



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**KLİNİK *ENTEROBACTERIACEAE*
İZOLATLARINDA FOSFOMİSİN DİRENCİNİN
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ VE BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERE ETKİSİ**

Doktora Tezi

Mustafa ÖKEER

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İzmir
2023

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**KLİNİK *ENTEROBACTERIACEAE*
İZOLATLARINDA FOSFOMİSİN DİRENCİNİN
MOLEKÜLER EPİDEMİYOLOJİSİ VE BİYOLOJİK
ÖZELLİKLERE ETKİSİ**

Mustafa ÖKEER

Danışman
Prof. Dr. Bayrı ERAÇ

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı
Doktora Programı

İzmir
2023

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Prof. Dr. Bayrı ERAÇ

(Danışman)

Üye : Prof. Dr. Hüseyin TAŞLI

Üye : Prof. Dr. Şafak ERMERTCAN

Üye : Prof. Dr. Mehmet Emin LİMONCU

Üye : Doç. Dr. Fethiye Ferda YILMAZ

Üye : Doç. Dr. İsmail ÖZTÜRK

Doktora Tezinin kabul edildiği tarih: 03.08.2023

Önsöz

Çocukluğumdan beri antibiyotikler ve mikroorganizmalar benim için hep bir merak konusu olmuştı. Küçüklüğümde antibiyotiklerin prospektüslerini okuyup bakteri isimlerini öğrenmeye çalıştığımı hatırlıyorum. Belki de eczacılık fakültesini okumak istememin bir sebebi de ilaçlara olan bu ilgimdi. Fakültenin ikinci sınıfında farmasötik mikrobiyoloji dersini alırken laboratuvar uygulamalarından çok zevk almıştım ve ileride farmasötik mikrobiyoloji alanında çalışmalar yapmak istemiştim. İstedğim gibi de oldu. Fakülteden mezun olduktan hemen sonra doktora kabul edildim ve değerli hocam Sayın Prof. Dr. Bayrı ERAÇ danışmanlığında doktora öğrenimime başladım. Yeterlilik sınavımı geçtikten sonra sıra tez konumu belirlemeye gelmişti. Bütün dünyada sağlık sistemini derinden etkileyen ve etkisi önümüzdeki yıllarda daha da artacak olan antibiyotik direnciyle ilgili çalışmaya karar verdik. Genellikle üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılan ancak artan antibiyotik direnciyle beraber başka kullanım alanları da bulan ve direnç gelişimi nispeten az olan fosfomisinini tez konuma dahil ettik. Antibiyotik direncinin bu derece yaygınlaşmasından fosfomisinin de nasibini alacağını düşünerek fosfomisine direnç geliştiren bakterilerde meydana gelen/gelecek değişiklikleri incelemeyi planladık ve tez konumu yazdık. Her ne kadar Covid-19 pandemisiyle çalışmalarımız bir miktar sekteye uğrasa da uzun uğraşlar sonucunda çalışmalarımı tamamlayarak bu tez çalışmasını ortaya çıkardım. Çalışmamın sonuçlarının bilim dünyasına bir nebze de olsa katkı sağlayabilecek olmasını düşünmekten mutluluk duyuyorum.

İzmir, 10.08.2023

Mustafa ÖKEER

Özet

Klinik *Enterobacteriaceae* izolatlarında fosfomisin direncinin moleküler epidemiyolojisi ve biyolojik özelliklere etkisi

Diğer antibiyotiklerden farklı bir etki mekanizmasına sahip olması dolayısı ile çapraz dirence yol açmaması, gram pozitif ve GSBL-pozitif birçok gram negatif bakteriye karşı etkili olması fosfomisini yeniden gündeme getirmiştir. Çeşitli virülans faktörleri ve artan antibiyotik direnç oranları nedeniyle oluşturdukları enfeksiyonların tedavisi zorlaşan *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarına karşı fosfomisin kullanımının artacağı düşünülmektedir. Fosfomisin kullanım alanının genişlemesinin olası etkilerinin öngörülmesi önem taşımaktadır. Çalışmamızda fosfomisine dirençli ve duyarlı *E. coli* ile *K. pneumoniae* kökenlerinin virülans faktörleri arasındaki olası farklılıkların fenotipik ve moleküler açıdan incelenmesi amaçlanmıştır. Bu doğrultuda Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi'nde farklı klinik örneklerden izole edilen 78 *E. coli* ve 34 *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 112 köken çalışmaya dahil edilmiştir. Öncelikle kökenlerin fosfomisin minimum inhibitör konsantrasyonları agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. 78 *E. coli* kökeninin 13 tanesi (%16,66), 34 *K. pneumoniae* kökeninin ise 8 tanesi (%23,5) fosfomisine dirençli bulunmuştur. Fosfomisine dirençli bulunan *E. coli* (13) ve *K. pneumoniae* (8) kökenlerinde dirençle ilgili olan genlerin (*murA*, *glpT*, *uhpT*, *fos*) yanısıra, adezyon (*fimH*, *papC*, *mrkD*), kapsül yapısında yer alan polisakkaritler (*uge*, *ycfM*, *wabG*), üropatojenitede rol alan protein (*usp*) ve siderofor sentezi (*entb*) gibi çeşitli virülans faktörleriyle ilişkili genler de araştırılmıştır. Ardından seçilen fosfomisine duyarlı 2 *E. coli* ve 2 *K. pneumoniae* kökeni artan konsantrasyonlarda fosfomisin içeren besiyerlerine pasajlanarak dirençli hale getirilmiştir. Ardından dirençli ve duyarlı izogenik varyantların virülans genlerini eksprese etme düzeyleri, biyofilm oluşturma kapasiteleri ve üreme hızları karşılaştırılmıştır. Kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (RT-qPCR) sonucunda fosfomisin dirençli varyantlar ile duyarlı eşleri karşılaştırıldığında, incelenen virülans genlerinden birçoğunda ekspresyon düzeyi açısından anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Spektrofotometrik kristal viyole yöntemiyle dirençli ve duyarlı kökenlerin biyofilm oluşturma kapasiteleri karşılaştırılmış olup aralarında anlamlı bir fark bulunmamıştır. Fosfomisine dirençli ve duyarlı kökenler sıvı besiyeri içinde 10 saat boyunca inkübe edilmiş ve 2 saatte bir tüplerden örnek alınıp 600nm dalga boyunda absorbans ölçülerek üreme hızları karşılaştırılmıştır. İncelenen dört bakteri çiftinden üçünde duyarlı varyantların dirençlilere göre anlamlı bir şekilde hızlı ürediği ancak 1 kökenin duyarlı ve

dirençli varyantları arasında anlamlı bir farklılık olmadığı görülmüştür. Çalışmamızın verileri, fosfomisine dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenlerinin üreme hızlarında azalma olmakla birlikte, virülans faktörleri açısından önemli bir dezavantajları olmadığına işaret etmekte, fosfomisin kullanımının dikkatle izlenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler; Gen ekspresyonu; *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; Fosfomisin; Virülans faktörleri; Biyofilm



Abstract

Molecular epidemiology of fosfomycin resistance and effect on biological properties in clinical *Enterobacteriaceae* isolates

Fosfomycin has a different mechanism of action from other antibiotics and does not cause cross-resistance. Also its activity against many gram-positive and ESBL-positive gram-negative bacteria makes fosfomycin a point of interest. It is thought that the use of fosfomycin against *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates, will increase because infections of these microorganisms are difficult to treat due to various virulence factors and increasing antibiotic resistance rates. Therefore it is important to foresee the possible effects of expanding the use of fosfomycin. In our study, we aimed to examine the possible differences between the virulence factors of fosfomycin-resistant and susceptible *E. coli* and *K. pneumoniae* strains from a phenotypic and molecular point of view. A total of 112 strains, constitute of 78 *E. coli* and 34 *K. pneumoniae* isolated from different clinical specimens at Ege University Medical Faculty Hospital, were included in the study. The minimum inhibitory concentrations of fosfomycin of the strains were determined by agar dilution method. 13 (16.66%) of 78 *E. coli* strains and 8 (23.5%) of 34 *K. pneumoniae* strains were found to be resistant to fosfomycin. In the fosfomycin resistant *E. coli* (13) and *K. pneumoniae* (8) strains, genes related to resistance (*murA*, *glpT*, *uhpT*, *fos*), adhesion (*fimH*, *papC*, *mrkD*), polysaccharides in the capsule structure (*uge*, *ycfM*, *wabG*), gene involved in uropathogenicity (*usp*) and siderophore synthesis (*entb*) gene have been investigated. Then, fosfomycin-sensitive 2 *E. coli* and 2 *K. pneumoniae* strains were made resistant by passaging into media containing increasing concentrations of fosfomycin. Then, expression levels of virulence genes, biofilm forming capacities and growth rates of these resistant and susceptible isogenic variants were compared. There weren't any significant changes between the expression levels of the most of the virulence genes examined when fosfomycin resistant and susceptible isogenic variants were compared by quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-qPCR). Biofilm forming capacities of the resistant and susceptible variants were compared with the spectrophotometric crystal violet method and no significant difference was found between them. Fosfomycin resistant and susceptible variants were incubated in broth media for 10 hours, and the growth rates were compared by measuring the absorbance at 600nm wavelength by taking samples from the tubes every 2 hours. In three of the four bacterial variant pairs examined, we observed that the susceptible variants grew significantly faster than the resistant ones but there was no significant difference between the susceptible and resistant variants of one strain. The data of our study indicate that

although the growth rates of fosfomycin-resistant *E. coli* and *K. pneumoniae* strains are reduced, fosfomycin resistance didn't pose any significant disadvantage in terms of virulence factors. Therefore the use of fosfomycin should be carefully monitored.

Keywords; Gene expression; *Klebsiella pneumoniae*; *Escherichia coli*; Fosfomycin; Virulence factors; Biofilms



İçindekiler

Önsöz.....	II
Özet.....	III
Abstract.....	V
İçindekiler.....	VII
Tablolar Dizini	X
Şekiller Dizini	XI
Kısaltma Listesi.....	XII
1. Giriş.....	1
2. Genel Bilgiler.....	3
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesi Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Morfoloji ve Üreme Özellikleri.....	3
2.1.2. Biyokimyasal Özellikleri ve Antijenik Yapı	3
2.1.3. Virülans Faktörleri	4
2.1.3.1. Endotoksin	4
2.1.3.2. Ekzotoksin	5
2.1.3.3. Adezinler ve Kapsül Yapısı.....	5
2.1.3.4. Bakteriyosinler	6
2.1.3.5. Biyofilm.....	6
2.1.4. <i>Enterobacteriaceae</i> Üyelerinin Tanımlanması.....	7
2.1.5. Antimikrobiyal Direnç.....	8
2.2. Biyolojik Dezavantaj-Fitness Cost.....	8
2.3. Fosfomisin.....	9
2.3.1. Etki Mekanizması	10
2.3.2. Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri.....	10
2.3.3. Antibakteriyel Etki Spektrumu	11
2.3.4. Fosfomisin Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	11
2.3.5. Fosfomisin Direnç Mekanizmaları	11
3. Gereç ve Yöntem	13
3.1. Gereç	13
3.1.1. Bakteri Kökenleri.....	13
3.1.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler	15
3.2. Yöntem	19

3.2.1. Bakterilerde Fosfomisin Direncinin Agar Dilüsyon Yöntemiyle Belirlenmesi	19
3.2.2. Kökenlerin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi (Antibiyotiplendirme).....	20
3.2.3. Kökenlerde Fosfomisin Direnciyle İlgili Bazı Genlerin ve Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması	20
3.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu.....	21
3.2.3.2. Fosfomisine Dirençli <i>E. coli</i> Kökenlerinde Direnç ile İlişkili Bazı Genlerin Araştırılması.....	22
3.2.3.3. Fosfomisine Dirençli <i>E. coli</i> Kökenlerinde Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması.....	24
3.2.3.4. Fosfomisine Dirençli <i>K. pneumoniae</i> Kökenlerinde Direnç ile İlişkili Bazı Genlerin Araştırılması.....	25
3.2.3.5. Fosfomisine Dirençli <i>K. pneumoniae</i> Kökenlerinde Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması.....	26
3.2.3.6. Jel Elektrophorezi	27
3.2.4. Fosfomisine Dirençli İzogenik Varyantların Oluşturulması	27
3.2.5. Fosfomisin Dirençli İzogenik Varyantlarda Bazı Virülans Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin RT-qPCR Yöntemiyle Karşılaştırılması.....	27
3.2.5.1. Total RNA İzolasyonu	28
3.2.5.2. cDNA Sentezi.....	29
3.2.5.3. RT-qPCR Yöntemiyle mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi	30
3.2.6. Fosfomisine Dirençli İzogenik Bakteri Varyantlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Kristal Viyole Yöntemi ile Belirlenmesi ve Karşılaştırılması.....	32
3.2.7. Fosfomisine Dirençli İzogenik Bakteri Varyantlarının Üreme Hızlarının Karşılaştırılması.....	34
3.2.8. İstatistiksel Analiz.....	34
4. Bulgular	35
4.1. Fosfomisin MİK Değerleri	35
4.2. Kökenlerin Antibiyotik Direnç Profilleri (Antibiyotiplendirme).....	35
4.3. Kökenlerde Fosfomisin Direnci ile İlişkili Bazı Genlerin ve Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması	38

4.3.1. Fosfomisine Dirençli <i>E. coli</i> Kökenlerinde Direnç ile İlişkili Bazı Genlerin Araştırılması.....	38
4.3.2. Fosfomisine Dirençli <i>K. pneumoniae</i> Kökenlerinde Direnç ile İlişkili Bazı Genlerin Araştırılması.....	39
4.3.3. Fosfomisine Dirençli <i>E. coli</i> Kökenlerinde Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması.....	39
4.3.4. Fosfomisine Dirençli <i>K. pneumoniae</i> Kökenlerinde Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması.....	41
4.4. Oluşturulan İzogenik Varyantların Fosfomisin MİK Değerleri	42
4.5. Fosfomisin Dirençli İzogenik Varyantlarda Bazı Virülans Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin RT-qPCR Yöntemiyle Karşılaştırılması.....	43
4.6. Fosfomisin Dirençli İzogenik Varyantların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Karşılaştırılması.....	48
4.7. İzogenik Bakteri Varyantlarının Üreme Hızlarının Karşılaştırılması	50
Tartışma.....	53
Sonuç ve Öneriler.....	62
Kaynaklar	64
Ekler	75
Teşekkür	76
Özgeçmiş	77

Tablolar Dizini

Tablo 1. Bakteri Kökenlerinin İzole Edildiği Servisler.....	14
Tablo 2. Bakteri Kökenlerinin İzole Edildiği Örnekler.....	14
Tablo 3. <i>Escherichia coli</i> için kullanılan primer dizileri	16
Tablo 4. <i>Klebsiella pneumoniae</i> için kullanılan primer dizileri.....	18
Tablo 5. Fosfomisin MİK sınır değerleri	20
Tablo 6. cDNA sentezi reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları.....	30
Tablo 7. cDNA sentezi için PZR ısı döngüsü	30
Tablo 8. RT-qPCR Reaksiyon Karışımı.....	31
Tablo 9. RT-qPCR ısı döngü koşulları.....	32
Tablo 10. Kökenlerin biyofilm oluşturma kapasitelerine göre sınıflandırılması	34
Tablo 11. Kökenlerin Fosfomisin MİK Değerleri.....	35
Tablo 12. <i>Escherichia coli</i> kökenlerinin antibiyotik direnç profillerine göre gruplandırılması (Antibiyotipler)	36
Tablo 13. <i>Klebsiella pneumoniae</i> kökenlerinin antibiyotik direnç profillerine göre gruplandırılması (Antibiyotipler).....	37
Tablo 14. <i>E. coli</i> Kökenlerinde <i>murA</i> , <i>uhpT</i> , <i>glpT</i> , <i>fosA</i> , <i>fosA3</i> ve <i>fosC2</i> genlerinin varlığı ..	38
Tablo 15. <i>K. pneumoniae</i> kökenlerinde <i>murA</i> ve <i>glpT</i> genlerinin varlığı.....	39
Tablo 16. <i>E. coli</i> kökenlerinde <i>fimH</i> , <i>papC</i> ve <i>usp</i> genlerinin varlığı.....	41
Tablo 17. <i>K. pneumoniae</i> kökenlerinde <i>uge</i> , <i>ycfM</i> , <i>wabG</i> , <i>mrkD</i> , <i>entB</i> , <i>fimH</i> genlerinin varlığı	42
Tablo 18. İzogenik <i>E. coli</i> varyantlarında ekspresyon düzeylerindeki değişim.....	47
Tablo 19. İzogenik <i>K. pneumoniae</i> varyantlarında ekspresyon düzeylerindeki değişim.....	48
Tablo 20. İzogenik Bakteri Varyantlarının ve Optik Dansite Değerleri ve Biyofilm Oluşturma Kapasiteleri	49

Şekiller Dizini

Şekil 1. Fosfomisinin Kimyasal Yapısı	9
Şekil 2. <i>E. coli</i> kökenlerinde <i>fimH</i> geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü.....	40
Şekil 3. <i>E. coli</i> kökenlerinde <i>papC</i> geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü	40
Şekil 4. <i>E. coli</i> kökenlerinde <i>usp</i> geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü	40
Şekil 5. İzogenik <i>E. coli</i> varyantlarında <i>fimH</i> geni ekspresyon değişim düzeyleri	44
Şekil 6. İzogenik <i>E. coli</i> varyantlarında <i>papC</i> geni ekspresyon değişim düzeyleri	44
Şekil 7. İzogenik <i>K. pneumoniae</i> varyantlarında <i>entB</i> geni ekspresyon değişim düzeyleri	45
Şekil 8. İzogenik <i>K. pneumoniae</i> varyantlarında <i>mrkD</i> geni ekspresyon değişim düzeyleri ..	45
Şekil 9. İzogenik <i>K. pneumoniae</i> varyantlarında <i>uge</i> geni ekspresyon değişim düzeyleri.....	46
Şekil 10. İzogenik <i>K. pneumoniae</i> varyantlarında <i>ycfM</i> geni ekspresyon değişim düzeyleri .	46
Şekil 11. İzogenik <i>K. pneumoniae</i> varyantlarında <i>wabG</i> geni ekspresyon değişim düzeyleri	47
Şekil 12. İzogenik Bakteri Varyantlarının 570nm’de Ölçülen Optik Dansite Değerleri.....	50
Şekil 13. 4 ve 4R numaralı kökenlerin zamana göre değişen absorbans değerleri.....	51
Şekil 14. 24 ve 24R numaralı kökenlerin zamana göre değişen absorbans değerleri.....	51
Şekil 15. 27 ve 27R numaralı kökenlerin zamana göre değişen absorbans değerleri.....	52
Şekil 16. E.c ve E.cR kodlu kökenlerin zamana göre değişen absorbans değerleri	52

Kısaltma Listesi

ATCC	:	American Type Culture Collection
cDNA	:	Komplementer DNA
CLSI	:	Clinical and Laboratory Standards Institute
ÇİD	:	Çoklu İlaç Direnci
EDTA	:	Etilendiamintetraasetikası
EUCAST	:	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
G-TSB	:	%2,5 Glukozlu Tryptic Soy Broth
MHA	:	Mueller Hinton Agar
MHB	:	Mueller Hinton Broth
MİK	:	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NK	:	Negatif Kontrol
OD	:	Optik Dansite
PCR (PZR)	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RT-qPCR	:	Kantitatif gerçek zamanlı ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu
TBE	:	Tris Borat EDTA Tamponu
TSA	:	Tryptic Soy Agar
TSB	:	Tryptic Soy Broth

1. Giriş

Günümüzde antibiyotik direnci, sağlık alanında en sık karşılaşılan problemlerden biridir. Sir Alexander Fleming'in 1928 yılındaki keşfettiği ve 1945 yılında H.W. Florey ve E.B. Chain ile birlikte Nobel ödülü kazanmasını da sağlayan antibiyotiklerin, bilinçsiz ve yanlış kullanımı tedavisi mümkün olmayan enfeksiyonlara ve semptomlara yol açabilmektedir. Öyle ki 2019 yılında İsviçre Davos'ta gerçekleştirilen Dünya Ekonomik Forumu'nda, enfeksiyon hastalıklarında meydana gelen hızlı ve yüksek orandaki artışa dikkat çekilmiştir (Huemer, Mairpady Shambat, Brugger, & Zinkernagel, 2020).

Antibiyotik dirençli mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar günümüzde her yıl yaklaşık 700.000 ölümden sorumludur. Bu sayının 2050 yılında yıllık 10 milyon ölüme kadar yükseleceği ve antibiyotik direncinin sağlık sektörüne yıllık 1 trilyon dolardan fazla maliyet yaratacağı tahmin edilmektedir (Dadgostar, 2019; Huemer vd., 2020).

Antibiyotik direnci, bakterilerde yapısal ve doğal yolla oluşabileceği gibi sonradan kazanılarak da gelişebilir. Kazanılmış antibiyotik direncinin gelişmesi ve yayılmasını hızlandıran başlıca etmenlere; antibiyotiklere kolay erişim ve antibiyotiklerin bilinçsiz kullanılması, hayvancılıkta antibiyotiklerin kullanılması ve mikroorganizmalar arasındaki genetik materyal transferleri örnek olarak verilebilir (Dadgostar, 2019).

Çoklu ilaç dirençli (ÇİD) mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonların giderek artması tedavi seçeneklerini de kısıtlı hale getirmektedir. Özellikle idrar yolu enfeksiyonlarında sık kullanılan florokinolon grubu antimikrobiyal ilaçlara karşı direncin artması ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (Extended Spectrum Beta-Lactamase, ESBL) üreten bakterilere daha sık rastlanması tedavi seçeneklerinin tekrar gözden geçirilmesine yol açmıştır (Karaiskos vd., 2019).

Komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarının tedavisinde; benzersiz etki mekanizması, direnç gelişimi oranının düşük olması ve çapraz direnç gelişimi olmaması nedeniyle fosfomisin öne çıkmıştır. Ayrıca tedavide tek doz kullanımın genellikle yeterli olması, hastanın tedaviye uyumu ve direnç gelişimi konusunda da önem arz etmektedir. Bu avantajları nedeniyle fosfomisinin, dirençli bakterilerin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanımının artacağı öngörülmektedir. Bu nedenle ilerleyen yıllarda fosfomisin direncinin yaygınlaşma tehlikesi söz konusudur (Raz, 2012).

Escherichia coli'de fosfomisin hücre içine alımı *glpT* ve *uhpT* genleri tarafından kodlanan proteinler sayesinde gerçekleşir. Fosfomisin hücre içindeki hedefi ise *murA* genidir. Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar bakterinin fosfomisine direnç kazanmasını sağlayabilir. Ayrıca fosfomisini modifiye ederek etkisiz hale getiren enzimleri kodlayan *FosA*, *FosB*, *FosX*, *FomA* ve *FomB* genleri de dirençten sorumludur (Silver, 2017).

Bakteride bir antibiyotiğe karşı direnç gelişmesi bakteriye “fitness cost” olarak tanımlanan, üreme hızında azalmaya yol açan biyolojik bir yük getirir. Dirençli bakteriler metabolik faaliyetleri için gerekli olan genlerin yanında antibiyotik direnci kodlayan genleri de transkribe etmek durumundadır. Bu da bakterinin üreme hızını yavaşlatarak, virülansını ve bula ıcılı ını azaltabilir (Andersson & Hughes, 2011). Günümüzde fosfomisin idrar yolları enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılmasına rağmen klinik kökenlerde direnç gelişimi nadirdir. Bunun sebebinin ise direncin bakteriye getirdiği biyolojik y k (fitness cost) olduğu düşünülmektedir.

Bu tez çalışmasında, Ege Üniversitesi Hastanesi'nde izole edilen klinik *Enterobacteriaceae* izolatlarında, fosfomisin direnç mekanizmalarının ve bu direncin bakterilerin üreme hızı ve biyofilm oluşturma kapasitesi gibi fenotipik ve virülans genlerinin ekspresyon düzeylerinin değişimi gibi genotipik özellikleri üzerine etkisinin araştırılması hedeflenmiştir.

2. Genel Bilgiler

2.1. *Enterobacteriaceae* Ailesi Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae ailesi tıbbi olarak önemli Gram negatif basillerin en büyük temsilcisidir. Büyük bir aile olmasına rağmen insan için patojen olan türleri nispeten azdır (Murray, Rosenthal, & Pfaller, 2016). *Enterobacteriaceae* dünya üzerinde geniş yayılım gösterir ve toprakta, suda, havada, insanların ve hayvanların sindirim sisteminde bulunur. İnsanlarda görülen bakteriyemi olgularının üçte birinden, idrar yolu enfeksiyonlarının ise %70'ten fazlasından sorumludur. *Shigella* türleri, *Salmonella Typhi* gibi bazı üyeleri insanda her zaman hastalık oluştururken, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* gibi bazı üyeleri ise mikrobiyota elemanı olarak insan vücudunda bulunur ve fırsatçı enfeksiyonlara yol açabilir (Murray vd., 2016).

2.1.1. Morfoloji ve Üreme Özellikleri

Enterobacteriaceae üyeleri, 2-3µm boyunda, 0.3-1 µm eninde, Gram negatif boyanan çubuk şeklinde bakterilerdir ve spor oluşturmazlar. *Klebsiella*, *Shigella*, *Salmonella* cinsine ait bazı serovarlar hareketsiz, diğer üyeler ise hareketlidir. (Murray vd., 2016; Willke, Söyletir, & Doğanay, 2008).

Enterobacteriaceae üyelerinin tümü fakültatif anaeroptur. Birçoğu için optimal üreme sıcaklığı 35-37°C iken, genel olarak üreme sıcaklıkları 15-45°C arasında kabul edilir (Willke vd., 2008).

Bu ailedeki bakteriler, herhangi bir zenginleştirici maddeye ihtiyaç duymazlar ve basit besiyerlerinde üreyebilirler. Sıvı besiyerinde 8-12 saatte bulanıklık oluştururlar. Agar besiyerinde ise 16-18 saat inkübasyondan sonra genellikle kenarları düzgün ve ortası kabarık “S” tipi koloni oluştururlar. Bazı türler birkaç pasaj sonrası kenarları girintili “R” tipi koloni oluşturabilir. *Klebsiella* türleri gibi kapsül oluşturanlarda ise mukoid yapıdaki “M” tipi kolonilere rastlanır. Bu bakterilerin saf olarak izole edilmesi için özel işlemler uygulanmalı ya da seçici besiyerleri kullanılmalıdır (Willke vd., 2008).

