

T.C.
ADYAMAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GIDA VE KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN
ESCHERICHIA COLI SUŞLARININ DİRENÇ GENLERİNİN PCR
İLE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİRGÜL YELİMLİBAĞ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. MUHSİN AYDIN

ADYAMAN, 2023

Bu tez çalışması BAP Komisyonu tarafından kabul edilen FEFYL/2021-005 no.lu proje kapsamında desteklenmiştir.

ÖZET

GIDA VE KLİNİK ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ DİRENÇ GENLERİNİN PCR İLE KARAKTERİZASYONU

Birgül YELİMLİBAĞ

Biyoloji Anabilim Dalı

Adıyaman Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Ocak 2023

Danışman: Doç. Dr. Muhsin AYDIN

Bakterilerde savunma mekanizmalarından olan antimikrobiyal direnç gelişimi ile oluşan MDR insanoğlunu bu canlılarla mücadelede sürekli yeni antimikrobiyal ajan arayışına itmiştir. Kontamine olmuş gıda veya suların tüketilmesi ile insana açık sistem içinde ulaşan MDR'e sahip suşlardaki direncin tanımlanmasında hız ve hassasiyet oldukça önemlidir. Bu kapsamdaki çalışmada, gıda ve klinik kaynaklı *E. coli* izolatlarında ESBL gen varyantları (*bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{SHV}* ve *bla_{CTX-M}*), integron genleri (*int1*, *int2* ve *int3*) ve sülfonamid (*sul1*, *sul2* ve *sul3*) direnç genlerinin PCR ile moleküler karakterizasyonu hedeflenmiştir. Fenotipik olarak tanımlaması yapılan *E. coli* izolatlarının filogenetik identifikasyonu (6 set primer), moleküler deteksiyonu (1 set primer), direnç ve integron gen karakterizasyonu (10 set primer) için toplamda 17 set primer kullanılmıştır.

Gıda kaynaklı izolatların temini Adıyaman, Gaziantep, Kahramanmaraş ve Hatay illerinde tüketime sunulan 45 farklı kırmızı et örneğinden, klinik izolatların temini Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden İYE şikayetli hasta idrar örneklerinden gerçekleştirilmiştir. Moleküler tanımlama ile *E. coli* olduğu tespit edilen 63 gıda ve 33 klinik izolatta 3 multipleks PCR uygulaması ile 3 gen grubunun taraması yapılmıştır. Gıda örneklerinde taranan 3 gen grubu açısından en yüksek oranlar; %44,44 ile *bla_{SHV}* geninde, %69,84 ile *sul1* geninde ve %73,02 ile *int2* geninde tespit edilirken, klinik örneklerde ise %15,15 oranıyla *bla_{CTX-M}* geni, %81,82 ile *sul2* geni ve %54,55 ile *int1* geni şeklinde sıralanmaktadır. Taranan 3 gen grubu açısından gıda örneklerinden 31 izolatta ve klinik örneklerden 2 izolatta her gen grubundan en az bir gene sahip olmak üzere 3 ve üzerinde genin varlığı tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*; karakterizasyon; PCR; ESBL; çoklu direnç.

ABSTRACT

USING PCR FOR CHARACTERIZATION OF RESISTANCE GENES OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS ISOLATED FROM FOOD AND CLINICAL SAMPLES

Birgöl YELİMLİBAĞ

Department of Biology

Adıyaman University, Graduate Education School, January/2023

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Muhsin AYDIN

MDR, which is formed by the development of antimicrobial resistance, which is one of the defense mechanisms in bacteria, has pushed human beings to constantly seek new antimicrobial agents in the fight against these microorganisms. Speed and precision are very important in identifying resistance in strains with MDR that reach humans in an open system through the consumption of contaminated food or water. The main aim of this study was molecular characterization of ESBL gene variants (*bla_{TEM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{SHV}*, and *bla_{CTX-M}*), integron genes (*int1*, *int2*, and *int3*), and sulfonamide (*sul1*, *sul2*, and *sul3*) resistance genes by PCR from *E. coli* isolates originated from food and clinical samples. A total of 17 sets of primers were used for phylogenetic identification (6 sets of primers), molecular detection (1 set of primer), and resistance and integron gene characterization (10 sets of primers) of phenotypically identified *E. coli* isolates.

The red meat samples (45) were collected from local markets, which are located on four (Adıyaman, Gaziantep, Kahramanmaraş, and Hatay) different provinces, clinical isolates were obtained from urine samples of patients with UTI from Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Training and Research Hospital. Three gene groups were screened with 3 multiplex PCR applications in 63 food and 33 clinical isolates found to be *E. coli* by molecular identification. In terms of the 3 gene groups screened in food samples, the highest rates were found in the *bla_{SHV}* gene with 44.44%, the *sul1* gene with 69.84% and the *int2* gene with 73.02%; in clinical samples, it is listed as *bla_{CTX-M}* gene with 15.15%, *sul2* gene with 81.82% and *int1* gene with 54.55%. In terms of 3 gene groups scanned, the presence of 3 or more genes, including at least one gene from each gene group, was detected in 31 isolates from food samples and 2 isolates from clinical samples.

Keywords: *Escherichia coli*, Characterization, PCR, ESBL, Multidrug Resistance.

TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi, yüksek lisans eğitimim ve tez çalışma sürecimin her aşamasında sabırla bilgi birikimi ve tecrübelerini paylaşarak bana rehberlik eden saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Muhsin AYDIN'a teşekkür ederim.

Eğitim sürecimde bilgi ve tez sürecinde teknik düzeltme destekleri için Prof. Dr. Eyyüp RENCÜZOĞULLARI hocama; eğitim sürecimde ders aldığım Prof. Dr. Yusuf SEVGİLER hocama, uygulama sürecinde cihaz arızalarında destekleri için Doç. Dr. Serdar SÖNMEZ hocam ve yüksek lisans öğrencisi Dilara hanıma teşekkür ederim.

Klinik örneklerin temininde destekleri için Uz. Dr. Fatma HAKİM ve Uz. Dr. M. Cihan EKMEN hocalarıma teşekkür ederim.

Bu çalışma Adıyaman Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından kabul edilen FEFYL/2021-005 no.lu proje kapsamında desteklenmiş olup desteklerinden dolayı Adıyaman Üniversitesi BAP Komisyonuna teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

BAŞLIK SAYFASI	I
JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAY SAYFASI	II
ÖZET	III
ABSTRACT	IV
ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ	V
TEŞEKKÜR	VI
İÇİNDEKİLER.....	VII
ÇİZELGELER DİZİNİ	XI
ŞEKİLLER DİZİNİ	XII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	XIII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	2
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	2
2.1.1. <i>Enterobacteriaceae</i> üyeleri iyi üretim uygulamaları ve iyi hijyen uygulamaları	2
2.1.2. <i>Esherichia coli</i>	3
2.1.3. <i>E. coli</i> genel özellikleri	5
2.1.4. <i>E. coli</i> genomu	6
2.1.5. <i>E. coli</i> patotipleri	7
2.1.5.1. Enteroagregatif <i>E. coli</i> (EAEC)	8
2.1.5.2. Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC)	9
2.1.5.3. Enteroinvaziv <i>E. coli</i> (EIEC)	11
2.1.5.4. Enterotoksikolojik <i>E. coli</i> (ETEC)	12
2.1.5.5. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (ETEC)	13
2.1.5.6. Yapışık invaziv <i>E. coli</i> (AIEC)	16
2.1.5.7. Yaygın yapışık <i>E. coli</i> (DAEC)	18
2.1.5.8. Ekstraintestinal patojenik <i>E. coli</i> (ExPEC)	20
Üropatojenik <i>E. coli</i> (UPEC)	20
Sepsis ile ilgili <i>E. coli</i> (SEPEC)	25
Neonatal bakteriyel menenjitte neden olan <i>E. coli</i> (NEMEC)	26

<i>Avian patojenik E. coli (APEC)</i>	27
2.2. Antibiyotikler ve Antimikrobiyal Direnç	28
2.2.1. Antibiyotikler	28
2.2.2. Antibiyotik sınıfları	34
2.2.3. Antibiyotikler ve direnç mekanizmaları	36
2.2.3.1. Penisillin etki ve direnç mekanizması	37
2.2.3.2. Sefalosporin etki ve direnç mekanizması	39
2.2.3.3. Karbapenemler etki ve direnç mekanizması	41
2.2.3.4. Monobaktamlar etki ve direnç mekanizması	42
2.2.3.5. Glikopeptidler etki ve direnç mekanizması	44
2.2.3.6. Lipopeptidler etki ve direnç mekanizması	46
2.2.3.7. Oksazolidinonların etki ve direnç mekanizması	47
2.2.3.8. Aminoglikozidlerin etki ve direnç mekanizmaları	49
2.2.3.9. Tetrasiklinlerin etki ve direnç mekanizmaları	52
2.2.3.10. Makrolidlerin etki ve direnç mekanizmaları	55
2.2.3.11. Kinolonların etki ve direnç mekanizmaları	57
2.2.3.12. Sülfonamid ve trimetoprim etki ve direnç mekanizmaları ...	59
2.3. Bakterilerde Direnç Tanımlanması	60
2.3.1. Gram negatif bakterilerde fenotipik direnç tanımlama	61
2.3.2. Gram pozitif bakterilerde fenotipik direnç tanımlama	64
2.3.3. Gram negatif bakterilerde direnç tespitinde genotipik yöntemler	66
2.3.4. Gram pozitif bakterilerde direnç tespitinde genotipik yöntemler	67
2.3.5. Direnç tanımlamada PCR tekniğinin avantajları	69
2.3.5.1. PCR tekniği ile karakterize edilen genler	71
<i>Beta laktamaz genleri</i>	71
<i>Sülfonamid direnç genleri</i>	72
<i>İntegron genleri</i>	72
3. GEREÇ VE YÖNTEM	74
3.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler	74
3.1.1. Buzdolabı	74
3.1.2. Etüv	74
3.1.3. Termal döngüleyici (thermal cycler)	74
3.1.4. Sıcak su banyosu	74

3.1.5. Santrifüj	74
3.1.6. Elektrophorez ve güç kaynağı	74
3.1.7. Otoklav	74
3.1.8. Mikropipetler	74
3.1.9. UV jel görüntüleme kabini	75
3.1.10. Güvenlik kabini	75
3.1.11. Mikrodalga	75
3.1.12. Blender	75
3.1.13. Kaba terazi	75
3.1.14. Hassas terazi	75
3.1.15. Karıştırıcı (Vortex)	75
3.1.16. Isıtıcı manyetik karıştırıcı	75
3.2. Kullanılan kimyasallar	76
3.2.1. Tryptic soy broth	76
3.2.2. EMB (eosin methilen blue) agar	76
3.2.3. MacConcey agar	76
3.2.4. Agaroz	76
3.2.5. Ethidium bromür	76
3.2.6. 10X Tris-borate-EDTA (10X TBE)	76
3.2.7. Loading dye (yükleme boyası)	76
3.2.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'da kullanılan çözeltiler	76
3.2.8.1. MgCl ₂	76
3.2.8.2. Nükleotit karışımı (dNTP mix)	77
3.2.8.3. Taq polimeraz tamponu 10X	77
3.2.8.4. Deiyonize su (dH ₂ O)	77
3.2.8.5. Taq polimeraz	77
3.2. 8.6. Primerler	77
3.2.8.7. DNA belirteci	80
3.3. İzolatların Eldesi	80
3.4. Pozitif Kontrol	80
3.5. Örneklerden Bakteri İzolasyonu ve İzole Bakterilerden DNA Deteksiyonu .	80
3.6. İzole DNA'larda <i>E. coli</i> Moleküler İdentifikasyonu	81
3.7. <i>E. coli</i> 'de Filogenetik Karakterizasyon	81

