Memmert	Batı Almanya

**Tablo 3.2: Diğer laboratuvar malzemeleri**

No.	Ekipmanlar	Firma	Kaynak ülke
1	96 oyuklu alt plaka (Polistiren)	Coastar	ABD
2	Bunsen döngüsü	Jlassco (Hindistan)	Hindistan
3	Tek kullanımlık döngü	Jlassco (Hindistan)	Hindistan
4	Ependorf tüpü	Promega	ABD
5	Filtre kağıtları	Hindistan	Hindistan
6	Forseps	İtalya	İtalya
7	Mikropipet (farklı boyutta)	Brand	Almanya
8	Polen tüpleri (10 mi), Petri kapları ve Steril sürüntü	Çin	Çin
9	Vidalı kap tüpleri	Jlassco (Hindistan)	Hindistan
10	Hacimsel silindir	Jlassco ( Hindistan )	Hindistan
11	Hacimsel şişe	Jlassco (Hindistan)	Hindistan
12	Beyaz tüp	Jlassco (Hindistan)	Hindistan

### 3.1.2- Kullanılmaya hazır besiyerleri

Tüm besiyerleri üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmıştır (Tablo 3.3).

**Tablo 3.3: Çalışmada kullanılan Bakteri besiyerleri**

No.	Ortam	Firma	Kaynak
1	kan ağarı	Himedia	Hindistan
2	Beyin kalp infüzyon agar	Himedia	Hindistan
3	Beyin kalp infüzyon suyu	Himedia	Hindistan
4	MacConkey ağarı	Himedia	Hindistan
5	MR-VP	Himedia	Hindistan
6	Mueller Hinton ağarı	Himedia	Hindistan
7	Mueller Hinton suyu	Himedia	Hindistan
8	Besin ağarı	Himedia	Hindistan
9	Simmons sitrat ağarı	Himedia	Hindistan
10	Triptikaz soya agar	Himedia	Hindistan
11	Triptikaz soya suyu	Szamedia	Uganda
12	Tripton suyu	Himedia	Hindistan
13	Üre bazlı agar	Himedia	Hindistan

### 3.1.3- Kimyasal Materyaller ve Çözeltiler:

Bu çalışmada kullanılan kimyasallar ve çözeltiler Tablo 3.4 deki gibidir.

**Tablo 3.4: Çalışmada kullanılan kimyasal materyaller ve çözeltiler.**

No.	Materyal	Firma	Kaynak ülke
1	Etanol 75%	Applichem	Almanya
2	Etanol 99%	Hayman	Birleşik Krallık
3	Gliserol	Fisher	Birleşik Krallık
4	Gram boyama	Vaccines and sera institute	Bağdat
5	Hidrojen klorür	BOH biochemical	Almanya
6	Hidrojen peroksit	BOH biochemical	Almanya
7	Metanol	Hayman	Birleşik Krallık
8	Sodyum klorit	BOH biochemical	Almanya

**Tablo 3.5: PCR ve Elektroforezin malzeme listesi:**

No.	PCR and Elektrforez malzemeleri	Firma	(Menşe)
1	Agaroz jel	Carl roth	(BK)
3	ddH <sub>2</sub> O	Bioneer	(Kore)
4	DNA merdiveni İşaretleyici (100bp)	Biolabs	(BK)
2	Boya yükleme	Biolabs	(BK)
5	Etidyum bromür	Abm	(Kanada)
6	Master mix	Biolabs	(BK)
7	PCR tampon	Promega	(ABD)
8	Primerler	BGI	(Çin)
9	Quantifluor <sup>R</sup> dsDNA numune kiti	Promega	(ABD)
10	Tris baz, asetik asit ve EDTA	Promega	(ABD)

### 3.1.4- Antibiyotikler

Bu çalışmada kullanılan antibiyotikler Tablo 3.6'da belirtilmektedir.

**Tablo 3.6: Antibiyotik diskler**

No	Antibiyotik diski	Kod	Konsantrasyon µg/disc	Firma ve Menşe
1	Imipenem	IPM	10	Mast Group/ İngiltere
2	Meropenem	MEM	10	
3	Sefotaksim	STX	30	
4	Seftriaksone	SRO	30	
5	Amikacin	AK	30	
6	Siprofloksasin	SIP	10	
7	Amoksillin	AM	100	
8	Amoksillin +Klavulanik asid	AMK	30	
9	Seftazidime	SAZ	5	

### 3-1-5 Kitler :

#### 3-1-5-1 DNA ekstaksiyonu (çıkarma)

Çalışmada kullanılan DNA ekstaksiyon listesi Tablo 3.7’de gösterilmiştir.

**Table 3.7 : DNA ekstraksiyon kitleri**

Kitler	Kitin bileşenleri		Şirket ve Ülke
Wizard <sup>R</sup> genomik DNA purifikasyon saflaştırma kitleri	Materyal	Size	(Promega ; USA)
	Hücre parçalama solüsyonu	100 mL	
	Çekirdek parçalama solüsyonu	50 mL	
	Protein çökeltme	25 mL	
	DNA Rehidrasyon solüsyonu	50 MI	
<b>**DNA-spin Plazmit Arıtma Kiti</b>			

#### 3-1-5-2 PCR Tesbit Kiti

Çalışmada kullanılan PCR materyalleri Tablo 3.8’de gösterilmiştir.

**Tablo 3-8: PCR materyalleri**

Kitler	Kitin bileşenleri	Şirket ve Ülke
Polimeraz Zincir Reaksiyonu	Green master mix , 20 µL include: Taq DNA polymerase 1U, dNTPs which include: 250 µM of each dATP, dCTP, dGTP, dTTP). (1.5) mM of MgCl <sub>2</sub> (Magnesium chloride), (30) mM of KCl, (10) mM of Tris-HCl (pH 9.0), Blue dyes loading dye, Nuclease free water.	Biolabs Company (UK)

## Standart bakteri

Çalışmada kullanılan standart bakteri örneği aşağıdaki gibidir.

**Table (3.9):** Standart bakteri izolatları

No.	Bakteri standardı	Kod	Kaynak
1	<i>E. coli</i>	ATCC25922	Ministry of Industry and Minerals/Industrial Research and Development Authority/Al-Razi Center

## 3-2 Primerler

ERIC'in belirlenmesi için geleneksel PCR'da kullanılan primerler Tablo 3.10' da gösterilmiştir.

**Table (3.10):** Çalışmada kullanılan primerler.

NO.	Primer adı , (5'-----3')	Referans
<b>ERIC1R</b>	ATGTAAGCTCC TGGGGATTCA C	(59)
<b>ERIC2</b>	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	

## 3.3 Ayıraçlar, solüsyonlar ve Pigmentlerin hazırlanması

### 3.3.1- Ayıraçlar

#### 3.3.1.1- Katalaz ayırıcı

Katalaz ayırıcı bakterilerin katalaz enzimi üretme yeteneğini ölçmek için kullanılır. Bu ayıraç (%15) stok solüsyondan 3% hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) olarak hazırlandı ve karanlık bir yerde muhafaza edildi. (60).

#### 3.3.1.2-Kovacs Ayırıcı:

Kovac's ayıracı indol testi için kullanılmaktadır. Bu ayıraç, 150ml isoamyl alkol içinde 10g para dimetil amino benzaldehidin çözünerek 50C su banyosunda ısıtılmasıyla hazırlandı ve yavaşca 50 ml (1M) HCl eklendi. Küçük miktarlarda hazırlanan ayıraç buzdolabında saklandı. (60).

### **3.3.1.3- Vogas-proskauer Ayıracı:**

Bu ayıraç %96 etanol içinde %5  $\alpha$ -naftol ile %40 potasyum hidroksitin karıştırılmasıyla hazırlandı. Solüsyon koyu renkli bir şişe içinde saklandı ve kullanmadan önce çalkalandı. (60).

### **3.3.1.4- Oksidaz Ayıracı**

Bu ayıraç 50 ml distile suda 500mg N,N,N,N-tetrametil-P-fenilene-diamine dihidroklorür çözünerek hazırlandı ve oksidaz testinde kullanıldı. (61).

## **3.3.2 Solüsyonlar**

### **3.3.2.1 Normal Tuz Solüsyonu**

Normal tuz 90ml distile su içinde 0.85 g NaCl eritilerek, hacim 100 ml ye tamamlanarak, tuz tamamen eriyene kadar karıştırılmıştır ve pH 7'ye ayarlanmıştır. Solüsyon 121 °C'de 15 psi basınçta 15 dakika otoklavlandı. Solüsyon gerektiğinde seyreltme işlemlerinde kullanılmıştır (62) .

### **3.3.2.2 Sodyum Fosfat Tamponu**

Solüsyon bileşenleri NaCl (8g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.44g), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0.24g), KCl (0.2g), 1 litre distile suda pH 7.2 ye ayarlanarak çözüldü. (63).

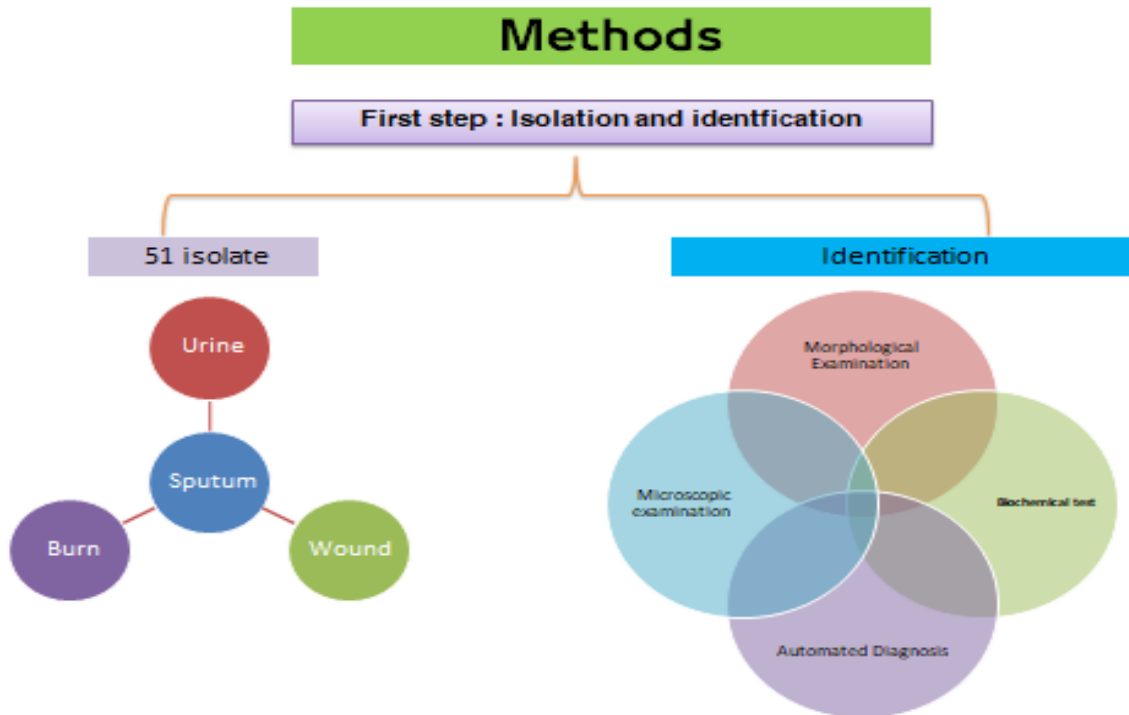
### **3.3.2.3 Tris-Asetat- EDTA Solüsyonu**

Bu solüsyon 450 ml distile su ile 50 ml TAE-10X stoğu karıştırılarak hazırlandı ve 4°C’de saklandı. (64).

### 3.4- Metotlar

#### 3.4.1- Çalışma Şekli

75 *Klebsiella pneumonia* izolatu Felluce’de Al- Ramadi Teknik Hastanesinde Üroloji ve Dermatoloji bölümüne kabul edilen hastalardan ve özel kliniklerde ayakta tedavi edilen hastalardan elde edilmiştir. Tüm örnekler Ağustos – Kasım 2020 tarihleri arasında farklı cinsiyetteki hastalardan toplanmıştır. Hastalardan, ailelerinden veya yakınlarından tam bilgilendirici geçmiş alınmıştır. Çalışma örnekleri, kateter kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarından, yanık, balgam ve yara içeren diğer enfeksiyonlardan sağlanmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 : Bakteriyel izolatların izolasyon tasarımı



### **3.4.2- Besiyeri Hazırlanması**

MacConkey agar, Blood agar, Brain heart infusion, Muller Hinton agar , Muller Hinton broth, Trypticase soy broth, Peptone water, and Muller Hinton broth besiyerleri üretici firmanın talimatlarına göre hazırlanmıştır. Tüm bileşenlerin tamamen çözünmesi için su banyosunda bekletilmiştir ve sterilizasyon için 121°C’ de, 15 psi basınçta, 15 dakika otoklavlandılar ve kullanılabildiği kadar 4°C’de saklandılar.

### **3.4.3- Bakteri Kültürü**

Referans 65 tarafından önerilen sınıflandırma sistemini takiben, bakteri isolatları aşağıda gösterildiği gibi çeşitli kültürel ve biyokimyasal testleri tabii tutulmaktadır.