2.1.2. Biyokimyasal Özellikleri ve Antijenik Yapı

Bu ailenin bütün üyeleri glukozu fermente ederken, bazıları glukozu ek olarak sakkaroz ve laktozu da fermente eder. Çoğunlukla fermentasyon sırasında gaz oluştururlar. Katalaz reaksiyonları pozitifdir. Aminoasitleri dekarboksile ederler. Sitokrom oksidaz enzimi bulundurmazlar (Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008).

Enterobacteriaceae ailesi üyelerinin tamamında “Enterobacterial Common Antigen” (ECA) bulunur. Bu antijen lipopolisakkarid tabakanın derin kısımlarında yer alır. *Enterobacteriaceae* ailesinin ayırt edici özellikleri içinde önemli bir yere sahiptir. Bu ailede ECA’nın yanı sıra karmaşık bir antijen yapısı daha vardır. Bu antijenler; hücre dış duvarında yer alan “O” somatik antijeni, kirpik taşıyan türlerde bulunan “H” kirpik antijeni ve “K” kapsül antijenidir (Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008).

Somatik O antijeni, Gram negatif hücre yapısındaki lipopolisakkarit yapısının polisakkarit kısmını oluşturur. Özgüllüğü düşük olduğu için aynı cins içindeki farklı türlerde hatta farklı cins bakterilerde benzerlik gösterebilir. O antijeni 2-3 saat kaynatmaya, alkole ve asitlere dayanıklıdır ancak formaldehite duyarlıdır (Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008).

H kirpik antijeni, kirpik taşıyan üyelerde kirpiğe bağlı olarak bulunur. Somatik antijenlerin tersine H antijenleri protein yapısı nedeniyle ısıya, asitlere ve alkole duyarlı, formaldehite ise dirençlidir. H antijenleri özellikle *Salmonella* ve *Escherichia* türlerinin sınıflandırılmasında kullanılır. Bazı bakterilerde kirpik antijeni dışında bakterilerin hareketsiz şekillerinde de bulunabilen fimbria antijenleri vardır. Bu fimbria antijenleri özellikle *E. coli* olmak üzere başka türlerde de bulunabilir. Bakterinin hücrelere tutunmasından sorumludur (Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008).

K antijeni, kapsüllü bakterilerde kapsül katmanında yer alırken kapsülsüz bakterilerde O antijeninin yüzeyini örten yapıda (slime tabakası) bulunur. Genellikle polisakkarit yapıdadır ancak protein yapıda da bulunabilir. Isıya kısmen dayanıklıdır. Bakteriler K antijenlerine göre serotiplere ayrılır (Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008).

2.1.3. Virülans Faktörleri

Enterobacteriaceae üyeleri geniş bir virülans spektrumuna sahiptir. İnsanda enfeksiyon oluşturmayan mikrobiyota elemanlarından, yüksek morbidite ve mortaliteye sebep olacak kadar yüksek virülansa sahip üyeler bulunmaktadır. Bu durum virülans faktörlerinin çeşitliliği ve bakteride bulunma durumuna göre değişiklik göstermektedir. Patogeneizde rolü olan bazı faktörler plazmidler üzerinde yer alarak türler arasında aktarılabilir (Willke vd., 2008).

2.1.3.1. Endotoksin

Bütün Gram negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkarid yapı endotoksin aktivitesi göstermektedir. *Enterobacteriaceae* üyelerinin O somatik antijeninde bulunan lipid A bölümü bu endotoksin aktiviteden sorumludur. Endotoksinler bakterilerden hücre dışına

salınmazlar ancak bakterinin lizisi veya hücre duvarının yıkımı sonucu ortama salınırlar. Isıya ve proteolitik yıkıma dirençli ancak asit hidrolizine dayanıksızdır. Yüksek derecede pirojenik aktivite gösterir. Makrofajlar tarafından tümör nekroz faktör (TNF) yapımını ve bazı sitokinlerin salınmasını indükler. Endotoksinin düşük miktarları bile; ateş yükselmesi, lökositöz, hipotansiyon, şok gibi tablolara ve hatta ölüme sebep olabilir. Endotoksinin yara ve üriner sistem enfeksiyonlarında rolü çok fazla olmasa da bakteriyemili hastalarda önemli bir tehlike unsurudur (Murray vd., 2016; Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008).

2.1.3.2. Ekzotoksin

Enterobacteriaceae ailesindeki bakterilerin bir kısmı patogeneizde rol alan ekzotoksinler salgılar. Ekzotoksinler protein yapısındadır ve endotoksinlerin aksine hücre dışına salgılanır. Bakterinin hücre duvarı makromoleküllerin geçişine izin vermediği için sekresyon sistemleri ile ortama salınırlar. Oldukça güçlü toksik etkileri vardır ancak genellikle tek başlarına tipik semptomlar oluşturmazlar. En bilinen örnekleri Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) kökenlerinin salgıladığı labil toksin (LT) ve stabil toksin (ST), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) kökenlerinin salgıladığı verotoksinler ve *Shigella dysenteriae* tip 1 kökenlerinin salgıladığı shigella toksindir (Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008).

Hemolizinler, bazı *Enterobacteriaceae* üyelerinin salgıladığı enzimlerdir. Hemolizinlerin *E. coli*'nin sebep olduğu enfeksiyonların bazılarında önemli olduğu gösterilmiştir. Bağırsak dışı enfeksiyonlardan izole edilen *E. coli* kökenlerinin birçoğu tarafından hemolizin salgılanır. Ancak gastrointestinal sistem enfeksiyonuna neden olan *E. coli* kökenlerinin yalnızca küçük bir kısmı hemolizin salgılar. Üriner sistem enfeksiyonlarına sebep olan *E. coli* kökenlerinin çoğunda hem P fimbria hem de hemolizin bulunmaktadır. Hemolizinler sitotoksik etkilerini sadece alyuvarlarla sınırlı kalmayarak, lenfositlere ve nötrofillere karşı da göstermektedir (Bilgehan, 2008; Ustaçelebi, 1999).

2.1.3.3. Adezinler ve Kapsül Yapısı

Enterobacteriaceae ailesinde konak hücreye doğrudan toksik etki göstermeden bakterinin virülansına katkı sağlayan faktörler de bulunmaktadır. Bunlardan biri bakterinin hücre yüzeyine tutunmasından sorumlu adezin molekülüdür. Enfeksiyon patogenezinin ilk basamağı bakterinin hücre yüzeyine tutunmasıdır. Ancak bu tutunma rastgele bir tutunma olmayıp bakteri dış yüzeyindeki proteinler ve hücre yüzeyindeki reseptörlerin etkileşimi ile gerçekleşir. *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde bulunan dış membran proteinleri ve fimbria

önemli adezinlerdir. Bazı kökenlerde hücre yüzeyindeki bazı karbonhidratlar da tutunmaya katkı sağlar. Bakterilerde adezinlerin kaybı bakterinin yaşamsal aktivitesini etkilemez ancak virülansını önemli ölçüde azaltır (Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008).

Enterobacteriaceae üyelerinde yaygın olarak tip-I fimbrialar bulunur. Bu fimbriaların uçlarında bulunan “fimH” alt birimleri konak hücre yüzeyinde yer alan glikolipid ve glikoproteinlerin mannoz rezidülerine bağlanır. Bakteriler *fim* operonuyla fimbriaların ekspresyonunu düzenler ve yalnızca gerekli olduğu zaman eksprese olmasını sağlar. Bazı bakterilerde tip-IV fimbrialar da bulunur. Ayrıca farklı reseptörlere bağlanma afinitesi olan başka fimbria türleri de bulunmaktadır (Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008).

Enterobacteriaceae ailesinin bir diğer virülans faktörü de kapsüldür. Genellikle polisakkarit yapıda olan kapsül, bakterinin fagositozdan korunmasına yardımcı olur. Ayrıca bazı enfeksiyonların patogeneğinde de kapsül yapısının rolü vardır. Örneğin, yapılan hayvan deneylerinde K2 serotipi kapsül sentezleyemeyen *E. coli* kökenlerinin üriner sistem enfeksiyonu oluşturmadağı görülmüştür (Willke vd., 2008)

2.1.3.4. Bakteriyosinler

Bazı *Enterobacteriaceae* üyeleri bakteriyosin adı verilen, protein yapıda maddeler sentezlerler. Bu proteinler duyarlı bakterilerin yüzeylerinde bulunan spesifik reseptörlere bağlanarak bakterinin lizisine yol açar. Bakteriyosin üreten kökenler, kendi ürettikleri bakteriyosinlere dirençlidir. Bakteriyosinlerin ilk grubu *E. coli*’den elde edilmiş ve bu nedenle colisin (kolisin) ismi verilmiştir. *Enterobacteriaceae* kökenlerinin tiplendirilmesine ve kökenler arası benzerliklerin araştırılmasında bakteriyosinlerin kullanımı vardır (Ustaçelebi, 1999).

2.1.3.5. Biyofilm

Uzun bir zamandır bakterilerin katı yüzeylere tutunarak kaygan ve yapışkan bir tabaka oluşturduğu bilinmekteydi. Özellikle su tankları gibi ıslak yüzeylerde ve doğada oluşan bu yapı sorun yaratmaktaydı. 1970li yıllarda yapılan çalışmalarda oluşan bu biyofilm yapısının enfeksiyonlardaki rolü ortaya çıkmaya başladı. Biyofilm tabakası özellikle vücut içine yerleştirilen; kateter, sonda gibi tıbbi cihazların üzerinde oluşabilmektedir. Bunun yanında kalp kapaklarında, diş yüzeylerinde ve hatta deri yüzeyinde biyofilm tabakası oluşabilmektedir (Costerton, Stewart, & Greenberg, 1999; Marcinkiewicz, Strus, & Pasich, 2013).

Biyofilm tabakası, tek bir bakteri ya da farklı bakteri türlerinin bir araya gelmesiyle oluşabilmektedir. Bakteriler ürettikleri ekzopolisakkarit yapılar sayesinde canlı ya da cansız

bir yüzeye tutunarak bir matriks oluştururlar ve bu yapı içinde toplu olarak yaşarlar. Biyofilm tabakası bakterilerin zorlu ortam koşullarına uyum sağlaması ve konak canlının immün sisteminden korunmasında etkilidir. Aynı zamanda biyofilm tabakası bakterileri antimikrobiyal ajanların etkisinden de korumaktadır (Costerton vd., 1999; Fleming & Rumbaugh, 2017; Marcinkiewicz vd., 2013).

Biyofilm oluşumu dört aşamada gerçekleşir, bunlar;

- Mikroorganizmanın yüzeye geri dönüşümlü olarak tutunması,
- Salgıladıkları ekzopolisakkaritler ve diğer maddelerle yüzeye geri dönüşümsüz bağlanması,
- Mikroorganizmaların çoğalarak mikrokoloni oluşturması
- Olgun biyofilmin oluşumu sonrasında flagella sentezleyen mikroorganizmaların biyofilmden koparak dış ortama geçişidir (Gupta, Sarkar, Das, Bhattacharjee, & Tribedi, 2016).

2.1.4. *Enterobacteriaceae* Üyelerinin Tanımlanması

Enterobacteriaceae üyelerinin tanımlanmasında; seçici besiyerlerinde üreme, koloni morfolojisi, faj duyarlılıkları gibi özelliklerden faydalanılır. Bu ailenin üyeleri genellikle metabolik olarak çok aktiflerdir ve şekerleri fermente ederler. Gram negatif fakültatif anaerob bakterilerin arasından negatif oksidaz testiyle ayrılırlar. Bu ailenin üyeleri kendi içinde, MacConkey ya da EMB agar gibi besiyerlerinde laktoz fermentasyonu yapıp yapmamasına göre ayrılabilir. Üç şekerli demir besiyerinde (TSI) H₂S üreten ve üretmeyen, ayrıca laktoz/sakkaroz fermente eden ve etmeyen bakteriler birbirinden ayrılır. İndol, metil kırmızısı, voges-proskauer ve sitrat testlerinden oluşan IMVIC test paneli *Enterobacteriaceae* üyelerinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılmaktadır. Christensen'in üre agarında üreaz üreten ve üretmeyen cinsler birbirinden ayrılabilir. Bakterilerin hareket yeteneği de yine ayırıcı bir faktördür. Bütün bu biyokimyasal özelliklerin yanında bakterilerin antijenik yapıları ve nükleik asit yapıları da tanımlamada kullanılabilir. Bakterilerin O antijenleri, hareketli türlerdeki H antijenleri ve gerekirse K antijenleri antijen-antikor reaksiyonlarıyla araştırılabilir. Moleküler yöntemler kullanılarak ise bakterilerin aile, cins, tür, serotip düzeyleri tanımlanabilir. Plazmid profil analizi, DNA dizi analizi gibi yöntemlerden elde edilen veriler standart kökenlerle karşılaştırılarak ileri düzeyde tanımlama yapılabilir (Willke vd., 2008).

2.1.5. Antimikrobiyal Direnç

Bakterilerde direnç; doğal (intrensek) ya da sonradan kazanılmış şekilde görülebilir. *Enterobacteriaceae* ailesinde makrolidler, fusidik asit, penisilin G, streptograminler ve linezolid gibi antimikrobiyal ajanlara karşı doğal direnç vardır. Bakterinin doğal dirençli olduğu antimikrobiyallere karşı duyarlılık testi yapılmamalı, yapıldı ve bakteri bu ilaçlara karşı duyarlı bulundursa bile sonuçlar dikkate alınmamalıdır. Doğal dirençten farklı olarak kazanılmış dirence de bu ailede sıkça rastlanır. Bu bakterilerde antimikrobiyal ajana karşı direnç, kromozom veya plazmidler üzerinde bulunan direnç genleri aracılığıyla oluşur. Direnç genleri bakteriler arasında R plazmidleri ile aktarılabildiği gibi DNA üzerindeki direnç genleri de çeşitli genetik yapılar arasında transpozonlar yardımıyla aktarılabılır. Bu mekanizmalar *Enterobacteriaceae* ailesinde çok yaygın olarak görülür ve bunun sonucunda antimikrobiyal ajanlara karşı oluşan direnç özellikle hastane ortamlarında hızla artmaktadır (Willke vd., 2008). Özellikle son yıllarda sıklıkla rapor edilen karbapenemaz üreten ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten türler tedavi seçeneklerini önemli ölçüde kısıtlamaktadır (Bonomo vd., 2018; Peirano & Pitout, 2019).

2.2. Biyolojik Dezavantaj-Fitness Cost

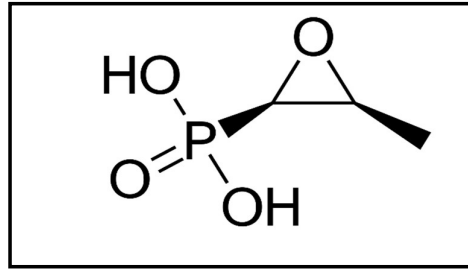
Mikrobiyolojide “fitness” terimi, mikroorganizmanın dış ortam şartlarına uyum sağlayarak büyümek ve çoğalmak için metabolizma faaliyetlerini düzenlemesidir. “Fitness cost” ise mikroorganizmaların zorlu ortam şartlarında hayatta kalabilmek için yaptığı değişiklikler sonucunda metabolik faaliyetlerinin yavaşlaması ve üreme hızının azalması olarak tanımlanabilir (Laurent, 2001). Antimikrobiyal ajanların tedavi amacıyla ya da profilaktik kullanımı sonucunda antibiyotik dirençli kökenlerin oranı gitgide artmaktadır. Antibiyotik direncini yenmenin bir yolu antibiyotik kullanımının azaltılmasıdır. Bu sayede dirençli ve üreme hızları yavaşlamış kökenlerin yerini daha hızlı üreyen ve duyarlı kökenler alacaktır. (Levin vd., 1997; Melnyk, Wong, & Kassen, 2015). Aynı zamanda antibiyotik direnci mikroorganizmaların hücresel faaliyetlerini de etkilemektedir. Stickland ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada, florokinolon direncinin *Pseudomonas*larda hareketliliği azalttığı, Springer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada ise aminoglikozit direncinin bakterilerin ribozom yapısını bozabildiği gösterilmiştir (Springer vd., 2001; Stickland, Davenport, Lilley, Griffin, & Welch, 2010). Bu verilere rağmen antibiyotik tedavisini bırakmanın dirençli kökenleri azalttığına dair bilgiler hala yetersizdir. Bazı çalışmalarda beklendiği gibi duyarlı kökenler dirençli kökenlerin yerini alırken, bazı çalışmalarda ise dirençli kökenlerin

azalmadığı hatta arttığı görülmüştür. Epidemiyolojik çalışmaların sonuçlarına göre antibiyotik tedavisini kesmek genellikle dirençli kökenleri azaltsa da kısa vadede tamamen ortadan kaldırmak için yeterli olmamaktadır (Melnyk vd., 2015).

Mikroorganizmalarda, antibiyotik tedavisinin kesilmesi durumunda bile direncin devam etmesini sağlayan mekanizmalarla ilgili üç hipotez ortaya koyulmuştur. Bunlardan biri direnç geninin bulunduğu gen bölgesiyle başka bir bölgenin eş zamanlı ekspresyonu yoluyla direncin korunmasıdır. Çoklu ilaç dirençli mikroorganizmalarda ve plazmid aracılı dirençte daha çok bu yolak görülür. İkinci olarak direnç mutasyonlarının yaratacağı üreme dezavantajını (fitness cost) ortadan kaldıracak veya dengeleyebilecek başka mutasyonlar görülebilir. Son olarak da biyolojik dezavantajı (fitness cost'u) etkilemeyecek “no-cost” adı verilen mutasyonlar meydana gelebilir (Melnyk vd., 2015).

2.3. Fosfomisin

Fosfomisin, keşfedildiğinde ilk verilen adıyla fosfonomisin, ilk kez İspanya’da 1969 yılında *Streptomyces* kültürlerinden elde edilmiştir. Fosfomisin, fosfonik asit türevi bir antibiyotiktir ve çok düşük molekül ağırlığına sahiptir. Proteinlere neredeyse hiç bağlanmaz. Fosfomisinin etki mekanizması, bugüne kadar bilinen hiçbir antibiyotikle benzerlik göstermez ve bu nedenle çapraz direnç gelişimi görülmez. Molekül formülü $C_3H_7O_4P.C_4H_{11}NO$ şeklindedir ve kimyasal yapısı **Şekil 1**’de gösterilmiştir (Michalopoulos, Livaditis, & Gougoutas, 2011).



Şekil 1. Fosfomisinin Kimyasal Yapısı

Fosfomisin oral yoldan kullanılan iki formülasyona sahiptir. Bunlar; biyoyararlanımı arttırmak için sentezlenen fosfomisin trometamol (trometamin) tuzu ve fosfomisin kalsiyum tuzudur. Ayrıca intravenöz kullanım için fosfomisin disodyum tuzu da bulunur.

2.3.1. Etki Mekanizması

Fosfomisin Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin hücre duvar sentezini bozarak bakterisidal etki gösterir. Bu etkisini fosfoenolpirüvat sentezinin ilk basamağını inhibe ederek gösterir. Bakterilerin hücre duvar yapısı birbirini takip eden ve pentapeptid bağlarıyla bağlanmış N-asetil-glukozamin (NAG) ve N-asetil-muramik asit (NAM) yapılarından oluşmaktadır. Bakterinin hücre duvar sentezi sitoplazmada başlar ve ilk aşamada uridin difosfat N-asetil-glukozamin (UDP-NAG) grubunun 3' ucuna fosfoenolpirüvattan gelen enolpirüvat yapısı bağlanır. Bu reaksiyon UDP-NAG enol pirüvil transferaz (*murA*) enzimi ile katalizlenir. Bu enzim *E. coli* için yaşamsal bir enzimdir ve inaktive olması hücre duvar sentezini engelleyerek bakterinin ölümüne yol açar. Fosfomisin, duyarlı hücrelerin içine iki farklı transport yolağıyla girer. Bunlar; L- α -gliserofosfat transport sistemi (*glpT*) ve heksoz-fosfat alım sistemi (*uhpT*) yolaklarıdır. Hücre içine giren fosfomisin *murA* enzimidaki 115. sistein kalıntısına kovalent olarak bağlanır ve enzimi inaktive ederek etkisini gösterir (Kumar, Parvathi, Hernandez, Cadle, & Varela, 2009; Michalopoulos vd., 2011). Fosfomisinin, *E. coli* enfeksiyonlarında oluşan biyofilm tabakasına geçebildiği ve mikroorganizmalar üzerinde etkinliğini sürdürebildiği gösterilmiştir (Schito, 2003). Ayrıca fosfomisine maruz kalan *E. coli* kökenlerinde adezyon yeteneğinin azaldığı ve oluşan biyolojik dezavantajdan (fitness cost'tan) dolayı bakterilerin üreme hızının da azaldığı Garau ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada gösterilmiştir (Garau, 2008).

2.3.2. Farmakokinetik ve Farmakodinamik Özellikleri

Fosfomisin oral yoldan kullanımda iyi absorbe olur ve vücutta serbest asit haline dönüşür. Fosfomisin trometamol için oral biyoyararlanım yaklaşık %40 iken daha az kullanılan kalsiyum tuzu için bu oran %12 civarındadır. Fosfomisin trometamolün %30-60'ı değişime uğramadan idrar yoluyla atılır. Fosfomisinin %95'i böbreklerde metabolize olur ve sağlıklı kişilerde yarılanma ömrü 4-8 saat arasında değişir. Fosfomisin dokulara ve organlara iyi dağılım gösterir. Serumda, mesane duvarında, böbreklerde tedavi edici konsantrasyonlara ulaşabildiği gösterilmiştir. Menenjit durumunda beyin omurilik sıvısına geçebilse bile duyarlı bakterilere karşı etkinliği düşüktür. Komplike olmayan idrar yolu enfeksiyonlarında tek seferlik 3g dozu yeterliyken menenjit tedavisinde 3 gün, günde 8g dozun yeterli olduğu gösterilmiştir (Michalopoulos vd., 2011).

2.3.3. Antibakteriyel Etki Spektrumu

Fosfomisin eşsiz yapısı ve etki mekanizmasıyla geniş bir antibakteriyel spektruma sahiptir ve genellikle komplike olmayan üriner sistem enfeksiyonlarında kullanılır (Garau, 2008). Fosfomisinin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomisine dirençli ya da duyarlı enterokok (VSE/VRE) gibi Gram pozitif ve *Klebsiella* türleri, *Enterobacter* türleri ve *E. coli* gibi Gram negatif *Enterobacteriaceae* üyelerine karşı etkinliği vardır (Abbott vd., 2020; Falagas & Kopterides, 2007; Patel, Balfour, & Bryson, 1997). Yapılan çalışmalarda fosfomisin; üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde β -laktam grubu antibiyotikler, aminoglikozitler ve diğer bazı antimikrobiyallerle sinerjistik etki göstermiştir (Falagas & Kopterides, 2007; K.S., Pallam, Mandal, Jindal, & S., 2020). Ayrıca fosfomisine doğal dirençli olan *Acinetobacter baumannii* kökenlerinde yapılan *in vitro* çalışmalarda fosfomisinin amikasin gibi bir aminoglikozit türeyle beraber kullanılmasının sinerjistik etki oluşturduğu gösterilmiştir (Leite vd., 2016).

2.3.4. Fosfomisin Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Fosfomisinin hücre içine girişi çoğu *Enterobacteriaceae* üyesinde glukoz-6-fosfat ile indüklenir. Bu nedenle fosfomisinin *in vitro* testlerdeki etkinliğini arttırmak amacıyla ortama glukoz-6-fosfat ilavesi yapılması gerekmektedir (Michalopoulos vd., 2011). Fosfomisin duyarlılığının belirlenmesinde disk difüzyon, agar dilüsyon ve sıvı dilüsyon/mikrodilüsyon, gradient difüzyon yöntemlerinin yanı sıra otomatize sistemler de kullanılabilir. Agar dilüsyon ve sıvı dilüsyon yöntemlerinde ortama 25 μ g/ml konsantrasyonda glukoz-6-fosfat ilavesi yapılması gerekirken, disk difüzyon yönteminde kullanılan 200 μ g fosfomisin içeren disklerin içeriğinde 50 μ g glukoz-6-fosfat bulunmaktadır (Croughs, Konijnendijk-de Regt, & Yusuf, 2022). Bu yöntemlerin içinde ‘The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing’ (EUCAST) tarafından önerilen ve kabul gören yöntem agar dilüsyon yöntemidir (EUCAST, 2023).

2.3.5. Fosfomisin Direnç Mekanizmaları

Bakterilerde fosfomisin direnci oluşumuna yol açan üç ana mekanizma bulunmaktadır. Bunlar bakterinin fosfomisin geçirgenliğinin azalması, antibiyotiğin hedefi olan *murA*’da meydana gelen modifikasyonlar ve bakteri tarafından antibiyotik yapısının bozulmasıdır (Castañeda-García, Blázquez, & Rodríguez-Rojas, 2013).

glpT ve *uhpT* transport sistemlerinde meydana gelen değişimler, bakterinin fosfomisin alımını azaltacağı için bakterinin duyarlılığını azaltır. Aynı zamanda bakteri hücre içindeki cAMP düzeyinin azalması da bu genlerin ekspresyonunu azaltmaktadır. cAMP sentezinden sorumlu *cyaA* ve *ptsI* genlerinin ekspresyonunun azalması da dolaylı yoldan fosfomisin geçirgenliğini ve bakterinin duyarlılığını azaltmaktadır (Castañeda-García vd., 2013).

Bakterilerde antibiyotik hedefinin değiştirilmesiyle duyarlılığın azalması en sık rastlanan antibiyotik direnç mekanizmalarından biridir. Ancak fosfomisin direncinde *murA* enziminde değişiklik sonucu direnç gelişimi nadir olarak görülür. Ancak fosfomisin, etkisini *murA*'ya kovalent bağlanarak ve doz bağımlı olarak gösterdiği için bakteride *murA*'nın normalden fazla eksprese olması duyarlılığı azaltmaktadır (Castañeda-García vd., 2013).