3.8. <i>E. coli</i> İzolatlarında ESBL Gen Varyantlarının İdentifikasyonu	82
3.9. <i>E. coli</i> İzolatlarında Sülfonamid Direnç Genlerinin İdentifikasyonu	82
3.10. <i>E. coli</i> İzolatlarında İntegron Sınıflarının İdentifikasyonu	82
3.11. PCR Ürünlerinin Agaroza Jelde Yürütülmesi	83
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	85
4.1. Gıda ve Klinik Örneklerde <i>E. coli</i> 'nin Genotipik Tanımlanması	85
4.2. Filogenetik Sınıflandırma	86
4.3. <i>E. coli</i> İzolatlarında ESBL Gen Varyantlarının İdentifikasyonu	86
4.4. <i>E. coli</i> İzolatlarında Sülfonamid Direnç Genlerinin İdentifikasyonu.....	92
4.4.1. Beta laktam ve sülfonamid direnç genlerinin birlikte bulunma durumu	95
4.5. <i>E. coli</i> İzolatlarında İntegron Sınıflarının İdentifikasyonu	97
4.5.1. Beta laktam ve integron genlerinin birlikte bulunma durumları ..	98
4.5.2. Sülfonamid direnç ve integron genlerinin birlikte bulunma durumları	100
4.5.3. Sülfonamid direnç, beta laktamaz ve/veya integron genlerinin birlikte bulunma durumları	101
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	102
KAYNAKÇA	105
ÖZGEÇMİŞ	

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 2.1. Klinik olarak kullanılan tüm antibiyotik sınıfları ve kaynakları	31
Çizelge 2.2. Etki mekanizmasına dayalı antimikrobiyal gruplar	35
Çizelge 2.3. Antibiyotik etki mekanizmaları ve etkinlik tanımları	35
Çizelge 3.1. <i>E. coli</i> genotipik ve filogenetik tanımlama genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri	78
Çizelge 3.2. <i>E. coli</i> ESBL gen varyantları ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri	79
Çizelge 3.3. <i>E. coli</i> sülfonamid direnç genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri	79
Çizelge 3.4. <i>E. coli</i> integron genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri	80
Çizelge 3.5. <i>E. coli</i> izolatlarında çalışılan primerlere ait PCR amplifikasyon Koşulları	83
Çizelge 4.1. Gıda örnekleri izolatlardaki direnç gen ve gen varyantları verileri	87
Çizelge 4.2. Klinik örnek izolatlarındaki direnç gen ve gen varyantları verileri	91
Çizelge 4.3. Gıda izolatlarında beta laktam ve sülfonamid direnç genlerinin birlikte bulunma oranları	96
Çizelge 4.4. Gıda izolatlarında beta laktam ve integron genlerinin birlikte bulunma Oranları	99
Çizelge 4.5. Gıda izolatlarında sülfonamid direnç ve integron genlerinin birlikte bulunma oranları	100
Çizelge 4.6. Sülfonamid direnç, beta laktamaz ve integron genlerinin birlikte bulunma durumları	101

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. 27 saatlik bebek mekonyumu; 2. 2 aylık sütlü bebek dışkı preparatı ışık mikroskobu görüntüleri	3
Şekil 2.2. Kliniğe ulaşan on yıllık yeni antibiyotik sınıflarını gösteren zaman Çizelgesi	30
Şekil 4.1. Gıda örnekleri <i>bla</i> genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü ...	89
Şekil 4.2. Gıda örnekleri <i>bla</i> genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü/2	89
Şekil 4.3. Gıda örnekleri <i>sul</i> genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü	93
Şekil 4.4. Gıda örnekleri <i>sul</i> genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü/2	94
Şekil 4.5. Klinik örnekleri <i>sul</i> genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez Görüntüsü	95
Şekil 4.6. Gıda örnekleri <i>int</i> genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü	97
Şekil 4.7. Klinik örnekleri <i>int</i> genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez Görüntüsü	98

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

AA	: Bulk adhesion mediated by binder adhesive (Toplayıcı yapıştırıcı aracılı toplu yapışma)
AAC	: Aminoglycoside Acetyl Transferase (Aminoglikozid asetil transferaz)
AAF	: Aggregative Adherence Fimbriae (Agregatif Yapışık Pilus)
ABC	: ATP-Binding Cassette (ATP bağlayıcı kaset)
aEPEC	: Atypical Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (Atipik Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>)
AFM	: Atomic Force Microscope (Atomik kuvvet mikroskobu)
AIEC	: Adherent-Invasive <i>Escherichia coli</i> (Yapışık İnvaziv <i>Escherichia coli</i>)
AMBR	: Asynchronous Magnetic Bead Rotation (Eşzamansız manyetik boncuk döndürme)
AME	: Aminoglycoside- Modifiing Enzyme (Aminoglikozid modifiye edici enzim)
AMR	: Antimicrobial Resistance (Antibiyotik Direnci)
ANT	: Aminoglycoside Nucleotidyl Transferase (Aminoglikozid nükleotidil transferaz)
APEC	: Avian Pathogenic <i>Escherichia coli</i> (Kuş patojeni <i>Escherichia coli</i>)
APH	: Aminoglycoside Fosfotransferaz (Aminoglikozid fosfotransferaz)
AST	: Antimicrobial Susceptibility Testing (Antimikrobiyal duyarlılık testi)
BFP	: Bundle-Forming Pili (Demet Oluşturan Pilus)
CARD	: Catalyzed Reporter Deposition (Katalize raportör biriktirme)
CCCP	: Carbonyl Cyanide M-Chlorophenyl Hydrazone (Karbonil siyanür m-klorofenil hidrazon)
CD	: Crohn's Disease (Crohn Hastalığı)
CDT	: Cytolethal Distending Toxin (Sitoletal genişleyen toksin)

CF	: Colonization Factor (Kolonizasyon Faktör)
CFU	: Colony Forming Unit (Koloni oluşturan birim)
CNF1	: Citotoxic Necrotizing Factor (Sitotoksik nekrotizan faktör 1)
CS	: Coli Surface (Koli Yüzeyi)
CU	: Chaperone-Usher (Şaperon-usher)
CUF	: Chaperone-Usher Fimbria (Şaperon-usher pilus)
DA	: Widespread adhesion mediated by Afa adhesive (Afa yapıştırıcı aracılı yaygın yapışma)
DDST	: Double Disk Synergy Test (Çift disk sinerji testi)
DEC	: Diarrheagenic <i>Escherichia coli</i> (Diyarejenik <i>Escherichia coli</i>)
DIEC	: Diffusely Adherent <i>Escherichia coli</i> (Yaygın Yapışık <i>Escherichia coli</i>)
EAEC	: Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> (Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i>)
EAF	: <i>Escherichia coli</i> adherence factor (<i>Escherichia coli</i> bağlanma faktörü)
EAST	: Enteroaggregative thermostable enterotoxin (Enteroagregatif ısıya dayanıklı toksin)
EHEC	: Enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> (Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>)
EIEC	: Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> (Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>)
EPEC	: Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>)
ESBL	: Extended-Spectrum Beta-Lactamases (Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz)
ETEC	: Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>)
ExPEC	: Extraintestinal Pathogenic <i>Escherichia coli</i> (Ekstraintestinal <i>E. coli</i>)
FDA	: Food and Drug Administration (Gıda ve ilaç dairesi)
FISH	: Fluorescence In Situ Hybridization (Floresans in situ hibridizasyon)
GHP	: Good Hijyen Practise (İyi hijyen uygulamaları)
GMP	: Good Manufacturing Practise (İyi üretim uygulamaları)

HEp-2	: Human Epidermoid Cancer Cells (İnsan Epidermoid Kanser Hücreleri)
HGC	: Homologous Gene Cluster (Homolog gen kümesi)
HMW	: High Molecular Weight (Yüksek moleküler ağırlık)
HPI	: High Pathogenicity island (Yüksek Patojenite adaları)
HUS	: Hemolytic Uremic Syndrome (Hemolitik Üremik Sendrom)
IBC	: Intracellular Bacterial Communities (Hücre içi bakteri toplulukları)
KPC	: <i>Klebsiella pneumonia</i> Carbapenemase (<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenamaz)
LA	: Local Adhesion (Lokal Yapışma)
LAL	: Localized-like adhesion (Lokale benzeri yapışma)
LAMP	: Loop-Mediated Isothermal Amplification (Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon)
LEE	: Locus Of Enterocyte Effacement (Enterosit Silme Lokusu)
LFT	: Nucleic acid lateral flow experiments technique (Nükleik asit yanıl akış deneyleri tekniğı)
LGT/HGT	: Lateral (or horizontal) Gene Transfer (Yatay Gen Transfer)
LNZ-R	: Linezolid-Resistance (linezolid direnci)
LPA	: Line Prob Assay (Hat probu tahlili)
LPF	: Long Polar Fimbriae (Uzun polar pilus)
LPS	: Lipopolysaccharide (Lipopolisakkarit)
LT	: Heat-Labile Temperature (Isıya duyarlı)
MATE	: Multi-Antimicrobial Extrusion Protein (Çoklu antimikrobiyal ekstrüzyon protein)
MBL	: Metallo Beta Lactamase (Metallo beta laktamaz)
MFS	: Major Facilitator Superfamily (Ana kolaylaştırıcı süper aile)
MGE	: Mobile Genetic Elements (Mobil Genetik Elementler)

MPEC	: Mammary Pathogenic <i>Escherichia coli</i> (Mastitis ilişkili Patojenik <i>Escherichia coli</i>)
MRSA	: Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (Metisillin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>)
NMEC	: Neonatal Meningitis-causing <i>Escherichia coli</i> (Neonatal Menenjitte neden olan <i>Escherichia coli</i>)
NP	: Natural Product (Doğal ürün)
OMP	: Outer Membrane Protein (Dış zar protein)
OMV	: Outer Membrane Vesicles (Dış zar vezikülleri)
ORF	: Open Reading Zone (Açık okuma bölgesi)
PAI	: Pathogenicity island (Patojenite adaları)
PBP	: Penicillin Binding Proteins (Penisillin bağlayıcı protein)
PCR	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PMN	: Polymorphonuclear (Polimorfonükleer)
PP	: Peyer-Platten (Peyer yamaları)
qRT-PCR	: Quantitative Reverse Transcription PCR (Kantitatif Ters Transkripsiyon PCR)
RND	: Resistance-Nodulation-Division (Direnç nodülasyon bölünme)
ROS	: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)
RPP	: Ribosomal protection proteins (Ribozom koruyucu proteinler)
RT	: Heat-Stable Temperature (Isıya duyarsız)
SAT	: Secreted Autotransporter Toxin (Salgılanan ototransporter toksin)
SCMA	: Single-Cell Morphological Analysis (Tek hücre morfolojik analiz)
SEPEC	: Human Sepsis-Associated <i>Escherichia coli</i> (Septisiye neden olan patojenik <i>Escherichia coli</i>)
SMR	: Small Multidrug Resistance (Küçük çoklu ilaç direnci)
SPATE	: Serine Protease Autotransporters (Serin proteaz ototaşıyıcıları)

STEC	: Shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (Shiga Toksin üreten <i>Escherichia coli</i>)
STX	: Shiga toxin (Shiga toksin)
tEPEC	: Typical Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (Tipik Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>)
TIHSS	: Type III Secretion System (Tip III Salgı Sistemi)
UPEC	: UroPathogenic <i>Escherichia coli</i> (Üropathojenik <i>Escherichia coli</i>)
USP	: Uropathogenic Specific Protein (Üropatojenik spesifik protein)
VAG	: Virulence-Associated Gene (Virölans İlişkili Gene)
VRE	: Vancomycin-Resistant Enterococci (Vankomisin dirençli enterokoklar)
VRSA	: Vancomycin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (Vankomisin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>)
WGS	: Whole Genome Sequencing (Tam genom dizileme)
β	: Beta

1. GİRİŞ

Mikrobiyal enfeksiyonların insidansında görülen belirgin artış, tedavi için yoğunlukla antimikrobiyal ajan kullanımını tetiklemiş ve bakterilerde bu ajanlara yönelik direnç mekanizmalarının gelişmesine neden olmuştur [1]. Dirence sahip bakteri türlerinin/suşlarının gelişmesinin altında dolayısıyla antibakteriyal ajanların oluşturduğu baskı yatmaktadır [2, 3]. Yeni dirençlerin ortaya çıkması ve hızla yayılımı standart tedaviye verilen yanıtın etkisizleşmesine neden olmuş ve antimikrobiyal direncin küresel bir halk sağlık problemi olarak yer almasını sağlamıştır [1].