## **3.5- *Klebsiella pneumoniae* nin tanımlanması**

### **3.5.1- Morfolojik İnceleme:**

MacConkey agar ve kanlı agar da geliştirilen tüm izolatlar, koloni formu, büyüklüğü, rengi, kokusu, dokusu, kenarları, hemolizi kapsayan özellikleri incelenmiştir (66).

### **3.5.2-Mikroskopik İnceleme (Gram boyaları):**

Işık mikroskopu altında (100X) bakterinin şekli ve yapısı gram boyaması sonrasında incelenmiştir (67).

### **3.5.3-Biyokimyasal doğrulama testleri (Schaub, 1958):**

#### **3.5.3.1- Katalaz testi:**

Bir lam üzerine (3-2-1-1-1)’de bahsedildiği gibi 1 damla hidrojen peroksit (%3) damlatılır ve bu ayıraçla taze koloni karıştırılır. Doğrudan, hava kabarcığı oluşumu sonucu pozitif olarak kabul edilir (68).

### 3.5.3.2- Oksidaz testi:

Bir filtre kağıdı birkaç damla taze hazırlanmış ayıraç (Tetrametil-p-fenilenediamine dihidroklorür) ile ıslatılır ve incelenecek olan koloninin küçük bir miktarı toplanarak nemli filtre kağıdına dağıtılır. 30 saniye içerisinde rengin mavi veya mora dönüşmesi testin pozitifliğini işaret eder.

### 3.5.3.3- Üre agar tabanı:

Bakteri izolatları UAB besi ortamına büyük miktarlarda ekildi ve üreaz üreten bakterileri (UPB) elemek için 37°C'de 24-72 saat arası inkübe edildi. Üreaz üretim testi renk değişiminin görsel olarak izlenmesi ile yapılmıştır. İnkübasyon süresince UAB besiyerini açık sarıdan pembeye dönüştüren bakteri izolatu seçilmiş diğerleri elenmiştir (69).

### 3.5.3.4- İMVİC testi:

Schaub (1958) göre, bakteri izolatları aşağıda belirtilen farklı kültürel ve biyokimyasal testlere tabi tutulmuşlardır.

#### 3.5.3.4.1- İndol Testi:

Bakteri kültürü Tripton sıvı besi ortamıyla gece boyu aşılama için yetiştirildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra (4-7) damla (0.5 ml) Kovac's ayırıcı doğrudan bakteri bulunan tüpe eklendi. Yumuşak bir çalkalama sonucunda görünen kırmızı halka pozitif sonucu gösterirken, değişimin olmaması negatif sonucu göstermiştir. Bu deneyde, triptofanı indol, pirüvik asit ve amonyağa dönüştüren triptofanaz enziminin bakteri tarafından üretim yeteneği gözlenmiştir.



#### **3.5.3.4.2- Metil Kırmızı Testi:**

Bu test glukoz fermantasyonunun ve son ürün olarak asit üretimini ortaya çıkarmak için kullanıldı. Test edilen bakteri kültürü MR-VP besi ortamına aşılandı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Daha sonra sonra örneğe birkaç damla metil kırmızısı solüsyonu eklendi. Sarıdan parlak kırmızıya renk değişimi pozitif sonucu göstermiştir.

#### **3.5.3.4.3- Voges-Proskauer Testi:**

12- 18 saat kültüre edilen izolatların herbiri MR-VP besi ortamına aşılandı 37°C'de 24-48saat inkübe edildi. Daha sonra 0.2 ml 40% KOH ve 0.6ml  $\alpha$ -naphthol (5%) eklendi.15- 30 dakika sonra ortaya çıkan kırmızı renk pozitif sonucu gösterdi. Bu deney bakteriyal fermantasyonu ve glukoz fermantasyonu sonucu oluşan asetoin üretim kapasitesini belirlemek için kullanıldı.

#### **3.5.3.4.4- Sitrat kullanım testi:**

Citrate Simmons agara bakteri kültürü steril bir öze ile aşılandı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Besi ortamının yeşilden maviye renk değişimi pozitif sonucu göstermiştir.

#### **3.5.4- Otomatik Teşhis:**

Bakteri izolatının son tanımlanması için biyokimyasal analizlere dayalı VITEK-2 kullanıldı. Tüm rutin tanımlama testleri için sisteme (VITEK-2 cihazına) önceden geniş bir tanımlama veritabanı yüklendi. 3ml normal tuz solusyonu içeren test tüpüne test edilen bakteri kolonisi enjekte edildi. Tanımlama için, 0.5 - 0.63 McFarland aralığında (türbidite için) bakteri süspansiyonu oluşturuldu. Analizi yürütmek için VITEK®2 software system 07.01 kullanıldı. Tüm aşamalar üretici firmanın talimatlarına göre tamamlandı.

### **3.6-Bakteri izolatlarının saklanması**

Collee *et al.* (1996) göre, izolatların korunması aşağıdakiler gibi yapılmıştır:

#### **3.6.1- Kısa süreli depolama:**

Nutrient agar içeren petrilere inokule edilen bakteri izolatları parafilm ile sarılarak 4°C'de saklandı.

#### **3.6.2- Orta süreli depolama:**

Bakteri kolonileri bir kaç ay saplama kültürde saklandı. Bu besiyerleri için 5-8 ml beyin kalp infüzyon agar besi ortamı içeren vida kapaklı şişeler kullanıldı. İzolatlar eğimli yüzey üzerine çizildi ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Parafimle sarılarak ve 4°C'de saklandı.

#### **3.6.3- Uzun süreli depolama:**

Bakteri izolatı 15% gliserol içeren BHI sıvı besi düşük sıcaklıkta saklandı. 37°C'de 24 saat inkübasyondan sonra, 10 ml beyin kalp infüzyon sıvısına 1.5 ml steril gliserol eklenerek son hacmi 10 ml olan tüpler -20°C' de dondurularak saklandı.

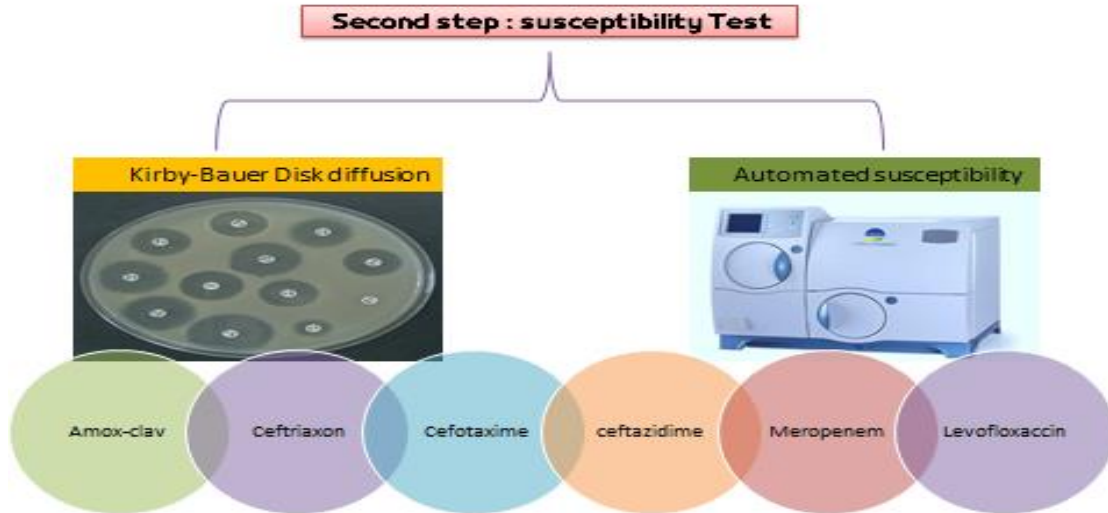
### **3.7- Bakteri aşılamanın hazırlanması:**

CLSI (2020)' e göre, tek bir koloni besleyici agar tabakasından pamuklu çubukla seçilir ve pamuklu çubuk sıvı besi ortamına daldırılır. Kültür ortamı hava geçirmeyen steril bir kapakla gevşek bir şekilde kapatılır. Bakteri kültürü 37°C'de 12-18 saat çalkalayıcılı inkübatörde inkübe edilir. İnkübe edilen bakteri tüpü McFarland ( $0.5 \times 10^8$  CFU/ml) ile standardize edilir.

### 3.8- Antimikrobiyal duyarlılık testi

Antimikrobiyal duyarlılık testi Dünya Sağlık Örgütü'nün modifiye ettiği Kirby-Bauer metoduna göre otomatik VITEK-2 sisteminde kullanılan AST kartı kullanılarak gerçekleştirildi.

Antibiyotik duyarlılık testleri Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsüne göre Kirby-Bauer metodu kullanılarak yapıldı Şekil (3.2) . 1.5108 CFU/ml'ye karşılık gelen 0.5 McFarland bulanıklığına göre ayarlanmış bir bakteri süspansiyonu oluşturmak için gelir, iki koloni 2 ml nutrient brotha aktarıldı ve gece boyunca 37°C'de inkübe edildi. Steril pamuklu çubuk bakteri süspansiyonuna (1.5108 CFU/ml) batırıldı ve besi yerinin tüm yüzeyine çizgi şeklinde yayıldı. Steril pens kullanılarak, antibiyotik diskler agar yüzeye tamamen temas edecek şekilde hafifçe bastırıldı (herbir tabaka 3 defa). Petriler 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, sonuçlar CLSI (2020)'nin önerileri dikkate alınarak değerlendirildi. Herbir antibiyotik diskinin inhibisyon alanının çapı milimetre ile ölçüldü ve kaydedildi. (72).



Şekil 3.2 : *Klebsiella pneumoniae* için antibiyotik duyarlılık yöntemleri

### **3.9- ESBLs enzimlerinin tespiti:**

#### **3.9.1- Fenotipleme Yöntemleri:**

##### **3.9.1.1- Modifiye Hodge Testi:**

Seftriakson ve Sefotaksime dirençli ve Sefalosporine dirençli suşlar tanımlandı ve ESBL üreten bakterileri tanımlamak için fenotipik MHT kullanıldı. Normal disk difüzyon işlemini gerçekleştirmek için *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun 0.5 McFarland standart süspansiyonu yapıldı ve 1:10 seyreltilti. Daha sonra Mueller-Hinton agar tabakası üzerine aşılandı. Mueller Hinton agarda tabakalar üzerine uygun sayıda CTX ve IPM diskleri yerleştirildi. *Klebsiella pneumonia* gelişimi tüm gece boyunca takip edildi ve diskin kenarından petrinin kenarına kadar düzgün bir çizgide aşılandı. Son olarak, tüm petriler 37°C'de 18-22 saat inkübe edildi. Pozitif suşlar yonca yaprağına benzer şekilde gözlemlendi. (72).

##### **3.9.1.2- Modifiye Sefalosporin veya Karbapenem İnaktivasyon Yöntemleri :**

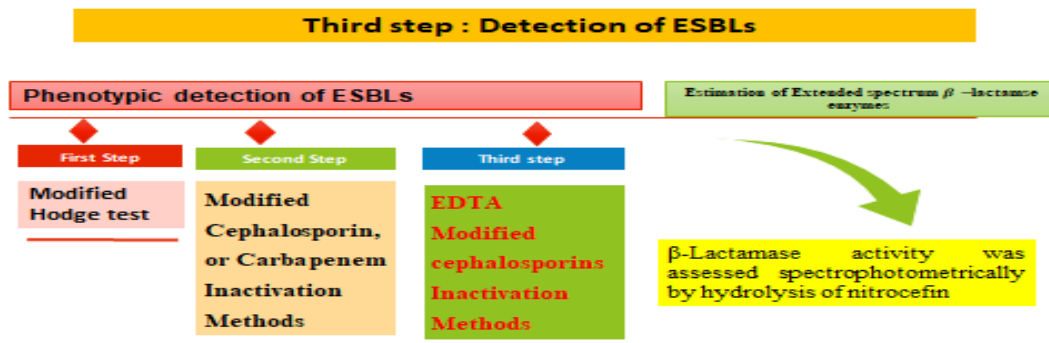
mCIM orjinal CLSI protokolüne göre yapıldı. Test edilen suşun kültüre edilmiş kolonisi bir öze ile 2 ml TSB (Triptikaz soya suyu) içine aktarıldı ve bir süspansiyon oluşturuldu. Sonrasında süspansiyon içine 30 g Seftriaksone ve 30 g Sefotaksime diskleri batırıldı ve 37°C'de 4 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası, diskler süspansiyondan alındı ve *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu aşılanmış Mueller-Hinton agar petrisi üzerine yerleştirilerek ve tüm gece 37 °C' de inkübe edildi. Bu süreçten sonra bir inhibisyon bölgesinin olmaması cephalosporinlerin (ESBLs-positif) enzimatik hidrolizini gösterirken bir inhibisyon bölgesinin varlığı ise test edilen izolatın ESBLs aktivitesi (ESBLs-negatif) göstermediğini belirtir.