Bakterilerde bir diğer fosfomisin direnç gelişim mekanizması ise antibiyotiğin yapısının bakteri tarafından bozulmasıdır. Bu amaçla bakteriler tarafından *FosA*, *FosB* ve *FosX* proteinleri kullanılır. Her üçü de fosfomisinin yapısındaki oksiran halkasını açarak antibiyotiği etkisiz hale getirir. Ancak her birinin etki mekanizması birbirinden farklıdır. *FosA* enzimi Mn^{+2} bağımlı glutatyon transferaz aktivitesi göstererek fosfomisin yapısında oksiran halkasına glutatyon bağlayarak etkisini gösterir. *FosB* Mg^{+2} bağımlı tiyol transferaz aktivitesiyle oksiran halkasına tiyol bağlarken *FosX* ise Mn^{+2} bağımlı hidrolaz aktivitesi göstererek oksiran halkasına su bağlayarak antibiyotiğin yapısını bozar. Bunlar dışında, fosfomisini fosfatlayarak etki gösteren *FomA* ve *FomB* enzimlerine de çeşitli bakterilerde rastlanmaktadır (Castañeda-García vd., 2013).

3. Gereç ve Yöntem

3.1. Gereç

3.1.1. Bakteri Kökenleri

Bu çalışmada etik kurul izniyle (Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu Onay No: 20-2T/26) E.Ü. Tıp Fakültesi Hastanesi'nde çeşitli servislerden ve klinik örneklerden izole edilen ve farklı hastalardan toplanan, 78 *Escherichia coli* ve 34 *Klebsiella pneumoniae* kökeni olmak üzere toplam 112 köken incelendi. Bakteri kökenlerinin tanımlaması MALDI-TOF (Biotyper-Bruckner) yöntemi ile, antibiyotik duyarlılığı ise VITEK-2 (Bio-Merieux) sistemi ile belirlendi. Kontrol kökeni olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 ve *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 kullanıldı. Bütün bakteri kökenleri çalışmaya başlanana kadar %10'luk gliserinli beyin kalp infüzyon buyyon içerisinde -80°C'de saklandı. Bakteri kökenlerinin izole edildiği servisler ve örnekler aşağıdaki tablolarda verilmiştir (**Tablo 1** ve **Tablo 2**).

Tablo 1. Bakteri Kökenlerinin İzole Edildiği Servisler

Bakteri Kökenlerinin İzole Edildiği Servisler	Sayı	Bakteri Kökenlerinin İzole Edildiği Servisler	Sayı
Acil Servis	25	Göğüs Hastalıkları	2
Alerji Polikliniği	1	Göz Hastalıkları	1
Anestezi	1	İç Hastalıkları	7
Çocuk Hastalıkları	3	İmmünoloji	1
Çocuk Acil Servis	9	İntaniye	6
Çocuk Hematoloji	1	Kadın Doğum	15
Çocuk Kemik İliği Transplantasyon Ünitesi	1	Nefroloji	8
Çocuk Nefroloji	2	Nöroloji	1
Çocuk Onkoloji	1	Onkoloji	2
Çocuk Sağlığı	2	Ortopedi	1
Gastroenteroloji	3	Üroloji	18
Genel Cerrahi	1		

Tablo 2. Bakteri Kökenlerinin İzole Edildiği Örnekler

Bakteri Kökenlerinin İzole Edildiği Örnekler	Sayı
Kateter İdrarı	17
Orta Akım İdrarı	93
Sol Nefrostomi İdrarı	2

3.1.2. Kullanılan Madde ve Malzemeler

a. Besiyerleri

Mueller-Hinton Agar (MHA) (Merck)

Tryptic Soy Agar (TSA) (Oxoid)

Mueller-Hinton Broth (MHB) (Merck)

Mueller-Hinton (II) Broth (Katyon Ayarlı MHB) (BD BLL)

Beyin-Kalp İnfüzyon Broth (Merck)

Tryptic Soy Broth (TSB) (Oxoid)

Luria Bertani Broth (LBB) (Merck)

Besiyerleri ambalajları üzerinde belirtilen miktarda tartılarak distile suda çözüldü ve otoklavda sterilize edildikten sonra steril petri kaplarına döküldü. Kullanılncaya kadar buzdolabında +4°C’de saklandı.

b) Tamponlar ve Çözeltiler

%0,9 NaCl çözeltisi (serum fizyolojik)

Tris-Borik asit-Etilendiamintetraasetikasit çözeltisi (TBE)

%0,1 Kristal Viyole (KV) Çözeltisi

Steril Fosfat Tamponu (Phosphate Buffered Saline, PBS)

c) Diğer Madde ve Malzemeler

Fosfomisin trometamol (Sigma)

Glukoz-6-Fosfat (Roche)

Agaroz (Pronax)

Safeview Classic (ABM)

dNTP Karışımı (Ampliqon)

Taq Polimeraz (Ampliqon)

Taq Buffer (Ampliqon)

MgCl₂ (Ampliqon)

DNA Marker

- Generuler 100bp (Thermo)
- 100bp Opti DNA Marker (ABM)

RNA izolasyon Kiti (GeneJet) (Thermo Scientific)

cDNA Sentez Kiti (Procomcure)

Magic SYBR Mix (Real Time PCR Master Mix) (Procomcure)

Escherichia coli için kullanılan primer dizileri (**Tablo 3**)

Klebsiella pneumoniae için kullanılan primer dizileri (**Tablo 4**)

Tablo 3. *Escherichia coli* için kullanılan primer dizileri

Hedef Gen	Primer Dizisi 5'→3'	PZR Ürünü Boyutu (Baz çifti)	Referans
<i>fosA</i>	ATCTGTGGGTCTGCCTGTCGT (F) ATGCCCGCATAGGGCTTCT (R)	271	(Y. Li vd., 2015)
<i>fosA3</i>	GCGTCAAGCCTGGCATT (F) GCCGTCAGGGTCGAGAAA (R)	282	(Y. Li vd., 2015)
<i>fosC2</i>	TGGAGGCTACTTGGATTG (F) AGGCTACCGCTATGGATT (R)	217	(Y. Li vd., 2015)
<i>glpT</i>	GCGAGTCGCGAGTTTTTCATTG (F) GGCAAATATCCACTGGCACC (R)	1359	(Y. Li vd., 2015)

<i>murA</i>	AAACAGCAGACGGTCTATGG (F) CCATGAGTTTATCGACAGAACG (R)	1260	(Y. Li vd., 2015)
<i>uhpT</i>	TTTTTGAACGCCCAGACACC (F) AGTCAGGGGCTATTTGATGG (R)	1392	(Y. Li vd., 2015)
<i>fimH</i>	GTGCCAATTCCTCTTACCGTT (F) TGGAATAATCGTACCGTTGCG (R)	164	(Hojati, Zamanzad, Hashemzadeh, Molaie, & Gholipour, 2015)
<i>papC</i>	GACGGCTGTACTGCAGGGTGTGGCG (F) ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA (R)	328	(Van Bost, Jacquemin, Oswald, & Mainil, 2003)
<i>usp</i>	ATGCTACTGTTTCCGGGTAGTGTGT (F) CATCATGTAGTCGGGGCGTAACAAT (R)	1000	(Nakano vd., 2001)
<i>recA</i>	CGCATTCGCTTTACCCTGACC (F) TCGTCGAAATCTACGGACCGGA (R)	510	(Zhang, Wang, Li, Hou, & Hao, 2021)

Tablo 4. *Klebsiella pneumoniae* için kullanılan primer dizileri

Hedef Gen	Primer Dizisi 5'→3'	PZR Ürünü Boyutu (Baz çifti)	Referans
<i>glpT</i>	CACCAGGTCTTGCTCAAGGT (F) TATTGCCTACCATCGCGACC (R)	1643	(Liu vd., 2020)
<i>murA</i>	GATGTGATTGCTCGACAGCG (F) TTGCTGGTCTGTGGATTTGC (R)	1512	(Liu vd., 2020)
<i>entB</i>	ATTCCTCAACTTCTGGGGC (F) AGCATCGGTGGCGGTGGTCA (R)	371	(Vargas vd., 2019)
<i>fimH</i>	CACGCAAGGCACCATTC (F) GCTCAGAATCAACATCGGTAAC (R)	903	(Stahlhut vd., 2009)
<i>mrkD</i>	AAGCTATCGCTGTACTTCCGGCA (F) GGCGTTGGCGCTCAGATAGG (R)	339	(Compain vd., 2014)
<i>uge</i>	TCTTCACGCCTTCCTTCACT (F) GATCATCCGGTCTCCCTGTA (R)	534	(Vargas vd., 2019)

wabG	ACCATCGGCCATTTGATAGA (F) CGGACTGGCAGATCCATATC (R)	683	(Vargas vd., 2019)
ycfM	ATCAGCAGTCGGGTCAGC (F) CTTCTCCAGCATTCAGCG (R)	168	(Vargas vd., 2019)
infB	CTCGCTGCTGGACTATATTCG (F) CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC (R)	462	(Diancourt, Passet, Verhoef, Grimont, & Brise, 2005)

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakterilerde Fosfomisin Direncinin Agar Dilüsyon Yöntemiyle Belirlenmesi

Bu çalışmada toplanan 112 *Enterobacteriaceae* izolatının fosfomisin minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri ‘The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing’ (EUCAST) tarafından yayınlanan kılavuzlar dikkate alınarak agar dilüsyon yöntemiyle belirlendi. -80°C’de stoklanan bakteri kökenleri Müller Hinton Agar (MHA) besiyerine ekilerek 37°C’lik inkübatörde 16-18 saat inkübasyon sonucunda canlandırıldı. 3 ml %0,9 NaCl içeren tüplerde 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonları hazırlandı. Fosfomisin, steril bir santrifüj tüpü içerisinde gerekli miktarda steril distile su içinde çözülerek konsantrasyonu 1280 µg/ml olacak şekilde ayarlandı. İkişer katlık dilüsyonlarla 1280-640-320-160-80-40-20-10-5 µg/ml olacak şekilde 9 farklı antibiyotik konsantrasyonu hazırlandı. Aynı bir steril santrifüj tüpü içerisinde glukoz-6-fosfat, gerekli miktarda steril distile su içinde çözülerek konsantrasyonu 500 µg/ml olarak hazırlandı. 55°C’ye ayarlanmış su banyosu içinde, 50 ml hacimli steril santrifüj tüpleri içerisine; otoklavlanmış ve 45-50°C’ye kadar soğutulmuş 17 ml MHA, 2 ml antibiyotik solüsyonu ve 1 ml glukoz-6-fosfat solüsyonu eklendi ve plaklara döküldü. Bu sayede son fosfomisin konsantrasyonları 128-64-32-16-8-4-2-1-0,5 µg/ml ve glukoz-6-fosfat konsantrasyonları 25 µg/ml olan 9 farklı antibiyotik konsantrasyonu içeren

agar plakları hazırlandı. Plaklar üzerinde belirlenen noktalara, 0,5 McFarland bulanıklığındaki bakteri solüsyonları 1/10 dilüe edilerek her bakteri için 2 µl olacak şekilde (yaklaşık 3×10^4 koloni oluşturan birim (kob)) inoküle edildi. 37°C’de 16-18 saat inkübasyon sonucunda üremenin görülmeyişi en düşük konsantrasyon MİK değeri olarak kabul edildi. Elde edilen değerler EUCAST’ın belirlediği sınır değerlerle karşılaştırılarak bakterinin direnç profili, duyarlı (S) ya da dirençli (R) olarak belirlendi (**Tablo 5**).

Tablo 5. Fosfomisin MİK sınır değerleri

Fosfomisin	Duyarlı (S)	Dirençli (R)
<i>E. coli</i> için MİK Sınır Değeri (µg/ml)	≤ 8	> 8
<i>K. pneumoniae</i> için MİK Sınır Değeri (µg/ml)	≤ 32	> 32

3.2.2. Kökenlerin Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi (Antibiyotiplendirme)

Bakteri kökenlerinin antibiyotik direnç paternlerine göre birbirlerine olan benzerlikleri incelendi. Bu amaçla kökenlerin farklı antibiyotik gruplarından seçilen nitrofurantoin, amoksisilin/klavulanik asit, imipenem, gentamisin, siprofloksasin, trimetoprim/sülfametoksazol ve sefoksitin antibiyotiklerine direnç durumu incelendi. Antibiyotik direnç paternleri birbiri ile aynı veya çok yakın olan kökenler aynı grup içinde toplandı (Büyük, Yılmaz, Gül Yurtsever, & Hoşgör Limoncu, 2017; Çiftci vd., 2022). Fosfomisine dirençli izogenik varyant oluşturma çalışmalarında kullanılacak bakterilerin seçimi yapılırken bu aşamada elde edilen verilerden faydalandı.

3.2.3. Kökenlerde Fosfomisin Direnciyle İlgili Bazı Genlerin ve Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması

Önceki aşamalarda fosfomisine dirençli olduğu belirlenen 7 *E. coli* kökeninde, fosfomisinin hedef geni olan *murA*, fosfomisin transportunda rol alan genler olan *glpT* ve *uhpT* ve plazmid üzerinde yer alarak transfer edilebilir özellikteki *fosA*, *fosA3* ve *fosC2* genlerine ve fosfomisine dirençli olduğu belirlenen 8 *K. pneumoniae* kökeninde fosfomisinin hedef geni olan *murA* ve fosfomisin transportunda rol alan genlerden biri olan *glpT* genlerine yönelik spesifik primerler

kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapıldı. Öncelikle kökenlerden DNA izolasyonu yapıldı. Ardından her bir gen uygun koşullar altında, PZR ile çoğaltıldı. Oluşan ürünler jel elektroforez yöntemiyle yürütülerek ultraviyole ışık altında görüntülendi. Oluşan bantların büyüklükleri belirlendi ve kökenlerde ilgili genlerin bulunma durumu değerlendirildi.

3.2.3.1. Genomik DNA İzolasyonu

Kökenlerden DNA ekstraksiyonu için aşağıda belirtilen basamaklar uygulandı.

1. Bakteri kökenleri DNA ekstraksiyon işleminden bir gün önce MHA besiyerine ekildi ve 37°C’de 16-18 saat inkübe edildi.
2. Ependorf tüplerinin içine 400 µl steril ultra saf su ilave edildi.
3. Katı besiyerinde üreyen kültürden alınan 2-3 bakteri kolonisi ependorflardaki ultra saf suyun içinde süspande edildi ve karıştırıldı.
4. Bakteri içeren süspansiyonlar, bakterilerin hücre duvarlarının parçalanması için 95°C’de ısı bloğunda 20 dakika tutuldu.
5. Ardından örnekler 13.000 devir/dakika hızda +4C’de 5 dakika boyunca santrifüjlendi.
6. Santrifüj işleminden sonra, DNA içeren süpernatantlar, dikkatlice yeni ependorf tüplerine aktarıldı. Tüpler çalışılınca kadar -20°C’de stoklandı.

3.2.3.2. Fosfomisine Dirençli *E. coli* Kökenlerinde Direnç ile İlişkili Bazı Genlerin Araştırılması

3.2.3.2.1 *murA*, *uhpT* ve *glpT* Genlerinin Araştırılması

Fosfomisine dirençli olduğu tespit edilen 7 *E. coli* kökeninde, fosfomisinin hedefi olan ve peptidoglikan sentezinden sorumlu *murA* geninin (1260 baz çifti) ve fosfomisinin hücre içine taşınmasından sorumlu gliserol-3-fosfat (*glpT*, 1359 bç) ile heksoz fosfat taşıyıcı (*uhpT*, 1392 bç) genlerinin varlığı araştırıldı. Amplifikasyon için 200 µl'lik PZR tüpleri içinde her gen için toplam 25 µl hacim olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı.

PZR Karışımı	Final Konsantrasyon (Hacim)
PZR Tamponu (10x)	1x (2.5 µl)
dNTP (100 mM)	400µM (1 µl)
F Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
R Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
Hot-Start Taq Polimeraz (5 U/µl)	1U (0.2 µl)
Bakteriyel DNA	2 µl
Steril distile su	18.3 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımları, her PZR tüpüne 23 µl olacak şekilde eklendi. Ardından kökenlere ait 2 µl DNA ekstraktları eklendi. Karışım PZR cihazında 95°C'de 15 dakika ön denatürasyonun sonrasında, 30 döngü olacak şekilde 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 58°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama işleminin ardından son uzama için 72°C'de 10 dakika süreyle bekletildi.

3.2.3.2.2 *fosA*, *fosA3*, *fosC2* Genlerinin Araştırılması

Fosfomisine dirençli olduğu tespit edilen 7 *E. coli* kökeninde, plazmidler üzerinde taşınan ve fosfomisin direncine katkısı olan *fosA* (271 bç), *fosA3* (282 bç) ve *fosC2* (217 bç) genlerinin varlığı araştırıldı. Amplifikasyon için 200 µl'lik PZR tüpleri içinde her gen için toplam 25 µl hacim olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı.

PZR Karışımı	Final Konsantrasyon (Hacim)
PZR Tamponu (10x)	1x (2.5 µl)
dNTP (100 mM)	200µM (0.5 µl)
F Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
R Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
Hot-Start Taq Polimeraz (5 U/µl)	1U (0.2 µl)
Bakteriyel DNA	2 µl
Steril distile su	18.8 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımları, her PZR tüpüne 23 µl olacak şekilde eklendi. Ardından kökenlere ait 2 µl DNA ekstraktları eklendi. Karışım PZR cihazında 95°C'de 15 dakika ön denatürasyonun sonrasında, 30 döngü olacak şekilde 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 55°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama işleminin ardından son uzama için 72°C'de 10 dakika süreyle bekletildi.

3.2.3.3. Fosfomisine Dirençli *E. coli* Kökenlerinde Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması

3.2.3.3.1 *fimH*, *papC* ve *usp* Genlerinin Araştırılması

Fosfomisine dirençli olduğu tespit edilen 7 *E. coli* kökeninde, adezin moleküllerini kodlayan *fimH* (164bç) ve *papC* (328bç) genlerinin ayrıca üropatojenik spesifik proteini kodlayan *usp* (1000 bç) geninin varlığı araştırıldı. Amplifikasyon için 200 µl'lik PZR tüpleri içinde her gen için toplam 25 µl hacim olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı.

PZR Karışımı	Final Konsantrasyon (Hacim)
PZR Tamponu (10x)	1x (2.5 µl)
dNTP (100 mM)	200µM (0.5 µl)
F Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
R Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
Hot-Start Taq Polimeraz (5 U/µl)	1U (0.2 µl)
Bakteriyel DNA	2 µl
Steril distile su	18.8 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımları, her PZR tüpüne 23 µl olacak şekilde eklendi. Ardından kökenlere ait 2 µl DNA ekstraktları eklendi. Karışım PZR cihazında 95°C'de 15 dakika ön denatürasyonun sonrasında, 30 döngü olacak şekilde 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 58°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama işleminin ardından son uzama için 72°C'de 10 dakika süreyle bekletildi.

3.2.3.4. Fosfomisine Dirençli *K. pneumoniae* Kökenlerinde Direnç ile İlişkili Bazı Genlerin Araştırılması

3.2.3.4.1 *murA* ve *glpT* Genlerinin Araştırılması

Fosfomisine dirençli olduğu tespit edilen 8 *K. pneumoniae* kökeninde, fosfomisinin hedefi olan ve peptidoglikan sentezinden sorumlu *murA* geninin (1512 bç) ve fosfomisinin hücre içine taşınmasından sorumlu gliserol-3-fosfat (*glpT*, 1643 bç) geninin varlığı araştırıldı. Amplifikasyon için 200 µl'lik PZR tüpleri içinde her gen için toplam 25 µl hacim olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı.

PZR Karışımı	Final Konsantrasyon (Hacim)
PZR Tamponu (10x)	1x (2.5 µl)
dNTP (100 mM)	400µM (1 µl)
F Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
R Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
Hot-Start Taq Polimeraz (5 U/µl)	1U (0.2 µl)
Bakteriyel DNA	2µl
Steril distile su	18.3 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımları, her PZR tüpüne 23 µl olacak şekilde eklendi. Ardından kökenlere ait 2 µl DNA ekstraktları eklendi. Karışım PZR cihazında 95°C'de 15 dakika ön denatürasyonun sonrasında, 30 döngü olacak şekilde 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 58°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama işleminin ardından son uzama için 72°C'de 10 dakika süreyle bekletildi.

3.2.3.5. Fosfomisine Dirençli *K. pneumoniae* Kökenlerinde Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması

Fosfomisine dirençli olduğu tespit edilen 8 *K. pneumoniae* kökeninde, fagositoza direnç sağlayan ve kapsül yapımıyla ilişkili *uge* (534 bç), *ycfM* (168 bç), *wabG* (683 bç) genleri, adezin moleküllerini kodlayan *mrkD* (339 bç) ve *fimH* (903 bç) genleri ve siderofor moleküllerini kodlayan *entB* (371 bç) geninin varlığı araştırıldı. Amplifikasyon için 200 µl'lik PZR tüpleri içinde her gen için toplam 25 µl hacim olacak şekilde PZR karışımı hazırlandı.

PZR Karışımı	Final Konsantrasyon (Hacim)
PZR Tamponu (10x)	1x (2.5 µl)
dNTP (100 mM)	400µM (1 µl)
F Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
R Primer (100 µM)	2µM (0.5 µl)
Hot-Start Taq Polimeraz (5 U/µl)	1U (0.2 µl)
Bakteriyel DNA	2 µl
Steril distile su	18.3 µl
Toplam	25 µl

Hazırlanan reaksiyon karışımları, her PZR tüpüne 23µl olacak şekilde eklendi. Ardından kökenlere ait 2 µl DNA ekstraktları eklendi. Karışım PZR cihazında 95°C'de 15 dakika ön denatürasyonun sonrasında, 30 döngü olacak şekilde 95°C'de 30 saniye denatürasyon, 56°C'de 30 saniye bağlanma ve 72°C'de 2 dakika uzama işleminin ardından son uzama için 72°C'de 10 dakika süreyle bekletildi.

3.2.3.6. Jel Elektroforezi

PZR ile çoğaltılan DNA örneklerinin görüntülenmesi için 1X TBE içerisinde %1 agaroz içeren jel kullanıldı. Gerekli miktarda tartılan agaroz 1X TBE içerisine ilave edilip ısıtılarak eritildi. Jel katılaşmadan önce içine 10 µl/100 ml oranında Safeview (ABM) ilave edildi. Ardından kuyucukların oluşumunu sağlayan tarak yerleştirilmiş uygun bir tankın içine döküldü ve donmaya bırakıldı. Donarak katılaşan jel elektroforez tankına yerleştirildi. Çoğaltılan DNA örnekleri, 5X DNA yükleme boyasıyla 1/5 oranında karıştırılarak agaroz jel kuyucuklarına yüklendi. Her jel için bir kuyucuğa 6 µl ladder yüklendi. Agaroz jele yüklenen DNA örnekleri 80V gerilim altında 45 dakika boyunca yürütüldü. Ardından, jelde oluşan bantlar UV ışık altında görüntülendi.

3.2.4. Fosfomisine Dirençli İzogenik Varyantların Oluşturulması

Bu aşamada fosfomisine duyarlı olup, yedi antibiyotiğe (F, AMC, IMP, GE, CIP, SXT, FOX) dirençli olan bir köken (4 numaralı) ve bir antibiyotiğe (F) dirençli olan bir köken (24 numaralı) olmak üzere toplam 2 *K. pneumoniae* kökeni seçilmiştir. Aynı şekilde fosfomisine duyarlı olup, 4 antibiyotiğe (AMC, GE, CIP, SXT) dirençli olan bir köken (27 numaralı) ile ATCC 25922 numaralı standart *E. coli* kökeni seçildi. Bakteri süspansiyonları ve besiyerleri agar dilüsyon yöntemi bölümünde belirtildiği şekilde hazırlandı. Her bakteri, fosfomisin MİK/2 değerinden başlayıp 2 kat artan konsantrasyonlarda fosfomisin içeren besiyerlerine eiklerek 37°C’de 48 saat süreyle inkübasyon gerçekleştirildi. Süre sonunda üreme görülen en yüksek konsantrasyonu içeren plaktan alınan bakteriler steril serum fizyolojik içinde 0,5 McFarland değerine ayarlanarak 1/10 dilüe edildikten sonra bu süspansiyondan 2 µl alınarak, takip eden konsantrasyonda antibiyotik içeren plaklara pasajlandı. Pasajlar 48 saat sonunda üreme görülmeyecek kadar yüksek konsantrasyonlara kadar (maksimum 2048 µg/ml) tekrarlandı ve üreme görülen en yüksek konsantrasyondaki bakteriler %10 gliserinli beyin-kalp infüzyon buyyon içinde -80°C’de stoklandı. Fosfomisine dirençli hale gelen bakterilerin köken numaralarının yanına “R” harfi eklenerek isimlendirme yapıldı.

3.2.5. Fosfomisin Dirençli İzogenik Varyantlarda Bazı Virülans Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin RT-qPCR Yöntemiyle Karşılaştırılması

Fosfomisine dirençli izogenik varyantları oluşturulan iki *E. coli* kökeninde; adezin moleküllerini kodlayan *fimh* ve *papC* genlerinin ekspresyon düzeyleri ve fosfomisine dirençli izogenik varyantları oluşturulan iki *K. pneumoniae* kökeninde; fagositoza direnç sağlayan ve

kapsül yapımıyla ilişkili *uge*, *ycfM*, *wabG* genleri, adezin moleküllerini kodlayan *mrkD* geni ve siderofor moleküllerini kodlayan *entB* genlerinin ekspresyon düzeyleri RT-qPCR yöntemiyle karşılaştırıldı. Referans gen olarak *E. coli* için *recA* geni, *K. pneumoniae* için ise *infB* geni kullanıldı.

Bu amaçla öncelikle bakterilerden total RNA izolasyonu yapıldı. Ardından RT-qPCR deneylerinde kullanılmak üzere cDNA sentezi yapıldı. Elde edilen cDNA'lar 96 kuyucuklu RT-qPCR mikrotiplerine her bir kuyucuğa 2 µl olacak şekilde aktarıldı. Reaksiyon karışımından her bir kuyucuğa 18 µl ilave edilip, LightCycler 480 II (Roche) cihazında ısı döngüsü uygulandı. Sonuçlar “threshold cycle” (CT) değerleri dikkate alınarak Delta-Delta CT yöntemi ile belirlendi.