1940’larda antibiyotiğin patojen bakterilerle mücadelede kullanılmasıyla görülmeye başlayan bakteriyal antibiyotik direnç kullanılan antibiyotiklerin artmasına paralel bir seyir izleyerek direnç mekanizmalarının birden fazla ajana dirençli daha karmaşık bir hal almasına neden olmuştur [2].

Çoklu ilaç direnci (MDR) enfeksiyonları; tedavilerin masraflı olması ve sürecinin zorluğu açısından halk sağlığı üzerindeki tehdidi artırmakta olup yapılmış çalışmalar bakteriyal popülasyonlarda tek ajana direncin birden fazla ajana dirençle uyumlu bir korelasyon içinde olduğunu göstermiştir [4]. Çoklu ilaç direncine sahip patojenlerin sebep olduğu enfeksiyonlarla mücadele edebilmek için bu direncin oluşum nedenini bilmek ve buna göre mücadele tasarımlarının geliştirmek gerekir [4]. Bunun temelinde de çoklu dirence sahip patojenlerin karakterizasyonunun yapılması yer almaktadır. Antimikrobiyal direncin belirlemede disk difüzyonu, mikro dilüsyon gibi geleneksel fenotipik yöntemler kullanılsa da bu yöntemler direncin moleküler düzeydeki mekanizmasını belirlemekte yetersiz kalır. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ve DNA dizileme gibi moleküler teknikler ile çoklu direnç genleri ya da gen topluluklarının tanımlanması ve direnci belirleyen belirteçlerin izlenmesini mümkün kılarak geleneksel yöntemin açığını kapatmıştır [5].

Bu çalışmada, gıda ve klinik örneklerden izole edilen çoklu dirence sahip *E. coli* izolatlarının moleküler yöntemlerden PCR tekniğiyle karakterizasyonu hakkında bilgiler yer almaktadır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. *Enterobacteriaceae*

Üyeleri basil görünümlü, spor oluşturmeyen, fakültatif anaerob solunum yapan, şeker fermantasyonu ile laktik asit üreten, nitratın nitrite indirgenmesinde görev alan, Gram ve oksidaz negatif, katalaz pozitif özelliklere sahip insan, hayvan ya da bitkilerde patojen bakterilerinin büyük bölümünü barındıran geniş bir bakteri ailesidir. 22 cinsinde tek tür, 7 cinsinde ise 10'dan fazla tür bulunduran 51 cins ve 238 türe (2014'e kadar tespit edilen) sahip bir ailedir [6].

2.1.1. *Enterobacteriaceae* üyeleri iyi üretim uygulamaları ve iyi hijyen uygulamaları (GMP/GHP)

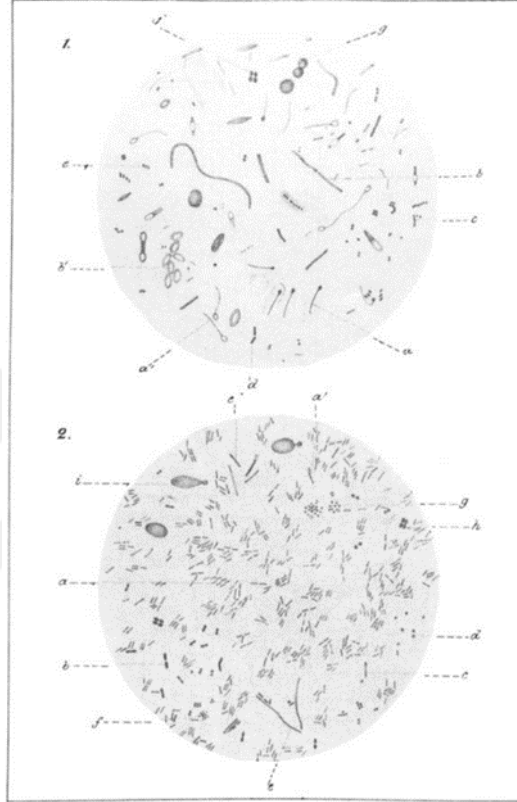
Enterobacteriaceae üyeleri GMP/GHP gibi gıdada önleyici ön koşul tedbirlerinin incelenmesinde gıda üreticileri tarafından genellikle tercih edilen hijyen göstergeleri olarak kabul edilip kullanılırlar. Tehlike Analizleri ve Kritik Kontrol Noktaları sistemi tarafından gıda ürününün tüketiciye sunuluncaya kadar olan sürecinde önemli tehlike unsurları olarak görülmediğinden spesifik kontrol önlemleri belirlenmezken; Salmonella gibi önemli tehditlere karşı oluşturulan kontrol önlemleri, bu ailenin diğer üyeleri içinde etkili ve uygulama bakımından uygun kontrol önlemleridir.

Enterobacteriaceae üyelerinin gıdalarda düşük oranlarda varlığı gıda güvenliği için risk olarak görülmez; bu nedenle *Enterobacteriaceae* üyeleri için özel kontrol önlemlerinin oluşturulmasına bazı gruplar (prematüre bebekler ve bebek mamaları) hariç olmak üzere sıklıkla rastlanmaz [7].

İndikatör organizmalar denilen canlılar, gıdaların üretimi ve kontrol sistemlerinin güvenliğinin mikrobiyal değerlendirilmesinde kullanılmaktadırlar. Bu organizmalar belirlenen sayısal değerlerin üzerinde görüldüğünde; üründe yetersiz işlemeyi, hammadde kalitesini ve benzer ekolojik koşulları tercih eden patojenlerin oluşum olasılığını gösteren belirteç olarak görev yaparlar. Gıda kalitesi ve gıda güvenliğinin göstergesi olarak kullanılan indikatör organizmalar arasında *Enterobacteriaceae* üyeleri de yer almaktadır. *Enterobacteriaceae* üyeleri; işlem görmüş gıdalarda temas yüzeylerini değerlendirmek ve oluşabilecek kontaminasyona sebep olan kaynak tespitinde etkili olan yöntemler arasında yer almaktadır. Bu aile üyeleri ayrıca indikatör organizmalar arasında yer alan koliformlardan sanitasyon göstergesinde daha güçlü bir role sahiptir. Bu gücün oluşumunu indikatör organizmalarda aranan çevre koşullarına direncin koliformlardan daha yüksek olması oluşturmaktadır [8].

2.1.2. *Escherichia coli*

1885 yılında pediatrist ve bakteriyolog Theodor Escherich tarafından yeni doğmuş bebeklerin mekonyumlarından izole edilen, 1 ila 5 μ boyunda, yaklaşık 0.3-0.4 μ enindeki küçük çubuk görünümlü bakteriler *Bacterium coli commune* diye isimlendirilmiştir [9, 10].



Şekil 2.1. 27 saatlik bebek mekonyumu; 2. 2 aylık sütü bebek dışkı preparatı ışık mikroskobu görüntüleri [9, 10]

Mikrobiyal bağırsak hastalıkları üzerine yapılan incelemelerin diğer bulaşıcı hastalıklara kıyasla yetersiz kalması ve yeni doğan bebeklerde bağırsak enfeksiyonu kaynaklı ölümlerin yoğunluğu, mikrobiyal bağırsak hastalıklarının patolojisi ve tedavisine yönelik çalışmalara T. Escherich'in yönelmesini sağlamıştır. Bu yolla inceleme materyali olarak kullanılan yenidoğan mekonyumu ile sadece sütle beslenen bebek dışkısı kullanılması diğer bağırsak hastalıklarına nazaran en ölümcül etkiye sahip olan bu hastalığın yetişkinlerdeki daha karmaşık olan sürecinin gelişimsel adımlarının anlaşılmasında ön koşulu oluşturmaktadır [9].

Şekil 1’de 27 saatlik mekonyum preparatında 1d’de gösterilen ve sadece sütle beslenen 2 aylık bebek dışkı preparatında 2a ile gösterilen ve sayısal olarak daha yoğun olarak görülen bu bakterilerin agar ve kan serumu üzerinde sivilaşmayan koloniler oluşturduğu yapılan kültürleme çalışmaları ile anlaşılmıştır. Anilin boyalarla hızlıca boyanan bu bakterilerin Gram boyası ile (Potasyum iyodür ve alkolle) muameleden sonra hızla renklerini kaybettikleri görülmüştür. Glukoz bulunan ortamlarda fermentasyon gerçekleştiren ve asit üretimi ile sütün pıhtılaşmasını sağlayan bu bakteriler *Bacterium coli commune* ismiyle anılmıştır [9]. Kolonda bulunduğu için *Bacterium coli* ismi verilen bakteriler hareketleri ve şekillerine göre erken prokaryotik sınıflandırmada bir cinse yerleştirilirken, daha sonra Ernst Haeckel’in bakteri sınıflandırmasına göre Monera alemi içinde yer almıştır [11]. *Bacterium coli commune* Escherich, 19. yy’da yapılan incelemeler ile Tifüs basiline çok benzeyen ve ilgili yüzyıl için mevcut bakteriyolojik araştırma araçları ile bireysel bileşenleri kesin olarak tespit edilememiş kollektif bir türdür [12]. *Escherichia* cinsi sınıflandırma için yeterli tanımlayıcı veriyi bulundurmamayanların devre dışı bırakılması halinde birçok üyesi bulunan geniş bir tür grubuna sahiptir. Eberthae’nin tanımlamasına göre sütü pıhtılaştırma ve laktoz ve glukozu tamamen fermente etme özelliğine sahip bu cinsin üyelerinden 1886 yılında Escherich tarafından tespit edilen *Bacterium coli commune* ismiyle anılan tür, 1919’da *Escherichia coli* olarak Castellani ve Chalmers tarafından adlandırılmıştır [13]. *B. coli* grubu bakterilerden oluşan 4 grubun ikisi Escherich tarafından adlandırılmış olan *B. coli communis* ve *B. coli aerogenes*’dir. *B. coli* grubu bakteriler; fermentasyon ile dekstrozu ve laktozdan gaz üreten, spor oluşturmamayan, fakültatif anaerob olan, küt uçları ile kısa çubuk görünümlü, eskülin ile pozitif sonuç verme özelliklerini barındırırlar. Jelatin ve agar üzerinde farklı sıcaklıklarda (20 °C ve 37 °C’de) gelişen, jelatin üzerinde gelişiminde 14 gün süreyle sivilaşma yapmayan su ve süt için fekal kontaminasyon göstergesi olan bakterilerdir [14]. Escherich bakterisinin (*B. coli*’nin) isimlendirilmesinde Escherich ve Pfaundler arasında farklılık gözlenmektedir. Araştırmacıların bakteriler üzerine yapılan incelemelerinde Escherich çalışmanın klinik bölümünde *Bacterium coli commune*’den bahsederken, Pfaundler yazısının fizyolojik bölümünde *B. coli*’den bahseder, fakat *B. coli commune*’den bahsetmez. Escherich’in derlemede commune takısını kullanması bakterilerin yetişkinler kadar çocuklarda da yaygın görülmesine atfetmesi kaynaklıdır.

Bakterinin; Kılavuz dizininde *E. coli* olarak tanımlanmasında gözlenen referans sayısı (birkaç tane), *Bacterium coli* olarak tanımlanmasında gözlenen referans sayısından azdır ve bunlar birbiri ile örtüşmez. *Escherichia* ismi “Bergey's Manual of Determinative

Microbiology”nın ilk baskısında 22 farklı bakteri türü için kullanılarak yaygın bir kullanıma sahiptir. Sonraki baskılarda bu sayı değişkenlik göstererek Bergey’in 5. baskısında detaylı bir düzenleme ile *Escherichia* isimli bakterilerin *Enterobacteriaceae* ailesi içinde Cins I altında yer alması sağlanmıştır [15].

