



**T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KLİNİK BAKTERİ İZOLATLARINDA DEZENFEKTAN DİRENÇ
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

EREN BİÇER

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**HATAY
OCAK - 2022**



T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK BAKTERİ İZOLATLARINDA DEZENFEKTAN DİRENÇ
GENLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

EREN BİÇER

ORCID: 0000-0001-8735-6250

**BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Danışman
Prof. Dr. Birgül ÖZCAN
ORCID: 0000-0001-9003-8480**

**HATAY
OCAK-2022**

27/01/2022

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.

Eren BİÇER

ÖZET

KLİNİK BAKTERİ İZOLATLARINDA DEZENFEKTAN DİRENÇ GENLERİNİN BELİRLENMESİ

Dezenfektanlar, başta hastaneler olmak üzere diğer sağlık birimlerinde enfeksiyonun kontrol edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakteriler dezenfektanlara karşı farklı mekanizmalarla direnç göstermektedir. Dezenfektan dirençliliği genellikle bir veya daha fazla akış pompasının varlığı ve ifadesi ilgili olabilmektedir. Bu çalışmada, klinik bakteri izolatlarında *qacA/B*, *qacC/D*, *qacE*, *qacΔE1*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* ve *acrA* genlerinin varlığının ve dezenfektanların (bir kuaterner amonyum bileşiği ve bir bisguanid) bakteriler üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonlarının (MİK) belirlenmesi amaçlanmıştır. Toplam 40 klinik izolat, spesifik primerler kullanılarak ilgili genlerin varlığı yönünden PCR amplifikasyonu ile taranmıştır. Dezenfektan duyarlılığı agar dilüsyon yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. İzolatların tanımlanması, matris destekli lazer desorpsiyon/ionizasyon uçuş süresi kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) tekniği ile doğrulanmıştır. İzolatların 6 adedinde (%15) *qacΔE1* geni tespit edilmiştir. Benzalkonyum klorür ve klorhekzimid glukonat'ın gen pozitif *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* suşlarında MİK değerleri sırasıyla 32-256 mg/L ve 2-16 mg/L olarak belirlenmiştir. Sonuçlarımız, biyosite dirençli genlerin varlığı veya yokluğu ile klinik izolatlar *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'da gözlenen MİK'ler arasında bir ilişki olmadığını göstermiştir.

2022, 34 sayfa

Anahtar Kelimeler: Dezenfektan, Direnç geni, Klinik izolat, MİK

ABSTRACT

DETERMINATION of DISINFECTANT RESISTANCE GENES in CLINICAL BACTERIAL ISOLATES

Disinfectants are widely used to control infection, primarily in hospitals and other healthcare units. Bacteria are resistant to disinfectants by different mechanisms. Disinfectant resistance can often be related to the presence and expression of one or more efflux pumps. The aim of this study was to determine the presence of the *qacA/B*, *qacC/D*, *qacE*, *qacΔE1*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* ve *acrA* genes in clinical bacteria isolates and disinfectants (a quaternary ammonium compound and a bisguanide) minimum inhibitory concentration (MIC) values on bacteria. In total 40 clinical isolates were screened by PCR amplification of related genes using specific primers. The disinfectant susceptibility was carried out by agar dilution method. Identification of the isolates was confirmed by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) technique. The *qacEΔ* gene was detected in 6 isolates (15 %). MICs of bezalkonium chloride and chlorhexidine gluconate for gene positive *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* has been determined as 32 - 256 mg/L and 2-16 mg/L respectively. Our results imply that there was no relation between presence or absence of biocide resistant genes and MICs observed in clinical isolates *E. coli*, *K. pneumoniae*, and *P. aeruginosa*.

2022, 34 pages

Keywords: Disinfectant, Resistance genes, Clinical isolates, MICs

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez konusunun belirlenmesinde, araştırılması ve yazımı sırasında sahip olduğu bilgi birikimi ve tecrübesi ile çalışmayı yönlendiren ve her türlü yardımı esirgemeyen saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Birgül ÖZCAN'a sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarda yardım ve destek sunan Suphi TOHOĞLU ve Erhan TEK'e, manevi anlamda motivasyonumu sürekli yüksek tutmamı sağlayan Furkan GÜZELYURT ve Rahime OKÇU'ya, kimyasal talebimizi karşılıksız ve hızlı bir şekilde karşılayan Ataman Kimya A.Ş.'den Figen ASLAN'a teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında desteklerini esirgemeyen bu süreçte ellerinden geleni yapan annem Şükran BİÇER, babam Nebih BİÇER, kardeşlerim Esen ve Evren BİÇER'e ile ailemin diğer tüm fertlerine çok teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	V
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
1. GİRİŞ.....	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	6
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	10
3.1.Materyal.....	10
3.2. Yöntem.....	10
3.2.1 Bakteriler.....	10
3.2.2.Klinik İzolatlardan DNA İzolasyonu.....	10
3.2.3 Dezenfektan Direnç Genlerinin PZR ile Belirlenmesi.....	11
3.2.4 İzolatların İdentifikasyonu.....	12
3.2.5 Dezenfektanların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi.....	12
4.ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	14
4.1. Dezenfektan Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	14
4.2.Benzalkonyum Klorür ve Klorhekzimit'in Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Değerleri.....	18
4.3. İzolatların İdentifikasyon Sonuçları.....	23
5.SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	25
KAYNAKLAR.....	28
ÖZGEÇMİŞ.....	34

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1.	Çalışmada kullanılan primerler ve özellikleri.....	11
Çizelge 4.1.	Bakteriler ve izolasyon kaynakları.....	14
Çizelge 4.2	Benzalkonyum Klorür'ün minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri.....	20
Çizelge 4.3.	Klorhekzimit glukonat'ın minimum inhibisyon konsantrasyon değerleri.....	20



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1.	1-4 nolu bakteri suşlarından <i>qacA/B</i> (1-4) ve <i>qacΔE1</i> (7-10) genlerinin PZR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi	15
Şekil 4.2.	21 ve 23-25 nolu bakteri suşlarından <i>qacA/B</i> (1-4), <i>qacΔE1</i> (6-9) ve <i>qacE</i> (10-14) genlerinin PZR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi.....	16
Şekil 4.3.	13, 15, 17 ve 18 nolu bakteri suşlarından <i>qacA/B</i> (1-4), <i>qacΔE1</i> (6-9) ve <i>qacE</i> (10-14) genlerinin PZR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi.....	16
Şekil 4.4.	22, 27, 28, 30, 33, 34, 50, 67 nolu bakteri suşlarından <i>qacA/B</i> (1-4), <i>qacΔE1</i> (6-9) ve <i>qacE</i> (10-14) genlerinin PZR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi.....	17
Şekil 4.5.	Benzalkonyum Klorür'ün agar dilüsyon MİK sonuçları.....	19
Şekil 4.6.	Klorheksimit Glukonat'ın agar dilüsyon MİK sonuçları.....	19
Şekil 4.7.	Tür tanımlaması için MALDI-TOF MS analiz skor değerleri.....	23
Şekil 5.1.	<i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> ve <i>P. aeruginosa</i> suşlarında <i>qacΔE</i> genine ait PZR sonuçları.....	26

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

L	: Litre
M	: Molar
μ M	: Mikromolar
mL	: Mililitre
μ L	: Mikrolitre
bp	: Baz çifti
kob	: Koloni oluşturan birim

KISALTMALAR

QAC	: Kuaterner amonyum bileşikleri
KAB	: Kuaterner amonyum bileşikleri
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
RNA	: Ribonükleik asit
rRNA	: Ribozomal ribonükleik asit
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyon
MBK	: Minimal bakterisidal konsantrasyon
MDR	: Çoklu ilaç direnci
ARG	: Antibiyotik direnç geni
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
TBE	: Tris borat edta
dNTP	: Deoksiribo nükleozid trifosfat
BHI	: Brain heart infusion

1. GİRİŞ

Hastane ve diğer sağlık birimlerinde enfeksiyonun kontrol edilmesinde antiseptik ve dezenfektan kullanımı oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Dezenfektanlar kimyasal özellikleri yönünden oksitleyici ve oksitleyici olmayan şeklinde iki geniş başlık altında gruplandırılabilir. Oksitleyici dezenfektanlar arasında halojenler, klor, iyot, brom ve klor dioksit ve perasetik asit ve hidrojen peroksit gibi oksijen salıcı kimyasallar bulunur. Oksitleyici olmayan dezenfektan grubuna ise kuaterner amonyum bileşikler, amfoterikler, biguanitler ve asit anyonikler girmektedir (Fisher, 2003). Bunlar arasında halojen içerikli iyodoforlar ve klor bileşikler, kuaterner amonyum bileşikler (KAB), peroksitler, fenoller, glutaraldehit ve biguanitler yaygın olarak kullanılmaktadır (Chapman J.S., 2003; CDC, 2008; Gnanadhas D.P., 2012).

İyodoforlar, iyot ile birlikte çözücü bir ajan içeren çözeltilerdir ve iyot salınımına neden olurlar. Küçük bir molekül olan iyot, mikroorganizmaların hücre duvarı ve membranına hızla nüfuz ederek proteinlerini, nükleotidleri ve yağ asitlerini oksitler ve sonunda hücre ölümüne yol açar (Lepelletier ve ark., 2020; Chauret, 2014).

KAB'ler katyonik deterjan (sürfektan veya yüzey aktif ajanlar) yapısında olup bakteri sitoplazmik membranı ile etkileşime girerek fiziksel ve iyonik stabilitesinin bozulmasına neden olurlar. KAB'lerden benzalkonyum klorür bileşikler hücre zarına iyonik ve hidrofobik etkileşimlerle bağlanarak zar özelliklerinin ve işlevinin değişmesine devamında ise zar ve hücre bütünlüğünü bozarak hücre içi bileşenlerin sızması neden olmaktadır (Ferreira ve ark., 2011; Morente ve ark., 2013). Membran aktif özellikte olan bu kimyasallar membranın yanı sıra DNA'ya bağlanarak hücre içerisinde de etki göstermektedirler (Wessels ve Ingmer, 2013; Gerba, 2015).

Peroksitler, oksidatif biyositler olup duyarlı kimyasal gruplardan elektronları uzaklaştırarak oksitlenmelerine ve kendilerinin indirgenmesine neden olan ajanlardır. Özellikle, membran lipitleri, DNA ve diğer temel hücre bileşenlere atak yapabilen yıkıcı serbest radikalleri üreterek etkilerini göstermektedirler (Block, 2001; Finnegan ve ark., 2010).

Fenol, antiseptik cerrahi amacıyla mikrop öldürücü olarak ilk kullanımından itibaren hastane dezenfeksiyonunda önemli bir yere sahip olmuştur. Son 30 yıl içerisinde ise daha çok fenol türevleri veya fenolik bleşiklerin antimikrobiyal özellikleri çalışılmaya başlanmıştır. Fenol türevleri, aromatik halka üzerindeki hidrojen atomlarından birinin

yerine alkil, fenil, benzil, halojen gibi fonksiyonel bir grup geçtiğinde oluşan bileşiklerdir. Yüksek konsantrasyonlarda fenol, hücre duvarına nüfuz ederek parçalamakta ve hücre proteinlerini çökeltirerek yüksel etkili bir protoplazmik zehir gibi işlev görmektedir. Düşük konsantrasyonlardaki fenol ve yüksek moleküler ağırlıklı fenol türevleri, temel enzim sistemlerini inaktive etmekte ve hücre duvarından temel metabolitlerin sızması yoluyla bakterilerin ölümüne neden olmaktadır (Kahn, 1970; Prindle, 1983).

Klorlu bileşikler geniş bir antimikrobiyal aktivite spektrumuna sahip, toksik kalıntı bırakmayan, su sertliğinden etkilenmeyen, düşük maliyetli ve hızlı etki gösteren kimyasallardır. Serbest klorun mikroorganizmaları yok ettiği kesin mekanizma bilinmemektedir ancak birden fazla yöntemle etki gösterdiği kabul edilmektedir; enzim ve amino asitlerde sülfidril gruplarının oksidasyonu, amino asitlerde halka klorinasyonu, hücre içeriği kaybı, hücreye besin alımının azalması, protein sentezinin inhibisyonu, oksijen alımının azalması, solunum bileşenlerinin oksidasyonu, adenosin trifosfat üretiminin azalması, DNA'da kırık oluşması ve DNA sentezinin baskılanması. Klorun bu mekanizmaların kombinasyonu ya da kritik bölgeler üzerindeki etkisiyle mikrobisidal etkisini gösterdiği kabul edilmektedir (Dychdala, 2001; Gerba ve Rusin, 2001).

Glutaraldehit, etki düzeyi yüksek dezenfektan ve kimyasal sterilant olarak geniş kabul görmüş doymuş bir dialdehittir. Mikroorganizmaların amino, sülfhidril, hidroksil ve karboksil gruplarının alkilleyerek biyosidal aktivite göstermektedir. Tüm bunların sonucunda RNA, DNA ve protein sentezi etkilenmektedir (Scott ve Gorman 2001, 1991).