Bütün deneyler üç tekrarlı olarak yapıldı. Sonuçların istatistiksel analizinde GraphPad Prism 8 programında Student's t test yöntemi kullanıldı.

3.2.5.1. Total RNA İzolasyonu

Bakteri süspansiyonları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı.

1. Dirençli izogenik kökenler, belirlenen fosfomisin MİK değerlerinin yarısı kadar fosfomisin ve 25 µg/ml glukoz-6-fosfat içeren MHA besiyerinde 37°C'de 16-18 saat boyunca inkübe edildi. Duyarlı kökenler ise antibiyotik içermeyen MHA besiyerinde aynı şartlarda canlandırıldı.

2. İnkübasyon sonrasında üreyen bakterilerden birkaç koloni alınarak; dirençli kökenler için önceki aşamada kullanılan konsantrasyonlarda fosfomisin ve glukoz-6-fosfat içeren MHB sıvı besiyerinde 0,5 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonu hazırlandı. Duyarlı kökenler için ise antibiyotik içermeyen MHB kullanıldı.

3. Bakteri süspansiyonları 37°C'de 3-4 saat boyunca inkübe edildi.

“Genejet RNA Purification Kit” (Thermo Scientific) kullanılarak bakteri süspansiyonlarından total RNA izolasyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla aşağıda belirtilen basamaklar izlendi;

1. 0,4 mg/ml konsantrasyonda lizozim içeren Tris-EDTA (TE) tampon çözeltisi hazırlandı.
2. Kullanılacak her 1 ml lizis tamponu için 20 µl 14,3 M β-merkaptotanol eklendi.
3. Her bir bakteri süspansiyonundan 1,5 ml alınarak tüplere aktarıldı. 13.000 devir/dakikada 2 dakika boyunca santrifüjlendi. Ardından süpernatant uzaklaştırıldı.

4. Pelletlerin üzerine 100 µl TE tamponu eklendi ve oda sıcaklığında 5 dk. bekletildi
5. Tüplere ikinci aşamada hazırlanan lizis tamponundan 300 µl eklendi ve karışım yaklaşık 20 saniye vortekslendi.
6. Tüplere 180 µl %96lık etanol eklendi.
7. Elde edilen süspansiyonlar, GeneJet RNA saflaştırma kolonlarına aktarıldı. 13.000 devir/dakikada 1 dakika boyunca santrifüjlendi. Toplama tüplerine geçen sıvı uzaklaştırıldı ve RNA içeren kolonlar 2 ml'lik yeni tüplere aktarıldı.
8. Kolonlara 700 µl yıkama tamponu 1 eklendi ve 13.000 devir/dakikada 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüplerine geçen sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar yeniden aynı tüplere yerleştirildi.
9. Kolonlara 600 µl yıkama tamponu 2 eklendi ve 13.000 devir/dakikada 1 dakika boyunca santrifüj edildi. Toplama tüplerine geçen sıvı uzaklaştırıldı ve kolonlar yeniden aynı tüplere yerleştirildi.
10. Kolonlara 250 µl yıkama tamponu 2 eklendi ve 13.000 devir/dakikada 1 dakika boyunca santrifüj edildi ve kolonlar 1,5 ml'lik RNAz içermeyen tüplere aktarıldı.
11. RNAların elüsyonu için, kolon membranlarının orta bölümüne 100 µl nükleaz içermeyen su eklendi. 13.000 devir/dakikada 1 dakika boyunca santrifüjlendi.
12. Son olarak kolonlar uzaklaştırıldı ve elde edilen total RNAlar cDNA sentezinde kullanılıncaya kadar -80°C'de saklandı.

3.2.5.2. cDNA Sentezi

Bir önceki basamakta elde edilen RNA örnekleri kullanılarak “VitaScript™ FirstStrand cDNA Synthesis Kit” (Procomcure, Avusturya) protokolüne göre cDNA sentezi gerçekleştirildi. **Tablo 6**'da belirtildiği şekilde her bir kökenin RNA'sı için cDNA sentez karışımı hazırlandı. Hazırlanan karışımla ısı döngüsü cihazında, üretici firma tarafından belirtildiği şekilde PZR uygulandı ve PZR ürünleri nükleaz içermeyen su ile 200 µl'ye tamamlanarak -80°C'de saklandı (**Tablo 6** ve **Tablo 7**).

Tablo 6. cDNA sentezi reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşen	Miktar
5x Reaksiyon Tamponu	4 µl
Revers Transkriptaz Enzim Karışımı	1 µl
Total RNA	5 µl
Nükleaz İçermeyen Su	10 µl
Toplam	20 µl

Tablo 7. cDNA sentezi için PZR ısı döngüsü

Aşama	Sıcaklık	Süre
cDNA Sentezi	42°C	60 dakika
Enzim İnaktivasyonu	80°C	10 dakika

3.2.5.3. RT-qPCR Yöntemiyle mRNA Ekspresyon Düzeylerinin Belirlenmesi

RT-qPCR çalışmalarında, izogenik varyantlardan elde edilen cDNA'lar ve Tablo 1 ve 2'de yer alan primerler kullanıldı.

Deney protokolü “2X Magic SYBR Mix” (Procomcure) kitinde gösterilen şekilde uygulandı (**Tablo 8**). 96 kuyucuklu RT-qPCR mikrolaklarında her bir kuyucuğa toplamda 20 µl olacak şekilde 2 µl cDNA, 1er µl forward ve reverse primerler, 10 µl master mix ve 6 µl nükleaz içermeyen su eklendi. Negatif kontrol grubu olarak üç kuyucuk içine cDNA içermeyen reaksiyon karışımı eklenerek mikrolaklar yapıştırma filmiyle kapatıldı. Mikrolakalar LightCycler 480 (Roche) cihazına yerleştirilerek aşağıdaki tabloda belirtilen ısı döngü koşulları uygulandı (**Tablo 9**).

Sonuçlar “threshold cycle” (CT) değerleri dikkate alınarak Delta-Delta CT yöntemi ile belirlendi. Delta-Delta CT yöntemine ait formül aşağıda gösterilmiştir.

Delta CT (örnek)= CT (hedef) – CT (referans)

Delta-Delta CT= Delta CT (Dirençli izogenik köken) – Delta CT (Duyarlı İzogenik Köken)

Ekspresyon Kat Değişimi = $2^{-(\text{Delta-Delta CT})}$

Elde edilen değerlere göre ekspresyon düzeylerinde oluşan değişimler incelendi.

Tablo 8. RT-qPCR Reaksiyon Karışımı

Bileşen	Miktar
2x Magic Sybr Mix	10 µl
cDNA	2 µl
Forward Primer (10 µM)	1 µl
Reverse Primer (10 µM)	1 µl
Nükleaz İçermeyen Su	6 µl
Toplam	20 µl

Tablo 9. RT-qPCR ısı döngü koşulları

	Sıcaklık (°C)	Okuma Modu	Süre
Ön İnkübasyon	95	-	5 dakika
Amplifikasyon (40 döngü)	95	-	10 saniye
	58	-	15 saniye
	72	Tek	20 saniye
Son Uzama	72	-	2 dakika
Erime Derecesi Tayini	95	-	10 saniye
	65	-	60 saniye
	97	Sürekli	-
Soğuma	40	-	2 dakika

3.2.6. Fosfomisine Dirençli İzogenik Bakteri Varyantlarının Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Kristal Viyole Yöntemi ile Belirlenmesi ve Karşılaştırılması

Fosfomisine dirençli ve duyarlı izogenik varyantların biyofilm oluşturma kapasiteleri; spektrofotometrik temelli kristal viyole (KV) yöntemi ile belirlendi (Stepanović vd., 2007).

-80°C’de stoklanan bakterilerden; dirençli izogenik kökenler, belirlenen fosfomisin MİK değerlerinin yarısı kadar fosfomisin ve 25 µg/ml glukoz-6-fosfat içeren MHA besiyerinde 16-18 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi. Duyarlı kökenler ise antibiyotik içermeyen MHA besiyerinde aynı şartlarda canlandırıldı. İnkübasyon sonunda, katı besiyerinde üreyen kültürden birkaç koloni alınarak 3 ml steril %0,9 NaCl içeren tüplerde 0,5 McFarland bulanıklıkta bakteri süspansiyonları hazırlandı. 96 kuyucuklu düz tabanlı steril mikropalakalar kullanılarak spektrofotometrik mikropalaka yöntemiyle biyofilm oluşumu incelendi.

Kuyucuklara; 180 µl %2.5 glukozlu TSB (G-TSB) ve 20 µl 0,5 McFarland bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonlarından eklendi. 200 µl G-TSB besiyeri içeren kuyucuklar negatif kontrol olarak kullanıldı. Mikroplakalar 16-18 saat boyunca 37 °C’de inkübe edildi. Bu süre sonunda, kuyucuk yüzeyine tutunamamış bakterileri barındıran besiyeri kuyucuklardan uzaklaştırıldı. Tüm kuyucuklara 200 µl steril fosfat tamponu (phosphate-buffered saline-PBS) eklenerek yıkama işlemi yapıldı ve bu işlem 3 kez tekrarlandı. Yıkama işleminden sonra mikroplakalar filtre kâğıdı üzerine ters çevrilerek 5-10 dakika oda sıcaklığında kurutuldu. Ardından kuyucuklara 150 µl metanol eklendi ve 15 dakika bekletilerek biyofilm yapısının sabitlenmesi sağlandı. Fiksasyon işleminden sonra metanol kuyucuklardan uzaklaştırıldı ve mikroplakalar filtre kâğıdı üzerine ters çevrilerek kurumaya bırakıldı. Her bir kuyucuğa 200 µl %0,1’lik kristal viyole çözeltisi ilave edilerek 15 dakika beklendi. Süre sonunda kuyucukların içerikleri ters çevrilerek boşaltıldı. Kuyucuklarda kalan boyanın fazlasının uzaklaşması amacıyla distile yıkama işlemi yapıldı. Yıkamadan sonra mikroplakalar ters çevrilerek kuruyana kadar oda sıcaklığında bekletildi. Kuruma işlemini takiben her bir kuyucuğa 150 µl etanol (%96) eklenerek 15 dakika beklendi ve biyofilme tutunan kristal viyole boyasının çözünmesi sağlandı. Ardından mikrolaka okuyucuda kuyucuklara ait absorbans değerleri 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüldü. Tüm deneyler ve ölçümler üç tekrarlı olarak yapıldı. Deneylerde G-TSB negatif kontrol grubu, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kökeni ise pozitif kontrol olarak kullanıldı. Optik dansite ± standart sapma değerleri her köken için ayrı ayrı hesaplandı. Duyarlı ve dirençli kökenlere ait biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesi amacı ile her bir grup için hesaplanan OD değerleri ile negatif kontrole ait OD değeri karşılaştırıldı ve tabloda belirtilen şekilde yorumlandı (**Tablo 10**) (Stepanović vd., 2007; Temel & Erac, 2022). Çalışılan kökenler biyofilm oluşturma kapasiteleri açısından; biyofilm üretimi negatif, zayıf, orta veya güçlü biyofilm üreticisi olarak sınıflandırıldı. Sonuçların istatistiksel analizinde GraphPad Prism 8 programında Student’s t test yöntemi kullanıldı. $p<0.05$ olarak hesaplanan veriler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Tablo 10. Kökenlerin biyofilm oluşturma kapasitelerine göre sınıflandırılması

OD ≤ Negatif Kontrol (NK)	Biyofilm Üretimi Yok (-)
NK < OD ≤ 2xNK	Zayıf Biyofilm Üretimi (+)
2xNK < OD < 4xNK	Orta Biyofilm Üretimi (++)
4xNK ≤ OD	Güçlü Biyofilm Üretimi (+++)

3.2.7. Fosfomisine Dirençli İzogenik Bakteri Varyantlarının Üreme Hızlarının Karşılaştırılması

Fosfomisine dirençli ve duyarlı izogenik varyantların üreme hızları spektrofotometrik yöntemle ve koloni sayımı yöntemi ile belirlendi. Bu amaçla bir gece boyunca inkübe edilerek antibiyotik içeren MHA besiyerinde canlandırılan dirençli kökenler ve antibiyotiksiz MHA besiyerinde canlandırılan duyarlı kökenlerden birkaç koloni alınarak steril serum fizyolojik içinde 0,5 McFarland bulanıklığında bakteri süspansiyonu hazırlandı (Yaklaşık $1,5 \times 10^8$ koloni oluşturan ünite/ml). Bu süspansiyonlardan 5'er µl alınarak 5ml Luria Bertani (LB) Broth besiyeri içeren tüplere eklendi. İyice vortekslenen tüpler 37°C'de 200rpm devirdeki çalkalamalı etüvde 10 saat boyunca inkübe edildi. Bakterilerin besiyerine eklendiği an 0. saat kabul edildi ve 0.-2.-4.-6.-8. ve 10. saatlerde tüplerin içinden 100 µl örnek alınarak 96 kuyucuklu mikropalakalara 3 tekrarlı olacak şekilde eklendi. Spektrofotometrede 600nm dalga boyunda ölçüm yapıldı ve absorbans değerleri kaydedildi. Bu sonuçlara göre bakterilerin üreme hızları arasındaki olası farklılık değerlendirildi.

3.2.8. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen veriler GraphPad Prism programında istatistiksel olarak analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile kontrol edildi. Normal dağılan verilerin analizi Student's t-test yöntemiyle gerçekleştirildi. Tüm testlerde $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$ olarak ifade edildi.

4. Bulgular

4.1. Fosfomisin MİK Değerleri

Çalışmaya dahil edilen 78 *Escherichia coli* ve 34 *Klebsiella pneumoniae* kökeni olmak üzere toplam 112 izolatın fosfomisin MİK değerleri EUCAST'ın önerisi doğrultusunda agar dilüsyon yöntemi ile belirlendi. EUCAST kılavuzlarında belirlenen sınır değerleri dikkate alınarak, *E. coli* kökenleri için MİK değeri ≤ 8 µg/ml olan kökenler fosfomisine duyarlı, >8 µg/ml olan kökenler fosfomisine dirençli, *K. pneumoniae* kökenleri için MİK değeri ≤ 32 µg/ml olan kökenler fosfomisine duyarlı, >32 µg/ml olan kökenler ise fosfomisine dirençli kabul edildi. Buna göre çalışmaya alınan 78 *E. coli* kökeninin 13 tanesinin (26-41-42-48-56-59-60-79-81-87-91-106-111 nolu kökenler) fosfomisine dirençli olduğu (%16,66), 34 *K. pneumoniae* kökeninin ise 8 tanesinin (5-6-8-11-17-66-77-112 nolu kökenler) fosfomisine dirençli olduğu (%23,5) belirlendi. Bakterilerin MİK değer dağılımları aşağıdaki tabloda gösterilmiştir (**Tablo 11**).

Tablo 11. Kökenlerin Fosfomisin MİK Değerleri

	Fosfomisin Agar Dilüsyon Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerleri (µg/ml)								
	<0.5	1	2	4	8	16	32	64	128
<i>Escherichia coli</i> (n=78)	40	19	2	2	2	4	2	6	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=34)	8	1	3	6	3	2	3	0	8

4.2. Kökenlerin Antibiyotik Direnç Profilleri (Antibiyotiplendirme)

Bakteri kökenlerinin nitrofurantoin, amoksisilin/klavulanik asit, imipenem, gentamisin, siprofloksasin, trimetoprim/sülfametoksazol ve sefoksitin antibiyotiklerine direnç paternleri belirlendi. Farklı antibiyotik direnç profiline sahip gruplara ayrı kodlar verildi. Buna göre *E. coli* kökenlerinde 19 farklı, *K. pneumoniae* kökenleri arasında ise 16 farklı antibiyotik direnç paterni (antibiyotip) olduğu saptandı (**Tablo 12** ve **Tablo 13**). Fosfomisine dirençli bulunan 13 *E. coli* kökeninden; üçünün A1, birinin A4, birinin A5, birinin A9, üçünün A10, birinin A13, ikisinin A14 ve birinin A18 antibiyotipinden olduğu saptandı. Fosfomisine dirençli bulunan 8 *K. pneumoniae* kökeninin; B1, B2, B6, B9, B11, B12, B14 ve B16 antibiyotiplerinin her birinde birer köken olacak şekilde dağılım gösterdiği görüldü.

Fosfomisine dirençli izogenik varyant oluşturma çalışmalarında *E. coli* kökenleri arasından A14 grubundan 27 nolu köken ve ATCC 25922 nolu standart köken seçilirken, *K. pneumoniae*'lar arasından ise B2 grubundan 24 nolu ve B16 grubundan 4 nolu köken seçildi.

Tablo 12. *Escherichia coli* kökenlerinin antibiyotik direnç profillerine göre gruplandırılması (Antibiyotipler)

Tip	Dirençli Bulunan Antibiyotik Sayısı	Köken Sayısı	Dirençli Bulunan Antibiyotikler	Fosfomisine Dirençli Köken Sayısı
A1	0	28	-	3
A2	1	7	AMC	-
A3	1	1	GE	-
A4	1	3	SXT	1
A5	2	3	AMC, SXT	1
A6	2	2	AMC, CIP	-
A7	2	1	AMC, FOX	-
A8	2	1	GE, SXT	-
A9	2	4	CIP, SXT	1
A10	3	3	AMC, GE, CIP	3
A11	3	1	AMC, GE, SXT	-
A12	3	2	AMC, CIP, FOX	-
A13	3	6	AMC, CIP, SXT	1
A14	4	7	AMC, GE, CIP, SXT	2
A15	4	1	GE, CIP, SXT, FOX	-
A16	4	2	AMC, CIP, SXT, FOX	-
A17	4	4	AMC, GE, CIP, SXT, FOX	-
A18	5	1	AMC, IMP, CIP, SXT, FOX	1
A19	7	1	F, AMC, IMP, GE, CIP, SXT, FOX	-

F: Nitrofurantoin, AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit, IMP: İmipenem, GE: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol, FOX. Sefoksitin

Tablo 13. *Klebsiella pneumoniae* kökenlerinin antibiyotik direnç profillerine göre gruplandırılması (Antibiyotikler)

Tip	Dirençli Bulunan Antibiyotik Sayısı	Köken Sayısı	Dirençli Bulunan Antibiyotikler	Fosfomisine Dirençli Köken Sayısı
B1	0	9	-	1
B2	1	2	F	1
B3	1	4	AMC	-
B4	1	1	SXT	-
B5	2	1	F, AMC	-
B6	2	1	F, CIP	1
B7	2	1	AMC, GE	-
B8	2	1	AMC, SXT	-
B9	2	2	AMC, FOX	1
B10	3	1	F, AMC, SXT	-
B11	3	1	AMC, SXT, FOX	1
B12	4	1	F, AMC, GE, SXT	1
B13	4	1	F, AMC, CIP, SXT	-
B14	5	1	F, AMC, IMP, CIP, FOX	1
B15	6	1	F, AMC, IMP, CIP, SXT, FOX	-
B16	7	6	F, AMC, IMP, GE, CIP, SXT, FOX	1

F: Nitrofurantoin, AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit, IMP: İmipenem, GE: Gentamisin, CIP: Siprofloksasin, SXT: Trimetoprim/Sülfametoksazol, FOX: Sefoksitin

4.3. Kökenlerde Fosfomisin Direnci ile İlişkili Bazı Genlerin ve Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması

4.3.1. Fosfomisine Dirençli *E. coli* Kökenlerinde Direnç ile İlişkili Bazı Genlerin Araştırılması

Fosfomisine dirençli olduğu tespit edilen 7 *E. coli* kökeninde, fosfomisinin hedefi olan ve peptidoglikan sentezinden sorumlu *murA* geninin (1260 bç) ve fosfomisinin hücre içine taşınmasından sorumlu gliserol-3-fosfat (*glpT*, 1359 bç) ile heksoz fosfat taşıyıcı (*uhpT*, 1392 bç) genlerinin varlığı ve ayrıca plazmidler üzerinde taşınan ve fosfomisin direncine katkısı olan *fosA* (271 bç), *fosA3* (282 bç) ve *fosC2* (217 bç) genlerinin varlığı araştırıldı

murA geni 26 ve 48 nolu kökenlerde, *uhpT* geni 26-41-42-48-59 nolu kökenlerde, *glpT* geni ise 26-42-48-56 nolu kökenlerde tespit edildi. *fosA*, *fosA3* ve *fosC2* genlerine ise hiçbir kökende rastlanmadı (Tablo 14).

Tablo 14. *E. coli* Kökenlerinde *murA*, *uhpT*, *glpT*, *fosA*, *fosA3* ve *fosC2* genlerinin varlığı

Köken No/Gen	<i>murA</i>	<i>uhpT</i>	<i>glpT</i>	<i>fosA</i>	<i>fosA3</i>	<i>fosC2</i>
26	+	+	+	-	-	-
41	-	+	-	-	-	-
42	-	+	+	-	-	-
48	+	+	+	-	-	-
56	-	-	-	-	-	-
59	-	+	+	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-

4.3.2. Fosfomisine Dirençli *K. pneumoniae* Kökenlerinde Direnç ile İlişkili Bazı Genlerin Araştırılması

Fosfomisine dirençli olduğu tespit edilen 8 *K. pneumoniae* kökeninde, fosfomisinin hedefi olan ve peptidoglikan sentezinden sorumlu *murA* geninin (1512 bç) ve fosfomisinin hücre içine taşınmasından sorumlu gliserol-3-fosfat (*glpT*, 1643 bç) genlerinin varlığı araştırıldı. İncelenen bütün kökenlerde iki gen de tespit edildi (Tablo 15).

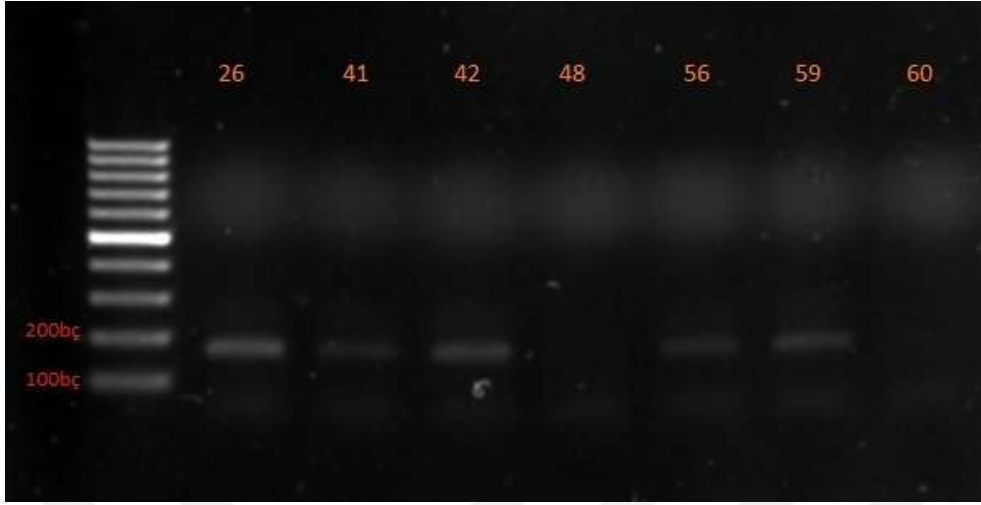
Tablo 15. *K. pneumoniae* kökenlerinde *murA* ve *glpT* genlerinin varlığı

Köken No/Gen	<i>murA</i>	<i>glpT</i>
5	+	+
6	+	+
8	+	+
11	+	+
17	+	+
66	+	+
77	+	+
112	+	+

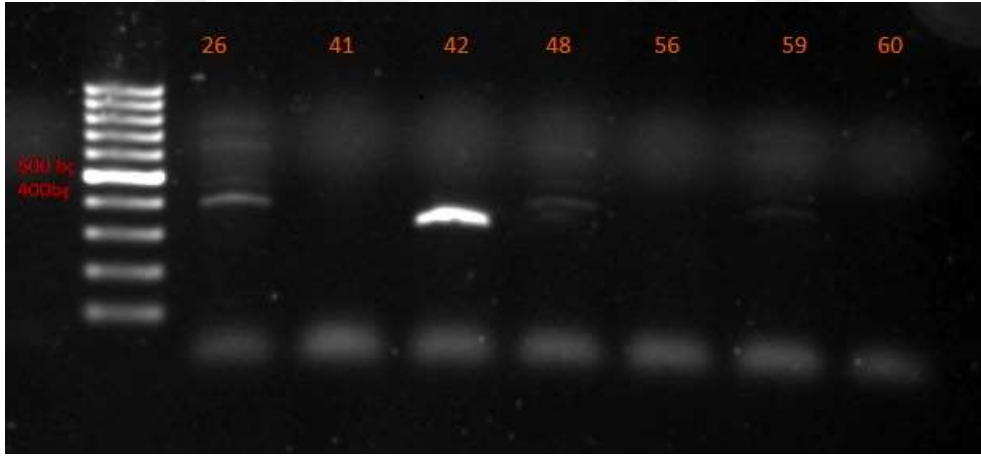
4.3.3. Fosfomisine Dirençli *E. coli* Kökenlerinde Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması

Fosfomisine dirençli olduğu tespit edilen 7 *E. coli* kökeninde, adezin moleküllerini kodlayan *fimh* (164 bç) ve *papC* (328 bç) genlerinin ayrıca üropatojenik spesifik proteini kodlayan *usp* (1000 bç) genlerinin varlığı araştırıldı.

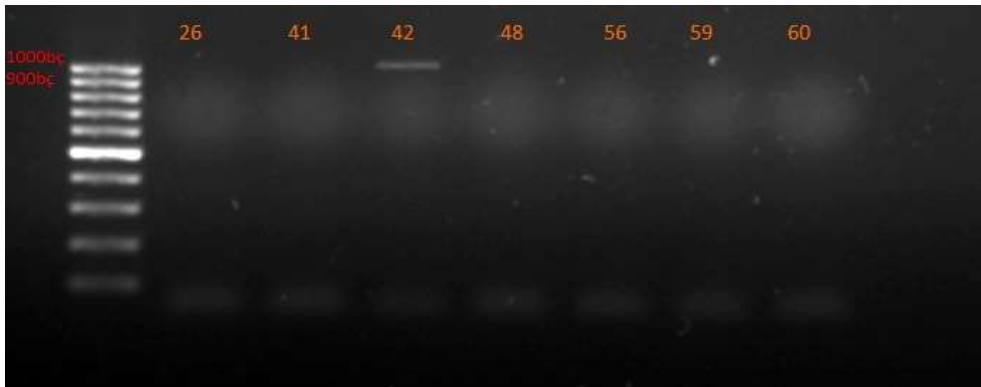
fimh geni 26-41-42-56-59 nolu kökenlerde, *papC* ve *usp* geni 42 nolu kökende tespit edildi (Şekil 2, Şekil 3, Şekil 4, Tablo 16).