### 3.9.1.3- EDTA Modifiye Sefalosporinler inaktivasyon yöntemleri:

Herbir izolata ikinci bir 2mL TSB tüpü ECIM testi için etiketlendi ve son konsantrasyon 5 mM EDTA nın sağlanması için 2 mL TSB içine 20 mL of 0.5 M EDTA veya clavulanic acid eklendi. Sonraki adımda 37°C’de 2 saat inkübe edildi. Inkübasyon sonrasında, disk süspansiyondan alındı ve *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu aşılansız Mueller-Hinton agar tabakasına yerleştirildi, tüm gece 37°C’de inkübe edildi. Bu süreç sonrasında inhibisyon bölgesinin yokluğu serin ESBLs anlamına gelirken, belirgin bir inhibisyon tabakası test edilen izolat Metallo-Beta Lactamase olduğunda gelişir. (72).

### 3.9.2. Geniş Spektrumlu $\beta$ -laktam enzimlerinin tahmini:

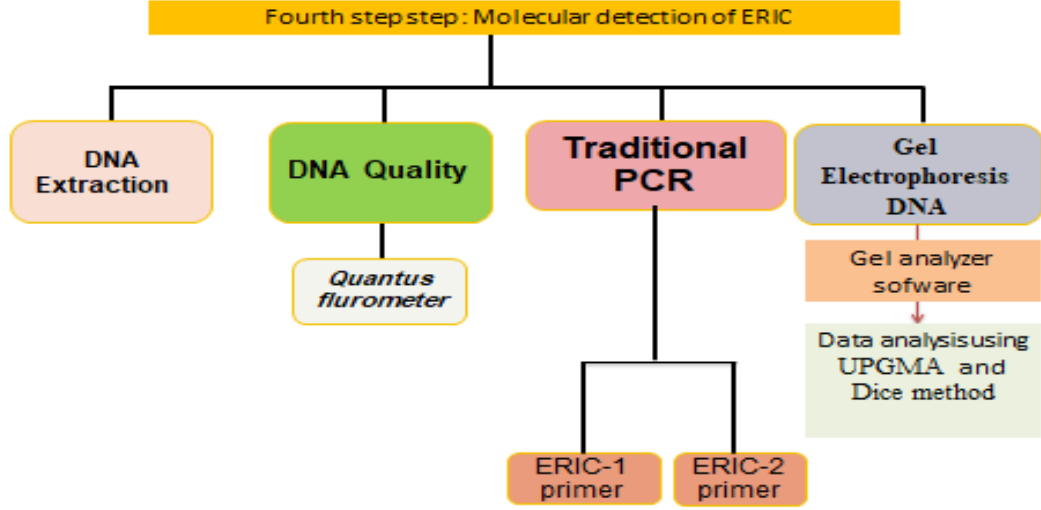
$\beta$ -Laktamaz aktivitesi nitrocefirin hidrolizisi ile spektrofotometrik olarak değerlendirildi. 1.5 mL of 50 mM fosfat tamponun son hacmi 83 g nitrocefirin, 167 g of BSA, 10% glycerol ve 0.33 mL (0.6 g/mL of albumin) laktamaz içeren hücre lizatında kapsayan deney karışımından oluşturuldu. Laktamaz aktivitesi 390 nm absorbandaki azalmayı ölçerek 37°C’de 10 dakika ölçüldü. Enzim aktivitesi nitrocefirin için 15 000 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup> molar sönmeme (ekstinksiyon) katsayısı kullanılarak hesaplandı ve nitrocefirin hydrolyzed/min/mg protein mol olarak temsil edildi. Bu metotta kontrol grubu olarak *E. coli* ATCC25922 suşu kullanıldı (73).



Şekil 3.3 :ESBLs üreten *Klebsiella pneumoniae* için doğrulama testlerinin fenotipik profili

### 3.10. Moleküler çalışma:

ESBLs üreten *Klebsiella pneumoniae* ERIC ile belirlemek için çok sayıda moleküler adım kullanıldı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 : ERIC ESBLs üreten *Klebsiella pneumoniae*'nin moleküler tespit aşamaları.

#### 3.10.1.DNA ekstraksiyonu:

*Klebsiella pneumonia* izolatının genomic DNA'sı WizardR Genomic DNA saflaştırıcı kit kullanılarak ekstrakte edildi, saflaştırma işlemi üretici firmanın talimatlarına göre yapıldı. Bakteriyal DNA Promega Company (USA) tarafından sağlanan DNA ekstraksiyon (genomic) kit prosedürüne göre ekstrakte edildi.

- 1 ml hücre pelleti 13000 rpm hızda 2 dakika santrifüj edildi ve üst yani sıvı kısım uzaklaştırıldı.
- 500µl Nuclei Lysis Solution eklendi ve pipet yardımıyla nazikçe karıştırıldı.
- Tüm karışım 30 dakika 70°C'de inkübe edildi sonra oda sıcaklığına soğutuldu.
- RNA lizis için 3µl RNase Solution karıştırıldı ve 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.



- Protein çöktürmek için, hücre lizatına 250µl of Protein Precipitation Solution eklendi. Sonra vortexle karıştırıldı. Daha sonra 13,000 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildi.
- Seyreltilmiş DNA oda sıcaklığında 500µl isopropanol içeren temiz bir tüpe aktarıldı. Nazikçe karıştırıldıktan sonra yukarıda bahsedildiği şekilde santrifüjlenen hücre pelletindeki gibi sıvı kısım supernatant atıldı.
- Oda sıcaklığında 70% 500µl etanol eklendi ve 13.000 rpm hızda 2 dakika santrifüj edildi.
- Etanol aspire edildi ve pellet havada kurutuldu.
- DNA pelletine 100µl of Rehydration Solution içinde 65°C'de 1 saatte sukaybettirildi. (rehydrate edildi)

### **3.10.2- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):**

#### **3.10.2.1-Quintus TM Florometre kullanılarak DNA konsantrasyonunun belirlenmesi:**

Diğer uygulamalar için örneğin iyiliğini belirlemek amacıyla ekstrakte edilen nükleik asitin konsantrasyonunu ölçmede Quantus<sup>TM</sup> Fluorometer (Promega, USA)'dan faydalanıldı. DNA ve RNA miktarı için Promega QuantiFluor® Dey System (QuantiFluor® ds DNA) tarafından önceden programlanmış bir ayar ile cihaz optimize edildi. 100 µl seyreltilmiş nükleik asit örneği için (1 µl of nucleic acid + 99 µL Tris-EDTA buffer) 100 µl seyreltilmiş QuantiFluor Dye (1X) tedarik edildi ve karıştırıldı. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyondan sonra, DNA konsantrasyonu florimetrede belirlendi (74).

### 3.10.2.2- Primer seyreltmesi:

Tüm primerler Alpha Canada şirketi tarafından farklı pikomol konsantrasyonlarında liyofilize edilmiş bir ürün olarak tedarik edildi ve son konsantrasyonu 10 picomols / $\mu$ l süspansiyona ulaşmak için nükleaz içermeyen su kullanılarak yeniden süspanse edildi.

### 3.10.2.3- Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR):

Tablo 3-11'de görüldüğü gibi DNA ekstraksiyonu için incelenen bakteri kültüründeki tüm izolatlar PCR amplifikasyon (çoğaltma) işlemiyle analiz edildi. Spesifik (özel) primerler Alpha DNA (Alpha Co., Canada)'dan sentezlendi (75).

**Table 3-11.** ERIC1 ve ERIC2 genleri için hedef DNA'nın amplifikasyonunda kullanılan PCR protokolleri.

#### ERIC1 and ERIC2 genleri

	Zaman	Sıcaklık	Döngü
Ön denaturasyon	5 dk	95	1 döngü
Denatürasyon	30 sn	95	33 döngüler
Annealin(primer Bağlanması)	30 sn , 1dk	47,52	
Uzatma	30 sn	72	
Son Uzatma	10 dk	72	1 döngü

*ERIC1 and ERIC2* genlerinin PCR analizleri için DNA ekstraksiyon kitleri kullanılarak *Klebsiella pneumoniae*'nin 15 izolatından bakteriyel DNA ekstrakte edildi. Ortaya çıkarılan DNA'nın daha önce tanımlandığı gibi miktarı belirlendi. *ERIC1 and ERIC2 genes* kullanılan primerleri içeren PCR Tablo 3-13'de listelendiği gibidir, primerler 10 pmol/ $\mu$ L konsantrasyondaki deiyonize suda yeniden oluşturuldu. Ek olarak, PCR bir

reaksiyon tampon içinde 400  $\mu$ M (herbiri) dATP, dGTP, dCTP, dTTP, ve 3-mM MgCl<sub>2</sub> içeren Go Taq ana karışımının kullanımında gerektirir.

**Tablo 3-12** Orijinal PCR reaktifleri ve protokolün son konsantrasyonları

Bileşen	Hacim
Go Taq Green Master Mix 2x	7.5 $\mu$ L
ERIC1	2 $\mu$ L
ERIC2	2 $\mu$ L
DNA kalıbı	3 $\mu$ L
Nükleaz içermeyen su	5.5 $\mu$ L
Son hacim	20 $\mu$ L

### 3-11. Jel elektroforezi

#### Agaroz jel elektroforezi:-

PCR amplifikasyonundan sonra, agaroz jel elektroforezi kullanılarak amplifikasyon olduğu doğrulandı. Ekstrakte edilen DNA ölçütleri tamamen PCR'a bağlıdır.

#### Solüsyonlar:

**1 X TAE tamponu, DNA merdiveni işaretleyici, Ethidium bromide (10mg/ml).**

#### Agaroz hazırlanması

- 100 ml 1X TAE behere döküldü.
- 1.5 gm (for 1.5%) agaroz tampon eklendi.
- Solüsyon kaynayanaya kadar ısıtıldı (mikrodalga kullanılarak), tüm jel partikülleri çözülene kadar.
- 1 $\mu$ l Ethidium Bromide (10mg/ml) agarozaya eklendi.

- Agaroz iyice karışması ve köpük oluşumunu önlemek için çalkalandı.
- Solüsyon 50-60°C’de soğumaya bırakıldı. Dna örneğini yükleme (77):

### **Agaroz jelin hazırlanması.**

İki kenarıda bantlandıktan sonra agaroz solüsyonu jel tepsisine döküldü ve 30 dakika oda sıcaklığında bırakıldı. Tarak dikkatlice çıkarıldıktan sonra, jel tepsisinde biriktirildi. 1X TAE elektroforez tamponu jel yüzeyinin 3-5 mm üzerine ulaşana kadar tepsi içine döküldü.

PCR ürünleri doğrudan yüklendi. PCR ürünü için, 5µl doğrudan kuyuya yüklendi. 100v/mAmp 75 dakika elektrik gücü verildi. DNA katotdan anot kutbuna hareket eder. Jel içindeki lekeli Ethidium bromide bantları jel görüntüleme sistemi kullanılarak görüntülendi.

### **3.12- ERIC – PCR ürünleri verilerinin analizi:**

ERIC modellerini incelemek için online bir veri analiz servisi kullanıldı (insilico.ehu.es). Dice metodu ERIC profillerini karşılaştırmak için kullanıldı, ve bunları kümelemek için de UPGMA (aritmetik ortalamalı ağırlıksız çift grup metodu) aracı kullanıldı. Karşılaştırılabilir ERIC modelli izolatlar veya 1, 2, veya 3 farklı banta sahip izolatlar bir ERIC tipi olarak sınıflandırılırken üçden fazla değişken banta sahip izolatlar ayrı bir ERIC tipi olarak sınıflandırıldı. Dendrogram çizmek için kümeleme kullanıldı. Farklı ERIC çeşitleri ve örneklerin alındığı hastaneler arasındaki ilişkiyi belirlemek için SPSS 22 yazılımında Chi-square testi ilerletildi.

### **3.13. İstatistiksel Analiz:**

Analiz verileri SPSS-22 nin uygun istatistik paketi kullanılarak yapıldı (sosyal bilimleri için istatistik paketi-version 22). Verilere frekans (sıklık), yüzde, ortalama ve

standart sapmanın basit ölçümleri yansıtıldı. Farklı ortalamalar arasındaki önemli fark (sayısal veriler) iki bağımsız ortalama arasındaki fark bağımsız test T-test ile test edildi. Önemlilik incelemesi için  $P$  değeri 0.05'e eşit veya daha küçük olduğunda istatistiksel olarak dikkate alındı.