Biguanidler, guanidin türevleridir ve genellikle polimerik yapıda olup tuz formundadırlar. Kimyasal olarak katyonik yapıdadırlar ancak yüzey aktif olarak kabul edilmezler. Polimerik biguanidler hücre zarının iki değerlikli katyonlarla stabilizasyonunu ve lipopolisakkarit yapıyı bozarak hücreye girerler (Gnanadhas, 2012; Fisher, 2003).

Dezenfektanlar yaygın kullanılan kimyasallardır ve formülasyonları, hedeflenen mikroorganizmaların minimum inhibitör konsantrasyonunun (MİK) çok üzerindeki seviyelerde aktif bileşenler içerirler. Uygun olmayan dezenfektan uygulaması, deşarj ortamındaki seyrelme ve biyolojik bozunma, biyosit konsantrasyonunda derecelenmelere neden olmaktadır. Bu nedenle, mikroorganizmalar sıklıkla öldürücü olmayan (sub-inhibitör) biyosit konsantrasyonlarına maruz kalırlar. Son yıllardaki çalışmalar, sub-inhibitör düzeylerde biyosit konsantrasyonlarına maruz kalmanın, biyosite karşı direnç

gelişmesini kolaylaştırdığı ve ayrıca antibiyotik gibi diğer antimikrobiyal ajanlara karşı birlikte- ve çapraz-dirence yol açabileceği bildirilmiştir (Tezel 2015).

Antibiyotik uygulmasındaki gibi biyosit direncinin tanımıyla ilgili epidemiyolojik veriler son derece sınırlıdır (Morrisey ve ark., 2019). Dünya çapında antibiyotikler için kılavuzlar bulunmasına rağmen, dezenfektanlar için ortaya konmuş belirli standart değerler bulunmamaktadır. Bakteri üremesini önleyen en düşük madde dozu minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ile ifade edilir. Dolayısıyla biyosit ile ilgili MİK değerleri direncin bir göstergesi olarak kabul edilebilir ve klinisyenler tarafından tedavinin başarısını ölçmede bu konsantrasyonları bir kriter gibi kullanabilir. Ancak dezenfektanların MİK değerlerinin belirlenmesine yönelik az sayıda çalışma bulunmaktadır (Febler ve ark., 2018; Uzunbayır-Akel ve ark., 2020).

Son on yıllarda çoklu ilaç direncine sahip bakterilerin (MDR) ortaya çıkışı, antibiyotik direnci ile birlikte önemli bir küresel sorun haline gelmiştir (Roca ve ark., 2015). Dolayısıyla günümüzde tıbbi ortamlar ve endüstriyel sahada istenmeyen bakteri üremesine karşı en uygun koruma dezenfektanlar ve gelişmiş biyogüvenlik önlemleriyle sağlanmaktadır (Bragg ve ark., 2018). Ancak, bilimsel yönetim ve uygun planlamanın yapılmaması, dezenfektanların aşırı miktarlarda ve yanlış kullanılması antibiyotik direnç genlerinin (ARG) artmasına neden olmaktadır (Kim ve ark., 2018). Örneğin, klorlama işleminin yapıldığı atık su arıtım tesisleri ve yüksek oranda fungusite maruz kalan sera topraklarında ekstraselüler ve intraselüler ARG miktarlarının yüksek olduğu tespit edilmiştir (Bai ve ark, 2015; Zhang ve ark, 2020). Yukarıda da değinildiği gibi çevrede seyreli ve kalıntı halinde bulunan dezenfektanlar bakterilerde fenotipik adaptasyon, gen mutasyonu ve yatay gen transferi toleransı arttırabilmektedir. Ayrıca bakterilerin sürekli olarak dezenfektanlara maruz kalması dezenfektana adaptasyon ve toleransın gelişmesine neden olmaktadır. Dezenfektanlara dirençli bakterilerin üreme hızları yüksek olmakta ve buna bağlı olarak dezenfektanların öldürme verimliliği büyük ölçüde azalmaktadır. Çoklu ilaç direncine sahip bakteriler ve çoklu ilaç direnç genlerinin sıklığı insan sağlığı ve ekosistem için ciddi bir tehdit oluşturmaktadır. Dezenfektan direnç mekanizması hakkındaki raporların yeterince kapsamlı olmaması ve dezenfektan direnci yayılmasına fazla değinilmemiştir. Bu nedenle dezenfektan direnç probleminin çözümünde dezenfektan direnç mekanizmalarının kapsamı ve direnci etkileyen

faktörlerin belirlenmesi oldukça önem kazanmıştır (Thong ve ark., 2021; Zhu et al., 2020; Cazares ve ark., 2020).

Bakteriler, biyosidal kimyasalların neden olduğu zararlı etkiyi önlemek için çeşitli mekanizmalar kullanırlar. Bu mekanizmalar, bakteri hücrelerine zarar vermeyecek şekilde biyosit konsantrasyonunun azaltılması ve bakterinin hasarları onarma yeteneği ile ilişkilidir. Hasar onarımı etkili şekilde gerçekleştirilmediği veya yüksek metabolik aktivite gibi nedenlerden dolayı daha kötüleştiği durumlarda bakteri hücresinde ölüm gerçekleşecektir (Maillard, 2018). Bakteriler çevrelerinde bulunan dezenfektanlara karşı direnci, biyofilm oluşumu, hücre zarı geçirgenliğinin değişmesi, hücre dışına pompalama, enzimatik yıkım ve hedef bölgelerin değiştirilmesi mekanizmalarıyla gerçekleşmektedir (Thong ve ark., 2021).

Bakterilerde yaygın olarak bulunan dışa atım pompaları (efflux pumps), bakteri hücrelerine giren antimikrobiyal konsantrasyonunun azalmasına katkıda bulunurlar. *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium ve *Acinetobacter baumannii*'de antimikrobiyal aktivite üzerinde özellikler aktif pompalamanın etkili olduğu belirlenmiştir. Dışa atım pompaları 5 ana sınıf altında gruplandırılmıştır; ilaç/metabolit taşıyıcı süperfamilyası, temel kolaylaştırıcı süperfamilyası, ATP bağlayıcı kaset familyası, direnç-nodülasyon-bölünme familyası ve çoklu ilaç ve toksik bileşik atım familyası (Piddock, 2006; Poole, 2002). Dışa atım pompalarının tek başına biyositlere/biyosidal ürünlere direnç kazandırma yeteneğinin bulunup bulunmadığı net değildir. Ancak bu pompaların biyosidalden kurtulma mekanizmalarının bir parçası olma ihtimalinin yüksek olduğu bildirilmiştir. Antimikrobiyal ajanlar arasında özellikle biguanid ve kuaterner amonyum bileşiklerinin yoğun olarak kullanıldığı ortamlardan izole edilerek biyositlere karşı duyarlılığı azaldığı tespit edilmiş bakteri izolatlarında *qacA/B*, *norA*, *norB* ve *smr* gibi dışa atım pompa genlerinin dağılımının yüksek olduğu belirtilmiştir (Maillard, 2018).

Hastanelerde enfeksiyonları önlemek ve kontrol altına almak için çoğunlukla dezenfektanlar kullanılmaktadır. Ancak benzalkonyum klorür ve klorheksidin gibi dezenfektanların aşırı kullanımı, suşlar üzerinde seçici baskı oluşturarak dezenfektan direnç genlerinde geniş bir dağılıma yol açmıştır. Birçok dezenfektan direnç geni tanımlanmış olup bunlardan *qacA/B*, *qacC/D*, *qacE*, *qacΔE1*, *qacG*, *qacH* ve *qacJ* kuaterner amonyum bileşiklerine direnç durumlarında saptanmış ve plazmidal genlerdir.

Qac, kuaterner amonyum bileşiklerinin kısaltmasıdır, ancak bu bileşiklere karşı duyarlılığın azalmasını sağlayan tüm genler için bu kısaltma kullanılmamıştır (Wassenaar ve ark., 2015; Thong ve ark., 2021). *Qac* genlerinden A ve B, temel kolaylaştırıcı süperfamilyasının üyesidir ve basit PZR ile ayırt edilmesi zor olan yedi ila dokuz baz haricinde dizileri birbirine çok benzemektedir, bu nedenle *qacA/B* geni olarak ifade edilmektedir. Bu genlerin benzalkonyum klorür, biguanidler, klorheksidin direnci ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir. Diğer *qac* genlerinden *C*, *D*, *E*, ΔEI , *G*, *H* ve *J* çoklu ilaç atım familyasına dahildirler. Farklı promotör dizilerine sahip olmalarına rağmen dizileri aynı olan *qacC* ve *qacD* genleri *qacC/D* olarak ifade edilmektedir. Ayrıca *qacC* geni stafilokokkal çoklu ilaç direnç geninin kısaltması olan *smr* ile eş anlamlı olarak da kullanılmaktadır (*qacC/smr*). Benzalkonyum klorür, klorheksidin ve setrimid direncinde rol alabilecekleri bildirilmiştir. *qac\Delta EI* geni *qacE*'den evrimleşmiştir. Delesyonel mutasyon sonucunda ortaya çıkan *qac\Delta EI* geninin yüksek benzalkonyum klorür MİK değerinde sorumlu olduğu belirtilmiştir. Diğer bir gen olan *qacF* *qacE* genine %67,8 oranında benzerlik göstermektedir. Benzalkonyum klorür ve setiltrimetilamonyum direnciyle ilişkisi gösterilen *qacG*, *H* ve *J* genleri benzer amino asit sayısına sahip proteinler olarak tanımlanmıştır (Zou ve ark., 2014; Liu ve ark., 2015; Wassenaar ve ark., 2015; Thong ve ark., 2021). Gram negatiflerde antibiyotik, deterjan, boya ve organik çözücüler dahil olmak üzere çok geniş yelpazedeki antimikrobiyal bileşikleri hücreden çıkaran çoklu ilaç atım pompası olan AcrAB-TolC üçlünün parçası olan AcrA periplazmik proteindir ve direnç-nodülasyon-bölünme aile familyasına dahildir (Perez ve ark., 2012).

Tez kapsamında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler biyoloji laboratuvarındaki bakteri koleksiyonunda yer alan hastane kökenli klinik izolatlarda *qacA/B*, *qacC/D*, *qacE*, *qac\Delta EI*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* ve *acrA* direnç genlerinin varlığı PZR ile belirlenmiş, bant saptanan izolatların identifikasyonu yapılarak bu izolatlar üzerinde iki farklı dezenfektanın minimum inhibisyon konsantrasyonları belirlenmiştir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Gram negatif bakterilerde üç kısımdan meydana gelmiş ve çoklu ilaç dışa atım pompa sistemi olan AcrAB-TolC'de bileşenlerin dirençlilik üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla iki adet klinik *Enterobacter cloacae* izolatında AcrA ve TolC bileşenleri delesyona uğratılmış ve antibiyotik direncinin azaldığı belirlenmiştir (Perez ve ark., 2012).

Çoklu ilaç dirençliliği gösteren *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'nin başlıca hastane patojeni olarak rol adığı Suudi Arabistan hastanelerindeki hastalardan izole edilen ve üç veya daha fazla antimikrobiyal antibiyotik sınıfına dirençli 44 MDR izolatında (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*) polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile biyosit dirençliliği genleri (*qacA*, *qacE* ve *cepA*) taranmıştır. İzolatlarda *qacA* geninin mevcut olmadığı, izolatların tümünde en yüksek oranda *cepA*'nın bulunduğu ve yalnızca *P. aeruginosa* *qacA*'nın tespit edilmediği bildirilmiştir. Çalışmada benzalkonyum klorür, setrimit ve klorheksidin glukonat olmak üzere üç biyositin in vitro duyarlılık testleri, broth mikrodilüsyon yöntemiyle test edilmiştir ve biyositlere karşı MİK değerlerinin 8 ile >512 g/mL arasında değiştiği gösterilmiştir (Vijayakumar ve ark., 2018)

2010-2012 yılları arasında Tahran ve İshafan'da (İran) bulunan hastanelerin yanık ünitelerinden toplanan 83 *Pseudomonas aeruginosa* ve 5 *Acinetobacter baumannii* izolatında *qacE* ve *qacΔEI* antiseptik direnç genlerinin varlığı PZR ile belirlenmiştir. Çalışma sonucunda *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarının yarısında, *Acinetobacter bumanii* izolatlarının ise %40'da *qacE* geninin, tüm izolatların %80'den fazlasında ise *qacΔEI* geninin bulunduğu (Mahzounieh ve ark., 2014).

Yin ve ark. (2008) çoklu ilaç direnci gösteren 31 *Acinetobacter baumannii* izolatında plazmidal kodlanan direnç genlerini PZR ile belirlemişlerdir. İzolatların %80,6'nın *qacEDAI* geni yönünden pozitif olduğu rapor edilmiştir.

Hastane ortamından 2014-2015 yılları arasında izole edilmiş karbapenem dirençli 51 *Acinetobacter baumannii* izolatında dezenfektan direnç genleri olan *qacA/B*, *qacC/D*, *qacE*, *qacΔEI*, *qacG*, *qacJ* ve β -laktamaz'ın varlığı PZR ile belirlenmiş ve çalışma sonucunda izolatların %96'da *qacΔE*, %31,4'de *qacE*, %23,4'de *qacG* ve %23,5 ve %14'de *qacA/B* bulunduğu ve *qacC/D* and *qacJ* genlerine ise rastlanmadığı bildirilmiştir.