2.1.3. *E. coli* genel özellikleri

E. coli; fakültatif anaerob solunum yapan, gram negatif özelliğe sahip çubuk görünümlü bir bakteri olup *Enterobacteriaceae* ailesine mensuptur [16]. Düz yuvarlak uçları arasında 2,0–6,0 µm uzunluğa sahip düz, silindirik görümlü, 1,1 ile 1,5 µm çapa sahip bir bakteridir. Tek tek ya da çiftler halinde bulunan bakteri ya hareketsizdir ya da peritriköz kamçılarla hareket ederler [17]. Bazı bakterilerde yalnızca tek kamçı bulunurken, *E. coli* birden fazla kamçıya sahip olup bunlar hücre yüzeyine dağılmış halde bulunur. *E. coli*’de bulunan hücre yüzeyine dağılmış bu çok sayıda kamçının saat yönünün tersine yaptığı hareketle yüzme davranışı gösterirken; tek bir kamçının ya da çok sayıdaki kamçının koordineli saat yönünde dönüşü yuvarlama hareketine neden olur ve yüzmeyi durdurur [18].

E. coli’nin laboratuvar ortamında ilk kolonizasyon tespitinin yapıldığı bir asır öncesinden itibaren doğal yaşam alanının insan ve hayvanların kalın bağırsakları olduğu bilinmektedir [19]. Sağlıklı bireylerin bağırsağında yer alan mikrobiyota üyelerinin hem kendileri hem de konak bu birliktelikten fayda gördüğü simbiyotik bir ilişki içinde yer alırlar. Simbiyotik birlikteliğin başlangıcı yaşamın erken dönemleri denilen bebekliğin ilk aşamalarında gerçekleşir. Bu birlikteliğin öncülerini *Enterobacteria*, *Staphylococcus* ve *Streptococcus* cinsi üyeleri gibi aerob solunum tercih edenlerin oluşturduğu bunları *Eurobacteria* ve *Clostridia* cinsi üyeleri gibi anaerobların önceki çalışmalarla tutarlı bir şekilde takip ettiği görülmüştür [20, 21]. Öncelikle aerob bakterilerin çoğalmasını *E. coli* gibi fakültatif anaeroblar takip ederek ortam oksijen seviyesini hızla düşürüp anaerob bakteri kolonizasyonu için uygun ortam oluştururlar [22]. Fakültatif anaerob olan *E. coli* ortamdaki değişime bağlı olarak hem aerob hem de anaerob koşullarda yaşama özelliği göstermektedir. Değişen ortam koşullarına adaptasyon için farklı mekanizmalar devreye girer. Oksijenin bulunduğu koşullarda fermentasyonla ilgili gen düzenlemesi azalırken oksijenli solunumla ilgili genlerin düzenlemesi artar. Oksijensiz koşullardan oksijen bulunan ortamlara geçişin sağlandığı durumlarda bakteri genomunun %20’den fazlasının çalışması düzenlenerek gerekli enzimatik basamaklar aktive edilir ya da pasifleştirilmektedir [23]. Ortamın oksijen seviyesine bağlı olarak ATP sentez üretim yolu değişmektedir [24]. Oksijen varlığında *E.*

coli'de fosforilasyon sürecine giriş basamağına göre üretilen enerji değişmekle birlikte 1 mol glikozdan maksimum 26 mol ATP üretimi sağlanmaktadır [25]. Solunum tepkimelerinde görevli elektron alıcılarının yer almaması durumunda substrat düzeyinde fosforilasyonla enerji üretimi karma bir asit fermantasyonu ile gerçekleşir. Molekül başına 2 ya da 3 mol ATP'nin üretildiği bu mekanizmada; etil alkol, laktik asit, süksinik asit, asetat, formaldehit, karbondioksit, hidrojen gibi oksidasyon süreci son ürünleri ortaya çıkar [26]. Enerji verimi yüksek olmasına rağmen oksijenli solunumda üretilen reaktif oksijen türleri (ROS) nedeni ile spontan mutasyonların görülmektedir. Oksijen yokluğuna bağlı olarak gerçekleşen anaerobik solunum ve fermentasyonda üretilen ROS miktarı, oksijenli solunumdan azdır; fakat gerçekleşen spontan mutasyon sayısı daha fazladır. Aerobik solunum yapan *E. coli* için genomik yapısal varyasyonlar haricinde gözlenen mutasyon sayısı her genom için tahminen 1.10^{-3} kadardır [27].

E. coli enerji elde etmek için karbon kaynağı olarak organik bileşikleri tercih eden bir kemoorganotropik (kemoheterotrofik) bakteridir [28]. Karbon kaynağı olarak karışım halinde ya da tek başına bir organik bileşik üzerinde (şeker ya da aminoasit) çoğalabilen *E. coli* glikoz üzerinde diğer kaynaklara nazaran çok daha hızlı büyüme eğilimi gösterir. Bu eğilim 37 °C'de 50 dakika gibi bir hızla gerçekleşirken kaynağın değişimi sürecin saatler sürmesine neden olmaktadır [29, 30]. Tiamin aminoasiti gibi tek okzotrofik gereksinime sahip suşlarının yanında ortamda tek çeşit aminoasit varlığı (valin, lizin, sistein gibi) ile büyümeleri inhibisyona uğrayan suşları da mevcuttur [29]. Asidik ve bazik Ph değerlerinde (5.5-8) çoğalabilen suşlara sahip olan bakteri en iyi 37 ile 42 °C sıcaklıklarda çoğalım göstermektedir [31].

Gram boyası ile boyandığında negatif özellik gösteren bakteri, sitokrom oksidaz eksikliğinden dolayı elektron transfer sisteminde başka yollar kullanarak elektron taşınımı yapmaktadır [32].

2.1.4. *E. coli* genomu

Bakteriyal genomlarda gözlenen çeşitliliğin altında yatan lateral gen transferi (LGT) ile genetik unsur çeşitliliği artmıştır. Bazı bakterilerde LGT yoluyla genomun %25'lik bölümünün evrimsel süreç içinde aktarılmış olduğu düşünülmektedir. Bakterilerden *E. coli* içinde gözlenen çeşitlenmenin oluşumunda izlenen evrimsel yolların farklılaştığı ve tek bir hücredeki genetik materyaldeki gen sayısının pan genomuna oranının yaklaşık 1/9 şeklinde olması bu çeşitlenmenin boyutunu göstermesi açısından etkileyicidir [33]. *E. coli* genomu

farklı izolatlarında; yaklaşık 1000 ila 2000'i kolonizasyonda görev alan ya da virülans faktörü olan gen ile 3000 kadarı izolatlar arasında transfer edilen gen olmak üzere 4000-5000 kadar gene sahiptirler [34].

İnsan bağırsağının bir koloni oluşturuu üyesi olarak bulunan *E. coli*'nin genomu üzerine yapılan çalışmalar, bu bakterinin aynı zamanda patojen olma potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir. *E. coli*'de gözlenen evrimsel değişimin atasal aktarımdan ziyade horizontal gen transferi (HGT) yoluyla gerçekleştiğini ortaya koymuştur. Evrimsel süreçte gözlenen rekombinasyonlarda uzun süreli etki HGT ile gerçekleşirken, dizi kaynaklı evrimsel değişimde HGT oranının mutasyona oranı bilinmemektedir [35]. Ortam değişikliğine bağlı olarak gerçekleşen *E. coli*'deki genomik plastisite; suşlardan bazılarını gastrointestinal sistemde kommensal bir pozisyona sokarken, bazılarını ise oluşan virülans ile bağlantılı gen (VAG) kombinasyonları nedeni ile bağırsak iç ve dışı patojenleri haline sokmaktadır [36, 37]. *E. coli* izolatlarındaki farklılık aynı konağı tercih eden kommensal ve patojen formlarının pan genomlarında da belirgin gözlenmektedir. Çekirdek, yumuşak çekirdek, kabuk ve bulut gen sayılarına yansımaktadır. Örneğin; sığırlardan elde edilen kommensal *E. coli* izolatları pan genom toplamı (20.042 gen), Klinik Mastitis ile ilişkili *E. coli* (MPEC) izolatlarının pan genom toplamlarından (17.532) fazladır. Kommensal pan genomdaki en büyük payı; 14.965 gen ile tek bir suşa ya da suşun alt gruplarında gözlenen bulut pan genomu oluştururken, bunu 3538 gen ile Çekirdek-Yumuşak çekirdek pan genomu ve 1539 gen ile kabuk genomu takip eder. Sığır MPEC izolatlarındaki toplam pan genomu 12503 gen ile bulut pan genomu; 3391 gen ile bir türün tamamında ya da tamamına yakınında gözlenen Çekirdek pan genomu ile %99-95'inde gözlenen Yumuşak çekirdek pan genomu; 1638 gen ile türün %15-95'inde gözlenen kabuk pan genomu oluşturur [38]. Genom plastisitesinin yüksekliği nedeniyle *E. coli* suş çeşitliliği artmıştır. Bu artışta düzenli olarak kazanılıp, kaybedilen genler de görev almaktadır. Antimikrobiyal direnç geni (AMR) ile Virülans genlerinin (VAG) kazanılması patojen üye sayısını artırmaktadır. AMR ve VAG'lerin aktarımı HGT'nde görev alan başta plazmitler olmak üzere Mobil Genetik elemanlar (MGE) yoluyla gerçekleşir. Sonuç olarak *E. coli*; AMR ve VAG kazanımı, zengin gen havuzu, genomik plastiste yüksekliği, ekolojik nişler arasındaki değişim ve geniş ekosistem yayılımı nedeniyle zengin bir gen deposuna sahiptir [39].

2.1.5. *E. coli* patotipleri

Kommensal olarak bağırsaklarda bulunan izolatların yanında bakteriyemiye, idrar yolu enfeksiyonlarına, yeni doğan menenjitine (insan ve hayvanlarda) bakteriyel çeşitli ishal türlerinin oluşumunda baş rolü üstlenen patojenik tiplerine rastlanmaktadır [40]. Patovar ya da patotip diye adlandırılan bu patojenik varyantlar öncelikle enfeksiyon organlarına göre intestinal *E. coli* ve Ekstraintestinal *E. coli* (ExPEC) diye ikiye ayrılmakta olup bunların tanımlanması fenotipik ve moleküler belirteçlerin tespitine dayanmaktadır [39]. Patojenik bakterilerin kommensallerden ayrılmasını sağlayan; çeşitli virülans genlerinin oluşturduğu özellikleri (pilus ya da pilus dışı yapışma elemanları ve kolonizasyon, konak hücre içine giriş mekanizmaları, toksin salgılama, konak hücrede koful içinde ya da sitoplazmada saklanma, konak hücrenin bağışıklık elemanları olan enzimleri devre dışı bırakma, demir şelatı oluşturma gibi) bulunmaktadır [41]. Sahip olunan virülans genler ve uygunluk genleri 1.10^{+6} baz çiftlik bir artışa neden olarak patojenlerin kommensallerden ayrılmasını sağlar. Patojenik varyantlar arasındaki çeşitlilik; tüm örneklerde bulunan korunmuş çekirdek gen seti diye adlandırılan yaklaşık 1700 homolog gen kümesinden (HGC) ayrılan esnek gen seti denilen genlerin kazanılması ya da kaybıyla gerçekleşir [42, 43]. Esnek gen setindeki virülans genler; çeşitli mobil genetik elemanların (MGE) (plazmit, transpozon, bakteriyofaj, ikame dizileri) konjugasyon, transdüksiyon ve translasyon gibi transfer mekanizmaları ile konak genoma kaynak olarak ya da bağımsız kopyalanma ile yayılım özelliğindedir [43].

Gastrointestinal enfeksiyonlara neden olan Diyarejenik patotipler 7 alt grupta yer alır. Bunlar; enteroagregatif *E. coli* (EAEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), yapışık invaziv *E. coli* (AIEC) ve yaygın yapışık *E. coli* (DAEC)'dir [39].

ExPEC suşları; sepsisemiye neden olanlar (SEPEC), üropatojenik *E. coli* (UPEC = üriner sistemi enfekte edenler) ve neonatal menenjitte neden olan *E. coli* (NMEC) olmak üzere 3 grup patotip altında yer alırlar [44].