## 4. BULGULAR ve TARTIŞMA

### 4.1- *Klebsiella pneumoniae*'nin önemini incelemek:

Özellikle tıbbi açıdan önemli olan *Klebsiella* türlerinden *Klebsiella pneumoniae*, hastane kaynaklı idrar yolu enfeksiyonları, zatüre, kan zehirlenmesi (septisemi) ve yumuşak doku enfeksiyonlarının önemli bir kısmını oluşturur. *Klebsiella*'nın bulaşmasında başlıca patojenik kaynaklar sindirim sistemi ve hastane personelinin elleridir. Hastane ortamında çok hızlı yayılma yeteneklerinden dolayı bu bakteriler hastane salgınlarına neden olma eğilimindedirler. Çoklu ilaca dirençli *Klebsiella* türlerinin hastane salgınları özellikle yenidoğan servislerindeki salgınlara genellikle geniş spektrumlu  $\beta$  laktamaz (ESBL) olarak adlandırılan yeni tip suşlar sebep olur. Klinik *Klebsiella* izolatları arasında ESBL üreten suşların vaka sayıları son yıllarda gittikçe artmaktadır. Tedavi yöntemlerinde ortaya çıkan sınırlamalar *Klebsiella*'nın hastane enfeksiyonlarının yönetiminde yeni önlemler gerektirir. ERIC -PCR gibi farklı tip metotlar enfeksiyon kontrolü için kullanışlı epidemiyolojik araçlar olsa da, *Klebsiella* virulans faktörü ve ESBLs üretimi hakkındaki son bulgular bu bakterilerin patojenik stratejileri hakkında yeni görüşler sağladı. Kapsül veya lipopolisakkarit ve ESBLs üreten gibi *Klebsiella* patojenite faktörleri şu anda immünolojik enfeksiyon kontrol önlemleri olarak yardımcı olabilecek aşılama çabaları için umut verici adaylar olarak kabul edilmektedir.

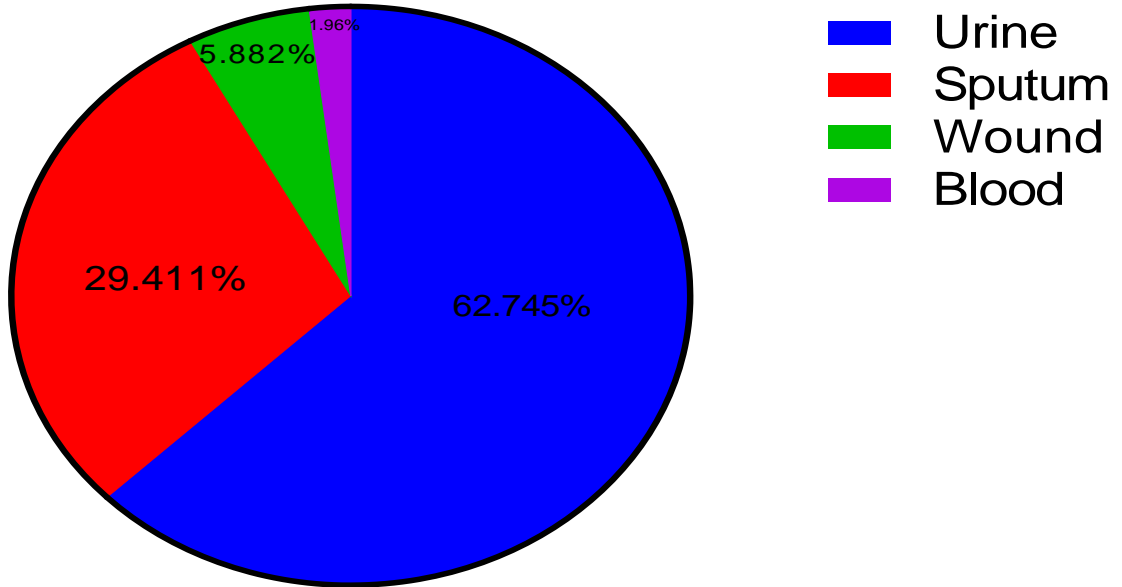
### 4.2. *Klebsiella pneumoniae* İzolasyonu ve Tanımlanması:

#### 4.2.1. İzolasyon:

Tüm örnekler Haziran ayının başından Eylül ayının sonuna kadar 4 ay boyunca toplanmıştır. Çalışma idrar, balgam, yara ve kan enfeksiyonları gibi farklı kaynaklardan izole edilen ellibir klinik örnek üzerinde gerçekleştirildi. Bakteri izolatları Al-Anbar Teknik hastanesi (Irak) bakteriyoloji departmanına başvuran hastalar ve bu şehirdeki özel

klินิกleri ziyaret eden ayakta hastalardan bu periyot boyunca elde edildi. Bu örnekler *Klebsiella pneumoniae*'yi tanımlamak ve izole etmek için çok sayıda kültür ortamı ve biyokimyasal testlerdem geçirildi.

Örnekler enfeksiyon kaynağına göre idrar, balgam, yara ve kan gibi dağıtıldı. Bu çalışmada *Klebsiella pneumoniae*'nin en yüksek izolasyon oranları sırasıyla idrar 62.745% ve balgamdan 29.411% sağlanmış olup yara, kan, yanık oranları ise sırasıyla 5.88%, 1.96% , 5/75'dir (Şekil 4-1).



Şekil 4.1. *K.pneumoniae*'nin izolat kaynaklarına göre dağılımı

## 4.2.2. Tanımlama:

### 4.2.2.1. Morfolojik özellikler:

Tanımlamayı doğrulamak için, *Klebsiella pneumonidae* gibi önceden tanımlanan isolatlar toplandı. Bakteri isolatları Kanlı agar ve MacConkey agarda aerobik koşullarda kültüre edildi ardından diğer tanı (teşhis) testleri yapıldı. Tüm isolatlar MacConkey agar (MCA) üzerinde pembe laktoz fermente mukoid koloniler gösterdi. Kanlı agar üzerinde 24

saatlik inkübasyondan sonra hemolitik olmayan gri-beyaz mucoid koloniler gelişti (Şekil 4.2).



Şekil 4.3. A: Kanlı agar üzerinde *K. pneumoniae*, B: MacConkey agar.

#### 4.2.2.2. Mikroskopik ve Biyokimyasal test:

Mikroskopik olarak sonuçlar, bu izolatların Gram-negatif kısa çubuklar (basil) şeklinde olduğunu dolayısı ile *Klebsiella spp.* olabileceğini göstermektedir. İlave doğrulama için spesifik bazı biyokimyasal testler de yapılmıştır. Elli bir numune için yapılan testler sonucunda bunların katalaz için pozitif ve oksidaz için negatif olduğu, gram boyama sonucunda ise negatif sonuç gösterdiği belirlenmiştir. *K. pneumoniae* kolonileri, Şekil 4.2'de görüldüğü gibi besiyerine ve enfeksiyon kaynağına göre mukoid kolonilere göre farklılıklar göstermektedir. Katalaz (hidrojen peroksiti suya ve oksijen gazı kabarcıklarına indirgeyen) üretebildikleri için pozitif katalaz sonuçları, sitokrom oksidaz (oksidazlar tetrametil-fenilendiamin) üretme yeteneklerindeki eksikliklerle ilgili negatif oksidaz sonuçları ve pozitif üreaz, üreyi amonyak ve karbon dioksite hidrolize etme yetenekleriyle ilgilidir (Tablo 4.1).



Birincil karbon kaynağı olarak sitrat kullanıldığı için sitrat kullanımında önemli sonuçlar elde edilmiştir. Bu bakterinin VP için pozitif bir sonuç verdiği çünkü bütandiol yoluyla şekerleri fermente etme kabiliyeti, bir ara madde olarak daha da 2,3-bütandiol'e indirgenebilen asetoin (yani asetil metil karbinol veya 3-hidroksibutanon) üretmektedir. Tüm sonuçlar Mahon, C. R. ve diğ. (2018)'e göredir.

**Tablo 4.1.** *Klebsiella pneumoniae* bakteri izolatları için morfolojik özellikler ve biyokimyasal testler.

Özellikler	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kanlı ağar	$\gamma$ – hemolitik, gri – beyaz, mukoid koloniler
Katalaz	+ve
Sitrat	+ve
Gram boyama	-ve
İndol	-ve
MacConkey ağar ortamı	Pembe renk, laktoz fermenter ve mukoid koloniler
Metil Kırmızısı	-ve
Oksidaz	-ve
Şekil	Rod
Üreaz	+ve
VP	+ve

#### 4.2.2.3. Otomatik Tanılama:

Sonuç olarak çalışmadaki tüm *Klebsiella pneumonia* izolatları ve *Escherichia coli* ATCC25922 suşu Vitek-2 sistemi kullanılarak bakteriyolojik olarak tanımlandı ve uygulanan biyokimyasal testlerle de doğrulandı.

#### 4.3. Duyarlılık Testi sonuçları:

Bu çalışmada antibiyotik duyarlılık testi (Tablo 4.2), ESBLs üreten *Klebsiella pneumonia* izolatlarının belirlenmesinde birincil ve temel test olması nedeniyle seçilmiştir. Öte yandan, genişletilmiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) üreten *Klebsiella pnömonisi*, klinik mikrobiyologlar, klinisyenler, enfeksiyon kontrol uzmanları ve antibakteriyel keşif çalışması yapan bilim adamları için benzersiz zorluklar yaratır. GSBL'ler, Penisilinler,

geniş spektrumlu Sefalosporinler ve monobaktamlar gibi birçok antibiyotiği hidrolize edebilen enzimlerdir. GSBL genleri genellikle suştan suşa ve bakteri türleri arasında aktarılabilen plazmitler üzerinde bulunur.

Yara, yanık, balgam ve Foley kateter idrar yolu enfeksiyonlu hastalardan elde edilen 51 *K. pneumoniae* izolatu, Kirby Bauer diskleri difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılığı için (72) önerisine göre uygulandı. Suşların duyarlılığı Meropenem (72), Sefotaksim, Seftriakson, Amikasin, Siprofloksasin, Augmentin, Seftazidime olmak üzere yedi antimikrobiyal için test edildi. Sonuçlar, mevcut çalışmada kullanılan antibiyotiklere karşı izolatların direncinin varyasyonunu ortaya çıkardı.

Mevcut çalışmada kullanılan antibiyotiklere karşı direnç yüzdelerinin Augmentin (%96), Sefotaksim (%92), Seftriakson=Seftazidim (%88), Amikasin (%48), Levofloksasin (%42) ve meropenem (%26) olduğunu belirlendi (Tablo 4-1). Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre *K. pneumoniae* izolatları arasında antibiyotik direncinde yüksek düzeyde çeşitlilik gözlemlendi. Üç veya daha fazla antimikrobiyalden en az bir ajana karşı direnç, izolatların %66.66'sından fazlasında saptandı ve MDR izolatları olarak belirlendi.

**Tablo 4.2.** Kirby-Bauer AST kart tekniğine göre *K. pneumoniae* izolatları çalışması için antibiyogram parametresi.

Antibiyotikler	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>					
	Direnç		Orta düzey		Duyarlılık	
	No.	%	No.	%	No.	%
Amoksiklav	48	96	1	2	1	2
Seftriakson	44	88	3	6	3	6
Sefotaksime	46	92	1	2	3	6
Seftazidime	44	88	0	0	6	12
Meropenem	13	26	9	18	28	56
Amikasin	24	48	2	4	24	48
Levofloksasin	21	42	15	30	14	28

\*S=duyarlılık ; I=orta; R=direnç.

Bu çalışmanın amacı; *Klebsiella pneumonia* bakterilerinde sefalosporin grubuna dirençli örneklerin belirlenmesidir. Karbapenemler, çoklu ilaca dirençli *Klebsiella pnömonisinin* neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için son basamak ilaçlar olarak kabul edilir. Anbar şehrinde yürütülen mevcut çalışma, bir *Klebsiella pneumonia* suşunun Amoksilin, Amoksiklav, Seftriakson, Sefotaksime'e karşı en yüksek dirence sahip olduğunu göstermiştir. Seftazidime karşı direnç yüzdesi sırasıyla %96, %88, %92, %88, %52 iken, *Klebsiella pneumonia* %26 oranında meropenem direncine sahiptir. Öte yandan, beta laktam dirençli *Klebsiella pneumonia* için tercih edilen ilaç Amikasin ve siprofloksasindir. Şekil (4-3).

“Mehr et al. (2017), Kore'de çeşitli hastanelerden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarının direncini belirlemeye yönelik yaptıkları çalışmada ; bu çalışmada olduğu gibi imipenem'e direnç oranı %4 olarak bulunmuştur (1). Ayrıca bu sonuçlar, Güney Afrika'daki çeşitli hastanelerden izole edilen *K. pneumoniae* izolatlarının direncinin Siprofloksasin için %35 ve Amikasin için %37 olduğunu saptayan Vasaikar ve ark., 2017 çalışması ile tutarlı bulunmuştur (79).

Yapılan çalışmalar sonucunda Chasemian ve ark. (2018), Tahran ve çevresinde bulunan illerdeki birçok kapsamlı hastanelerden izole edilen *K. pneumoniae*'nin varlığını saptamak için araştırmalar gerçekleştirilmiştir. Yapılan çalışmalarda Sefotaksim'e direnci saptamak amacıyla gerçekleştirilen araştırmanın sonucunda direncin %94,6 olarak saptanmıştır; Fakat elde ettiğimiz veriler ile yapılan bu çalışmalar karşılaştırıldığında elde direncin %86 olduğu ve Babakhani ve ark., 2015 çalışmasının sonuçlarıyla paralel veriler elde edilmediği sonucuna varılmıştır (80).