Ayrıca çalışma kapsamında benzalkonyum klorür ve klorheksidinin izolatlar üzerindeki MİK değerleri broth mikrodilüsyon yöntemiyle belirlenmiş ve her iki dezenfektan için MİK değerlerinin 4 ile 64µg/L arasında olduğu tespit edilmiştir (Liu ve ark., 2017).

Çin’de 2016-2018 yılları arasında Sun Yat-sen Üniversite hastanesindeki hastalardan izole edilen karbapenem dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* suşlarında PZR ile *qacEΔ1*, *qacA/B* ve *cepA* genlerinin varlığı ve ortamdaki konsantrasyonları 1-512 mg/L arasında değişen üç dezenfektanın (klorheksidin, trikloroizosiyanurik asit ve povidon iyodin) MİK ve minimum bakterisidal (MBK) değerleri mikrobrot dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. 36 *K. pneumoniae* izolatından 15’nde ve 14 *E. coli* izolatından 8’nde *qacEΔ1* geninin mevcut olduğu ve bu genin idofor direnç mekanizmasında rolü olabileceği bildirilmiştir (Chen ve ark., 2020).

Azadpour ve ark., (2015), Aralık ve Eylül 2012 tarihleri arasında İran’ın Lorestan kentindeki hastanelerde yatan hastaların idrar, balgam, lezyon, kan ve diğer numunelerinden rastgele topladıkları 85 *K. pneumoniae* izolatına QAC grubu dezenfektanlardan didesil dimetil amonyum klorürün mikrobrot dilüsyon yöntemi ile MİK değeri belirlenmiştir. *Klebsiella* izolatlarındaki antimikrobiyal direnç genleri olan *qacΔE1* ve *cepA*’nın varlığı ise PZR le belirlenmiştir. İzolatların %73’de *qacΔE1* varlığı belirlenmiş ve geni içeren izolatların dezenfektana daha az duyarlı olduğu bildirilmiştir.

Capital Medical Üniversitesine bağlı Beijing Tiantan Hastanesinde (Pekin, Çin) yatan hastaların kan, idrar, dışkı, yara, steril vücut sıvısı, balgam ve diğer örneklerinden 2011 ve 2013 yılları arasında izole edilen karbapenem dirençli toplam 27 *K. pneumoniae* suşu üzerinde 7 dezenfektanın MİK ve MBK değerleri ve PZR ile suşların direnç genleri (*qacA*, *qacDE*, *qacE* ve *acrA*) içerip içermediği araştırılmıştır. İzolatların etil alkol, klorheksidin asetat ve iyodofor gibi yaygın olarak kullanılan kimyasal dezenfektanlara karşı nispeten yüksek direnç gösterdiği, suşların %59, 41, 19 ve 15’nin *qacDE*, *qacA*, *acrA* ve *qacE*, %15’nin *acrA*, *qacDE* ve *qacA*’yı ve %26’nın hem *qacA* hem de *qacDE*’yi taşıdığı tespit edilmiştir. Direnç genlerinin daha yüksek MİK değerleri ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Guo ve ark., 2015).

Kazama ve ark. (1998), 63’ü klinik izolat olan toplam 78 *Pseudomonas* suşu ile yaptıkları PCR çalışmasında 48 suşun *qacE* ve *qacEΔ1* genleri yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

Eppendorf Üniversitesi’de (Hamburg-Almanya) klinik örneklerden izole edilmiş bakterilerde direnç geni ve dezenfektan (benzalkonyum klorür ve setiltrimetilamonyum bromür) duyarlılığının (MİK) belirlendiği çalışmada toplam 63 *P. aeruginosa* suşundan %65,1’inin *qacEΔ1* ve %23.8’inin *qacE* genini içerdiği tespit edilmiştir. Çalışmada benzalkonyum klorüre direncin sadece *P. aeruginosa* suşlarında tespit edildiği ve benzalkonyum klorüre direncin veya artmış MİK değerlerinin *qacE* veya *qacEΔ1* genlerinin varlığıyla ilişkili olmadığı bildirilmiştir (Kücken ve ark., 2000).

Abuzaid ve ark. (2012), 2006-2008 yılları arasında Edinburgh Royal Infirmary hastanesindeki farklı enfeksiyon bölgelerinden izole ettikleri altmış dört *K. pneumoniae* suşunda *cepA*, *qacΔE* ve *qacE* genlerinin varlığını ve beş dezenfektanın suşlar üzerindeki MİK değerlerini belirlemişlerdir. Suşlardan sırasıyla 50, 49 ve 53 adedinin klorheksidin, Trigen ve benzalkonyum klorüre karşı duyarlılığının azaldığı, direnç genlerinden *cepA*, *qacΔE* ve *qacE*’nin sırasıyla 56, 34 ve bir izolatta tespit edildiği bildirilmiş ve klinik *K. pneumoniae* izolatlarında dışa atım pompa genleri, *cepA*, *qacΔE* ve *qacE*’nin mevcudiyeti ile azalmış biyosit duyarlılığı arasında yakın bir bağlantı olduğu bildirilmiştir.

Daha önce klorheksidine maruz kalmamış farklı servislerde bulunan 3 hastadan (Wenzhou Tıp Fakültesi Hastanesi, Wenzhou-Çin) 2015 yılında izole edilen üç adet klinik *K. pneumoniae* suşu klorheksidine maruz bırakılarak adaptasyonu sağlanmış ve bu suşlarda dışa atım pompaları olan *qacΔE* ve *qacE* genlerine rastlanmadığı adaptasyonla artan direncin *cepA* geni ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (Zhang ve ark., 2019)

2006 yılında ABD’de perakende satışa sunulan etlerden izole edilen 570 *Escherichia coli* suşunda kuaterner amonyum bileşiklerine dirençten sorumlu olduğu bilinen genlerin dağılımı ve bu dağılımın kuaterner amonyum bileşikleri ve diğer antimikrobiyallere olan dirençle ilişkisinin incelendiği çalışmada 10 direnç geninin varlığı PZR ile taranmıştır. (*qacE*, *qacΔE1*, *qacF*, *qacG*, *emrE*, *sugE(c)*, *sugE(p)*, *mdfA* ve *ydgE/ydgF*) varlığı açısından taranmıştır. İzolatlar üzerinde 6 dezenfektanın (N-alkil dimetil benzil amonyum klorür, setiltrimetilamonyum bromür, hekzadesiltrimetilamonyum bromür, setilpiridinyum klorür, klorheksidin ve triklosan) MİK değerleri agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir. Sonuç olarak izolatlarda *emrE*, *sugE(c)*, *mdfA* ve *ydgE/ydgF* genlerinin yaygın, *qac* genlerinin ise daha düşük düzeyde bulunduğu ve bunlardan *qacΔE1* ve *sugE(p)*’nin varlığının yüksek MİK değerleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir.

Setiltrimetilamonyum bromüre dirençli 40 adet klinik koagülaz negatif *Staphylococcus* izolatlarında çoklu ilaç taşıyıcı genlerden *qacA* veya *qacC* veya her iki genin mevcut olduğu ve bu genlerin plazmit üzerinde kodlandığı bildirilmiştir (Leelaporn ve arkadaşları (1994).

Tahran’da (İran) bir hastaneden 6 ay boyunca hastane enfeksiyonu olduğundan şüphelenilen hastalardan izole edilen 102 *E. coli* suşunda *qacE* ve *qacΔE1* pompa genlerinin varlığı PZR ile ve hastanede dezenfektan olarak kullanılan kuaterner amonyum bileşiği sınıfına ait didesil di-metil amonyum klorürün izolatlar üzerindeki MİK değerleri broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir. Suşların büyük kısmında maksimum 0,0078 mg/L düzeyinde MİK değerinin ve MİK değeri %96.9 olan suşlarda *qacE* geni ve %93.7 olan suşlarda ise *qacΔE1* geninin bulunduğu tespit edilmiştir (shafaati ve ark., 2016).

Kanatlı endüstrisinde kuaterner amonyum bileşiklerinin yüksek oranda kullanılması nedeniyle İbrahim ve arkadaşlarının (2019) Mısır’daki piliçlerden izole ettikleri *E. coli* suşlarında antibiyotik ve dezenfektan direnç genleri olan *tetA*, *qacED1* ve *qacA/B* varlığını PZR ile belirledikleri çalışmada izolatların %70,6’da *qacΔE1*, %14,7’de ise *qacA/B* geninin bulunduğu bildirilmiştir.

İran Qazvin’de hastanede yatan hastalardan izole edilen *E. coli*’de *qacE* ve *qacΔE1* genlerinin sıklığı ve disk difüzyon yöntemi ile anti mikrobiyal ajanlara dirençliliğin belirlendiği çalışmada, izolatların %4,9’nun *qacE*, %60,8’nin *qacΔE1* ve %9,8’nin her iki geni taşıdığı ve QAC direnci ile çoklu ilaç dirençliliği profili arasında anlamlı bir ilişkinin bulunduğu bildirilmiştir (Habibollah-Pourzereshki ve ark., 2020).

Farklı coğrafyalardaki klinik *Staphylococcus aureus* izolatlarıyla yapılan çalışmalarda izolatların *qacA/B* ve/veya *qacC* genlerini taşıdıkları bildirilmiştir (Mayer ve ark., 2001; Sidhu ve ark., 2002; Alam ve ark., 2003; Wang ve ark., 2008; Longtin ve ark., 2011; Zmantar ve ark., 201; Temiz ve ark., 2014; Paniagua-Contreras ve ark., 2014; Vali ve ark., 2017; Damavandi ve ark., 2017; Do Vale ve ark., 2019; Hong ve ark., 2019; Akin ve ark.,2020).

3.MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Tez aşamasında kullanılan genomik DNA saflaştırma kiti, safe-T-stain, DNA marker, Müller Hinton agar/broth, Brain heart infusion (BHI) agar/broth, 10X TBE tamponu, NaCl, Lizozim, 10X PZR tamponu, dNTP, MgCl₂, Taq polimeraz, agaroz, klorhekzidin ve benzalkonyum klorür, Thermofisher, Bmlabosis, Biomatik, Sigma, Merck ve Ataman Kimya'dan temin edilmiştir.

Çalışma kapsamında kar buz makinası, termal ısı döngü cihazı, statik etüv, otomatik pipet, hassas terazi, otoklav, laminar kabin, vorteks, yatay jel elektroforezi, güç kaynağı, soğutmalı santrifüj ve UV-transluminatör cihazı kullanılmıştır.

3.2. Yöntem

3.2.1. Bakteriler

Tez kapsamında H.M.K.Ü, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji laboratuvarındaki bakteri koleksiyonunda yer alan bakteri suşları kullanılmıştır. Gliserol stokları halinde muhafaza edilen izolatlar Brain Heart Infusion (BHI) besi yerinde pasajlanarak aktiveleştirilmiş ve agar ortamında saflık kontrolleri yapılmıştır.

3.2.2. Klinik İzolatlardan DNA İzolasyonu

BHI ortamındaki kültürlerden DNA izolasyonu genomik DNA ekstraksiyon kiti (Thermo Fischer Genomic DNA Purification Kit, K0512) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Saflıkları kontrol edilen izolatların 18-24 saatlik sıvı kültürleri hazırlanmıştır. Sıvı kültürlerden santrifüjle elde edilen hücre peleti iki kez steril % 0,3 NaCl ile yıkanarak tekrar santrifüjlenmiştir. Süpernatantı dikkatlice ayrılan hücre peletinden DNA izolasyonu, kit üretici firmanın kullanım talimatı doğrultusunda gerçekleştirilmiştir. Ayrıca Gram pozitif izolatlardan DNA izolasyonu aşamasında kitte

önerildiği şekilde taze hazırlanan 20 mg/ml lizozim çözeltisi kullanılmıştır. Elde edilen DNA örnekleri % 0,8 agaroz jelde yürütülerek kontrol edilmiş ve PZR çalışmalarına kadar -20 °C’de saklanmıştır.

