



T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



Yüksek Lisans Tezi

ÇEVRESEL *ENTEROBACTERIACEAE* İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZLARI KODLAYAN GENLERİN TESPİT EDİLMESİ

Hazal ZORBOZAN

Biyoloji Anabilim Dalı

Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programı

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ayten KİMİRAN

Temmuz, 2019

İSTANBUL

Bu çalışma, 24.07.2019 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoloji Anabilim Dalı, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Programında Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi



Prof. Dr. Ayten KİMİRAN(Danışman)
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



Prof. Dr. Meltem YEŞİLÇİMEN AKBAŞ
Gebze Teknik Üniversitesi
Temel Bilimler Fakültesi



Doç. Dr. Nihal DOĞRUÖZ GÜNGÖR
İstanbul Üniversitesi
Fen Fakültesi



20.04.2016 tarihli Resmi Gazete’de yayımlanan Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin 9/2 ve 22/2 maddeleri gereğince; Bu Lisansüstü teze, İstanbul Üniversitesi’nin abonesi olduğu intihal yazılım programı kullanılarak Fen Bilimleri Enstitüsü’nün belirlemiş olduğu ölçütlere uygun rapor alınmıştır.

Bu tez, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yürütücü Sekreterliğinin 36585 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenimim boyunca bana yol gösteren ve tez çalışmalarımda bilgi birikimi ve tecrübesiyle destek olup değerli vakitlerini ayıran saygıdeğer danışman hocam Prof. Dr. Ayten KİMİRAN'a,

Tez çalışmalarımda karşılaştığım sorunların üstesinden gelmemde güleryüzü ve sabrıyla yardımda bulunan Dr. Öğr. Üyesi Elif Özlem ARSLAN AYDOĞDU'ya,

Tez çalışmalarımda esnasında teknik ve akademik yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Füsun ÖZTAY, Prof. Dr. Ercan ARICAN, Dr. Öğr. Üyesi Nazmiye Özlem ŞANLI ve Arş. Gör. Merve ERÇİN'e,

Yüksek lisans öğrenimim boyunca birlikte çalıştığım, zor anlarımda yanımda olup beni mutlu eden sevgili dostlarım İpek ADA, Nil KAYA ve tüm dönem arkadaşlarıma,

Hayatım boyunca attığım her adımda bana inanan, her daim sevgiyle ve fedakârlıkla arkamda duran aileme çok teşekkür ederim.

Temmuz 2019

Hazal ZORBOZAN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ	viii
TABLO LİSTESİ.....	xi
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ	xiii
ÖZET	xv
SUMMARY	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL KISIMLAR.....	4
2.1. ENTEROBACTERIACEAE.....	4
2.1.1. <i>Enterobacteriaceae</i> 'nin Genel Özellikleri	4
2.1.2. <i>Enterobacteriaceae</i> 'nin İdentifikasyonu.....	5
2.1.3. <i>Enterobacteriaceae</i> 'ye Bağlı Enfeksiyonlar	5
2.2. ANTİBİYOTİKLER.....	6
2.3. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER.....	8
2.3.1. Beta-Laktam Antibiyotiklerin Sınıflandırılması..	9
2.3.1.1. Penisilinler.....	9
2.3.1.2. Sefalosporinler.....	10
2.3.1.3. Monobaktamlar.....	10
2.3.1.4. Karbapenemler.....	10
2.3.1.5. Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri.....	11
2.3.2. Beta-Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması.....	11
2.3.3. Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Geliştirilen Direnç Mekanizmaları.....	11
2.4. BETA-LAKTAMAZLAR.....	13
2.4.1. Beta-Laktamazları Kodlayan Genetik Faktörler	14
2.4.2. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması	15
2.4.2.1. Sınıf A Beta-Laktamazlar	15
2.4.2.2. Sınıf B Beta-Laktamazlar	18
2.4.2.3. Sınıf C Beta-Laktamazlar	18
2.4.2.4. Sınıf D Beta-Laktamazlar	20

2.4.3. Beta-Laktamazların Tespit Edilmesinde Kullanılan Yöntemler	21
2.4.3.1. Beta-Laktamazların Tespit Edilmesinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler.....	21
2.4.3.2. Beta-Laktamazların Tespit Edilmesinde Kullanılan Genotipik Yöntemler.....	22
2.5. SU ORTAMLARINDA ANTİMİKROBİYAL DİRENCİN GELİŞİMİ.....	24
3. MALZEME VE YÖNTEM.....	27
3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BAKTERİLER.....	27
3.1.1. İznik Gölü Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu	28
3.1.2. Kullanılan Antibiyotikler	28
3.2. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN FENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ.....	29
3.2.1. Bakteri Suşlarının Hazırlanması	29
3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	29
3.2.2.1. Disk difüzyon testi.....	30
3.2.2.2. GSBL Doğrulama İçin Kombine Disk Testi.....	30
3.2.2.3. AmpC Doğrulama İçin Kombine Disk Testi	31
3.3. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN GENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ.....	31
3.3.1. Plazmid DNA İzolasyonu	32
3.3.2. Genomik DNA İzolasyonu.....	33
3.3.3. DNA Örneklerinde Saflık Kontrolü	34
3.3.4. DNA Örneklerinin Agaroze Jel Elektrofrezisi ile Görüntülenmesi.....	34
3.3.5. Beta-Laktamazları Kodlayan Genlerin PZR Yöntemi İle Gösterilmesi	35
3.3.5.1. Plazmid Aracılı Beta-Laktamazları Kodlayan Genlerin PZR Yöntemi İle İncelenmesi.....	36
3.3.5.2. Kromozomal Aracılı blaAmpC Geninin Semi-Nested PZR Yöntemi İle İncelenmesi.....	38
3.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER.....	39
3.4.1. Endo Besiyeri (Sartorius, Almanya)	39
3.4.2. Nutrient Agar Besiyeri (Oxoid, UK).....	39
3.4.3. Mueller-Hinton Agar (Himedia, Hindistan).....	40
3.4.4. Luria-Bertani Broth, Miller (Himedia, Hindistan).....	40
3.4.5. Oksidaz ayırıcı.....	41
3.4.6. Fizyolojik Tuzlu Su.....	41
3.4.7. Fosfat tamponu (1X)	41

3.4.8. 0.5 McFarland Bulanıklık Standardı (CLSI, 2012).....	42
3.4.9. 10 M Sodyum Hidroksit.....	42
3.4.10. 0.5 M EDTA.....	42
3.4.11. 10X Tris-Borik Asit-EDTA	43
3.4.12. 1X Tris-Borik Asit-EDTA	43
3.4.13. AgaroZ Jel Solüsyonları	43
3.4.14. 1 M Hidroklorik Asit.....	43
3.4.15. 1M Tris-HCl.....	44
3.4.16. Tris-EDTA buffer.....	44
3.4.17. Proteinaz K.....	44
3.4.18. AFBA	44
3.4.19. Taq PZR Mastermix (Biomatik)	45
3.4.20. Primer (Biomatik)	45
4. BULGULAR.....	46
4.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ENTEROBACTERIACEAE İZOLATLARI.....	46
4.2. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN FENOTİPİK OLARAK GÖSTERİLMESİ.....	46
4.2.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları	46
4.2.1.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları.....	46
4.2.1.2. GSBL Doğrulama İçin Kombine Disk Testi Sonuçları.....	54
4.2.1.3. AmpC Doğrulama İçin Kombine Disk Testi Sonuçları.....	55
4.3. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN GENOTİPİK OLARAK GÖSTERİLMESİ.....	59
4.3.1. Plazmid aracılı Beta-Laktamazları Kodlayan Genlerin PZR Yöntemi İle Gösterilmesi.....	59
4.3.1.1. Plazmid DNA eldesi	59
4.3.1.2. Plazmid aracılı beta-laktamaz kodlayan genlerin PZR İle Gösterilmesi	60
4.3.2. Kromozomal aracılı AmpC Kodlayan Genin Semi-Nested PZR Yöntemi İle Gösterilmesi.....	64
4.3.2.1. Kromozomal DNA eldesi	64
4.3.2.2. Kromozomal Aracılı blaAmpC Geninin Semi-Nested PZR İle Gösterilmesi	65
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	67
KAYNAKLAR.....	81
ÖZGEÇMİŞ	88

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

- Şekil 2.1:** Beta-laktam antibiyotiklerin kimyasal yapısı (Farsak Orak, 2005).....9
- Şekil 2.2:** Gram pozitif (solda) ve Gram negatif (sağda) bakterilerde hücre duvarı ve beta laktamazlar (Brunton ve diğ., 2010).....13
- Şekil 2.3:** Çevresel ortamlarda antibiyotiklerin yayılımı. A.Ö.T: atık su ön arıtma tesisleri, K.A.S: katı atık sahaları (Kümmerer, 2003).....26
- Şekil 3.1:** *K. pneumoniae* ATCC 700603 kwik-stik aparatı.....27
- Şekil 3.2:** Plazmid DNA izolasyonunda temel aşamalar.....33
- Şekil 3.3:** DNA marker bant profilleri. A: 1 kb plus DNA ladder (Biomatik; 100 loads, 15 DNA fragments); B: 100 bp DNA ladder (Bioline 10 DNA fragments) 35
- Şekil 4.1:** Disk difüzyon testinde çeşitli inhibisyon zonları..... 53
- Şekil 4.2:** GSBL doğrulama kombine disk testinde CAZ, CAZ/CLA, CTX, CTX/CLA için ölçülen inhibisyon zon çapları $\pm$ SS; A: negatif sonuç veren suşlar; B: pozitif sonuç veren suşlar 54
- Şekil 4.3:** GSBL doğrulama testinde klavulanik asidin etkisi. A: GSBL negatif sonuç veren bir izolat (B90); B: GSBL pozitif sonuç veren bir izolat (B236)..... 55
- Şekil 4.4:** AmpC doğrulama testinde CAZ, CAZ/AFBA, CTX, CTX/AFBA, CRO, CRO/AFBA, FEP, FEP/AFBA, FOX ve FOX/AFBA diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları $\pm$ SS..... 57
- Şekil 4.5:** AmpC doğrulama testinde boronik asidin etkisi. A: AmpC negatif sonuç veren bir izolat (B237); B: AmpC pozitif sonuç veren bir izolat (İ5)..... 58
- Şekil 4.6:** B243 bakteri suşunda CLA ve AFBA etkisi. A: CTX diski; B: CTX/CLA diski; C: CTX/AFBA diski 59
- Şekil 4.7:** *Enterobacteriaceae* izolatlarına ait plazmid DNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü. A1)1 kb DNA marker, A2)B66, A3)B85, A4)B89, A5)B90, A6)B91 A7)B120, A8)B153; B9)B155, B10)B176, B11)B180, B12)B185, B13)B236, B14)B237, B15)B243; C16)pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 35218), C17)B53, C18)B54, C19)B57, C20)B58, C21)B65, C22)B109, D23)B233, D24)B235, D25)M55, D26)M82, D27)İ3, D28)İ5, D29)İ8, D30)negatif kontrol..... 60
- Şekil 4.8:** *blaTEM* geni. A1)100 bp marker, A2)pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 35218), A3)B53, A4)B54, A5)B57, A6)B58, A7)B65, A8)B66, B9)100 bp marker, B10)B85, B11)B89(+), B12)B90, B13)B91 (+), B14)B109, B15)B120 (+),

B16)negatif kontrol, C17)100 bp marker, C18)B153, C19)B155, C20)B176, C21)B180, C22)B185, C23)B233, C24)B235, D25)B236, D26)B237, D27)B243, D28)M55, D29)M82, D30)İ3, D31)İ5, D32)İ8..... 61

Şekil 4.9: *blaSHV* geni. A1)1 kb marker, A2)B120 (+), A3)B155(+), A4)B176 (+), A5)B180(+), A6)B185(+), A7)B233(+), A8)B235(+), B9)B153, B10)B236, B11)B237, B12)B243, B13)M82, B14)i3, B15)i5, B16)i8, C17)1 kb marker, C18)pozitif kontrol (*K.pneumoniae* ATCC 700603), C19)B85(+), C20)M55(+), C21)B89, C22)B90, C23)B91, C24)B109, D25)1 kb marker, D26)negatif kontrol, D27)B53, D28)B54, D29)B57, D30)B58, D31)B65, D32)B66.....61

Şekil 4.10: *blaCTX-M* geni. A1)1 kb marker, A2)B91, A3)B109, A4)B120, A5)153, A6)B155, A7)B176, A8)B180, B9)1 kb marker, B10)B185, B11)B233, B12)B235, B13)B236(+), B14)B237(+), B15)B243(+), B16)negatif kontrol, C17)1 kb marker, C18)B53, C19)B54, C20)B57, C21)B58, C22)B65, C23)B66, C24)B85, D25) 1 kb marker, D26)B89, D27)B90, D28)M55, D29)M82, D30)İ3, D31)İ5, D32)İ8..... .62

Şekil 4.11: CIT gen grubu. A1)1 kb marker, A2)B176, A3)B180, A4)B185(+), A5)233, A6)235, A7)236, A8)237, B9)100 bp marker, B10)İ3, B11)İ5, B12)İ8, B13)B243(+), B14)M55, B15)M82, B16)negatif kontrol, C17)1 kb marker, C18)B53, C19)B54, C20)B57, C21)B58, C22)B65, C23)B66, C24)B85, D25)B89, D26)B90, D27)B91, D28)B109, D29)B120, D30)B153, D31)B155 62

Şekil 4.12: MOX gen grubu. A1)1 kb marker, A2)B53, A3)B54, A4)B57, A5)B58, A6)B65, A7)B66, A8)B85, B9)1 kb marker, B10)B89, B11)B90, B12)B91, B13)B109, B14)B120, B15)B153, B16)B155, C17)1 kb marker, C18)B176, C19)B180, C20)B185, C21)B233, C22)B235, C23)B236, C24)B237, D25)1 kb marker, D26)B243, D27)M55, D28)M82, D29)İ3, D30)İ5, D31)İ8, D32)negatif kontrol..... 63

Şekil 4.13: FOX gen grubu. A1)1 kb marker, A2)B53, A3)B54, A4)B57, A5)B58, A6)B65, A7)B66, A8)B85, B9)1 kb marker, B10)B89, B11)B90, B12)B91, B13)B109, B14)B120, B15)B153, B16)B155, C17)1 kb marker, C18)B176, C19)B180, C20)B185, C21)B233, C22)B235, C23)B236, C24)B237, D25)1 kb marker, D26)B243, D27)M55, D28)M82, D29)İ3, D30)İ5, D31)İ8, D32)negatif kontrol.....63

Şekil 4.14: *blaIMP* geni. A1)1 kb marker, A2)B53, A3)B54, A4)B57, A5)B58, A6)B65, A7)B66, A8)B85, B9)1 kb marker, B10)B89, B11)B90, B12)B91, B13)B109, B14)B120, B15)B153, B16)B155, C17)1 kb marker, C18)B176, C19)B180, C20)B185, C21)B233, C22)B235, C23)B236, C24)B237, D25) 1 kb marker, D26)B243, D27)M55, D28)M82, D29)İ3, D30)İ5, D31)İ8, D32)negatif kontrol 64

Şekil 4.15: Genomik DNA bant görüntüleri. 1)1 kb DNA marker, 2)İ3, 3)İ5, 4)İ8, 5)negatif kontrol..... 65

Şekil 4.16: *blaAmpC* geni. 1)1 kb marker, 2)i3(+), 3)i5(+), 4)i8(+), 5)negatif kontrol.....65



TABLO LİSTESİ

	Sayfa No
Tablo 3.1: Batı Karadeniz ve Manyas Gölü bakteri izolatları.....	28
Tablo 3.2: Disk difüzyon ve kombine disk testlerinde kullanılan beta-laktam antibiyotikler.....	29
Tablo 3.3: Plazmid aracılı beta-laktamazları kodlayan genleri tespit etmek için kullanılan primerler.....	36
Tablo 3.4: Plazmid aracılı <i>blaTEM</i> , <i>blaSHV</i> ve <i>blaCTX-M</i> genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları (Henriques ve diğ., 2006a).....	37
Tablo 3.5: Plazmid aracılı CIT, MOX ve FOX gen gruplarını tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.....	37
Tablo 3.6: Plazmid aracılı <i>blaIMP</i> genini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.....	37
Tablo 3.7: Kromozomal aracılı <i>blaAmpC</i> geninin semi-nested PZR ile tespiti için kullanılan primerler.....	38
Tablo 3.8: Kromozomal aracılı <i>blaAmpC</i> genini tespit etmek için kullanılan ilk ve ikinci adım semi-nested PZR koşulları	39
Tablo 4.1: İznik Gölü'nden izole edilen bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.....	47
Tablo 4.2: <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının inhibisyon zon çapları±SS (mm).....	49
Tablo 4.3: <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının beta-laktam antibiyotik duyarlılıkları.....	50
Tablo 4.4: <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık yüzdeleri.....	51
Tablo 4.5: <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının beta-laktam antibiyotik direnç profilleri	52
Tablo 4.6: <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarının çoklu beta-laktam antibiyotik direnç profilleri.....	53
Tablo 4.7: GSBL doğrulama testi sonucu CAZ/CLA ile CAZ arası ve CTX/CLA ile CTX arası inhibisyon zon çapı farkları ve GSBL üretiminin değerlendirilmesi	55

Tablo 4.8: AmpC doğrulama testinde FOX/AFBA ile FOX arası, CAZ/AFBA ile CAZ arası, CTX/AFBA ile CTX arası, CRO/AFBA ile CRO arası ve FEP/AFBA ile FEP arası inhibisyon zon çapı farkları ve AmpC üretiminin değerlendirilmesi	58
--	----

Tablo 4.9: <i>Enterobacteriaceae</i> izolatlarında beta-laktamazları kodlayan genler ve direnç fenotipleri.....	66
--	----



SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
atm	: Atmosfer
bp	: Baz Çifti
g	: Gram
<i>g</i>	: Relative Centrifugal Force
kb	: Kilobaz
l	: Litre
m	: Metre
M	: Molar
μ	: Mikro
μg	: Mikrogram
μl	: Mikrolitre
μm	: Mikrometre
μM	: Mikromolar
mg	: Miligram
ml	: Mililitre
mg/ml	: Miligram/mililitre
mm	: Milimetre
mol/l	: Mol/litre
ng	: Nanogram
nm	: Nanometre
pH	: Hidrojen Gücü
°C	: Santigrad Derece
U	: Unit
%	: Yüzde

Kısaltmalar	Açıklama
AFBA	: 3-Aminofenil Boronik Asit
AmpC	: Sınıf C Beta-Laktamaz
API	: Analitik Profil İndeksi

ATCC	: American Type Culture Collection
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleosit trifosfat
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
MİK	: Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
OIE	: Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
Rpm	: Revolutions Per Minute
Tris	: Hidroksimetil aminometan
UV	: Ultraviyole
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ÇEVRESEL *ENTEROBACTERIACEAE* İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZLARI KODLAYAN GENLERİN TESPİT EDİLMESİ

Hazal ZORBOZAN

İstanbul Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Ayten KİMİRAN

Doğal su ortamlarında yaşayabilen *Enterobacteriaceae* ailesi bakteriler, insanlarda çeşitli enfeksiyon hastalıklarına yol açabilen tehlikeli mikroorganizmalardır. *Enterobacteriaceae*'de; beta-laktam antibiyotiklerin yoğun ve bilinçsiz tüketimine bağlı olarak gelişen temel direnç mekanizması, beta-laktamaz üretimidir. Bir veya daha fazla beta-laktamaz sentezleyen *Enterobacteriaceae* suşları, tedavisi başarısızlıkla sonuçlanan enfeksiyonların sık rastlanan etkenleridir.

Besin zinciri, tarımsal sulama faaliyetleri, atık su boşaltımı gibi yollarla doğal su ortamlarına taşınan antimikrobiyal kalıntılar, mikrobiyal floranın dengesini sonradan direnç kazanmış mutant bakteriler lehine bozarak ciddi toplumsal kaynaklı enfeksiyonlara davetiye çıkarmaktadır. Bu nedenle, özellikle *Enterobacteriaceae*'nin çevresel izolatlarında beta-laktam antibiyotiklere direncin tespit edilmesine yönelik çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışmada; çevresel *Enterobacteriaceae* izolatlarında beta-laktam antibiyotik direnç profillerinin fenotipik testler ile belirlenmesi, beta-laktam direncini kodlayan genlerin moleküler yöntemler kullanılarak tespit edilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda; Batı Karadeniz kıyı ve deniz suyu örnekleri ile Manyas Gölü ve İznik Gölü sularından izole edilen toplam 27 *Enterobacteriaceae* suşunda (20 *Escherichia coli*, 3 *Klebsiella oxytoca*, 3 *Enterobacter cloacae*, 1 *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*) üç farklı antimikrobiyal duyarlılık testi (disk difüzyon testi, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları doğrulamak için kombine disk testi ve sınıf C beta-laktamazları doğrulamak için kombine disk testi) uygulanmıştır. Beta-laktam direncinin fenotipik yöntemler ile tespitinden sonra, plazmid aracılı beta-laktamazları kodlayan genler (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaIMP*) ve gen grupları (CIT, MOX, FOX) ile *Enterobacter cloacae* türüne özgü kromozomal aracılı sınıf C beta-laktamaz (*blaAmpC*) geninin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemi ile araştırılmıştır.

Disk difüzyon yöntemi sonuçlarına göre, 15 farklı beta-laktam antibiyotik içinde ampisilin (%92.6), karbenisilin (%74.1) ve sefalotin (%63) antibiyotiklerine karşı direncin yüksek olduğu

saptanmıştır. Suşların 24'ünün (%88.9) birden fazla beta-laktam antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir.

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) ve sınıf C beta-laktamaz (AmpC) doğrulama testlerinde 3 *E. coli* suşunda GSBL; 2 *E. coli* ve 3 *E. cloacae* suşunda sınıf C beta-laktamaz üretimi doğrulanmıştır. Bu suşlardan birinde ise her iki enzim birden saptanmıştır.

Çalışmada; 3 *E. coli* suşunda *blaTEM* geni; 6 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* ve 1 *K. oxytoca* suşunda *blaSHV* geni; 3 *E. coli* suşunda ise *blaCTX-M* tipi GSBL kodlayan gen varlığı belirlenmiştir. Yalnız 2 *E. coli* suşunda CIT gen grubu tespit edilmiş, plazmid aracılı AmpC kodlayan genlere sahip olmayan *E. cloacae* suşlarının kromozomal aracılı *blaAmpC* ekspresyonu yaptığı tespit edilmiştir.

Batı Karadeniz'den izole edilen 3 farklı *E. coli* suşunun birinde *blaTEM+blaSHV*, birinde *blaSHV+CIT*, birinde *blaCTX-M+CIT* gen profiline rastlanmıştır.

Çalışmamızda, çevresel *Enterobacteriaceae* izolatlarına ait antimikrobiyal duyarlılık test sonuçları ve PZR ile belirlenen beta-laktamaz kodlayıcı gen profilleri genel olarak uyumluluk göstermiştir. Yaptığımız bu çalışma, su ortamlarında gelişen bakteri türleri arasında transfer edilebilen genetik faktörlerin yansıttığı beta-laktam antibiyotik direnç fenotipini ortaya koymuştur. Bu bağlamda; çalışmamız, sucul ortamlardan izole edilen *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde beta-laktamaz üretimi ile bu enzimleri kodlayan genetik faktörlerin ilişkilendirilmesi sürecine katkıda bulunarak gelecekte yapılacak benzer araştırmalara ışık tutacaktır.

Temmuz 2019, 106 sayfa.

Anahtar kelimeler: *Enterobacteriaceae*, beta-laktamaz, antibiyotik direnci.

SUMMARY

DETECTION OF THE GENES ENCODING BETA-LACTAMASES IN ENVIRONMENTAL *ENTEROBACTERIACEAE* ISOLATES

M.Sc. THESIS

Hazal ZORBOZAN

Istanbul University
Institute of Graduate Studies in Sciences
Department of Biology

Supervisor : Prof. Dr. Ayten KIMIRAN

The family *Enterobacteriaceae* which can live in natural aquatic environments are precarious microorganisms that can lead to various infectious diseases in humans. In *Enterobacteriaceae*; primary resistance mechanism depending upon intense and unconscious consumption of beta-lactam antibiotics is beta-lactamase production. *Enterobacteriaceae* strains which synthesize one or more beta-lactamases are common causitives of the infections that result in therapeutic failure.

Antimicrobial residues transferred to natural aquatic environments through food chain, agricultural irrigation activities, sewage disposal etc. cause serious community-acquired infections by unbalancing the microbial flora for the good of mutant bacteria that acquire resistance. Therefore, studies aiming at identifying the resistance to beta-lactam antibiotics especially among the environmental isolates of *Enterobacteriaceae* are required.

The purpose of this study is to determine the beta-lactam antibiotic resistance profiles with phenotypic tests and the genes encoding resistance to beta-lactams through performing molecular methods in environmental *Enterobacteriaceae* isolates. Within this scope, three different antimicrobial susceptibility tests (disc diffusion test, combined disc test for extended-spectrum beta-lactamase confirmation and combined disc test for class C beta-lactamase confirmation) were performed in total 27 *Enterobacteriaceae* strains (20 *Escherichia coli*, 3 *Klebsiella oxytoca*, 3 *Enterobacter cloacae*, 1 *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*) isolated from Western Black Sea coast and sea water, Lake Manyas and Lake Iznik. After the detection of resistance to beta-lactams by performing phenotypic methods, presence of the genes (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaIMP*) and gene groups (CIT, MOX, FOX) encoding plasmid-mediated beta-lactamases and chromosomally-mediated AmpC beta-lactamase gene

(*blaAmpC*) of *Enterobacter cloacae* were investigated with polymerase chain reaction (PCR) method.

According to the results of disc diffusion method, among 15 different beta-lactam antibiotics, high level resistance to ampicillin (92.6%), carbenicillin (74.1%) and cephalothin (63%) was detected. 24 of the strains (88.9%) were determined to be resistant to more than one of the beta-lactam antibiotics.

In extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and class C beta-lactamase (AmpC) confirmation tests, ESBL production in 3 *E. coli*; AmpC production in 2 *E. coli* and 3 *E. cloacae* strains were confirmed. Both enzymes were detected in one of these strains.

In the study, presence of *blaTEM* in 3 *E. coli* strains; *blaSHV* in 6 *E. coli*, 2 *K. pneumoniae* and 1 *K. oxytoca* strains; *blaCTX-M* type ESBL encoding gene in 3 *E. coli* strains were determined. CIT gene group was determined only in 2 *E. coli* isolates and *E. cloacae* strains with no plasmid-mediated AmpC encoding genes were defined to express the chromosomal *blaAmpC* gene.

Among 3 different *E. coli* isolates from Western Black Sea; one *blaTEM*+*blaSHV*, one *blaSHV*+CIT and one *blaCTX-M*+CIT gene profile was experienced.

In our study, antimicrobial susceptibility test results and beta-lactamase encoding gene profiles identified with PCR in environmental *Enterobacteriaceae* isolates, were generally compatible. This study revealed the beta-lactam antibiotic resistance phenotype reflected by genetic factors which can be transferred between the bacteria growing in aquatic environments. In this context; our study which we associate the processes between the beta-lactamase production and the genetic determinants encoding these enzymes in the bacteria of *Enterobacteriaceae* family isolated from the aquatic environments will enlighten the similar prospective investigations.

July 2019, 106 pages.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, beta-lactamase, antibiotic resistance.

1. GİRİŞ

1928 yılında Alexander Fleming tarafından penisilinin keşfedilmesini takip eden yıllarda farklı işlevselliğe sahip çok sayıda antibiyotik üretilmiştir. Ancak antibiyotiklerin uygun olmayan kullanımı; bakteriyel popülasyonlar üzerinde seçim baskısı oluşturmuştur. Bu baskı, antibiyotik dirençli bakterilerin seçilimi ve yayılımı noktasında kritik rol oynamaktadır.

Antibiyotikler, tıbbi olarak tedavi amaçlı ve veterinerlik sahalarında büyüme destekleyici faktör olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bakterilerin doğru olmayan antibiyotik konsantrasyonlarına maruz kalması, bakteri hücrelerinde oldukça karmaşık süreçleri kapsayan çok sayıda farklı direnç faktörünün ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır (Kümmerer, 2004; Öcal, 2012).

Antibiyotiklerin geniş çaplı kullanımı sonucu nehirler, kıyı bölgeleri, göller gibi kanalizasyon sularıyla kirletilmiş sucul ortamlarda antibiyotik dirençli mikroorganizmaların seçilimi ve yayılımının son yıllarda artış gösterme eğiliminde olduğu gözlenmektedir. Hayvan mikroflorasında direnç faktörleri seçiliminin nedeni olarak, hayvanlarda büyüme destekleyici olarak kullanılan antibiyotikler gösterilmekte ve bu faktörlerin insanlara besin zinciri ile geçiş yapabildiği bilinmektedir (Henriques ve diğ., 2006; Alpay-Karaoglu ve diğ., 2007).

Dirençli bakteriler ve sahip oldukları direnç genleri ev ve hastane atık suları, atık su çamurları ve sahil gölleri, yer altı suları ve atık sularla kontamine olmuş akarsularda saptanmaktadır. Çevresel ortamlarda bulunan antibiyotik dirençli bakterilerin en büyük kaynağının hastane atık suları ve kümes hayvanlarının gübresi olduğu düşünülmektedir. Bu bakteriler, işlenmemiş atık suyun direkt boşaltımı veya atık su ön arıtma tesislerinden boşaltılan arıtma çamuruyla doğal su kaynaklarına giriş yapabilmektedir. Aynı zamanda bu tesislerde işlenmiş biyoatıklar ve hayvan gübrelili çiftlikler yoluyla toprağa transfer edilmekte, ardından yer altı sularına karışarak akış ya da erozyon ile yüzey sularına taşınmaktadır (Prado ve diğ., 2008; Zhang ve diğ., 2009).

Beta-laktamlar, insanlarda enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak tüketilen antibiyotiklerdir. Veterinerlik sahaları, tarımsal faaliyetler ve su kültürleri gibi farklı alanlarda

da kullanılan beta-laktam antibiyotikler, diğer antibiyotik gruplarına nazaran daha az toksisiteye sahip, bakterisid özellik gösteren güvenilir ajanlar olmalarından dolayı tercih edilmektedir. Bu antibiyotikler aynı zamanda kimyasal konfigürasyonlarında değişiklik yapılarak işlevleri genişletilebilen maddeler olmaları nedeniyle önem kazanmaktadır (Henriques ve diğ., 2006; Livermore ve Woodford, 2006).

Gram negatif bakterilerde beta-laktam direnci, Gram pozitif bakterilere oranla daha sık karşılaşılan bir durumdur. Beta-laktam direnci, çoğu zaman birden fazla direnç mekanizmasının birarada çalışmasından dolayı, enfeksiyon kontrol ve tedavi süreçlerinin karmaşık hale gelmesine yol açmaktadır. Bu bakterilerde gelişen beta-laktam direncinin en temel mekanizmaları, porin kaybı sonucu hücrede impermeabilite ile artan beta-laktamaz enzimi üretimi ve effluks sistemidir (Livermore ve Woodford, 2006).

Enterobacteriaceae ailesi üyesi bakteriler, insan ve hayvan bağırsaklarında doğal olarak yaşayan Gram negatif mikroorganizmalardır. Hastane enfeksiyonlarında sıkça izole edilen ve pnömoni, kan dolaşımı enfeksiyonları, idrar yolları enfeksiyonları, bakteremi ve diğer intra-abdominal enfeksiyonlar ile doğrudan ilişkili türlerin dahil olduğu bu bakteriler arasında *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* gibi birçok farklı tür bulunmaktadır (Schwartz ve diğ., 2003; Prado ve diğ., 2008).

Enterobacteriaceae'de en önemli beta-laktam direnç mekanizması beta-laktamaz enzimi üretimidir (Demirdağ ve diğ., 2013). Beta-laktam antibiyotiklerin hidrolizine neden olarak işlevselliğini sürdüren beta-laktamaz enzimleri, hem kromozomal DNA hem de plazmidler gibi farklı hareketli genetik elementler ile taşınan genler tarafından kodlanmaktadır. Yapılan gen dizisi analizleri, çoğu plazmid aracılı enzimin temelde diğer bakteri türlerinin kromozomlarından 'genetik kaçış' yoluyla sentezlendiğini göstermektedir (Livermore ve Woodford, 2006).

Son 20 yılda, beta-laktamazların hidrolitik aktivitelerine dayanıklı olması için özel olarak geliştirilen birçok yeni beta-laktam antibiyotik ortaya çıkmıştır. Ancak hastaların tedavisinde yeni beta-laktam ajanların kullanımı, bakteri hücrelerinde her seferinde bu gruba ait ilaçlara dirence neden olan yeni beta-laktamazların sentezlenmesi ile sonuçlanmıştır; çünkü yeni

antibiyotiklerin aşırı kullanımıyla oluşan seçilim baskısı, yeni beta-laktamaz varyantlarının seçilimine neden olmuştur (Pitout ve Laupland, 2008).