Şekil 2. *E. coli* kökenlerinde *fimH* geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü



Şekil 3. *E. coli* kökenlerinde *papC* geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü



Şekil 4. *E. coli* kökenlerinde *usp* geni PZR ürünlerinin jel görüntüsü

Tablo 16. *E. coli* kökenlerinde *fimH*, *papC* ve *usp* genlerinin varlığı

Köken No/Gen	<i>fimH</i>	<i>papC</i>	<i>usp</i>
26	+	-	-
41	+	-	-
42	+	+	+
48	-	-	-
56	+	-	-
59	+	-	-
60	-	-	-

4.3.4. Fosfomisine Dirençli *K. pneumoniae* Kökenlerinde Bazı Virülans Genlerinin Araştırılması

Fosfomisine dirençli olduğu tespit edilen 8 *K. pneumoniae* kökeninde, fagositoza direnç sağlayan ve kapsül yapımıyla ilişkili *uge* (534 bç), *ycfM* (168 bç), *wabG* (683 bç) genleri, adezin moleküllerini kodlayan *mrkD* (339 bç) ve *fimH* (903 bç) genleri ve siderofor moleküllerini kodlayan *entB* (371 bç) genlerinin varlığı araştırıldı.

uge geni 8-11-17-66-77-112 nolu kökenlerde, *ycfM* geni bütün kökenlerde, *wabG* geni 6-8-11-17-66-77-112 nolu kökenlerde, *mrkD* ve *entB* genleri bütün kökenlerde tespit edilirken *fimH* genine hiçbir kökende rastlanmadı (Tablo 17).

Tablo 17. *K. pneumoniae* kökenlerinde *uge*, *ycfM*, *wabG*, *mrkD*, *entB*, *fimH* genlerinin varlığı

Köken No/Gen	<i>uge</i>	<i>ycfM</i>	<i>wabG</i>	<i>mrkD</i>	<i>entB</i>	<i>fimH</i>
5	-	+	-	+	+	-
6	-	+	+	+	+	-
8	+	+	+	+	+	-
11	+	+	+	+	+	-
17	+	+	+	+	+	-
66	+	+	+	+	+	-
77	+	+	+	+	+	-
112	+	+	+	+	+	-

4.4. Oluşturulan İzogenik Varyantların Fosfomisin MİK Değerleri

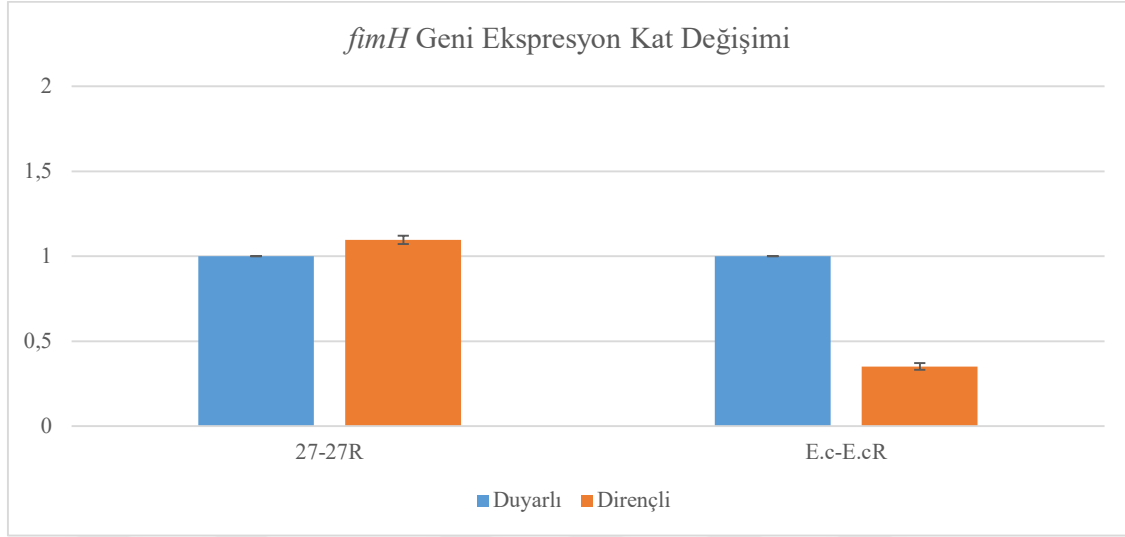
Fosfomisine duyarlı ve diğer antibiyotikler için farklı antibiyotik direnç paternlerine sahip 2 *K. pneumoniae* kökeni (4 ve 24 numaralı kökenler) ve 2 *E. coli* kökeninin (27 numaralı köken ve ATCC 25922 standart kökeni) fosfomisin dirençli izogenik varyantları oluşturuldu. Bakteri süspansiyonları ve besiyerleri agar dilüsyon yöntemi bölümünde belirtildiği şekilde hazırlandı. Her bakteri, fosfomisin MİK/2 değerinden başlayıp 2 kat artan konsantrasyonlarda fosfomisin içeren besiyerlerine ekildi ve 48 saat boyunca 37°C’de inkübe edildi. 48 saat inkübasyon sonucunda üreme görülen en yüksek konsantrasyonu içeren plaktan alınan bakteriler steril serum fizyolojik içinde 0,5 McFarland değerine ayarlanarak 1/10 dilüe edildikten sonra bu süspansiyondan 2 µl alınarak, takip eden konsantrasyonda antibiyotik içeren plaklara pasajlandı. Pasajlar 48 saat sonunda daha yüksek konsantrasyonlara kadar (maksimum 2048 µg/ml) tekrarlandı. 4 ve 24 nolu *K. pneumoniae* dirençli izogenik varyantlar için MİK değerleri

4 µg/ml'den **>2048 µg/ml'ye**, 27 nolu *E. coli* kökeni için <0,5 µg/ml'den **1024 µg/ml'ye**, *E. coli* ATCC 25922 standart kökeni için ise <0,5 µg/ml'den **512 µg/ml'ye** yükseltildi.

4.5. Fosfomisin Dirençli İzogenik Varyantlarda Bazı Virülans Genlerinin Ekspresyon Düzeylerinin RT-qPCR Yöntemiyle Karşılaştırılması

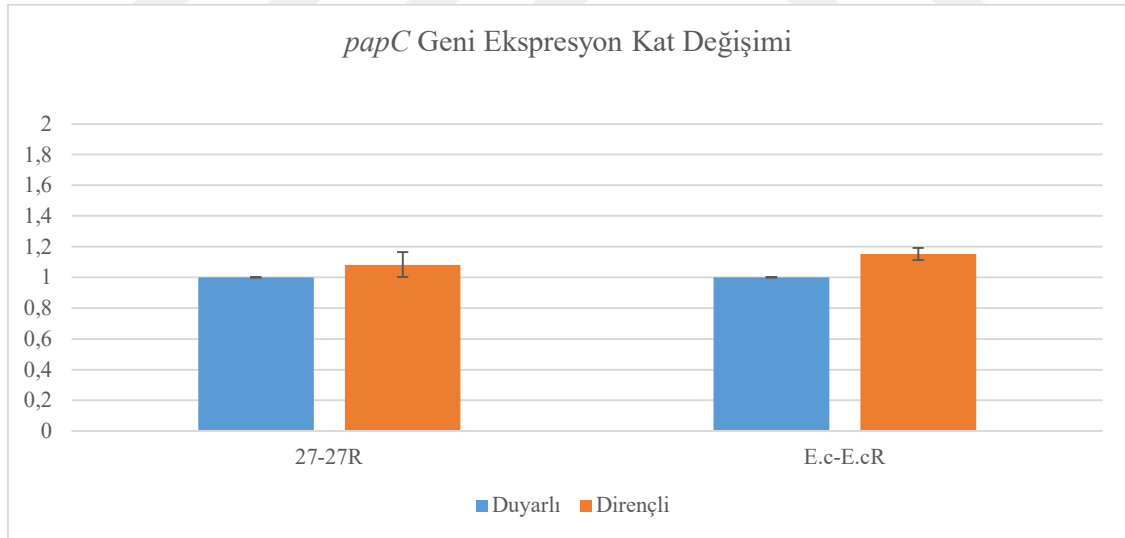
Çalışmamızda fosfomisine duyarlı 4 ve 24 nolu *K. pneumoniae* kökenleri ve bunların dirençli hale getirilmiş izogenik varyantları (4R ve 24R nolu) ile 27 nolu *E. coli* kökeni ve ATCC 25922 standart *E. coli* kökeni ve bunların dirençli hale getirilmiş izogenik varyantlarında (27R ve EcR) bazı virülans genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim araştırıldı. Bu amaçla *E. coli* kökenlerinde dirençli ve duyarlı varyantlar arasındaki *fimH* ve *papC* genlerinin ekspresyon düzeyi araştırıldı. Referans gen olarak ise *recA* geni kullanıldı. *K. pneumoniae*'de *entB*, *mrkD*, *uge*, *wabg* ve *ycfM* genlerinin ekspresyon düzeyleri araştırıldı. Referans gen olarak *infB* geni kullanıldı. RT-qPCR çalışmalarına başlamadan önce tüm bakterilerde, kullanılacak bütün genlerin varlığı konvansiyonel PZR yöntemi ile doğrulandı. Hesaplamalar Delta-Delta CT yöntemiyle yapıldı. Dirençli varyantlarda meydana gelen **en az iki katlık ekspresyon değişimi** anlamlı kabul edildi.

E.coli varyantlarında *fimH* geninin ekspresyon düzeyinin 27R nolu kökende 27 nolu kökene göre değişim göstermediği, E.c.R kökeninde ise E.c kökenine göre **anlamlı derecede azalma** olduğu gözlemlendi (**Şekil 5**).



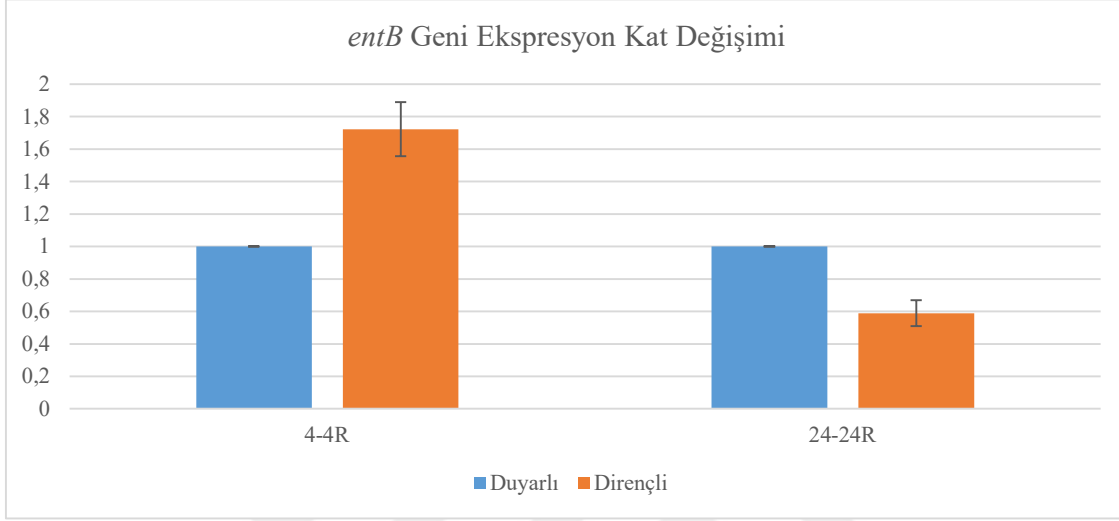
Şekil 5. İzogenik *E. coli* varyantlarında *fimH* geni ekspresyon değişim düzeyleri

E. coli varyantlarında *papC* geninin ekspresyon düzeyinde dirençli ve duyarlı kökenler arasında anlamlı bir fark saptanmadı (**Şekil 6**).



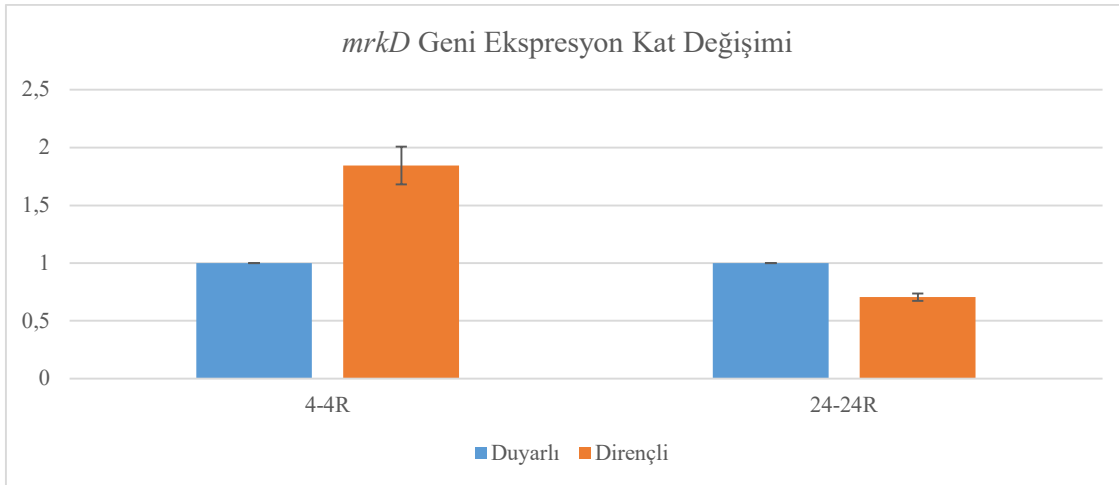
Şekil 6. İzogenik *E. coli* varyantlarında *papC* geni ekspresyon değişim düzeyleri

K. pneumoniae varyantlarında *entB* geninin ekspresyon düzeyinde dirençli ve duyarlı kökenler arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 7).



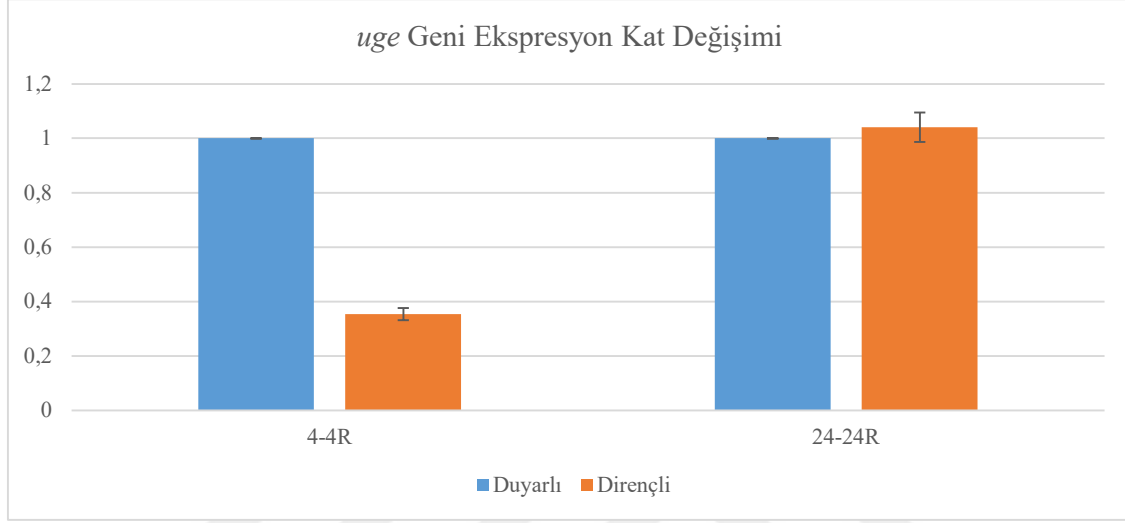
Şekil 7. İzogenik *K. pneumoniae* varyantlarında *entB* geni ekspresyon değişim düzeyleri

K. pneumoniae varyantlarında *mrkD* geninin ekspresyon düzeyinde dirençli ve duyarlı kökenler arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Şekil 8).



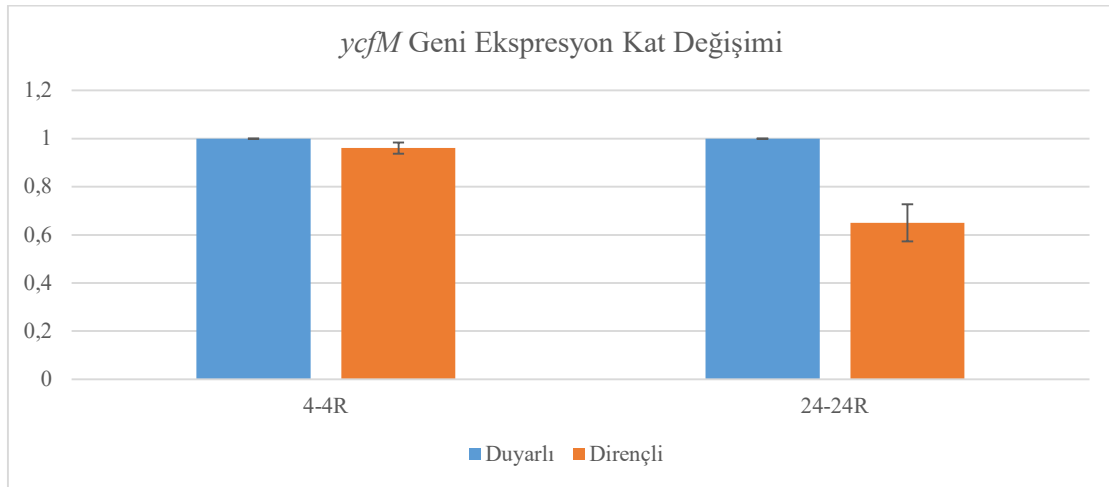
Şekil 8. İzogenik *K. pneumoniae* varyantlarında *mrkD* geni ekspresyon değişim düzeyleri

K. pneumoniae varyantlarında *uge* geninin ekspresyon düzeyinde 4R nolu kökende 4 nolu kökene göre **anlamli derecede azalma** olduğu, 24R nolu kökende ise 24 nolu kökene göre ekspresyon düzeyinde anlamli bir fark olmadığı görüldü (**Şekil 9**).



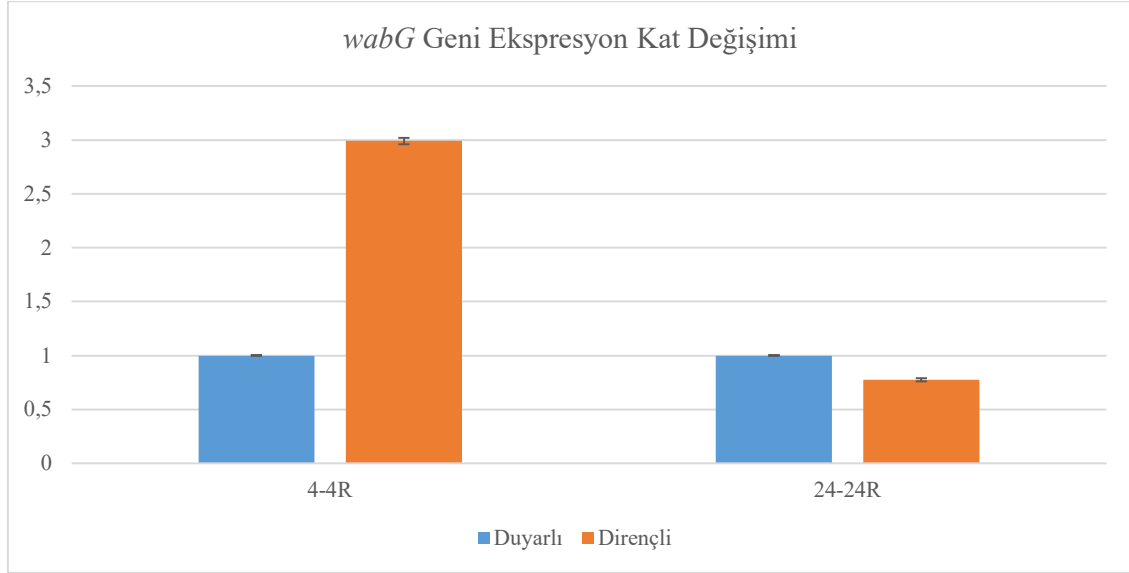
Şekil 9. İzogenik *K. pneumoniae* varyantlarında *uge* geni ekspresyon değişim düzeyleri

K. pneumoniae varyantlarında *ycfM* geninin ekspresyon düzeyinde dirençli ve duyarlı kökenler arasında anlamli bir fark saptanmadı (**Şekil 10**).



Şekil 10. İzogenik *K. pneumoniae* varyantlarında *ycfM* geni ekspresyon değişim düzeyleri

K. pneumoniae varyantlarında *wabG* geninin ekspresyon düzeyinde 4R nolu kökende 4 nolu kökene göre **anlamli derecede artış** olduğu, 24R nolu kökende ise 24 nolu kökene göre ekspresyon düzeyinde değişim olmadığı saptandı (**Şekil 11**).



Şekil 11. İzogenik *K. pneumoniae* varyantlarında *wabG* geni ekspresyon değişim düzeyleri

E. coli varyantlarında incelen virölans genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim aşağıdaki tabloda özet halinde verilmiştir (**Tablo 18**).

Tablo 18. İzogenik *E. coli* varyantlarında ekspresyon düzeylerindeki değişim

Köken No/Gen	<i>fimH</i>	<i>papC</i>
27-27R	↔	↔
E.c-E.cR	↓	↔

↑: Dirençli kökende duyarlı kökene göre ekspresyon düzeyinde anlamli artma. ↓: Dirençli kökende duyarlı kökene göre ekspresyon düzeyinde anlamli azalma. ↔: Dirençli ve duyarlı kökenler arasında ekspresyon düzeyinde anlamli fark yok.

K. pneumoniae varyantlarında incelenen virölans genlerinin ekspresyon düzeylerindeki değişim aşağıdaki tabloda özet halinde verilmiştir (**Tablo 19**).

Tablo 19. İzogenik *K. pneumoniae* varyantlarında ekspresyon düzeylerindeki değişim

<i>Köken No/Gen</i>	<i>entB</i>	<i>mrkD</i>	<i>uge</i>	<i>ycfM</i>	<i>wabg</i>
4-4R	↔	↔	↓	↔	↑
24-24R	↔	↔	↔	↔	↔

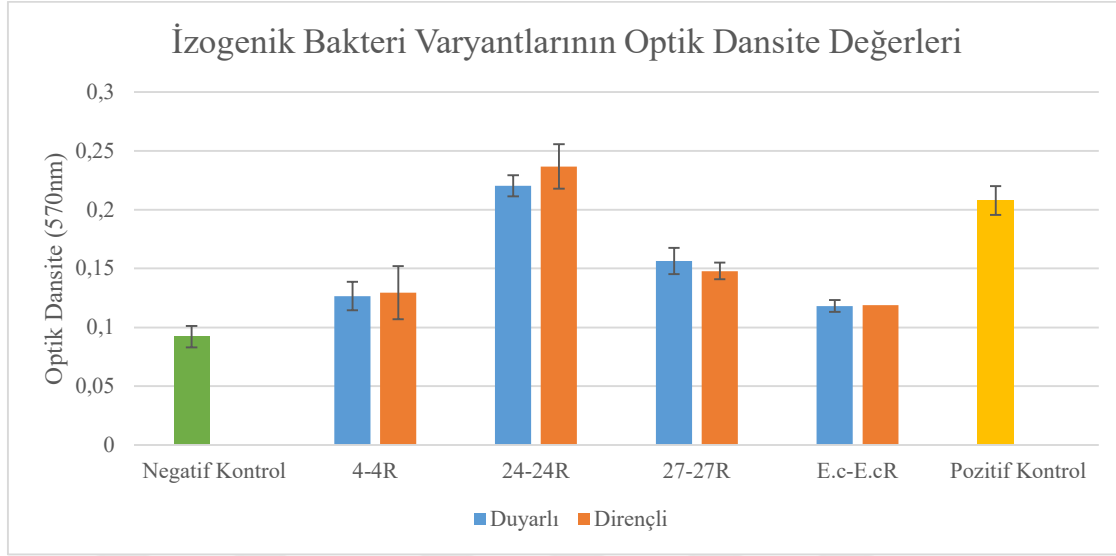
↑: Dirençli kökende duyarlı kökene göre ekspresyon düzeyinde anlamlı artma. ↓: Dirençli kökende duyarlı kökene göre ekspresyon düzeyinde anlamlı azalma. ↔: Dirençli ve duyarlı kökenler arasında ekspresyon düzeyinde anlamlı fark yok.

4.6. Fosfomisin Dirençli İzogenik Varyantların Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Karşılaştırılması

Fosfomisin dirençli/duyarlı 4 *E. coli* ve 4 *K. pneuminae* varyantının biyofilm oluşturma kapasiteleri spektrofotometrik mikropilaka yöntemi (kristal viyole yöntemi) ile incelenerek karşılaştırıldı. Kökenlerin 570 nm’de ölçülen optik dansite (OD) değerleri negatif kontrolün (NK) OD değeriyle karşılaştırılarak, biyofilm üretim seviyeleri belirlendi (Bkz. Gereç ve Yöntem). Negatif kontrol olarak bakteri ekilmemiş G-TSB içeren kuyucuklar, pozitif kontrol olarak ise *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 kökeni kullanıldı. Çalışma sonucunda 4-4R nolu *K. pneumoniae*, 27-27R ve Ec-EcR kodlu *E. coli* varyantlarının zayıf düzeyde biyofilm ürettiği, 24-24R numaralı *K. pneumoniae* varyantlarının ise orta düzeyde biyofilm ürettiği tespit edildi (**Tablo 20**). Dirençli ve duyarlı varyantların biyofilm oluşturma kapasitelerinin karşılaştırılması sonucunda hiçbir izogenik varyant çiftinin biyofilm oluşturma kapasitesinde anlamlı bir değişim gözlenmedi (**Şekil 12**).