3.2.3. Dezenfektan Direnç Genlerinin PZR ile Belirlenmesi

Çalışmada kapsamında antimikrobiyal madde direncinden sorumlu 8 farklı gen bölgesi, bu bölgelere ait primer çiftleri ve çoğaltılan bölge büyüklükleri (bp) çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan primerler

Gen	Primer çiftleri	Amplikon büyüklüğü (bp) ve referans
<i>qacA/B</i>	5’-GCTGCATTTATGACAATGTTTG-3’ 5’-AATCCCACCTACTAAAGCAG-3’	629 bp (Guo ve ark., 2015)
<i>qacC/D</i>	5’GGCTTTTCAAAATTTATACCATCCT-3’ 5’-ATGCGATGTTCCGAAAATGT-3’	249 bp (Liu ve ark., 2017)
<i>qacΔE</i>	5’-TAGCGAGGGCTTTACTAAGC-3’ 5’-ATTCTGAAATGCCGAACACCG-3’	335 bp (Mahzounieh ve ark., 2014)
<i>qacE</i>	5’-GCCCTACACAAATTGGGAGA-3’ 5’-TTAGTGGGCACTTGCTTTGG-3’	350 bp (Guo ve ark., 2015)
<i>qacG</i>	5’-CAACAGAAATAATCGGAAC-3’ 5’-TACATTTAAGAGCACTACA-3’	275 bp (Prag ve ark., 2014)
<i>qacH</i>	5’-ATAGTCAGTGAAGTAATAG-3’ 5’-AGTGTGATGATCCGAATGT-3’	295 bp (Prag ve ark., 2014)
<i>qacJ</i>	5’-CTTATATTTAGTAATAGCG-3’ 5’-GATCCAAAAACGTTAAGA-3’	306 bp (Prag ve ark., 2014)
<i>acrA</i>	5’-CCTCAAGTTAGCGGGATTAT-3’ 5’-ACCGTCCTGCGGGAACCTTAA-3’	567 bp (Guo ve ark., 2015)

Herbir örnek için PZR aşaması 20 µl’lik reaksiyon hacminde gerçekleştirilmiştir. PZR reaksiyon ortamı, PZR tamponu, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, primerçiftleri 20 pmol, 5U/µl Taq DNA Polimeraz ve bakteri DNA’sı içermektedir. Her PZR reaksiyonuna negatif kontroller dahil edilmiştir. PZR reaksiyonu koşulları; *qacA/B*, *qacΔE*, *qacE* ve *acrA* gen bölgeleri için 94 °C’de 3 dakika ön denatürasyon, devamında 30 döngülük 94 °C’de 45 saniye DNA denatürasyonu, 53 °C’de primer birleşmesi, 72 °C’de 50 saniye polimerizasyon işlemi ve son aşamada 72 °C’de 10 dakika final uzaması olacak şekilde

gerçekleştirilmiştir. Diğer bölgelerden *qacC/D* için primer birleşme sıcaklığı ve süresi 56 °C’de 35 saniye ve *qacG*, *qacH* ve *qacJ* bölgeleri için 44 °C’de 55 saniye uygulanmıştır.

PZR işlemi sonrasında ürünlerin görüntülenmesi için % 1’lik Agaroz jel kullanılmıştır. Agaroz, Tris borat edta tamponu (10X TBE) ile hazırlanmıştır. DNA bantlarının görüntülenmesi amacıyla agaroz ortamına Safe-T-stain (5µl/100ml) ilave edilmiştir. Amplifikasyon ürünleri jel yükleme boyası (6X) ile birleştirilerek kuyulara yüklenmiştir. DNA örnekleri 100 V’da yürütülmüş ve elektroforez işlemi sonrasında jeller ve DNA bantları UV ışık altında incelenerek görüntülenmiştir. DNA markeri olarak 100-1500 bp aralığındaki 100 bp ladder-Biomatik kullanılmıştır.

3.2.4. İzolatların İdentifikasyonu

İdentifikasyonu yapılacak bakteri suşları BHI agara ekim yapılmış ve 18-24 saat 37°C de inkübasyona bırakılmıştır. Taze kültürleri hazırlanan klinik bakteri izolatlarının tür teşhisinin teyidi HMKÜ Bitki Sağlığı Kliniği Uygulama ve Araştırma Merkezi’nde bulunan Matrix asisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) mikroorganizma tanımlama cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Sistem, bakteri izolatlarından etanol formik asit ekstraksiyonu ile elde edilen protein profillerinin, cihaz kütüphanesinde yer alan protein parmak izi eşleştirmelerinin taranması şeklinde çalışmaktadır. Bakteri identifikasyonu, cihazın flex kontrol yazılım programı (Biotyper 3.0; Microflex LT; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) ile elde edilen spektrumların, Maldit Biotyper Real-Time Classification (RTC) yazılımı ile karşılaştırılmasıyla gerçekleştirilmiştir (Uysal ve ark., 2019).

3.2.5. Dezenfektanların Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Dezenfektanlardan klorhekzidin glukonat ve benzalkonyum klorür’ün minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) CLSI (M100-S15) tarafından önerilen agar dilüsyon yöntemiyle belirlenmiştir (CLSI, 2010). Dezenfektanların MİK’lerini belirlemek amacıyla bakteri süspansiyonlarının yoğunluğunu ayarlamak için McFarland 0.5 standardı (yaklaşık 1.5×10^8 kob/ml) kullanılmıştır (Kralik ve ark., 2012). McFarland ayarı yapılan bakteri süspansiyonları agar yüzeyinde final hücre sayısı yaklaşık 104 kob/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. Dezenfektanlar iki katlı seyreltilerek final

konsantrasyonları 0.125-1024 mg/L aralığında olacak şekilde steril Mueller-Hinton agar (MHA) ortamlarındaki eklenmiştir. Dezenfektan ve kontrol grubu olarak dezenfektan içermeyen MHA ortamlarına bakteri süspansiyonlarından pipetle nokta ekimi yapılarak 37°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Dezenfektanların MİK değeri her seyreltmede üremenin varlığı veya yokluğunun gözlemlenmesiyle belirlenmiştir. Agar yüzeyinde bakteri üremesini tamamen inhibe eden en düşük dezenfektan konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlenmiştir (Zou ve ark. 2014).



4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

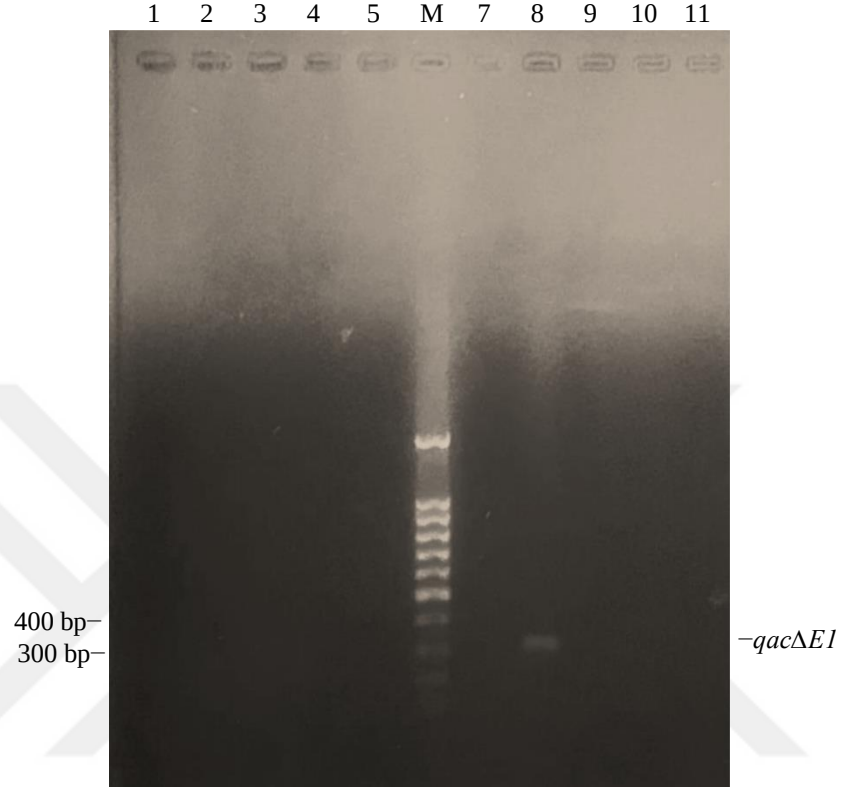
4.1. Dezenfektan Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Tez kapsamında Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonunda bulunan ve hastane yoğun bakım, üroloji, dahiliye, genel cerrahi, kadın doğum, göğüs hastalıkları ve palyatif bakım ünitelerinden gelen numunelerden izole edilerek identifikasyonları yapılmış ve rast gele seçilmiş toplam 40 adet bakteri suşunda (Çizelge 4.1) *qacA/B*, *qacC/D*, *qacΔE*, *qacE*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* ve *acrA* genlerinin mevcudiyeti PZR ile belirlenmiştir.

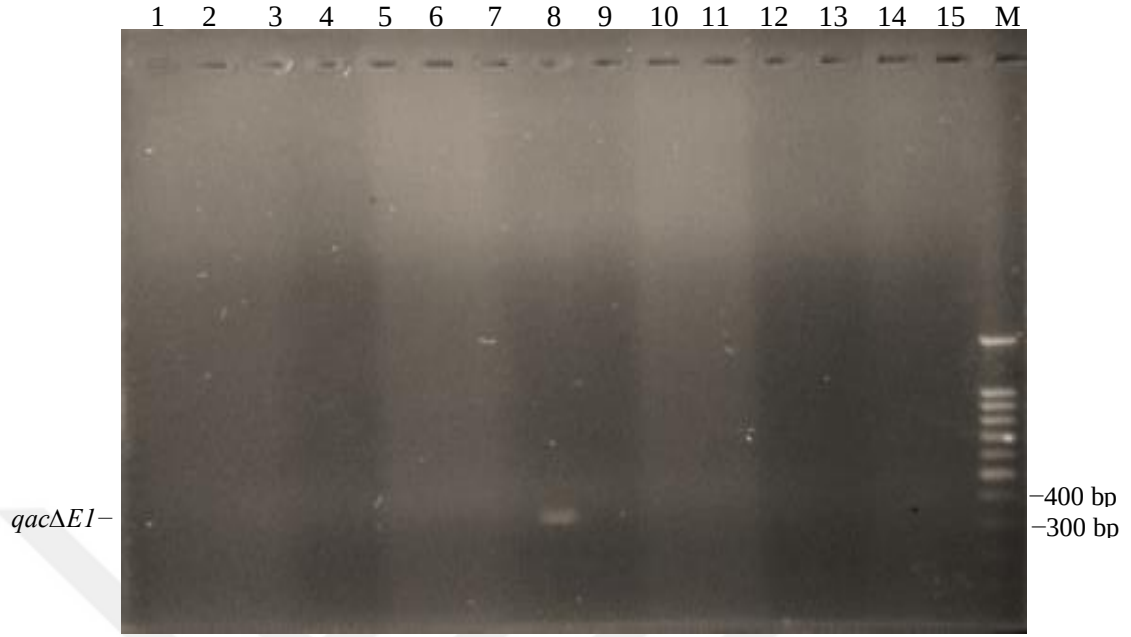
Çizelge 4.1. Bakteriler ve izolasyon kaynakları

No	Bakteri/Gram reaksiyonu	Kaynak	No	Bakteri/Gram reaksiyonu	Kaynak
1	<i>Acinetobacter baumannii</i> (Gr-)	Yara	21	<i>Klebsiella oxytoca</i>	İdrar
2	<i>Escherichia coli</i> (Gr-)	İdrar	22	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Yara
3	<i>Escherichia coli</i>	Yara	23	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Kan
4	<i>Klebsiella oxytoca</i>	İdrar	24	<i>Escherichia coli</i>	İdrar
5	<i>Escherichia coli</i>	İdrar	25	<i>Escherichia coli</i>	İdrar
6	<i>Escherichia coli</i>	İdrar	26	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Balgam
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Gr-)	İdrar	27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aspirat
8	<i>Enterococcus faecium</i> (Gr+)	Yara	28	<i>Acinetobacter baumannii</i>	İdrar
9	<i>Enterococcus faecalis</i> (Gr+)	İdrar	29	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Kan
10	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Yara	30	<i>Klebsiella ozaenae</i>	Kan
11	<i>Escherichia coli</i>	İdrar	31	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	İdrar
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Yara	32	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İdrar
13	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Kan	33	<i>Escherichia coli</i>	İdrar
14	<i>Escherichia coli</i>	İdrar	34	<i>Staphylococcus aureus</i> (Gr+)	Kan
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (Gr-)	Kan	35	<i>Escherichia coli</i>	İdrar
16	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Aspirat	36	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Aspirat
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	İdrar	37	<i>Staphylococcus aureus</i>	Kan
18	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Yara	38	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Gr+)	Vajina
19	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	İdrar	39	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Doku
20	<i>Escherichia coli</i>	Yara	40	<i>Serratia marcescens</i> (Gr-)	Kan

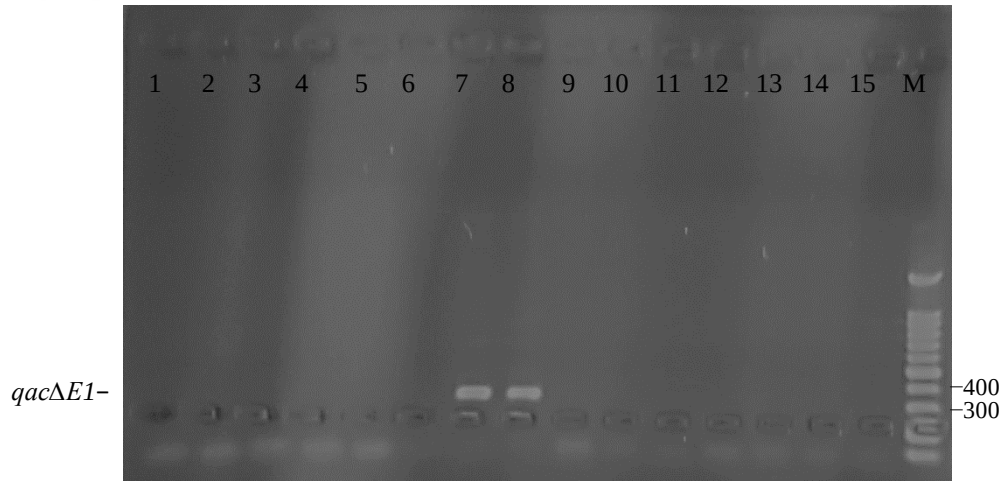
Klinik bakteri suşlarından izole edilen DNA'ların kullanılarak farklı antimikrobiyal direnç gen bölgelerine ait PZR sonuçları Şekil 4.1-4.4'de verilmiştir.