Yayılımı yalnız klinik çevrelerle sınırlı kalmayıp farklı çevresel ortam ve habitat yaşamlarına da uyum sağlayabilen, direnç faktörlerinin dünya çapında hızla yayılmasına neden olan *Enterobacteriaceae* ailesinden önemli patojenik mikroorganizmalar, toplum sağlığı açısından ciddi sorunlar yaratmaktadır.

Tüm bu veriler, beta-laktam antibiyotiklere karşı *Enterobacteriaceae*'de beta-laktamaz enzimleri ile geliştirilen direnç hakkında yeni ve yararlı bilgiler sağlayacak çalışmaların gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bu bağlamda; bu çalışmada, ülkemizde birçok farklı endüstriyel faaliyet ve antropojenik yollar aracılığıyla kirletilen Batı Karadeniz kıyı ve deniz suları ile Manyas Gölü ve İznik Gölü sahil sularından elde edilen *Enterobacteriaceae* izolatlarında beta-laktam direnç profillerinin ve dirence neden olan genlerin fenotipik ve genotipik yöntemler kullanılarak tespit edilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL KISIMLAR

2.1. ENTEROBACTERIACEAE

2.1.1. *Enterobacteriaceae*'nin Genel Özellikleri

Enterobacteriaceae; küçük, düzgün çomak veya kokobasil şekilli, Gram negatif ve oksidaz negatif, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob ve fermentatif özellik gösteren bakterilerdir. Genel olarak 37 °C'de iyi üremekle birlikte 25-30 °C'de de üreyebilen türleri bulunmaktadır. Çoğu flagellaya sahip ve hareketli, katalaz pozitif ve nitratı nitrite dönüştürme özelliği gösteren bakterilerdir. Pepton ve et ekstraktları içeren besiyerlerinde iyi gelişim gösterirler.

Enterobacteriaceae; dünya çapında geniş yayılım gösteren, toprak, su, bitkiler, hayvan ve insanlar üzerinde yaşayabilen, canlı organizmalarda enfektif etki gösterebilen bakterilerdir.

Enterobacteriaceae, 170'den fazla isimlendirilmiş türü kapsayan 53 cins bakterinin dahil olduğu bir ailedir. *Enterobacteriaceae* ailesi içinde 26 farklı cinsin, insanlarda enfeksiyon etkeni olduğu bilinmektedir. Bu aile içerisinde *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, *Edwardsiella*, *Citrobacter*, *Serratia*, *Erwinia* ve *Hafnia* gibi bakteri cinsleri yer almaktadır.

Escherichia cinsi bakteriler 2.0 µm uzunluğunda ve 0.25-1 µm çapında, hareketli, peritrik kamçılı mikroorganizmalardır. Üreyebildikleri optimum sıcaklık 37 °C olup hem aerob hem anaerob koşullarda yaşayabilirler. Nitrat redükleyebilir ve MacConkey Agar besiyerinde kırmızı veya renksiz koloniler oluştururlar. Bir kısmı kapsül antijenine sahip olup çoğu türü enterotoksinler ve diğer virülans faktörlerini taşır. İnsan ve memeli hayvan dışkılarında bulunmakla birlikte hayvanlar ve hayvansal gıdalar yoluyla insanlara geçiş yapabilmektedir. Bu bakteriler, su, gıda veya toprak gibi çevrelerde fekal kirlenmenin indikatörü olarak da kullanılmaktadır.

Klebsiella cinsi bakteriler 6 tür ve 3 alt türe sahip, 0.6-6 µm uzunlukta ve 0.3-1 µm genişlikte hareketsiz, genellikle kapsüllü, tümü adi besiyerlerinde üreyebilen çomaklardır. MacConkey Agar besiyerinde büyük, mukoid koloniler oluştururlar; agar yüzeyinde kırmızı pigmentasyon

laktoz fermentasyonu ve asit ürettiklerini gösterir. Farklı serogruplara ait 77'den fazla kapsül antijeni bulundurlar.

Enterobacter cinsi bakteriler 22 tür ve 2 alt türe sahip, 2 µm uzunlukta ve 0.25-1 µm çapta, spor oluşturmeyen hücrelerdir. 37 °C optimum sıcaklıkta adi besiyerlerinde üreyebilen, glukoz ve laktoz fermente edebilen bu bakteriler *Klebsiella* ile benzer özellikler gösterir; ancak hareketli ve ornitin pozitif olmaları ile ayrılırlar. Toprak ve su gibi doğal ortamlarda sıklıkla izole edilirler

2.1.2. *Enterobacteriaceae*'nin İdentifikasyonu

Enterobacteriaceae ailesi bakterilerinin identifikasyonu için biyokimyasal ve morfolojik özelliklerinin belirlenmesine dayalı klasik kültür yöntemleri kullanılarak yapılan testlerin yanı sıra, son yıllarda API 20E ve BBL Crystal gibi manuel değerlendirmeli sistemler ve Vitek, MicroSCAN gibi otomatik sistemler de yaygınlaşmıştır.

2.1.3. *Enterobacteriaceae*'ye Bağlı Enfeksiyonlar

Doğal olarak yaşadıkları bağırsaklar dışında, çeşitli doku ve organlarda çoğalarak hastalıklara neden olan *Enterobacteriaceae* ailesi bakterileri, farklı türlerin sahip olduğu çok sayıda virulans faktörlerini kullanır. Antibiyotik tedavisi sonucu normal bağırsak mikroflorasının bozulması, hastane enfeksiyonu etkeni dirençli bakterilerin kolonize olmasına imkan tanımakta, özellikle yoğun bakım ünitelerinde çoklu direnç gösteren enterik bakterilerin sıklıkla izole edilmesine neden olmaktadır. Cerrahi bölge, yumuşak doku ve orta kulak enfeksiyonları ile birlikte, kan dolaşım sistemi, solunum sistemi, üriner sistem enfeksiyonları *Enterobacteriaceae*'nin sıklıkla izole edildiği toplumsal kökenli enfeksiyonlardır (Nordmann, 1998; Bradford 2001).

Escherichia cinsi bakterilerde, insanlarda enfeksiyon etkeni beş farklı tür mevcuttur. Bunlar *Escherichia albertii*, *Escherichia coli*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, ve *Escherichia vulneris*'tir. Hakkında en fazla bilgiye sahip olunan ve en sık rastlanan tür olan bağırsak patojeni *E. coli* türü bakteriler, enterit, üriner sistem enfeksiyonları, yara enfeksiyonları ve sepsis gibi hastalıkların başlıca etmenlerindendir. Antijenik yapılarına göre; ETEC (Enterotoksijenik *E. coli*), EPEC (Enteropatojenik *E. coli*), EIEC (Enteroinvaziv *E. coli*) ve EHEC (Enterohemorajik *E. coli*) ve EAEC (Enteroadheran *E. coli*) olmak üzere 5 gruba ayrılırlar (Öğüt, 2001).

Klebsiella cinsi bakterilerin insanlarda enfeksiyon etkeni türleri; *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae subsp. ozaenae*, *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella variicola*, *Klebsiella rhinoscleromatis*'tir. Bu bakterilerin bakteremi, hepatik enfeksiyonlar, peritonit, endokardit, koleosistit gibi hastalıkların etkeni olduğu gösterilmiştir.

Klinik açıdan önem taşıyan *Enterobacter* cinsi bakteriler ise *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter asburiae*, *Enterobacter gergoviae*, *Enterobacter cowanii*, *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter ludwigii* ve *Enterobacter kobei*'dir. Bu bakteriler bakteremi, solunum yolları ve üriner sistem enfeksiyonlarının sık görülen etkenleridir (Baron, 1996).

Salmonella, *Citrobacter*, *Serratia*, *Proteus* cinsi bakteriler, diğer sık karşılaşılan *Enterobacteriaceae*'den bazılarıdır.

2.2. ANTİBİYOTİKLER

Antibiyotikler; bakteriler, mantarlar ve parazitlerin dahil olduğu mikroorganizma gruplarının gelişimini engelleyen antimikrobiyal ajanlardır.

Günümüzde üretilen farklı gruplardan antibiyotiklerin %80'i, çoğu *Streptomyces* cinsine ait farklı türlerden olmak üzere *Actinomycetes* grubu bakterilerin biyoaktif sekonder metabolitleri olarak elde edilmektedir. Bu bakterilerden elde edilen ilk antibiyotik, 1942 yılında keşfedildiğinde streptotrisin adıyla anılan streptomisindir. Antibiyotiklerin diğer %20'si ise fungal türlerden elde edilmektedir. Bu türlerin arasında penisilinlerin elde edildiği *Penicillium notatum* ve sefalosporinlerin elde edildiği *Penicillium chrysogenum* bulunmaktadır (Watve ve diğ., 2001; Dhanasekaran ve Jiang, 2016).

Antibiyotik grupları, bakteri hücrelerine farklı mekanizmalar yoluyla etki ederler:

1. Nükleik asit sentezinin durdurulması

Bakteri hücresinde nükleik asitlere etki eden antibiyotikler, DNA'nın çift sarmal yapısını bozarak, DNA ve RNA polimeazların yapısını bozarak, nükleik asitlerin yerine geçerek yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olarak işlev görürler.

Kinolonlar (siprofloksasin gibi) bakteri hücrelerinde DNA giraz (topoizomerez II) ve topoizomerez IV enzimlerine etki ederek DNA replikasyonunu önlemektedir.

Rifampisin ise; ribonükleik asit zincir gelişimini bloke ederek ve transkripsiyonun başlamasını engelleyerek RNA sentezini inhibe etmektedir.

2. Hücre duvarı sentezinin bozulması

Bakteri hücre duvarı sentezini bozan antibiyotikler, Gram pozitif bakterilerin hücre duvarının yapısını D-alanil-D-alanin dipeptid molekülündeki alt ünitelere bağlanarak peptidoglikan (murein) tabaka sentezine engel olurlar. Bu antibiyotiklerden vankomisin, metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* bakterilerinin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sık kullanılmaktadır. Hem Gram pozitif hem Gram negatif bakterilere etki edebilen beta-laktamlar da bu işlevi gören antibiyotiklerdir.

3. Sitoplazmik membran işlevinin bozulması

Bakteri hücresinde aktif ve pasif geçişlerde rol oynayan sitoplazmik membran bozulması, hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Daptomisin, polimiksin B ve polimiksin E antibiyotikler, hücrede fosfolipidler ile etkileşime girerek sitoplazmik membranın permeabilitesinin bozulmasını sağlarlar. Bu antibiyotikler, sinir sistemi üzerindeki yan etkileri nedeniyle nadiren kullanılırlar.

4. Protein sentezinin durdurulması

Bazı antibiyotikler, seçici şekilde bakteri ribozomlarını etkileyerek protein sentezini bozarlar. Bu antibiyotiklerden bir kısmı RNA'nın 30S alt ünitesine bağlanır. Örneğin; tetrasiklinler aminoasıl-tRNA bağlanmasını engelleyen antibiyotiklerdir. Aminoglikozidler (gentamisin, kanamisin, streptomisin gibi) 30S alt ünitenin 16S rRNA bileşenine bağlanarak translasyonda tRNA'nın yanlış eşleşmesine neden olurlar. Amfenikoller (kloramfenikol gibi) ve makrolidler (eritromisin gibi) ise RNA'nın 50S alt ünitesine bağlanarak peptidil transferaz aktivitesini bloke ederler (Kohanski ve diğ., 2010).

5. Metabolizma reaksiyonlarının bozulması

Bazı antibiyotikler, bakteri metabolizmasını bozarak etkili olurlar. Bunlar, daha çok substrat analogları olup enzimlerin substratlarının kimyasal yapılarına çok yakın özellikte olduğundan,

enzimlerin aktif bölgeleri, gerçek substrat yerine antibiyotikleri tanır. Ortamda yeteri kadar bulunduklarında enzimler metabolizma için gerekli olan bu maddeler yerine substrat analoglarıyla uğraşır. Bunun sonucunda metabolik aktiviteler yerine getirilemez. Sulfametoksazol-trimetoprim gibi bazı antibiyotik kombinasyonları, folik asidin sentezlenmesi aşamasında görev alan enzimleri inhibe ederek, bakteri hücresi için hayati önem taşıyan folik asit sentezine engel olurlar. Sulfametoksazol, aktif bir bileşik olan para-aminobenzoik asidin fonksiyonlarını inhibe eder. Trimetoprim ise, dihidrofolat redüktaz enziminin inhibisyonundan sorumludur (Smith ve Powell, 2000).

Antibiyotiklerin insan ve hayvanlarda sürekli artış gösteren kullanımı, sağlık örgütlerinin dünya çapında derlediği veriler ile rapor edilmektedir. Dünya Sağlık Örgütü'nün 2018'de yayınladığı 'Antibiyotik Tüketimi Araştırma Raporu'nda 46 Avrupa ülkesinin dahil edildiği 2015 yılı verilerine göre; 38.18 oranı ile bin kişi başına düşen günlük antibiyotik tüketim oranı en yüksek ülkenin Türkiye olduğu bildirilmiştir. Buna göre; 46 ülkede en sık tüketilen antibiyotik alt grubu, %37 ile penisilinler olmuştur. Diğer beta-laktam antibiyotikler ise total tüketimin %15'ini oluşturmaktadır. Total tüketimin %13'lük kısmını oluşturan 'diğer antibiyotikler' sınıfı içerisinde en fazla tüketilen ise 2. kuşak sefalosporinler olmuştur (WHO, 2018).

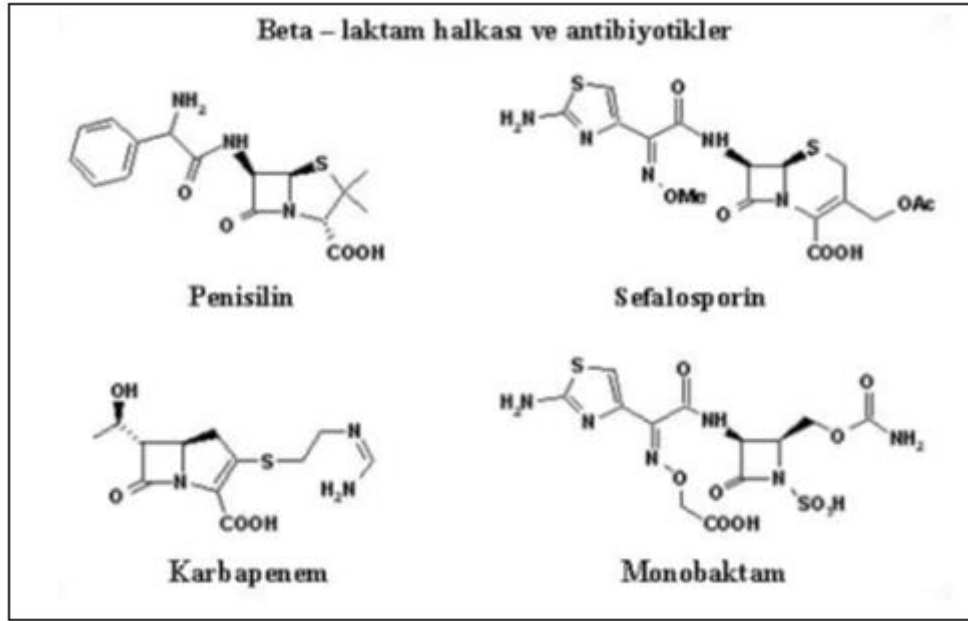
Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü'nün 2018 yılında yayınladığı 'Hayvanlarda Planlanan Antibiyotik Ajan Kullanımı Yıllık Raporu'nda 116 üye ülkeden alınan verilere göre; 2015-2017 arası hayvanlarda antimikrobiyal kullanım istatistiğinde penisilinlerin %15.2 ile ikinci en sık kullanılan antibiyotik olduğu; Avrupa'da bu oranın %20.2'ye ulaştığı belirlenmiştir. Su ortamlarında yetişen gıda kaynağı hayvanların üretimi alanında ise bu oran %4.2'dir (OIE, 2018).

2.3. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİKLER

Dünya çapında antibiyotik tüketiminin yaklaşık %50'sini oluşturan beta-laktam grubu antibiyotikler (Alpay-Karaoglu ve diğ., 2007), bakterilerde hücre duvarının temel yapısını oluşturan peptidoglikan tabakayı yıkarak işlev gören antimikrobiyal ajanlardır. Bu antibiyotikler, sahip oldukları beta-laktam halkasına eklenen zincirin yapısına göre beş ana gruba ayrılırlar:

1. Penisilinler

2. Sefalosporinler
3. Karbapenemler
4. Monobaktamlar
5. Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonları (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Beta-laktam antibiyotiklerin kimyasal yapısı (Farsak Orak, 2005).

2.3.1. Beta-Laktam Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

2.3.1.1. Penisilinler

Penisilin grubu antibiyotikler; tiazolidin halkası, beta-laktam halkası ve bir yan zincirden oluşan antibiyotiklerdir. Penisilin G'nin dahil olduğu doğal penisilinler, beta-hemolitik streptokoklar ve pnömokoklar ile *Bacillus anthracis*, *Clostridium* cinsi bakterilerin neden olduğu hafif ve orta şiddetteki üst solunum yolu ve yumuşak doku infeksiyonlarında kullanılmaktadır. Amoksisilin ve ampisilin dahil olduğu aminopenisilinler ise *E.coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* ve *Shigella* cinsi bazı Gram-negatif bakteriler ile *Listeria monocytogenes* enfeksiyonlarında tercih edilmektedir. Karbenisilin ve tikarsilin ise karboksipenisilin sınıfına dahil olup geniş spektrumlu penisilinlerdir. Aminopenisilinlerin etki alanına ilave olarak *P.aeruginosa*, *Serratia* ve *Enterobacter* cinsi bakterilerde de etkilidirler. Üreidopenisilinler piperasilin, mezlosilin gibi antibiyotikler olup Gram negatif bakteriler ve *P. aeruginosa*'da etki

gösterirler. Penisilinaz dirençli metisilin, oksasilin gibi penisilinler ise stafilokok ve streptokok enfeksiyonlarında etkilidirler.

2.3.1.2. Sefalosporinler

Sefalosporin grubu beta-laktam antibiyotikler, beta-laktam halkasının yanında dihidrotiazin halkası taşıyan antibiyotik ajanlardır. Birinci kuşak (sefalotin, sefaloridin gibi) sefalosporinler ilk keşfedilen türevleridir. Tienil halkası bulunduran bu antibiyotikler, yan zincirlerindeki α -C atomunda ikinci bir madde bulundurmazlar. İlk üretildiği dönemde yalnız Gram pozitif bakterilere etki gösteren bu antibiyotikler; sonradan yapısal değişikliğe uğratılması sonucu Gram negatif bakterilere de etki etmeye başlamıştır. Zamanla bu antibiyotikler ve sefamisinler olarak bilinen (sefoksitin, sefotetan) ikinci kuşak sefalosporinlerin kullanımı, bakterilerde direnç gelişimi ve yayılımını artırmıştır. Bu durumun etkisi genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlerin keşfiyle azaltılmıştır. Yeni oksiiimino sefalosporinler, çoğunlukla ciddi Gram negatif enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya başlamıştır. Üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin yapısında aminotiazolil ve metoksiimino grubu moleküller bulunmaktadır. Oksiiimino sefalosporinlerin (seftazidim, sefotaksim, seftriakson gibi) arasında bulunduğu genişletilmiş spektrumlu 3. kuşak ile 4. kuşak (sefepim, sefpirom) sefalosporinlerin yoğun kullanımı, önceleri beta-laktamazların hidrolitik aktivitelerine dirençli olarak dizayn edilmiş olmasına rağmen farklı direnç özellikleri taşıyan mutant bakterilerin ortaya çıkmasına neden olmuştur (Monstein ve diğ., 2007; Niu ve diğ., 2007).

2.3.1.3. Monobaktamlar

Monobaktamlar; penisilinler ile sefalosporinlere alternatif olarak kullanılan, yapısında yan zincir olarak 3 beta-aminotiazolil oksim bulunan monosiklik antibiyotiklerdir. Üretilen ilk sentetik monobaktamlara aztreonam adı verilmiştir (Demir, 2006). Etki alanları Gram negatif bakterilerle sınırlı olup geniş spektrumlu beta-laktamazlara düşük afinite gösterirler (Bush ve diğ., 1982).

2.3.1.4. Karbapenemler

Karbapenemler, en geniş etki alanına sahip beta-laktam antibiyotiklerdir. Geliştirilen ilk karbapenem *Streptomyces cattleya* türü bakteriden elde edilen tienamisindir. Trans-6-hidroksietil grubu taşıyan bu antibiyotikler, zamanla imipenem adıyla sentetik olarak

üretilmeye başlanmıştır. Sonraki yıllarda meropenem, doripenem gibi yeni sentetik türevleri üretilmiştir. İmipenem yüksek seviyede etkinliği nedeniyle ciddi üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (Papp-Wallace ve diğ., 2011).

2.3.1.5. Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri

Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörleri; beta-laktamaz inhibitörlerinin (klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam) keşfedilmesinin ardından, farklı gruplardan beta-laktamlar ile kombine edilerek kullanılması ve dirençli bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavi edilmesi amacıyla sonradan oluşturulmuş antibiyotiklerdir (amoksisilin/klavulanik asit, sefoperazon/sulbaktam gibi). Klavulanik asit ilk kez 1945 yılında *Streptomyces clavuligerus* cinsi bakterilerden elde edilmiştir. Klavulanik asit genel olarak üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli bakterilerin üremesini inhibe etmektedir; ancak sınıf C beta-laktamazların inhibisyonunda aktif değildir.

2.3.2. Beta-Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Beta-laktam antibiyotikler; hücre duvarı sentezini engelleme aktivitesine sahip antibiyotikler olup bu yolla bakteri hücresinde ozmotik basınç kaybıyla beraber lizise neden olurlar. Konfigürasyonları peptidoglikan monomerlerinde pentapeptidin hedef bölgesinde bulunan D-alanil-D-alanin molekülüne benzer özelliktedir. Bu molekülü taklit ederek transpeptidaz enzimine bağlanır ve hücre duvarının temelini oluşturan peptidoglikan tabaka ve diziler arası çapraz bağların yapımını engellerler (Van Bambeke, 2004).

2.3.3. Beta-Laktam Antibiyotiklere Karşı Geliştirilen Direnç Mekanizmaları

Beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç, başlıca 3 yolla gerçekleşmektedir.

1. Porin kaybı veya effluks (aktif dışa atım) mekanizması gibi yollarla antibiyotiklerin hücre içi konsantrasyonu azaltılır.

Porin kaybı durumunda, hücre membranında porin adı verilen kanal şeklindeki yapıların kapanmasıyla impermeabilite sağlanır. Bu sistemde, antibiyotiklerin hücreye girişini sınırlandırmak için porinlerin yerini daha seçici kanalların alması intrinsik dirençtir. Ancak yapılan son çalışmalar, porin ekspresyonunun azaltılmasının *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* gibi Gram negatif bakterilerde karbapenem ve sefalosporinlere direnç gelişimine neden olduğunu bildirmektedir (Blair ve diğ., 2014).

Effluks pompaları ise içeri alınan antibiyotik maddeyi hücrenin dışına atarak direnç neden olan düzenleyici sistemlerdir. Bu proteinlerden bazıları tek bileşiğe özgü tanıma özelliğine sahip iken; antibiyotiklerin de aralarında bulunduğu farklı antimikrobiyal maddelerin dışa atımı birden fazla bileşiği tanıyabilen pompa sistemleri ile düzenlenir. Dış membranda bir pompa proteini, bir dış membran kanal proteini ve bir periplazmik membran füzyon proteini olmak üzere üç farklı protein yapının birarada çalışmasıyla oluşan pompalar birden fazla substratı tanıyarak hücre dışına atar ve bu şekilde çoklu direnç mekanizması görevi görürler (Aygül, 2015).

2. Antibiyotik için hedef bölge olan penisilin bağlayıcı proteinin (PBP) yapısında değişiklik yapılır.

PBP ekspresyonunu kontrol eden genlerde meydana gelen mutasyonlar, PBP'lerin beta-laktam antibiyotiklere afinitesini azaltmaktadır. PBP değişikliği bazen de yeni direnç genlerinin kazanılmasıyla sağlanmaktadır. Örneğin; metisilin dirençli *S. aureus*'ta direnç mekanizması hareketli genetik elementler üzerinde taşınan yeni bir gen kasedinin kromozomal DNA'ya entegre edilmesiyle tetiklenir. Bu gen kasedindeki *mecA* geni PBP2a adı verilen yeni bir PBP sentezini kodlar. Bu yeni protein, beta-laktamlara bağlanmaz ve hücre duvarı yapımının sürekliliğini sağlar.

Aminoglikozidler için hedef bölge olan ribozomlarda metiltransferaz enzimi aracılığıyla metilasyon sonrası ribozomun yapısında değişiklik meydana gelir. Metiltransferaz enziminin *armA* ve *rmt* adı verilen genler ile kodlandığı tespit edilmiştir.

Topoizomeraz-kinolon kompleksi oluşturarak etki gösteren kinolonlara karşı direnç, topoizomerazı serbest bırakarak işlevini devam ettirmesine izin veren pentapeptid tekrar proteinleri kodlanarak sağlanır. Bu proteinler *qnr* geni ile kodlanır (Giedraitienė ve diğ., 2011; Blair ve diğ., 2014).

3. Beta-laktamaz üretimi ile antibiyotik ajanın aktivasyonu engellenir (Farsak Orak, 2005; Zhang ve diğ., 2009).

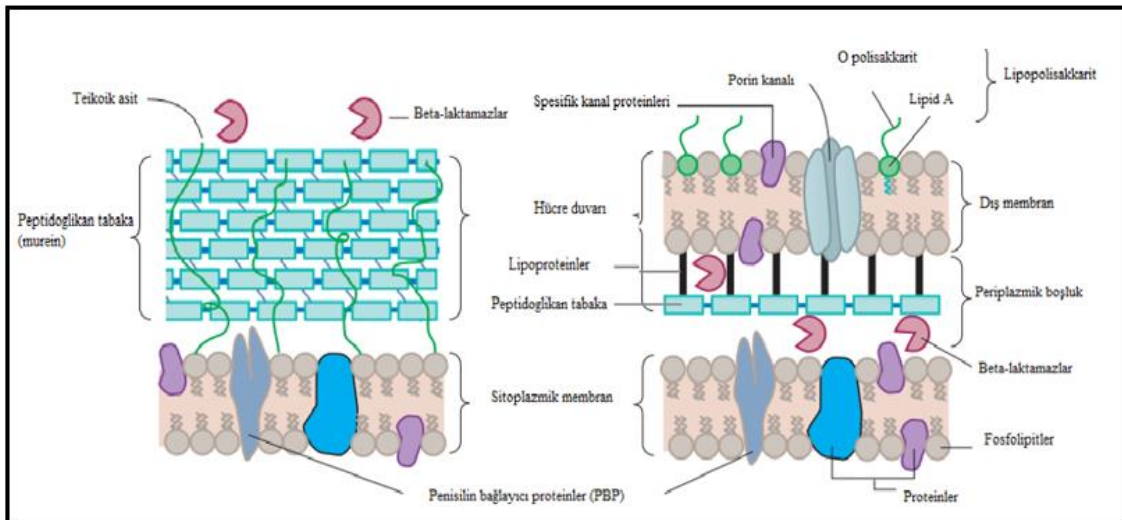
2.4. BETA-LAKTAMAZLAR

Gram negatif bakterilerde temel direnç mekanizması, beta-laktam halkasının beta-laktamaz tarafından yıkılması esasına dayanan enzimatik inaktivasyondur. Günümüze kadar, 100'den fazla farklılaşmış *bla* geni ile kodlanan 400'den fazla beta-laktamaz enzimi tespit edilmiştir. Bu enzimlerin birkaç aminoasit değişikliği sonucu meydana gelen varyantları, aynı zamanda dirence neden olduğu substrat antibiyotiğe karşı spesifitesini belirlemektedir (Zhang ve diğ., 2009).

Beta-laktam antibiyotiklerin amid bağlarını hidroliz ederek işlev gösteren beta-laktamazların, benzeşen yapıları nedeniyle evrimsel süreçte penisilin bağlayıcı proteinlerden farklılaşmış olabileceğini belirten çalışmalar mevcuttur (Bradford, 2001; Henriques ve diğ., 2006b; Demir, 2006).

Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan tabaka çok katmanlı olup antijenik özellikteki teikoik asit polimerlerini bulundurur. Dış membranın olmadığı bu hücrelerde, beta laktamazlar peptidoglikan tabakası üzerinde yer alır.

Gram negatif bakterilerde ise peptidoglikan tabaka tek katmanlı olup lipopolisakkarit yapıda bir dış membran bulunur. Beta-laktamlar dış membran üzerindeki porin kanallarından geçerek dış membran ile hücre membranı arasındaki periplazmik boşlukta sentezlenen beta-laktamaz enzimleri ile karşılaşır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Gram pozitif (solda) ve Gram negatif (sağda) bakterilerde hücre duvarı ve beta-laktamazlar (Brunton ve diğ., 2010).

2.4.1. Beta-Laktamazları Kodlayan Genetik Faktörler

Beta-laktamaz enzim sentezi yoluyla antibiyotik direncinin keşfedildiği yıllardan günümüze kadar, birçok farklı beta-laktamaz türevi ortaya çıkmıştır. Bunun başlıca nedeni, beta-laktamaz sentezini kontrol eden genlerin yalnız dikey gen transferi değil, yatay gen transferi ile de bakteri grupları arasında geçiş yapabiliyor olmasıdır.

E. cloacae, *S. marcescens*, *C. freundii* gibi bazı bakterilerde antibiyotik direncini sağlayan beta-laktamazları kodlayan genler kromozomal DNA üzerinde yer almaktadır. Bununla birlikte direnç genleri, bakteri hücrelerinde bulunan kromozom dışı genetik faktörlere geçiş yapabilmektedir. Plazmidler, integronlar ve transpozonların dahil olduğu bu faktörler, farklı bakteri türleri ve grupları arasında yatay gen transferini sağlamaktadır.

Çevresel su kaynaklarına doğrudan geçiş yapabilen atık sularda farklı antibiyotik gruplarına direnç neden olan genetik faktörlerin birarada taşınması mümkündür. Yatay gen transferi yoluyla kromozomal DNA'nın mutasyonel transformasyonu, plazmidler, integronlar ve transpozonlarla konjugatif transfer ve bakteriyofaj transdüksiyonu ile gerçekleşmektedir. Kromozom dışı genetik faktörler kendiliğinden replike olamadığından, bir faj veya çoğu zaman olduğu gibi bir plazmid ile taşınarak bir hücreden diğerine geçiş yapabilir. Küçük bir transpozon tipi olan insersiyon dizileri rekombinaz ve transpozaz kodlama dışında herhangi bir fonksiyona sahip değildir. Transpozonlar ve insersiyon dizileri çoğunlukla rastlantısal, bazen de genom veya plazmidler üzerinde sıçramalar yapar ve bunun sonucunda yeni veya çoklu direnç ortaya çıkar. İntegronlar kendiliğinden hareket edemez; ancak kendi görünür bölgelerinde bulunan direnç gen kasetlerini yakalama, entegre etme ve eksprese etme yeteneğine sahiptir (Zhang ve diğ., 2009).

Direnç plazmidleri (R faktör), farklı grup antibiyotiklere direnç mekanizmalarını kodlayan genlerin kaynağıdır. Zhang ve diğ. (2009), atık su arıtma sistemlerinden elde edilen *bla* geni içeren plazmidlerin, transpozon ve integronlar ile ilişkili olduğunu ve çoğunlukla aminoglikozid nükleotidiltransferaz (asetiltransferaz) kodlayan *aad* (*acc*), kloramfenikol effluks proteini kodlayan *cm1* ve kloramfenikol asetiltransferaz kodlayan *cat* ile bir arada taşındığını belirtmiştir. Ozgumus ve diğ. (2007), yaptıkları araştırmada hareket edebilen integronların

trimetoprim, aminoglikozidler, kloramfenikol ve tetrasiklinler gibi antibiyotik ajanlara karşı direnç determinantlarını kodlayan gen kasetlerini entegre edebildiğinden bahsetmiştir. Yine Philippon ve diğ. (2002), beta-laktamazları kodlayan genleri taşıyan plazmidlerin, aynı zamanda aminoglikozidler, kloramfenikol, sulfonamid, tetrasiklin, trimetoprim gibi diğer antibiyotik gruplarına direncin kodlanmasında rol alan genlerin de kaynağı olduğunu bildirmiştir.

2.4.2. Beta-Laktamazların Sınıflandırılması

Beta-laktamazların sınıflandırılmasında; moleküler özelliklerine göre yapılan Ambler sınıflandırması ve fonksiyonel özelliklerine göre yapılan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırması kullanılmaktadır.

Ambler ; enzimleri aminoasit dizilerine göre A, B, C ve D olmak üzere dört sınıfa ayırmıştır. A, C ve D sınıfları, aktif bölgesinde serin aminoasidi taşıyan enzimler iken; B sınıfı enzimler aktif bölgede bir Zn^{+2} iyonu taşıdığından, metallo-beta-laktamazlar olarak bilinirler.