Tablo 20. İzogenik Bakteri Varyantlarının ve Optik Dansite Değerleri ve Biyofilm Oluşturma Kapasiteleri

Köken No	Optik Dansite (570nm)	Biyofilm Oluşturma Kapasiteleri
4 (<i>K. pneumoniae</i>)	0,12650	Zayıf
4R (<i>K. pneumoniae</i>)	0,12952	Zayıf
24 (<i>K. pneumoniae</i>)	0,22028	Orta
24R (<i>K. pneumoniae</i>)	0,23679	Orta
27 (<i>E. coli</i>)	0,156400	Zayıf
27R (<i>E. coli</i>)	0,147846	Zayıf
Ec (<i>E. coli</i>)	0,118113	Zayıf
EcR (<i>E. coli</i>)	0,118894	Zayıf
Negatif Kontrol	0,091976	-
Pozitif Kontrol	0,207738	-

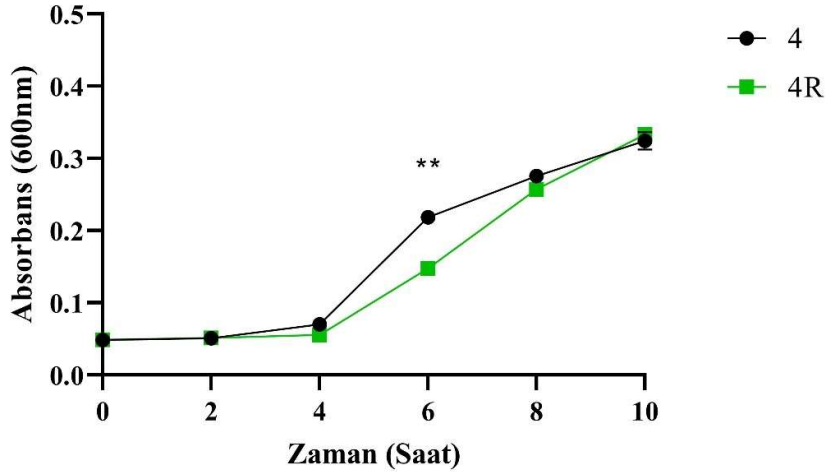


Şekil 12. İzogenik Bakteri Varyantlarının 570nm’de Ölçülen Optik Dansite Değerleri

4.7. İzogenik Bakteri Varyantlarının Üreme Hızlarının Karşılaştırılması

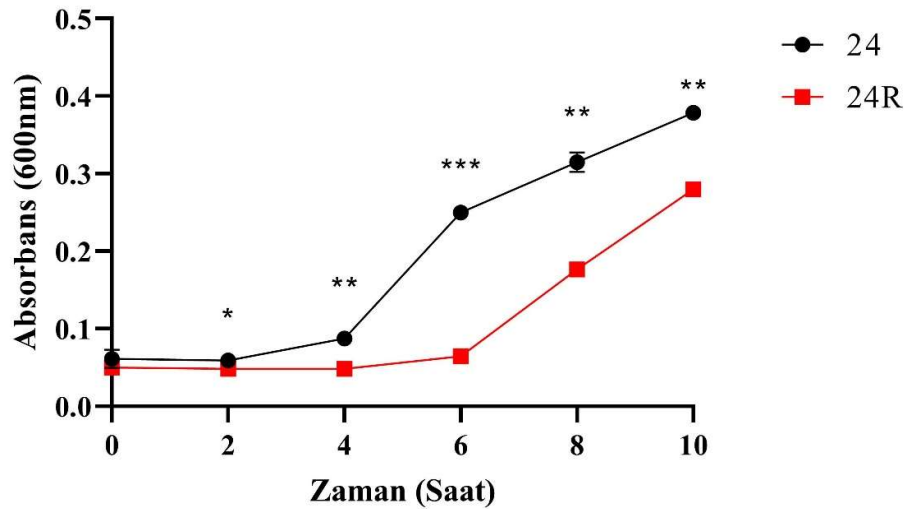
Fosfomisin dirençli/duyarlı 4 *E. coli* ve 4 *K. pneumoniae* varyantının üreme hızları spektrofotometrik yöntem ile incelendi. LB broth besiyeri içinde 37°C’de 200rpm çalkalamalı etüvde inkübe edilen bakterilerden 0, 2, 4, 6, 8 ve 10. saatlerde 100 µl örnek alındı ve bu örnekler steril 96 kuyucuklu şeffaf mikropalakalara eklendi. Spektrofotometrede 600nm dalga boyunda ölçümler alındı. Örnek alınan her saat için dirençli ve duyarlı bakterilerin OD değerleri GraphPad Prism 8 programında Student’s t test ile karşılaştırıldı. $p < 0.05$ olan sonuçlar anlamlı kabul edildi. İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$ olarak ifade edildi.

4 numaralı *K. pneumoniae* kökeninin duyarlı varyantının sadece 6. saatte dirençli varyantına göre daha yüksek absorbans değeri gösterdiği, diğer saatlerde ise kökenlerin absorbans değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü (Şekil 13).



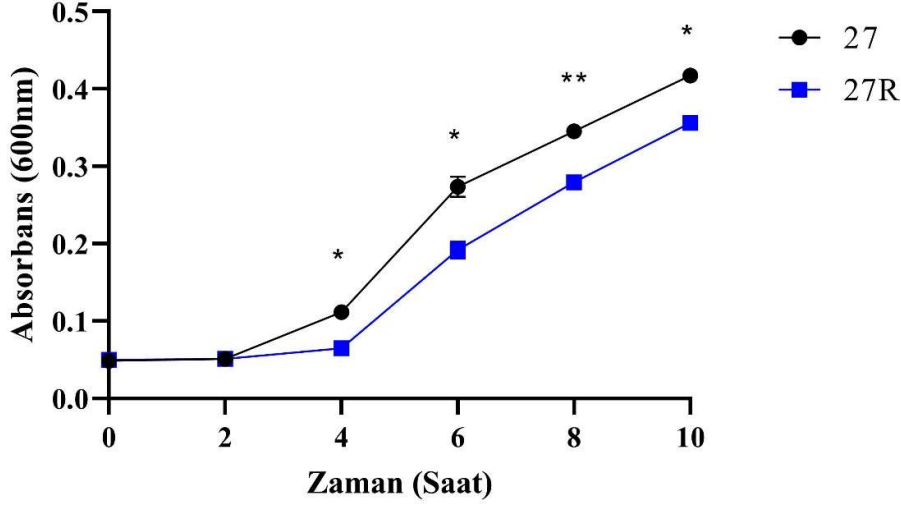
Şekil 13. 4 ve 4R numaralı kökenlerin zamana göre değişen absorbans değerleri

24 numaralı *K. pneumoniae* kökeninin duyarlı varyantının 2, 4, 6, 8, ve 10. saatte dirençli varyantına göre daha yüksek absorbans değeri gösterdiği görüldü (Şekil 14).



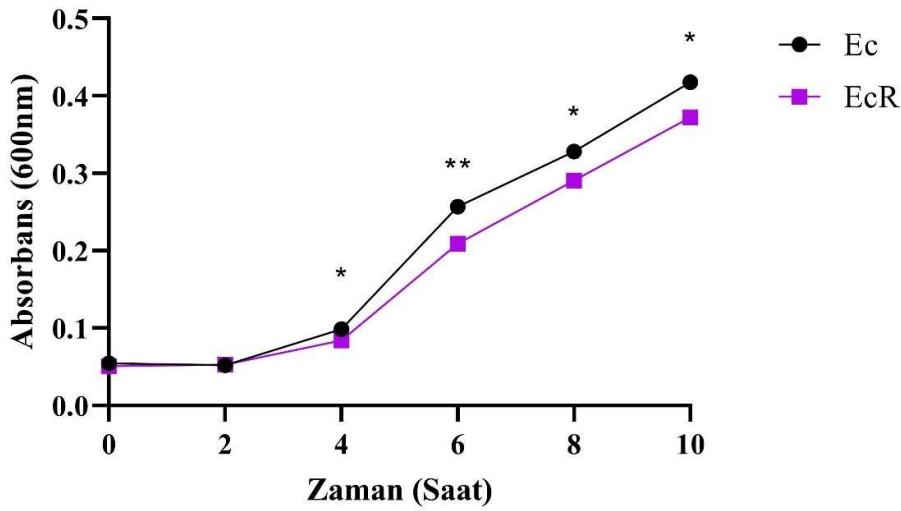
Şekil 14. 24 ve 24R numaralı kökenlerin zamana göre değişen absorbans değerleri

27 numaralı *E.coli* kökeninin duyarlı varyantının 4, 6, 8, ve 10. saatte dirençli varyantına göre daha yüksek absorbans değeri gösterdiği, ancak 2. saatte kökenlerin absorbans değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü (Şekil 15).



Şekil 15. 27 ve 27R numaralı kökenlerin zamana göre değişen absorbans değerleri

E.c kodlu *E. coli* kökeninin duyarlı varyantının 4, 6, 8, ve 10. saatte dirençli varyantına göre daha yüksek absorbans değeri gösterdiği, ancak 2. saatte kökenlerin absorbans değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmadığı görüldü (Şekil 16).



Şekil 16. E.c ve E.cR kodlu kökenlerin zamana göre değişen absorbans değerleri

Tartışma

Antibiyotiklerin tedavide bilinçsiz ve uygunsuz kullanımı ve hayvancılıkta antibiyotiklerin kullanımının artması antibiyotiklere dirençli bakterilerin artmasına yol açmaktadır. Yeni antibiyotiklerin keşfinin uzun sürmesi ve yüksek maliyetli olması nedeniyle antibiyotiklere dirençli bakterilerin tedavisinde kullanılabilecek seçenekler gün geçtikçe azalmaktadır (Ventola, 2015). Bu durum kolistin ve fosfomisin gibi eski antibiyotiklere olan ilgiyi arttırmaktadır (Theuretzbacher vd., 2015). Fosfomisin 1969 yılında İspanya’da *Streptomyces* kültürlerinden elde edilmiştir. Etki mekanizması olarak günümüzde kullanılan hiçbir antibiyotiğe benzerlik göstermediği için çapraz direnç gelişimi görülmemektedir. Fosfomisin, keşfinden bu yana ağırlıklı olarak komplike olmayan idrar yolları enfeksiyonlarında kullanılmış olup diğer enfeksiyonlarda kullanımı sınırlı kalmıştır (Garau, 2008; Michalopoulos vd., 2011). Ancak tedavide kullanılabilecek antibiyotik sayısının azalması ve ESBL üreten bakterilere karşı da etkili olması nedeniyle fosfomisinin idrar yolları enfeksiyonlarının dışında solunum yolları enfeksiyonları, merkezi sinir sistemi enfeksiyonları, endokardit ve osteomiyelit gibi enfeksiyonlarda da kullanımı gündeme gelmektedir ve bu durumun fosfomisine karşı direnç gelişimini hızlandıracağı öngörülmektedir (Roussos, Karageorgopoulos, Samonis, & Falagas, 2009; Zhanel, Zhanel, & Karlowisky, 2018). Fosfomisin, bakterilerin hücre duvar sentezinden sorumlu *murA* enzimini inaktive ederek ve bu sayede peptidoglikan sentezini engelleyerek etki gösterir. Fosfomisinin hücre içine girişinden *glpT* ve *uhpT* yolakları sorumludur. Bakterilerde fosfomisin direncinin gelişmesinde *murA* enziminin yapısının değişmesi veya yüksek miktarda salgılanması ya da *glpT* ve *uhpT* yolaklarında meydana gelen yapısal değişiklikler önemli rol oynamaktadır (Castañeda-García vd., 2013; Michalopoulos vd., 2011).

Çalışmamızda 78 *E. coli* ve 34 *K. pneumoniae* kökeninin fosfomisin MİK değerleri EUCAST önerileri doğrultusunda agar dilüsyon yöntemiyle belirlendi. (EUCAST, 2023). Buna göre *E. coli* kökenlerinde direnç oranı %16,66 (13/78) olarak *K. pneumoniae* kökenlerinde ise bu oran %23,5 (8/34) olarak saptandı. Ülkemizde 2021 yılında yayınlanan Soydan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 89’u *E. coli* 31’i *K. pneumoniae* olan 120 bakteride agar dilüsyon yöntemiyle fosfomisin direnci araştırılmıştır. Çalışmanın gerçekleştirildiği zamandaki EUCAST standartlarına göre (>32 µg/ml dirençli) *E. coli*’de direnç oranının %4,9 (4/89), *K. pneumoniae*’de ise %22,6 (7/31) olduğu gösterilmiştir (Soydan, Görgülü, & Öztürk, 2021). Öcal ve arkadaşlarının 2022 yılında yayınlanan bir çalışmalarında incelenen 175 *E. coli*

kökeninde agar dilüsyon yöntemiyle sadece 6 kökende fosfomisin direnci saptanmış olup (>32 µg/ml dirençli) direnç oranı %3 olarak bildirilmiştir (Öcal vd., 2022). Çalışmamızda *K. pneumoniae* izolatlarında %20 bandında saptanan fosfomisin direnç oranları, ülkemizde bu konudaki araştırma verileri ile benzerlik göstermektedir. *E. coli* izolatlarında yaklaşık %17 olarak saptadığımız fosfomisin direnci, daha önceki çalışmalardaki değerlerden yüksek olarak görülmektedir. Ancak bu farklılık EUCAST'ın güncel versiyonundaki duyarlılık sınırının *E. coli* için 32 µg/ml'den 8 µg/ml'ye düşürülmesinden kaynaklanmaktadır. Ülkemizde olduğu gibi dünyada da bu konuda yapılmış birçok çalışma bulunmaktadır ancak bu çalışmaların bir kısmında standart yöntem olan agar dilüsyon yöntemi kullanılmamış, bazılarında ise fosfomisin direnci Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından belirtilen değerlere uygun olarak belirlenmiştir (Bi vd., 2017; Lu vd., 2016; Ohkoshi vd., 2017; Tseng vd., 2015). Fosfomisin Gram negatif bakterilere olduğu kadar Gram pozitif bakterilere karşı da yüksek etkinlik göstermektedir. 2009 yılında yayınlanan bir meta analiz çalışmasında metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* kökenlerinde kümülatif fosfomisin direnç oranı %13,3 (652/4892) bulunmuştur. Penisilinlere dirençli pnömokoklar için bu oran %12,8 (28/219) bulunurken vankomisin dirençli enterokoklarda %69,7 gibi yüksek bir direnç oranına rastlanmıştır (421/604) (Falagas, Roussos, Gkegkes, Rafailidis, & Karageorgopoulos, 2009).

Çalışmamızda *E.coli* kökenlerinde 19 farklı, *K.pneumoniae* kökenleri arasında ise 16 farklı antibiyotik direnç paterni (antibiyotip) olduğu saptandı. Fosfomisine dirençli bulunan 13 *E. coli* ve 8 *K. pneumoniae* kökeninin sekizer farklı antibiyotip altında toplandığı görüldü. Fosfomisine dirençli olan *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenlerinin belirli bir antibiyotipe sahip olmadığı, diğer antibiyotiklere olan dirençten bağımsız bir dağılım gösterdiği saptandı. Bu veri fosfomisinin kendine özgü olan etki ve direnç mekanizması ile de uyum göstermekteydi.

Gram negatif bakterilerde fosfomisin direncine nispeten az rastlanması tedavide fosfomisinin kullanımının umut verici olabileceğini göstermektedir. Ancak bilindiği gibi antibiyotiklerin kullanımının artması antibiyotik direncinin artması ve yayılmasında önemli etkenlerden biridir. Bakterilerde antibiyotik direncinin oluşması “fitness cost” adı verilen bakterilerin metabolik aktivitelerini yavaşlatan ya da bozan değişikliklere yol açmaktadır. Oluşan bu biyolojik dezavantaj (fitness cost) bakterilerin üreme hızının yanında bakterinin virülansını da azaltmaktadır (Laurent, 2001; Nilsson, Berg, Aspevall, Kahlmeter, & Andersson, 2003). Antibiyotik direncini yenmenin bir yolu antibiyotik kullanımının azaltılmasıdır. Bu sayede dirençli ve üreme hızları yavaşlamış kökenlerin yerini daha hızlı üreyen ve duyarlı kökenler alacaktır. (Levin vd., 1997; Melnyk vd., 2015; Rajer & Sandegren, 2022). Yapılan *in vivo* ve

in vitro çalışmalarda, ortamda antibiyotik varlığının hem *in vivo* hem de *in vitro* ortamda bakteride oluşturduğu biyolojik dezavantaj sonucunda üreme hızını azalttığı gösterilmiştir. Üreme hızındaki bu azalmanın da klinik vakalarda fosfomisin direncine daha az rastlanmasına sebep olduğu düşünülmektedir (Björkman & Andersson, 2000; Nilsson vd., 2003). Ancak bu biyolojik dezavantaj bakteride her zaman üreme hızında azalmaya ya da bakterinin virülansının azalmasına yol açmayabilir. Örneğin Melnyk ve arkadaşlarının 2014 yılında yayınlanan bir çalışmasında fusidik asit direncinin incelenen bakterilerde biyolojik dezavantaj oluşturmayan “no cost” mutasyonlar sonucu ortaya çıktığı gösterilmiştir (Melnyk vd., 2015).

Çalışmamızda fosfomisine dirençli *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenlerinde fosfomisin direnciyle ilişkili olan bazı genler PZR yöntemiyle araştırılmıştır. Buna göre *E. coli* kökenlerinin bazılarında *murA*, *glpT* ve *uhpT* genlerinin bir veya birkaçının çoğaltılamadığı görülmüştür. Bu durumun bu genlerin yapılarında meydana gelen değişiklikler sonucu ortaya çıktığı ve bakterilerin bu mutasyonlar sonucu fosfomisin direnci kazanmış olabileceği düşünülmüştür. *glpT* ve *uhpT* genlerinin düşük düzeyde eksprese olmasının fosfomisin duyarlılığını *E. coli* ve *S. aureus* kökenlerinde azalttığı yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Hirakawa vd., 2023; Takahata vd., 2010; Xu vd., 2017). *murA* geninde meydana gelen mutasyonların da fosfomisin duyarlılığını azalttığı bilinmektedir (Falagas, Athanasaki, Voulgaris, Triarides, & Vardakas, 2019). Bakterilerde bir diğer fosfomisin direnç oluşum mekanizması ise antibiyotiğin yapısının bakteriyel enzimlerce bozulmasıdır. Bu amaçla bakteriler tarafından FosA, FosB, FosC ve FosX proteinleri kullanılır. Bu proteinler fosfomisinin yapısındaki oksiran halkasını açarak antibiyotiği etkisiz hale getirir. Çalışmamızda *fosA*, *fosA3* ve *fosC2* genlerinin varlığı fosfomisine dirençli *E. coli* kökenlerinde araştırılmış ancak hiçbir kökende bu genlere rastlanmamıştır. Meksika’da yapılan bir çalışmada incelenen 38 fosfomisine dirençli *E. coli* kökeninin 23 (%60,5) tanesinde *fos* genlerine rastlanmıştır (Galindo-Méndez vd., 2022). Çin’de yapılan başka bir çalışmada fosfomisine dirençli 24 *E. coli* kökeninin 20 tanesinde (%83,3) *fosA3* genine rastlanırken, hiçbirinde *fosA*, *fosB*, *fosB2*, *fosC*, *fosC2* ve *fosX* genlerine rastlanmamıştır (Bi vd., 2017). İsviçre’de yapılan bir diğer çalışmada ise 17 fosfomisine dirençli *E. coli* kökeninin 4 tanesinde (%23,5) en sık rastlanan *fos* geni olan *fosA3* geni ve 1 tanesinde *fosA4* genine rastlanmıştır (Mueller, Cimen, Poirel, Descombes, & Nordmann, 2019). Sonuçların arasında yüksek oranda farklılıkların olması plazmid aracılı direnç genlerinin dağılımının çalışmaların yapıldığı bölgelere göre farklı olduğunu göstermektedir. Çalışmamız kapsamında plazmit aracılı

fosfomisin direnç genlerinin araştırıldığı köken sayısının (7) düşük olmasının da bu genlerin saptanamamasının bir nedeni olabileceği düşünülmüştür.

K. pneumoniae'de fosfomisin direnci daha çok *murA* enzimindeki mutasyonlar, *glpT* ve *uhpT* genlerindeki modifikasyonlar ve *fosA* genleri aracılığıyla görülmektedir (Huang vd., 2021; Liu vd., 2020). Çalışmamızdaki fosfomisine dirençli *K. pneumoniae* kökenlerinde *murA* ve *glpT* genleri çoğaltılmış olup bu genlerde herhangi bir değişim olmadığı ve bakterilerdeki fosfomisin direncinin başka bir yolak(lar) üzerinden gerçekleştiği öngörülmüştür.

Enterobacteriaceae üyelerinde bulunan dış membran proteinleri ve fimbria konak hücreye tutunmayı sağlayan önemli adezinlerdir. Bazı kökenlerde hücre yüzeyindeki karbohidratlar da tutunmaya katkı sağlar. Bakterilerde adezinlerin kaybı bakterinin yaşamsal aktivitesini etkilemez ancak virülansını önemli ölçüde azaltır (Ustaçelebi, 1999; Willke vd., 2008). *Enterobacteriaceae* üyelerinde yaygın olarak tip-I fimbrialar bulunur. Bu fimbriaların uçlarında bulunan "fimH" alt birimleri konak hücre yüzeyinde yer alan glikolipid ve glikoproteinlerin mannoz rezidülerine bağlanır. Bakteriler *fim* operonuyla fimbriaların ekspresyonunu düzenler ve yalnızca gerekli olduğu zaman eksprese olmasını sağlar. Çalışmamızda fosfomisine dirençli 7 *E. coli* kökeninin 5 tanesinde (%71,4) bu gene rastlanmıştır. 2018 yılında İran'da yapılan bir çalışmada incelenen 60 üropatojenik *E. coli* kökeninin 53 tanesinde (%89) *fimH* geni saptanmıştır (Raeispour & Ranjbar, 2018). *fimH* geni diğer ülkelerde yapılan pek çok çalışmada incelenen üropatojenik *E. coli* örneklerinde %68 ile %100 arasında değişen oranlarla en sık rastlanan virülans geni olmuştur (Garofalo vd., 2007; Hojati, Molaie, & Gholipour, 2015; Rijavec, Müller-Premru, Zakotnik, & Žgur-Bertok, 2008; Tarchouna, Ferjani, Ben-Selma, & Boukadida, 2013; Watts vd., 2010).

Üropatojenik spesifik protein (*usp*) *E. coli* kökenlerinde bulunan ve memelilerde prostatit, piyelonefrit ve bakteriyemiye sebep olan bir genotoksindir. Karsinojenik etkisini DNA'da hasar oluşturarak gösterir (Nipič, Podlesek, Budič, Rnigoj, & Žgur-Bertok, 2013; Yamamoto vd., 2001). Çalışmamızda incelenen fosfomisine dirençli 7 *E. coli* kökeninin sadece 1 tanesinde *usp* geni saptanmıştır. Slovenya'da yapılan bir çalışmada idrar yolları enfeksiyonu kaynaklı bakteriyemili hastalardan izole edilen 105 *E. coli* kökeni incelenmiş ve bu kökenlerin %34'ünde *usp* geni saptanmıştır (Rijavec vd., 2008). Finlandiya'da 508'i idrar yolları enfeksiyonu kaynaklı olan toplam 924 *E. coli* kökeni ile yapılan bir çalışmada kökenlerin %63,7'sinde *usp* geni tespit edilmiştir. En yüksek *usp* pozitiflik oranı piyelonefrit hastalarından izole edilmiş olan 153 kökende görülmüştür ve bu kökenlerin 126 tanesinde (%82,4) *usp* geni

saptanmıştır. En düşük *usp* pozitiflik oranı ise idrar yolları enfeksiyonu kaynaklı olmayan ve dışkıdan izole edilmiş kökenlerde görülmüştür. 184 kökenin sadece 95 tanesinde (%57,9) *usp* genine rastlanmıştır (Bauer vd., 2002). Japonya’da yapılan bir çalışmada da benzer oranlara rastlanmıştır. Kurazono ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada kontrol amacıyla kullanılan ve sağlıklı gönüllülerin dışkılarından izole edilmiş 50 *E. coli* kökeninin %24’ünde, sistit hastalarından izole edilmiş 195 *E. coli* kökeninin %80’inde, piyelonefrit hastalarından izole edilmiş 76 *E. coli* kökeninin ise %93’ünde *usp* genine rastlanmıştır (Kurazono vd., 2000). Li ve arkadaşlarının Çin’de yaptığı bir çalışmada idrar yolları enfeksiyonu kaynaklı *E. coli* kökenlerinde idrar yolları enfeksiyonu kaynaklı olmayan kökenlere göre *usp* genine anlamlı bir şekilde daha fazla rastlandığı bildirilmiştir. Ayrıca çalışmada *usp* geni ile antibiyotik direnci arasındaki ilişki de incelenmiş ve *usp* geni taşıyan bakterilerde levofloksasin direncinin anlamlı bir şekilde arttığı gösterilmiştir (G. Li vd., 2022).