2.1.5.1. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)

1985 yılında insan epidermoid lariks karsinom hücrelerine (HEp-2) toplu şekilde yapışması ile tanımlaması yapılan ve alınan bağırsak örneklerinde hem ileum hem kolon üzerinde yapışma gösterdiği tespit edilen bir patojendir. Enteropatojenik ve yaygın yapışık patotiplerden yapışma özelliği bakımından ayırt edilmektedir [45]. 2 yaş altı çocuklarda, HIV virüsü taşıyan bireylerde, seyahat eden gezginlerde gözlenen; hafif ateş, kısmen ishal ve mukuslu dışkı oluşumuna neden olan bir patotiptir [46]. Gelişmiş ve gelişmekte olan

ülkelerde gözlenen bu patotipin; kalıcı ishal, yetersiz beslenme ve büyüme geriliği ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [47].

EAEC suşlarının patojen ve patojen olmayan suşlarının bulunduğu ve bunlar arasındaki farkın anlaşılmasında öneriler arasında yer alan patojenite oluşum basamaklarının gözlenmesidir [47]. EAEC'nin patojenite oluşumunun mukusal yüzeye yapışma ile başlayıp, kript açıklıklarındaki genişleme, mikrovilluslarda vezikül oluşumu ve boy kısalması, epitel hücreye giriş, hemorojenik nekroz ve mukozal toksisite oluşumu, inflamatuvar tepki ile sonuçlandığı tahmin edilmektedir [48].

EAEC'lerin konağa yapışmasında görevli olan plazmit kaynaklı (AAF/I ve AAF/II) farklı pilusların olduğu, bunun yanında pilusa sahip olmayan farklı adezinler bulunduran tiplerinin de bulunduğu yapılan çalışmalar ile tespit edilmiştir [49]. Virülans faktörü olarak görev alan yapışma fimbrialarından tespit edilen 4 varyantı plazmit kaynaklı (pAA)'dır ve 4 gen (*aggA*=AAF/I, *aafA*=AAF/II, *agg3A*=AAF/III, *agg4A*=AAF/IV) tarafından kodlanmaktadır [50]. EAEC izolatlarında; AAF/I fimbriyası görülme oranı (%31), AAF/II fimbriyasının görülme oranından (%12) fazladır [51].

EAEC'nin suşlarının tanımlanmasında kullanılan virülans faktörlerinin (Agregatif yapışma fimbriaları (AAF), dispersin, dispersin translokator Aat ve Aai Tip IV sekresyon sistemi) ekspresyonunda görevli olan transkripsiyon faktörü AggR regülondur. Yapılan Ters transkripsiyon Polimeraz zincir reaksiyonu (qRT-PCR) ve mikrodizileme gibi moleküler yöntemlerle incelenen AggR regülunun önceden bağlantılı görülmeyen 19 gen dahil olmak üzere kromozomal ve plazmit kaynaklı lokuslara sahip 44 genin çalışmasını düzenlediği tespit edilmiştir [52]. AggR regülunu tüm EAEC suşlarında gözlenmez (tipik suşlarda rastlanırken, atipik olanlarda rastlanmaz) [47].

2.1.5.2. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC)

Shiga toksin üreten *E. coli*'nin (STEC) bir alt grubu olan ve diyare kaynağı olarak değerlendirilen Diyarejenik *E. coli*'nin (DEC) bir patotipidir [53]. Enterohemorojenik *E. coli* (EHEC) gıda yoluyla bulaşan, yayılım alanı dünyayı kapsayan bir patojendir [54]. Hemolitik Üremik Sendrom (HUS) salgını nedeni olarak insan patojeni olan patotip için sığır bir rezervuar görevindedir. Dünyada gözlenen EHEC salgınlarının ¾'ünün sığır kaynaklı kontamine besinlerin tüketimi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. Hayvanat bahçelerindeki geviş getiren hayvanlarla temas, enfekte kişilerle doğrudan temas yoluyla da bulaş özelliğine

sahip olan EHEC'ler, sığır gübresi içinde uzun süre (7 hafta) canlı kalabilme özelliği sayesinde yıkama suları ile daha geniş sahalara bulaş riskine sahiptir [55].

EHEC'lerde patojeniteden sorumlu virülans faktörlerini MGE'ler oluşturmaktadır. Bunlar arasında; Shiga toksin üreten bakteriyofajlar, Patojenite Ada (PAI)'ları ve 0157 bakteri suşundan elde edilen 96 baz çiftlik plazmit (pO157) yer alır [56].

PAI'ları arasında yer alan EHEC'lerin bazı suşlarında enterosit silme lokusu (Locus Of Enterocyte Effacement) (LEE) diye adlandırılan bağırsak epiteline yapışma ve mikrovillularda silinmenin oluşumuna neden olan 35 kb'lık bir kromozomal kökenli bir PAI olduğu tespit edilmiştir. Bu PAI'nda; enterokokal yüzey proteinleri (*esp* geni), Tip III protein salgılama sistemleri (TIISS) ve adezin intimini (*eae* geni) denilen ve yapışmadan sorumlu 94-kDa'luk proteini kodlayan yapışma ve silmeden (AE) sorumlu tüm genler yer alır [57]. PAI'larından bir diğeri; *eae* geni içermeyen EHEC suşlarında gözlenen *Vibrio cholerae*'daki *IrgA* genine homolog bir adezin olduğundan Iha diye adlandırılan ve 35 kb'lık farklı bir yapışma proteini kodlayan kromozomal bir adadır. Yapışma özelliğine sahip olmayan EHEC suşlarının laboratuvar ortamında Iha transferi ile yapışma özelliğine sahip olduğu gözlenmiştir [58]. Yüksek Patojenite adası denilen (HPI) ada, *eae* genine sahip olmayan suşlarda gözlenen bir diğer adadır. *hyuA* genini içerdiği tespit edilen bu adanın potansiyel bir yersiniabactin olduğu düşünülmektedir [59].

EHEC'lerde patojenitede öncelikli virülans yeteneği, en güçlü biyolojik zehirler arasında değerlendirilen shiga toksinin bir ya da birden fazla çeşidini üretebilmelerinden gelir [53, 60]. Shiga toksini (Stx) üretiminden sorumlu genler, lambDOId profajlar olan ve Stx dönüştürücü faj diye adlandırılan fajlarca taşınır. EHEC'ler yüksek patojeniteye sahip Stx üreten suşları (STEC) bu özelliği oluşturan profajlara daha önceden enterik patojen potansiyelini bulunduran atipik enteropatojenik *E. coli* (aEPEC) ve enteroagregatif *E. coli* (EAEC)'ler aracılığıyla ulaşırlar [61]. Antijenik özellik gösteren Stx'ler; Stx1 ve Stx2 diye iki grup altında ele alınırken bunlarında alt grupları bulunmaktadır. EHEC'lerde hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom (HUS) gibi halk sağlığının ciddi tehditleri arasında yer alan hastalıkların oluşumunda Stx2 Stx 1'den daha etkin görev almaktadır [62].

STEC'lerde farklı boyutlardaki plazmitlere rastlanmaktadır. Bunlar arasında en yaygınlarını 75 ile 100 kbp uzunluğundakiler oluşturur. DEC'lerin farklı patotiplerinde de gözlenen plazmitlerin patojenitenin oluşumunda sorumlu genleri genel olarak taşıma özelliğinde olan, EHEC'lerde ısıya dayanıklı ya da ısıya dayanıksız toksin üretiminde etkin oldukları bilinmektedir [63]. EHEC'lerde patojeniteden sorumlu olduğu düşünülen farklı

plazmitler (farklı suşlarda) bulunmakla birlikte bunlardan en bilineni 94-104 kbp'lik pO157 plazmitidir. STEC'lerin tamamında bulunmasa da çoğunluğunda yer alan EHEC O157'nin büyük plazmiti diye adlandırılan pO157 plazmidi başta hemolisinini kodlayan *hly* geni olmak üzere birçok geni taşımaktadır [64]. pO157 plazmiti üzerinde; 81.8 kDa'luk moleküler ağırlıktaki 2208 bp'lik açık okuma bölgesine (ORF) sahip olan, 7-9 kbp'lik küçük bir DNA parçası üzerinde tanımlanan iki fonksiyonlu Katalaz peroksidaz kodlayan *katP* geni [65]; insan pıhtılaşma faktörü V'i parçalayan serin proteaz'ı kodlayan 3900 bp'lik ORF'ne sahip *espP* geni [66] ve EHEC'lerde Tip II Salgılama sistemlerine özgü genleri içeren 13 farklı ORF'ni kodlayan *etc* genlerinin (*etcC*, *etcD*, *etcE*, *etcF*, *etcG*, *etcH*, *etcI*, *etcJ*, *etcK*, *etcL*, *etcM*, *etcN*, *etcO*) bulunduğu tespit edilmiştir [56]. EHEC'lerde virülans faktörü olarak görevli *katP* geni, *hly* geni ve *espP* geninin farklı kombinasyonlarını barındıran plazmitlere rastlandığı gibi bazılarında bunların bulunmadığı plazmitlerde görev almaktadır. Büyük plazmitlerde hem bu faktörlerin kombinasyon hem de içerik (düzenlenme) farklılıklarının olması bunlarda tek tip virülans faktöründen ziyade grupların etkili olduğunu göstermiştir [63]. Shiga toksin üreten *E. coli*'nin (STEC) büyük plazmitleri, oldukça değişken genetik elementlerdir.

EHEC'lerinde dahil olduğu DEC'lerde çoklu virülans faktörleri PAI ve plazmidlerde korunmuş kümeler oluştururken, bireysel virülans faktörlerini ise bakteriyofaj ya da transpozon kaynaklı stx üreten genler oluşturmaktadır [64].

2.1.5.3. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)

Shigella türü bakterilerinin incelenmesi sürecinde tespit edilen 1947'deki çalışmada Paracolon basili olarak adlandırılan Shigella türleri ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [67]. Hayvanlar ve hayvansal kaynaklı besinlerle bulaşa yönelik yeterli kanıtın bulunmaması nedeniyle EIEC'lerin rezervuarı olarak insanlar görülmektedir. EIEC bulaşı, enfekte insanların birbiri ile teması sonucu kontamine su ve besinler ya da insan dışkısı yolu ile gerçekleşmektedir [68].

EIEC bakterileri kolon epiteli içine nüfuz eder, yanal yolla epiteller arasında transfer olabilir ve hücre membranından çıkıp tekrar girerek epitel hücrelerini enfekte ederler. Diğer *E. coli* patotiplerine nazaran EIEC'ler makrofajlarda dahil olmak üzere hücre içi istila ve çoğalma özelliklerinden dolayı hücre içi patojen olduklarından diğer patotiplerden ayrılma gösterirler [69]. Kolon epitelinde inflamatuvar yanıtın oluşumuna neden olan bakteriler, kan

ve mukus içerikli düşük hacime sahip dışkı oluşumundan sulu ishale giden dizanteri etkenleri arasında yer almaktadırlar [68].

EIEC'lerde patojenite diğer *E. coli* patotiplerinde görüldüğü üzere HGT ile MGE'lerin (Plazmit, transpozon, faj, PAI) kazanılması yolu ile sağlanmaktadır [69]. EIEC'lerde Shigella'larda da mevcut büyük bir plazmit olan pINV tarafından taşınan genler vasıtasıyla kazanılan istila, yaşama devam ve hücrelere yanal yollu difüzyon patojeniteyi sağlar. pINV'de taşınan genler arasında *mxi* ve *spa* genleri gibi patojenite faktörlerinin aktarılmasında görevli Tip III Salgı Sistemlerini (TIISS) kodlayan genler ile konak hücreyi giriş ve hücreden hücreye yayılmak gibi özelliklerin kazanılmasından sorumlu efektörleri kodlayan *ipaB*, *ipaC*, *ipaD* ve *icsA* genleri yer alır [70].