Bush-Jacoby-Medeiros ise beta-laktamazları, substrat profili ve moleküler ağırlık gibi özelliklerine göre 1'den 4'e kadar dört farklı grupta toplamıştır. Örneğin; Grup 1'de klavulanik asit ve sulbaktamdan etkilenmeyen, monobaktam ve karbapenem duyarlılığı gösteren enzimler bulunmakta; EDTA ile inhibe olabilen metallo-beta-laktamazlar ise Grup 3'te yer almaktadır (Bush ve diğ., 1995). Beta-laktamazların ayırımında daha çok Ambler sınıflandırma sistemi tercih edilmektedir. Aminoasit dizileri, substrat ve inhibitör profillerine dayanılarak 340'tan fazla beta-laktamaz, Ambler tarafından A'dan D'ye dört farklı sınıfta toplanmıştır. Plazmid aracılı geniş spektrumlu TEM ve SHV ailelerini içeren sınıf A enzimler ve hem kromozomal hem plazmid aracılı kodlanan sefalosporinazları kapsayan sınıf C enzimler en sık karşılaşılan beta-laktamazlardır (Monstein ve diğ., 2007; Henriques ve diğ., 2006a).

2.4.2.1. Sınıf A Beta-Laktamazlar

Genellikle penisilinaz özellik gösteren sınıf A beta-laktamazlardan en sık karşılaşılanlar TEM, SHV ve CTX-M enzimler ve bu enzimlerin türevleridir.

TEM tipi beta-laktamazlar daha çok penisilinleri hidroliz eden penisilinazlardır. TEM-1 enzimlerin en iyi substratlarının ampisilinler olduğu düşünülmeyle birlikte ayrıca birinci kuşak

sefalosporinleri de hidroliz ettikleri bilinmektedir (Demir, 2006). TEM-1 beta-laktamazlar ilk kez 1965 yılında Yunanistan, Atina’da Temoniera adlı bölgede bir hastadan izole edilen *E. coli* bakterisinde görülmüş ve adını bu bölgeden almıştır (Paterson ve Bonomo, 2005). Beta-laktam antibiyotiklerin aşırı kullanımına bağlı olarak, aslen *E. coli* ve *K. pneumoniae* başta olmak üzere *Enterobacteriaceae*’de bulunan bu enzimler, aynı zamanda *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*’de de görülmüştür (Monstein ve diğ., 2007). TEM-1’den farklılaştığı bilinen ilk varyant TEM-2 enzimi olarak adlandırılmıştır. Bu enzim, TEM-1’de 39. yerleşimdeki lizinin glutamin ile yer değiştirmesi ile oluşmuştur. TEM-2 enzimin substrat profili ise TEM-1 ile özdeşir.

En çok rastlanan beta-laktamazlardan biri olan SHV-1 enzimler, penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinlere dirence neden olurlar (Bradford, 2001; Rupp ve Fej, 2003). Adını sülfidril değişken yapısından alan SHV enzimler, en sık *Klebsiella*, *Escherichia*, *Salmonella* cinsi bakterilerde ve bazen de *Pseudomonas*’ta görülmektedir (Monstein ve diğ., 2007; Pitout ve Laupland, 2008).

TEM ve SHV tipi beta-laktamazları kodlayan *blaTEM* ve *blaSHV* genlerinde meydana gelen nokta mutasyonlar, bir veya daha fazla aminoasit değişimine neden olarak bu enzimlerin yapısal ve fonksiyonel açıdan değişmesine neden olmuştur. Daha geniş spektrumda beta-laktam antibiyotik hidrolizi yapabilen bu yeni enzimlere genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) adı verilmiştir. İlk olarak 1989’da TEM-1’den türevlenen TEM-3 varyantının tanımlanmasıyla ortaya çıkarılan GSBL’ler, oksimin sefalosporinler ve monobaktamlara direncin etkeni olup sulbaktam, tazobaktam ve özellikle klavulanik asit ile inhibe olurlar. Ancak sefamisin ve karbapenemlere karşı etkinlikleri yoktur. Bu direnç fenotipi, rastlantısal mutasyonların başarılı birikimi sonucu günümüze varan çoklu aminoasit değişikliği temeline dayanan GSBL evrimini yansıtmaktadır (Rupp ve Fej, 2003; Pitout ve Laupland, 2008; Bali ve diğ., 2010). Bu bağlamda GSBL kodlayan genler, kodlayıcı ve promotör bölgelerinde çoklu mutasyonlar taşır. Bazı değişiklikler suskun olup bazıları ise fenotipe yansıtılarak enzim aktivitesini etkileyen aminoasit değişikliklerine neden olur (Caniça ve diğ., 1997).

TEM-1 veya TEM-2 kökenli, 12 farklı pozisyonda aminoasit değişikliği sonucu meydana gelen 90’dan fazla GSBL tanımlanmıştır. TEM GSBL varyantlarında görülen dizi değişimleri; 104. pozisyonda glutamattan lizine, 164. pozisyonda argininden serin veya histidine, 238.

pozisyonda glisinden serine ve 240. pozisyonda glutamattan lizine dönüşümlerdir. GSBL fenotipine sahip SHV varyantlarının çoğu ise 238 no'lu pozisyonda serin yerine glisin değişikliği ile karakterize edilmektedir (Pitout ve Laupland, 2008).

Şimdiye dek 200'den fazla türevi tanımlanan GSBL'nin en sık rastlandığı *Enterobacteriaceae* türleri *E. coli* ve *K. pneumoniae*'dir (Rupp ve Fej, 2003; Livermore ve Woodford, 2006; Machado ve diğ., 2008).

GSBL'nin keşfedildiği ilk dönemlerde TEM ve SHV varyantları daha yaygın iken, son yıllarda özellikle hastane dışı ortamlardaki yayılım potansiyeline dikkat çekilen CTX-M varyantlarının daha sık rapor edildiği bilinmektedir (Bali ve diğ., 2010; Demirdağ ve diğ., 2013).

TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 tipi enzimlerden kökenlenen GSBL harici enzimler de bulunmaktadır. İnhibitör dirençli olan bu beta-laktamazlar, amoksisilin/klavulanik asit kombinasyonlarına direnç neden olabilen; ancak nadir görülen enzimlerdir (Nordmann, 1998). TEM ve SHV kökenli olmayan GSBL'ler içinde son yıllarda en sık rastlanan CTX-M enzimleri, sınıf A GSBL'erin önemli bir alt grubunu teşkil eden plazmid aracılı enzimlerdir. Bu enzimler *Enterobacteriaceae*'de daha çok sefotaksim hidrolizi yaparlar; bu nedenle CTX-M-1 dahil tüm CTX-M enzimlerin GSBL olduğu kabul edilmektedir (Farsak Orak, 2005; Pitout ve Laupland, 2008). TEM ve SHV enzimleriyle yaklaşık %40'luk aminoasit benzerliği taşıyan bu enzimler, *Enterobacteriaceae*'nin diğer türlerinde doğal olarak bulunan kromozomal aracılı beta-laktamazların türevleridir. *Kluyvera ascorbata* türüne ait kromozomal AmpC enzimi ile CTX-M tipi enzimler arasında görülen yüksek dizi homolojisi, enzimin bu bakteri türünden kökenlendiğini düşündürmektedir. CTX-M beta-laktamazlara ait filogenetik çalışma 4 ana tipi ortaya çıkarmıştır: CTX-M-1 ve CTX-M-3'ü içeren CTX-M-1 tipi; CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7 ve Toho-1'i içeren CTX-M-2; Toho-2 ve CTX-M-8. (Bradford ve diğ., 2001; Monstein ve diğ., 2007; Pitout ve Laupland, 2008).

Sonradan tanımlanan ve GSBL olarak adlandırılmayan başka bir grup beta-laktamazlar ise beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli olanlardır. Bunlar genelde TEM kökenli olup 19 ayrı varyantı tespit edilmiştir. Bu enzimler, beta-laktamaz inhibitörlerinden klavulanik asit ve sulbaktam dirençli, tazobaktam duyarlıdır. Ayrıca genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere direnç gösteremezler (Rupp ve Fej, 2003).

E. cloacae ve *S. marcescens*'te görülen kromozomal aracılı penisilinazlar (Sme-1, NmcA, IMI-1) da sınıf A beta-laktamazlara dahil edilmiştir.

2.4.2.2. Sınıf B Beta-Laktamazlar

İlk kez 1991 yılında *P. aeruginosa*'da IMP-1 enziminin bildirilmesiyle tanımlanan sınıf B beta-laktamazlar, metallo-beta-laktamazlar olarak da bilinen karbapenemazlardır (Demirdağ ve diğ., 2013). IMP ve VIM enzimlerini kapsayan karbapenemazların çeşitli inhibitörleri henüz araştırma aşamasındadır. Klavulanik asit ile inhibe olmayan metallo-beta-laktamazların EDTA ile inhibisyonunda olumlu sonuç alınan çalışmalar mevcuttur (Nordmann, 1998). Fakat bunların hepsi klinik kullanımdan uzak olmakla birlikte karbapenemaz üreten suşların çoğu, sahip olduğu direnci muhtemelen hiçbir inhibitöre cevap vermeyen permeabilite ve effluks sistemine borçludur (Livermore ve Woodford, 2006).

Enterobacteriaceae'de rapor edilen karbapenemazlar nadir görülen plazmid aracılı metallo-enzim IMP-1'dir. *blaIMP-1* geni ilk kez bir *S. marcescens* izolatının kromozomal DNA'sında izole edilmiş olup, daha sonra aynı bakteride plazmid, transpozon ve integron aracılı kodlandığı görülmüştür (Nordmann, 1998). *blaIMP* dışında sınıf B beta-laktamaz kodlayan genler *blaVIM* ve *blaNDM*'dir.

2.4.2.3. Sınıf C Beta-Laktamazlar

Sınıf C beta-laktamazlar, Ambler tarafından AmpC tipi enzimler olarak adlandırılan sefalosporinazlardır (Farsak Orak, 2005; Demir, 2006).

İlk kez 1940 yılında bir *E. coli* izolatında keşfedilen AmpC beta-laktamazlar penisilinlere nazaran sefalosporinler üzerinde etkili olup 7- α -metoksi sefalosporinleri (sefoksitin ve sefotetan) hidroliz edebilen enzimlerdir. Fazla miktarda üretildiklerinde penisilin ve monobaktam direnci de sağlayabildikleri rapor edilmiştir (Nordmann, 1998; Yagi ve diğ., 2005; Black ve diğ., 2005; Jacoby, 2009). AmpC sentezi yapabilen bakterilerde, dış membran porin kaybı ve/veya aşırı effluks ekspresyonu da dirence eşlik ettiğinde karbapenem hidrolizi yapılabilmektedir (Demirdağ ve diğ., 2013).

AmpC tipi enzimler; Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırmasında Grup 1'e dahil edilmiştir. Bu enzimlerin *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* ve *Proteus mirabilis* gibi bakterilerde kromozomal DNA aracılığıyla doğal olarak üretildiği bilinmektedir (Schwartz ve diğ., 2002). Şimdiye kadar yapılan çalışmalarda, kromozomal aracılı *blaAmpC* geninin aşırı ekspresyonunun, baskılanmış mutantlarda sonradan kazanılmış AmpC enzim sentezine yol açarak tedavi esnasında direnç oluşumunu tetiklediği dile getirilmiştir (Pérez-Pérez ve Hanson, 2002; Öcal, 2012). *AmpD* reseptör genindeki mutasyonlar, AmpC beta-laktamazların aşırı üretimine neden olmaktadır. *E. coli*'de AmpC regülasyonu oldukça farklı bir mekanizma ile çalışır. *AmpR* geni taşımayan *E. coli* için AmpC indüklenebilir bir enzim değildir. Bu nedenle kromozomal aracılı *blaAmpC* esasen düşük seviyede üretilir. Yine de bazı çalışmalar, *E. coli*'de AmpC promotör/attenuatör bölgedeki çeşitli mutasyonların aşırı ekspresyona neden olabildiğini bildirmiştir (Nelson ve Elisha, 1999; Peter-Getzlaff ve diğ., 2011).

K. pneumoniae ve *K. oxytoca* türü bakterilerde ise kromozomal *blaAmpC* geni yoktur (Philippon ve diğ., 2002; Manoharan ve diğ., 2012).

AmpC'ler; penisilinazlardan farklı gen dizilimine sahip olmakla birlikte, tıpkı penisilinazlar gibi plazmidler ile taşınan genler tarafından da kodlanabilen enzimlerdir. GSBL grubu enzimlerden farklı olarak sefamisinleri de hidroliz ederek daha geniş spektrumdaki beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç göstermektedirler. GSBL enzimlerini inhibe edebilen klavulanik asit, AmpC üzerinde ise yok denecek kadar az seviyede inhibisyon etkisine sahiptir. Bazı kaynaklar, direncin imipenem duyarlılığını azalttığını da ortaya koymuştur (Jacoby, 2009; Peter-Getzlaff ve diğ., 2011; Coşkun ve Altanlar, 2012).

Enterobacter spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Aeromonas spp.* ve *Hafnia alvei* gibi bakterilerin kromozomal aracılı AmpC'lerinin aminoasit dizilimlerinde meydana gelen küçük değişimler, plazmid aracılı AmpC'lerin ortaya çıkmasına ve zamanla bu enzimlerde varyasyonlara yol açmıştır. 1989'dan beri varlığı bilinen bu enzimler kromozomal DNA aracılı AmpC'ler ile aynı fonksiyonel özellikleri göstermektedir (Pitout ve diğ., 2010).

Plazmid aracılı AmpC, en çok *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella spp.*, *P. mirabilis* gibi kromozomal aracılı AmpC enzimine sahip olmayan diğer türlerde görülebilmektedir. Bazı

enzimler *E. coli*'de de gösterilmiş olup aynı zamanda normalde *E. coli* 'de zayıf olarak eksprese edilen kromozomal *blaAmpC* geni sonradan AmpC promotör/attenuatör bölgede oluşan bir mutasyon nedeniyle güçlü bir şekilde eksprese edilebilmektedir (Philippon ve diğ., 2002).

Nordmann, 1998 yılında yaptığı çalışmada plazmid aracılı beta-laktamazları, gösterdikleri aminoasit dizi homolojilerini göz önünde bulundurarak üç farklı grupta toplamıştır. Buna göre ilk grupta; Japonya'da bir *K.pneumoniae* suşunda izole edilen MOX-1 ve Arjantin'de izole edilen FOX-1'dir. Bu enzimler daha çok %40 aminoasit dizi homolojisi gösterdikleri *Pseudomonas aeruginosa*'nın AmpC sefalosporinazlarına yakındırlar. İkincisi Güney Kore'de *K. pneumoniae*'de izole edilen CMY-1, Yunanistan'da izole edilen CMY-2, LAT-1 ve *E. coli*'de izole edilen BIL-1 enzimleridir. Üçüncü grupta ise diğer iki grup ile çok farklı bir aminoasit dizilimi gösteren MIR-1 enzimi yer almaktadır.

Plazmid aracılı beta-laktamazlar hakkında yapılan çalışmalarda bu enzimler, dizi homolojilerine göre 6 farklı gruba ayrılmıştır. Bunlar; *Hafnia alvei* kökenli ACC, bilinmeyen kökenli MOX ve FOX enzimleri, *Morganella morganii* kökenli DHA, *Citrobacter freundii* kökenli CIT ve *E. cloacae* kökenli EBC'dir. Bu bakterilerin kromozomal AmpC'leri ile benzerlik yüzdeleri ACC, FOX, MOX, DHA, CIT ve EBC için sırayla %94.3, %94.2, %89.4, %95.7, %98.6 ve %84.2 olarak belirlenmiştir. Önceleri *blaFOX-6* olarak adlandırılan *blaFOX-5b* geni ise *blaFOX-5* geninde yalnızca bir nükleotid değişimiyle farklılaşmıştır (Pérez-Pérez ve Hanson, 2002; Philippon ve diğ., 2002).

Sınıf C beta-laktamazların aşırı ekspresyonu sefotaksim, seftazidim ve seftriakson gibi geniş spektrumlu sefalosporinlere direnci sağlar ve özellikle *Enterobacter aerogenes* ve *E. cloacae*'ye bağlı enfeksiyonlarda, bu ajanlara tedavi boyunca dirençli hale geldiğinde sorun teşkil eder (Manoharan ve diğ., 2012).

2.4.2.4. Sınıf D Beta-Laktamazlar

OXA grubu beta-laktamazları kapsayan plazmid aracılı Ambler sınıf D enzimler genellikle *P. aeruginosa*, nadiren *Enterobacteriaceae* tarafından sentezlenmektedir. Bu grupta yer alan enzimlerin penisilinler ve karbapenemlere etki ettiği; ancak genişletilmiş spektrumlu sefalosporinleri hidroliz etmediği bilinmektedir (Potron ve diğ., 2011; Öcal, 2012).

2.4.3. Beta-Laktamazların Tespit Edilmesinde Kullanılan Yöntemler

2.4.3.1. Beta-Laktamazların Tespit Edilmesinde Kullanılan Fenotipik Yöntemler

GSBL tipi enzimler, klavulanik asit tarafından inhibe edilirler. Bu özelliklerinden yararlanılarak geliştirilen testler ile GSBL fenotipik doğrulama testleri uygulanmaktadır. Bu testler; çift disk sinerji testi, kombine disk testi, üç boyutlu disk testidir. Çift disk sinerji testinde; klavulanik asit inhibitörü emdirilmiş bir boş diskin her iki yanına seftazidim ve sefotaksim sefalosporin diskler yerleştirilir ve bir veya her iki yandan inhibitör diskine doğru genişleyen inhibisyon zonları pozitif sonuç olarak değerlendirilir. Kombine disk testinde; seftazidim veya sefotaksimin tek başına ve klavulanik asit ile kombine edilmiş diskleri arasındaki inhibisyon zon çapı farkı değerlendirilerek yapılır. Kombine disk etrafındaki inhibisyon zon çapında ≥ 5 mm'lik fark GSBL pozitif sonucu gösterir. Üç boyutlu disk testinde ise; *E.coli* ATCC 25922 gibi bir hedef suşa klasik disk difüzyon testi uygulanır. Bakteri süspansiyonu agarda açılan dairesel yarığa konur ve 3 mm uzağa seftazidim veya sefotaksim içerikli bir disk yerleştirilir. İnhibisyon zonundaki bozulma, antibiyotiğin GSBL ile hidroliz olduğunu gösteren pozitif sonucu verir.

Boronik asitler, 1982'den beri sınıf C beta-laktamazların spesifik inhibitörü olarak bilinmektedir. Bu özellikten yararlanılarak GSBL doğrulama testleri temel alındığı ve test antibiyotiği olarak genellikle sefoksitin tercih edildiği fenotipik modifiye çift disk ve modifiye kombine disk testlerinde başarılı sonuçlar elde edilmektedir (Yagi ve diğ., 2005; Koldaş ve diğ., 2011).

Fenotipik yöntemler kullanılarak belirlenen beta-laktamaz enzimlerinden biri, son yıllarda ortaya çıkan karbapenemazlardır. Sınıf A beta-laktamazlardan NDM-1 ve sınıf D beta-laktamazlardan OXA-48 tespitinde yüksek seviyede duyarlı olan modifiye Hodge Test kullanılmaktadır. Mueller-Hinton Agar besiyerinde karbapeneme duyarlı bir suşun, sahip olduğu enzim sayesinde üreyebilmesini temel alan testte, duyarlı suş yonca şeklinde bir inhibisyon zonu oluşturur. Bu yöntem uzun süren bir prosedür gerektirmekte ve bazen AmpC beta-laktamaz üreten suşlarda yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Karbapenemaz aktivitesinin tespit edilmesinde inhibisyon esasına dayanan EDTA testi de bulunmaktadır (Girlich ve diğ., 2012).

Doğrulama test yöntemlerinden biri de mikrodilüsyon testidir. Sefalosporin antibiyotik ile inhibitörle kombine edildiği durumlarda MİK (minimum inhibisyon konsantrasyonları) değerlendirmesi yapılır. İnhibitörlü kuyucuklarda MİK değerlerinde en az 8 kat azalma pozitif sonuç anlamına gelir. MİK değerlerinin ölçülmesi esasına dayanan bir başka yöntem ise E-test'tir. Bir tarafına yalnız test antibiyotiği, diğer tarafına uygun inhibitör emdirilmiş hazır bir sribin kullanıldığı yöntem, yapılan çalışmalarda duyarlı ve güvenilir olarak değerlendirilmektedir (Monstein ve diğ., 2007; Peter-Getzlaff ve diğ., 2011). Yine de, hem GSBL hem AmpC üreten bakterilerde fenotipik testlerin duyarlılığı hakkında şüpheli yaklaşımlar mevcut olup moleküler yöntemler ile karşılaştırma yapılması tavsiye edilmektedir.

Bakteriyel organizmaların oluşturduğu direnç mekanizmalarını tam olarak doğru bir şekilde karakterize etmek yalnızca tek bir test ile mümkün olmamaktadır. Fenotipik yöntemlerin kullanıldığı duyarlılık testleri, direncin tespitinde gerekli olmakla birlikte son dönemlerde yetersiz kalabilmektedir. Son yıllarda klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanımı artan, daha kolay uygulanabilen ve kısa zamanda sonuç veren kart okuyuculu VITEK otomatize sistem de beta-laktamazların tespitinde etkili bir yöntemdir. Duyarlılık testleri arasında genotipik tekniklere dayalı otomatize sistemler mevcut olsa da, plazmid aracılı direnci tek başına veya diğer direnç mekanizmaları ile eşzamanlı olarak eksprese eden organizmalar için kesinliği şüphe uyandırabilmektedir. Bu durum, direnç mekanizmalarını birbirinden ayırt etmek için fenotipik ve moleküler identifikasyon yöntemlerinin klinik ve araştırma laboratuvarlarında birarada kullanılmasını gerektirmektedir (Pérez-Pérez ve Hanson, 2002).

2.4.3.2. Beta-Laktamazların Tespit Edilmesinde Kullanılan Genotipik Yöntemler

Beta-laktamaz kodlayan genlerde karmaşık mutasyonların meydana gelmesi sonucu yeni direnç spektrumuna sahip çok sayıda beta-laktamaz türevinin ortaya çıkması, bu enzimlerin fenotipik yöntemler ile ayırt edilmesini olanaksız kılmıştır. Bu şekilde; gen mutasyonlarının hangi nitelikte ve ne seviyede dirence neden olduğunun belirlenmesine dair yararlı ve güvenilir veriler edinilmesini sağlayan moleküler çalışmalar geliştirilmiştir.

Çalışmamızda da uyguladığımız klasik PZR yöntemi, araştırılan gen dizisinde bulunan oligonükleotid primerler aracılığıyla genin binlerce kopyasının çıkarılabildiği bir yöntemdir.

Yöntemin temel aşamalarından ilki, DNA zincirinin denatürasyonudur. Açılan zincire uygun primerlerin bağlanması, ardından deoksinükleosit trifosfat ile zincirin uzaması sağlanır. Uygun sıcaklık ve sürelerde çoğaltılan DNA kopyalarının varlığı incelenir. PZR gen haritalama, DNA parmak izi gibi farklı alanlarda kullanılan bir moleküler yöntemdir. PZR yönteminde primerler, önceden belirlenmiş gen dizilimlerinden yararlanılarak elde edilmektedir. Bunun için GenBank adı verilen, birçok nükleik asit ve protein dizisinin yer aldığı bir veri tabanı bulunmaktadır. Bununla birlikte PZR ile ayırt edilemeyen GSBL türevleri, PZR ürününün uygun restrüksiyon endonükleazları ile kesilerek dizi analizlerinin yapılmasıyla belirlenmektedir (Bradford, 2001).

Son yıllarda geliştirilen multipleks PZR yöntemi, farklı hedef bölgelerin eş zamanlı olarak araştırılmasında önemli ölçüde zaman ve maliyet kaybını önlemektedir; fakat tüm reaksiyonlar aynı koşullar altında gerçekleştiğinden, bazı DNA amplifikasyonlarının inhibe edilmeleri sonucu yanlış negatif sonuç elde edilmesi de mümkün olabilmektedir. Multipleks PZR yönteminin bir diğer dezavantajı ise, primer çiftleri arasındaki dimer yapısının deney sonuçlarını maskeleyesi ve düşük duyarlılığa neden olabilmesidir. Bütün bu dezavantajlara rağmen multipleks PZR hala izole edilmiş bakteriler veya çevresel DNA'daki birden fazla antibiyotik direnç geninin saptanmasında hızlı ve güvenilir bir yöntem olarak görülmektedir. Kantitatif gerçek zamanlı PZR; ilk konsantrasyonun, amplifikasyon döngüleri ile değişen PZR ürünü konsantrasyonundaki değişikliklere dayanılarak tahmin edilmesi esasına dayanan, hedef DNA'nın sayımında kullanılan bir yöntemdir.

Beta-laktamazların tespit edilmesinde kullanılan bir başka moleküler yöntem de DNA mikroarray'dir. DNA mikroarray; yüksek verimlilik, yüksek hız ve yüksek duyarlılık gösteren bir genomik analiz yöntemidir. Antibiyotik dirençlerinin belirlenmesinde DNA mikroarray, eş zamanlı olarak tek bir çalışma ile birçok sayıda antibiyotik direnç geni varlığı veya yokluğunu saptamada izolatlarla ilgili detaylı bilgi sağlamaktadır. Mikroarray, birkaç saat içinde antibiyotik direnç determinantlarının belirlenmesini sağlayan ve geleneksel direnç saptama çalışmalarını destekleyen zaman kazandırıcı ve güvenilir bir yöntemdir. Bu yöntem klinik örneklerin antibiyotik dirençlerini değerlendirmenin yanı sıra, çevresel örneklerde için de kullanılmıştır. Yöntemin çevresel örneklere uygulanmasında ilk dezavantaj, yöntemin sınırlı saptama özelliğidir; ancak çevresel antibiyotik direnç genleri için PZR ile birlikte kullanımı saptama limitini yükseltebilmektedir. DNA mikroarray'in sık kullanılmamasının diğer bir nedeni ise örneklerin karmaşıklığı ve ön işlem uygulamasıdır. Çevresel örneklerde istenmeyen

kontaminantların varlığı DNA ekstraksiyonu ve/veya hedef gen amplifikasyonunu inhibe etmektedir. Bu yüzden tatmin edici sonuçları elde edebilmek için çevresel örneklerin karmaşık ön işlemlerden geçirilmesi gerekmektedir. Mikroarray yöntemi bakteriyel antibiyotik direnci için detaylı bir tanımlama imkanı sunmakta, çevresel değişikliklere karşılık direnç genlerinin ekspresyonundaki küresel değişiklikleri ortaya koymaktadır. Gen ekspresyonu hakkında edinilen bilgiler; antibiyotik direnç mekanizmaları ve antibiyotik direnç genlerinin çevreyle ilişkili değişikliklere genetik tepkisi ile ilgili önemli veriler sunacaktır (Zhang ve diğ., 2009).

DNA problemleri, PZR amplifikasyonu ve BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) sistemleri ile DNA dizileme gibi moleküler yöntemlerin bulunması her bir mikrobiyal komünitenin genetik içeriğini direkt değerlendirecek uygulamaların geliştirilmesine fırsat tanımıştır. Ayrıca, ekzojenik plazmid izolasyon yöntemlerinin uygulanması da yalnızca genetik direnç determinantlarının moleküler yayılımının karakterizasyonlarında değil, aynı zamanda tüm fonksiyonel genlerin belirlenmesi ve ilgili enzimlerin aktivitelerinin değerlendirilmesinde önemli bir adımdır. Antibiyotik direncinin çalışılmasında DNA temelli bir yaklaşım, dirençli bakterilerin kültüre edilmesi gerektiği önyargısını kırmaktadır. Bu şekilde doğal bir ortamda bulunan direnç determinantlarının moleküler tipleri ile ilgili bütünsel bir bakış ortaya koyulabilmektedir (Henriques ve diğ., 2006b).

2.5. SU ORTAMLARINDA ANTİMİKROBİYAL DİRENCİN GELİŞİMİ

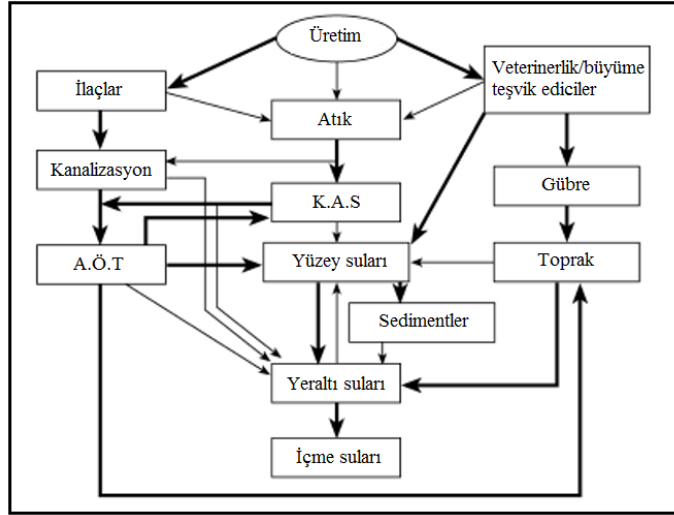
Antibiyotik tüketim oranları farklı coğrafyalarda gün geçtikçe artarken, insan ve hayvanlarda yeterince metabolize olmadan dış ortamlara atılan bu sentetik kimyasallar hem klinik hem de çevresel ortamlarda birikerek kimyasal kirliliğin önemli unsurlarından biri olmuş, daha da önemlisi direnç faktörlerinin seçiliminde başlangıç noktasını oluşturmuştur.

Yapılan birçok çalışma; atık su ön arıtma tesislerinin, antibiyotik direnç genlerinin önemli bir rezervuarı olduğunu ortaya koymaktadır. Bu tesisler; hastane, ev, endüstri ve tarım kökenli kanalizasyon sularının geçiş noktası olduğundan, çevresel antibiyotik direnç genlerinin rekombinasyonu, alışverişi ve yayılımında önemli rol oynamaktadır. Bu atık suların boşaltımı, yüzey suları sedimentlerinin, antibiyotik dirençli bakterilerin beslenmesi için zengin habitatlar oluşturmasının ana nedenidir. Bu atık sular aynı zamanda radyoizotoplar, hormonlar ve ağır metaller gibi toksik maddeler ile patojenik mikroorganizmaları da barındırabilmektedir. Bu

atıkların elimine edilmesindeki başarısızlık ve temel hijyen uygulamalarının yetersizliği, çevredeki bu mikroorganizmalar ile direnç genlerinin ve antibiyotik kalıntılarının yüzey ve yeraltı sularından içme sularına kadar ulaşmasına katkıda bulunmaktadır (Prado ve diğ., 2008; Zhang ve diğ., 2009; Lu ve diğ., 2010).

Dirençli bakteriler; hastane atıkları, kentsel atık sular, havalandırma tankları, atık su arıtma tesislerinin anaerobik ayırma süreçleri veya topraktaki antibiyotikler tarafından seçilim baskısına maruz kalmaktadır. Ayrıca, kurak bölgelerde sulama işlemleri dirençli bakteriler ve antibiyotik kalıntıları içeren atık sular ile yapılmakta, atık su çamurları ise gübre işlevi görmektedir. Bu durum, dirençli bakterilerin besin zincirine direkt olarak girmesine izin vermektedir (Kümmerer, 2003).

Bakteriler, maruz kaldıkları antibiyotiklerin etkilerini ortadan kaldıracak farklı savunma mekanizmaları geliştirmiştir. Bu mekanizmaların işlevselliğinde rol alan moleküllerin yapımını kodlayan genler dikey gen transferi ile bir sonraki nesle aktarılmaktadır. Bununla birlikte; plazmidler, transpozonlar, integronlar gibi ekstrakromozomal gen taşıyıcı hareketli genetik elementlerin farklı cins ve türden bakteriler arasında alışverişi (konjugasyon) ile yatay gen transferi de mümkündür. Metabolik aktiviteler, sıcaklık veya besin sınırlılığından etkilenen üreme değişimleri, kalsiyum veya magnezyum gibi iyonlar ve artış gösteren fosfat seviyesi, bir genetik elementin su ortamlarındaki transferini belirleyen doğal faktörlerdir. Plazmidlerin türler arası transferinin doğal çevresel koşullarda gerçekleştiği ve olası plazmid transferinin sucul ortamlarda bakterilerin hayatta kalma oranı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (Schwartz ve diğ., 2002; Prado ve diğ., 2008; Baquero ve diğ., 2008).



Şekil 2.3: Çevresel ortamlarda antibiyotiklerin yayılımı. A.Ö.T: atık su ön arıtma tesisleri, K.A.S: katı atık sahaları (Kümmerer, 2003).

Tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin tedavi edici seviyenin altında kullanılan konsantrasyonları, bakterilerde direncin ve direncin genotipik transferinin seçiliminde rol oynamaktadır. Bu transferin suda yaşayan bakteriler ile balık ve insan patojenleri arasında gerçekleştiği düşünüldüğünde, seçim baskısının neden olduğu dirençli popülasyonlarda görülen hızlı artış daha net anlaşılacaktır (Kümmerer, 2003; Baquero ve diğ., 2008).

3. MALZEME VE YÖNTEM

3.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN BAKTERİLER

Çalışmamızda kontrol olarak; *E. coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD), *E. coli* ATCC 35218 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakteriler kullanılmıştır. Satın alınan *E.coli* ATCC 35218 ile *K. pneumoniae* ATCC 700603 Kwik-Stik™ (Microbiologics) liyofilize bakterileri kullanım talimatlarına uygun şekilde üretilmiş olup Gram boyama yöntemi ile saflık kontrolü ve API 20E sistemi (Biomerieux, Fransa) ile tür doğrulaması yapılmıştır. API 20E (Biomerioux, Fransa) sistemi ile identifikasyonu yapılan bakterilerin 24 saatlik taze kültürlerindeki koloniler fosfat tamponu ile toplanarak %35 gliserin içeren cryo tüplerine paylaştırılmış ve -86 °C’de saklanmıştır.



Şekil 3.1: *K. pneumoniae* ATCC 700603 kwik-stik aparatı.

Çalışmamızda, ülkemizin Batı Karadeniz kıyı ve deniz suyu örneklerinden izole edilmiş (Kimiran Erdem ve diğ., 2017) 22 (B53, B54, B57, B58, B65, B66, B85, B89, B90, B91, B109, B120, B153, B155, B176, B180, B185, B233, B235, B236, B237 ve B243) ve Manyas Gölü su örneklerinden izole edilmiş (Arslan Aydoğdu ve diğ., 2017) 2 (M55 ve M82) bakteri izolatu kullanılmıştır. Deneylere başlamadan önce suşlar, Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerlerine ekilmiş ve 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Azaltma yöntemi ile bir kez daha ekilen bakteri kültürlerinde üreyen tek koloniler seçilerek Gram boyama ile saflık kontrolü yapılmış ve oksidaz aktiviteleri incelenmiş, Gram negatif ve oksidaz negatif suşlar değerlendirmeye alınmıştır. API 20E (Biomerioux, Fransa) identifikasyon testi ile 20’si *E. coli*, 3’ü *K. oxytoca*

ve 1'i *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* olarak tür doğrulaması yapılan suşların (Tablo 3.1) 24 saatlik taze kültürlerindeki koloniler fosfat tamponu ile toplanarak %35 gliserin içeren cryo tüplerine paylaştırılmış ve -86 °C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1: Batı Karadeniz ve Manyas Gölü bakteri izolatları.

Bakteri No.	Bakteri Türü	İstasyon
B53, B54, B57, B58, B65, B66, B89, B90, B91, B109, B120, B176, B180, B185, B233, B235, B236, B237, B243	<i>Escherichia coli</i>	Batı Karadeniz
B85, B153, B155	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Batı Karadeniz
M55	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	Manyas Gölü
M82	<i>Escherichia coli</i>	Manyas Gölü

3.1.1. İznik Gölü Su Örneklerinden Bakteri İzolasyonu

Çalışmamıza, Ağustos 2013'te İznik Gölü'nden alınarak laboratuvarımıza getirilen su örneklerinden izole ettiğimiz suşlar da dahil edilmiştir.

İznik Gölü kıyı bölgesinden alınan su örnekleri 1/100 oranında sulandırıldıktan sonra membran filtrasyon sistemi ile 0.45 µm por çaplı membran filtreden süzölmüştür. Su örneklerinin geçirildiği membran filtreler Endo-NPS (Sartorius, Almanya) besiyerlerine yerleştirilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda besiyerlerinde koyu kırmızı ve metalik yeşil renkteki koloniler seçilerek Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerlerine azaltma yöntemi ile ekilmiştir. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonucunda suşların Gram özelliği ve oksidaz aktivitesi belirlenerek Gram negatif ve oksidaz negatif olanlar değerlendirmeye alınmış ve API 20E sistemi (Biomerieux, Fransa) ile identifikasyonları yapılmıştır. Değerlendirme sonucu üç izolat *E. cloacae* olarak tanımlanmıştır. *E. cloacae* suşlarının 37 °C'de üretilen taze kültürleri %35 gliserin içeren cryo tüplerine aktarılmış ve -86 °C'de saklanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere beş ana gruptan toplam 15 farklı ticari beta-laktam antibiyotik diski (Becton-Dickinson, Almanya) temin edilmiştir. Testlerde kullanılan antibiyotik ajanların tamamı Tablo 3.2'de gösterilmiştir.

Tablo 3.2: Disk difüzyon ve kombine disk testlerinde kullanılan beta-laktam antibiyotikler.

Beta-Laktam Grubu	Beta-Laktam Alt Grubu	Antibiyotik Adı	Antibiyotik Konsantrasyonu (µg)
Penisilin	Aminopenisilin	Ampisilin (AM)	10
	Karboksipenisilin	Karbenisilin (PY)	100
Sefalosporin	1. kuşak	Sefalotin (CF)	30
	2. kuşak	Sefoksitin (FOX)	30
	3. kuşak	Seftazidim (CAZ), Sefotaksim (CTX), Seftriakson (CRO), Moksalaktam (MOX), Sefoperazon (CFP)	30
	4. kuşak	Sefepim (FEP)	75
			30
Karbapenem		İmipenem (IMP)	10
Monobaktam		Aztreonam (ATM)	30
Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü		Amoksisilin/Klavulanik asit (AMC/CLA),	20/10
		Seftazidim/klavulanik asit (CAZ/CLA),	30/10
		Sefotaksim/klavulanik asit (CTX/CLA)	

3.2. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN FENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ

3.2.1. Bakteri Suşlarının Hazırlanması

Farklı su kaynaklarından elde edilen *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakteriler ile *E. coli* ATCC 25922 ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 standart bakterilerin -86 °C'deki stok kültürlerinden Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerine damlatma ekim yapılmıştır. Bir gece 37 °C'de üreyen bakteriler azaltma ekim yapılarak tekrar üretilmiş ve sık ekimle çoğaltılmıştır. Sık ekim ile üretilen bakterilerin 24 saatlik taze kültürlerinden, McFarland 0.5 bulanıklık tüpüne göre bakteri süspansiyonları hazırlanmıştır.

3.2.2. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmamızda; üç farklı su kaynağından elde edilmiş toplam 27 *Enterobacteriaceae* izolatının beta-laktam antibiyotiklere duyarlılığını belirlemek amacıyla disk difüzyon testi, dirençli suşlarda GSBL ve AmpC doğrulama için kombine disk testleri uygulanmıştır.

3.2.2.1. Disk difüzyon testi

Enterobacteriaceae ailesine ait bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı duyarlılıkları Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemine göre yapılmıştır. 0.5 McFarland bulanıklığına göre hazırlanan bakteri süspansiyonları, Mueller-Hinton Agar (Himedia, Hindistan) besiyerlerine tek kullanımlık steril eküvyonlar yardımıyla yayılarak ekilmiştir. Antibiyotik diskler bir petri üzerinde en fazla üç adet olacak ve birbirine 24 mm'den yakın olmayacak şekilde yerleştirilmiştir. Deney esnasında petrilerin etüve alınmadan önce oda sıcaklığında 15 dakikadan fazla bekletilmemesine özen gösterilmiştir. Disklerin agar üzerine iyice yapışması için kısa bir süre bekletilen petriler ters çevrilerek 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır (CLSI, 2012). İnkübasyon süresi sonunda, bakterilerin antibiyotik diskler etrafında oluşturduğu inhibisyon zon çapları hem yatay hem dikey düzlem üzerinde ölçülerek ortalaması alınmış ve sonuçlar CLSI (2016) kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir. Ortalama inhibisyon zon çapları dikkate alınarak suşlar duyarlı, yarı duyarlı veya dirençli olarak gruplandırılmıştır. Birden fazla beta-laktam antibiyotiğe direnç gösterdiği belirlenen bakteriler çoklu direnç gösteren bakteriler olarak tanımlanmıştır. Deney her bakteri için çift tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir. Standart bakteri olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) kullanılmıştır.

3.2.2.2. GSBL Doğrulama İçin Kombine Disk Testi

Bu testte, klavulanik asidin genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar üzerindeki inhibe edici özelliğinden yararlanılmaktadır. Çalışmamızda, 0.5 McFarland bulanıklık tüpüne göre süspansiyonu hazırlanan *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* türlerine ait toplam 24 bakteri GSBL doğrulama testi için değerlendirmeye alınmıştır. CLSI 2016 standartlarına göre, disk difüzyon testinde $CAZ \leq 22$ mm, $ATM \leq 27$ mm, $CTX \leq 27$ mm ve $CRO \leq 25$ mm şartlarından en az birini sağlayan bakteriler GSBL doğrulama testine tabi tutulmaktadır.

0.5 McFarland bulanıklık tüpüne göre hazırlanan bakteri süspansiyonları, Mueller-Hinton Agar (Himedia, Hindistan) petrileri üzerine tek kullanımlık steril eküvyonlar aracılığıyla ekilmiştir. Birkaç dakika içinde aynı petri üzerine yalnız seftazidim diski ile seftazidim/klavulanik asit kombine diski veya yalnız seftaksim diski ile seftaksim/klavulanik asit kombine diski yerleştirilmiştir. Test için kullanılan antibiyotik diskler ve konsantrasyonları Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Disklerin agar üzerine iyice yapışması için kısa bir süre bekletilen petriler ters çevrilerek 37 °C'de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon süresi sonunda bakterilerin antibiyotik disk etrafında oluşturduğu inhibisyon zon çapları hem yatay hem dikey

düzlem üzerinde ölçülerek ortalaması alınmıştır. GSBL doğrulama testine göre; CAZ/CLA veya CTX/CLA antibiyotik diski etrafında oluşan inhibisyon zon çapının, yalnız CAZ veya yalnız CTX antibiyotik diskinin etrafındaki inhibisyon zon çapından en az 5 mm büyük olması halinde, suşlar GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir (CLSI, 2016). Deneyde her bakteri için çift tekrarlı olarak çalışılmıştır. Standart bakteri suşu olarak *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) kullanılmıştır.

3.2.2.3. AmpC Doğrulama İçin Kombine Disk Testi

Çalışmamızda, disk difüzyon testi sonucu 7-alfa-metoksi sefalosporinler ve oksiminio sefalosporinlerden bir veya birkaçına karşı direnç profili gösterdiği belirlenen suşlar, sınıf C β -laktamaz varlığının araştırılması için modifiye edilmiş antibiyotik duyarlılık testine tabi tutulmuştur (Coşkun ve Altanlar, 2012).

Bu testte, boronik asidin sınıf C β -laktamazlar üzerindeki inhibe edici özelliğinden yararlanılmaktadır. 0.5 McFarland bulanıklık tüpüne göre hazırlanan bakteri süspansiyonları Mueller-Hinton Agar (Himedia, Hindistan) petripleri üzerine steril eküvyonlar yardımıyla ekilmiş ve petripler üzerine çok bekletilmeden seftazidim, sefotaksim, seftriakson veya sefoksitin antibiyotik disklerden biri ile aynı diske 3-aminofenil boronik asit (AFBA; Sigma) emdirerek hazırladığımız modifiye bir disk yerleştirilmiştir. Disklerin agar üzerine iyice yapışması için kısa bir süre bekletilen petripler ters çevrilerek 37 °C’de 16-18 saat inkübasyona bırakılmıştır. Çalışılan suşların antibiyotik disk etrafında oluşturduğu inhibisyon zon çapları hem yatay hem dikey düzlem üzerinde ölçülerek ortalaması alınmıştır.

AmpC beta-laktamaz doğrulama testine göre; sefalosporin/AFBA antibiyotik diski etrafında oluşan inhibisyon zon çapının, yalnız sefalosporin antibiyotik diski etrafında oluşan inhibisyon zon çapından en az 5 mm büyük olması halinde, suşlar AmpC pozitif olarak değerlendirilmiştir (Yagi ve diğ., 2005). Deney, her bakteri için çift tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

3.3. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN GENOTİPİK OLARAK İNCELENMESİ

Çalışmada, üç farklı su ortamından elde edilen toplam 27 *Enterobacteriaceae* suşunda beta-laktam antibiyotiklere karşı dirence neden olan beta-laktamaz enzimlerini kodladığı bilinen 7’si plazmid ve 1’i kromozomal DNA aracılı toplam 8 farklı gen bölgesinin varlığının araştırılması

amaçlanmıştır. Bu kapsamda, bakteri suşlarından plazmid ve kromozomal DNA örnekleri elde edilerek PZR yöntemi uygulanmıştır.

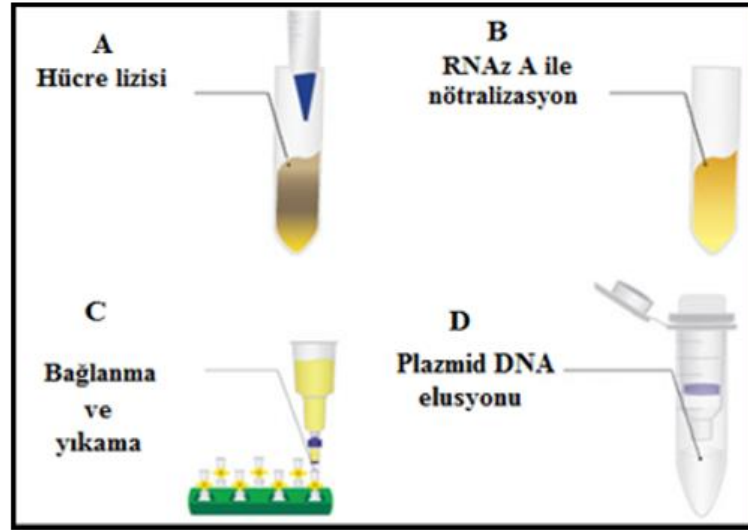
3.3.1. Plazmid DNA İzolasyonu

Çalışmada, farklı su kaynaklarından izole edilen 27 bakteri ile birlikte *E. coli* ATCC 35218 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterilerinden plazmid DNA izolasyonu yapılması için Zyppy™ Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research) kullanılmıştır.

Çalışmada 27 bakteri izolatu ve standart bakterilerin -86 °C'deki stok kültürlerinden Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerlerine damlatma ekim yapılmıştır. Etüvde 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından azaltma ekim yapılarak aynı şartlarda yeniden üretilen bakterilerden tek koloniler seçilmiş ve sık ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra steril bir öze yardımıyla ampisilin ilaveli 3 ml'lik LB Broth, Miller (Himedia, Hindistan) besiyerlerine plazmid DNA izolasyonunda kullanılmak üzere çalkalama yöntemi kullanılarak ekim yapılmış ve 37 °C'de 18 saatlik inkübasyona bırakılmıştır.

18 saatlik inkübasyon sonrası taze kültürler 1.5 ml'lik steril mikrotüplere aktarılmıştır. Mikrosantrifüj cihazında (Beckman Coulter Microfuge) 4000 g'de 30 saniye boyunca çevrilen örneklerde süpernatant atılmış, elde edilmek istenen DNA miktarını artırmak için aynı işlem tekrarlanmıştır. Süpernatant tekrar atıldıktan sonra pellet üzerine 600 µl Tris-EDTA buffer eklenerek resüspanse edilmiştir. Oluşabilecek muhtemel presipitasyonların çözülmesi için önceden 37 °C'de 20 dakika ısıtılmış olan 7xlysis bufferdan 100 µl eklenmiştir. 4 ila 6 kez alt üst edilerek karışması sağlandıktan sonra mavi renk alan süspansiyonun üzerine vakit kaybetmeden +4 °C'de bekletilmiş soğuk haldeki nötralizasyon bufferdan 350 µl ilave edilerek birkaç kez alt üst edilmiştir. Nötralizasyon tamamlandığında örnek sarı renk almış ve tüp içinde sarımsı bir presipitat oluşmuştur. 11000 g'de 4 dakika santrifüjün ardından elde edilen süpernatant, hücre pelletinin bozulmamasına dikkat edilerek toplama tüpleri üzerine yerleştirilmiş Zymo-Spin™ INN kolonuna aktarılmıştır. 11000 g'de 30 saniye santrifüj edildikten sonra toplama tüpünde biriken sıvı atılmış ve üzerine spin kolonu tekrar yerleştirilmiştir. Kolon üzerine 200 µl Endo-Wash buffer ilave edildikten sonra 11000 g'de 1 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Üzerine 400 µl Zyppy™ Wash buffer (4 katı oranında %100 etanol ile sulandırılmış) eklenmiş ve tekrar 11000 g'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Spin

kolonu yeni bir steril mikrotüpe aktarıldıktan sonra, üzerine 50 °C kuru sıcaklıkta ısıtılmış elusyon tamponundan 40 µl eklenmiş ve 2 dakika oda sıcaklığında bekletilmiştir. İnkübasyon süresinin sonunda son kez 11000 g'de 1 dakikalık santrifüjün ardından mikrotüp içerisinde biriken plazmid DNA içerikli örnekler, PZR deneylerinde kullanılmak üzere -20 °C ve -86 °C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2: Plazmid DNA izolasyonunda temel aşamalar.

3.3.2. Genomik DNA İzolasyonu

İznik Gölü tatlı sularından izole edilen 3 *E. cloacae* bakterisinde kromozomal DNA izolasyonu için IDPURE™ Spin Column Bakteri Genomik DNA İzolasyon Kiti (IDLabs) kullanılmıştır.

Çalışmada, 3 *E. cloacae* izolatu ve standart bakterilerin -86 °C'deki stok kültürlerinden Nutrient Agar (Oxoid, UK) besiyerlerine damlatma ekim yapılmıştır. Etüvde 37 °C'de 24 saatlik inkübasyonun ardından azaltma ekim yapılarak aynı şartlarda yeniden üretilen bakterilerden tek koloniler seçilmiş ve sık ekim yapılmıştır. 37 °C'de 24 saat inkübasyondan sonra bakteri kültürlerinden genomik DNA izolasyonunda kullanılmak üzere 0.5 McFarland bulanıklık tüpüne göre süspansiyonlar hazırlanmıştır. Süspansiyonların absorbens değerleri 625 nm dalga boyunda ölçülmüştür.

Bakteri süspansiyonları 1.5 ml'lik steril mikrotüplere aktararak mikrosantrifüj cihazında (Beckman Coulter Microfuge) 10000 rpm'de 15 dakika boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatantın tamamı atılmıştır. Tüpte kalan hücre pelleti 200 µl soğuk Tris-EDTA buffer ile

resüspanse edilerek muhtemel presipitasyonları çözdürmek için önceden ısıtılmış lizis solüsyonundan 400 µl eklenmiştir. Tüp birkaç kez alt üst edildikten sonra 3 µl proteinaz K eklenen süspansiyon 55 °C kuru sıcaklıkta 5 dakika bekletilmiştir. 260 µl %100 etanol eklendikten sonra süspansiyon toplama kabı üzerine yerleştirilmiş spin kolonuna aktararak 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Toplama tüpünde biriken sıvı atıldıktan sonra 500 µl yıkama solüsyonu eklenerek yeniden 10000 rpm’de 5 dk santrifüj edilmiştir. Son aşama bir kez daha tekrarlandıktan sonra toplama kabında biriken sıvı atılarak yıkama solüsyonunun tamamen uzaklaştığından emin olmak için 1 dakika daha santrifüj edilmiştir. Spin kolonu steril bir mikrotüp üzerine aktararak kolon membranının tam ortasına 40 µl 50 °C’de ısıtılmış elusyon tamponu eklenmiştir. 2-5 dakika bekletildikten sonra DNA’yı kolondan ayırmak için 10000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Elde edilen DNA örnekleri, PZR deneylerinde kullanılmak üzere -20 °C ve -86 °C’de saklanmıştır.

3.3.3. DNA Örneklerinde Saflık Kontrolü

Bakteri suşlarından elde edilen plazmid ve kromozomal DNA örneklerinin PZR reaksiyonlarında kullanılacak optimum miktarını belirleyebilmek için, DNA miktarları ölçülmüştür. Bakterilerden elde edilen DNA içeren sıvılar micropleyt kuyucuklarına 4’er µl yüklenmiştir. Spektrofotometre (Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate) ile yapılan ölçümlerde, örnek içeriğindeki µl başına düşen DNA konsantrasyonu ng cinsinden elde edilmiştir. Örneklerin saflığı, 260/280 nm ve 260/230 nm absorbans oranlarında ölçüm sonuçlarına göre değerlendirilmiştir. DNA örneklerinin protein ve diğer kontaminantlardan arınmış olduğundan emin olmak için 260/280 oranının yaklaşık 1.8 ve 260/230 oranının 2.0-2.2 aralığında olmasına özen gösterilmiştir.

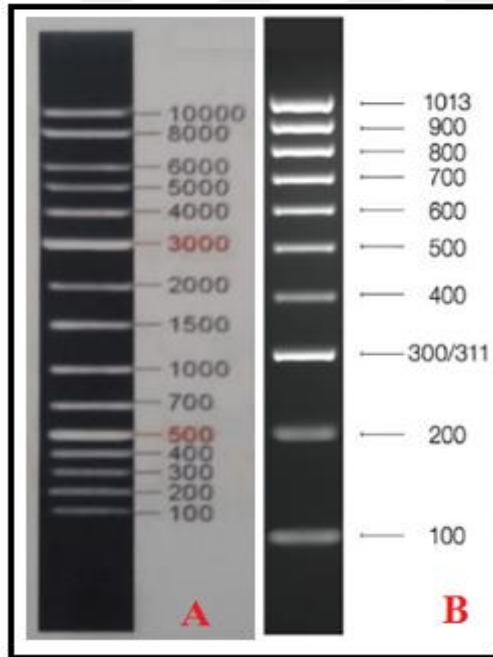
3.3.4. DNA Örneklerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Görüntülenmesi

İzole edilen DNA örneklerinin nitel olarak analizi agaroz jel elektroforezi kullanılarak yapılmıştır.

Plazmid DNA örneklerinin yürütülmesinde %0.8, kromozomal DNA örneklerinin yürütülmesinde %1 oranda agaroz jel hazırlanmıştır. Agaroz jel içine 0.35 µl DNA boyası (GelRed™ DNA stain in water, Biotium) eklenerek karıştırılmıştır. Agaroz jel solüsyonu, su terazisi ile dengelenen düz bir zemin üzerine yerleştirilmiş ve üzerine sekiz bölmeli tarak oturtulmuş olan jel tankına, hava kabarcığı oluşmamasına dikkat edilerek yavaşça dökülmüştür.

Agaroz jelin katılaşması için oda sıcaklığında 20 dakika, +4 °C'de 10 dakika boyunca bekletilmiş ve tarak jelin üzerinden dikkatlice çıkarılmıştır. Üzerinde bulunduğu tank ile yavaşça büyük elektroforez tankı üzerine yerleştirilen jelin yüzeyini kaplayacak kadar (yaklaşık 400 ml) 1X Tris-borik asit-EDTA (1X TBE) ilave edilmiştir. Agaroz jel üzerinde oluşan kuyucuklara DNA yüklemesi yapılmadan önce nitril eldiven kullanılarak 5 µl DNA örneği ile 1 µl 6x yükleme boyası (Biomatik) bir parafilm tabaka üzerinde karıştırılmış ve pipetaj yapıldıktan sonra agaroz jel üzerindeki kuyucuklara dikkatli bir şekilde yüklenmiştir. Sistem 80 volt elektrik akımı verilerek 60 ila 75 dakika boyunca çalıştırılmıştır. Jelin 2/3'ü kadar yürütülen örnekler elektrik akımı durdurulduktan hemen sonra UV transilluminatörde (Kodak GL 1500) görüntülenmiştir.

Çalışmada pozitif kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 35218 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterisinden elde edilen DNA örneği, negatif kontrol olarak ultra saf su kullanılmıştır.



Şekil 3.3: DNA marker bant profilleri. A: 1 kb plus DNA ladder (Biomatik; 100 Loads, 15 DNA Fragments); B: 100 bp DNA ladder (Bioline; 10 DNA fragments).

3.3.5. Beta-Laktamazları Kodlayan Genlerin PZR Yöntemi İle Gösterilmesi

Penisilinaz, sefalosporinaz ve karbapenemaz enzimlerinin üretiminden sorumlu plazmid DNA aracılı genlerin tespiti için klasik PZR yöntemi; sınıf C sefalosporinaz üretiminden sorumlu kromozomal DNA aracılı gen tespiti için semi-nested PZR yöntemi uygulanmıştır.

3.3.5.1. Plazmid Aracılı Beta-Laktamazları Kodlayan Genlerin PZR Yöntemi İle İncelenmesi

Çalışmada plazmid aracılı beta-laktamazları kodlayan *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaIMP* hedef genleri ile CIT, MOX ve FOX hedef gen gruplarını tespit etmek için PZR yöntemi uygulanmıştır.

Plazmid aracılı beta-laktamazları kodlayan genleri tespit etmek için kullanılan primerler Tablo 3.3'te gösterilmiştir.

Tablo 3.3: Plazmid aracılı beta-laktamazları kodlayan genleri tespit etmek için kullanılan primerler.

Primer Çifti	Hedef Gen Grubu	Primer Dizisi (5'-3')	Amplikon Boyutu (bp)	Primer Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Primer Referans
TEM(F) TEM(R)	<i>blaTEM</i>	AAAGATGCTGAAGATCA TTTGGTATGGCTTCATTC	425	44	Henriques ve diğ., 2006a
SHV(F) SHV(R)	<i>blaSHV</i>	GCGAAAGCCAGCTGTCGGGC GATTGGCGGCGCTGTTATCGC	304	62	Henriques ve diğ., 2006a
CTXM(F) CTXM(R)	<i>blaCTX-M</i>	GTGCAGTACCAGTAAAGTTATGG CGCAATATCATTGGTGGTGCC	538	55	Henriques ve diğ., 2006a
CIT(F) CIT(R)	<i>blaLAT-1</i> ile <i>blaLAT-4</i> arası, <i>blaCMY-2</i> ile <i>blaCMY-7</i> arası, <i>blaBIL-1</i>	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	63	Pérez-Pérez ve Hanson, 2002
MOX(F) MOX(R)	<i>MOX-1</i> , <i>MOX-2</i> , <i>CMY-1</i> , <i>CMY-8</i> ile <i>CMY-11</i> arası	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520	63	Pérez-Pérez ve Hanson, 2002
FOX(F) FOX(R)	<i>blaFOX-1</i> ile <i>blaFOX-5b</i> arası	AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190	63	Pérez-Pérez ve Hanson, 2002
IMP(F) IMP(R)	<i>blaIMP</i>	CTACCGCAGCAGAGTCTTTG AACCAGTTTTGCCTTACCAT	587	55	Senda ve diğ., 1996

bp: baz çifti; (F): forward; (R): reverse.

Plazmid aracılı beta-laktamazları kodlayan genlerin tespit edilmesi için ilk olarak PZR reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Bunun için; bir buz kalıbı üzerinde 0.2 ml'lik PZR tüpleri içerisine 12.5 µl Taq PZR mastermix (Biomatik), 1'er µl forward ve reverse primerler (Biomatik; 10 µM), 1.5 µl plazmid DNA örneği ve 1.5 µl DMSO ilave edilerek elde edilen karışımın son hacmi bidistile su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışımlar PZR cihazına (Biorad T100 Thermal Cycler) yerleştirilmiş ve programlanmıştır.

Çalışmamızda varlığı araştırılan plazmid aracılı *blaTEM*, *blaSHV* ve *blaCTX-M* genlerini, plazmid aracılı CIT, MOX ve FOX hedef gen gruplarını ve plazmid aracılı *blaIMP* genini tespit etmek için kullanılan PZR reaksiyon koşulları sırayla Tablo 3.4, Tablo 3.5 ve Tablo 3.6’da verilmiştir.

Tablo 3.4: Plazmid aracılı *blaTEM*, *blaSHV* ve *blaCTX-M* genlerini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları (Henriques ve diğ., 2006a).

Döngü		Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	1 döngü	94 °C	9 dakika
Denatürasyon	30 döngü	94 °C	30 saniye
Bağlanma		44 °C*, 62 °C**, 55 °C***	30 saniye
Uzama		72 °C	1 dakika
Son uzama		72 °C	10 dakika

*: *blaTEM* bağlanma sıcaklığı; **: *blaSHV* bağlanma sıcaklığı; ***: *blaCTX-M* bağlanma sıcaklığı.

Tablo 3.5: Plazmid aracılı CIT, MOX ve FOX gen gruplarını tespit etmek için kullanılan PZR koşulları.

Döngü		Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	1 döngü	95 °C	10 dakika
Denatürasyon	35 döngü	94 °C	40 saniye
Bağlanma		63 °C	30 saniye
Uzama		72 °C	2 dakika
Son uzama		72 °C	10 dakika

Tablo 3.6: Plazmid aracılı *blaIMP* genini tespit etmek için kullanılan PZR koşulları (Senda ve diğ., 1996).

Döngü		Sıcaklık	Süre
İlk denatürasyon	1 döngü	94 °C	2 dakika
Denatürasyon	30 döngü	94 °C	1 dakika
Bağlanma		55 °C	1 dakika
Uzama		72 °C	90 saniye
Son uzama		72 °C	8 dakika

Tablo 3.7: Kromozomal aracılı *blaAmpC* geninin semi-nested PZR ile tespiti için kullanılan primerler.

Primerler	Hedef Gen Grubu	Primer Dizisi (5'-3')	Amplikon Boyutu (bp)	Primer Bağlanma Sıcaklığı (°C)	Primer Referans
TN5(F)*	<i>E. cloacae blaAmpC</i>	CGTTTGTTCAGGCACAGTCAAATCCA	576	63	Conceição ve diğ., 2004
TN4(R)*		TTACTGTAGCGCGTCGAGGATATGG			
TN2(R)**		TTCCACTGCGGCTGCCAGT			

bp: baz çifti; (F): forward; (R): reverse; *: dış primer; **: iç primer.

Bu işlemlerden sonra elde edilen PZR ürünleri bekletilmeden agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. %1.2 agaroz jelde 100 volt elektrik akımında 60/75 dakika yürütülen ürünler, UV transilluminatörde (Kodak GL 1500) görüntülenmiştir.

PZR ürünlerinin bant uzunlukları, Şekil 3.3'te gösterilen 1 kb DNA ladder (Biomatik) ve 100 bp DNA ladder (Bioline) kullanılarak saptanmıştır.

İncelenen *Enterobacteriaceae* suşlarında plazmid aracılı genlerin varlığı, Tablo 3.3'te belirtilen amplikon boyutları dikkate alınarak saptanmıştır.

3.3.5.2. Kromozomal Aracılı *blaAmpC* Geninin Semi-Nested PZR Yöntemi İle İncelenmesi

İznik Gölü tatlı sularından izole edilen 3 *E. cloacae* bakterisinde kromozomal DNA üzerinde taşınan türe özgü *blaAmpC* geni varlığının araştırılması için semi-nested PZR yöntemi kullanılmıştır.

Kromozomal aracılı AmpC kodlayan geni tespit etmek için kullanılan primerler Tablo 3.7'de gösterilmiştir.

E. cloacae'de kromozomal aracılı AmpC beta-laktamaz kodlayan geni tespit etmek için ilk olarak PZR reaksiyon karışımları hazırlanmıştır. Bunun için; bir buz kalıbı üzerinde 0.2 ml'lik PZR tüpleri içerisine 12.5 µl Taq PZR mastermix (Biomatik), 1'er µl forward ve reverse primerler (Biomatik; 10µM), 1.5 µl kromozomal DNA örneği ve 1.5 µl DMSO ilave edilerek elde edilen karışımın son hacmi bidistile su ile 25 µl'ye tamamlanmıştır. Elde edilen karışımlar PZR cihazına (Biorad T100 Thermal Cycler) yerleştirilmiş ve programlanmıştır.

İlk PZR reaksiyonunda dış primerlerin bağlanmasıyla elde edilen ürünler, bir dış ve bir iç primerin bağlandığı ikinci PZR reaksiyonunda DNA örneği olarak kullanılmıştır. İlk ve ikinci adım semi-nested PZR reaksiyon koşulları Tablo 3.8’de gösterilmiştir.

Tablo 3.8: Kromozomal aracılı *blaAmpC* genini tespit etmek için kullanılan ilk ve ikinci adım semi-nested PZR koşulları.

	Döngü		Sıcaklık	Süre
İlk adım PZR	İlk denatürasyon	1 döngü	94°C	3 dakika
	Denatürasyon	35 döngü	94°C	1 dakika
	Bağlanma		63°C	1 dakika
	Uzama		72°C	2 dakika
	Son uzama	1 döngü	72°C	8 dakika
İkinci adım PZR	İlk denatürasyon	1 döngü	94°C	3 dakika
	Denatürasyon	35 döngü	94°C	1 dakika
	Bağlanma		59°C	1 dakika
	Uzama		72°C	2 dakika
	Son uzama	1 döngü	72°C	8 dakika

PZR reaksiyonları sonrası elde edilen ürünler bekletilmeden agaroz jel elektroforezinde yürütülmüştür. %1.2 agaroz jelde 100 volt elektrik akımında 60/75 dakika yürütülen ürünler, UV transilluminatörde (Kodak GL 1500) görüntülenmiştir.