Mustafa (2018) gerçekleştirdiği Bağdat ve civarı bölgelerindeki hastanelerden elde edilen klinik vakalardan izole edilen *K. pneumoniae*'nin direncinin; Seftazidim ve

Sefotaksim antibiyotiklerine karşı gösterdiği direnç sırasıyla; %32 ve %84 olarak saptanmış olup elde edilmiş mevcut veriler ile uyumluluk göstermiş bulunmaktadır. Bağdat ve civarı illerden izole edilen *K. pneumoniae*'nin suşlarının antibiyotiklere karşı direncini inceleyen bir başka bilim insanı olan Zedan-Alobadi nin çalışmaları ile de uyumluluk gösterdiği gözlemlenmektedir. Yapılan çalışma sonucu elde edilen direnç oranlarının; İmipenem için %2.5, Amoksislav için %95, Amoks için %97 ve Seftriakson için %77.5 olarak sonuçlandığı belirtilmiştir. (81).

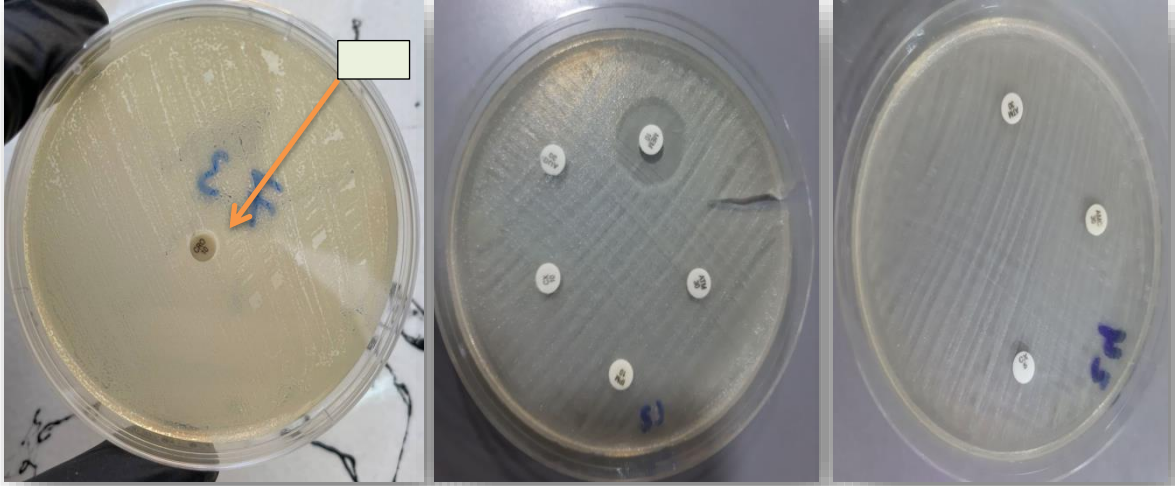
Yapılan çalışmalar neticesinde; Ampisiline karşı dirençli *Escherichia coli* izolatlarından elde edilen klinik sonuç %93.3 olarak saptanmış olup, Akpaka ve Swanston tarafından daha önce gerçekleştirilen çalışma ile de uyumlu olduğu saptanmıştır (82). Farklı bir organizma olan *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının Sefalosporinler arasında gösterdiği en yüksek antibiyotik direnci (%58.3-%83.3) arasında olarak saptanmış olmasına rağmen, Suudi Arabistan'da yapılan bir başka çalışmada Ampisilin antibiyotiğine karşı gösterilmiş olan en yüksek direncin *Klebsiella pneumoniae*'nin (%100) olduğu belirtilmiştir (83).

Sefazolin, Seftazidime, Sefepim gibi Sefalosporinlere karşı yüksek direncin gözlenmiş olması, Hacı ve arkadaşlarının daha önce gerçekleştirmiş oldukları çalışmada; GSBL üreten Enterobacteriaceae izolatlarının örneklen alınan Erbil şehir hastanelerinde yaygın olarak dağılmış olmasından kaynaklanmaktadır. Yapılan gözlemler sonucunda GSBL üremesinin 15'i (%78.9) *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatları olarak saptanmıştır (83). 2019 yılında yapılan çalışmada Ahmed, Karbapenemlere karşı direncin hızla ortaya çıktığını ve arttığını belirtti. Antibiyotik duyarlılık profili (%13.5) İmipenem ve (%14.86) Meropenem dirençli *Escherichia coli* izolatları olarak gösterilirken, *Klebsiella*

*pneumoniae* izolatları (%33.3) hem İmipenem hem de Meropenem'e karşı dirençli oldukları belirlenmiştir.(84)

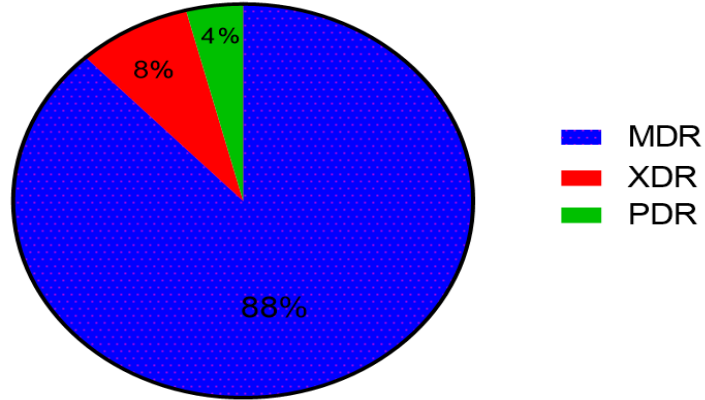
Çok sayıda yapılan çalışmalar sonucunda ,  $\beta$ -laktam direnci için meydana gelen en yüksek direnc olarak saptanmıştır. Mohammed Obaid ve Safaa Al-Meani (2019), gerçekleştirdiği çalışmalar sonucunda *Klebsiella pneumoniae*'nin Seftriakson (%78), Sefpodoksium (%68), Seftazidimim (%62), Sefepim (%62) ve Sefoksintin'e (%16) yüksek direnç gösterdiğini saptamıştır. (85) . Daha sonra gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde ise, Seftriakson (%80), Seftazidim (%70), Sefepem (%70), Sifloksasin (%38), Asmikasin (%36) ve İmipenem=Meropenem (%22) (86, 87). *E.coli*'nin Seftriakson'a (%86) ve Sefepim'e (%70) Siprofloksasine (%62) oranlarında dirençli olduğu ortaya koymuştur.

Yapılan çalışmalarda gözlenmiştir ki üçüncü kuşak Sefalosporinlere karşı gösterilen direnç, *K. pneumoniae* karşı gösterilen direnç yüzdesinden % 50 daha fazla dirençli olduğu ortaya konmaktadır.(88). Yapılan bu çalışma neticesinde ise 3. Nesil sefalosporin bir çok bakteri üzerinde daha etkili olduğu savunulmaktadır; örnekler doğrultunda açıklamak gerekirse, rektum, üretra veya endoserviksini komplike olmayan gonokoksik enfeksiyonlarında, tek doz tedavi olarak Seftriakson, Sefiksime ve Seftazidim kullanılabileceği öne sürülmektedir. Öte yandan, Plazmitler, *K. pneumoniae*'de dirençli determinantların ve virüent genlerin yayılmasında ve edinilmesinde merkezi bir rol oynadığı saptanmıştır. Bazı yazarların onları bağımsız organizmalar olarak kabul ettiği bakterilerin birçok özel özelliğinden sorumlu olduğunu öne sürmüştür. (89).



Şekil 4.4. *K. pneumoniae*'de antibiyotikler için Kirby-Bauer Disk Difüzyon Duyarlılık Testi

Mevcut çalışma sonuçları, Çoklu İlaç Dirençli (MDR), Yaygın İlaç Dirençli (XDR) ve Pan İlaç Dirençli (PDR) yüzdelik sıralarıyla 44 (%88), 4 (%8), 2 (%4) oranları ile Şekil 4.4'de gösterilmektedir.



Şekil 4.5. Al-Anbar ilinde *K. pneumoniae* arasında PDR, XDR ve MDR dağılımı

#### **4.4. *K. pneumoniae*'de ESBL Tespiti:**

##### **4.4.1. *K. Pneumoniae*'de ESBL'lerin fenotipik tespiti :**

GSBL üretimi, geniş spektrumlu Sefalosporinlerin tüketimi için büyük bir tehdit olarak düşünülmelidir. Günümüzde GSBL üreten suşların artan prevalansı ile karşı karşıyayız. Aşağıda belirtildiği gibi doğrulama testleri, ESBL testi ve genotipik saptama kullanılarak, GSBL üreten suşların saptanması için çok sayıda yöntem bulunmaktadır.

GSBL'lerin bakteri üretimi fenotipik ve moleküler yöntemlerle tespit edilebilir. GSBL'lerin saptanmasında moleküler yöntemler altın standart olmaya devam etmektedir. Bir laboratuvarında GSBL tespiti için uygun bir fenotipik testin seçilmesi bir dizi faktöre bağlıdır: Geri Dönüş Süresi, maliyet, test hacimleri, test edilen organizmalar, kullanım kolaylığı, testin düzenleyici durumu, ekipman ve reaktifler ve ayrıca performans özelliklerinin tümü önemli hususlardır. Farklı hasta bakım alanları (yani yatan hasta servisleri, poliklinikler ve uzun süreli bakım ortamları), yaygınlık ve riske bağlı olarak farklı algoritmalar veya sürveyans uygulamaları gerektirebilir. Antibiyotiklere dirençli olarak seçilen 25 izolat (Seftriaksoon, Seftazidimim, Sefotaksime) geniş spektrumlu  $\beta$ -laktamaz içererek olumlu sonuçlar vermiştir.

##### **4.4.1.1. Modifiye Hodge Testi (yonca yaprağı testi):**

Yonca yaprağı testi, disk difüzyonu üzerinde orta veya hassas zon çapı gösteren izolatlarda ESBL testi için rutin laboratuvarında yapılabilecek basit bir testtir. Modifiye Hodge testi bugün, birkaç yıl önce kullanılan Hodge testinin değiştirilmiş bir versiyonu olarak tanımlanmaktadır. u amaçla Cloverleaf testi (91) ve (92). Modifiye Hodge testi (MHT),  $\beta$ -laktamaz tespiti için kabul edilebilir duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle önerilmektedir.

Bu çalışma 1/25(4) pozitif sonuç verirken, 24/25 (%96) negatif sonuç verdi. Hung ve diğerleri, 2013, 138/200 (%69) izolatın modifiye Hodge testine göre pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir.). Irak'ta yapılan bir başka çalışmada ise tüm izolatların bu test için pozitif sonuç verdiği bildirilmiştir (94).

#### **4.4.1.2. Modifiye sefalosporinler inaktivasyon yöntemi :**

mCIM, Sefalosporine dirençli *K. pneumoniae* bakterileri arasında ESBLs üretiminin saptanması için geliştirilmiştir. Bu çalışmada izolatların tümü (86), (95) ve (96) ile uyumlu pozitif sonuç vermiştir.

#### **4.4.1.3. EDTA Modifiye sefalosporinler inaktivasyon yöntemi:**

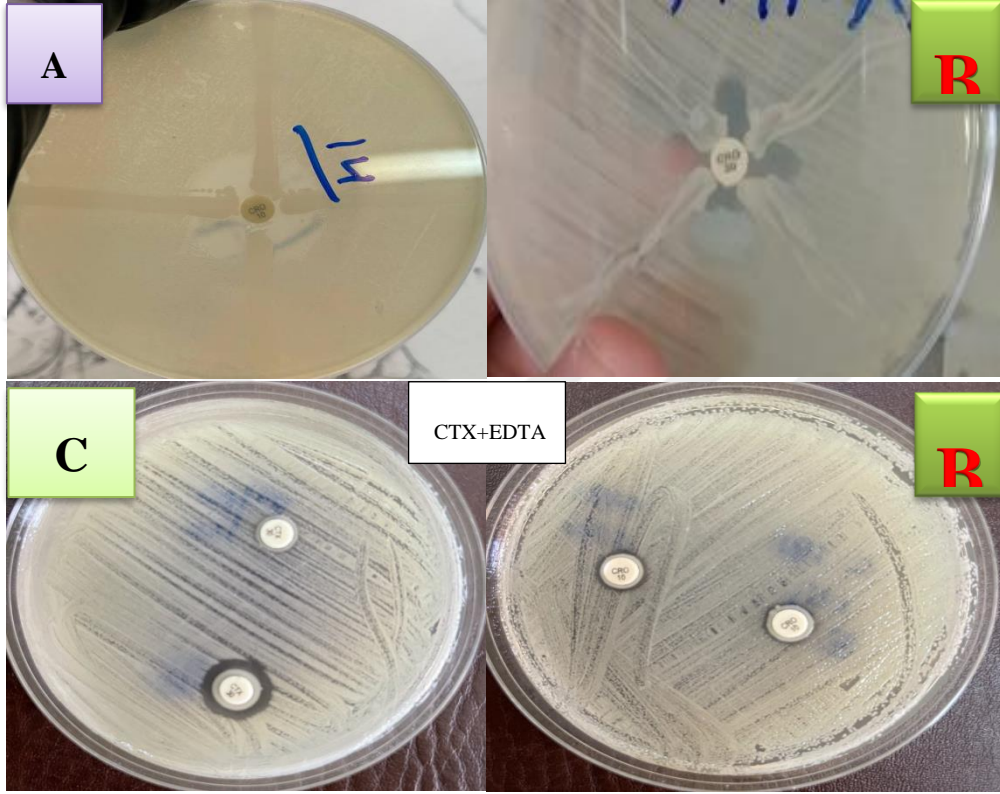
eCIM, modifiye sefalosporin inaktivasyon yöntemi (mCIM) ile birlikte kullanıldığında serin ve metale bağımlı metallo- $\beta$ -laktamazlar (MBL'ler) arasında ayırım yapmak için kullanılan bir testtir. eCIM'in genel duyarlılığı ve özgüllüğü %100'dür ve ESBLs enzimlerini tanımlamak için mCIM ile birlikte kullanılacak bir yöntem olarak Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü tarafından önerilmektedir (Şekil 4.5).