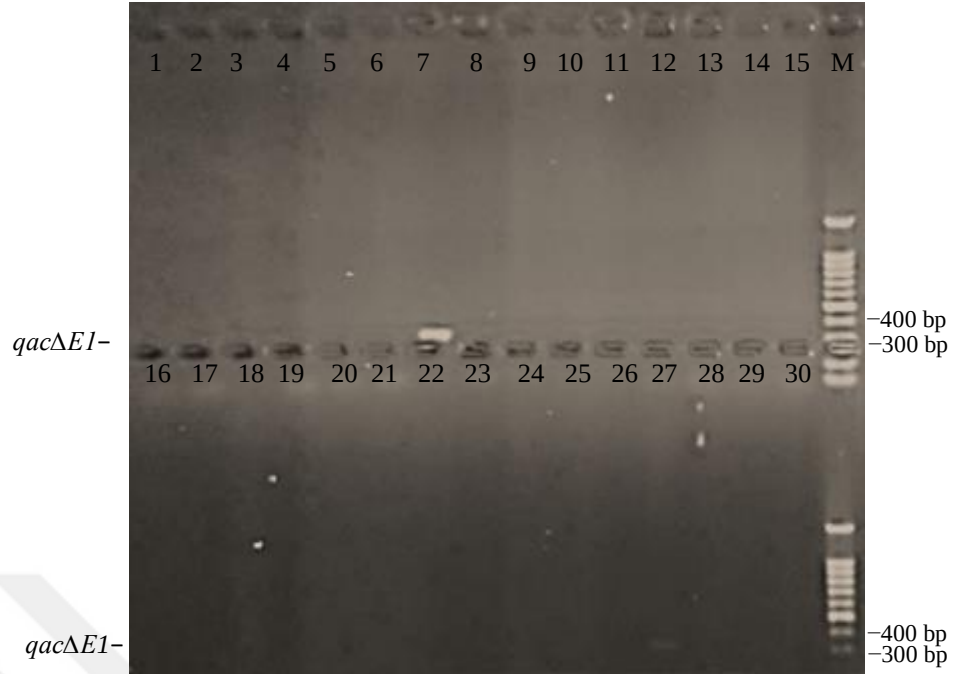
Şekil 4.1. 1-4 nolu bakteri suşlarından *qacA/B* (1-4) ve *qacΔE1* (7-10) genlerinin PZR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi (1 ve 7: *A. baumannii*, 2, 3, 8 ve 9: *E. coli*, 4 ve 10: *K. oxytoca*, Markır 1500-100bp, 5 ve 11 negatif kontrol)



Şekil 4.2. 21 ve 23-25 nolu bakteri suşlarından *qacA/B* (1-4), *qacΔE1* (6-9) ve *qacE* (10-14) genlerinin PZR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi (1, 6 ve 11: *K. oxytoca*, 2, 7 ve 12: *A. baumannii*, 3, 4, 8, 14 9, 13 ve: *E. coli*, Markır 1500-100 bp, 5 ve 10 negatif kontrol)



Şekil 4.3. 13, 15, 17 ve 18 nolu bakteri suşlarından *qacA/B* (1-4), *qacΔE1* (6-9) ve *qacE* (10-14) genlerinin PZR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi (1, 6, 11: *A. baumannii*, 2, 3, 7, 8, 11, 12: *K. pneumoniae*, 4, 9, 14: *P. aeruginosa*, Markır 1500-100bp, 5, 10 ve 15 negatif kontrol)



Şekil 4.4. 22, 27, 28, 30, 33, 34, 50, 67 nolu bakteri suşlarından *qacA/B* (1-4), *qacΔE1* (6-9) ve *qacE* (10-14) genlerinin PZR sonuçlarına ait agaroz jel elektroforezi (1, 2, 6, 7, 11, 12, 17, 18, 23, 25, 30: *P. aeruginosa*, 3, 8, 13, 19, 24, 29: *A. baumannii*, 4, 9, 14, 20: *K. ozoenae*, 22, 27: *K. pneumoniae*, Markır 1500-100bp, 5, 10 ve 15 negatif kontrol)

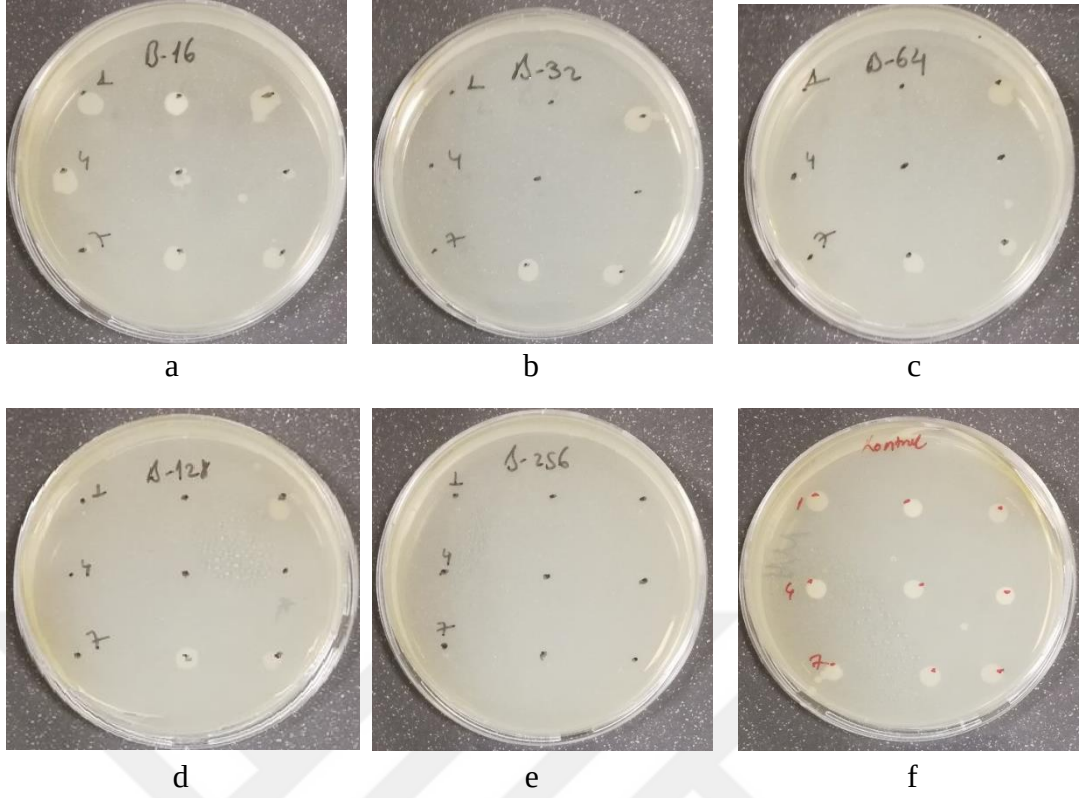
Hastane kaynaklı 40 adet bakteri izolatının 6 adedinde 335 bp büyüklüğündeki *qacΔE1* geni tespit edilmiştir. Bunlardan 2 adedi idrar kaynaklı *E. coli* suşunda (2 ve 24 nolu suşlar) (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1 ve 4.2), 2 adedi kan kaynaklı *K. pneumoniae* suşunda (15 ve 17 nolu suşlar) (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.3) ve diğer 2 adedi aspirat ve idrar kaynaklı *P. aeruginosa* suşunda (27 ve 34 nolu suşlar) (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.4) bulunmuştur. Çalışmamızda ilgili genin yüzde oranları *E. coli* izolatları arasında %18.2 *P. aeruginosa* izolatları arasında %22.2 ve *K.pneumoniae* izolatları arasında %66.7 olarak ve toplamda 40 bakterinin %15’de tespit edilmiştir.

Proton itici güçle dışarı katyon pompalayan quaterner amonyum bileşiği pompa proteinleri hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde yer almaktadır. Bu pompalardan *qacA*, *qacB*, *qacG*, *qacC/D(smr)* ve *qacH* her iki grup bakteride bulunurken *qacE* ve *qacΔE* Gram negatif bakterilerde bulunmaktadır (Heir ve ark., 1998; Heir ve ark., 1999; Lyon ve Skurray, 1987). *qacE* geni, Gram-negatif bakterilerde sınıf 1 integronların 3'-korunmuş segmentinde yer almakta ve delesyonla mutasyona uğraması sonucu *qacΔE1* geni ortaya çıkmıştır. Sınıf I integronların en fazla *Enterobacteriaceae*

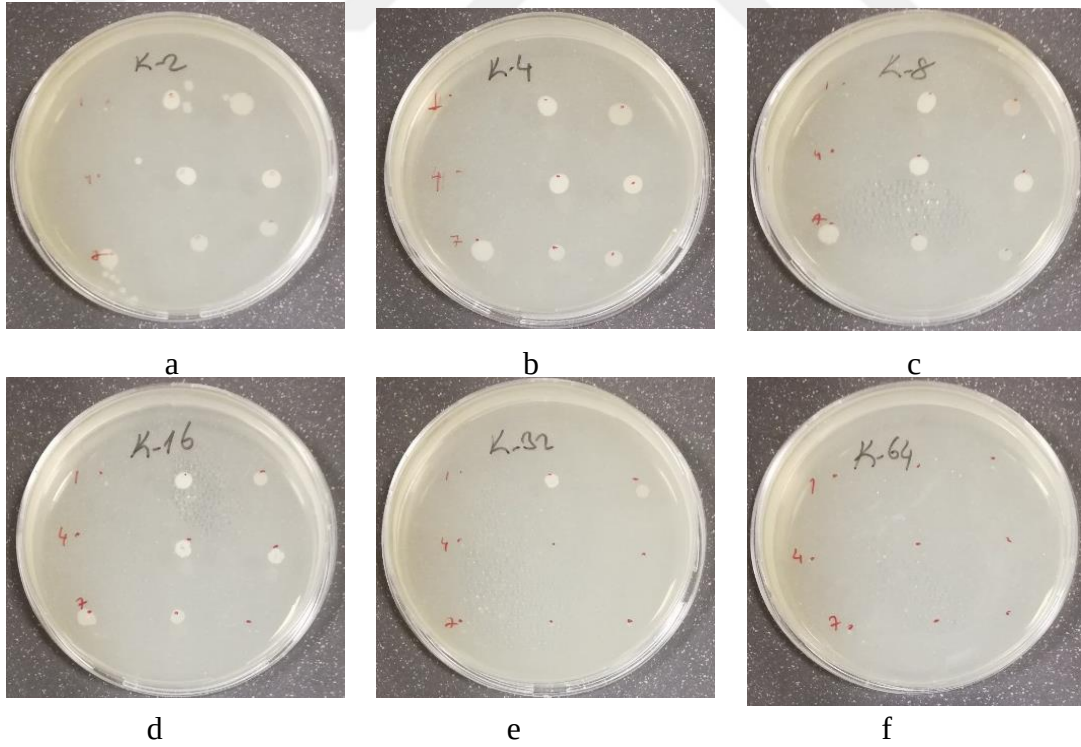
ve *Pseudomonaceae* familyalarına ait antibiyotiğe dirençli klinik izolatlarından izole edildiği ve rapor edilmiştir bildirilmiştir (Kucken ve ark., 2000; Chuanchuen ve ark., 2007). *qacE* ve *qacΔE* genlerindeki prevalansın yüksek olduğu ve bunun yatay gen transferi yoluyla popülasyonlar arasında yayılmayı kolaylaştıran integron gibi hareketli genetik elementlerde taşınmaları ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir (Oggioni ve ark., 2013; Gillings ve ark., 2015). Günümüze kadar klinik *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında PZR ile *qacΔE1* geninin varlığı ortaya konmuştur. *Pseudomonas aeruginosa* ile ilgili olarak; Kücken ve ark. (2000) 37 hastane izolatının %13.5'nde, Mahzonieh ve ark., (2014) yanık ünitesindeki hastalardan izole edilmiş 83 izolatın %91.5'nde, Kazama ve ark. (1998) toplam 63 klinik izolatın %65'nde, Helal ve Khan (2015) 52 klinik izolatın %47.2'de ve Subedi ve ark. (2018) mikrobiyal keratitli hastalardan izole edilmiş 13 izolatla *qacΔE* geninin mevcut olduğunu tespit etmişleridir. Klinik *K. pneumoniae* izolatlarıyla ilgili olarak, Chen ve ark. (2020), Abuzaid ve ark. (2012), Azadpour ve ark. (2015) ve Guo ve ark. (2015) sırasıyla %41.7, %53, %30.6 ve %59 oranında *qacΔE* geninin bulunduğunu bildirmişlerdir. Klinik *E. coli* izolatlarının ise %57.1 ve %81.4 oranında *qacΔE* geni içerdiği bildirmiştir (Chen ve ark., 2020; Shafaati ve ark., 2016). Klinik izolatların yanısıra yoğun kuaterner amonyum bileşiklerinin kullanıldığı piliç ve piliç eti ve yetiştiriciliği sektöründen %70 lere varan yaygın *qacΔE* geni varlığı ve et ile ilgili başka bir çalışma kapsamında izole edilmiş *E. Coli* suşlarında da ilgili genin mevcut olduğu (%22.2) rapor edilmiştir (Wieland ve ark., 2016; İbrahim ve ark., 2019; El- Tawab ve ark. 2017; Zou ve ark. 2014).