PZR ürünlerinin bant uzunlukları, 1 kb DNA ladder (Biomatik) kullanılarak belirlenmiştir.

İncelenen *Enterobacteriaceae* suşlarında kromozomal aracılı *blaAmpC* geninin varlığı, Tablo 3.7’de belirtilen amplikon boyutu dikkate alınarak saptanmıştır.

3.4. ÇALIŞMADA KULLANILAN BESİYERLERİ VE KİMYASAL MADDELER

3.4.1. Endo Besiyeri (Sartorius, Almanya)

İznik Gölü su örneklerinden *Enterobacteriaceae* ailesi bakterilerin izolasyonu için kullanılmıştır. Hazır mini petriler içindeki nütrient pedler, kullanımdan önce 3 ml steril distile su ile ıslatılmıştır.

3.4.2. Nutrient Agar Besiyeri (Oxoid, UK)

Enterobacteriaceae ailesi bakterilerin üretilmesi için kullanılmıştır.

Et ekstraktı

10 g

Maya ekstraktı	2.0 g
Pepton	5.0 g
Sodyum klorür	5.0 g
Agar	15.0 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.4 (± 0.2) (25 °C’de)

Hazırlanan besiyeri 121°C’de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Steril petrilere paylaştırılan besiyeri, agar katılaştıktan sonra 37 °C’de bir gece bekletilmiş, yapılan sterilite kontrolünün ardından kullanım aşamasına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.4.3. Mueller-Hinton Agar (Himedia, Hindistan)

Enterobacteriaceae ailesi bakterilerde antibiyotik duyarlılık testleri için kullanılmıştır.

Beef Heart Infusion	2.0 g
Kazein Asit Hidrolizat	17.5 g
Nişasta	1.5 g
Agar	17.0 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.4 (± 0.1) (25 °C’de)

Hazırlanan besiyeri 121°C’de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiştir. Steril petrilere paylaştırılan besiyeri, agar katılaştıktan sonra 37 °C’de bir gece bekletilmiş, yapılan sterilite kontrolünün ardından kullanım aşamasına kadar +4 °C’de saklanmıştır.

3.4.4. Luria-Bertani Broth, Miller (Himedia, Hindistan)

Plazmid DNA izolasyonu öncesi *Enterobacteriaceae* ailesi bakterilerin üretilmesi için kullanılmıştır.

Kazein enzimik hidrolizat	10.0 g
Maya ekstraktı	5.0 g
Sodyum klorür	10.0 g
Distile su	1000 ml

pH: 7.4 (± 0.2) (25 °C’de)

2.5 g Luria-Bertani Broth, Miller tartılarak 100 ml distile suda çözdürülmüştür. Cam deney tüplerine 3'er ml paylaştırıldıktan sonra 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiş, oda sıcaklığına geldikten sonra her tüpe 3'er µl 100 mg/ml konsantrasyonda ampisilin ilavesi yapılmıştır. 37 °C'de bir gece bekletilerek yapılan sterilite kontrolünün ardından kullanım aşamasına kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.4.5. Oksidaz ayıracı

Enterobacteriaceae ailesi bakterilerin sitokrom oksidaz aktivitesinin tespit edilmesi için kullanılmıştır.

4-amino-N,N-dimetilanilin dihidroklorid 0.05 g

Distile su 5ml

Oksidaz testinde kullanılan ayıraç 5 ml distile suda çözdürülmüş ve bekletilmeden kullanılmıştır.

3.4.6. Fizyolojik Tuzlu Su

Gram boyama için bakteri preparatlarının hazırlanmasında, antibiyotik duyarlılık testleri genomik DNA izolasyonu öncesi bakteri süspansiyonlarının hazırlanmasında kullanılmıştır.

Sodyum klorür 0.85 g

Distile su 100 ml

Distile suda çözülerek 121 °C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiş ve 37 °C'de bir gece bekletilerek yapılan sterilite kontrolünün ardından kullanılmıştır.

3.4.7. Fosfat tamponu (1X)

Bakterilerin -20 °C ve -86 °C'deki cryo stok kültürlerinin saklanması için kullanılmıştır.

Sodyum klorür 0.8 g

Potasyum hidroksit 0.02 g

Disodyum hidrojen fosfat 0.144 g

Monopotasyum fosfat 0.024 g

Distile su 100 ml

pH: 7.4 (±0.2)

80 ml distile suda kimyasallar çözdürülmüş ve HCl ile pH 7.4'e ayarlandıktan sonra kalan 20 ml distile su ilave edilerek 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiş ve kullanılıncaya kadar +4 °C'de saklanmıştır.

3.4.8. 0.5 McFarland Bulanıklık Standardı (CLSI, 2012)

Çalışmada hazırlanan bakteri süspansiyonlarında türbidite ayarlaması için referans olarak kullanılmıştır.

Baryum klorür 0.048 mol/l

Sülfürik asit 0.18 mol/l

Distile su ile belirtilen oranlarda hazırlanan stok solüsyonlardan 0.5 ml baryum klorür ve 99.5 ml sülfürik asit iyice karıştırılmıştır. Spektrofotometre cihazı ile uyumlu bir küvet içinde 625 nm'de absorbansı ölçülen süspansiyonun yoğunluğunun 0.08 ile 0.13 arası standart değerlere uyumluluğu kontrol edilmiştir. Süspansiyon karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiş olup kullanım öncesi her defasında iyice vortekslenmiştir.

3.4.9. 10 M Sodyum Hidroksit

0.5 M EDTA için pH ayarlamasında kullanılmıştır.

Sodyum hidroksit 40 g

Distile su 100 ml

Sodyum hidroksit bir beherde tartılarak üzerine 70 ml distile su ilave edilmiştir. Solüsyon soğutulduktan sonra kalan 30 ml distile su ilave edilmiş ve 0.22 µM por çaplı steril enjektör ucu filtresinden geçirilerek ağzı kapalı şekilde karanlık ortamda bekletilmiştir.

3.4.10. 0.5 M EDTA

10X Tris-Borik Asit-EDTA hazırlanmasında kullanılmıştır.

EDTA 18.61 g

Distile su 100 ml

EDTA bir beherde tartılarak distile suyun yarısında çözdürülmüş ve 10 M sodyum hidroksit kullanılarak pH değeri 8'e ayarlanmıştır. Kalan distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edildikten sonra çözdürülen solüsyon 0.22 µM por çaplı steril enjektör ucu filtresinden geçirilerek +4 °C'de saklanmıştır.

3.4.11. 10X Tris-Borik Asit-EDTA

1X Tris-Borik Asit-EDTA hazırlanmasında kullanılmıştır.

Tris	108 g
Borik asit	55 g
0.5 M EDTA	40 ml
Bidistile su	960 ml

Tartılan Tris ve borik asit temiz bir 1000 ml schott şişeye alınarak 900 ml bidistile suda çözündürülmüştür. Üzerine 40 ml 0.5 M EDTA ilave edilerek bidistile su ile 1000 ml'ye tamamlanmış ve 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edildikten sonra +4 °C'de saklanmıştır.

3.4.12. 1X Tris-Borik Asit-EDTA

Agaroz solüsyonlarının hazırlanması ve jel elektroforez tankına yükleme işlemi esnasında kullanılmıştır.

10X Tris-borik asit-EDTA	100 ml
Bidistile su	900 ml

10X Tris-Borik asit-EDTA'nın 1/10 oranında sulandırılmasıyla elde edilen 1X Tris-Borik Asit-EDTA, steril bir schott şişe içinde karıştırılarak +4 °C'de saklanmıştır.

3.4.13. Agaroz Jel Solüsyonları

Agaroz	0.4 g (%0.8'lik solüsyon için)
Agaroz	0.5 g (%1'lik solüsyon için)
Agaroz	0.6 g (%1.2'lik solüsyon için)
1X TBE	50'şer ml

Bir beher içinde tartılan agaroz üzerine 50 ml 1X TBE eklenmiş; mikrodalga fırında kaynamamasına dikkat edilerek yavaşça eritilmiş, bekletilmeden kullanılmıştır.

3.4.14. 1 M Hidroklorik Asit

%37'lik hidroklorik asit	8.3 ml
Distile su	100 ml

8.3 ml %37'lik hidroklorik asit, 100 ml distile su içerisine yavaşça eklenmiştir. Asidin yakıcı özelliği nedeniyle çeker ocakta eldiven ve maske yardımıyla hazırlanmıştır.

3.4.15. 1M Tris-HCl

Tris-EDTA buffer hazırlanmasında kullanılmıştır.

Tris	12.11 g
Distile su	100 ml

Tris temiz bir beherde tartılarak üzerine 80 ml distile su ilave edilerek çözdürülmüştür. 1 M hidroklorik asit kullanılarak pH değeri 8'e ayarlanmıştır. Kalan distile su ile 100 ml'ye tamamlanan solüsyon, 0.22 µM por çaplı steril enjektör ucu filtresinden geçirildikten sonra +4 °C'de steril schott şişe içinde saklanmıştır.

3.4.16. Tris-EDTA buffer

Plazmid ve genomik DNA izolasyon deneylerinde ve primer dizilerinin sulandırılmasında kullanılmıştır.

1 M Tris-HCl	1 ml
0.5 M EDTA	0.2 ml
Bidistile su	100 ml

Belirtilen miktarlarda karıştırılan 1 M Tris-HCl ve 0.5 M EDTA üzerine 100 ml bidistile su ilave edilmiştir. Solüsyon 100 ml schott şişeye alınarak 121°C'de 1.2 atm basınçta 15 dakika steril edilmiş ve +4 °C'de saklanmıştır.

3.4.17. Proteinaz K

Proteinaz K	2 mg
Bidistile su	150 µl

Genomik DNA izolasyon kit içeriğinde bulunan proteinaz K enzimi talimatlara uygun şekilde 150 µl steril bidistile su ile sulandırılmış ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklanmıştır.

3.4.18. AFBA

AmpC doğrulama testlerinde kullanılmıştır.

AFBA	120 mg
DMSO	3 ml
Distile su	3 ml

Toz halde temin edilen AFBA (Sigma, Almanya) 120 mg tartılarak steril bir petri kabı içinde 3'er ml DMSO ve distile su eklenerek çözdürülmüş ve sefalosporin disklerine 20'er µl

emdirilerek 30 dakika süre ile oda sıcaklığında kurumaya bırakılarak kullanıma hazır hale getirilmiştir (Coşkun ve Altanlar, 2012).

3.4.19. Taq PZR Mastermix (Biomatik)

PZR reaksiyon karışımlarında kullanılmıştır.

Taq DNA polimeraz	0.25 U/ μ l
PZR buffer	2X
dNTP'ler	0.4 mM
Magnezyum klorür	3.2 mM
Bromfenol mavisi	%0.02

Hazır halde temin edilen karışım kullanılıncaya dek -20°C'de saklanmıştır.

3.4.20. Primer (Biomatik)

Enterobacteriaceae ailesi ait bakterilerin plazmid ve kromozomal DNA aracılı beta-laktamaz genlerinin tespit edilmesi için PZR yönteminde kullanılan ve tamamı Tablo 3.3 ile Tablo 3.4'de gösterilen primer dizileri, 100'er nmol konsantrasyonda liyofilize halde temin edilmiş olup üretici firma tarafından belirlenen talimatlara göre sulandırılarak 100 μ M stok konsantrasyonları elde edilmiştir. Stok konsantrasyonlardan 10 μ l alınarak 90 μ l Tris-EDTA buffer içinde sulandırılmış ve mikrotüplere paylaştırılarak PZR reaksiyon karışımlarında kullanılmak üzere -20°C'de saklanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. ÇALIŞMADA KULLANILAN ENTEROBACTERIACEAE İZOLATLARI

Çalışmamızda, daha önce yapılan çalışmalarda Batı Karadeniz kıyı ve deniz suyu örnekleri (Kimiran Erdem ve diğ., 2017) ile Manyas Gölü su örneklerinden (Arslan Aydoğdu ve diğ., 2017) izole edilen *Enterobacteriaceae* ailesine ait 24 suş kontaminasyon olup olmadığı açısından incelenmiştir. Gram boyama ve oksidaz testi sonucu Gram negatif ve oksidaz negatif çomak şeklindeki bakteriler için API 20E (Biomerieux, Fransa) sistemi ile *E. coli*, *K. oxytoca* ve *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* olarak tür doğrulaması yapılmıştır.

İznik Gölü su örneklerinden Gram negatif ve oksidaz negatif olan üç izolat, *E. cloacae* olarak identifiye edilmiştir. API 20E (Biomerieux, Fransa) sistemi kullanılarak uygulanan biyokimyasal testler ile sonuçları Tablo 4.1’de yer almaktadır.

4.2. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN FENOTİPİK OLARAK GÖSTERİLMESİ

4.2.1. Antimikrobiyal Duyarlılık Test Sonuçları

4.2.1.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları

Batı Karadeniz ile Manyas ve İznik Gölleri sularından izole edilen *Enterobacteriaceae* ailesine ait 27 bakterinin beta-laktam antibiyotik duyarlılıkları Kirby-Bauer antibiyotik disk difüzyon yöntemi ile belirlenmiştir.

Disk difüzyon testinde bakterilerin antibiyotik diskler etrafında oluşturduğu inhibisyon zon çapı ortalama değerleri Tablo 4.2’de; CLSI 2016 standartlarına göre belirlenen duyarlılık profilleri ise Tablo 4.3’te verilmiştir.

Çalışmada, *Enterobacteriaceae* izolatlarının beta-laktam antibiyotik duyarlılık oranları Tablo 4.4’te; direnç profilleri ise Tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.1: İznik Gölü’nden izole edilen bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri.

Bakteri no	Endo NPS'de üreme morfolojisi	Gram morfolojisi	API 20E Biyokimyasal özellikleri																				
			ONPG	ADH	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	VP	GEL	GLU	MAN	INO	SOR	RHA	SAC	MEL	AMY	ARA	OX
İ3	Renksiz, mat,küçük koloni	Gram(-) kokobasil	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
i5	Şeffaf, parlak,yapışkan, orta boy koloni	Gram(-) kokobasil	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
İ8	Gri, opak, küçük koloni	Gram(-) basil	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-

NPS: Nütrient ped seti; ONPG: β galaktozidaz; ADH: arginin dihidrolaz; LDC: lizin dekarboksilaz; ODC: ornitin dekarboksilaz; CIT: sitrat; H₂S: hidrojen sülfür; URE: üreaz; TDA: triptofan deaminaz; IND: indol; VP: voges proskauer; GEL: jelatinaz; GLU: glukoz; MAN: mannitol; INO: inozitol; SOR: sorbitol; RHA: ramnoz; SAC: sakkaroz; MEL: melibiyoz; AMY: amigladin; ARA: arabinoz; OX: oksidaz.

Deneyde antibiyotik duyarlılığı incelenen 27 bakterinin 25'inin (%92.6) ampisiline dirençli olduğu saptanmıştır. Aynı zamanda incelenen bakterilerin 20'sinin karbenisiline (%74.1), 17'sinin sefalotine (%63) ve 10'unun amoksisilin/klavulanik aside (%37) dirençli olduğu görülmüştür (Tablo 4.4). Çalışmada incelenen bakterilerden üç *E. coli* izolatının (B236, B237 ve B243) üçüncü kuşak sefalosporinlerden sefotaksim, seftriakson ve sefoperazona direnç gösterdiği, ikisinin (B237 ve B243) aynı zamanda seftazidim, sefepim ve aztreonama karşı direnç oluşturduğu saptanmıştır. Bakteri suşlarının tamamının moksalaktam ve imipenem antibiyotiklere duyarlı olduğu görülmüştür (Tablo 4.2). İznik Gölü'nden izole edilen *E. cloacae* bakterilerinin sefoksitin ve amoksisilin/klavulanik asit çoklu direnç profili sergilediği belirlenmiştir. Test sonucu, üç *E. coli* suşunda (B57, B90 ve B109) yalnız ampisilin direnci; dört *E. coli* suşu (B65, B66, B185 ve M82) ve bir *K. pneumoniae* suşunda (M55) ise yalnız iki beta-laktam antibiyotiğe direnç tespit edilmiştir (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

Çalışmada, iki *E. coli* suşunun (B237 ve B243) 9 beta-laktam antibiyotiğe direnç gösterdiği saptanmış, bir *E. coli* suşunun (B236) ise 7 farklı beta-laktam antibiyotiğe dirençli olduğu görülmüş olup bu üç suş üçüncü kuşak sefalosporinlerden sefotaksim, seftriakson ve sefoperazona ortak direnç profili sergilemiştir. Çalışmada, dördüncü kuşak sefalosporin (sefepim) direnci gösteren yalnız iki *E. coli* suşu (B237 ve B243) olmuştur (Tablo 4.4 ve Tablo 4.5).

Tablo 4.2: Enterobacteriaceae izolatlarının inhibisyon zon çapları±SS (mm).

İstasyon	Bakteri no	Antibiyotikler (µg)												
		AM	PY	AMC	CF	FOX	CAZ	CTX	CRO	MOX	CFP	FEP	IMP	ATM
Batı Karadeniz	B53	0.50±1.00	16.50±1.29	21.00±0.00	12.25±0.96	23.75±0.50	26.00±0.82	26.75±2.06	29.50±1.00	24.00±1.15	30.00±0.00	31.50±0.58	29.50±0.58	29.00±0.82
	B54	9.50±1.00	18.50±0.58	21.00±1.15	12.75±0.50	20.00±0.00	24.75±0.50	26.25±1.26	26.50±0.58	21.50±0.58	28.00±0.82	29.50±0.58	27.25±0.50	28.00±0.82
	B57	13.00±0.00	21.00±0.82	22.75±0.50	15.50±0.58	23.50±0.58	26.00±0.82	28.75±0.50	30.00±0.00	26.50±1.29	29.75±0.50	31.50±1.29	29.75±0.50	29.50±0.58
	B58	8.25±0.96	17.25±0.50	19.25±0.96	12.50±0.58	21.25±0.50	30.00±0.00	29.00±1.41	25.75±0.50	20.00±0.00	26.00±0.00	29.50±1.00	25.75±0.96	26.25±0.50
	B65	11.75±0.96	17.75±0.96	23.50±0.58	15.50±0.58	22.25±0.96	24.75±0.50	25.00±0.82	26.25±0.50	20.50±0.58	27.50±1.29	29.00±0.00	28.50±1.00	26.50±0.58
	B66	3.25±0.50	20.50±0.58	17.25±0.50	14.00±1.15	22.00±0.00	30.00±0.82	28.50±1.29	29.25±0.50	21.75±0.50	29.50±1.29	35.50±0.58	30.00±0.00	30.75±0.96
	B85	0.00±0.00	0.00±0.00	4.00±0.80	19.00±1.15	23.25±0.96	27.50±1.00	31.50±0.58	29.50±0.58	26.00±1.15	28.75±0.50	33.00±0.82	27.75±0.96	31.75±0.96
	B89	0.00±0.00	0.00±0.00	4.00±1.15	11.50±0.58	19.75±0.50	29.50±1.00	31.25±0.50	30.25±0.58	18.75±0.50	25.25±0.50	34.25±0.96	31.00±0.00	31.25±0.50
	B90	11.75±0.50	20.25±0.50	18.00±0.00	16.00±0.00	22.25±0.96	28.50±1.29	26.25±0.96	30.50±1.29	21.00±0.82	26.50±0.58	32.25±0.50	28.50±0.58	31.00±1.15
	B91	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	12.00±0.00	21.25±0.96	27.75±0.96	27.00±0.82	28.50±1.29	21.00±0.00	25.75±0.50	33.00±0.82	30.50±0.58	31.50±0.58
	B109	10.25±2.06	20.50±0.58	19.75±0.50	16.00±1.15	24.00±1.15	29.50±0.58	30.50±1.29	32.75±0.50	21.75±0.96	30.75±0.50	34.50±0.58	29.75±0.96	32.75±0.96
	B120	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	11.50±0.58	21.25±0.50	29.00±1.41	29.00±0.82	30.25±0.50	20.50±0.58	26.25±0.50	33.25±0.50	30.00±0.00	30.25±0.50
	B153	0.00±0.00	0.00±0.00	12.00±0.82	20.00±0.82	24.00±0.00	28.50±0.58	28.50±0.58	29.50±0.58	21.75±0.50	31.00±0.00	34.75±0.50	29.75±0.96	34.25±0.96
	B155	0.00±0.00	0.00±0.00	12.50±1.29	19.00±0.00	21.75±0.96	29.00±0.00	31.25±0.96	23.50±0.58	19.25±0.50	28.25±0.50	31.25±0.50	27.00±0.00	31.50±0.58
	B176	0.00±0.00	14.25±0.50	14.50±1.29	13.25±0.50	19.75±0.50	25.25±0.50	26.25±0.50	25.00±0.82	17.25±0.50	27.00±1.15	30.50±0.58	28.50±1.00	30.00±0.00
	B180	2.50±0.58	19.00±0.00	20.00±1.15	11.75±0.96	20.00±0.00	28.50±0.58	29.25±0.96	26.50±2.08	22.50±1.00	31.50±1.00	30.00±1.15	31.75±0.96	25.25±0.50
	B185	0.00±0.00	0.00±0.00	18.75±0.96	15.00±0.00	24.00±1.15	29.00±0.82	27.00±0.82	25.00±0.82	26.00±1.41	24.25±0.50	28.75±0.96	31.50±1.00	26.25±0.50
	B233	0.00±0.00	17.50±0.58	16.50±1.29	10.25±0.50	24.00±0.82	31.25±0.96	33.75±0.50	32.50±0.58	20.50±0.58	30.75±0.50	35.50±0.58	31.75±0.50	34.75±0.50
	B235	0.00±0.00	19.00±1.15	17.50±0.58	13.00±0.00	23.75±0.50	31.50±0.58	34.00±0.00	30.50±0.58	22.75±0.96	31.00±0.00	34.75±0.50	31.75±0.96	34.75±0.50
	B236	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	20.50±0.58	20.50±0.58	11.75±0.00	8.50±0.58	18.75±0.50	7.75±0.50	21.75±1.50	31.75±0.50	18.50±0.58
	B237	0.00±0.00	0.00±0.00	18.25±0.50	0.00±0.00	23.25±0.50	16.00±0.00	8.50±0.00	7.50±1.00	24.00±0.82	9.00±1.15	14.25±0.96	33.00±0.82	13.25±0.50
	B243	0.00±0.00	0.00±0.00	19.75±0.50	0.00±0.00	23.00±0.00	16.50±0.58	8.50±0.00	7.25±0.96	24.50±0.58	10.50±0.58	17.00±1.83	31.00±0.82	13.75±0.50
Manyas Gölü	M55	0.00±0.00	9.75±0.96	20.50±0.58	20.00±0.00	21.50±1.00	22.00±0.82	26.00±0.82	24.75±0.96	25.50±0.58	23.25±0.50	25.50±0.58	24.75±0.96	28.75±1.89
	M82	3.50±0.58	15.00±1.15	20.75±0.50	16.00±0.00	22.00±1.15	23.25±0.96	24.75±0.96	25.75±0.96	27.50±0.58	27.50±1.00	29.00±0.00	29.75±0.50	28.50±0.58
İznik Gölü	İ3	14.25±0.96	23.50±1.00	10.75±0.50	0.00±0.00	0.00±0.00	22.00±0.82	25.00±0.82	21.75±0.50	24.25±0.96	25.25±0.50	26.50±1.00	21.25±1.26	25.50±0.58
	İ5	0.00±0.82	22.00±1.15	10.50±0.58	0.00±0.00	0.00±0.00	22.00±1.83	30.0±0.00	23.00±1.63	25.00±0.00	21.75±1.50	24.75±0.96	21.50±1.00	28.00±1.41
	İ8	13.25±1.50	24.25±1.26	10.25±0.50	0.00±0.00	0.00±0.00	24.25±0.50	26.75±2.30	22.25±0.50	23.00±0.82	23.00±0.82	22.50±0.58	21.75±0.96	24.25±1.50

AM: ampisilin; PY: karbenisilin; AMC: amoksisilin/klavulanik asit; CF: sefalotin; FOX: sefoksitin; CAZ: seftazidim; CTX: sefotaksim; CRO: seftriakson; MOX: moksalaktam; FEP: sefepim; CFP: sefoperazon; IMP: imipenem; ATM: aztreonam; SS: standart sapma.

Tablo 4.3: *Enterobacteriaceae* izolatlarının beta-laktam antibiyotik duyarlılıkları.

İstasyon	Bakteri no	Antibiyotikler												
		AM	PY	AMC	CF	FOX	CAZ	CTX	CRO	MOX	CFP	FEP	IMP	ATM
Batı Karadeniz	B53	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
	B54	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Yd	Du
	B57	Di	Yd	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
	B58	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Yd	Du
	B65	Di	Di	Du	Yd	Du	Du	Yd	Du	Yd	Du	Du	Yd	Du
	B66	Di	Yd	Yd	Di	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B85	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
	B89	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B90	Di	Yd	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B91	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B109	Di	Yd	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B120	Di	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B153	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B155	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B176	Di	Di	Yd	Di	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B180	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
	B185	Di	Di	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
	B233	Di	Di	Yd	Di	Du	Du	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du
	B235	Di	Di	Du	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
	B236	Di	Di	Di	Di	Du	Yd	Di	Di	Yd	Di	Du	Du	Yd
	B237	Di	Di	Du	Di	Du	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Di
	B243	Di	Di	Du	Di	Du	Di	Di	Di	Du	Di	Di	Du	Di
Manyas Gölü	M55	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Du
	M82	Di	Di	Du	Yd	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Du	Du	Du
İzmit Gölü	İ3	Yd	Du	Di	Di	Di	Du	Yd	Yd	Du	Du	Du	Yd	Du
	İ5	Yd	Yd	Di	Di	Di	Du	Du	Du	Du	Du	Du	Yd	Du
	İ8	Di	Du	Di	Di	Di	Du	Du	Yd	Du	Du	Du	Yd	Du

Di: dirençli; Yd: yarı duyarlı; Du: duyarlı; AM: ampicilin; PY: karbenisilin; AMC: amoksisilin/klavulanik asit; CF: sefalotin; FOX: sefoksitin; CAZ: seftazidim; CTX: sefotaksim; CRO: seftriakson; MOX: moksalaktam; FEP: sefepim; CFP: sefoperazon; IMP: imipenem; ATM: aztreonam.

Tablo 4.4: *Enterobacteriaceae* izolatlarının antibiyotik duyarlılık yüzdeleri.

Beta-laktam antibiyotik grubu	Beta-laktam antibiyotik adı	Batı Karadeniz (%)			Manyas Gölü (%)			İznik Gölü (%)			Toplam (%)		
		Di	Yd	Du	Di	Yd	Du	Di	Yd	Du	Di	Yd	Du
Penisilin	AM	100	0	0	100	0	0	33.3	66.7	0	92.6	7.4	0
	PY	81.8	18.2	0	100	0	0	0	33.3	66.7	74.1	18.5	7.4
Beta-laktam/beta-laktamaz inhibitörü	AMC	31.8	13.6	54.6	0	0	100	100	0	0	37.0	11.1	51.9
1. kuşak sefalosporin	CF	63.7	22.7	13.6	0	50	50	100	0	0	63.0	22.2	14.8
2. kuşak sefalosporin	FOX	0	0	100	0	0	100	100	0	0	11.1	0	88.9
3. kuşak sefalosporin	CAZ	9.1	4.5	86.4	0	0	100	0	0	100	7.4	3.7	88.9
	CTX	13.6	4.6	81.8	0	50	50	0	33.3	66.7	11.1	11.1	77.8
	CRO	13.6	0	86.4	0	0	100	0	66.7	33.3	11.1	7.4	81.5
	MOX	0	63.6	36.4	0	0	100	0	0	100	0	51.9	48.1
	CFP	13.6	0	86.4	0	0	100	0	0	100	11.1	0	88.9
4. kuşak sefalosporin	FEP	9.1	0	90.9	0	0	100	0	0	100	7.4	0	92.6
Karbapenem	IMP	0	13.6	86.4	0	0	100	0	100	0	0	22.2	77.8
Aztreonam	ATM	9.1	4.5	86.4	0	0	100	0	0	100	7.4	3.7	88.9

Di: dirençli; Yd: yarı duyarlı; Du: duyarlı; AM: ampisilin; PY: karbenisilin; AMC: amoksisilin/klavulanik asit; CF: sefalotin; FOX: sefoksitin; CAZ: seftazidim; CTX: sefotaksim; CRO: seftriakson; MOX: moksalaktam; FEP: sefepim; CFP: sefoperazon; IMP: imipenem; ATM: aztreonam.

Tablo 4.5: *Enterobacteriaceae* izolatlarının beta-laktam antibiyotik direnç profilleri.

İzole edildiği kaynak	Bakteri no	Bakteri adı	Antibiyotik direnç profili	Direnç görüldüğü antibiyotik sayısı
Batı Karadeniz	B53	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, CF	3
	B54	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, CF	3
	B57	<i>Escherichia coli</i>	AM	1
	B58	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, CF	3
	B65	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY	2
	B66	<i>Escherichia coli</i>	AM, CF	2
	B85	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AM, PY, AMC	3
	B89	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, AMC, CF	4
	B90	<i>Escherichia coli</i>	AM	1
	B91	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, AMC, CF	4
	B109	<i>Escherichia coli</i>	AM	1
	B120	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, AMC, CF	4
	B153	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AM, PY, AMC	3
	B155	<i>Klebsiella oxytoca</i>	AM, PY, AMC	3
	B176	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, CF	3
	B180	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, CF	3
	B185	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY	2
	B233	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, CF	3
	B235	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, CF	3
	B236	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, AMC, CF, CTX, CRO, CFP	7
	B237	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, CF, CAZ, CTX, CRO, CFP, FEP, ATM	9
	B243	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY, CF, CAZ, CTX, CRO, CFP, FEP, ATM	9
Manyas Gölü	M55	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	AM, PY	2
	M82	<i>Escherichia coli</i>	AM, PY	2
İznik Gölü	i3	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMC, CF, FOX	3
	i5	<i>Enterobacter cloacae</i>	AMC, CF, FOX	3
	i8	<i>Enterobacter cloacae</i>	AM, AMC, CF, FOX	4

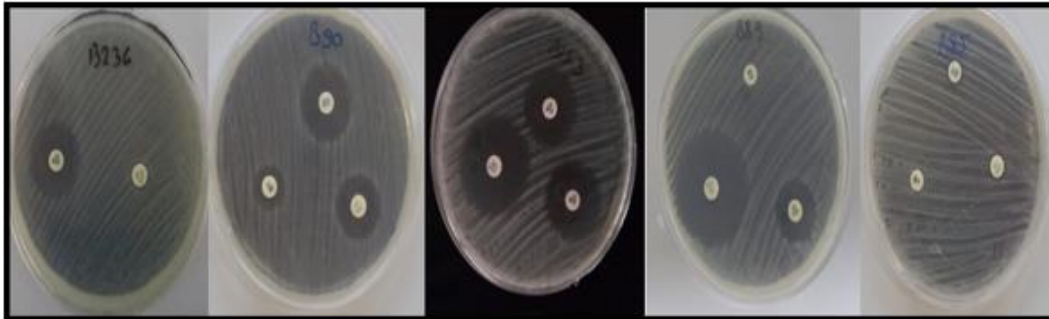
AM: ampisilin; PY: karbenisilin; AMC: amoksisilin/klavulanik asit; CF: sefalotin; FOX: sefoksitin; CAZ: seftazidim; CTX: sefotaksim; CRO: seftriakson; MOX: moksalaktam; FEP: sefepim; CFP: sefoperazon; IMP: imipenem; ATM: aztreonam.

Çalışmada, toplam 27 bakteri suşundan 24'ünün (%88.9) iki veya daha fazla beta-laktam antibiyotiğe direnç gösterdiği belirlenmiştir (Tablo 4.6). Çoklu antibiyotik direnci gösteren 24 *Enterobacteriaceae* izolatından 17'sinin *E. coli*, 3'ünün *K. oxytoca*, 3'ünün *E. cloacae* ve 1'inin de *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* bakterileri olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.6: *Enterobacteriaceae* izolatlarının çoklu beta-laktam antibiyotik direnç profilleri.