Elde edilen veriler (%100) serin genleri için pozitif sonuç vermiştir. Öte yandan Al-meani ve Ahmed, 10'unun (%55.56) MBL için pozitif, 8'inin (%44.44) serin ESBLs (Şekil 4.6) için pozitif sonuç verdiğini bildirmiştir (86).

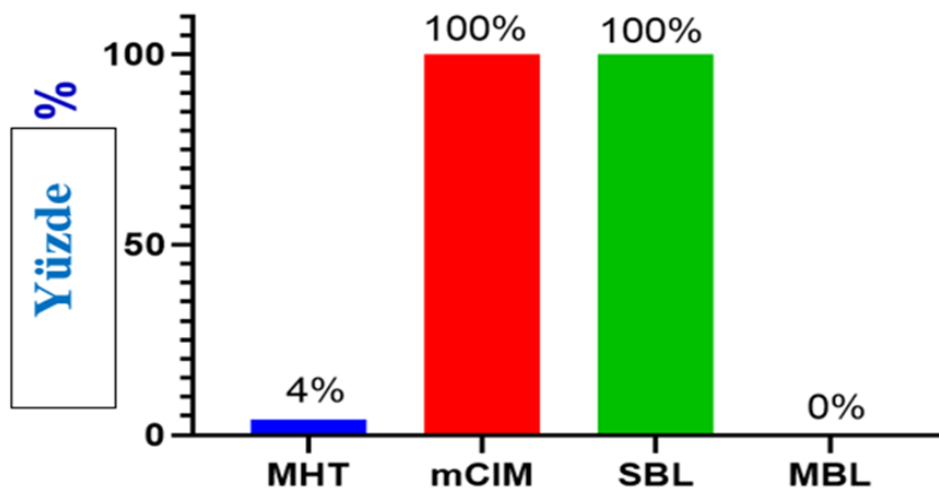
Çoklu ilaca dirençli izolatlar, dünya çapında klinisyenler için büyük bir terapötik problem teşkil etmektedir. *K. pneumoniae* suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı oldukça dirençli olduğu ve görünüşe göre bu direnç seviyesinin hızla arttığı görülmektedir. Bakteriyel direncin gelişmesinde önemli olan etken, bakteriler tarafından beta-laktamaz enzimlerinin üretilmesidir, bu da hastane enfeksiyonlarında artış ve ciddi vakalarda mortalite bu direncin sonucudur (97). Hastane enfeksiyonlarından elde edilen örneklerin çoğu çok sayıda antibiyotiğe dirençlidir. 3GC, birincil ve ikincil hastanelerde sıklıkla



başlangıç ampirik antibiyotik olarak kullanılır. Bununla birlikte, son çalışmalar, GSBL veya AmpC  $\beta$ -laktamaz üreten 3GC'ye dirençli organizmalar nedeniyle toplum kaynaklı enfeksiyonlarda artan enfeksiyon prevalansı konusunda uyarıda bulunmuştur (98). MIC değerlerindeki bu değişimin nedeni farklı derecelerde olabilir.



Şekil 4.6. (A) MHT, (B) mCIM ve (C) eCIM kullanılarak doğrulama testi.



Şekil 4.7. ESBL tespiti için doğrulama testlerinin yüzdesi.

#### 4.4.2-K. *pneumoniae*'de GSBL Aktivitesi

On altı *K. pneumoniae* izolatı, spektrofotometri deneyi kullanılarak ESBLs üretme yetenekleri açısından araştırıldı. On beş izolatın %100 oranında ESBLs ürettiği bulundu. İzolatların ESBLs üretme yetenekleri farklılık göstermiştir. Diğer izolatların enzimatik aktivite değerleri (0.11-0.7) arasında değişmektedir (Tablo 4-3). Mevcut çalışmada ESBLs'ye sahip izolatların oranı (99) ile yakındır.

**Tablo 4.3.** *K. pneumoniae* izolatları arasında ESBLs Aktivitesi

No.	ESBL aktivitesi	No.	ESBL aktivitesi
1	0.12	6	0.52
2	0.21	7	0.46
3	0.25	8	0.44
4	0.11	9	0.53
5	0.7	10	0.413
11	0.38	14	0.23
12	0.16	15	0.27
13	0.51		

#### 4.5 . Ekstraksiyon genomik DNA :

Bölüm (3.10.1)'e göre tanımlanan on altı (15 *Klebsiella pneumoniae* izolatından izolatından, WizardR Genomic DNA Purification Kit (Promega; USA) kullanılarak materyal ve yöntemlerde belirtildiği gibi DNA ekstraksiyonu yapıldı.

#### 4.6- DNA konsantrasyonu :

Quantus florometre ile yapılan ölçümler sonucunda ekstrakte DNA konsantrasyonunun (6.9 – 33) ng/ ul) arasında olduğunu belirlenmiştir.

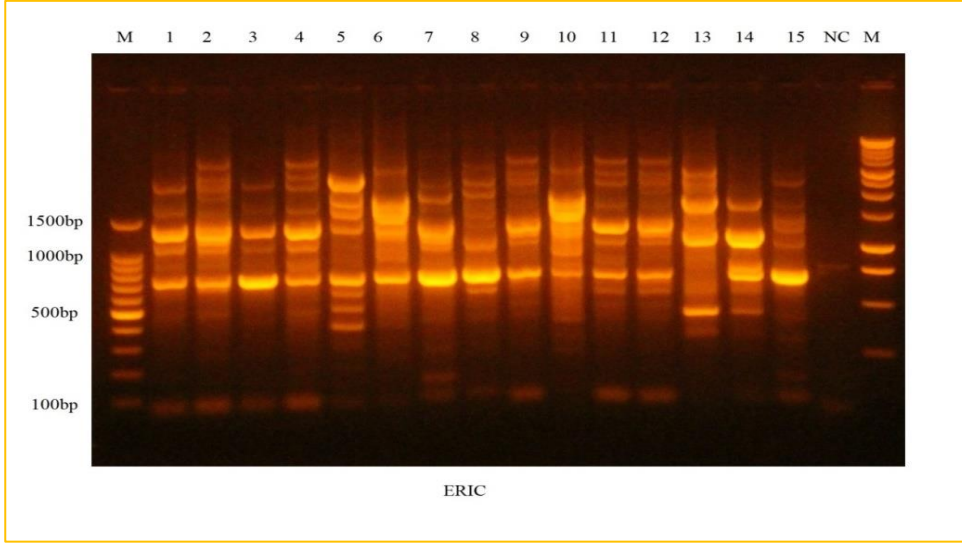
#### **4.7. ERIC-PCR tekniği kullanılarak *Klebsiella Pneumoniae* için moleküler parmak izi yöntemi:**

Yirmi yılı aşkın bir süredir  $\beta$ -laktam, Enterobacteriaceae'nin neden olduğu çoklu ilaca dirençli enfeksiyonların tedavisinde son çare olarak kabul edilmektedir.

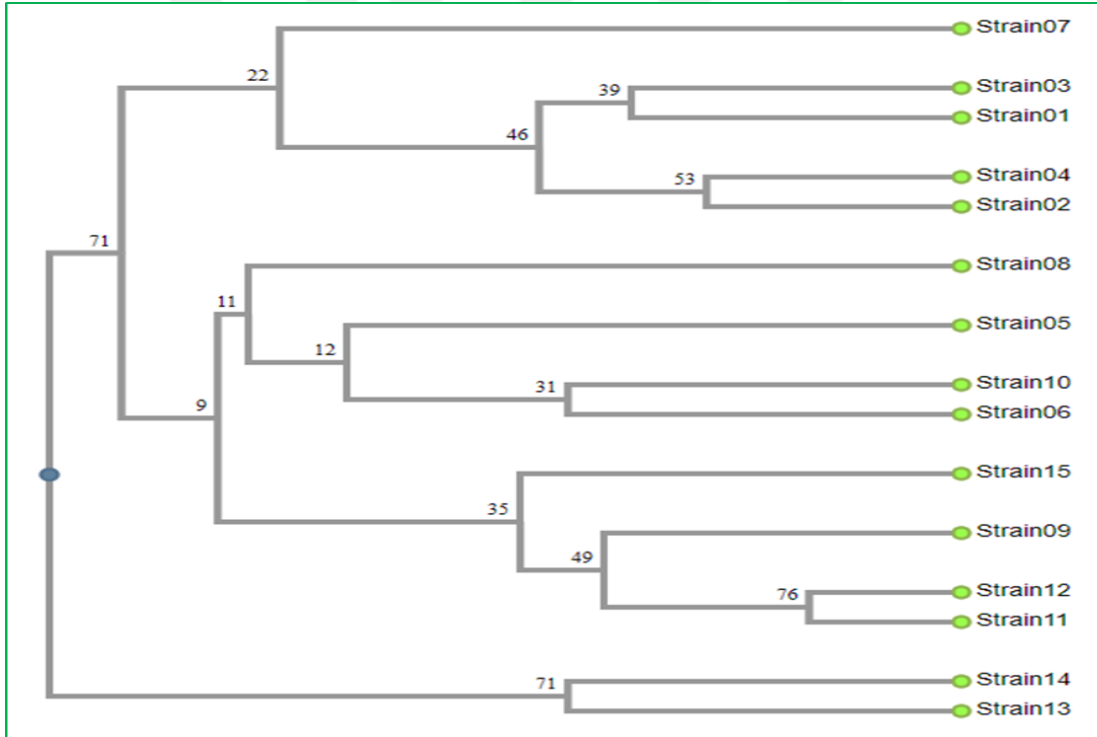
Sefalosporin antibiyotiklerine direnç, uluslararası bir halk sağlığı tehdidi olarak kabul edilir. Tüm dünyada, *Klebsiella pneumoniaea* ve *E. coli* gibi Enterobacteriaceae dahil olmak üzere GSBL'lerle klinik enfeksiyon vakaları artmaktadır.

#### **4.8. Enterobakteriyel tekrarlayan intergenik konsensüs (ERIC) PCR:**

*K. pneumoniae*'nin hastane enfeksiyonlarındaki önemli rolü ile ilgili olarak, klinik izolatların genotiplenmesi, enfeksiyon kaynaklarının belirlenmesi ve hastane kaynaklı enfeksiyonların önlenmesi için faydalıdır [4]. Bakteriyel suşların genotiplenmesi için ribotipleme, pulse field jel elektroforezi (PFGE) ve multilokus sekans tipleme (MLST) gibi çeşitli moleküler yöntemler uygulanabilir. Ancak bunlar pahalı ve zaman alıcıdır. ERIC-PCR gibi tekrarlayan element palindromik (REP) PCR yöntemi, Enterobacteriaceae familyasının moleküler tiplendirilmesi için bir hızlı, güvenilir ve uygun maliyetli tekniktir, Bu nedenle yaptığımız çalışmada bu tekniği kullandık. Şekil 4-7, 4-8 ve Tablo 4-4'ün her ikisine göre sonuçlar, ERIC-PCR ürünlerinin bir jel elektroforez görüntüsünü verilmiştir. Bant sayısı 4 ile 9 arasında, boyutu ise 115 bp ile 4008 kb veya daha fazla arasında değişiklik göstermiştir. Suşların benzerliği, Jel Analizörünün profil analizi (Banding) ve karşılaştırma için Dice yöntemi ve kümeleme için UPGMA yöntemi kullanılarak belirlendi. Elektroforez ve yazılım analiz sonuçlarına göre *K. pneumoniae* izolatları yüksek düzeyde genetik çeşitliliğe sahiptir (Şekil 4-7).



Şekil 4.8. ERIC ürün amplifikasyonunun jel elektroforezi. M: Ladder 100bp, 1-15: *Klebsiella Pneumoniae* izolatları, NC: *E. coli* ATCC 25922 Görünmez bandı.



Şekil 4.9. Anbar hastanelerinden izole edilen 15 *K. Pneumoniae* suşu için ERIC-PCR sonuçlarının dendrogramı.