Piyelonefrit ilişkili pili (pyelonephritis-associated, pap) *E. coli* kökenlerinde bulunan ve “p fimbria” ismiyle de bilinen bir adezindir. Üropatojenik *E. coli* kökenlerinde virülansa önemli ölçüde katkı sağlar (Lane & Mobley, 2007). P fimbria *pap* operonu tarafından eksprese edilir. P fimbria farklı görevlere sahip 11 adet proteinden meydana gelmektedir. papG proteini en uç kısmını oluşturur ve tutunmadan asıl sorumlu olan yapıdır. papC proteini bakterinin dış membranında yer alırken, papI ve papB proteinleri ise ekspresyonun düzenlenmesinden sorumludur (Lillington, Geibel, & Waksman, 2014; Waksman & Hultgren, 2009). Harwalkar ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada siprofloksasin duyarlı 96 üropatojenik *E. coli* kökeninin 70 tanesinde (%72,9) *papC* genine rastlanırken, siprofloksasin dirençli 97 üropatojenik *E. coli* kökeninin 39 tanesinde (%40,2) bu gen tespit edilmiştir (Harwalkar, Gupta, Rao, & Srinivasa, 2014). Kinolon dirençli *E. coli* kökenlerinde p fimbria bulunma oranının daha düşük olduğuna dair başka çalışmalar da bulunmaktadır (Johnson, Moseley, Roberts, & Stamm, 1988). Bu veriler dirençli bakterilerde oluşan biyolojik dezavantaj nedeniyle bakterinin p fimbria sentezi yerine enerjisini ve kaynaklarını başka metabolik aktivitelerde kullandığını göstermektedir. Çalışmamızda incelediğimiz fosfomisine dirençli 7 *E. coli* kökeninin sadece 1 tanesinde (%14,3) bu gen tespit edilmiştir. Oranın düşük olmasının hem fosfomisin direncinin bakteriye getirdiği biyolojik dezavantajdan hem de çalışılan bakteri sayısının düşük olmasından kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

K. pneumoniae kökenlerinde kapsül ve polisakkarit üretimi *uge*, *wabG*, *ycfM* ve diğer bazı genler tarafından düzenlenir. Bu genlerin eksikliği bakteride kapsül yapısının oluşamamasına ve bakterinin virülansının önemli ölçüde azalmasına sebep olur (Hasani vd., 2020; Regué vd.,

2004). Bakterinin hücreye tutunmasını sağlayan adezyon moleküllerinden ise *fimH* ve *ycfM* genlerinin de içinde bulunduğu bazı genler sorumludur (Abduljabbar, Aljanaby, Hassan, & Alhasani, 2016). Bakterilerin yaşamsal faaliyetleri için gerekli olan demir, bakterilerde bulunan siderofolar yardımıyla hücre içine alınır. Ortamdaki serbest demir bakteri tarafından alınabileceği gibi konak organizmadaki demir de ele geçirilebilir. *entB* tarafından kodlanan enterobaktin *K. pneumoniae*'nin önemli sideroforlarından biridir (Lawlor, O'connor, & Miller, 2007). Çalışmamızda incelediğimiz fosfomisine dirençli 8 *K. pneumoniae* kökeninin tamamında (%100) *ycfM*, *mrkD* ve *entB* tespit edilirken, 7 tanesinde (%87,5) *wabG* geni, 6 tanesinde (%75) *uge* geni tespit edilmiştir. Kökenlerin hiçbirinde *fimH* genine rastlanmamıştır. Yapılan çalışmalarda diğer genlerin yanısıra *fimH* genine de yüksek oranlarda rastlandığı görülmektedir. (Stahlhut vd., 2009). Yousefi ve arkadaşlarının 70 *K. pneumoniae* kökeni ile yaptığı bir çalışmada, çalışmamızda incelediğimiz virülans genleri de incelenmiş ve bakterilerin %94,2'sinde *entB*, %91,4'ünde *fimH*, %85,7'sinde *mrkD* genine ve %84,2'sinde *ycfM* geni tespit edilmiştir (Yousefi vd., 2020). Polonya'da yapılan başka bir çalışmada ise incelenen 109 *K. pneumoniae* kökeninin tamamında *entB* geni, %96,3'ünde *mrkD* geni ve %91,7'sinde *fimH* geni saptanmıştır (Kot vd., 2023). Davoudabadi ve arkadaşlarının 2018-2020 yılları arasında İran'da izole edilen 52 *K. pneumoniae* kökeni ile yaptıkları çalışmada, kökenlerin tamamında *entB* geni, %88,5'inde *mrkD* geni, %86,5'inde ise *fimH* geni tespit edilmiştir (Davoudabadi, Goudarzi, & Hashemi, 2023). Ülkemizde 2017 yılında yayınlanan bir çalışmada da 53 adet *K. pneumoniae* kökeninin çeşitli virülans genleri incelenmiş ve kökenlerin %96,2'sinde *entB* geni, %86,8'inde *ycfM* geni, %83'ünde *mrkD* geni ve %64,2'sinde *fimH* geni tespit edilmiştir (Kuş, Arslan, Türk Dağı, & Fındık, 2017).

Çalışmamızda dirençli ve duyarlı izogenik varyantlarda bulunan bazı virülans genlerinin ekspresyon düzeylerinin karşılaştırılması amacıyla RT-qPCR yöntemi uygulanmıştır. *E. coli* kökenlerinde *fimH* ve *papC*, *K. pneumoniae* kökenlerinde *entB*, *mrkD*, *uge*, *ycfM* ve *wabG* genlerindeki değişim incelenmiştir. Konak hücrelere adezyonu sağlayan *fimH* geninin ekspresyonu 27-27R nolu kökenler arasında farklılık göstermezken, dirençli EcR kökeninde Ec kökenine göre anlamlı bir şekilde azalmıştır. Pira ve arkadaşlarının çalışmasında fosfomisine direnç kazanan *E. coli* kökenlerinde adezyon yeteneğinin azaldığı gösterilmiştir (Pira, Pruzzo, & Schito, 1987). *K. pneumoniae* kökenlerinde dirençli ve duyarlı varyantlar arasında *entB*, *mrkD* ve *ycfM* genlerinin ekspresyon düzeyinde anlamlı farklılık görülmemiştir. Dirençli 4R kökeninde duyarlı 4 nolu kökene göre *uge* geninin ekspresyonu anlamlı şekilde azalırken, *wabG* geninin ekspresyonu artmıştır. 24 ve 24R nolu kökenlerde ise her iki genin de

ekspresyon düzeyleri arasında anlamlı fark bulunamamıştır. *uge* ve *wabG* genlerinin ikisi de bakterilerde polisakkarit senteziyle ilgili genler olduğu için 4R nolu kökendeki *uge* geninin ekspresyon düzeyinin azalmasının *wabG* geninin ekspresyonunun artmasıyla kompanse edilmiş olabileceği düşünülmüştür.

Biyofilm tabakası, bakterilerin yaşamsal aktivitelerini sürdürebilmek ve zorlu dış ortam şartlarına karşı kendilerini koruyabilmek için ürettiği ekstrasellüler matriks tabakasıdır. Biyofilmlerin kronik bakteriyel enfeksiyonların %80'inden ve bütün bakteriyel enfeksiyonların %60'ından sorumlu olduğu Ulusal Sağlık Enstitüleri (National Health Institutes, NIH) tarafından bildirilmiştir (Temel & Erac, 2022). *Enterobacteriaceae* enfeksiyonlarında da biyofilmin önemli bir rolü bulunmaktadır. Özellikle *K. pneumoniae* kökenlerinde yüksek oranda biyofilm üretimi görülmektedir (Piperaki, Syrogiannopoulos, Tzouveleakis, & Daikos, 2017; Ramos-Vivas vd., 2019). Biyofilm yapısı, antibiyotiklerin bakterilere ulaşmasını zorlaştırdığı için biyofilm kaynaklı enfeksiyonların tedavisi de oldukça güçtür. Yapılan çalışmalarda hücre içi ve hücre dışı antibiyofilm etkinliği yüksek olan azitromisin, eritromisin, klaritromisin gibi bir makrolid grubu antibiyotiğin kombine tedavi ile kullanılmasının etkili olabileceği gösterilmiştir. Bunun yanında, bakterilerin çoğunluğu algılama (quorum sensing) mekanizmalarını hedefleyen tedaviler ve biyofilm yapısını parçalayan ajanların kullanımı da biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde etkilidir (Wu, Moser, Wang, Høiby, & Song, 2014). Biyofilm oluşumunun saptanmasında sıklıkla modifiye tüp adherans yöntemi, Kongo kırmızılı agar yöntemi ve spektrofotometrik temele dayanan mikropilaka yöntemi kullanılmaktadır (Christensen vd., 1985; Ozturk vd., 2014; Stepanović vd., 2007). Biyofilm üretimi ve antibiyotik direnci arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Nirwati ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada inceledikleri *K. pneumoniae* kökenlerinde biyofilm üretenlerin biyofilm üretmeyenlere kıyasla daha yüksek antibiyotik direnci gösterdiği görülmüştür. Saha ve arkadaşları da yaptıkları çalışmada *P. aeruginosa* kökenlerinde benzer şekilde sonuçlar elde etmişlerdir (Nirwati vd., 2019; Saha vd., 2018). Cepas ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarında ise inceledikleri Gram negatif bakterilerde çoklu ilaç direnci ve biyofilm üretimi arasında anlamlı bir ilişki bulamamışlardır ancak biyofilm oluşumuyla bazı antibiyotiklere direnç arasında bir korelasyon bulmuşlardır. Biyofilm oluşumuyla; *E. coli* kökenlerinde gentamisin ve seftazidim, *P. aeruginosa* kökenlerinde siprofloksasin, *K. pneumoniae* kökenlerinde ise piperasilin-tazobaktam direnci arasındaki ilişki ortaya koyulmuştur (Cepas vd., 2019). Behzadi ve arkadaşları idrar yolları enfeksiyonu kökenli 50

adet doğal (normal) tip, 50 adet siprofloksasine dirençli, 50 adet fosfomisine dirençli, 50 adet trimetoprim-sülfametoksazole dirençli ve 50 adet GSBL üreten toplam 250 *E. coli* kökeni ile yaptıkları çalışmada kökenlerin 119 tanesinin (%47,6) biyofilm ürettiğini belirlemişlerdir. GSBL üreten gruptaki biyofilm üreten bakteri sayısının doğal tip grubuna göre anlamlı bir şekilde daha fazla olduğu ancak diğer gruplar ile doğal tip grup arasında anlamlı bir fark olmadığı bildirilmiştir (Behzadi, Urbán, & Gajdács, 2020). Çalışmamızda fosfomisine duyarlı ve dirençli izogenik bakteri varyantlarının biyofilm oluşturma kapasiteleri mikropilaka yöntemi (kristal viyole yöntemi) ile belirlenmiş ve varyantlar arasındaki olası farklar araştırılmıştır. 4 ve 4R nolu *K. pneumoniae* kökenleri ile 27, 27R numaralı, Ec ve EcR kodlu *E. coli* kökenlerinin zayıf düzeyde biyofilm ürettiği 24 ve 24R nolu *K. pneumoniae* kökenlerinin ise orta düzeyde biyofilm ürettiği görülmüştür. Dirençli ve duyarlı varyantların 570 nm’de ölçülen OD değerleri karşılaştırıldığında ise varyantlar arasında anlamlı bir fark bulunmadığı saptanmıştır. Bu veri incelenen kökenlerde oluşan fosfomisin direncinin biyofilm üretimi açısından anlamlı bir değişime yol açmadığını ortaya koymaktadır.

Bütün bu veriler ışığında çalışmamız kapsamında incelenen klinik *E. coli* ve *K. pneumoniae* kökenlerinin birçok virülans faktörüne sahip olduğu görülmektedir. Laboratuvar koşullarında oluşturulan fosfomisin dirençli varyantlar ile duyarlı eşleri karşılaştırıldığında, incelenen virülans genlerinden birçoğunda ekspresyon düzeyi açısından anlamlı bir değişim saptanmamıştır. Bu bulgu fosfomisin direncinin incelenen kökenlerde önemli bir virülans kaybına yol açmadığına işaret etmektedir. Gen ekspresyon verilerinin ortaya koyduğu bu veri, biyofilm oluşumu gibi fenotipik bulgularla da desteklenmektedir. Fosfomisin duyarlı/dirençli varyantlar arasında biyofilm oluşturma kapasiteleri açısından da anlamlı bir fark görülmemiştir.

Antimikrobiyal direnç ve bakteriyel virülans arasındaki ilişki mikrobiyologların ilgisini çekmektedir ve bu konuyla ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Beceiro ve arkadaşlarının yazdığı bir derleme çalışmada Gram negatif ve Gram pozitif pek çok bakterinin, β -laktamlar, aminoglikozitler, tetrasiklinler ve florokinolonlar gibi farklı aileden birçok antimikrobiyale karşı oluşturdıkları direnç mekanizmaları ve bu direnç mekanizmalarının bakterinin virülansına oluşturduğu etki gösterilmiştir. Örneğin *Streptococcus pneumoniae* kökenlerinde β -laktam antibiyotiklerin bağlanma bölgesi olan penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) meydana gelen değişikliklerin ya da mutasyonların bakteride β -laktam direnci oluşturduğu ve bu direncin bakterinin virülansını azalttığı gösterilmiştir. Ancak bu değişikliklerin Gram

negatif basillerde de virölansı azalttığına dair yeterince çalışma bulunmamaktadır (Beceiro, Tomás, & Bou, 2013). Bakterilerde antimikrobiyal direnç oluşumu bakteriye her zaman biyolojik bir dezavantaj getirmeyebilir. Örneğin *gyrA* ve *parC* genlerinde meydana gelen mutasyonların *E. coli* kökenlerinde siprofloksasin direnci oluşturduğu ancak dirençli kökenlerin *in vivo* ve *in vitro* üreme hızlarında herhangi bir değişim görülmediği gösterilmiştir (Beceiro vd., 2013). Bakterilerin üreme hızı özellikle idrar yolları enfeksiyonları açısından önem arz etmektedir. İdrar yolları enfeksiyonu gelişimi için idrar yollarında belirli bir sayının üzerinde bakteri olması ve bu bakterilerin dokulara tutunabilmesi gerekmektedir. İdrar yollarının düzenli olarak idrarla yıkanması bakterilerin tutunmasını zorlaştırmaktadır. Ayrıca bakterilerde direnç gelişimi sonucu oluşan biyolojik dezavantaj bakterilerin üreme hızını azaltır ve bu durum enfeksiyon oluşturmak için gerekli bakteri sayısına ulaşılmasını güçleştirir. Fosfomisin direncinin *in vitro* ortamda kolay kazanılması ancak enfeksiyonlardan izole edilen bakterilerin genellikle fosfomisine duyarlı olması bu hipotezi doğrulamaktadır (Nilsson vd., 2003). Çalışmamızda fosfomisine duyarlı ve dirençli izogenik bakteri varyantlarının üreme hızları bakterileri LB broth içinde 10 saat boyunca inkübe ederek ve her 2 saatte bir alınan örneklerin 600nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçülerek hesaplanmıştır. 4 ve 4R nolu *K. pneumoniae* kökenlerinde duyarlı ve dirençli varyantlarda sadece 6. saatte duyarlı kökenin absorbans değerinin dirençliye göre anlamlı bir şekilde yüksek olduğu diğer saatlerde ise anlamlı bir fark bulunmadığı, 24 ve 24R nolu *K. pneumoniae* varyantlarında duyarlı kökenin 2, 4, 6, 8 ve 10. saatlerde, 27 ve 27R nolu, Ec ve EcR kodlu *E. coli* varyantlarında ise duyarlı kökenlerin 4, 6, 8 ve 10. saatlerde dirençli kökene göre anlamlı şekilde yüksek absorbans değeri verdiği, dolayısı ile daha fazla ürettiği görülmüştür. Başlangıç bakteri konsantrasyonları eşit olarak hazırlandığı için 0. saatte kökenler arasında herhangi bir absorbans değeri farkı bulunmamaktadır. Elde edilen sonuçlar incelenen bakterilerde oluşan fosfomisin direncinin genellikle üreme hızını azalttığını göstermektedir. Ancak 4 numaralı kökende fosfomisin direnci bakteriye üreme hızını azaltacak bir biyolojik dezavantaj getirmemiştir. Pira ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada fosfomisine spontan direnç kazanmış 2 *E. coli* ve 1 *K. pneumoniae* kökeni ve bu kökenlerin izogenik duyarlı varyantlarının üreme hızları karşılaştırılmış *E. coli* kökenlerinde dirençli varyantların üreme hızlarının duyarlılardan daha düşük olduğu ancak *K. pneumoniae* kökeninde üreme hızında varyantlar arası bir fark görülmediği gösterilmiştir (Pira vd., 1987).

Sonuç ve Öneriler

Antibiyotik direnci günümüzde sağlık sektörünü etkileyen en önemli sorunlardan biridir. Antibiyotiklerin bilinçsiz, yanlış ve aşırı kullanımı tedavisi mümkün olmayan enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Antibiyotik dirençli mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar günümüzde her yıl yaklaşık 700.000 ölümden sorumludur. Bu sayının 2050 yılında yıllık 10 milyon ölüme kadar yükseleceği tahmin edilmektedir. Artan antibiyotik direnci ve çoklu ilaç dirençli (ÇİD) bakterilerin oranının gitgide artması tedavi seçeneklerinin tekrar gözden geçirilmesine sebep olmuştur. Bu amaçla fosfomisin gibi kullanımı genellikle idrar yolu ile sınırlı olan antibiyotiklerin daha farklı enfeksiyonlarda kullanımı gündeme gelmiştir. Fosfomisinin kullanımı arttıkça bakterilerde görülen direnç de artış göstermeye başlamıştır. Ancak bu direncin bakterilerde oluşturduğu biyolojik dezavantaj (fitness cost) ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Çalışmamızda fosfomisine dirençli ve duyarlı *E.coli* ve *K.pneumoniae* izogenik varyantları arasındaki fenotipik ve genotipik farklar araştırılmıştır. Bu doğrultuda bakterilerde; kapsül yapımıyla, fimbria oluşumuyla ve siderofor üretimiyle ilgili genlerin varlığı konvansiyonel PZR yöntemiyle belirlenmiş, varlığı tespit edilen genlerin duyarlı ve dirençli izogenik varyantlardaki ekspresyon düzeyi ise RT-qPCR yöntemi ile araştırılmıştır. İki adet fosfomisine duyarlı *E. coli*, 2 adet fosfomisine duyarlı *K. pneumoniae* ve bu kökenlerin dirençli varyantları olmak üzere toplam 8 kökende çalışılmıştır. *E. coli* kökenlerinin bir tanesinde fimbria oluşumundan sorumlu *fimH* geninin ekspresyonu dirençli varyantta azalırken diğer kökenin dirençli ve duyarlı varyantları arasında fark görülmemiştir. P fimbria üretimiyle ilgili olan *papC* geninin ekspresyonunun ise her iki *E. coli* kökeninde de dirençli ve duyarlı varyantlar arasında farklılık göstermediği görülmüştür. *K. pneumoniae* kökenlerinde siderofor üretimiyle ilgili *entB*, polisakkarit senteziyle ilgili *wabG*, adezyon moleküllerini kodlayan *ycfM* ve *mrkD*, kapsül antijenlerini kodlayan *uge* genleri incelenmiştir. *entB*, *mrkD* ve *ycfM* genlerinin ekspresyonu dirençli ve duyarlı *K. pneumoniae* varyantları arasında farklılık göstermezken, bir kökende dirençli varyantta *wabG* geninin ekspresyonunun arttığı, *uge* geninin ekspresyonunun ise azaldığı görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında fosfomisin direncinin incelenen virülans genlerinin ekspresyonu üzerinde büyük değişikliklere yol açmadığı görülmüştür. Spektrofotometrik bir yöntem olan kristal viyole yöntemiyle dirençli ve duyarlı varyantların biyofilm oluşturma kapasiteleri incelenmiş olup hiçbir kökende varyantlar arası anlamlı bir fark bulunamamıştır. Fosfomisin dirençli ve duyarlı varyantların üreme hızları karşılaştırılmış ve üç köken çiftinde duyarlı varyantların dirençlilere göre daha hızlı ürediği görülürken bir kökenin varyantları arasındaki üreme hızında fark görülmemiştir.

Çalışmamızda fosfomisin duyarlı/dirençli izogenik varyantlar arasında, incelenen virülans genlerinden birçoğunun ekspresyonunda anlamlı bir farka rastlanmaması, aynı kökenlerin biyofilm oluşturma kapasitelerinde de önemli bir değişim saptanmaması ile uyumludur. Ancak genel olarak dirençli varyantların üreme hızlarının, duyarlılara göre düşük olduğu gözlenmiştir. Bu veri dikkate alındığında, incelenen kökenlerde fosfomisin direncinin üreme hızı yönünden bir biyolojik dezavantaj getirdiği söylenebilir. Ancak, genotipik ve fenotipik bulguların işaret ettiği üzere fosfomisin direncinin, çalışılan kökenlerde anlamlı bir virülans kaybına yol açmadığı belirlenmiştir. Bu veri, fosfomisin dirençli *Enterobacteriaceae* kökenlerinin enfeksiyon oluşturmada önemli bir dezavantajla karşılaşmayacaklarını göstermektedir. Önümüzdeki dönemde daha yaygın bir şekilde kullanımı gündemde olan fosfomisin için çalışmamızın ortaya koyduğu bulgular dikkatle değerlendirilmeli ve *in vivo* araştırmalar ile desteklenmelidir.

Kaynaklar

- Abbott, I. J., Van Gorp, E., Van Der Meijden, A., Wijma, R. A., Meletiadis, J., Roberts, J. A., ... Peleg, A. Y. (2020). *Oral Fosfomycin Treatment for Enterococcal Urinary Tract Infections in a Dynamic In Vitro Model*. <https://doi.org/10.1128/AAC.00342-20>
- Abduljabbar, A., Aljanaby, J., Hassan, A., & Alhasani, A. (2016). *African Journal of Microbiology Research Virulence factors and antibiotic susceptibility patterns of multidrug resistance Klebsiella pneumoniae isolated from different clinical infections*. 10(22), 829-843. <https://doi.org/10.5897/AJMR2016.8051>
- Andersson, D. I., & Hughes, D. (2011). Persistence of antibiotic resistance in bacterial populations. *FEMS Microbiology Reviews*, 35(5), 901-911. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00289.x>
- Bauer, R. J., Zhang, L., Foxman, B., Siitonen, A., Jantunen, M. E., Saxen, H., & Marrs, C. F. (2002). Molecular Epidemiology of 3 Putative Virulence Genes for *Escherichia coli* Urinary Tract Infection—*usp*, *iha*, and *iroN* *E. coli*. *The Journal of Infectious Diseases*, 185(10), 1521-1524. <https://doi.org/10.1086/340206>
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2013). *Antimicrobial Resistance and Virulence: a Successful or Deleterious Association in the Bacterial World?* <https://doi.org/10.1128/CMR.00059-12>
- Behzadi, P., Urbán, E., & Gajdács, M. (2020). Association between Biofilm-Production and Antibiotic Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC): An In Vitro Study. *Diseases (Basel, Switzerland)*, 8(2), E17-E17. <https://doi.org/10.3390/DISEASES8020017>
- Bi, W., Li, B., Song, J., Hong, Y., Zhang, X., Liu, H., ... Cao, J. (2017). *Antimicrobial susceptibility and mechanisms of fosfomycin resistance in extended-spectrum β -lactamase-producing Escherichia coli strains from urinary tract infections in Wenzhou, China*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2017.02.010>
- Bilgehan, H. (2008). *Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi (Uygulama Konuları ile)* (12.). İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitabevi.
- Björkman, J., & Andersson, D. I. (2000). *Cost of bacterial resistance The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective*. <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0147>
- Bonomo, R. A., Burd, E. M., Conly, J., Limbago, B. M., Poirel, L., Segre, J. A., & Westblade, L. F. (2018). Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases*, 66(8), 1290-1297. <https://doi.org/10.1093/cid/cix893>

- Büyük, A., Yılmaz, F. F., Gül Yurtsever, S., & Hoşgör Limoncu, M. (2017). *Acinetobacter baumannii* İzolatlarının Antibiyotik Direnç Profili ve Genotipleri ile Tigesiklin ve Kolistin Çeşitli Antibiyotiklerle Kombinasyonlarının İn Vitro Etkileşimleri. *Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14(1), 13-18. <https://doi.org/10.4274/TJPS.44127>
- Castañeda-García, A., Blázquez, J., & Rodríguez-Rojas, A. (2013). Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. *Antibiotics*, 2(2), 217-236. <https://doi.org/10.3390/antibiotics2020217>
- Cepas, V., López, Y., Muñoz, E., Rolo, D., Ardanuy, C., Martí, S., ... Soto, S. M. (2019). Relationship Between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. *Microbial Drug Resistance*, 25(1), 72-79. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0027>
- Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., ... Barrett, F. F. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*, 22(6), 996. <https://doi.org/10.1128/JCM.22.6.996-1006.1985>
- Compain, F., Babosan, A., Brisse, S., Genel, N., Audo, J., Ailloud, F., ... Decré, D. (2014). Multiplex PCR for Detection of Seven Virulence Factors and K1/K2 Capsular Serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 52(12), 4377-4380. <https://doi.org/10.1128/JCM.02316-14>
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science (New York, N.Y.)*, 284(5418), 1318-1322. <https://doi.org/10.1126/science.284.5418.1318>
- Croughs, P. D., Konijnendijk-de Regt, M., & Yusuf, E. (2022). Fosfomycin Susceptibility Testing Using Commercial Agar Dilution Test. *Microbiology Spectrum*, 10(2). <https://doi.org/10.1128/spectrum.02504-21>
- Çiftçi, A., Gizem Sezener, M., Enes Ergüden, V., Fındık, A., Akgöz, S., Gülhan, T., & Moçco, O.-A. (2022). Investigation of the antibiotic resistances, biofilm formation, and genotypes of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Turkey and Romania. *Vet Mikrobiyol Derg*, 33(2). <https://doi.org/10.35864/evmd.1166225>
- Dadgostar, P. (2019). *Antimicrobial Resistance: Implications and Costs*. <https://doi.org/10.2147/IDR.S234610>