Çoklu direnç profilleri	Dirençli beta-laktam antibiyotik sayısı	İzole edildiği kaynak		
		Batı Karadeniz	İznik Gölü	Manyas Gölü
AM, PY	2	B65, B185		M55, M82
AM, CF	2	B66		
AM, PY, CF	3	B53, B54, B58, B176, B180, B233, B235		
AM, PY, AMC	3	B85, B153, B155		
CF, FOX, AMC	3		i3, i5	
AM, PY, CF, AMC	4	B89, B91, B120		
AM, CF, FOX, AMC	4		i8	
AM, PY, CF, CTX, CRO, CFP, AMC	7	B236		
AM, PY, CF, CAZ, CTX, CRO, CFP, FEP, ATM	9	B237, B243		

AM: ampicilin; PY: karbenisilin; AMC: amoksisilin/klavulanik asit; CF: sefalotin; FOX: sefoksitin; CAZ: seftazidim; CTX: sefotaksim; CRO: seftriakson; MOX: moksalaktam; FEP: sefepim; CFP: sefoperazon; IMP: imipenem; ATM: aztreonam.



Şekil 4.1: Disk difüzyon testinde çeşitli inhibisyon zonları.

4.2.1.2. GSBL Doğrulama İçin Kombine Disk Testi Sonuçları

Disk difüzyon duyarlılık testinde $CAZ \leq 22$ mm, $ATM \leq 27$ mm, $CTX \leq 27$ mm ve $CRO \leq 25$ mm şartlarından en az birini sağlayan toplam 15 bakteri (B53, B54, B58, B65, B90, B91, B155, B176, B180, B185, B236, B237, B243, M55, M82) için GSBL doğrulama için kombine disk metodu uygulanmıştır. CAZ, CAZ/CLA, CTX ve CTX/CLA diskleri için ölçülen inhibisyon zon çapı ortalama değerlerinin gösterildiği Şekil 4.2’de gösterilmiştir.

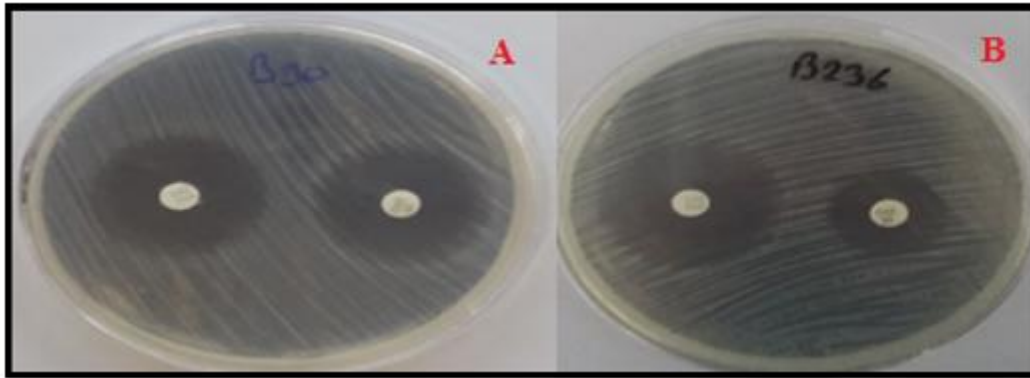


Şekil 4.2: GSBL doğrulama kombine disk testinde CAZ, CAZ/CLA, CTX, CTX/CLA için ölçülen inhibisyon zon çapları±SS; A: negatif sonuç veren suşlar; B: pozitif sonuç veren suşlar.

CAZ/CLA ile CAZ diskleri arası ve CTX/CLA ile CTX diskleri arası inhibisyon zon çapı ortalama değerleri arasındaki farklar belirlenmiş olup Tablo 4.7’de gösterilmiştir. Değerlendirme sonucu, farkın hem CAZ hem CTX antibiyotikler için 5 mm’den fazla olduğu belirlenen 3 *E. coli* suşunun (B236, B237 ve B243) GSBL pozitif olduğu doğrulanmıştır.

Tablo 4.7: GSBL doğrulama testi sonucu CAZ/CLA ile CAZ arası ve CTX/CLA ile CTX arası inhibisyon zon çapı farkları ve GSBL üretiminin değerlendirilmesi.

Bakteri No	CAZ/CLA-CAZ Farkı (mm)	CTX/CLA-CTX Farkı (mm)	GSBL Üretimi
B53	2.5	2.5	-
B54	1.5	1.25	-
B58	2.0	4.25	-
B65	0.5	1.75	-
B90	1.75	3.25	-
B91	1.5	1.0	-
B155	0.75	1.25	-
B176	3.75	1.0	-
B180	2.25	4.75	-
B185	4.25	4.75	-
B236	10.75	10.75	+
B237	7.75	16.75	+
B243	10.0	15.25	+
M55	1.25	0	-
M82	3.5	2.75	-



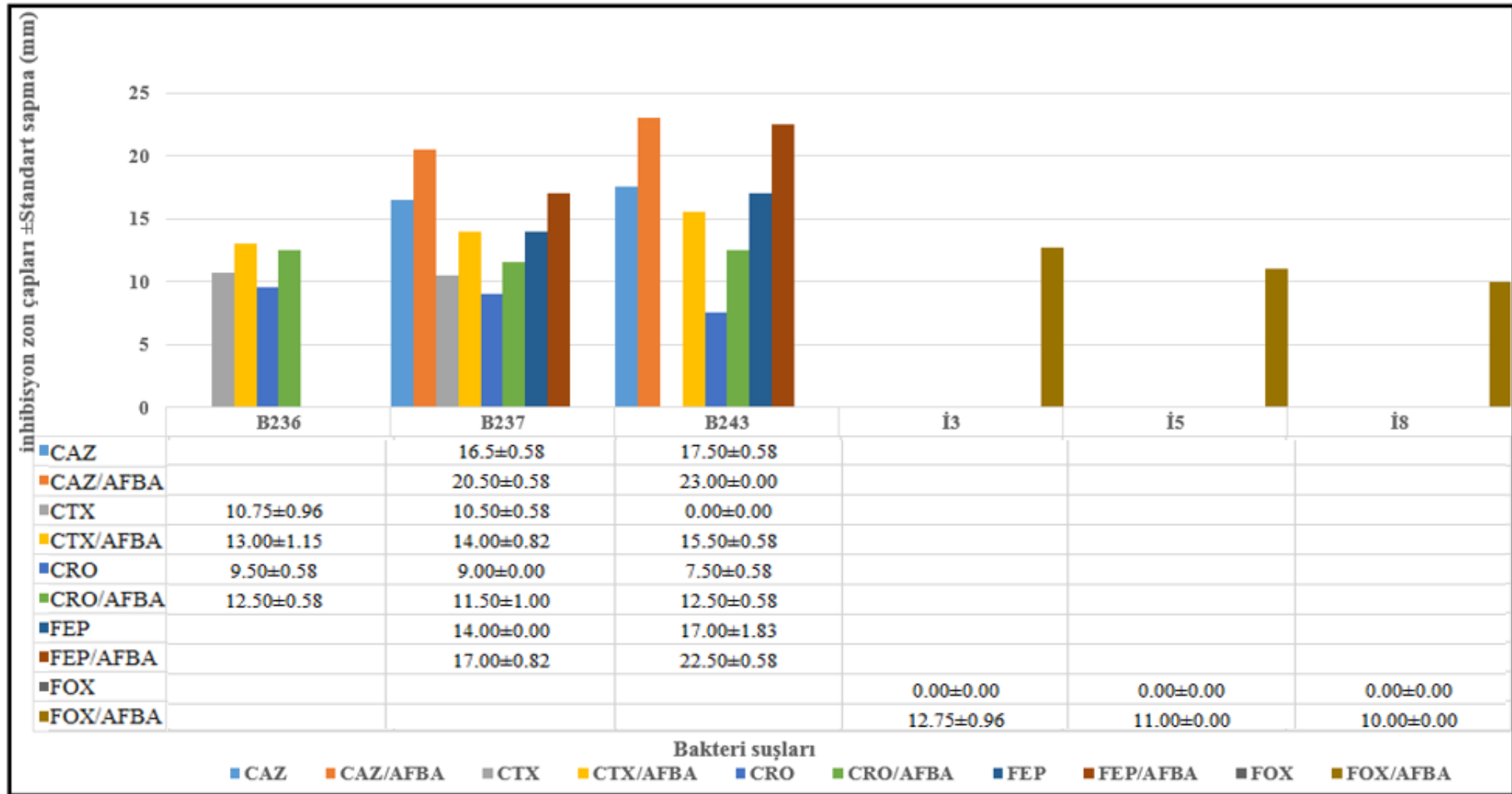
Şekil 4.3: GSBL doğrulama testinde klavulanik asidin etkisi. A: GSBL negatif sonuç veren bir izolat (B90); B: GSBL pozitif sonuç veren bir izolat (B236).

4.2.1.3. AmpC Doğrulama İçin Kombine Disk Testi Sonuçları

Çalışmada, 6 suşun (B236, B237, B243, İ3, İ5, İ8) ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere direnç gösterdiği saptandığından, AmpC doğrulama testi uygulanmıştır. Test sonucu elde edilen inhibisyon zon çapları ortalama değerleri Şekil 4.4'te verilmiştir.

Disk difüzyon testinde; AmpC enziminin etki spektrumunda bulunan seftazidim, sefotaksim, seftriakson, sefepim ve sefoksitin antibiyotiklerden en az birine direnç gösterdiği belirlenen 6 suшта (B236, B237, B243, İ3, İ5, İ8) yapılan AmpC doğrulama testi sonucu; 1'i *E. coli* (B243) ve 3'ü *E. cloacae* (İ3, İ5 ve İ8) olmak üzere toplam 4 suшта AmpC üretimi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.8).

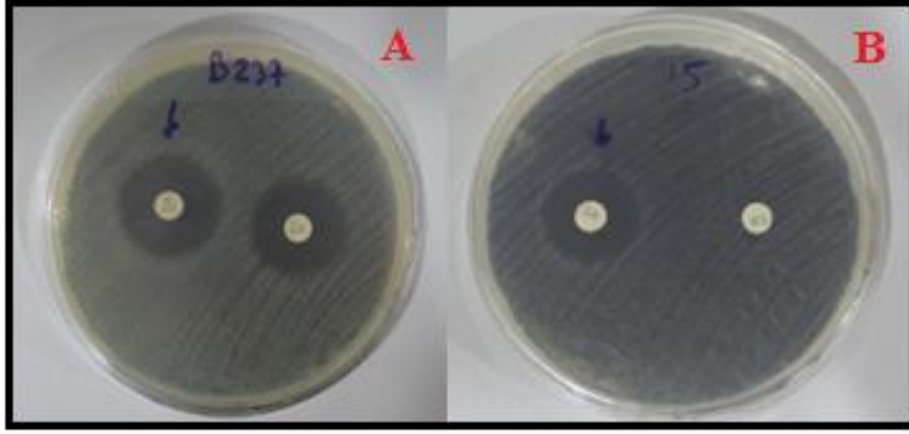




Şekil 4.4: AmpC doğrulama testinde CAZ, CAZ/AFBA, CTX, CTX/AFBA, CRO, CRO/AFBA, FEP, FEP/AFBA, FOX ve FOX/AFBA diskleri etrafında oluşan inhibisyon zon çapları±SS.

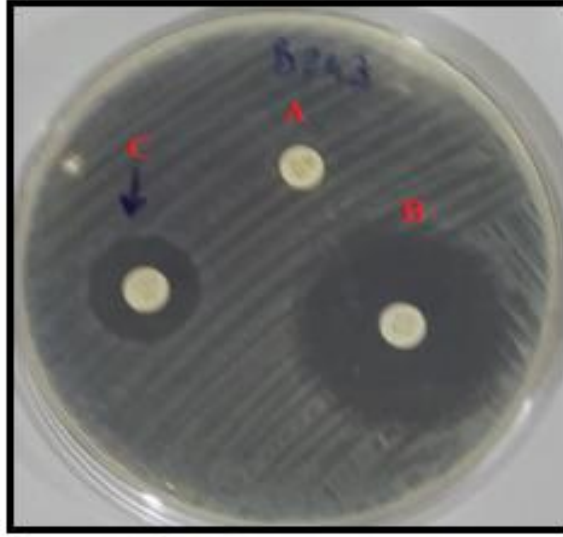
Tablo 4.8: AmpC doğrulama testinde FOX/AFBA ile FOX arası, CAZ/AFBA ile CAZ arası, CTX/AFBA ile CTX arası, CRO/AFBA ile CRO arası ve FEP/AFBA ile FEP arası inhibisyon zon çapı farkları ve AmpC üretiminin değerlendirilmesi.

Bakteri adı	FOX/AFBA- FOX farkı (mm)	CAZ/AFBA- CAZ farkı (mm)	CTX/AFBA- CTX farkı (mm)	CRO/AFBA- CRO farkı(mm)	FEP/AFBA- FEP farkı (mm)	AmpC üretimi
B236			2.25	3.0		-
B237		4.0	3.5	2.5	3.0	-
B243		5.5	15.5	5.0		+
i3	12.75					+
i5	11.0					+
i8	10.0					+



Şekil 4.5: AmpC doğrulama testinde boronik asidin etkisi. A: AmpC negatif sonuç veren bir izolat (B237); B: AmpC pozitif sonuç veren bir izolat (İ5).

Çalışmamızda; GSBL ve AmpC fenotipik doğrulama testleri sonucu bir *E. coli* izolatında (B243) hem GSBL hem AmpC varlığı tespit edilmiştir. Şekil 4.6'da; bu izolatın klavulanik asit ve boronik asit inhibitörleri ile kombine edilen sefotaksim antibiyotik diski ve her iki inhibitörün bakteri üremesine olan etkisi görülmektedir.



Şekil 4.6: B243 bakteri suşunda CLA ve AFBA etkisi. A: CTX diski; B: CTX/CLA diski; C: CTX/AFBA diski.

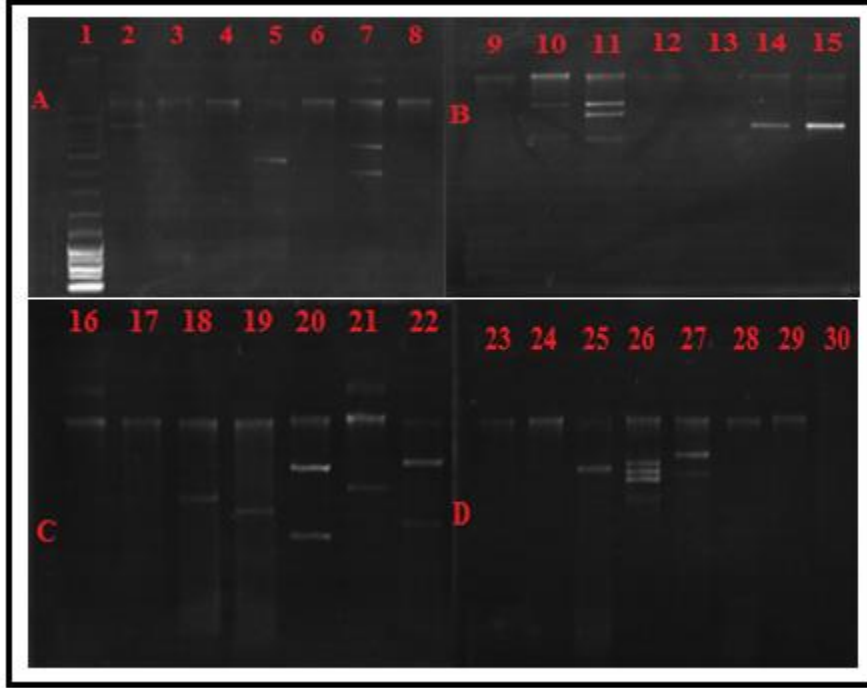
4.3. BETA-LAKTAM ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN GENOTİPİK OLARAK GÖSTERİLMESİ

4.3.1. Plazmid aracılı Beta-Laktamazları Kodlayan Genlerin PZR Yöntemi İle Gösterilmesi

TEM beta-laktamaz ürettiği bilinen (Monstein ve diğ., 2007) *E. coli* ATCC 35218 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) ve SHV-18 GSBL varyantı ürettiği bilinen (Rasheed ve diğ., 2000) *K. pneumoniae* ATCC 700603 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) standart bakterilerin kullanıldığı çalışmada; farklı su kaynaklarından izole edilen 27 *Enterobacteriaceae* suşunda plazmid aracılı beta-laktamazları kodlayan genler araştırılmıştır.

4.3.1.1. Plazmid DNA eldesi

Çalışmamızda plazmid aracılı beta-laktamazları kodlayan genlerin PZR yöntemi ile tespit etmek için öncelikle plazmid DNA izolasyonu yapılmıştır. Örneklere ait plazmid DNA izolasyon bantları Şekil 4.7’de gösterilmiştir.

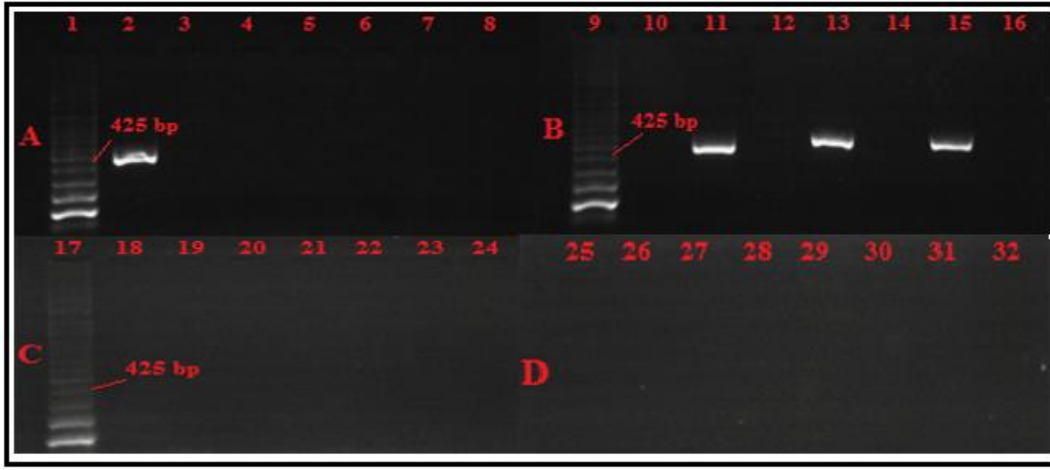


Şekil 4.7: *Enterobacteriaceae* izolatlarına ait plazmid DNA'ların agaroz jeldeki görüntüsü. A1)1 kb DNA marker, A2)B66, A3)B85, A4)B89, A5)B90, A6)B91 A7)B120, A8)B153; B9)B155, B10)B176, B11)B180, B12)B185, B13)B236, B14)B237, B15)B243; C16)pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 35218), C17)B53, C18)B54, C19)B57, C20)B58, C21)B65, C22)B109, D23)B233, D24)B235, D25)M55, D26)M82, D27)İ3, D28)İ5, D29)İ8, D30)negatif kontrol.

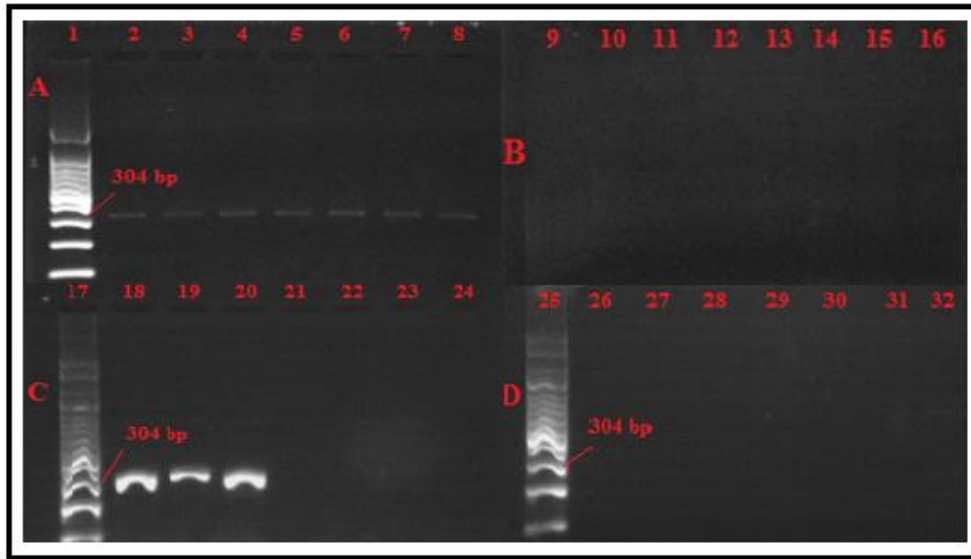
4.3.1.2. Plazmid aracılı beta-laktamaz kodlayan genlerin PZR İle Gösterilmesi

Plazmid aracılı *blaTEM*, *blaSHV*, *blaCTX-M*, *blaIMP* ile CIT, MOX ve FOX gen gruplarının tespit edilmesi amacıyla yapılan PZR deneyleri sonucu elde edilen ürünlerin agaroz jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.8 ila Şekil 4.14'de gösterilmiştir.

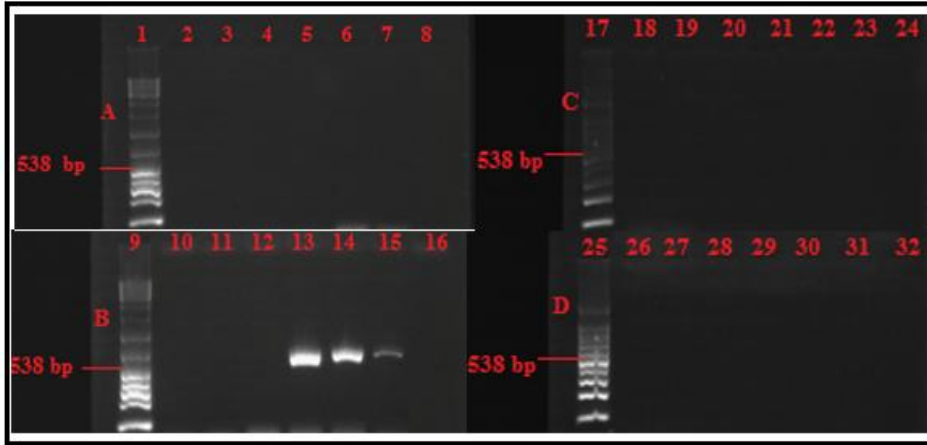
Plazmid aracılı beta-laktamazları kodlayan genlerin araştırılması için yapılan PZR deneyleri sonucu; 3 *E. coli* bakterisinde (B89, B91, B120) *blaTEM* geni (Şekil 4.8), 6 *E. coli* (B120, B176, B180, B185, B233, B235), 1 *K. pneumoniae* (M55) ve 2 *K. oxytoca* (B85 ve B155) bakterisinde *blaSHV* geni (Şekil 4.9), 3 *E.coli* (B236, B237 ve B243) bakterisinde *blaCTX-M* geni (Şekil 4.10), 2 *E. coli* (B185 ve B243) bakterisinde CIT gen grubu (Şekil 4.11) saptanmıştır. Çalışmamızda kullanılan 27 *Enterobacteriaceae* izolatının plazmid aracılı MOX ve FOX gen grupları ile *blaIMP* geni taşımadığı tespit edilmiştir.



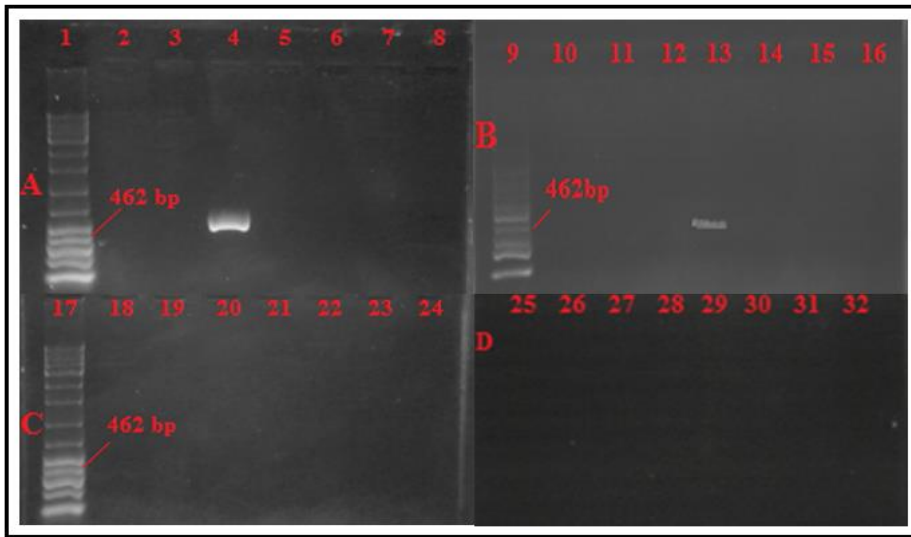
Şekil 4.8: *blaTEM* geni. A1)100 bp marker, A2)pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 35218), A3)B53, A4)B54, A5)B57, A6)B58, A7)B65, A8)B66, B9)100 bp marker, B10)B85, B11)B89(+), B12)B90, B13)B91 (+), B14)B109, B15)B120 (+), B16)negatif kontrol, C17)100 bp marker, C18)B153, C19)B155, C20)B176, C21)B180, C22)B185, C23)B233, C24)B235, D25)B236, D26)B237, D27)B243, D28)M55, D29)M82, D30)İ3, D31)İ5, D32)İ8.



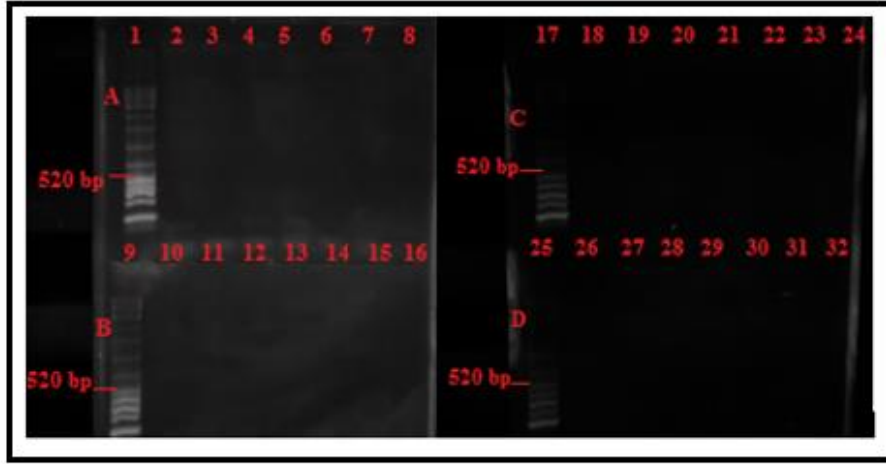
Şekil 4.9: *blaSHV* geni. A1)1 kb marker, A2)B120 (+), A3)B155(+), A4)B176 (+), A5)B180(+), A6)B185(+), A7)B233(+), A8)B235(+), B9)B153, B10)B236, B11)B237, B12)B243, B13)M82, B14)İ3, B15)İ5, B16)İ8, C17)1 kb marker, C18)pozitif kontrol (*K.pneumoniae* ATCC 700603), C19)B85(+), C20)M55(+), C21)B89, C22)B90, C23)B91, C24)B109, D25)1 kb marker, D26)negatif kontrol, D27)B53, D28)B54, D29)B57, D30)B58, D31)B65, D32)B66.



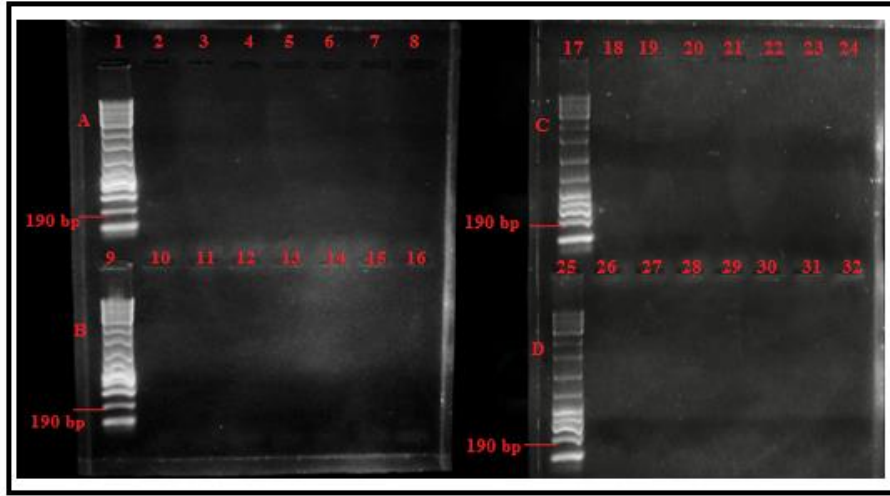
Şekil 4.10: *bla*CTX-M geni. A1)1 kb marker, A2)B91, A3)B109, A4)B120, A5)153, A6)B155, A7)B176, A8)B180, B9)1 kb marker, B10)B185, B11)B233, B12)B235, B13)B236(+), B14)B237(+), B15)B243(+), B16)negatif kontrol, C17)1 kb marker, C18)B53, C19)B54, C20)B57, C21)B58, C22)B65, C23)B66, C24)B85, D25) 1 kb marker, D26)B89, D27)B90, D28)M55, D29)M82, D30)İ3, D31)İ5, D32)İ8.



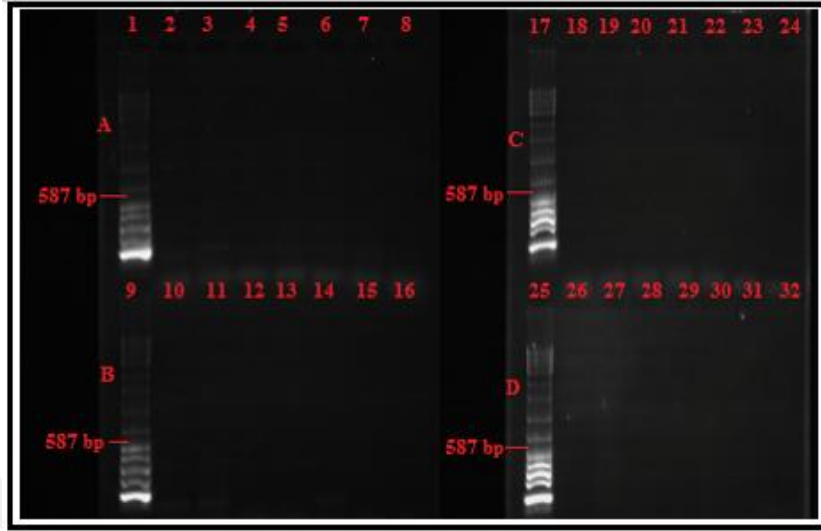
Şekil 4.11: CIT gen grubu. A1)1 kb marker, A2)B176, A3)B180, A4)B185(+), A5)233, A6)235, A7)236, A8)237, B9)100 bp marker, B10)İ3, B11)İ5, B12)İ8, B13)B243(+), B14)M55, B15)M82, B16)negatif kontrol, C17)1 kb marker, C18)B53, C19)B54, C20)B57, C21)B58, C22)B65, C23)B66, C24)B85, D25)B89, D26)B90, D27)B91, D28)B109, D29)B120, D30)B153, D31)B155.



Şekil 4.12: MOX gen grubu. A1)1 kb marker, A2)B53, A3)B54, A4)B57, A5)B58, A6)B65, A7)B66, A8)B85, B9)1 kb marker, B10)B89, B11)B90, B12)B91, B13)B109, B14)B120, B15)B153, B16)B155, C17)1 kb marker, C18)B176, C19)B180, C20)B185, C21)B233, C22)B235, C23)B236, C24)B237, D25)1 kb marker, D26)B243, D27)M55, D28)M82, D29)İ3, D30)İ5, D31)İ8, D32)negatif kontrol.



Şekil 4.13: FOX gen grubu. A1)1 kb marker, A2)B53, A3)B54, A4)B57, A5)B58, A6)B65, A7)B66, A8)B85, B9)1 kb marker, B10)B89, B11)B90, B12)B91, B13)B109, B14)B120, B15)B153, B16)B155, C17)1 kb marker, C18)B176, C19)B180, C20)B185, C21)B233, C22)B235, C23)B236, C24)B237, D25)1 kb marker, D26)B243, D27)M55, D28)M82, D29)İ3, D30)İ5, D31)İ8, D32)negatif kontrol.



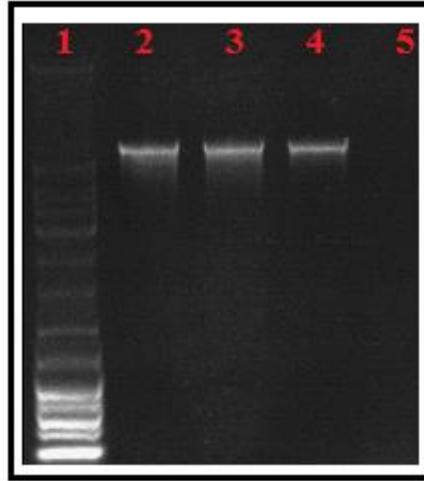
Şekil 4.14: *blaIMP* geni. A1)1 kb marker, A2)B53, A3)B54, A4)B57, A5)B58, A6)B65, A7)B66, A8)B85, B9)1 kb marker, B10)B89, B11)B90, B12)B91, B13)B109, B14)B120, B15)B153, B16)B155, C17)1 kb marker, C18)B176, C19)B180, C20)B185, C21)B233, C22)B235, C23)B236, C24)B237, D25) 1 kb marker, D26)B243, D27)M55, D28)M82, D29)İ3, D30)İ5, D31)İ8, D32)negatif kontrol.