**Tablo 4.4** Jel analizörü kullanılarak suşların küme analizi ve genetik çeşitliliği.1-5 izolat, 216-1971 bç (farklı boyutlarda)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
													1971	
								1721		1786	1753			
	1530		1628		1521				1598					
						1164	1164					1157		1247
				1033										
										1121				
			1027					1021	1008		1033			
													995	
							983							
					946							958		
929														
	883	900					889				917			
								861						
									803					
783				768	763							744	734	
					579	575	610	594	626	610	610		659	590
498	515	508	542	529					502				522	515
					460									
						422		411	411	425	428		414	
343	355	360	380		377				362			387		
				327		316		312			327			
				216										

**Jel analiz cihazına dayalı bakteri izolatlarındaki bant sayısı**

İzolatlar	Bant sayısı	İzolatlar	Bant Sayısı
Strain_01	4	Strain_09	5
Strain_02	4	Strain_10	7
Strain_03	3	Strain_11	5
Strain_04	4	Strain_12	5
Strain_05	5	Strain_13	4
Strain_06	6	Strain_14	6
Strain_07	5	Strain_15	3
Strain_08	4	Strain_16(ATCC)	0

#### 4.9. ESBL'ler ile ERIC profili arasındaki ilişki:

Tablo 4'e göre, yara, balgam ve idrardan izole edilen suşlar arasında benzer bir filogrup dağılımı tespit edilmiştir. Bu, Anbar'da yapılan ilk çalışmadır ve klinik örneklerden elde edilen Sefalosporinlere dirençli Gram-negatif basil izolatlarının genetik çeşitliliğini araştıran bu ülkedeki az sayıdaki çalışmadan biridir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin analizi sonucunda ERIC-PCR tekniği kullanılarak sefalosporinlere dirençli izolatlar arasında yüksek derecede genetik çeşitlilik belirlenmiştir. ERIC-PCR parmak izleri, Sefalosporin dirençli çalışma izolatlarının GSBL-tiplerinin varlığını ve ekspresyonunu kanıtlamıştır. Bu çalışmada bazı izolatlar benzer ERIC profiline sahip olup, ikisi idrardan (13, 14), ikisi balgamdan (11 ve 12) ve ikisi idrardan (1,3) izole edilen suşlar genetik olarak homojen profil göstermiştir. Bu çalışmada, klonal olarak benzer suşların, ürettikleri  $\beta$ -laktamaz enzimlerinin paterni ile ilgili antibiyotik duyarlılıkları ile korelasyonu olduğunu gözlemledik. Loncaric ve arkadaşları(36), antibiyotik direncinin yayılmasının sadece farklı  $\beta$ -laktamazların yayılmasından değil, aynı zamanda klonal geçişten kaynaklandığını da göstermiştir.

GSBL üreten kinolon dirençli klinik *E. coli* izolatları hakkında Durmaz ve arkadaşları (34) tarafından benzer bir rapor verilmiştir. Shakil ve arkadaşları (37), YYBÜ hastalarından alınan dört blaCTX-M-15-pozitif *E. coli* izolatı arasında ERIC-PCR ile klonal benzerlik bildirmiştir. Mevcut çalışmada, çeşitli klinik örneklerden toplanan  $\beta$ -laktamaz üreten MDR *E. coli*'nin ERIC-PCR bazlı suş tiplemesinin önemli miktarda klonal heterojenite sergilediği sonucuna varılabilir. Bu izolatlar arasında klonal olarak benzer birkaç grubun ortaya çıkması, ya farklı  $\beta$ -laktamazların yayılması yoluyla antibiyotik direncinin yayılmasına ya da klonal geçişe bağlı olabilir. Bununla birlikte, bu klonal olarak benzer izolatların ilgili antibiyotik duyarlılık paternleri veya

çalışmamızda  $\beta$ -laktamaz enzim üretimi ile ilişkisinin olmaması, yukarıdaki olasılığı dışlıyor ve antibiyotik seçiminin daha fazla doğrulanması gereken ana nedenlerden biri olduğunu göstermektedir (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** ESBL pozitif taşıyıcılar arasındaki genetik ilişki.

İzolasyon sayısı	Benzerlik	Kaynak	ESBLs	Tahlil
1,3	39%	wound	+	0.12 , 0.25
12,11	76%	Sputum	+	0.38 , 0.16
13 , 14	71%	urine	+	0.51 , 0.23

## 5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

### 5.1- Sonuç :

- 1- Al-Ramadi hastanelerinde tarama yoluyla GSBL üreten klinik *K. pneumoniae* prevalansının daha yüksek olduğu belirlenmiştir.
- 2- GSBL'lerin yüksek oranda üretilmesi ile çoklu ilaca dirençli *Klebsiella pneumoniae* suşlarının ortaya çıkması birbiri ile ilişkili bulunmuştur. Antibiyotik tedavisi, antibiyotiğe dirençli suşların ortaya çıkmasını ve yayılmasını önlemeye yardımcı olacak ESBLs'yi saptamak için doğrulama testinin yapılması gerekliliğini ortaya koymuştur.
- 3- GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae*'nin ortaya çıkışı, GSBL tipi, suşun genetik özellikleri ve ekolojik nişlerdeki seçici baskılar arasındaki karmaşık etkileşimlerin sonucu gibi görünmektedir.
- 4- ERIC-PCR parmak izleri, bu çalışmada *Klebsiella pneumoniae* suşları ve örnek toplama alanları arasında büyük bir çeşitlilik göstermiştir.
- 5- Bu bulgular, aynı antibiyotik direnç profiline, GSBL genlerine, filogenetik gruba ve ERIC-PCR parmak izlerine sahip GSBL üreten *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının farklı kaynaklardan izole edildiğini göstermiştir.



## 5.2 - Öneriler:

- 1- *K. pneumoniae*'de biyofilm oluşumu ve dışa akış pompası gibi diğer mekanizmalarının da genlerinin araştırılması.
- 2- MDR- *K. pneumoniae* de bazı inhibitörlerin ESBLs genleri üzerindeki etkisinin araştırılması.
- 3- Sefalosporinlere dirençli *K. pneumoniae* için bir Multilocus sekans tipleme sistemi (MLST) çalışması yapılması.
- 4- Al-Ramadi hastanelerinde GSBL'lerin çok çeşitli olması ve bu enzimleri üreten *K. pneumoniae* klinik izolatlarının prevalansı bunun bölgemizde önemli bir sorun olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan izolatlara karşı en aktif antimikrobiyal ajanlar karbapenemler iken, Beta-laktam dışı antibiyotiklerin tedavi seçenekleri arasında Amikasin ve Siprofloksasin yer almaktadır.

## Referanslar :

1. Parsaie Mehr V, Shokoohizadeh L, Mirzaee M, Savari M. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates by enterobacterial repetitive intergenic Consensus (ERIC)-PCR. *Infect Epidemiol Microbiol.* 2017;3(4):112–6.
2. Sianipar O, Asmara W, Dwiprahasto I, Mulyono B. Mortality risk of bloodstream infection caused by either *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: a prospective cohort study. *BMC Res Notes.* 2019;12(1):1–7.
3. Malik N, Bisht D, Faujdar SS. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases and metallo- $\beta$ -lactamases production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing pneumonia in rural population of Uttar Pradesh. *Int J Curr Microbiol App Sci.* 2019;8:1732–8.
4. Pishtivan AH, Khadija KM. Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M genes among ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolated from thalassemia patients in Erbil, Iraq. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2019;11(1).
5. Shelenkov A, Mikhaylova Y, Yanushevich Y, Samoilov A, Petrova L, Fomina V, et al. Molecular typing, characterization of antimicrobial resistance, virulence profiling and analysis of whole-genome sequence of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Antibiotics.* 2020;9(5):261.
6. Sedighi P, Zarei O, Karimi K, Taheri M, Karami P, Shokoohizadeh L. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction. *Int J Microbiol.* 2020;2020.
7. Sharma A, Lee S, Park Y-S. Molecular typing tools for identifying and characterizing lactic acid bacteria: a review. *Food Sci Biotechnol.* 2020;29(10):1301–18.
8. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11(4):589–603.
9. Wyres KL, Lam M, Holt KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*.

- Nat Rev Microbiol. 2020;18(6):344–59.
10. Navon-Venezia S, Kondratyeva K, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev. 2017;41(3):252–75.
  11. Friedländer C. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med. 1882;87(2):319–24.
  12. Carroll KC, Butel J, Morse S. Jawetz melnick and adelbergs medical microbiology 27 E. McGraw-Hill Education; 2015.
  13. Tsai S-S, Huang J-C, Chen S-T, Sun J-H, Wang C-C, Lin S-F, et al. Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in community-acquired and nosocomial infections in diabetic patients. Chang Gung Med J. 2010;33(5):532–9.
  14. Bengoechea JA, Sa Pessoa J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences. FEMS Microbiol Rev. 2019;43(2):123–44.
  15. Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. Microb genomics. 2018;4(9).
  16. Ryan KJ. Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases. McGraw-Hill Medical Publishing; 1994.
  17. Köhler W, Mochmann H. Carl Friedländer (1847-1887) and the discovery of the Pneumococcus--in memory of the centenary of his death. Z Arztl Fortbild (Jena). 1987;81(12):615–8.
  18. Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(2):223–32.
  19. Carter KC. Koch's postulates in relation to the work of Jacob Henle and Edwin Klebs. Med Hist. 1985;29(4):353–74.
  20. Zhu J, Wang T, Chen L, Du H. Virulence factors in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2021;12:734.

21. Remya PA, Shanthi M, Sekar U. Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*. Indian J Med Microbiol. 2019;37(2):210–8.
22. Janda JM, Abbott SL. The Changing Face of the Family Enterobacteriaceae (Order:“Enterobacterales”): New Members, Taxonomic Issues, Geographic Expansion, and New Diseases and Disease Syndromes. Clin Microbiol Rev. 2021;34(2):e00174-20.
23. Mohamed SH, Mohamed MSM, Khalil MS, Mohamed WS, Mabrouk MI. Antibiofilm activity of papain enzyme against pathogenic *Klebsiella pneumoniae*. J Appl Pharm Sci. 2018;8(06):163–8.
24. Baker S, Thomson N, Weill F-X, Holt KE. Genomic insights into the emergence and spread of antimicrobial-resistant bacterial pathogens. Science (80- ). 2018;360(6390):733–8.
25. Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. Microbiol Mol Biol Rev. 2016;80(3):629–61.
26. Nirwati H, Sinanjung K, Fahrurissa F, Wijaya F, Napitupulu S, Hati VP, et al. Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. In: BMC proceedings. BioMed Central; 2019. p. 1–8.
27. Lin T-H, Wu C-C, Kuo J-T, Chu H-F, Lee D-Y, Lin C-T. Fnr-dependent rmpa and rmpa2 regulation of capsule polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae*. Front Microbiol. 2019;10:2436.
28. Liu Y, Liu P, Wang L, Wei D, Wan L-G, Zhang W. Capsular polysaccharide types and virulence-related traits of epidemic KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a Chinese university hospital. Microb drug Resist. 2017;23(7):901–7.
29. Zhang W, Zhang Y, Wang X, Ding F, Fu Y, Zhao J, et al. Siderophores in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* promote ciprofloxacin resistance by inhibiting the oxidative stress. Biochem Biophys Res Commun. 2017;491(3):855–61.

30. Bogomolnaya LM, Tilvawala R, Elfenbein JR, Cirillo JD, Andrews-Polymenis HL. Linearized siderophore products secreted via MacAB efflux pump protect *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from oxidative stress. *MBio*. 2020;11(3):e00528-20.
31. Piperaki E-T, Syrogiannopoulos GA, Tzouvelekis LS, Daikos GL. *Klebsiella pneumoniae*: virulence, biofilm and antimicrobial resistance. *Pediatr Infect Dis J*. 2017;36(10):1002–5.
32. Alav I, Sutton JM, Rahman KM. Role of bacterial efflux pumps in biofilm formation. *J Antimicrob Chemother*. 2018;73(8):2003–20.
33. Moya C, Maicas S. Antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains: mechanisms and outbreaks. In: Multidisciplinary Digital Publishing Institute Proceedings. 2020. p. 11.
34. de Oliveira D V, Nunes LS, Barth AL, Van Der Sand ST. Genetic background of  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae isolates from environmental samples. *Microb Ecol*. 2017;74(3):599–607.
35. Nadeem SF, Gohar UF, Tahir SF, Mukhtar H, Pornpukdeewattana S, Nukthamna P, et al. Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. *Crit Rev Microbiol*. 2020;46(5):578–99.
36. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance. *Virulence Mech Bact Pathog*. 2016;481–511.
37. Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2018;45:131–9.
38. Botelho J, Grosso F, Peixe L. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*—Mechanisms, epidemiology and evolution. *Drug Resist Updat*. 2019;44:100640.
39. Varela MF, Stephen J, Lekshmi M, Ojha M, Wenzel N, Sanford LM, et al. Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents. *Antibiotics*. 2021;10(5):593.
40. Chu J, Vila-Farres X, Inoyama D, Gallardo-Macias R, Jaskowski M, Satish S, et al. Human microbiome inspired antibiotics with improved  $\beta$ -lactam synergy against MDR *Staphylococcus aureus*. *ACS Infect Dis*. 2018;4(1):33–8.