4.2. Benzalkonyum Klorür ve Klorhekzimit'in Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu Değerleri

Kuaterner amonyum bileşiği olan benzalkonyum klorür ve guanid bileşiği olan klorhekzidinin *qacΔE1* genini barındıran 6 suş ve aynı türe ait ilgili geni bulundurmadağı tespit edilen 3 suş üzerindeki MİK değerleri 2 katlı seyreltme yapılan agar dilusyon yöntemiyle belirlenmiştir (Şekil 4.5 ve 4.6).



Şekil 4.5. Benzalkonyum klorür'ün agar dilüsyon MİK sonuçları (a:16, b:32, c:64, d:128 ve e:256 mg/L, f:kontrol.)



Şekil 4.6. Klorheksimit glukonat'ın agar dilüsyon MİK sonuçları (a:2, b:4 ,c:8, d:16, e:32, f:64mg/L)

Çizelge 4.2. Benzalkonyum klorür'ün minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri

BK (mg/L)	5 <i>E. coli</i>	33 <i>K. pneu.*</i>	7 <i>P. aer.ⁱ</i>	24 <i>E. coli</i>	2 <i>E. coli</i>	15 <i>K. pneu.</i>	17 <i>K. pneu.</i>	27 <i>P. aer.</i>	34 <i>P. aer.</i>
0.125	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.250	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+	+	+	+	+
32	-	-	+	-	-	-	-	+	+
64	-	-	+	-	-	-	-	+	+
128	-	-	+	-	-	-	-	+	+
256	-	-	-	-	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*:*Klebsiella pneumoniae* , ⁱ: *Pseudomonas aeruginosa*

Çizelge 4.3. Klorheksimit glukonat'ın minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri

BK (mg/L)	5 <i>E. coli</i>	33 <i>K. pneu.*</i>	7 <i>P. aer.ⁱ</i>	24 <i>E. coli</i>	2 <i>E. coli</i>	15 <i>K. pneu.</i>	17 <i>K. pneu.</i>	27 <i>P. aer.</i>	34 <i>P. aer.</i>
0.125	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.250	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	-	+	+	+	+	+
4	-	+	+	-	+	+	+	+	+
8	-	+	+	-	+	+	+	+	+
16	-	+	+	-	-	-	-	-	-
32	-	+	+	-	-	-	-	-	-
64	-	-	-	-	-	-	-	-	-
128	-	-	-	-	-	-	-	-	-
256	-	-	-	-	-	-	-	-	-
512	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1024	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kontrol	+	+	+	+	+	+	+	+	+

*:*Klebsiella pneumoniae* , ⁱ: *Pseudomonas aeruginosa*

Agar dilüsyonla benzalkonyum klorürün suşlar üzerindeki mik değerleri, *qacΔE1* geni içeren suşlar dahil *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşları için 32 mg/L ve *P. aeruginosa*

suşları için 256 mg/L olarak bulunmuştur (Şekil 4.5 ve Çizelge 4.2). Klorhekzidinin MİK değerleri ise gen saptanmayan suş için 2 mg/L, geni içeren suşlarda ise 2 ve 16 mg/L, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* suşlarında ise gen içermeyenlerde 64 mg/L, gen içeren suşlarda 16 mg/L olarak tespit edilmiştir.

Benzalkonyum klorür (kuaterner amonyum bileşiği) dış membrana zarar vererek hücre içine girdiği kabul edilmektedir. Fosfolipidlerle reaksiyona girerek sitoplazmik membran yapısının bozulmasına neden olmaktadır. Katyonik biguanid grubundan klorhekzidin düşük moleküler ağırlıklı bileşenlerin sızması, adenosil trifosfataz gibi bazı membrana bağlı enzimlerin inhibisyonu gibi sitoplazmik membran üzerinde etki göstererek inhibisyona neden olmaktadır (Lambert ve ark., 2001).

Hastane izolatu *qacAE1* geni içeren *K. pneumoniae* suşları üzerinde benzalkonyum klorür ve klorhekzidin mik değerlerinin agar dilüsyon yöntemi ile belirlendiği çalışmada mik değerlerinin sırasıyla 16-64 mg/L ve 16-128 mg/L olduğu, klorhekzidin duyarlılığındaki azlamanın *cepA* geni bezalkonyum klorür duyarlılığındaki azalmanın ise hem *cepA* hem de *qacAE1* ilişkili bulunduğu bildirilmiştir (Abuzaid ve ark., 2012). *qacAE* dahil 4 dışa atım pompa geni yönünden taranan *K. pneumoniae* suşlarında broth dilüsyon yöntemi ile *qacAE* içerdiği belirlenen suşlarda klorhekzidin asetat ve benzalkonyum bromürün mik değerleri sırasıyla 32-64 mg/L ve 8-64 mg/L olarak bulunmuş ve ilaç direnç geni taşıyan *K. pneumoniae* suşlarının, herhangi bir ilaca direnç gen taşımayan suşlara göre dezenfektanlardan etkilenme (öldürme veya üreme inhibisyonu) yönünden daha yüksek toleransa sahip olduğu bildirilmiştir (Guo ve ark., 2015). Zhang ve arkadaşlarının (2019) 3 klinik *K. pneumoniae* izolatıyla yapmış oldukları çalışmada izolatların *qacAE* genini içermediklerini *cepA* gen ifadesindeki artışla adaptif klorhekzidin direncinin ilişkili olduğu bildirilmiştir. Klinik *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında broth dilüsyon yöntemi ile klorhekzidinin mik değerlerinin 4-128 mg/L ve 8-512 mg/L olduğu ve *qacAE* geni taşıyan *K. pneumoniae* suşlarının klorheksidine karşı daha az duyarlı olmasının *qacAE* geni ile antibiyotik direnç genleri arasındaki bağlantı nedeniyle olabileceği rapor edilmiştir (Chen ve ark., 2020). Klinik *E. coli* izolatlarıyla yapılan çalışmada *qacE* ve *qacAE* genlerinin varlığı ve broth dilüsyon ile belirlenen kuaterner amonyum grubu didesil dimetil amonyum klorür (MİK değerleri 0.0078-0.0312 mg/L) dirençliliği arasında anlamlı bir ilişki olduğu ancak MİK değeri daha

yüksek olan bir suşta her iki genin saptanmadığı, başka tip dışa atım pompası veya dirençli mekanizması bulundurmuş olabileceği bildirilmiştir (Shafaati ve ark. 2016).

Çalışmamızda *E.coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* üzerinde benzalkonyum klorür ve klorkezidin ile ilgili MİK değerlerinin aynı tür ve dezenfektanlarla yapılmış yukarıda verilen çalışma sonuçlarına benzediği görülmekle beraber 2 nolu *E. coli* suşu hariç *qacAE* geninin mevcudiyeti ile azalmış duyarlılık arasında bir ilişki saptanmamıştır. Ayrıca dezenfektan MİK değerlerinin bakteri cinsine, test yöntemlerine ve kullanılan dezenfektana bağlı olarak değişeceği bildirilmiştir (Wu ve ark., 2015). Yine, Maillard (2018), dışa atım pompalarının tek başına biyositlere/biyosidal ürünlere direnç sağlama yeteneğinin sorgulanabileceğini ve muhtemelen dışa atım pompalarının bir bakterinin biyosit/biyosidalden kurtulmak için kullandığı farklı mekanizmaların bir parçası olabileceğini belirtilmiştir.

Vijayakumar ve ark. (2018) hastane izolatları ile yapmış oldukları çalışmada *qacE* geni pozitif ve negatif *K. pneumoniae* suşlarında benzalkonyum klorür için 8-32 mg/L, ve klorhekzidin için 16-64 mg/L, *P. aeruginosa* suşlarında aynı dezenfektanlar için sırasıyla 32-512 mg/l ve 8-64 mg/l MİK değerleri tespit etmişlerdir. Çalışma sonuçlarının azaltılmış duyarlılık ile ilgili genin varlık ya da yokluğu arasında önemli bir korelasyon olmadığını ve bağımsız bildirmişlerdir. Yine klinik *K. pneumoniae* izolatları ile yapılan çalışmada kuaterner amonyum bileşiğine direnç ile (didesil dimetil amonyum klorür) *qacAE* ve *cepA* genlerinin varlığı arasında anlamlı bir ilişki bulunmadığı rapor edilmiştir (Azadpour ve ark., 2015). 2014). Naparsteket ve ark. (2012) *K. pneumoniae* suşları ile yapmış oldukları çalışmada klorheksidin duyarlılığı ile pompa geni (*cepA*) ekspresyonu arasında bir ilişki bulunmadığını rapor etmişlerdir. Diğer bakteri türleri ile yapılan çalışmalarda da gen varlığının azalmış biyosit duyarlılığı üzerinde anlamlı etkilerinin olmadığı belirtilmiştir (Babei ve ark. 2015; Liu ve ark. 2017).

4.3. İzolatların İdentifikasyon Sonuçları

Çalışma kapsamında kullanılan 40 bakteri arasından direnç geni varlığı yönünden pozitif bulunan 6 suş ve geni içermeyen aynı türe ait 3 izolatın (*E.coli*, *P. aeruginosa* ve *K. pneumoniae*) tür teşhislerinin teyidi MALDI-TOF MS mikroorganizma tanımlama cihazıyla gerçekleştirilmiştir. Elde edilen spektrumlar cihazdaki yazılım (Maldi Biotyper Real-Time Classification) programı ile karşılaştırılarak tanımlama gerçekleştirilmiştir. Analiz sonucunda, sisteme ait programın önerdiği 2.000-3.000 arasında yeşil renkli olarak belirlenen veriler, güvenilir skor değeri olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.7).

Analyte ID	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.456	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.439
34	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.364	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.275
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.389	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	2.298
33	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.479	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.393
17	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.392	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.38
15	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.513	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.398
24	<i>Escherichia coli</i>	2.508	<i>Escherichia coli</i>	2.427
5	<i>Escherichia coli</i>	2.459	<i>Escherichia coli</i>	2.449
2	<i>Escherichia coli</i>	2.167	<i>Escherichia coli</i>	2.131

Meaning of Score Values

Range	Description	Symbols	Color
2.300 ... 3.000	highly probable species identification	(+++)	green
2.000 ... 2.299	secure genus identification, probable species identification	(++)	green
1.700 ... 1.999	probable genus identification	(+)	yellow
0.000 ... 1.699	not reliable identification	(-)	red

Şekil 4.7. Tür tanımlaması için MALDI-TOF MS analizi skor değerleri

MALDI-TOF MS analizlerinden elde edilen skor değerleri incelendiğinde (Şekil 4.7) 9 türün daha önce belirlenmiş olan tanımlamaları 8 suş için yüksek olasılıklı, 1 suş için muhtemel olasılıklı olarak değerlendirilmiştir.

MALDI-TOF MS sistemi çalışılmış/bilinen bakteri suşlarının maliyet etkin ve hızlı tanımlanmasında 16S rRNA gen dizilemesine göre önemli bir alternatif olabilmektedir (Mellmann ve ark., 2008; Uhlík ve ark., 2011; Koubek ve ark., 2012; Wieser ve ark., 2012; Seng ve ark., 2013). MALDI-TOF MS tabanlı mikroorganizma tanımlaması, tüm

hücre materyalinden veya ekstrakte edilmiş hücre içi içerikten kütle spektrumlarının oluşturulmasını içerir ve bunların daha sonra bilinen veritabanı referanslarıyla eşleştirilmesi prensibine dayanmaktadır (Fenselau ve Demirev, 2001; Lay, 2001). Doğru tanımlama iki faktöre bağlıdır: yeterli spektrum kalitesi ve yakın veritabanı referans eşleşmeleri. Günümüzde Biotyper (Bruker Daltonics) ve Vitek MS (BioMérieux) gibi bazı başarılı ticari platformlar, klinik türlerin tanımlanmasında kullanılmaktadır (Strejcek ve ark., 2018).