2.1.5.4. Enterotoksikolojik *E. coli* (ETEC)

İnsan ve hayvanlarda ishale neden olan bir basil olduğu 1960'lı yıllarda anlaşılan bir bakteri grubudur [71]. ETEC'ler insanlarda incebağırsakta enfeksiyon oluşturarak ishale neden olan bir patojendir. 1956'da Kalküte şehrindeki ilk tespit çalışması ve daha sonraki çalışmalar bebek ve çocuklarda daha yüksek sıklıkla gözlemlendiğini göstermiştir [72]. Gelişmekte olan ülkelerde görülme sıklığı fazla olan ETEC enfeksiyonları ayrıca bu ülkelere gelen turistlerde de gözlenmektedir [73]. ETEC'lerle bulaş kontamine olmuş gıda ya da sıvıların tüketilmesi yolu ile olmaktadır [74]. Ortak tuvaletlerin kullanılması gibi temas kaynaklı bulaşlarında gözlemlendiği ETEC enfeksiyonları, patotipi içeren dışkı temaslı suyun ya da farklı yollu kontamine suyun içilmesi, yemek yapma ve banyo amaçlı kullanımı ile [75] ve sulama sularına karışması yoluyla yeşil yapraklı sebzelere tutunarak da yüzeysel yıkama ile ayrılmayan kontaminasyonu ile de gözlenir. Endüstrileşmiş ülkelerde paket ya da büfe ürünleri kaynaklı ishalin, gıdada ortam koşulları kaynaklı ETEC çoğalımı ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir [76].

Patojen özellik gösteren *E. coli* suşlarının ortak patojenite özellikleri arasında kolonizasyon yer alıp normalde koloni oluşturmaması gereken yerler olan ince bağırsak ve üretra gibi organlarda da kolonizasyon yaptıkları gözlenmektedir. ETEC'lerinde dahil olduğu bir grup patojenik *E. coli* (EPEC, EHEC ve ETEC'ler) insanda enfeksiyon yapmaktan sorumlu virülans faktörleri harici kolonizasyon faktörleri ile hayvanlarda da patojeniteyi oluştururlar [69].

ETEC suşlarında patojeniteyi incebağırsak epitel yüzeyine yapışma ve kolonizasyondan sorumlu faktörler ile sonrasında salgılanan enterotoksinler sağlar [77].

ETEC'lerde patojenitenin ilk basamağını oluşturan yapışma da görevli elemanlar arasında yer alan fimbrialar ve fibriller çeşitlilik göstermektedir [69]. ETEC'lerde şaperon-usher yolu ya da diğer şaperon yolları vasıtasıyla bir araya getirilen fimbrialar, gerçekleştirilen kolonizasyonda birincil virülans faktörü görevindedir [78]. Kolonizasyonda görevli Kolonizasyon Faktörü Antijenleri (CFA'ler) diye ifade edilen fimbriaların insanda kolonizasyon yapan çeşitleri arasında CFI, CFII, CFIII ve CFIV yer almaktadır [79]. Kolonizasyon Faktörleri (CF)'nin insanda tespit edilenlerinin sayısı 22'den fazla olup bunların hepsi fimbrialar yapıda olmayıp fibriller yapıda olanları da bulunmaktadır [80]. İnsanlarda tespit edilen kolonizasyon faktörlerinin büyük grubunu CFAI ve Coli Surface (CS) 1-6 antijenleri (CFAII ve CFAIV) oluştururken küçük bölümünü CS7 ile başlayan grup oluşturur. ETEC suşlarının bazılarında tek CS ekspre edilirken bazılarında ise birden fazlası birlikte ekspre edilir. ETEC suşları tarafından üretilen kolonizasyon faktörleri bazı suşlarda fimbriyalardan oluşurken bazılarında bunlara fibrillerde eşlik eder. Suşlarca üretilen fimbriaların çeşitleri büyüklük ve sayıları da farklılık göstermektedir. İnce esnek 2-3 nm çapındaki fibriller yapıdaki CS3'ler CFAII suşları tarafından tek başına sentezlenebildiği gibi 5-7 nm çapındaki sert fimbrialar olan CS1 ve CS2 ile birlikte de üretilebilmektedir. Suşlar tarafından üretilen CS'lerden bazılarının (CS6) ise henüz morfolojileri tespit edilmemiştir [81].

CF'leri aracılığıyla ince bağırsak yüzeyine yapışmanın gerçekleşmesinden sonraki patojenitenin oluşumundaki ikinci basamağı ETEC'ler tarafından enterotoksin salgılanması oluşturur. Salgılanan bu toksinler iyon kanallarının geçirgenliğini bozmanın yanında salgı oluşumu ile sulu ishal oluşumuna neden olur [82]. ETEC suşları ısıya duyarlı (LT) ve ısıya dayanıklı (RT) enterotoksinlerden ya birini ya da ikisini birden sentezleyebilmektedir. Enterotoksinlerden LT'nin, 60x10(6) Da'lık bir plazmit kaynaklı sentezlendiği domuzlarda gözlenen ishal etkeni ETEC'lerin analizi ile anlaşılmıştır [83]. Gerek LT gerek RT toksinler genel olarak transpozon temelli plazmidlerce kodlanmaktadır [84].

2.1.5.5. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)

Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde infantil diyare nedeni olarak görülen enteropatojenik *E. coli* (EPEC)'lerin bu ülkelerde görülme düzeyi ve etki gücü farklılık göstermektedir [30]. Gelişmiş ülkelerde EPEC salgınları, bebeklerde sporadik vakalar olarak düşük oranlarda görülürken, gelişmekte olan ülkelere akut vakalar olarak görülüp yeni doğanlarda %30 oranında ölümlere neden olan bir mortalite nedeni olarak bilinmektedir [85,

86]. EPEC'ler enterik patojenler arasında ilk sırayı almış olup 1940 ve 1950'li yıllarda sanayileşmiş ülkelerde ishale bağlantısı ölüm nedenlerinin ilk *E. coli* patotipleridir [87, 88]. Gelişmiş toplumlar için bebek ishallerinde gelişmekte olan topluluklara nazaran önceki popüleritesinde yer almayan EPEC'lerin meydana getirdiği ishalin sulu olması buna bağlı dehidratasyona ve halsizliğe neden olması görülen ilk septomlar arasında olmaktadır. Atılan dışkı genellikle kan içermezken nadiren bu verinin gözlemlendiği olmuştur. Ayrıca mukus içermesi, ateş yapması, kusmayı tetiklemesi diğer semptomları arasında yer alır ve bunlar genellikle birkaç günlük bir süreçte etkilidir. Kronikleşmiş olanlarda bu süre uzayabilmektedir [69].

EPEC'lerin diyare semptomlarını meydana getirme süreci değişken olmakla birlikte 0-6 gün arasında bir süreçte kontaminasyon ve çoğalım gözlenirken bazen kuluçka süreci 2-20 gün arasındaki bir süreçte de gözlenebilir. Bu süreç farklılıkları gözlenen semptomların etkisiyle de alakalı olarak beslenme güçlüğüne de neden olarak kişilerin ölümlerini de tetikleyebilmektedir [89]. İnkübasyon süresinin çalışılan bazı EPEC suşları için 0,5 saat ile 34 saat arasında değişen daha kısa sürelerde gerçekleştiği tespit edilmiştir [90].

EPEC'lere dahil serotiplerin tanımlanmasında ilk fenotipik, belirteç doku hücrelerine yapışma ve silme (A/E) etkisini oluşturan olaylar ve etkileri göstermesidir [64]. Enterositlere yapışarak yüzeylerindeki mikrovillusların çözünmesi ile histopatojenik lezyon oluşumuna neden olmaktadır [87]. Yapışmayı takip eden Tip III salgılama sistemi kaynaklı protein translokasyonu ve kaide teşekkülü olmak üzere üç aşamada gerçekleşen süreçte yapışma sonrası indüklenen lezyon ile hücre iskeleti bozulup inflamatuvar yanıt ve diyare gözlenir [69].

EPEC'ler kendi içinde tipik EPEC (tEPEC) ve atipik EPEC (aEPEC) olmak üzere 2 gruba ayrılırlar. Her iki grupta patojenik özellik saptanmıştır. EPEC'lerin ayrımında temel etmen tEPEC'lerde bulunup aEPEC lerde bulunmayan yapışmadan sorumlu plazmitin varlık ya da yokluğudur. pEAF plazmiti denilen plazmit tEPEC'ler için patojeniteden sorumlu demet piluslarının ekspresyonundan sorumludur [91].

EPEC'lerde patojeniteden sorumlu virülans genleri kromozomal ve plazmit kaynaklıdır. Kromozomal kaynaklı virülans genleri PAI'nda yer almaktadır. EPEC'lerde patojeniteden sorumlu olan virülans faktörlerinin sentezinden sorumlu plazmit aileleri görev almaktadır ve her aile birden çok virülans faktörünün sentezinden sorumludur [92]. EPEC'lerin patojenezinde ilk aşama lokal yapışma (LA)'dır ve bunun gerçekleşmesini yöneten EAF plazmitinin 60 megadalton (MDa) büyüklüğünde olduğu bulunmuştur [93].

70-100 kb'lık uzunluğa sahip bu plazmit, “demet oluşturan pilus”(BFP) diye adlandırılan Tip IV Pilus denilen her birinin uzunluğu 10 µm'den büyük pilusların kodlanmasını sağlar [94, 69]. EPEC'lerde bakterilerin birbirine yapışmasından sorumlu olan yalnız epitale yapışmadaki direk sorumluluğu bilinmeyen BFP'nin ekspresyonunda 14 genden oluşan bir gen kümesi görev alır. pEAF üzerinde yer alan bu operonun başlangıcını sağlayan yapısal alt ünite *bfpA* tarafından şifrelenir [95]. pEAF üzerinde yer alan ikinci operon ise Enterosit silinme lokusu (LEE) ve *bfp* operonundaki genlerin regülasyonunda görevli *per* grubu genlerden (*perA*, *perB*, *perC*) oluşmaktadır [96]. EPEC'lerde epitel hücreye yüzeysel yapışmayı takip eden ikinci patojenite adımı sinyal iletimi olup, bu sürecin düzenlenmesinde görevli virülans genleri kromozom kaynaklı 35 kb büyüklüğündeki LEE diye ifade edilen PAI'sında yer almaktadır. Bu genler; *sep* ve *esc* genleri gibi tip III segresyon sistemi aparatını şifreleyen genler; *espA*, *espD*, *espB* diye adlandırılan efektör proteinlerini kodlayan genler ve intimin adlı bakteriyel bir adezin kodlayan *eae* genidir [64]. Ayrıca ökaryotik hücre membranına yapışmayı kolaylaştıran bakterinin kendi intimin efektörü için kendi reseptör proteininin sentezlenmesini kodlayan *Tir* genidir [97]. Kromozom kaynaklı bu gen hücre membranına yerleştikten sonra intimin protein için bir pompa gibi görev yaparken diğer yandan ökaryotik sitozol ile temasıyla birlikte aktin filamente şekillenmesi ve kaide oluşumu ile neticelendirilerek patojenitede görev alır ve patojenitenin son aşaması ise samimi bağlanma aşaması ile sonuçlanır [98].