4.3.2. Kromozomal aracılı AmpC Kodlayan Genin Semi-Nested PZR Yöntemi İle Gösterilmesi

İznik Gölü sularından izole edilen 3 *E. cloacae* suşunda kromozomal DNA aracılı *blaAmpC* geni varlığı araştırılmıştır.

4.3.2.1. Kromozomal DNA eldesi

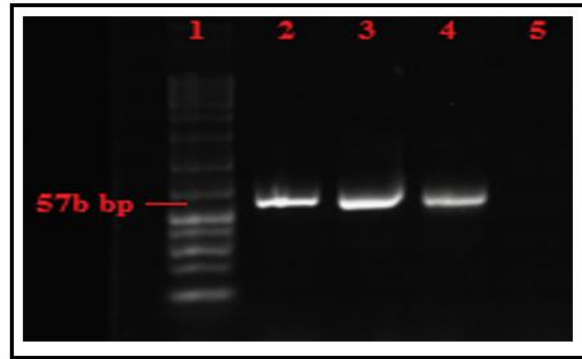
Çalışmamızda kromozomal DNA aracılı sınıf C beta-laktamaz kodlayan *blaAmpC* gen varlığı PZR yöntemi ile tespit etmek için *E. cloacae* bakterilerinde kromozmal DNA izolasyonu yapılmış ve örnekler jel elektroforezde yürütülerek görüntülenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15: Genomik DNA bant görüntüleri. 1)1 kb DNA marker, 2)İ3, 3)İ5, 4)İ8, 5)negatif kontrol.

4.3.2.2. Kromozomal Aracılı *blaAmpC* Geninin Semi-Nested PZR İle Gösterilmesi

E. cloacae türüne özgü kromozomal *blaAmpC* geninin varlığını tespit etmek amacıyla uygulanan semi-nested PZR reaksiyonu sonucu İznik Gölü izolatlarının (İ3, İ5 ve İ8) tamamında DNA amplifikasyonu görülmüştür (Şekil 4.16).



Şekil 4.16: *blaAmpC* geni. 1)1 kb marker, 2)İ3(+), 3)İ5(+), 4)İ8(+), 5)negatif kontrol.

Çalışmada, 27 *Enterobacteriaceae* izolatında belirlenen beta-laktamaz kodlayan gen profili ve direnç fenotipleri Tablo 4.9’da verilmiştir. Batı Karadeniz’den 3 farklı *E. coli* izolatından birinde *blaTEM*+*blaSHV*, birinde *blaCTX-M*+CIT, birinde *blaSHV*+CIT gen profili saptanmıştır (Tablo 4.9).

Tablo 4.9: *Enterobacteriaceae* izolatlarında beta-laktamazları kodlayan genler ve direnç fenotipleri.

Bakteri no	Bakteri adı	Enzim profili	Gen profili	Direnç fenotipi
B53, B54, B58	<i>Escherichia coli</i>	-	-	AM, PY, CF
B57, B90, B109	<i>Escherichia coli</i>	-	-	AM
B65, M82	<i>Escherichia coli</i>	-	-	AM, PY
B66	<i>Escherichia coli</i>	-	-	AM, CF
B85, B155	<i>Klebsiella oxytoca</i>	SHV	<i>blaSHV</i>	AM, PY, AMC
B89, B91	<i>Escherichia coli</i>	TEM	<i>blaTEM</i>	AM, PY, AMC, CF
B153	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	AM, PY, AMC
B176, B180, B233, B235	<i>Escherichia coli</i>	SHV	<i>blaSHV</i>	AM, PY, CF
B236	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M	<i>blaCTX-M</i>	AM, PY, AMC, CF, CTX, CRO, CFP
B237	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M	<i>blaCTX-M</i>	AM, PY, CF, CAZ, CTX, CRO, CFP, FEP, ATM
B243	<i>Escherichia coli</i>	CTX-M+CIT	<i>blaCTX-M+blaLAT-1</i> ile <i>blaLAT-4</i> arası, <i>blaCMY-2</i> ile <i>blaCMY-7</i> arası, <i>blaBIL-1</i>	AM, PY, CF, CAZ, CTX, CRO, CFP, FEP, ATM
M55	<i>Klebsiella pneumoniae subsp. pneumoniae</i>	SHV	<i>blaSHV</i>	AM, PY
İ3, İ5	<i>Enterobacter cloacae</i>	AmpC	<i>blaAmpC</i>	AMC, CF, FOX
İ8	<i>Enterobacter cloacae</i>	AmpC	<i>blaAmpC</i>	AM, AMC, CF, FOX
B120	<i>Escherichia coli</i>	TEM+SHV	<i>blaTEM+blaSHV</i>	AM, PY, AMC, CF
B185	<i>Escherichia coli</i>	SHV+CIT	<i>blaSHV+blaLAT-1</i> ile <i>blaLAT-4</i> arası, <i>blaCMY-2</i> ile <i>blaCMY-7</i> arası, <i>blaBIL-1</i>	AM, PY

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnsan-hayvan-çevresel ortam üçgeninde sık beta-laktam antibiyotik tüketimine bağlı olarak hızla gelişen beta-laktamaz üretimi yoluyla direnç mekanizması hem toplum sağlığını ciddi şekilde tehdit etmekte, hem de ekolojik kirliliğin baş etkenlerinden biri olma yolunda ilerlemektedir. Endüstriyel sağlık sektörünün yanı sıra tarımsal faaliyetler, kümes hayvancılığı, su kültürleri gibi gıda üretim alanlarında beta-laktam antibiyotik tüketimi, direnç döngüsünün gittikçe karmaşık hale gelmesine neden olmaktadır. Bu durum; uzun yıllar boyunca klinik bakteriyel suşlar üzerine odaklanan antimikrobiyal direnç araştırmalarının çevresel ortamlara yönelmesini gerektirmektedir. Sucul habitatteki antibiyotik direncinin araştırılması çalışmalarında bakterilerin fekal kökenine dikkat çekilmektedir; çünkü kirlilik indikatörü olarak kullanılan bu bakteriler enfektif hastalıklarla bağlantılandırılabilir (Ozgumus ve diğ., 2007). Bu bağlamda; yaptığımız çalışma sucul ortamlardan izole edilen *Enterobacteriaceae* üyesi bakterilerde beta-laktamaz üretimi ile bu enzimleri kodlayan genetik faktörlerin ilişkilendirilmesi sürecine katkıda bulunarak, gelecekte yapılacak benzer çalışmalar için ipuçları sağlayacaktır.

İnsanlar ile deniz, nehir, göl gibi yüzey suları arasında su ürünleri, içme suyu, direkt temas veya aerosol solunumu aracılığıyla sürekli bir ilişki mevcuttur (Lu ve diğ., 2010). Su ortamlarında yaşayan beta-laktamaz üreticisi bakteriler; plazmidler, transpozonlar, integronlar gibi hareketli genetik elementlerden yatay gen transferi yoluyla hem kendi aralarında hem de aynı ortamda birarada yaşadıkları patojen bakterilere, sahip oldukları direnç faktörlerini aktarabilmektedir (Matyar ve diğ., 2008; Zhang ve diğ., 2009). Bunun sonucunda; direnç kazanan patojen bakteriler seçim baskısına maruz kalarak, geçiş yaptıkları ortam ve dokularda baskın popülasyonu oluşturabilmekte, böylece hayvan ve insanlarda neden oldukları enfeksiyonların tedavisini daha da zorlaştırmaktadır. Bu durumun ortaya çıkmasında önemli etkenlerden biri, su kültürü ile gıda üretiminin artış göstermesidir. Besin kaynağı olarak üretilen balığın total miktarı 1962’de %5’ten 2014’te %44.1’e yükselmiştir. Hayvan ve su kültürü üretimi yapan büyük ülkelerde bu amaçla kullanılan 51 antibiyotiğin 39’unun Dünya Sağlık Örgütü listesinde bulunduğu ve bunların 37’sinin klinik açıdan yüksek derecede önem taşıyanlar sınıfında olduğu ortaya konmuştur. Bu antibiyotikler arasında penisilinler de bulunmaktadır. Balıklar antibiyotikleri yeterince metabolize edemediği için, dışkıları aracılığıyla aktif maddenin yoğun şekilde çevreye yayıldığı ve su kültürlerinde kullanılan antibiyotiklerin yaklaşık %70-80’inin

bu şekilde su sistemlerine geçiş yaptığı belirlenmiştir. Yapılan moleküler çalışmalar; su kültürlerindeki bakterilerin antibiyotik direnç genleri ile insan ve hayvanlarda hastalık etkeni olan karasal ortam bakterilerinin direnç genleri arasında büyük oranda benzerlik görüldüğünü ortaya koymaktadır (Santos ve Ramos, 2018).

Öte yandan; hastane ve benzeri sağlık kuruluşları ile atık su arıtma tesisleri gibi dirençli bakterileri taşıma potansiyeli yüksek noktalarındaki atık sulardan geçiş yapan bakteriler, direnç genleri ve antibiyotik kalıntıları, su ortamlarında direncin artmasına neden olan diğer önemli etkenlerdir. Kalıcı organik kirleticiler ve ağır metaller gibi antibiyotik direnç genleri de su ortamlarında yaygın bulunan kirleticilerdir. Bazı antibiyotiklerin kullanımı sonucu, su çevrelerinde seçilim baskısı altında antibiyotik dirençli bakteriler ve direnç genleri ortaya çıkabilmekte; zamanla baskı ortadan kalksa dahi bu genler kirletilmiş alanlardan kolay uzaklaştırılamamaktadır. Bu durum, antibiyotik kalıntısı olmayan çevrelerde neden antibiyotik direncine rastlandığını açıklamaktadır (Zhang ve diğ., 2009). Yapılan bir araştırmada; su kültürünün yapıldığı gller, difüze olmuş evsel atık sular ve tarım alanlarından boşaltılan atık suların direnç gen havuzlarını etkilediği belirtilmiş; insanlarda ve veterinerlik alanında ve tarım faaliyetlerinde kullanımı sonucu metabolize edilmiş antibiyotik ajanların, yüzey sularına çoğunlukla atık sular veya tarımsal alanlardan boşaltımı yapılan sulardan geçiş yaptığını söylenmiştir (Henriques ve diğ., 2006b; Yang ve diğ., 2018).

Beta-laktam antibiyotiklere direnç gösteren *Enterobacteriaceae* ailesi yeleri, çoğu zaman insanlarda enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkmaktadır. Sabir ve diğ. (2014) tarafından yapılan bir araştırmada, üriner sistem enfeksiyonu geçirmekte olan hastaların idrar örneklerinden izole edilen 321 *E. coli* suşunda Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik direnç profili araştırılmış ve suşların tamamının penisilin ve amoksisiline, %89.7'sinin sefotaksime, %73.8'inin seftazidime, %44.8'inin aztreonama, %43.3'ünün seftriaksona, %43.3'ünün imipeneme karşı dirençli olduğu rapor edilmiştir. Çalışmada ayrıca, *E. coli* izolatlarının 261'inde (%81) farklı antibiyotik gruplarından üç veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç saptanmıştır.

Bir başka çalışmada, yatan hastalarda üriner sistem enfeksiyonuna neden olan 119 *E. coli* suşu Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile incelenmiş ve %76.5 gibi oldukça yüksek bir oranda çoklu antibiyotik direnci görülmüştür. İzolatların %88.4'nde ampisiline, %74.4'nde

amoksisilin/klavulanik aside, %71.4'ünde ise yatan hastaların kaldığı hastanede üriner sistem enfeksiyonlarında yaygın olarak kullanılan seftriaksona karşı direnç görülmesine dikkat çekilmiştir (Niranjan ve Malini, 2014).

Hindistan'da yapılan bir çalışmada, çeşitli yiyeceklerden izole edilen 150 *E. coli* suşunda, bir veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç oranının %14.7, ampisilin ve amoksisilin antibiyotiklere karşı direncin %13.3, sefotaksime karşı direncin ise %5.3 olduğu belirlenmiştir (Rasheed ve diğ., 2014).

Portekiz'de çeşitli su ortamlarından izole edilen *Enterobacteriaceae* ailesi bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere direncinin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiştir. Suşların %53.5'inin sefoksitine, %43.5'inin amoksisilin/klavulanik aside, %22.7'sinin sefotaksime, %21.3'ünün aztreonama, %19.2'sinin sefpiroma ve %16.2'sinin seftazidime dirençli olduğu belirlenmiştir. Atık su arıtma tesislerinden izole edilen bakterilerde belirlenen direnç oranlarının işlem görmemiş atık sulardaki bakterilere göre daha yüksek olması dikkate değer bulunmuştur (Amador ve diğ., 2015).

Blaak ve diğ. (2015), 113 farklı yüzey suyu örneğinden 846 *E. coli*, 33 farklı atık su örneğinden 313 *E. coli* bakterisi izole etmiş ve bu bakterilerin %26'sının en az bir antibiyotik, %11'inin ise çoklu antibiyotik direnci gösterdiğini belirtmiştir. Ayrıca, sağlık kuruluşlarının atık sularında görülen sefotaksim direncinin, kentsel atık sular ve yüzey sularına göre çok daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

Süpermarketlerde paketlenmiş ve açık halde bulunan sebzeler ile çiftliklerden izole edilmiş *Enterobacteriaceae* suşlarında antimikrobiyal direncin evrimi üzerine yapılan bir çalışmada, en az üç antimikrobiyal ajana karşı direnç oranının çiftlik sebzelerinde yaklaşık %63, perakende satışı yapılan sebzelerde ise %70 olduğu belirlenmiştir. Çiftlik sebzelerinden izole edilen suşların %18'inin, perakende satışı yapılan sebzelerden izole edilen suşların %41'inin en az on antimikrobiyal ajana karşı direnç gösterdiği saptanmıştır. Elde edilen bu oranların, çoklu dirence sahip patojenlerin özellikle immün yetersizliğin görüldüğü insanlar için ne denli büyük potansiyele sahip bir sağlık sorunu oluşturduğu dile getirilmiştir (Tope ve diğ., 2016).

Çalışmamızda Batı Karadeniz Bölümü, Manyas Gölü ve İznik Gölü yüzey sularından izole edilmiş *Enterobacteriaceae* ailesinden dört farklı türe ait 27 suş kullanılmıştır. *E. coli*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* ve *K. pneumoniae subsp. pneumoniae* olarak tanımlanan suşlarda üç farklı fenotipik yöntem kullanılarak beta-laktam direnç profilleri araştırılmıştır. Kirby-Bauer disk difüzyon testi sonuçlarına göre; *E. coli* suşlarının tamamının (%100) ampisiline, 16'sının (%80) karbenisiline, 14'ünün (%70) sefalotin dirençli olduğu tespit edilmiştir. *K. oxytoca* suşlarının sadece ampisilin, karbenisilin ve amoksisilin/klavulanik aside, *E. cloacae* suşlarının ise sefalotin, sefoksitin ve amoksisilin/klavulanik asit antibiyotiklerine karşı direnç gösterdiği belirlenmiştir. Tüm izolatların 26'sının (%96.29) penisilinlerden, 17'sinin (%62.96) sefalosporinlerden en az birine dirençli olduğu; 2'sinin (%7.4) monobaktama (aztreonam), 10'unun ise (%37.03) beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonuna (amoksisilin/klavulanik asit) karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, incelenen suşların tamamının karbapenem (imipenem) ve moksalaktam antibiotiklere duyarlı veya yarı duyarlı olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda, suşların 17'sinin (%63) birinci kuşak sefalosporine (CF), 3'ünün (%11.1) ikinci kuşak sefalosporine (FOX), 2'sinin (%7.4) dördüncü kuşak sefalosporine (FEP), 3'ünün (%11.1) ise çalışmamıza dahil edilen beş farklı üçüncü kuşak sefalosporinden en az birine dirençli olduğu tespit edilmiştir. Disk difüzyon testinde elde ettiğimiz sonuçlar, sırayla ampisilin, karbenisilin ve sefalotin antibiyotiklerine karşı yüksek oranda direnç olduğunu ortaya koymaktadır.

Enterobacteriaceae'de GSBL türevlerinin en sık rastlandığı tür *K. pneumoniae*'dir (Machado ve diğ., 2008). Ülkemizde; ampisilin dirençli klinik *Enterobacteriaceae* izolatlarında TEM ve SHV kökenli GSBL için moleküler tiplendirmenin yapıldığı bir çalışmada, GSBL üretiminin *E. coli* suşlarında %17, *K. pneumoniae* suşlarında ise %57.1 olduğu; klinik *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* ve *E. cloacae* suşlarında SHV-5 enzimi, klinik *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında ise SHV-12 bulunduğu belirlenmiştir (Taşlı ve Bahar, 2005).

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, çeşme ve kaynak sularından izole edilen 117 *E.coli* suşunun tamamının birden fazla antibiyotiğe karşı dirençli olduğu, kullanılan üç veya daha fazla antibiyotiğe direnç gösteren 49 suşun (%41.8) çoklu direnç fenotipi gösterdiği saptanmıştır. *E. coli* izolatlarında antibiyotik direnç oranının, çeşme ve maden suları arasında önemli bir fark

göstermediği gözlenmiştir (Ozgumus ve diğ., 2007). Yine ülkemizde yapılan bir başka çalışmada, içme sularında *blaTEM* geni taşıyan çoklu antibiyotik direnci gösteren *E. coli* suşları izole edilmiştir (Alpay-Karaoglu ve diğ., 2007).

Sefotaksim hidrolizi yapan beta-laktamazların son yıllarda yaygınlaştığını gösteren bir çalışmada, Çin’de bulunan bir hastaneden izole edilen *Enterobacteriaceae*’de; CTX-M-9, CTX-M-13 ve CTX-M-14 olmak üzere üç farklı CTX-M türevi GSBL saptandığı, CTX’e etkili şekilde direnç gösteren 9 suşun CTX-M ESBL ürettiği, CAZ için yüksek minimum inhibisyon konsantrasyonu değerlerine sahip üç suşun ise SHV-12 ürettiği bildirilmiştir (Chanawong ve diğ., 2002).

Portekiz’de yapılan bir çalışmada, incelenen beş adet hastane atık su örneğinde izole edilen *K. pneumoniae* suşlarının TEM-116 enzimi ürettiği rapor edilmiştir. Beş farklı hastane atık suyundan izole edilen suşlarda; SHV-12 veya TEM-10/SHV-27 ve *E.coli* suşlarında TEM-52 GSBL’ler elde edilmiş, Güney Avrupa’da daha önce çevresel ortamlar ve hastanelerde görülen CTX-M-14 ve CTX-M-32 üreticisi bakteriler, bu çalışmada iki ayrı deniz sahil suyundan izole edilmiştir (Machado ve diğ., 2008).

Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerin çeşitli alanlarda artış gösteren kullanımı, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların ortaya çıkışını beraberinde getirmiştir. Buna bağlı olarak GSBL üreten *Enterobacteriaceae* yayılımı da artmış, bu enzimlerin olası ekspresyonunu geniş bir skalada doğru bir şekilde tespit edebilecek yöntemlere ihtiyaç duyulmuştur (Taşlı ve Bahar, 2005). GSBL’nin ortaya çıkışını takip eden yıllarda, hala kullanılmakta olan ve bu enzimlerin klavulanik asit ile inhibe edilebilmesi özelliğinden yararlanılan; ancak GSBL türevlerinin ayrımı için yeterli olmayan (Pitout ve Laupland, 2008) agar difüzyon yöntemleri geliştirilmiş, farklı GSBL tiplerinin ayırt edilmesinde ise uzun bir süre izoelektrik noktasının (pI) tespiti yöntemi uygulanmıştır. Fakat TEM, SHV ve CTX-M beta-laktamazların çok sayıda farklı türevlerinin ortaya çıkması, bu yöntemin GSBL fenotipi belirlemede bir seçenek olmaktan çıkmasına neden olmuştur (Bradford, 2001; Taşlı ve Bahar, 2005). Bunun yerine son dönemde, farklı beta-laktamaz enzim türevlerini kodlayan *blaTEM*, *blaSHV* ve *blaCTX-M* gibi genler için spesifik primerler ile eşleştirme yoluyla yeni kopyalarının çoğaltılması ve elde edilen amplifikasyon ürünlerinin görüntülenmesi esasına dayanan PZR yöntemi uygulanmaktadır. Varlığı belirlenen gen ampikonlarında DNA dizi analizi yapılmasıyla GSBL

türevleri güvenilir bir şekilde tespit edilebilmektedir (Monstein ve diğ., 2007). Diğer taraftan, gittikçe daha karmaşık hale gelen dirençli izolatlarda plazmid aracılı direnç ile diğer beta-laktam direnç mekanizmalarını birbirinden ayırt etmek için kültür bağımlı ve DNA temelli moleküler yöntemlerin birarada kullanması gerektiği de bir gerçektir (Pérez-Pérez ve Hanson, 2002; Manoharan ve diğ., 2012).

Çalışmamızda, penisilinler ve birinci kuşak sefalosporinlere dirence neden olduğu bilinen ve *Enterobacteriaceae*'de en sık rastlanan penisilinazlar olan TEM ve SHV enzimleri (Bradford, 2001) kodlayan plazmid aracılı genlerin varlığı PZR ile araştırılmıştır. İnceleme sonucu; 27 bakterinin 3'ünün (%11.1) TEM enzimini kodlayan *blaTEM*, 9'unun (%33.3) SHV enzimini kodlayan *blaSHV* genine sahip olduğu saptanmıştır.

Çalışmamızda *blaTEM* geni taşıyan 3 *E. coli* (B89, B91 ve B120) bakterisinin aynı zamanda ampisilin, karbenisilin ve birinci kuşak sefalosporine (sefalotin) çoklu direnci gösterdiği saptanmıştır. Bu sonuç, üç suşta direncin *blaTEM* geni ile kodlandığını doğrulamaktadır. *blaSHV* geni taşıyan 9 suşun (B85, B120, B155, B176, B180, B185, B233, B235 ve M55) 6'sının *E. coli*, 1'sinin *K. pneumoniae* ve 2'sinin *K. oxytoca* olduğu belirlenmiştir. *blaSHV* geni varlığının *Klebsiella* cinsi 4 bakterinin 3'ünde tespit edilmesi, bu genin *Klebsiella spp.*'de sıkça rapor edildiğini bildiren Nordmann (1998) ile Pitout ve Laupland (2008)'in çalışmalarını destekler niteliktedir. *blaSHV* geni taşıdığı belirlenen suşlardan 4'ünde ampisilin ve karbenisilin direnci; 5'inde ampisilin, karbenisilin ve sefalotin çoklu direnç profili görülmesi, uyguladığımız fenotipik ve genotipik test sonuçlarının birbirini destekler nitelikte olduğunu ortaya koymaktadır.

Plazmid aracılı TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerinin fazla miktarda sentezlenmesinin, beta-laktamaz inhibitörü ile kombine edilmiş penisilin direncine de neden olabileceği bilinmektedir (Farsak Orak, 2005). Çalışmamız boyunca *blaTEM* ve *blaSHV* genlerini taşıdığını tespit ettiğimiz 11 suşun 5'inde amoksisilin/klavulanik asit direncinin saptanması, bu durumla ilişkilendirilmiştir. Bu iki geni taşıyan suşların hiçbirinde üçüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonam direncine rastlanmamış olması ise, genlerin GSBL türevi olma ihtimalini azaltmaktadır. Yine de enzim tiplerinin ayırımında kesin bilgi, bu genler için yapılacak dizi analizleri ile sağlanacaktır.

PZR reaksiyonları neticesinde *blaTEM* ve *blaSHV* genlerinin ikisini de taşımadığını saptadığımız diğer 16 bakteri suşundan ikisinin (i3 ve i5) AM ve PY direnci göstermemiş olması, yüksek ihtimalle penisilinaz üreticisi olmadıklarını düşündürmüştür. Buna karşın; 16 bakteriden 5'i sadece ampisilin, 9'u hem ampisilin hem karbenisilin direnci göstermiştir. Bu durum; bu suşlarda penisilinlere direncin plazmid veya kromozomal aracılı kodlanan başka beta-laktamaz enzimler veya beta-laktamaz harici direnç mekanizmaları ile sağlanıyor olabileceğini işaret etmektedir.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, et ürünlerinden izole edilen sefoksitin dirençli 82 *E. coli* suşunun 81'inde beta-laktamaz genleri bildirilmiştir. Sığır etlerinin 7'sinin FOX dirençli *E. coli* izolatları olup hepsinin kombine disk testinde GSBL karakteri gösterdiği, bu 7 suşun birinin *blaCTX-M-3*, birinin *blaCTX-M-15* ve birinin de *blaTEM-1b* ve *blaCMY-2* genlerine sahip olduğu saptanmıştır (Pehlivanlar Önen ve diğ., 2015).

Hırvatistan'da halka açık plajlardan alınan deniz suyu örneklerinden izole edilen 1351 *Enterobacteriaceae* izolatında yüksek oranda (%35) çoklu direnç fenotipi gözlenmiş, izolatların %4.2'sinde GSBL kodlayan genler tespit edilmiştir. GSBL negatif *E. cloacae* suşlarının dahil olduğu sefalosporin dirençli suşlarda CMY ve DHA ailesi AmpC beta-laktamazların üretildiği doğrulanmıştır. Tüm izolatların karbapeneme duyarlı olduğu çalışmada, *blaCTX-M-15* geni varlığı belirlenmiş olup klinik *E. coli* izolatları ile deniz suyu izolatları arasında %89-92 oranında benzerlik görülmüştür (Maravic ve diğ., 2015).

Monstein ve diğ. (2007) tarafından yapılan bir çalışmada, 32 GSBL pozitif izolatta PZR yöntemi ile; 29 suшта (%90.6) *blaCTX-M* geni, 22 suшта (%68.7) *blaTEM* geni, 11 suшта (%34.3) *blaSHV* geni saptanmıştır.

Ülkemizde yapılan bir çalışmada, bir üniversite hastanesinin farklı birimlerinde yatan hastalardan izole edilen *E. coli* türü ve *Klebsiella* cinsi bakterilerde kombine disk ve çift disk sinerji testleri ile GSBL üretimi araştırılmıştır. *E. coli* izolatlarının %72.7'sinde, *K. pneumoniae* izolatlarının %73.3'ünde, *K. oxytoca* izolatlarının %25'inde TEM tipi GSBL'ler bulunduğu, çalışılan 65 suşun 18'inin (%19.2) birden fazla beta-laktamaz geni taşıdığı belirlenmiştir. Bu suşların 9'unun *blaTEM* ve *blaSHV* genlerini; 9'unun *blaTEM* ve *blaCTX-M* genine sahip olduğu, bu genlerin üçünü de içeren bir izolata rastlanmadığı bildirilmiştir (Bali ve diğ., 2010).

Çevresel su örnekleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada; 36 *E. cloacae* suşundan 18'inin seftazidim/klavulanik asit ile yapılan, 1 suşun seftotaksim/klavulanik asit ile yapılan kombine disk testinde pozitif sonuç vermesini takiben PZR yöntemi ile direnç genleri araştırılmıştır. PZR sonucu 8 suшта *blaTEM*, 7 suшта *blaSHV* ve 9 suшта *blaCTX-M* genleri pozitif sonuç vermiş; 3 suшта *blaSHV* ve *blaCTX-M* genleri, 2 suшта ise her üç beta-laktamaz geni birarada saptanmıştır (Gaalova ve diğ., 2014).

Çin'de körfez sularından izole edilen bakteriler üzerine yapılan bir çalışmada ise, varlığı en fazla belirlenen genlerin sırayla *blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA-1*, *blaMOX* ve *blaCMY* olduğu saptanmıştır (Wang ve diğ., 2008).

Çin'de yapılan başka bir çalışmada; nehirde alınan tek bir sediment örneğinden izole edilen 39 *Enterobacteriaceae* suşunda GSBL genleri içinde *blaCTX-M*'in en baskın (45 suş), *blaTEM* geninin ise ikinci en sık görülen (22 suş) gen olduğu belirlenmiştir (Lu ve diğ., 2010).

Beta-laktamaz saptama testlerinin, Gram negatif bakteri izolatlarında GSBL saptaması için kesin duyarlı veya spesifik olduğu söylenemez. Bunun nedeni; GSBL üreten suşlarda eş zamanlı olarak AmpC tipi enzim varlığı ile direncin maskelenmesi veya dış membran porin proteinlerinin eksikliği gibi başka direnç mekanizmaları olabilmektedir (Bradford, 2001).

Oksiimino sefalosporinler ve monobaktamları hidroliz ettiği bilinen GSBL (Philippon ve diğ., 2002) için önerilen fenotipik doğrulama testi standartları CLSI tarafından belirlenmiş olsa da, bu standartlar belirli bakteri türleri için geçerlidir. Ayrıca bu testler, bazı klinik mikrobiyoloji laboratuvarında enfeksiyon kontrolü amaçlı rutin çalışma testleri arasında yer almamaktadır. GSBL doğrulama testi olarak CLSI tarafından önerilen iki aşamalı kombine disk testi en güvenilir fenotipik yöntemdir (Thomson, 2001). Çalışmamızda, CLSI tarafından *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *K. oxytoca* türü bakterilerde GSBL varlığının doğrulanması için önerilen kombine disk yöntemi uygulanmış ve bu türlere ait 24 suştan 3 *E. coli* (%12.5) suşunda GSBL pozitif olduğu, GSBL negatif suşların hepsinin oksiimino sefalosporinler (CAZ, CTX, CRO, FEP) ve monobaktama (ATM) duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Test sonucu GSBL pozitif olduğu belirlenen suşlardan ikisinin CAZ, CTX, CRO ve FEP ile ATM dirençli B237 ve B243 izolatları olması, elde ettiğimiz GSBL pozitif sonucu doğrular niteliktedir. Bununla birlikte

GSBL pozitif sonuç veren diğer suş ise B236 izolatıdır. Bu suşun CTX dirençli ancak CAZ ve ATM için yarı duyarlı, FEP için duyarlı sonuç vermiş olması düşündürücüdür. Her üç GSBL pozitif suşun aynı zamanda sefoperazona dirençli olması, sonraki çalışmalarda bu direncin GSBL varlığı ile bağlantılı olup olmadığının araştırılmasını gerektirecektir.

Varlığı belirlenen TEM ve SHV enzimlerinin GSBL türevi olup olmadığının ayırımını yapabilmek için ileri dizi analizi çalışmalarına ihtiyaç duyulsa da; Pitout ve Laupland (2008) tarafından yapılan çalışmada *blaCTX-M* geni varlığının, direnç fenotipinden GSBL tipi bir CTX-M enziminin sorumlu olduğuna dair yeterli kanıt çoğunlukla sağladığı bildirilmiştir. Buna göre, yaptığımız çalışmada PZR ile *blaCTX-M* gen varlığını yüksek seviyede çoklu antibiyotik direnci gösteren üç *E. coli* izolatında (B236, B237 ve B243) tespit etmiş olmamız, bu suşlarda sefalosporin direnç fenotipinin CTX-M türevi bir GSBL ile sağlandığını ortaya koymaktadır. Aynı zamanda fenotipik GSBL doğrulama testi ile elde ettiğimiz pozitif sonuçların yine aynı üç suşa ait olması, bu düşüncemizi desteklemektedir.

Daha önce yapılan dizi analizi çalışmalarında; *E. cloacae*, *S. marcescens*, *Citrobacter freundii* gibi bakterilerin sahip olduğu doğal kromozomal DNA aracılı indüklenebilir beta-laktamazlardan kökenlendiği belirlenmiş olan (Philippon ve diğ., 2002) plazmid aracılı sınıf C beta-laktamazlar için fenotipik tarama testleri ile ilgili ise henüz bir standart belirlenmemiş olup elde edilen veriler, yapılan az sayıda çalışma ile sınırlıdır. Bu testlerin uygulanması zor olup sonuçlarının yorumlanması klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin kullanım için yeterince basit değildir ve aynı anda GSBL veya metallo-beta-laktamaz da üreten suşlarda yanıltıcı olabilmektedir (Yagi ve diğ., 2005; Pérez-Pérez ve Hanson, 2002). Üstelik bu testler, direnç kromozomal DNA üzerinde taşınan genler ve plazmid aracılı genlerden hangisi veya hangilerinin neden olduğunu ayırt etmeye imkan tanımamaktadır.

Filogenetik analizlerle de desteklenmiş sonuçlara göre; bugüne kadar yapılan dizi analizleri, CIT grubu CMY ve LAT kodlayan genlerin şimdiki dizilimlerinin *C. freundii* kromozomal *blaAmpC* geninde sonradan oluşan mutasyonların birikimiyle oluştuğunu ortaya koymuştur (Philippon ve diğ. 2002).