5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

Avrupa Kimya Ajansı biyosidal ürünleri türüne (22 adet) göre dört ana grup altında gruplandırmış ve dezenfektanları biyositler “1. Ana grubu” altında tanımlanmıştır (ECHA, 2021). Bulaşıcı hastalıkların yayılmasıyla mücadelede önemli bir araç olan dezenfektanlar uygun şekilde ve talimatlara göre kullanıldığında, özellikle hastane enfeksiyonlarında patojenlerin bulaşmasını ve yayılmasını önlemeye yardımcı olabilmektedir. Antibiyotiğe dirençli bakteriler ve yeni ortaya çıkan virüsler ile hayatı tehdit eden enfeksiyonların artmasına bağlı olarak dezenfektanların ve virüsidal sanitize edici ajanların kullanımı da artmıştır (Rozman ve ark., 2021). Cansız nesnelerdeki patojenik mikroorganizmaları yok etmek için kullanılan bu kimyasal ajanlar, dünya genelinde pek çok ülkede yaygın bir şekilde kullanılmakta olup kalite ve sağlık standartlarını sağlamada hayati önem taşımaktadırlar (McDonnel ve Russel, 1999; Kim ve ark., 2018).

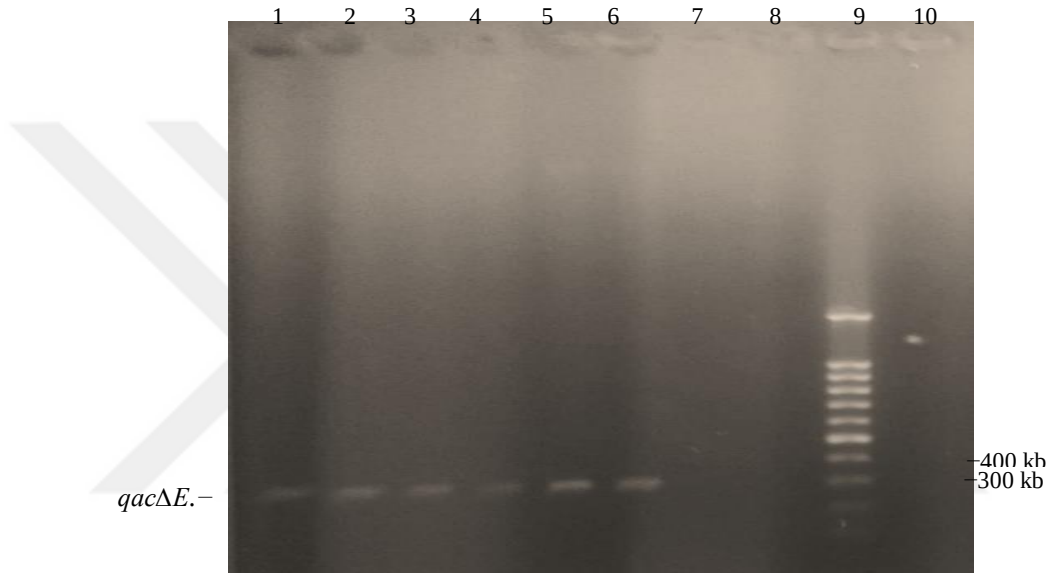
Dezenfektanlar hastanelerde genellikle yüzeylerin ve tıbbi cihazların sanitasyonunu sağlamak için kullanılmaktadırlar ve dolayısıyla enfeksiyon kontrolü ve enfeksiyöz mikroorganizmaların bulaşmasının önlenmesinde rolleri büyük olmaktadır. Bu nedenle doğru dezenfektan seçimi ve doğru dozun uygulanması enfeksiyonun kontrol altına alınmasındaki önemli adımlardan birini oluşturmaktadır (Vijayakumar ve ark., 2016).

Benzalkonyum klorür, benzetonyum klorür gibi kuaterner amonyum bileşikler ve klorheksidin diglukonat gibi iki değerlikli katyonlar dahil olmak üzere çok çeşitli biyosidal maddeler hastanelerde ve sağlık tesislerinde yüzeylerin dekontaminasyonunda, hastane personelinin ellerinin dezenfeksiyonunda ve hastane kaynaklı enfeksiyonların kontrol edilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Smith ve ark., 2008; Shamsudin ve ark., 2012). Ancak biyositlerin hastanelerde yaygın olarak kullanılması, dezenfektanlara dirençli bakterilerin ortaya çıkması olgusunu gündeme getirmiştir. Ayrıca aşırı dezenfektan kullanımı biyositler ve antibiyotikler arasında çapraz direncin ortaya çıkmasına da neden olabilmektedir (Zmantar ve ark., 2011; Longtin ve ark., 2011).

Antibiyotik direncine de karışan dışa atım pompaları gibi ortak mekanizmalar üzerinden çapraz direncin gelişmesi ve antimikrobiyal ajan ve antibiyotiklere dirençten sorumlu genlerin mobil genetik elementler üzerinde taşınabiliyor olması, bazı antimikrobiyal ajanların direnç mekanizmasını indükleyebilmesine neden olmaktadır (Gnanadhas ve ark., 2012). Bakterilerde yaygın olarak bulunan akış pompaları, bakteri

hücrelerine nüfuz eden antimikrobiyallerin konsantrasyonunun azalmasına katkıda bulunur (Maillard, 2018).

Tez çalışması ile, 40 adet gram negatif ve pozitif klinik bakteri izolatının (MKÜ Fen Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonu) biyosit direnç genlerinden *qacA/B*, *qacC/D*, *qacΔE1*, *qacE*, *qacG*, *qacH*, *qacJ* ve *acrA*'yı içerip içermediği PZR yöntemi ile belirlenmiştir. Toplam 40 bakteriden %15'nin (2 adet *E. coli*, 2 adet *K. pneumoniae* ve 2 adet *P. aeruginosa*) 8 gen arasından sadece *qacΔE1* genini içerdiği bulunmuştur (Şekil 5.1).



Şekil 5.1. *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* suşlarında *qacΔE1* genine ait agaroz jel elektroforezi

qacΔE1 geni yönünden pozitif bulunan suşların tür tanımlarının doğrulaması MALDI-TOF MS cihazıyla gerçekleştirilmiş olup, önceki tanımlamalarının yüksek olasılık sınırları dahilinde doğru olduğu teyid edilmiştir.

Dezenfektanlardan benzalkonyum klorür ve klorheksidin glukonat'ın ilgili geni içeren *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa* suşları üzerindeki minimum inhibisyon konsantrasyonu değerleri agar dilüsyon yöntemiyle fenotipik olarak belirlenmiştir. Buna göre MİK değerleri benzalkonyum klorür için *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de 32 mg/L, *P. aeruginosa*'da 256 mg/L, klorheksidin glukonatın için *E.coli*'de 2-16 mg/L, *K. pneumoniae* ve *P. aeruginosa*'da 16 mg/L olarak bulunmuştur.

Antimikrobiyal direnci halk sağlığı için büyük bir küresel tehdit olarak kabul edilmektedir. Özellikle, kuaterner amonyum bileşikleri, aldehitler ve alkoller dahil olmak üzere artan biyosit kullanımı, doğal bakteri popölasyonlarının antimikrobiyal direnç geliştirmesine ilişkin endişelerin artmasına neden olmaktadır. Ayrıca birçok ticari ürünün düşük konsantrasyonlarda biyosit içermesi ve biyosit atıklarının deşarjı, doğal bakteri popölasyonlarında antimikrobiyal direnci yönünden seçici bir baskı oluşturabileceğinden önem arz etmektedir (Morrissey ve ark, 2014).

Hastane kaynaklı enfeksiyon sayısının 1980'lerden beri artış göstermesi, fırsatçı patojenlerin yaygın hale gelmesi ve çoklu ilaç direncine sahip suşların ortaya çıkması dünya çapında morbidite ve mortalite oranlarının artmasına neden olmuştur. Bu nedenle dirençli izolatların sadece tedavisine değıl, yayılmalarının önlenmesine de dikkat edilmelidir (Vijyakumar ve ark., 2018). Biyosidal ajanlar antibiyotiğı dirençli bakterilerin yayılmasının engellenmesinde kullanılan yöntemlerden biridir ancak, bu ajanların aynı zamanda antibiyotik direncine yol açtığı (çapraz direnç) bilinen bir gerçektir (Kampf, 2018).

Dezenfektanlar, mikrobiyal yükü önemli ölçüde azaltan ve patojenleri ortadan tamamen kaldırmaya da kabul edilebilir sağlık standartlarının korunmasını sağlamada önemli rol oynayan ajanlardır. Dezenfektan dirençliliğı klinik düzeyde büyük önem taşımaktadır. Bu nedenle kaliteli ve güvenli sağlık hizmetinin temelinde iyi organize edilmiş dezenfeksiyon politikası bulunmaktadır. Tez çalışmasıyla klinik bakteri izolatlarının genetik düzeyde dezenfektan direnci ve iki farklı grup dezenfektanın MİK değıerleri belirlenmiştir. Çalışma kapsamında elde edilen verilerin ülkemizdeki klinik izolatlardaki biyosit dirençliliğı konusunda yapılan çalışmalara ve dezenfektan kullanımı politikasına destek sağlayacağı düşünülmektedir. Sonuç olarak, küresel halk sağlığı açısından büyük öneme sahip olan biyosit/dezenfektan dirençliliğinin ve beraberinde çapraz antibiyotik direncinin özellikle hastane ortamlarından izole edilen bakterilerde daha detaylı çalışılması ve izolasyon ortamlarında kullanılan biyosidal ajanların MİK değıerleri üzerinden etkinliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abuzaid, A., Hamouda, A. and Amyes, S. G. B., 2012. *Klebsiella pneumoniae* susceptibility to biocides and its association with *cepA*, *qacΔE* and *qacE* efflux pump genes and antibiotic resistance. **Journal of Hospital Infection**, 81(2): 87–91.
- Akin, M., Özcan B., Cantekin, Z., Ergün, Y. and Bulanık D. 2020. Investigation of antiseptic resistance genes in *Staphylococcus* spp. isolates. **Nesciences**, 5(3);136-143.
- Alam, M.M., Kobayashi, N., Uehara, N., and Watanabe, N., 2003. Analysis on Distribution and Genomic Diversity of High-Level Antiseptic Resistance Genes *qacA* and *qacB* in Human Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*. **Microbial Drug Resistance**, Vol 9(2): 109-121.
- Babaei, M., Sulong, A., Hamat, R., Nordin, S. and Neela, V., 2015. Extremely high prevalence of antiseptic resistant quaternary ammonium compound E gene among clinical isolates of multiple drug resistant *Acinetobacter baumannii* in Malaysia. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 14(11):2-5.
- Bai, X., Ma, X., Xu, F., Li, J., Zhang, H., Xiao, X., 2015. The drinking water treatment process as a potential source of affecting the bacterial antibiotic resistance. **Science of the Total Environment**, 533:24–31.
- Block, S.S., 2001. Peroxygen compounds. (S.S. Block, Editor). In: **Disinfection, sterilization, and preservation**. Lippincott Williams & Wilkins, 5th ed., p:185-204, Philadelphia.
- Cazares, A., Moore, M.P., Hall, J.P.J., Wright, L.L., Grimes, M., Emond-Rheault, J.G., Pongchaikul, P., Santanirand, P., Levesque, R.C., Fothergill, J.L. and Winstanley, C., 2020. A megaplasmid family driving dissemination of multidrug resistance in *Pseudomonas*. **Nature Communications**, 11:1370
- CDC, 2008. <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/guidelines/disinfection/disinfection-methods/chemical.html>. Erişim tarihi: 02.01.2022.
- Chapman, J.S., 2003. Disinfectant resistance mechanisms, cross-resistance, and co resistance. **International Biodeterioration & Biodegradation**. 51(4):271-276.
- Chuanchuen, R., Khemtong, S. and Padungtod, P., 2007. Occurrence of *qacE*/*qacED1* genes and their correlation with class 1 integrons in *Salmonella enterica* isolates from poultry and swine. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 38:855–62.
- CLSI, 2010. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Fifteenth Informational Supplement M100-S15**. CLSI, Wayne, PA, USA.
- Damavandi, M.S., Dehkordi, M.S., Denghan, A., and Heibati, F., 2017. Detection of Antiseptic Resistance Genes Among *Staphylococcus aureus* Colonising Nurses and Coagulase-Negative Staphylococci Isolated From Clinical Specimens at Teaching Hospitals in Southwest of Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, 10(1): 1-7.
- Dychdala, G.R., 2001 **Chlorine and chlorine compounds**. (S.S. Block, Editor). In: **Disinfection, sterilization, and preservation**. Lippincott Williams & Wilkins, 5th ed., 135-157, Philadelphia.