Patojenik özellikteki her iki grup EPEC'ler arasındaki temel fark; tEPEC'ler, LEE PAI ve EAF plazmitinin ikisini de bulundururken; aEPEC'lerin ise LEE bulunurken EAF plazmitine sahip olmamasıdır. tEPEC'lerde sahip olunan LEE ve EAF üzerindeki virülans genleri yanında bazı istisnai sitoletal genişleyen toksin üretimi (CDT) ve enteroagregatif ısıya dayanıklı toksin üretiminden (EAST1) sorumlu virülans genleri de bulunabilir. aEPEC'lerde bulunmayan EAF kaynaklı virülans genleri yerine patojenitede EAST1 ile LEE üzerinden kodlanmayan virülans elemanlarının ekspresyonundan sorumlu genler suşlarda sıklıkla yer almaktadır. LEE PAI'na sahip olmasına rağmen mevcut virülans faktörleri bakımından aEPEC'ler 2 grup altında ele alınırlar. Bunlar; LEE ve LEE'de bulunmayan genler tarafından ekspresyonu yapılan virülans faktörlerine sahip olanlar ve sadece LEE bölgesi üzerinden eksprese edilen virülans faktörlerini bulunduranlardır. aEPEC'lerdeki bu farklılıklara rağmen istisnai suşlar hariç olmak üzere tEPEC'lerde homolog virülans faktörlerine rastlanır. aEPEC'leri tEPEC'lerden ayıran bir diğer özellik ise bir serotip içinde farklı her iki aEPEC grubunu ait suşlara sahip olabilmeleridir [99]. BFP bulundurmayan

aEPEC’lerde samimi yapışmadan sorumlu araçlarda farklılık göstermekte ve bu farklılığa bağlı yapışma tipleri de çeşitlenmektedir. Buna göre; lokal yapışma (LA); intimin aracılığıyla lokalize benzeri yapışma (LAL); Afa yapıştırıcı aracılı yaygın yapışma (DA) ve toplayıcı yapıştırıcı aracılı toplu yapışma (AA) diye dörde ayrılırlar. tEPEC’lerde ise sadece LA gözlenir [99, 91]. LA ve LAL yapışmada kullanılan intimin bakımından da tEPEC’ler ve aEPEC’ler arasında farklılık gözlenmektedir [99]. EAF plazmitinin bulunmadığı aEPEC’lerin buna sahip olan tEPEC’lere nazaran öldürücü gücü daha azdır [100]. EPEC’ler arasındaki bir diğer fark; infantil ishalin tEPEC’ler nedeniyle gözlenmesi gelişmekte olan ülkelerde yaygınken; aEPEC kaynaklı ishale ise gelişmiş ülkelerde daha az oranda rastlanmasıdır. Bir diğer fark rezervuar kaynaklıdır. tEPEC’ler için mevcut rezervuar sadece insanlar iken aEPEC’lerde rezervuar kaynakları insanlar ve hayvanlar olarak çeşitlenmektedir [99].

EPEC’lerde BFP’ler dışında diğer fimbriaların da bulunduğu ve bunlar arasında Tip I fimbria’ların olduğu ancak epitel yüzeyine yapışmada aracılık rolü üstlenmediği tespit edilmiştir [101]. Ayrıca B171 suşu üzerinde yapılan boyama çalışmaları ile 7 nm genişlikteki pilus yapısına, 2-3 nm genişlikteki fibrillere ve daha uzun yapılı kamçı benzeri yapılara rastlanmıştır [102]. EPEC’ler hücre membranı içine belli ölçüde yerleşirken hücre içinde çoğalma özelliği göstermezler ve hücredeki fagositik kofullardan kaçarak korunma özelliği göstermezler [103].

2.1.5.6. Yapışık invaziv *E. coli* (AIEC)

E. coli patotiplerinden biri olan yapışık invaziv *E. coli* (AIEC) ilk olarak 1999 yılında Crohn Hastalığı (CD) bulunan kişilerin ileum mukozasında tespit edilmiştir. Çalışmada bakteriyel istila etkeni olarak incelenen örneklerin istilaya neden olabilecek *E. coli* patotiplerinden (EIEC, ETEC, EPEC) hiçbire ait tanımlayıcı protein belirteçlerinin yer almaması yeni patolojik *E. coli* grubunun tanımlanmasına neden olmuştur [104]. Yapılan çalışmalarda hem erken hem de kronik ileal lezyona sahip hastalardan alınan örneklerdeki aerob ve anaerob toplam bakteri sayısının %50’sinden fazlasına sahip olduğu görülmüştür [105]. DEC üyeleri genel olarak konak hücreyi enfeksiyonu takip eden süreçte apoptotik sürece sürükleyip hücre ölümünü indüklerler [106]. AIEC suşları konak hücreye yapıştıktan sonra konağı istila ederek makrofajlar içinde çoğalırken hücre ölümünü indüklemez ve böylece konağın immun sisteminden kaçarak yaşamını devam ettirir [107]. AIEC patotipi

intestinal *E. coli* patotiplerinden farklı virölans etmenlerine sahip olduğu bu özellikleri nedeni ile intestinal patotiplerden ExPEC'lere daha yakındır [108].

AIEC suşlarındaki virölans faktörleri arasında yer alan *fimH* geni en fazla araştırılmış faktördür. Bu gen bakterinin konak hücreye yapışması için yapışmaya müsaade eden bir özelliğin kodlanmasını sağlar. Böylece bakteri glikosile olmuş ya da olmamış konak hücre reseptörleri ya da hücrenin matrisi ile bağlantılı glikosile reseptör, çeşitli kollojen (tip I veya tip IV), laminin ya da fibronektin'e bağlanır [109]. *fimH* geni tarafından üretilen fimH; fim operonu tarafından kodlanıp ekspre edilen Tip 1 pilusunun alt terminal ucunda yer alır. CD hastalarının ileum mukozası tarafından ekspresyonu yoğun olan karsinoembriyonik antijenle ilişkili hücre adezyon molekülü 6 (CEACAM6) reseptörüne bu terminal alt uç bağlanır [110]. Patojen olmayan *E. coli*'lerde de gözlenen Tip 1 Pili tek başına AIEC'lerde patojeniteden sorumlu değildir. Bir diğer virölans faktörü *lpf* geni tarafından kodlanan uzun polar pilus (LPF)' tur. LPF'ler, Peyer yamalarının (PP) yüzeyini kaplayan özel epitel hücreler olan membranöz epitel hücreleri (M hücreleri) ile etkileşime girerek bunların arasında AIEC'lerin yer değiştirmesini sağlarlar. LPF pozitiflik bu manada AIEC tanımlamasında önemli yere sahip olup LPF-negatiflerde bu transfer bozulur. CD'lerinde LPF ekspresyonunda belirgin bir artış gözlenmektedir [111]. AIEC'lerin bu yolla translokasyonunda görev alan Tip 1 pili ve LPF aracılığıyla transloke olan bakteriler makrofajlar tarafından yutulmaktan kurtularak olgun fagolizomların içine geçer ve çoğalırlar. Bu durumda sitokinlerin üretimi artarak sürekli hale gelir ve makrofaj aktivasyonunda kronikleşme gözlenir [107]. CD'lerde sıklıkla gözlenen bir diğer durum AIEC ile enfekte makrofajlarda füzyonla dev hücrelerin oluşumu ve kümelenmeleri ve üzerlerinde lenfositlerin birikmesiyle granülom oluşumudur [112]. Diğer bir virölans faktörü ise dış zar proteinleri (OPM'ler) ve dış zar vezikülleri (OPV'ler)' dir. OPM'ler; besin transferi, atık boşaltımı, hücre savunmasından kaçma, patojenite oluşturma özellikleri nedeni ile bakterinin dış ortamla ilk temas noktası olduklarından patojenite tespitinde önemli bileşiklerdir. AIEC'lerde patojeniteden sorumlu 3 protein tespit edilmiştir. *chuA* ve *fitA* genleri tarafından üretilen 2 protein hücreye demir alımı yoluyla AIEC'lerin büyümelerinden sorumlu iken *eefC* geni tarafından üretilen proteinin ise çoklu ilaç akışında görevli bir protein olduğu düşünülmektedir [113]. Makrofajlar içindeki AIEC'ler *chuA* genini yukarı yönlü regüle ederek dispiyozu ve kalıcılıklarını artırır [114]. *ibeA* geninin de regülasyonu AIEC patotiplerinin makrofajlarda kalıcılığını artırır. Patojenitenin hücre istilası aşamasında *ompA*, *ibeA* ve dış zar vezikülleri görev alır [115]. AIEC'lerin

patojenitesinde görevli genleri; bağırsak epiteline yapışma istilasında sorumlu genler, PP ile etkileşim ve makrofajlar içinde hayatta kalma eğilimi genleri, metabolik düzenleme ve toksinler diye 3 grupta ele almamız mümkündür. Bağırsak epiteline yapışma istilasında sorumlu genler; *FimH Type 1*, *K 1*, *kpsMTII*, *afaC*, *ompC*, *ipaH*, *ial* ve *chiA*'dır. Metabolik düzenleme ve toksinler ile ilgili genler; *chuA*, *irp2*, *sit* operon/*sitA*, *pdu* operon/*pduC*, *fyuA/ybt*, *flhDC* and *fliA*, *ratA* ve *hfq*'dir. PP ile etkileşim ve makrofajlar içinde hayatta kalma eğilimi genleri; *ibeA*, *lpf* operon, *htrA* ve *dsbA*'dir [116]. AIEC'lerde bulunan diğer bir virülans faktörü bağırsak epitel hücrelerine yapışmayı kolaylaştıran proteazlardır [117]. Serin proteaz ototaşıyıcıları (SPATE) arasında yer alan vakuolatör ototransporter toksin (vat) tanımlanmış bir diğer virülans faktörüdür. Bağırsak epitel hücrelerinin (ICE) yüzeyindeki musin içeriğinde ve mukus vizkozitesinde bozunma sonucu patojenik kolonileşmeyi artırır [117].

AIEC patotiplerinin tek rezervuarı insanlar olmayıp diğer memeliler de bu patojenlerin rezervuarı olabilmektedir. Bunlar arasında granüloamatöz kolit ve sığır mastitisi gözlenen kediler, köpekler ve sığırlar sayılabilmektedir [113].

2.1.5.7. Yaygın yapışık *E. coli* (DAEC)

DEC gruplarından yedincisini oluşturan yaygın yapışık *E. coli* (DAEC)'ler sahip oldukları afimbrial kılıfları nedeniyle (Afa) Hep-2 hücrelerine yaygın yapışma (DA) özelliği göstermesi ile karakterize edilmiştir [118]. Küçük çocuklarda (18 ay-5 yaş arası) ishal, yetişkinlerde idrar yolu enfeksiyonu ve gebelikte komplikasyonlarla bağlantılı olarak ishalle ilişkilendirilen DAEC suşları olduğu gibi bağırsakta semptom göstermeyen mikrobiyota üyesi olarak değişik yaş gruplarında bulunan DAEC suşları da bulunmaktadır [119, 120]. İshal oluşum etkeni olan DAEC patovarlara insan ya da hayvanların dışkısı ile temas eden su ya da besinin tüketimi yoluyla bulaşan, ileri evrelerde sulu ve kanlı dışkı, ateş, dehidratasyon ve karın ağrısı ile kendini gösterir; fakat diğer DEC'lere nazaran daha az görülme insidansına sahiptir [121]. Çocuklarda sulu ishal oluşum etkenleri arasındaki DAEC suşlarından bazıları semptomları kalıcı hale getirirken; daha ileri yaş gruplarında semptom göstermeksizin inflamatuvar bağırsak hastalıklarının (Cronh, çölyak, inflamatuvar bağırsak sendromu gibi) kronikleşmesinde de görev alabilirler [122]. DAEC suşları başlıca tipik DEAC ve atipik DAEC olmak üzere iki sınıfa ayrılan heterojenik bir bakteri grubudur. Tipik DAEC sınıfı bakteriler özdeş genotipe sahip olan Afa/Dr adenzinlerini (AfaE-I, AfaE-II, AfaE-III, AfaE-V, Dr, Dr-II, F1845 ve NFA-I) bulundurma özelliğine sahip bakterilerdir.

Afa/Dr DAEC'ler adenozinlerin bağlandığı antijenlere bağlı olarak 2 alt gruba ayrılır. Bunlar; insan bozunmayı hızlandırıcı faktör olan DAF'a (veya hDAF'a) bağlananlar Afa/Dr DAF DAEC'ler (AfaE-I ve Dr-II suşları) ve karsinoembriyogenik antijen (CEA)'e bağlananlar Afa/Dr CEA DAEC'ler (Afa-III, Dr ve F1845 suşları)'dır. Atipik DAEC sınıfı; AfaE-VII, AfaE-VIII, AAF-I, AAF-II ve AAF-III adezinlerini ekspre ederek insana ait DAF'a bağlanmayan suşlardan oluşan 1. Alt grup ile EPEC'lerdeki LEE PAI gibi PAI'larını içeren yaygın yapışmadan sorumlu Afa/Dr adenozinleri ya da diğer yapıştırıcıları ekspre eden suşları içeren 2. alt gruptan oluşur [123, 124].