Birden fazla plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz ekspresyonu klinik izolatlarda bile nadiren bildirilmektedir. Çünkü transfer edilebilir sınıf C beta-laktamazları tam olarak tespit edebilecek

güncel fenotipik testler çoklu AmpC enzimi ayrıştırmasını sağlamamaktadır. Duyarlılık testleri arasında otomatize sistemler mevcut olsa da, plazmid aracılı AmpC beta-laktamazları tek başına veya GSBL ile kombine halde eksprese eden bakterilerde kesin sonuç almak için yetersizdir (Pérez-Pérez ve Hanson, 2002).

AmpC inhibitörü olduğu uzun süredir bilinen (Jacoby, 2009) boronik asitler kullanılarak yapılan AmpC doğrulama için modifiye edilmiş kombine disk testi daha önce farklı araştırmacılar tarafından uygulanmış olup olumlu sonuçlar alınmıştır. Yüksek seviyede çoklu antibiyotik direnci gözlenen deri ve yumuşak doku enfeksiyonu, idrar yolları enfeksiyonu ve kan kültürlerinden izole edilmiş klinik *Enterobacteriaceae* suşlarında bu test ile AmpC beta-laktamazların güvenilir bir şekilde belirlendiği bildirilmiştir (Manoharan ve diğ., 2012). Yagi ve diğ. (2005), 300 mikrogram 3-aminofenil boronik asit kullanıldığında seftazidim veya sefotaksim diskinin etrafındaki inhibisyon zon çapında 5 mm'lik artışın tüm AmpC türevlerini güvenilir bir şekilde tespit ettiğini gözlemlemiş, bu test farklı suşlarla da doğrulanmıştır. Farklı boronik asit türevlerinin seftazidim antibiyotik diski ile kombine edilerek kullanıldığı çalışmada; 3-aminofenil boronik asit, 2-tiyofen boronik asit ve 3-nitrofenil boronik asit arasından en güvenilir sonucun 3-aminofenil boronik asit ile sağlandığı bildirilmiştir.

Ülkemizde yapılan benzer bir çalışmada Coşkun ve Altanlar (2012); toplam 50 sefoksitin dirençli suşta, AmpC enzimlerinin klavulanik asit ile düşük, boronik asit ile yüksek oranda inhibe olma özelliğinden faydalanarak uyguladıkları boronik asit-klavulanik asit testinde, suşların 25'inin pozitif sonuç verdiğini, bu suşların 22'sinin AmpC genlerine sahip olduğunu saptamış olması, testin yüksek duyarlılık gösterdiğini ortaya koymaktadır.

Fenotipik AmpC doğrulama testinin uygulandığı benzer bir çalışmada, GSBL ürettiği genotipik olarak belirlenmiş olan 162 *Enterobacteriaceae* suşunda yapılan boronik asit-klavulanik asit testlerinde, suşların 25'inin aynı zamanda AmpC üreticisi olduğu başarıyla saptanmıştır. Diğer yandan GSBL negatif olduğu genotipik olarak belirlenmiş 139 suşun 20'sinde AmpC üretimi bu yöntem ile tespit edilebilmiştir (Paulou ve diğ., 2014).

Çalışmamızda, AmpC doğrulama için uyguladığımız modifiye edilmiş kombine disk testi ile, sefamisinler olarak bilinen 7-alfa-metoksi sefalosporinleri hidroliz eden bu enzimlerin (Philippon ve diğ., 2002) varlığı araştırılmış, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporin

antibiyotik ajanlardan en az birine direnç gösterdiği saptanan 6 suşun 4'ünde (B243, İ3, İ5, İ8), direncin boronik asit ile inhibe edildiği gözlenmiş; bu 4 suşun sınıf C beta-laktamaz üretiyor olabileceği sonucuna varılmıştır.

E. cloacae türü bakteriler, kromozomal aracılı indüklenebilir sınıf C beta-laktamazlara sahiptir (Pitout ve Laupland, 2008). Daha önce yapılan çalışmalarda, bu enzimin *E. cloacae*'de geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı doğal dirence neden olduğu, aynı zamanda imipenem duyarlılığını da azalttığı bilinmektedir (Peter-Getzlaff ve diğ., 2011).

İznik Gölü sularından izole ederek API 20E sistemi ile *E. cloacae* olarak identifiye edilen 3 suşta (İ3, İ5, İ8) semi-nested PZR yöntemi ile indüklenebilir kromozomal aracılı *blaAmpC* geni varlığı ortaya konulmuştur. Fenotipik AmpC doğrulama testinde boronik asidin etkisini gözlemlediğimiz bu izolatlarda FOX direnci ile birlikte görülen düşük imipenem duyarlılığının, kromozomal *blaAmpC* geninin yüksek seviyede ekspresyonundan kaynaklandığını düşündürmüştür. Bunun yanında görülen düşük imipenem duyarlılığı da yüksek seviyede *blaAmpC* geni ekspresyonunun bu ajanlar aracılığıyla güçlü şekilde uyarıldığını göstermiştir. Ayrıca, sınıf C beta-laktamazların klavulanik asit ile inhibe olmama özelliğinin (Black ve diğ., 2005), çalışmamızda *E. cloacae* suşlarında görülen AMC direncini açıkladığını da düşünmekteyiz. *E. cloacae*'de üretilen AmpC tip enzimler bazen GSBL varlığını maskeleyerek yanlış negatif değerlendirmelere sebep olabilmektedir (Pitout ve Laupland, 2008). Çalışmamızda ise *E. cloacae* izolatlarında GSBL varlığı ile uyumluluk sağlayacak direnç fenotipi gözlenmemiş olup PZR ile *blaTEM*, *blaSHV* ve *blaCTX-M* genlerinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Sınıf C beta-laktamazların varlığı, çalışmamızda tüm bakteri suşlarında üç farklı plazmid aracılı gen grubu (CIT, MOX, FOX) için araştırılmış olup 3 *E. cloacae* suşu ile birlikte diğer suşların 22'sinde bu gen grupları için amplifikasyon sağlanmamıştır. Fenotipik AmpC doğrulama testinde pozitif sonuç elde ettiğimiz *E. coli* suşunda (B243) CIT gen grubunun pozitif sonuç vermiş olması, AmpC doğrulama testinin duyarlılığını bir kez daha ortaya koymaktadır. Bazı çalışmalar; plazmid aracılı AmpC varlığı saptanan bakterilerde, fenotipik duyarlılık testlerinin GSBL saptamada başarısızlıkla sonuçlandığını ve bunun yol açtığı yüksek mortalite oranlarını vurgulamaktadır (Pai ve diğ., 2004). Yaptığımız çalışmada sefalosporin ajanların tamamına

duyarlı olduğunu belirlediğimiz bir *E. coli* suşunda (B185) CIT gen grubu varlığını tespit etmiş olmamız oldukça dikkat çekici bir sonuçtur.

Penisilinler ve yeni kuşak sefalosporinlere karşı bakterilerin yeni beta-laktamaz enzimleri geliştirmesinin ardından karbapenem kullanımının artış göstermesi, karbapenemaz enzimlerini üreten bakterilerin ortaya çıkışını tetiklemiştir.

Uygulamış olduğumuz disk difüzyon testlerinde hiçbir suşta karbapenem (imipenem) direnci gözlenmemiştir. Yapılan bir araştırma; *blaIMP* geni ekspresyonunun, karbapeneme düşük seviyede direnç gösteren suşlarda gizli veya baskılanmış olabileceğini; bu nedenle *blaIMP* pozitif suşların geniş spektrumlu sefalosporinlerin neredeyse hepsine yüksek seviyede direnç gösterdiğini; fakat karbapenem direnç seviyelerinin düşük olduğunu bildirmiştir (Senda ve diğ., 1996). Yine başka bir araştırmaya göre, düşük karbapenem duyarlılığı veya iki ya da daha fazla üçüncü kuşak sefalosporine karşı direnç, karbapenemaz varlığının araştırılmasını gerektirmektedir (Öcal, 2012). Ancak çalışmamızda bu şartları sağlayan suşlar (B54, B58, B65, B236, B237, B243, İ3, İ5, İ8) da dahil olmak üzere PZR reaksiyonlarında *blaIMP* geni taşıyan herhangi bir suşa rastlanmamıştır. Üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli bakterilerde direncin GSBL ile sağlandığını; *E. cloacae* türü bakterilerde ise düşük imipenem duyarlılığının kromozomal aracılı *blaAmpC* ekspresyonu ile ilişkili olduğunu düşündüğümüzden, *blaIMP* genine rastlanmaması şaşırtıcı olmamıştır. Ayrıca *Enterobacteriaceae*'de en yaygın karbapenem direnç mekanizması, dış membran permeabilitesinin düşürülmesidir (Nordmann,1998). Buna bağlı olarak, çalışmamızda düşük imipenem duyarlılığı gözlenen diğer üç izolatta farklı gen bölgeleri veya direnç mekanizmalarının araştırılması gerekecektir.

Karbapenemler, GSBL üreten *Enterobacteriaceae*'nin neden olduğu ciddi enfeksiyonların tedavisinde ilk tercih edilen ajanlardır (Öcal, 2012). *Enterobacteriaceae*'de karbapenem direnci ise nadiren görülmektedir; çünkü dirençli izolatların dağılımının artışı, son dönemde CTX-M veya sınıf C beta-laktamazlar ile impermeabilite kaynaklı direncin birarada bulunması ile daha çok ilişkilidir (Livermore ve Woodford, 2006). Bakteri izolatlarında plazmid aracılı GSBL ve AmpC varlığının gelecek yıllarda tedavi süreçlerinde karbapenemlere daha sık başvurulmasına neden olacağı varsayımı göz önünde bulundurulduğunda, karbapenemazların tespit edilememiş olması, mutasyonlar sonucu karbapenem direncinin gelecek yıllarda artış göstermeyeceğini garanti etmemektedir.

Beta-laktamaz enzimleriyle sağlanan direncin saptanmasında uygulanan genotipik yöntemlerden biri olan PZR reaksiyonlarında elde edilen sonuçlar, fenotipik testler ile elde ettiğimiz direnç profilleri ile genel olarak uyumluluk göstermiştir. Buna rağmen, plazmid aracılı mutant gen türevlerinin çok daha fazla sayıda olduğu düşünüldüğünde, çalışmamızın araştırdığımız gen bölgeleri ve çevresel izolat sayısının sınırlı olmasından kaynaklanabilecek eksik ve yanıltıcı veriler sağlayabileceği de unutulmamalıdır.

Çalışmamızda, Batı Karadeniz su örneklerinden izole edilen üç farklı suşta birden fazla plazmid aracılı gen tespiti yapılmıştır. Buna göre; bir *E. coli* suşunda (B120) aynı anda *blaTEM* ve *blaSHV* genleri tespit edilmiştir. Yine başka bir *E. coli* izolatının (B243) fenotipik doğrulama testlerinde hem GSBL hem AmpC pozitif olması; aynı zamanda bu enzimleri eksprese eden plazmid aracılı genlerin (*blaCTX-M* ve CIT hedef bölgesi) PZR ile amplifiye olması, suşun her iki tip enzime sahip olduğunu fenotipik ve genotipik yollarla kanıtlamıştır. İki farklı plazmid aracılı enzim (*blaSHV* ve CIT hedef bölgesi) ürettiğini tespit ettiğimiz diğer bir *E. coli* suşunun (B185), PZR reaksiyonlarında hem *blaSHV* hem CIT hedef bölgesi için pozitif sonuç vermesi, direnç fenotipi ile çelişmiştir. Bu veriler, bakteri suşlarında beta-laktamazların neden olduğu direncin yalnız klinik ortamlarda değil, doğal su ortamlarında da hızla evrildiğini kanıtlamaktadır. Plazmid aracılı genler ile kodlanan GSBL ve AmpC, bakterilerde tür içi ve/veya türler arası yayılım potansiyeli yüksek; bu sebeple direncin kontrol altında tutulmasını zorlaştıran enzimlerdir (Manoharan ve diğ., 2012). Gerek klinik mikrobiyoloji laboratuvarları, gerekse mikrobiyolojik araştırma laboratuvarları tarafından dikkate alınması gereken bu direnç faktörleri, dünya çapında gerekli önlemler alınmadığı takdirde, yakın gelecekte toplum sağlığı açısından daha büyük sorunlarla karşılaşmamıza neden olacaktır.

Hem insanlar hem de çevre konusunda uygun risk değerlendirmesi ve yönetimi için çevresel ortamlarda antibiyotiklerin ortaya çıkışı, geleceği ve etkileri hakkında temel bilgiler hala eksiktir (Kümmerer, 2003). Antibiyotik dirençli bakteriler ve direnç genlerinin toprak ve yeraltı suları aracılığıyla yüzey sularına ve hatta içme sularına geçişinin mümkün olabileceği dikkate alınarak arıtılmış atık su veya kanalizasyon sularının sulama ve tarımsal faaliyetlerde kullanımının uygun olup olmadığının etraflıca tartışılması gerekmektedir (Alpay-Karaoglu ve diğ., 2007; Zhang ve diğ., 2009).

Santos ve Ramos (2018), yaptıkları çalışmada son 20 yıldır yeni antibiyotiklerin keşfi, geliştirilmesi, üretimi ve pazarlanması süreçlerinin oldukça yavaşlamış olduğunu, başarı oranının düştüğünü ve antimikrobiyal moleküllerin yalnızca 16'da birinin klinik uygulamalarda kullanılabildiğinin altını çizmiştir. Tüm alanlarda antibiyotiklerin tedbirli kullanımı, çevresel dirençle başarılı bir şekilde başa çıkmanın temel şartıdır. Bu yüzden; insanlarda tedavi amaçlı, kümes hayvanları yetiştiriciliği ve su kültürleri gibi alanlarda antibiyotiklerin yerinde kullanımı çevre ve toplum için oluşacak riskleri önemli ölçüde azaltacaktır. Bu tedbir, kullanılan antibiyotiklerin yayılımının kontrolünü sağlamakla kalmayıp aynı zamanda yarı-tedavi edici konsantrasyonlarının düşürülmesi yoluyla seçim baskısını dengelemeyi sağlayacaktır (Kümmerer, 2004).

Dirençli bakteriler ve direnç mekanizmaları hakkında araştırmaların, maruz kaldıkları antimikrobiyal ajanlar açısından indikatör niteliği taşıyor olmaları göz önüne alındığında, dirençle karşı geliştirilecek olan mücadele yöntemlerinin doğru yöne kanalize olunarak belirlenmesine katkı sağlayacağı tartışılmaz bir gerçektir.

Çalışmamız boyunca elde ettiğimiz bulgular; yatay gen transferi ile direnç aktarımı sonucu plazmid aracılı beta-laktamaz üretiminin su ortamlarından izole edilen bakterilerde aktif şekilde devam ettiğini göstermektedir. Çalışmamızda; beta-laktamazların tespitinde direncin güvenilir olarak saptanması için direnç fenotipini belirleyecek uygun yöntemlerin seçilmesi ile birlikte bu direncin altyapısını oluşturan genetik faktörlerin moleküler yöntemlerle araştırılmasının gerekliliği bir kez daha ortaya konulmuştur. Çalışmamız, her iki yöntemin karşılaştırmalı analizlerinin yapılarak doğru sonuca ulaşıldığı benzer çalışmalara ışık tutacaktır. Bu çalışmalar, gelecekte çevresel izolatlar ile gen alışverişi yapabilen tehlikeli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlar ile ilgili farkındalığı artırarak tedavi süreçlerinin daha doğru şekilde planlanmasına olanak sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Alpay-Karaoglu, S., Ozgumus, O.B., Sevim, E., Kolaylı, F., Sevim, A., Yesilgil, P., 2007, Investigation of antibiotic resistance profile and TEM-type β -lactamase gene carriage of ampicillin-resistant *Escherichia coli* strains isolated from drinking water, *Annals of microbiology*, 57 (2), 281-288.
- Amador, P.P., Fernandes, R.M., Prudencio, M.C., Barreto, M.P., Duarte, I.M., 2015, Antibiotic resistance in wastewater: Occurance and fate of *Enterobacteriaceae* producers of class A and class C β -lactamases, *Journal of environmental science and health*, 50, 26-39.
- Arslan Aydoğdu, E.Ö., Şanlı, N.Ö., Akçaalan Albay, R., Köker, L., Agay, Z., Albay, M., Kimiran, A., Investigation of bacteriological pollution in Manyas Lake (Turkey), *International conference on civil and environmental engineering (ICOCEE-Cappadocia)*, 8-10 Mayıs 2017 Nevşehir, Türkiye.
- Aygül, A., 2015, Antibiyotik direncinde dışa atım sistemlerinin ve dirençle mücadelede dışa atım pompa inhibitörlerinin önemi, *Mikrobiyoloji bülteni*, 49 (2), 278-291.
- Bali, E.B., Acık, L., Sultan, N., 2010, Phenotypic and molecular characterization of SHV, TEM, CTX-M and extended-spectrum β -lactamase produced by *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella* isolates in a Turkish hospital, *African Journal of microbiology*, 4 (8), 650-654.
- Baquero, F., Martinez, J.-L., Canton, R., 2008, Antibiotics and antibiotic resistance in water environments, *Current opinion in biotechnology*, 19, 260-265.
- Baron, S., 1996, *Medical microbiology*, Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, Department of microbiology, ISBN-10: 0-9631172-1-1.
- Blaak, H., Lynch, G., Italiaander, R., Hamidjaja, R.A., Schets, F.M., Husman, A.M.R., 2015, Multidrug-resistant and extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch surface water and wastewater, *Public library of science*, 10 (6), 1-16.
- Black, J.A., Moland, E.S., Thomson, K.S., 2005, AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC β -lactamases, *Journal of clinical microbiology*, 43 (7), 3110-3113.
- Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V., 2014, Molecular mechanisms of antibiotic resistance, *Nature reviews microbiology*, doi:10.1038/nrmicro3380.
- Bradford, P.A., 2001, Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat, *Clinical microbiology reviews*, 14 (4), 933-951.

- Brunton, L., Chabner, B.A., Knollmann, B., 2010, *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 12nd ed., McGraw-Hill Medical Books, United States, ISBN: 9780071769396.
- Bush, K., Freudenberg, J.S., Syskes, R. B., 1982, Interaction of azthreonam and related monobactams with beta-lactamases from gram-negative bacteria, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 22 (3), 414-420.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., 1995, A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39, 1211-1233.
- Caniça, M.M.M., Lu, C.Y., Krishnamoorthy, R., Paul, G.C., 1997, Molecular diversity and evolution of *bla_{TEM}* genes encoding β -lactamases resistant to clavulanic acid in clinical *E. coli*, *Journal of molecular evolution*, 44, 57-65.
- Chanawong, A., M'Zali, F.H., Heritage, J., Xiong, J.H., Hawkey, P.M., 2002, Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the People's Republic of China, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (3), 630-637.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, Performance standards for antimicrobial susceptibility tests; approved standard-eleventh edition M02- A11, Wayne, PA.
- Clinical and laboratory standards institute, 2016, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-sixth informational supplement, CLSI document M100-S26, Wayne, PA.
- Conceição, T., Faria, N., Lito, L., Cristino, J.M., Salgado, M.J., Duarte, A., 2004, Diversity of chromosomal AmpC β -lactamases from *Enterobacter cloacae* isolates in a Portuguese hospital, *Federation of european microbiological societies*, 230, 197-202.
- Coşkun, S. ve Altanlar, N., 2012, Sefoksitine dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz tespiti. *Mikrobiyoloji bülteni*, 46 (3), 375-385.
- Demir, N., 2006, Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üretimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin araştırılması, Uzmanlık tezi, Dr. Lütfi Kırdar Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Enfeksiyon Hastalıkları Klinik Mikrobiyoloji Kliniği.
- Demirdağ, K., Yüce, P., Özden, M., Kalkan, A., 2013, Investigation of the susceptibility of extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* strains to combinations of carbapenems and beta-lactamase inhibitors, *Nobel medicus*, 9 (1), 89-94.
- Dhanasekaran, D. and Jiang, Y., 2016, *Actinobacteria: basics and biotechnological applications*, Books on Demand, Rijeka, Croatia, ISBN: 9789535122487.

- Farsak Orak, F., 2005, Hastane enfeksiyonuna neden olan gram-negatif bakterilerde direnç paterni ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz tayini, Uzmanlık tezi, C.U.
- Gaalova, B., Donauerova, A., Seman, M., Bujdakova, H., 2014, Identification and β -lactam resistance in aquatic isolates of *Enterobacter cloacae* and their status in microbiota of Dominica Cave in Slovak Karst (Slovakia), *International journal of speleology*, 43 (1), 69-77.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., Pavilonis, A., 2011, Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria, *Medicina (Kaunas)*, 47 (3), 137-146.
- Girlich, D., Poirel, L., Nordmann, P., 2012, Value of the modified hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*, *Journal of clinical microbiology*, 50 (2), 477-479.
- Henriques, I.S., Fonseca, F., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A., 2006a, Occurrence and diversity of integrons and β -lactamase genes among ampicillin-resistant isolates from estuarine waters, *Research in microbiology*, 157, 938-947.
- Henriques, I.S., Moura, A., Alves, A., Saavedra, M.J., Correia, A., 2006b, Analysing diversity among β -lactamase encoding genes in aquatic environments. *Federation of european microbiological societies microbiology ecology*, 56, 418-429.
- Jacoby, G.A., 2009, AmpC β -lactamases, *Clinical microbiology reviews*, 22 (1), 161-182.
- Karafistan, A., Arık-Çolakoğlu, F., 2005, Physical, chemical and microbiological water quality of the Manyas Lake, Turkey, *Mitigation and adaptation strategies for global change*, 10, 127-143.
- Kimiran Erdem, A., Arslan Aydogdu, E.O., Gulener, M., Zorbozan, H., Balci, M., Yesilova, K., Anda, M., Balkis, N., 2017, The determination of bacteriological quality of Kilyos-Igneada coast and sea water, *Fresenius environmental bulletin*, 26 (1), 533-544.
- Kohanski, M.A., Dwyer, D.J., Collins, J.J., 2010, How antibiotics kill bacteria: from targets to networks, *Nature reviews microbiology*, 8 (6), 423-435.
- Koldaş, K., Mumcuoğlu, İ., Karahan, Z.C., Alaca Coşkun, F., Kuşun, Ş., Aksu, N., 2011, *Enterobacteriaceae* suşlarında plazmid kökenli AmpC beta-laktamaz varlığının multiplex PZR ve fenotipik yöntemlerle araştırılması, *Türk mikrobiyoloji cemiyeti dergisi*, 41 (2), 65-72.
- Kümmerer, K., 2003, Significance of antibiotics in the environment, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52, 5-7.
- Kümmerer, K., 2004, Resistance in the environment, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 54, 311-320.
- Livermore, D. M. and Woodford, N., 2006, The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*, *Trends in microbiology*, 14 (9), 413-420.

- Lu, S.Y., Zhang, Y.L., Geng, S.N., Li, T.Y., Ye, Z.M., Zhang, D.S., Zou, F., Zhou, H.W., 2010, High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat, *Applied and environmental microbiology*, 76 (17), 5972-5976.
- Machado, E., Coque, T.M., Canton, R., Sousa, J.C., Silva, D., Ramos, M., Rocha, J., Ferreira, H., Peixe, L., 2008, Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 616-618.
- Manoharan, A., Sugumar, M., Kumar, A., Jose, H., Mathai, D. & ICMR-ESBL study group, 2012, Phenotypic & molecular characterization of AmpC β -lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* & *Enterobacter spp.* from five Indian Medical Centers, *Indian journal of medical research*, 135, 359-364.
- Maravic, A., Skocibusic, M., Cvjetan, S., Samanic, I., Fredotovic, Z. Puizina, J., 2015, Prevalence and diversity of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* from marine beach waters, *Marine pollution bulletin*, 90, 60-67.
- Matyar, F., Kaya, A., Dinçer, S., 2008, Antibacterial agents and heavy metal resistance in gram-negative bacteria isolated from seawater, shrimp and sediment in Iskenderun Bay, Turkey, *Science of the total environment*, 407, 279-285.
- Monstein, H.-J., Östholm-Balkhed, A., Nilsson, M.V., Nilsson, M., Dornbusch, K., Nilsson, L.E., 2007, Multiplex pcr amplification assay for the detection of *bla_{shv}*, *bla_{TEM}* and *bla_{CTX-M}* genes in *Enterobacteriaceae*, *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, 115, 1400-1408.
- Nelson, E.C and Elisha, B.G., 1999, Molecular basis of AmpC hyperproduction in clinical isolates of *Escherichia coli*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43 (4), 957-959.
- Niranjan, V. and Malini, A., 2014, Antimicrobial resistance pattern in *Escherichia coli* causing urinary tract infection among inpatients, *Indian journal of medical resistance*, 139, 945-948.
- Niu, H., Cai, Y., Shi, Y., Wei, F., Liu, J., Mou, S., Jiang, G., 2007, Evaluation of carbon nanotubes as a solid-phase extraction adsorbent for the extraction of cephalosporins antibiotics, sulfonamides and phenolic compounds from aqueous solution, *Analitica chimica acta*, 594, 81-92.
- Nordmann, P., 1998, Trends in β -lactam resistance among *Enterobacteriaceae*, *Clinical infectious diseases*, 27 (Suppl 1), 100-106.
- Öcal D., 2012, Gram negatif bakterilerde antibakteriyal direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi. *Antibiyotik ve kemoterapi*, 26(3), 154-164.
- Öğüt, M.T., 2001, *Escherichia coli* suşlarında çeşitli virulans faktörlerinin araştırılması Yüksek lisans tezi, İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü.

- Ozgumus, O.B., Celik-Sevim, E., Alpay-Karaoglu, S., Sandalli, C., Sevim, A., 2007, Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey, *The journal of microbiology*, 45 (5), 379-387.
- Pai, H., Kang, C.I., Byeon, J.H., Lee, K.D., Park, W.B., Kim, H.B., Kim, E.C., Oh, M.D., Choe, K.W., 2004, Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48 (10), 3720-3728.
- Papp-Wallace, K., Endimiani, A., Taracila, M.A., Bonomo, R.A., 2011, Carbapenems: past, present, and future, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55 (11), 4943-4960.
- Paterson, D.L. and Bonomo, R.A., 2005, Extended-spectrum β -lactamases: a Clinical Update, *Clinical microbiology reviews*, 18 (4), 657-686.
- Pehlivanlar Önen, S., Aslantaş, Ö., Yılmaz, E.Ş., Kürekci C., 2015, Prevalence of β -lactamase producing *Escherichia coli* from retail meat in Turkey, *Journal of food science*, 80 (9), 2023-2029.
- Pérez-Pérez, F.J. and Hanson, N.D., 2002, Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR, *Journal of clinical microbiology*, 40 (6), 2153-2162.
- Peter-Getzlaff, S., Polsfuss, S., Poledica, M., Hombach, M., Giger, J., Böttger, E.C., Zbinden, R., Bloemberg, G.V., 2011, Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*: Comparison of three phenotypic confirmation assays and genetic analysis, *Journal of clinical microbiology*, 49 (8), 2924–2932.
- Philippon, A., Arlet, G., Jacoby, G A., 2002, Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46 (1), 1-11.
- Pitout, J.D.D. and Laupland, K.B., 2008, Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern, *Lancet infectious diseases*, 8, 159-166.
- Pitout, J.D.D., Le, P.G., Moore, K.L., Church, D.L., Gregson, D.B., 2010, Detection of AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Salmonella spp.* and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory, *Clinical microbiology and infection*, 16 (2), 165–170.
- Potron, A., Nordmann, P., Lafeuille, E., Maskari, Z.A., Rashdi, F.A., Poirel, L., 2011, Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D β -Lactamase from *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55 (10), 4896-4899.
- Poulou, A., Grivakou, E., Vrioni, G., Koumaki, V., Pittaras, T., Pournaras, S., Tsakris, A., 2014, Modified CLSI extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among *Enterobacteriaceae* producing various β -Lactamases. *Journal of clinical microbiology*, p. 1483-1489.

- Prado, T., Pereira, W.C., Silva, D.M., Seki L.M., Carvalho A.P.D'A., Asensi, M.D., 2008, Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant, *Letters in applied microbiology*, 46, 136-141.
- Rasheed, J. K., Anderson, G. J., Yiğit, H., Queenan, A. M., Nech-Sanchez, A. D., Swenson, J. M., Biddle, J. W., Ferraro, M. J., Jacoby, G. A., Tenover, F. C., 2000, Characterization of the extended-spectrum β -lactamase reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which produces the novel enzyme SHV-18, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44 (9), 2382–2388.
- Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., Jamil, K., 2014, Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources, *Journal of the São Paulo institute of tropical medicine*, 56 (4), 341-346.
- Rupp, M.E. and Fey, P.D., 2003, Extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*, *Drugs*, 63 (4), 353-365.
- Sabir, S., Anjum, A.A., Ijaz, T., Ali, M.A., Khan, M.R., Muhammad Nawaz, M. (2014): Isolation and antibiotic susceptibility of *E. coli* from urinary tract infections in a tertiary care hospital, *Pakistan journal of medical sciences*, 30(2), 389-392.
- Santos, L., and Ramos, F., 2018, Antimicrobial resistance in aquaculture: Current knowledge and alternatives to tackle the problem, *International journal of antimicrobial agents*, 52, 135-143.
- Schwartz, T., Kohnen, W., Jansen, B., Obst, U., 2003, Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms, *Federation of european microbiological societies*, 43, 325-335.
- Senda, K., Arakawa, Y., Ichiyama, S., Nakashima, K., Ito, H., Ohsuka, S., Shimokata, K., Kato, N., Ohta, M., 1996, Pcr detection of metallo- β -lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum β -lactams, *Journal of clinical microbiology*, 34 (12), 2909-2913.
- Smith, C.L. and Powell, K.R., 2000, Review of the sulfonamides and trimethoprim, *Pediatrics in review*, 21 (11), 368-371.
- Taşlı, H. ve Bahar, İ.H., 2005, Molecular characterization of TEM-and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey, *Japanese journal of infectious diseases*, 58, 162-167.
- Thomson, K.S., 2001, Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases, *Emerging infectious diseases*, 7 (2), 333-336.
- Tope, A.M., Hitter, A.C., Patel, S.V., 2016, Evaluation of antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* and coliforms isolated on farm, packaged and loose vegetables in Kentucky, *Journal of food: microbiology, safety&hygiene*, 1 (2), 1-7.

- Van Bambeke, F., 2004, Glycopeptides in clinical development: pharmacological profile and clinical perspectives, *Current opinion in pharmacology*, 4 (5), 471-478.
- Wang, C., Dang, H., Ding, Y., 2008, Incidence of diverse integrons and β -lactamase genes in environmental *Enterobacteriaceae* isolates from Jiaozhou Bay, China, *World journal of microbiology and biotechnology*, 24, 2889–2896.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Joy, M.M., Bhole, B.D., 2001, How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?, *Arch microbiology journal*, 176, 386-390.
- World Health Organization, 2018, WHO report on surveillance of antibiotic consumption: 2016-2018 early implementation, Geneva, Switzerland, ISBN: 978-92-4-151488-0.
- World Organisation for Animal Health, 2018, OIE Annual report of antimicrobial agents intended for use in animals, Paris, France.
- Yagi, T., Wachino, J., Kurokawa, H., Suzuki, S., Yamane, K., Doi, Y., Shibata, N., Kato, H., Shibayama, K., Arakawa, Y., 2005, Practical methods using boronic acid compounds for identification of class C-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, *Journal of clinical microbiology*, 43 (6), 2551-2558.
- Yang, Y., Song, W., Lin, H., Wang, W., Du, L., Xing, W., 2018, Antibiotics and antibiotic resistance genes in global lakes: A review and meta-analysis, *Environment international*, 116, 60-73.
- Zhang, X.X., Zhang T., Fang H.H.P., 2009, Antibiotic resistance genes in water environment, *Applied microbiology and biotechnology*, 82, 397–414.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Hazal ZORBOZAN
Doğum Yeri	İSTANBUL
Doğum Tarihi	17.09.1989
Uyruğu	☒ T.C. ☐ Diğer:
Telefon	0543 819 82 08
E-Posta Adresi	hazal.zorbozan@gmail.com
Web Adresi	



Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	23.06.2011

Yüksek Lisans	
Üniversite	İstanbul Üniversitesi
Enstitü Adı	Fen Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Biyoloji
Programı	Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji

Makale ve Bildiriler
Acıöz, M., Zorbozan, H., Öztürk, T., 2017, Isparta’da üç farklı okulda <i>Enterobius vermicularis</i> ’in dağılımı, <i>KSÜ tıp fakültesi dergisi</i> , 12 (2), 1-3.
Kimiran Erdem, A., Arslan Aydogdu, E.O., Gulener, M., Zorbozan, H., Balci, M., Yesilova, K., Anda, M., Balkis, N., 2017, The determination of bacteriological quality of Kilyos-Igneada coast and sea water, <i>Fresenius environmental bulletin</i> , 26 (1), 533-544.
Zorbozan H., Kimiran A., Detection of beta-lactam antibiotic resistance and beta-lactamase genes in environmental <i>Enterobacteriaceae</i> isolates, 10 th Balkan Congress of Microbiology, 16-18 Kasım 2017, Sofya, BULGARİSTAN.