- Davoudabadi, S., Goudarzi, M., & Hashemi, A. (2023). *Detection of Virulence Factors and Antibiotic Resistance among Klebsiella pneumoniae Isolates from Iran*. <https://doi.org/10.1155/2023/3624497>
- Diancourt, L., Passet, V., Verhoef, J., Grimont, P. A. D., & Brisse, S. (2005). Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *Journal of clinical microbiology*, 43(8), 4178-4182. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.8.4178-4182.2005>
- EUCAST. (2023). Clinical breakpoints and dosing of antibiotics [Internet].
- Falagas, M. E., Athanasiaki, F., Voulgaris, G. L., Triarides, N. A., & Vardakas, K. Z. (2019). Resistance to fosfomycin: Mechanisms, Frequency and Clinical Consequences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.09.013>
- Falagas, M. E., & Kopterides, P. (2007). Old antibiotics for infections in critically ill patients. *Current Opinion in Critical Care*, 13(5), 592-597. <https://doi.org/10.1097/MCC.0B013E32827851D7>
- Falagas, M. E., Roussos, N., Gkegkes, I. D., Rafailidis, P. I., & Karageorgopoulos, D. E. (2009). Fosfomycin for the treatment of infections caused by Gram-positive cocci with advanced antimicrobial drug resistance: A review of microbiological, animal and clinical studies. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 18(7), 921-944. <https://doi.org/10.1517/13543780902967624>
- Fleming, D., & Rumbaugh, K. P. (2017, Haziran 1). Approaches to dispersing medical biofilms. *Microorganisms*, C. 5. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/microorganisms5020015>
- Galindo-Méndez, M., Navarrete-Salazar, H., Baltazar-Jiménez, F., Muñoz-de la Paz, E., Sánchez-Mawcinitt, M. F., Gómez-Pardo, A., ... Ostos-Cantú, H. L. (2022). Emergence of Fosfomycin Resistance by Plasmid-Mediated fos Genes in Uropathogenic ESBL-Producing *E. coli* Isolates in Mexico. *Antibiotics*, 11(10), 1383. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101383>
- Garau, J. (2008). Other antimicrobials of interest in the era of extended-spectrum β -lactamases: Fosfomycin, nitrofurantoin and tigecycline. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(SUPPL. 1), 198-202. <https://doi.org/10.1111/J.1469-0691.2007.01852.X>
- Garofalo, C. K., Hooton, T. M., Martin, S. M., Stamm, W. E., Palermo, J. J., Gordon, J. I., & Hultgren, S. J. (2007). *Escherichia coli* from Urine of Female Patients with Urinary Tract

- Infections Is Competent for Intracellular Bacterial Community Formation. *Infection and Immunity*, 75(1), 52-60. <https://doi.org/10.1128/IAI.01123-06>
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Harwalkar, A., Gupta, S., Rao, A., & Srinivasa, H. (2014). Lower prevalence of hlyD, papC and cnf-1 genes in ciprofloxacin-resistant uropathogenic Escherichia coli than their susceptible counterparts isolated from southern India. *Journal of Infection and Public Health*, 7(5), 413-419. <https://doi.org/10.1016/J.JIPH.2014.04.002>
- Hasani, A., Soltani, E., Rezaee, M. A., Pirzadeh, T., Oskouee, M. A., Hasani, A., ... Binesh, E. (2020). *Serotyping of Klebsiella pneumoniae and Its Relation with Capsule-Associated Virulence Genes, Antimicrobial Resistance Pattern, and Clinical Infections: A Descriptive Study in Medical Practice*. <https://doi.org/10.2147/IDR.S243984>
- Hirakawa, H., Takita, A., Sato, Y., Hiramoto, S., Hashimoto, Y., Ohshima, N., ... Tomita, H. (2023). Inactivation of ackA and pta Genes Reduces GlpT Expression and Susceptibility to Fosfomycin in Escherichia coli. *Microbiology spectrum*, 11(3). <https://doi.org/10.1128/SPECTRUM.05069-22>
- Hojati, Z., Molaie, R., & Gholipour, A. (2015). The FimH Gene in Uropathogenic Escherichiacoli Strains Isolated From Patient With Urinary Tract Infection. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(2). <https://doi.org/10.5812/jjm.17520>
- Hojati, Z., Zamanzad, B., Hashemzadeh, M., Molaie, R., & Gholipour, A. (2015). The FimH Gene in Uropathogenic Escherichia coli Strains Isolated From Patients With Urinary Tract Infection. *Jundishapur journal of microbiology*, 8(2), e17520. <https://doi.org/10.5812/jjm.17520>
- Huang, L., Cao, M., Hu, Y., Zhang, R., Xiao, Y., & Chen, G. (2021). Prevalence and mechanisms of fosfomycin resistance among KPC-producing Klebsiella pneumoniae clinical isolates in China. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 57(1), 106226. <https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2020.106226>
- Huemer, M., Mairpady Shambat, S., Brugger, S. D., & Zinkernagel, A. S. (2020). Antibiotic resistance and persistence—Implications for human health and treatment perspectives. *EMBO reports*, 21(12). <https://doi.org/10.15252/embr.202051034>
- Johnson, J. R., Moseley, S. L., Roberts, P. L., & Stamm, W. E. (1988). Aerobactin and other virulence factor genes among strains of Escherichia coli causing urosepsis: Association

- with patient characteristics. *Infection and Immunity*, 56(2), 405-412. <https://doi.org/10.1128/IAI.56.2.405-412.1988>
- Karaiskos, I., Galani, L., Sakka, V., Gkoufa, A., Sopilidis, O., Chalikopoulos, D., ... Giamarellou, E. (2019). Oral fosfomycin for the treatment of chronic bacterial prostatitis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 74(5), 1430-1437. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz015>
- Kot, B., Piechota, M., Szweda, P., Mitrus, J., Wicha, J., Grużewska, A., & Witeska, M. (2023). Virulence analysis and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates from hospitalised patients in Poland. *Scientific Reports*, 13(1), 4448. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-31086-w>
- K.S., S., Pallam, G., Mandal, J., Jindal, B., & S., K. (2020). Use of fosfomycin combination therapy to treat multidrug-resistant urinary tract infection among paediatric surgical patients – a tertiary care centre experience. *Access Microbiology*, 2(10). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000163>
- Kumar, S., Parvathi, A., Hernandez, R. L., Cadle, K. M., & Varela, M. F. (2009). Identification of a novel UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA) from *Vibrio* Wscheri that confers high fosfomycin resistance in *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 191, 425-429. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0468-9>
- Kurazono, H., Yamamoto, S., Nakano, M., Nair, G. B., Terai, A., Chaicumpa, W., & Hayashi, H. (2000). Characterization of a putative virulence island in the chromosome of uropathogenic possessing a gene encoding a uropathogenic-specific protein. *Microbial Pathogenesis*, 28(3), 183-189. <https://doi.org/10.1006/mpat.1999.0331>
- Kuş, H., Arslan, U., Türk Dağı, H., & Fındık, D. (2017). Hastane Enfeksiyonu Etkeni *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Çeşitli Virülans Faktörlerinin Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 51(4), 329-339. <https://doi.org/10.5578/mb.59716>
- Lane, M. C., & Mobley, H. (2007). Role of *P*-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. <https://doi.org/10.1038/sj.ki.5002230>
- Laurent, F. (2001). Fitness and competitive growth advantage of new gentamicin-susceptible MRSA clones spreading in French hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(3), 277-283. <https://doi.org/10.1093/jac/47.3.277>

- Lawlor, M. S., O'Connor, C., & Miller, V. L. (2007). Yersiniabactin Is a Virulence Factor for *Klebsiella pneumoniae* during Pulmonary Infection. *INFECTION AND IMMUNITY*, 75(3), 1463-1472. <https://doi.org/10.1128/IAI.00372-06>
- Leite, G. C., Oliveira, M. S., Perdigão-Neto, L. V., Rocha, C. K. D., Guimarães, T., Rizek, C., ... Costa, S. F. (2016). Antimicrobial Combinations against Pan-Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates with Different Resistance Mechanisms. *PLOS ONE*, 11(3), e0151270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151270>
- Levin, B. R., Lipsitch, M., Perrot, V., Schrag, S., Antia, R., Simonsen, L., ... Stewart, F. M. (1997). The Population Genetics of Antibiotic Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, 24(Supplement_1), S9-S16. https://doi.org/10.1093/clinids/24.Supplement_1.S9
- Li, G., Wang, S., Zhao, S., Zhou, Y., Jin, S., & Pan, X. (2022). Prevalence of USP and hlyA Genes and Association with Drug Resistance in Uropathogenic *Escherichia coli* Isolated from Patients in a Tertiary Hospital from Southeast China. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 174(1), 57-61. <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05648-3>
- Li, Y., Zheng, B., Li, Y., Zhu, S., Xue, F., & Liu, J. (2015). Antimicrobial Susceptibility and Molecular Mechanisms of Fosfomycin Resistance in Clinical *Escherichia coli* Isolates in Mainland China. *PloS one*, 10(8), e0135269. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135269>
- Lillington, J., Geibel, S., & Waksman, G. (2014). Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1840(9), 2783-2793. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.04.021>
- Liu, P., Chen, S., Wu, Z.-Y., Qi, M., Li, X.-Y., & Liu, C.-X. (2020). Mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.12.019>
- Lu, P.-L., Hsieh, Y.-J., Lin, J.-E., Huang, J.-W., Yang, T.-Y., Lin, L., & Tseng, S.-P. (2016). Characterisation of fosfomycin resistance mechanisms and molecular epidemiology in extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.08.013>
- Marcinkiewicz, J., Strus, M., & Pasich, E. (2013). Antibiotic resistance: a “dark side” of biofilm-associated chronic infections. *Polish Archives of Internal Medicine*, 123(6), 309-313. <https://doi.org/10.20452/pamw.1780>
- Melnyk, A. H., Wong, A., & Kassen, R. (2015). The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evolutionary Applications*, 8(3), 273-283. <https://doi.org/10.1111/eva.12196>

- Michalopoulos, A. S., Livaditis, I. G., & Gougoutas, V. (2011). The revival of fosfomycin. *International Journal of Infectious Diseases*, 15(11). <https://doi.org/10.1016/J.IJID.2011.07.007>
- Mueller, L., Cimen, C., Poirel, L., Descombes, M. C., & Nordmann, P. (2019). Prevalence of fosfomycin resistance among ESBL-producing *Escherichia coli* isolates in the community, Switzerland. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 38(5), 945-949. <https://doi.org/10.1007/S10096-019-03531-0/TABLES/1>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). *Tıbbi Mikrobiyoloji* (7.; D. A. Us & A. Başustaoğlu, Ed.).
- Nakano, M., Yamamoto, S., Terai, A., Ogawa, O., Makino, S., Hayashi, H., ... Kurazono, H. (2001). Structural and sequence diversity of the pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* which encodes the USP protein. *FEMS Microbiology Letters*, 205(1), 71-76. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2001.tb10927.x>
- Nilsson, A. I., Berg, O. G., Aspevall, O., Kahlmeter, G., & Andersson, D. I. (2003). Biological Costs and Mechanisms of Fosfomycin Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47(9), 2850-2858. <https://doi.org/10.1128/AAC.47.9.2850-2858.2003>
- Nipič, D., Podlesek, Z., Budič, M., Rnigoj, M. C. ˇ, & Žgur-Bertok, D. (2013). *Escherichia coli* Uropathogenic-Specific Protein, *Usp*, Is a Bacteriocin-Like Genotoxin. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit480>
- Nirwati, H., Sinanjung, K., Fahrurnissa, F., Wijaya, F., Napitupulu, S., Hati, V. P., ... Nuryastuti, T. (2019). Biofilm formation and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from clinical samples in a tertiary care hospital, Klaten, Indonesia. *BMC Proceedings*, 13(11), 1-8. <https://doi.org/10.1186/S12919-019-0176-7/TABLES/4>
- Ohkoshi, Y., Sato, T., Suzuki, Y., Yamamoto, S., Shiraishi, T., Ogasawara, N., & Yokota, S.-I. (2017). *Mechanism of Reduced Susceptibility to Fosfomycin in Escherichia coli Clinical Isolates*. <https://doi.org/10.1155/2017/5470241>
- Ozturk, I., Yurtman, A. N., Erac, B., Gul-Yurtsever, S., Ermertcan, S., & Hosgor-Limoncu, M. (2014). In vitro effect of moxifloxacin and rifampicin on biofilm formation by clinical MRSA isolates. *Bratislava Medical Journal*, 115(8), 483-486. https://doi.org/10.4149/BLL_2014_093
- Öcal, D., Türk, A. H., Lale, E. S., Bayansar, Z., Margün, Z., Namlı, C., ... Doğanay Erdoğan, B. (2022). *Escherichia coli* İzolatlarında Fosfomisin Duyarlılığının Çeşitli Yöntemler ile

- Saptanması. *Flora the Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology*, 27(1), 94-102. <https://doi.org/10.5578/flora.20229908>
- Patel, S. S., Balfour, J. A., & Bryson, H. M. (1997). Fosfomycin Tromethamine. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy as a single-dose oral treatment for acute uncomplicated lower urinary tract infections. *Drugs*, 53(4), 637-656. <https://doi.org/10.2165/00003495-199753040-00007/METRICS>
- Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2019). Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs*, 79(14), 1529-1541. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3>
- Piperaki, E.-T., Syrogiannopoulos, G. A., Tzouvelekis, L. S., & Daikos, G. L. (2017). *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(10), 1002-1005. <https://doi.org/10.1097/INF.0000000000001675>
- Pira, G. L., Pruzzo, C., & Schito, G. C. (1987). Monuril and Modification of Pathogenicity Traits in Resistant Microorganisms. İçinde *Eur. Urol* (C. 13).
- Raeispour, M., & Ranjbar, R. (2018). Antibiotic resistance, virulence factors and genotyping of Uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 7(1), 118. <https://doi.org/10.1186/s13756-018-0411-4>
- Rajer, F., & Sandegren, L. (2022). The Role of Antibiotic Resistance Genes in the Fitness Cost of Multiresistance Plasmids. *mBio*, 13(1). <https://doi.org/10.1128/MBIO.03552-21>
- Ramos-Vivas, J., Chapartegui-González, I., Fernández-Martínez, M., González-Rico, C., Fortún, J., Escudero, R., ... de la Torre Cisneros, J. (2019). Biofilm formation by multidrug resistant Enterobacteriaceae strains isolated from solid organ transplant recipients. *Scientific Reports*, 9(1), 8928. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45060-y>
- Raz, R. (2012, Ocak 1). Fosfomycin: An old-new antibiotic. *Clinical Microbiology and Infection*, C. 18, ss. 4-7. Elsevier. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03636.x>
- Regué, M., Hita, B., Piqué, N., Izquierdo, L., Merino, S., Fresno, S., ... Tomás, J. M. (2004). A Gene, *uge*, Is Essential for *Klebsiella pneumoniae* Virulence. *Infection and Immunity*, 72(1), 54-61. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.1.54-61.2004>
- Rijavec, M., Müller-Premru, M., Zakotnik, B., & Žgur-Bertok, D. (2008). Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *Journal of Medical Microbiology*, 57(11), 1329-1334. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.2008/002543-0>

- Roussos, N., Karageorgopoulos, D. E., Samonis, G., & Falagas, M. E. (2009, Aralık). Clinical significance of the pharmacokinetic and pharmacodynamic characteristics of fosfomycin for the treatment of patients with systemic infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 34, ss. 506-515. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.08.013>
- Saha, S., Devi, K. M., Damrolien, S., Devi, Kh. S., . K., & Sharma, K. T. (2018). Biofilm production and its correlation with antibiotic resistance pattern among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a tertiary care hospital in north-east India. *International Journal of Advances in Medicine*, 5(4), 964. <https://doi.org/10.18203/2349-3933.ijam20183129>
- Schito, G. (2003). Why fosfomycin trometamol as first line therapy for uncomplicated UTI? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22(SUPPL. 2), 79-83. [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(03\)00231-0](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(03)00231-0)
- Silver, L. L. (2017). Fosfomycin: Mechanism and Resistance. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(2), a025262. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025262>
- Soydan, G., Görgülü, Y., & Öztürk, C. (2021). Investigation of Fosfomycin Susceptibility in Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing Enteric Bacteria by Disk Diffusion, Automated System and Agar Dilution Kit. *Mikrobiyoloji bulteni*, 55(4), 617-625. <https://doi.org/10.5578/mb.20219712>
- Springer, B., Kidan, Y. G., Prammananan, T., Ellrott, K., Böttger, E. C., & Sander, P. (2001). Mechanisms of Streptomycin Resistance: Selection of Mutations in the 16S rRNA Gene Conferring Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10), 2877-2884. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.10.2877-2884.2001>
- Stahlhut, S. G., Chattopadhyay, S., Struve, C., Weissman, S. J., Aprikian, P., Libby, S. J., ... Sokurenko, E. V. (2009). Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *klebsiella pneumoniae*. *Journal of Bacteriology*, 191(6), 1941-1950. <https://doi.org/10.1128/JB.00601-08>
- Stepanović, S., Vuković, D., Hola, V., Di Bonaventura, G., Djukić, S., Ćirković, I., & Ruzicka, F. (2007). Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*, 115(8), 891-899. https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2007.apm_630.x
- Stickland, H. G., Davenport, P. W., Lilley, K. S., Griffin, J. L., & Welch, M. (2010). Mutation of *nfxB* causes global changes in the physiology and metabolism of *Pseudomonas*

- aeruginosa. *Journal of proteome research*, 9(6), 2957-2967.
<https://doi.org/10.1021/PR9011415>
- Takahata, S., Ida, T., Hiraishi, T., Sakakibara, S., Maebashi, K., Terada, S., ... Tomono, K. (2010). Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents*, 35(4), 333-337.
<https://doi.org/10.1016/J.IJANTIMICAG.2009.11.011>
- Tarchouna, M., Ferjani, A., Ben-Selma, W., & Boukadida, J. (2013). Distribution of uropathogenic virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(6), e450-e453.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.01.025>
- Temel, A., & Erac, B. (2022). Investigating Biofilm Formation and Antibiofilm Activity Using Real Time Cell Analysis Method in Carbapenem Resistant *Acinetobacter baumannii* Strains. *Current Microbiology*, 79(9), 1-11. <https://doi.org/10.1007/S00284-022-02943-0/FIGURES/3>
- Theuretzbacher, U., Van Bambeke, F., Cantón, R., Giske, C. G., Mouton, J. W., Nation, R. L., ... Kahlmeter, G. (2015). Reviving old antibiotics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(8), 2177-2181. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv157>
- Tseng, S. P., Wang, S. F., Kuo, C. Y., Huang, J. W., Hung, W. C., Ke, G. M., & Lu, P. L. (2015). Characterization of fosfomycin resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from human and pig in Taiwan. *PLoS ONE*, 10(8).
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135864>
- Ustaçelebi, Ş. (Ed.). (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji* (1. Baskı). Ankara: Güneş Kitabevi.
- Van Bost, S., Jacquemin, E., Oswald, E., & Mainil, J. (2003). Multiplex PCRs for Identification of Necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(9), 4480-4482.
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.9.4480-4482.2003>
- Vargas, J. M., Moreno Mochi, M. P., Nuñez, J. M., Cáceres, M., Mochi, S., del Campo Moreno, R., & Jure, M. A. (2019). Virulence factors and clinical patterns of multiple-clone hypermucoviscous KPC-2 producing *K. pneumoniae*. *Heliyon*, 5(6), e01829.
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01829>
- Ventola, C. L. (2015). The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *Pharmacy and Therapeutics*, 40(4), 277. <https://doi.org/Article>

- Waksman, G., & Hultgren, S. J. (2009). Structural biology of the chaperone–usher pathway of pilus biogenesis. *Nature Reviews Microbiology* 2009 7:11, 7(11), 765-774. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2220>
- Watts, R. E., Hancock, V., Ong, C.-L. Y., Vejborg, R. M., Mabbett, A. N., Totsika, M., ... Schembri, M. A. (2010). *Escherichia coli* Isolates Causing Asymptomatic Bacteriuria in Catheterized and Noncatheterized Individuals Possess Similar Virulence Properties. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(7), 2449-2458. <https://doi.org/10.1128/JCM.01611-09>
- Willke, T. A., Söyletir, G., & Doğanay, M. (Ed.). (2008). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi* (3. Baskı). İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi.
- Wu, H., Moser, C., Wang, H. Z., Høiby, N., & Song, Z. J. (2014). Strategies for combating bacterial biofilm infections. *International Journal of Oral Science* 2014 7:1, 7(1), 1-7. <https://doi.org/10.1038/ijos.2014.65>
- Xu, S., Fu, Z., Zhou, Y., Liu, Y., Xu, X., & Wang, M. (2017). Mutations of the transporter proteins glpt and uhpt confer fosfomycin resistance in staphylococcus aureus. *Frontiers in Microbiology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/FMICB.2017.00914/FULL>
- Yamamoto, S., Nakano, M., Terai, A., Yuri, K., Nakata, K., Nair, G. B., ... Ogawa, O. (2001). The presence of the virulence island containing the USP gene in uropathogenic *Escherichia coli* is associated with urinary tract infection in an experimental mouse model. *Journal of Urology*, 165(4), 1347-1351. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(01\)69897-5](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(01)69897-5)
- Yousefi, B., Abdolshahi, A., Dadashpour, M., Pahlevan, D., Ghaffari, H., & Eslami, M. (2020). Evaluation of genes involved in the binding and invasion of *Klebsiella pneumoniae* including fimH-1, entB, iutA, rmpA and cnf-1 genes in patients with urinary tract infection. *Reviews in Medical Microbiology*, 2020, 0-000. <https://doi.org/10.1097/MRM.0000000000000322>
- Zhanel, G. G., Zhanel, M. A., & Karlowsky, J. A. (2018). *Intravenous Fosfomycin: An Assessment of Its Potential for Use in the Treatment of Systemic Infections in Canada*. <https://doi.org/10.1155/2018/8912039>
- Zhang, Y., Wang, H., Li, Y., Hou, Y., & Hao, C. (2021). Drug susceptibility and molecular epidemiology of *Escherichia coli* in bloodstream infections in Shanxi, China. *PeerJ*, 9, e12371. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.7717/peerj.12371>

Ekler

Ege Univ. Evrak Tarih ve Sayısı: 06/02/2020-E.40406



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Tıp Fakültesi Dekanlığı
Tıbbi Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 99166796-050.06.04
Konu : Etik Kurul Onayı 20-2T/26

Sayın, Doç. Dr. Bayrı ERAÇ
Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Kurulumuza başvurusunu yaptığınız " Klinik Enterobacteriaceae İzolatlarında Fosfomisin Direncinin Moleküler Epidemiyolojisi Ve Biyolojik Özelliklere Etkisi" konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz Onay kararı ekte sunulmaktadır.

Başvuru dosyasının araştırmanın yürütüleceği kuruma iletilerek kurum iznini gösterir belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin (daha öncesinde sunulmamış ise) Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Başvuru dosyası kapsamında, araştırma giderlerinin Bilimsel Araştırmalar Proje Koordinatörlüğü (BAP) tarafından karşılanacağını, ilişkin sunulmuş bulunan belge doğrultusunda, araştırmanızın desteklendiğine dair belgenin alınmasından sonra çalışmaya başlanması ve süreç içinde bu belgenin Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir.

Varsa Biyolojik Materyal Transfer Formu'nun imzaları tamamlanarak Kurulumuza iletilmesi gerekmektedir. 10.04.2016 tarih ve 29680 sayılı Resmi Gazete'de yayımlanan Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliğinde Değişiklik Yapılmasına Dair Yönetmeliğin 34. maddesinde "yurtdışına tetkik amaçlı numune gönderme yetkisi sadece ruhsatlı tıbbi laboratuvarlara aittir" ifadesi yer almakta olup bu madde Klinik Araştırmalar için de yürürlüğe girmiştir. Gönderilen insan kaynaklı biyolojik materyal klinik araştırma için gönderilse bile ruhsatlı bir tıbbi laboratuvar aracılığı ile <http://numunetransfer.saglik.gov.tr> adresindeki numune transfer yazılımı kullanılarak gönderilmesi konusuna dikkat edilmelidir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Şafak DAĞHAN
Kurul Başkanı V.

Ek: İlgili Etik Kurul Kararı (1 Adet aşı gibidir örneği
elden gönderilecektir)

Ege Üniversitesi Rektörlüğü Gençlik Cad. No:12 35040 Bornova/İzmir
Telefon No: +90 (232) 311 21 10 Faks No: +90 (232) 339 90 90
E-Posta: İnternet Adresi: www.ege.edu.tr

Bilgi İçin: Hasibe TERZİLER
Unvan: Bilgisayar İşletmeni
Telefon No: 2134

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununa göre Güvenli Elektronik İmza ile imzalanmıştır.

Teşekkür

Doktora çalışmam boyunca her daim yanımda olan ve bilimsel gelişimime katkıda bulunan, karşılaştığımız her sorunda fikirleriyle bana yol gösteren değerli hocam tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Bayrı ERAÇ'a,

Desteklerinden dolayı tez izleme komitesi üyesi değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Şafak ERMERTCAN ve Sayın Prof. Dr. Mehmet Emin LİMONCU'ya,

Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyeleri değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU'ya, Sayın Prof. Dr. Hüseyin TAŞLI'ya, Sayın Doç. Dr. Fethiye Ferda YILMAZ'a, Arş. Gör. Dr. Ayşegül ATEŞ DEĞİRMENCİ'ye, anabilim dalımız sağlık teknikeri Merih YÜKSEL'e,

Tez çalışmalarım sırasında laboratuvarımda bana eşlik ve yardım eden Helen Abdülsamed ÇELEBİ'ye, ve Selcan KAHRAMAN VATANSEVER'e, E.Ü Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın Dr. Öğretim Üyesi Mustafa KOTMAKÇI'ya, E.Ü Eczacılık Fakültesi FABAL çalışanlarına, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın Doç. Dr. İsmail ÖZTÜRK'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi Yamaç TEKİNTAŞ'a, ve Sayın Dr. Öğretim Üyesi Aybala TEMEL'e

Bu günlere gelmemi sağlayan sevgili annem Süveyda ÖKEER ve babam Ertaş ÖKEER'e, bana hayatı hayata daha farklı bakmayı, düşünmeyi, sorgulamayı öğreten değerli abim Emre ÖKEER'e, sevgili eşi Seda ŞENER ÖKEER'e ve yeğenlerim Can ÖKEER ve Atlas ÖKEER'e, ve son olarak hayat yolculuğuna beraber çıktığımız ve her zaman yanımda olan biricik eşim Nina ENTEZARİ ÖKEER'e teşekkür ederim.

Bu tez çalışması Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü "TDK-2020-21813" nolu proje ile desteklenmiştir.

İzmir, 10.08.2023

Mustafa ÖKEER

Özgeçmiş

İlk ve orta öğrenimimi Bursa’da Altıparmak Fethi Açıncıcek İlköğretim Okulu’nda tamamladıktan sonra 2006 yılında Ulubatlı Hasan Anadolu Lisesi’ni kazandım ve 2010 yılında mezun oldum. 2011 yılında kazandığım Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nden 2016 yılında mezun oldum ve aynı yıl eylül ayında Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı’nda doktora öğretimime başladım. 2017 yılının nisan ayında araştırma görevlisi olarak atandığım görevime halen devam ediyorum.