- Do Vale, B.C.M., Nogueira, A.G., Cidral, T.A., Lopes, M.C.S., and de Melo, M.C.N., 2019. Decreased susceptibility to chlorhexidine and distribution of *qacA/B* genes among coagulase-negative *Staphylococcus* clinical samples. **BMC Infectious Diseases**, 19:1999.
- ECHA, 2022. Biocidal Products Regulation-Product Types. <https://echa.europa.eu/regulations/biocidal-products-regulation/product-types>. Erişim tarihi: 06.01. 2022
- El Tawab, A.S.A., Soad, A.N., Fatma, I.E. and Ola, A.I., 2017. Prevalence of *eaeA* and *qacEΔ1* genes in *Escherichia coli* isolated from omphalitis in baby chicks. **Benha Veterinary Medical Journal**, 32(1):184-192.
- Fang, C.T., Chen, H.C., Chuang, Y.P., Chang, S.C. and Wang, J.T., 2002. Cloning of a Cation Efflux Pump Gene Associated with Chlorhexidine Resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46(6):2024–2028.
- Ferreira, C., Pereira A.M., Pereira M.C., Melo L.F. and Simoes M., 2011. Physiological changes induced by the quaternary ammonium compound benzyldimethyldodecylammonium chloride on *Pseudomonas fluorescens*. **J Antimicrob Chemother**, 66:1036-1043.
- Finnegan, M., Linley E., Denyer S.P., McDonnell G., Simons C. And Maillard J.Y., 2010. Mode of Action of hydrogen peroxide and other oxidizing agents: differences between liquid and gas forms **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 65 (10):2108–2115.
- Ge, B., Bodeis, S. Walker, R.D., White, D.G., Zhao, S., McDermott, P.F. and Meng, J., 2002. Comparison of the Etest and agar dilution for in vitro antimicrobial susceptibility testing of *Campylobacter*. **J. Antimicrob. Chemother.** 50(4):487–494.
- Gerba, C.P. and Rusin P., 2001. Relationship between the use of antiseptics/disinfectants and the development of antimicrobial resistance. (W.A. Rutala, Editor). In: **Disinfection sterilization and antisepsis: principles and practices in healthcare facilities. Association for Professional in Infection Control and Epidemiology**, p:187-94, Washington, DC.
- Gillings, M.R., Gaze, W.H., Pruden, A., Smalla, K., Tiedje, J.M. and Zhu, Y.G., 2015. Using the class 1 integron integrase gene as a proxy for anthropogenic pollution. **The ISME J**, 9:1269–1279.
- Gnanadhas, D.P., Marathe, S.A. and Chakravorty, D., 2012. Biocides resistance, cross-resistance mechanisms and assessment. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 22(2):191–206.
- Heir, E, Sundheim, G. and Holck, A.L., 1998. The *Staphylococcus qacH* gene product: A new member of the SMR family encoding multidrug resistance. **FEMS Microbiol Lett.** 163:49-56.
- Heir, E, Sundheim, G. and Holck, A.L., 1999. The *qacG* gene on plasmid pST94 confers resistance to quaternary ammonium compounds in staphylococci isolated from the food industry. **J Appl Microbiol.** 86:378-88.
- Hong, S.I., Lee, Y.M., Park, K.H., Ryu, B.H., Hong, K.W., Kim, S., Bae, I.G., and Cho, O.H., 2019. Clinical and Molecular Characteristics of *qacA*- and *B*-Positive

- Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* Causing Bloodstream Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 63(4):1-9.
- Kahn, G., 1970. Depigmentation caused by phenolic detergent germicides. **Arch. Dermatol.**, 102:177-87.
- Kampf, G., 2018. Biocidal Agents Used for Disinfection Can Enhance Antibiotic Resistance in Gram-Negative Species. **Antibiotics (Basel)**;7(4):110.
- Kazama, H., Hamashima, H., Sasatsu, M. and Arai, T., 1998. Distribution of the antiseptic-resistance genes *qacE* and *qac ΔE* in Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, 159(2), 173–178.
- Kim, M., Weigand, Michael, R., Oh, S., Hatt, J.K. ve ark., 2018. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance. **Appl. Environ. Microbiol.** 84, 7–19.
- Kralik, P., Beran, V. and Pavlik, I., 2012. Enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* bu quantitative real-time PCR, culture on solid media and optical densitometry. **BMC Res Notes**.5:114.
- Kucken, D., Feucht, H. and Kaulfers, P., 2000. Association of *qacE* and *qacED1* with multiple resistance to antibiotics and antiseptics in clinical isolates of Gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol Lett.** 183: 95–8.
- Lambert, R.J.W., Joynson, J.A. and Forbes, B., 2011. The relationships and susceptibilities of some industrial, laboratory and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* to some antibiotics and biocides. **J Appl Microbiol**;91:972–84
- Lepelletier, D., Maillard, J.Y., Pozzetto, B. and Simone, A., 2020 Povidone Iodine: Properties, Mechanisms of Action, and Role in Infection Control and *Staphylococcus aureus* Decolonization. **Antimicrob Agents Chemother.**64(9):e00682-20.
- Liu, W.J., Fu, L., Huang, M., Zhang, JP., Wu, Y. and Zhou, YS., Zeng, J. And Wang, G.X., 2017. Frequency of antiseptic resistance genes and reduced susceptibility to biocides in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Med Microbiol**, 66(1):13–7.
- Longtin, J., Seah, C., Siebert, K., McGeer, A., Simor, A., Longtin, Y., Low, D.E. and Melano, R.G., 2011. Distribution of Antiseptic Resistance Genes *qacA*, *qacB* and *smr* in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Isolated in Toronto, Canada, from 2005 to 2009. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 55(6): 2999-3001.
- Lyon, B.R. and Skurray, R., 1987. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus*: Genetic basis. **Microbiol Rev.** 51:88.
- Roca, I., Akova, M., Baquero, F., Carlet, J., Cavaleri, M., Coenen, S., Cohen, J. Ve ark. 2015. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. **New Microbes New Infect.**, 6:22-29.
- Morrissey, I., Oggioni, M.R., Knight, D., Curiao, T., Coque, T., Kalkanci, A., Martinez J.S. and the BIOHYPO Consortium, 2019. Evaluation of epidemiological cut-off values indicates that biocide resistant microorganisms. **PLoS One**, 9(1):86669.
- McDonnell, G. and Russell, A.D., 1999. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin Microbiol Rev**;12(1):147-79
- Mayer, S., Boos, M., Beyer, A., Fluit, A.C., and Schmitz, F.J., 2001. Distribution of the antiseptic resistance genes *qacA*, *qacB* and *qacC* in 497 methicillin-resistant and

- susceptible European isolates of *Staphylococcus aureus*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 47: 893-905
- Morente, E.O., Fernandez-Fuentes, M.A., Burgos, M.J.G., Abriouel H., Pulido R.P., Galvez A., 2013: Biocide tolerance in bacteria. **Int J Food Microbiol** 162:13-25.
- Maillard, J.Y., 2018. Resistance of Bacteria to Biocides. **Microbiology Spectrum**, 6(2); 1-17.
- Kim, M., Weigand, M.R., Oh S., Hatt J.K., Krishnan, R., Tezel, U., Pavlostathis, S.G. and Konstandinis, T.K., 2018. Widely used benzalkonium chloride disinfectants can promote antibiotic resistance **Appl. Environ. Microbiol.**, 84:7-19
- Smith, K., Gemmell, C.G., and Hunter, I.S., 2008. The association between biocide tolerance and the presence or absence of *qac* genes among hospital-acquired and community-acquired MRSA isolates. **J Antimicrob Chemother**; 61(1):78-84.
- Shamsudin, M.N., Alreshidi, M.A., Hamat, R.A., Alshrari, A.S., Atshan, S.S., and Neela, V., 2012. High prevalence of *qacA/B* carriage among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Malaysia. **J Hosp Infect**; 81(3):206-208
- Strejcek, M., Smrhova, T., Junkova, P. And Uhlik, O., 2018. Whole-Cell MALDI-TOF MS Versus 16S rRNA Gene Analysis for Identification and Dereplication of Recurrent Bacterial Isolates. **Front Microbiol**. 19(9):1294.
- Naparstek, L., Carmeli, Y., Chmelnitsky, I., Banin, E., and Navon-Venezia, S., 2012. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. **J Hosp Infect**. 81(1):15–9.
- Nyenje, M. E., Tanih, N. F. and Ndip, 2014. R. N. A comparative study of M.I.C evaluator test with the broth microdilution method for antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacter cloacae* isolated from cooked food. **Pakistan J. Pharma. Sci.**, 27, 63–66
- Oggioni, M.R., Furi, L., Coelho, J.R., Maillard, J.Y., and Martinez, J.L., 2013. Recent advances in the potential interconnection between antimicrobial resistance to biocides and antibiotics. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, 11(4): 363-6.
- Prindle, R.F., 1983. Phenolic compounds. In: Block S.S., ed. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: **Lea & Febiger**, 197-224.
- Poole, K. 2002. Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. **Curr Pharm Biotechnol** 3:77–98.
- Piddock, L.J. 2006. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance Efflux pumps in bacteria. **Clin Microbial Rev**. 19:382–402.
- Perçin, D., Esen, Ş., Güncel, 2009. Dezenfektanlar ve Dezenfeksiyon Uygulamalarındaki Sorunlar **ANKEM Derg.** 23(2):89-93
- Pérez, A., Poza, M., Fernández, A., Fernández, M.d.C, Mallo, S., Merino, M., Rumbo-Feal, S., Cabral, M.P., and Bou, G., 2012. Involvement of the AcrAB-TolC Efflux Pump in The Resistance, Fitness, and Virulence of *Enterobacter cloacae*, **Antimicrob Agents Chemother**. 56(4): 2084–2090.
- Paniagua-Contreras, G.L., Monroy-Pérez, E., Vaca-Paniagua, F., Rodriguez-Moctezuma, J.R., Negrete-Abascal, E., and Vaca, S., 2014. Implementation of a novel in vitro model of infection of reconstituted human epithelium for expression of virulence genes in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated

- from catheter-related infections in Mexico. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, 13: 6.
- Scott, EM, Gorman, SP.,1991, Glutaraldehyde. In: Block SS, ed. Disinfection, Sterilization, and Preservation. Philadelphia: **Lea & Febiger**,596-616.
- Scott, EM, Gorman, SP.,2001 Glutaraldehyde. In: Block SS, ed. Disinfection, sterilization, and preservation. Philadelphia: **Lippincott Williams & Wilkins**,361-81.
- Sidhu, M.S., Heir, E., Leegaard, T., Wiger, K., and Holck, A., 2002. Frequency of Disinfectant Resistance Genes and Genetic Linkage with Beta-Lactamase Transposon Tn552 Among Clinical Staphylococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 46(9): 2797-2803.
- Tong, C., Hu, H., Chen, G., Li, Z., Li, A., & Zhang, J.,2021. Disinfectant resistance in bacteria: Mechanisms, spread, and resolution strategies. **Environmental Research**, 195, 110897.
- Uysal, A., Kurt, Ş., Soylu, S.,Soylu, ve E.M.,Kara, M.,2019.Yaprağı Yenen Sebzelerdeki Mikroorganizma Türlerinin MALDI-TOF MS (Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyon Uçuş Süresi Kütle Spektrometresi) Tekniği Kullanılarak Tanılanması **Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi** Cilt 29, Sayı 4.
- Vali, L., Dashti, A.A., Mathew, F., and Udo, E.E., 2017. Characterization of Heterogeneous MRSA and MSSA With Reduced Susceptibility to Chlorhexidine in Kuwaiti Hospitals. **Frontiers In Microbiology**, 8(1359):1-2.
- Vijayakumar, R., Aboody, M., AlFonaison, M., Turaiki, W., Mickymaray, S., Premanatha, M. ve ark.,2016. Determination of minimum inhibitory concentrations of common biocides to multidrug-resistant gram-negative bacteria **Appl Med Res**,pp. 56-62.
- Wang, J.T., Sheng, W.H., Wang, J.L., Chen, D., Chen, M.L., Chen, Y.C., and Changs, S.C., 2008. Longitudinal analysis of chlorhexidine susceptibilities of nosocomial methicillin resistant *Staphylococcus aureus* isolates at a teaching hospital in Taiwan. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 62(3): 514-517.
- Wessels, S., and Ingmer, H.,2013: Modes of action of three disinfectant active substances: a review. **Regul Toxicol Pharm**, 67:456- 467.
- Wu, G., Yang, Q., Long, M., Guo, L., Li, B. ve ark., 2015. Evaluation of agar dilution and broth microdilution methods to determine the disinfectant susceptibility.**J Antibiot**, 68:661–665.
- Yang, S., Deng, W., Liu, S., Yu, X., Mustafa, G.R., Chen, S., He, L., Ao, X., Yang, Y., Li, B., Han, X., Xu, X. and Zou, L., 2020. Presence of heavy metal resistance genes in *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates and analysis of resistance gene structure in *E. coli* E308. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 21:420-426
- Zmantar, T., Koudhi, B., Miladi, H. and Bakhrouf, A., 2011. Detection of macrolide and disinfectant resistance genes in clinical *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci. **BMC Research Notes**, 4:453.
- Zhu, Z., Shan, L., Zhang, X., Hu, F., Zhong, D., Yuan, Y. and Zhang, J., 2020. Effects of bacterial community composition and structure in drinking water distribution

systems on biofilm formation and chlorine resistance. **Chemosphere**, 264(1):128410.

Zhang, H., Chen, S., Zhang, Q., Long, Z., Yu, Y. and Fang, H., 2020. Fungicides enhanced The abundance of antibiotic resistance genes in greenhouse soil. **Environ Pollut.**, 259: 113877