41. Corrêa RCG, Heleno SA, Alves MJ, Ferreira ICFR. Bacterial Resistance: antibiotics of last generation used in clinical practice and the arise of natural products as new therapeutic alternatives. *Curr Pharm Des.* 2020;26(8):815–37.
42. Vasilenko S. Bacteria resistance to beta-lactam antibiotics. National Aviation University; 2021.
43. Zango UU, Ibrahim M, Shawai SAA. A review on  $\beta$ -lactam antibiotic drug resistance. *MOJ Drug Des Dev Ther.* 2019;3(2):52–8.
44. Benmahmod AB, Said HS, Ibrahim RH. Prevalence and mechanisms of carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates in Egypt. *Microb Drug Resist.* 2019;25(4):480–8.
45. Khan FA. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Wastewater-Associated Aquatic Environments. Örebro University; 2020.
46. Ayoub Moubareck C, Hammoudi Halat D. Insights into *Acinetobacter baumannii*: a review of microbiological, virulence, and resistance traits in a threatening nosocomial pathogen. *Antibiotics.* 2020;9(3):119.
47. Ramos S, Silva V, Dapkevicius M de LE, Caniça M, Tejedor-Junco MT, Igrejas G, et al. *Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) production. *Animals.* 2020;10(12):2239.
48. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Tassios PT, Legakis NJ. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents.* 2000;14(2):137–42.
49. Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2018;8:4.
50. Bush K. Proliferation and significance of clinically relevant  $\beta$ -lactamases. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1277(1):84–90.
51. Bahr G, González LJ, Vila AJ. Metallo- $\beta$ -lactamases in the Age of Multidrug Resistance: From Structure and Mechanism to Evolution, Dissemination, and Inhibitor Design. *Chem Rev.* 2021;

52. Somboro AM, Osei Sekyere J, Amoako DG, Essack SY, Bester LA. Diversity and proliferation of metallo- $\beta$ -lactamases: a clarion call for clinically effective metallo- $\beta$ -lactamase inhibitors. *Appl Environ Microbiol.* 2018;84(18):e00698-18.
53. Ahmed SH, Shehan MA. Phenotypic and Genotypic Detection of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase in MDR-*Klebsiella pneumoniae* in Anbar Governate. *Ann Rom Soc Cell Biol.* 2021;4984–92.
54. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(3):969–76.
55. Edowik Y. Epidemiological gene carriage study of gram-negative extended spectrum -Lactamase- producing bacteria in urinary tract infection patients in North Wales : isolation of a novel CTXM-type enzyme EPIDEMIOLOGICAL GENE CARRIAGE STUDY OF GRAM- BACTERIA IN URINA. 2020;
56. Sahoo RK, Das A, Gaur M, Pattanayak A, Sahoo S, Debata NK, et al. Genotypic validation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and virulence factors in multidrug resistance *Klebsiella pneumoniae* in an Indian hospital. *Pathog Glob Health.* 2019;113(7):315–21.
57. Beyene D, Bitew A, Fantew S, Mihret A, Evans M. Multidrug-resistant profile and prevalence of extended spectrum  $\beta$ -lactamase and carbapenemase production in fermentative Gram-negative bacilli recovered from patients and specimens referred to National Reference Laboratory, Addis Ababa, Ethiopia. *PLoS One.* 2019;14(9):e0222911.
58. Jahanbakhsh S. Molecular characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistance in *Escherichia coli* in pigs on-farm and from clinical cases throughout Quebec, Canada during 16 years. 2016;
59. Bilung LM, Pui CF, Su'ut L, Apun K. Evaluation of BOX-PCR and ERIC-PCR as molecular typing tools for pathogenic *Leptospira*. *Dis Markers.* 2018;2018.
60. Mackie TJ. Mackie & McCartney practical medical microbiology. Harcourt Health Sciences; 1996.
61. Tarrand JJ, Gröschel DH. Rapid, modified oxidase test for oxidase-variable bacterial isolates. *J Clin Microbiol.* 1982;16(4):772–4.

62. Abdel Hag SE. A pharmacological study of some therapeutic and antimicrobial potentials of ox bile. UOFK; 2008.
63. Hall KK, Scheuerman PR. DEVELOPMENT OF MULTIPLE REGRESSION MODELS TO PREDICT SOURCES OF FECAL POLLUTION IN THE WATAUGA RIVER WATERSHED. *Appl Multivar Stat Methodol to Model Factors Infl Fate Transp Fecal Pollut Surf Waters*. 2012;224.
64. Sanderson BA, Araki N, Lilley JL, Guerrero G, Lewis LK. Modification of gel architecture and TBE/TAE buffer composition to minimize heating during agarose gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 2014;454:44–52.
65. Prasai T, Lekhak B, Joshi DR, Baral MP. Microbiological analysis of drinking water of Kathmandu Valley. *Sci world*. 2007;5(5):112–4.
66. Sønnerholm M, Kragh KN, Koren K, Jakobsen TH, Darch SE, Alhede M, et al. *Pseudomonas aeruginosa* aggregate formation in an alginate bead model system exhibits in vivo-like characteristics. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(9):e00113-17.
67. Hamon M, Biondi-Zoccai GGL, Malagutti P, Agostoni P, Morello R, Valgimigli M, et al. Diagnostic performance of multislice spiral computed tomography of coronary arteries as compared with conventional invasive coronary angiography: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol*. 2006;48(9):1896–910.
68. Reiner K. Catalase test protocol. *Am Soc Microbiol*. 2010;1–6.
69. Ali NA, Karkush MO, Al Haideri HH. Isolation and Identification of Local Bacteria Produced from Soil-Borne Urease. In: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing; 2020. p. 12035.
70. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966;45(4\_ts):493–6.
71. Vandepitte J, Verhaegen J, Engbaek K, Rohner P, Piot P, Heuck CC, et al. *Basic laboratory procedures in clinical bacteriology*. World Health Organization; 2003.
72. Clinical And Laboratory Standars Institute. M100 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Vol. 8, *Journal of Services Marketing*. 2018. 31 p.



73. Perez-Llarena F, Martin JF, Galleni M, Coque JJ, Fuente JL, Frère J-M, et al. The bla gene of the cephamycin cluster of *Streptomyces clavuligerus* encodes a class A beta-lactamase of low enzymatic activity. *J Bacteriol.* 1997;179(19):6035–40.
74. Deconinck D, Hostens K, Taverniers I, Volckaert FAM, Robbens J, Derycke S. Identification and semi-quantification of Atlantic salmon in processed and mixed seafood products using Droplet Digital PCR (ddPCR). *Food Chem Toxicol.* 2021;112329.
75. Hemati S, Azizi-Jalilian F, Pakzad I, Taherikalani M, Maleki A, Karimi S, et al. The correlation between the presence of quorum sensing, toxin-antitoxin system genes and MIC values with ability of biofilm formation in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Iran J Microbiol.* 2014;6(3):133.
76. Lienhard A, Schäffer S. Extracting the invisible: obtaining high quality DNA is a challenging task in small arthropods. *PeerJ.* 2019;7:e6753.
77. Kugelman JR, Wiley MR, Nagle ER, Reyes D, Pfeffer BP, Kuhn JH, et al. Error baseline rates of five sample preparation methods used to characterize RNA virus populations. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171333.
78. Mahon CR, Lehman DC, Manuselis G. Textbook of diagnostic microbiology-e-book. Elsevier Health Sciences; 2018.
79. Vasaikar S, Obi L, Morobe I, Bisi-Johnson M. Molecular characteristics and antibiotic resistance profiles of *Klebsiella* isolates in Mthatha, Eastern Cape province, South Africa. *Int J Microbiol.* 2017;2017.
80. Chiu S-K, Wu T-L, Chuang Y-C, Lin J-C, Fung C-P, Lu P-L, et al. National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. *PLoS One.* 2013;8(7):e69428.
81. Al-Obadi THZ. Molecular Identification of *Klebsiella pneumoniae* Using Capsule Genes. M. Sc. Thesis. College of Science, Al-Nahrain University, Baghdad, Iraq; 2014.
82. Akpaka PE, Swanston WH. Phenotypic detection and occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and

- Escherichia coli* at a tertiary hospital in Trinidad & Tobago. Brazilian J Infect Dis. 2008;12(6):516–20.
83. Longley DB, Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. J Pathol A J Pathol Soc Gt Britain Irel. 2005;205(2):275–92.
  84. Ahmed HJ, Ganjo AR. Detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* recovered from clinical specimens in Erbil City Kurdistan Region of Iraq. Al-Mustansiriyah J Sci. 2019;30(2):10–8.
  85. Ibrahim MO, Al Meani SAL. DETECTION OF PLASMID-MEDIATED AMPC  $\beta$ -LACTAMASE GENES AND EVALUATION THE SYNERGISTIC EFFECT OF CLOVE VOLATILE OIL AND ANTIBIOTICS IN CLINICAL ISOLATES OF KLEBSIELLA PNEUMONIA IN IRAQ.
  86. Ahmed MM, Al Meani SAL. Occurrence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase KPC gene in *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients in Anbar city of Iraq. Ann Trop Med Public Heal. 2019;22(Special Issue 5).
  87. Ragheb YM, Abdulkarim AH. Phenotypic and Genotypic Detection Ampc  $\beta$ -Lactmase Producing *E. coli* Isolated from UTI in Anbar Governate. Ann Rom Soc Cell Biol. 2021;1181–92.
  88. Akpan MR, Ahmad R, Shebl NA, Ashiru-Oredope D. A review of quality measures for assessing the impact of antimicrobial stewardship programs in hospitals. Antibiotics. 2016;5(1):5.
  89. Salim DK, Altif IA, Abdulwahab MH. Assessment of bacteria exposure in vitro activity to 1 st, 2 nd, 3 rd and 4 th generation-cephalosporins and Comparison effects. Tikret J Pharm Sci. 2017;12(1).
  90. Clsi. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S10. Natl Comm Clin Lab Stand Wayne, Pa, USA. 2018;
  91. Orstavik I, Odegaard K. A simple test for Penicillinase production in *Staphylococcus aureus*. Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol. 1971;79(6):855–6.
  92. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test

- (modified Hodge test) for detecting Carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. J Antimicrob Chemother. 2010;65(2):249–51.
93. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple Carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50(9):3098–101.
  94. Sadiq Z, Sehlawi A. Occurrence and Detection of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in Najaf Hospitals. Mag Al-Kufa Univ Biol. 2013;5(2).
  95. Pierce VM, Simner PJ, Lonsway DR, Roe-Carpenter DE, Johnson JK, Brasso WB, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of Carbapenemase production among enterobacteriaceae. J Clin Microbiol. 2017;55(8):2321–33.
  96. Jing X, Zhou H, Min X, Zhang X, Yang Q, Du S, et al. The simplified Carbapenem inactivation method (sCIM) for simple and accurate detection of Carbapenemase-producing gram-negative bacilli. Front Microbiol. 2018;9:2391.
  97. Chatterjee M, Banerjee M, Guha S, Lahiri A, Karak K. Prevalence of ESBL producing urinary isolates and their drug resistance pattern in eastern part of India. Sri Lankan J Infect Dis. 2012;2(1).
  98. Rodríguez-Baño J, Picón E, Gijón P, Hernández JR, Ruíz M, Peña C, et al. Community-onset bacteremia due to extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli*: risk factors and prognosis. Clin Infect Dis. 2010;50(1):40–8.
  99. Kiliç E, Çirak MY. Comparison of staphylococcal beta-lactamase detection methods. Fabad J Pharm Sci. 2006;31(2):79.
  100. Henshke-Bar-Meir R, Yinnon AM, Rudensky B, Attias D, Schlesinger Y, Raveh D. Assessment of the clinical significance of production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) by Enterobacteriaceae. Infection. 2006;34(2):66–74.
  101. Cabral AB, Melo R de C de A, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae*

- isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45:572–8.
102. Mehboob M, Shuja MN. Isolation, Identification and Characterization of Urinary Tract Infectious Bacteria and the Effect of Different Antibiotics. *Biosci Rev.* 2021;3(3).
  103. Wei Z-Q, Chen Y-G, Yu Y-S, Lu W-X, Li L-J. Nosocomial spread of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* containing a plasmid encoding multiple  $\beta$ -lactamases. *J Med Microbiol.* 2005;54(9):885–8.
  104. Pérez-Moreno MO, Centelles-Serrano MJ, Cortell-Ortolá M, Fort-Gallifa I, Ruiz J, Llovet-Lombarte MI, et al. Molecular epidemiology and resistance mechanisms involved in reduced susceptibility to Amoxicillin/Clavulanic acid in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a chronic care centre. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(5):462–6.
  105. Ramazanzadeh R, Zamani S, Zamani S. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–PCR technique in Sanandaj hospitals. *Iran J Microbiol.* 2013;5(2):126.
  106. Seifi K, Kazemian H, Heidari H, Rezagholizadeh F, Saei Y, Shirvani F, et al. Evaluation of biofilm formation among *Klebsiella pneumoniae* isolates and molecular characterization by ERIC-PCR. *Jundishapur J Microbiol.* 2016;9(1).
  107. Moosavian M, Emam N. The first report of emerging mobilized colistin-resistance (mcr) genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran. *Infect Drug Resist.* 2019;12:1001.
  108. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(12):3724–32.