DAEC patotipinin patojenite süreci; patojen bakterinin konak hücre (enterik epiteryal hücreler veya üriner sistem epitel hücreleri) yüzeyine yapışması ile başlar. Yapışmada görev alan adezinler; Dr grubu fimbrial adezinler veya Afa grubu afimbrial adezinlerdir. Bunlardan Afa grubu adenozinler DAF ile birleşir ve konak hücre iskeletinde bozulma ve mikrovillus silinmesini tetiklerler. Dr grubu ise CEA'ya bağlanarak CEACAM'ların yüzeyde agregasyonu ve mikrovillus silinmesine neden olabilir. Bazı atipik DAEC suşlarında Afa/Dr adezinlerinin ekspresyonu gerçekleşmediğinden bunlar yapışmadan sorumlu AIDA-I adezinini kodlarlar [125]. İdrar yolu enfeksiyon etkeni olarak görev alan DAEC suşlarında ise Dr adezinler tip IV kollajenlere bağlanarak konakla birleşme yapar [126]. Afa/Dr adenozin, DAF ve flagella birliktelikleri IL-8 salgılanmasını ve polimorfonükleer nötrofil (PMN) göçünü artırır. Bu durum PMN'lerin aracılık ettiği fagositozun DAF aşırı yukarı regülasyonu ile azalmasına ve patojen yığılmasının artmasına neden olur. Adezinler patojenitede önemli virülans faktörleri olmasının yanında bazı DAEC suşları tarafından salgılanan diğer bir virülans faktörü SPATE proteinleridir. SPATE'ler iki gruba ayrılırlar. 1. Grup sitotoksik olan; hücre dışı serin proteaz (*espP* geni), sigA toksin (*sigA* geni), salgılanan ototransporter toksin (*sat* geni), plazmit kodlu toksin (*pet* geni)'den oluşur. 2. Grup sitotoksik olmayan bağırsak kolonizasyonuna dahil olan proteaz (*pic* geni)'dir. Bunlara ek olarak DAEC'lerin bazı suşlarında *fim* gen kümesi tarafından kodlanan Tip 1 pili ve pili adezini ile *astA* geni tarafından kodlanan enteroagregatif RT toksin 1 diğer virülans faktörlerindendir [127]. Ek olarak DAEC'lerde PAP pilinin ucunda konak zarındaki glikolipitlere yapışmadan sorumlu diğer bir adezin *pap* gen grubu tarafından sentezlenen diğer bir virülans faktörüdür [120]. Ek virülans faktörlerini sentezleyen genler arasında; *modD* (molipten taşıma sistemi sentezi), *irp2* (demir iyon taşınımından sorumlu), *icuB* ve *shuA* (aerobactin sentezinden ve kullanılmasından sorumlu) genleri verilebilir [124].

DAEC'lerde patojeniteden sorumlu virölans faktörleri kromozomal veya plazmid kaynaklı olabilmektedir. DAEC suşlarından bazılarında yer alan Pap pili operonu genleri ve hemolisin A'yı kodlayan *hlyA* geni bir PAI'nda yer almaktadır. Çocuklarda gözlenen ishal etkeni olan bazı DAEC suşlarında ishal oluşumundan sorumlu genler (*daaA-E* genleri) kromozom ya da plazmit kaynaklı virölans faktörleridir. AIDA-I adezini iki plazmit kaynaklı bir virölans faktörüdür [124].

2.1.5.8. Ekstraintestinal patolojik *E. coli* (ExPEC)

Çeşitli enteropatojenik grupları içinde barındıran *E. coli*'nin bağırsak dışında patojenik etki gösteren izolatların dahil olduğu grup Ekstrapatojenik *E. coli* (ExPEC)'dir [128]. Hem toplumsal kaynaklı hem de hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan ExPEC'ler rezervuarı olan insan ve hayvanların intestinal sistemleri dışında yerleşerek enfeksiyonlara neden olurlar. ExPEC'lerin enfeksiyona neden oldukları yerler arasında; dolaşım sistemi, idrar yolu, prostat gibi kısımlar yer alır [129]. Ekstraintestinal sistemlerde enfeksiyona neden olan bu patojenlerin enfeksiyon çeşitleri değişse de genel olarak ExPEC'ler bir grup (ST) klonal soya dahildir [130]. Antimikrobiyal direnç kazanma özellikleri nedeniyle sağlık hizmetlerinde gecikme, ekonomik kayıp ve mortalitede artış gibi önemli sonuçların oluşumunu tetiklerler [131]. ExPEC varyantları arasında; Üropatojenik *E. coli* (UPEC), kuş patojeni *E. coli* (APEC), neonatal menenjitte sorumlu *E. coli* (NMEC) ve sepsisemeye neden olan *E. coli* (SEPEC) yer almaktadır [69].

Üropatojenik *E. coli* (UPEC)

ExPEC'ler içinde önemli bir morbilite mortalite nedeni olan idrar yolu enfeksiyon (İYE)'lerinin, 18 yaş üstü kadınların yaşamları boyunca tahmini %20 oranında, yıllık %11 oranında görülme olasılığına sahip olan toplum kökenli enfeksiyonların, başlıca etkenini üropatojenik *E. coli* (UPEC)'ler oluşturur. UPEC'ler hem toplum kaynaklı hem de hastane kaynaklı İYE'lerin nedeni olmakla birlikte toplum kaynaklı İYE'lerde başrolü alma oranı (%70-95) hastane kaynaklıya (%50) göre daha fazladır [132]. UPEC'ler öncül rezervuarları olan insanların intestinal sistem floralarından çeşitli virölans faktörleri kazanımı sonucu üriner sisteme geçerek İYE etkeni haline dönüşürler [132, 133].

UPEC'ler sahip oldukları virölans faktörlerine göre moleküler tanımlaması yapıldığında; *E. coli* suşlarının dahil edildiği 5 gruptan (A, B1, B2, D, E) B grubunda ana üyelerinin ve daha az bir grup suşun ise D grubunda yer aldığı anlaşılmıştır [134]. *E. coli*

suşlarının genomik içerikleri, patojenlerin kommensallerden daha büyüktür ve UPEC'ler 5 Mb ya da üzerindeki genomik içerikle intestinal patojenlerden daha zengin bir içeriğe sahiplerdir. Antimikrobiyal direnç gösteren UPEC'ler kazanılan MGE'ler nedeniyle daha zengin bir genomik içerik bulundurur [135].

UPEC'lerde yüksek genetik çeşitlilik gözlenmekte olup bu çeşitlilik virülans genlerini barındıran PAI denilen MGE'lerce gerçekleştirilir [136]. UPEC patojenitesinin seviyesi sahip olunan bu virülans genleri yanında bunların ekspresyon düzeyiyle de ilişkilidir [137]. UPEC'lerde patojenite etkeni olan virülans faktörleri; bakterinin hücre yüzeysel faktörleri ve bakteriler tarafından salgılanan veya uzaklaştırılan virülans faktörleri diye ikiye ayrılmaktadır [138]. Yüzeyden sentezlenen virülans faktörleri arasında; pililer, adezinler, kapsül, lipoproteinler, flagella sayılabilir.

UPEC'lerde konak hücreye bağlanmada görev alan bir seri fimbria bulunmaktadır. Üretral epitele yapışmada görev alan ve kolonizasyonu teşvik eden fimbrilar içinde Tip 1 fimbria, Tip 3 fimbria, S fimbria, P fimbria, Auf fimbria, F1C fimbria, F9 fimbrialar yer alır. UPEC'ler için diğer önemli virülans faktörleri arasında yer alan adezinler arasında curli ve Afa afimbrial adezinleri yanında Dr adezini ile bazıları şaperon-usher (CU) sınıfı üyesi olan fimbrial adezinlerde (Tip 1 fimbria, Tip 3 fimbria, S fimbria, P-fimbria, Auf fimbria, F1C fimbria, F9 fimbria) yer alır [139]. Farklı adezinler patojenitede görevli önemli yüzeysel virülans faktörleri olup virülansa katkıları farklı şekillerdedir. Bunlar; patojen ya da konak hücrenin sinyal yollarını etkinleştirmek; bakteriyel ürünlerin konak hücreye nüfuzunu kolaylaştırmak ve patojen istilasını tetiklemek'dir [140]. İnsanda idrar kesesi, üreter ve henle kulbunda bağlanacağı reseptörleri bulunan Tip 1 fimbrialar CU sınıfına dahil mannoza duyarlı adezinler grubunda yer alırlar. 9 genin dahil olduğu bir operon (*fimABCDEFGHI*) tarafından ekspre edilen 10 nm kalınlık ve 2 µm uzunluğa sahip Tip 1 fimbria, ucundaki temel adezin görevini üstlenen FimH proteini ve altındaki bir dizi proteinle birlikte oluşur [139]. UPEC'lerde gözlenen diğer bir virülans faktörü olan Tip 3 fimbria bir grup *mrk* genlerinden (*mrkABCDEFG*) oluşan operon tarafından kodlanan, patojenitede yapışmadan sorumlu ana adezin görevini üstlenen proteini *mrkD* geni tarafından sentezlenen bir fimbiyadır. Katater bağlantılı idrar yolu enfeksiyonlarında biyofilm oluşum nedeni olarak görülen Tip 3 fimbriaların UPEC'lerdeki kökeni, *Enterobacteriaceae* üyesi *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*)'den plazmit kaynaklı *mrk* gen kümesinin yatay transferidir [139, 140]. UPEC'lerde bulunan F1C fimbriası 7 genden oluşan *foc* operonu (*focACDFGHI*) tarafından kodlanır ve patojenitede görev alan adezyon proteini *focH* geni tarafından

sentezlenir. F1C fimbriyası sebebiyle patojenite oluşturan suşlar UPEC patotiplerinin ¼'den fazlasını (%30) ihtiva eder [139]. F1C fimbriaları konak hücre membran uzantıları ile reseptörlere bağlanırlar. Bunlar; sadece böbreklerde yer alan globotriaesilseramid'ler ile böbrek, idrar kesesi ve üreter epiteryal hücre membranlarında yer alan galatosilseramid'lerdir [142]. Patojeniteye sebep olan *E. coli*'lerin %14'ünü oluşturan F1C fimbrialarının tübüllerden distal tüp epitellerine de yapışma gösteren yalnız yapışması hemoglütine olmayan bir patotiptir [143]. F1C fimbrialardan CU grubu fimbrialar olup bunların sentezinden sorumlu operon PAI üzerinde taşınmaktadır [142]. S fimbrialar 9 genden oluşan bir sfa operonu (*sfaCBADEFGSH*) tarafından kodlanır [144]. Sfa operonundaki *sfaS* geninin fimbrial adezin olduğu ve fimbrianın tepesinde yer aldığı tespit edilmiştir. Adezyonda *sfaA*, *sfaS* ve *sfaH* proteinlerinin belli oranlarda katkıları bulunmaktadır [139]. S fimbriaların adezyonundan sorumlu proteinin 12 kDa'luk bir ağırlığa sahip olduğu tespit edilmiştir [145]. S fimbria içeren suşlar UPEC'lerin 1/5'inden fazlasına (> %22) ihtiva etmektedir [139]. Mannoza dirençli özellik gösteren S fimbrialar epiteryal ya da endoteryal böbrek hücre yüzeylerindeki glikoproteinlerin uzantısı olan α -sialil-2,3-galaktozlara bağlanırlar ve biyofilm oluşumuna neden olan fimbrialardır [146]. UPEC'lerde yer alan CU grubu virülans faktörü olan fimbrialardan biri de P fimbrialardır [142]. 11 genden oluşan pap operonu tarafından kodlanan P fimbriasının taban kısmını *papA* geni sentezlerken adezyonda görev alan kısmını *papG* geni sentezler. Distal uçta yer alan adezinden sorumlu *papG* geninin UPEC patotiplerinde 3 farklı izosınıfta yer aldığı gözlenmiştir. Bunlar; *papGI*, *papGII*, *papGIII* şeklinde olup bunlardan *papGII*'nin insanlarda majör sınıfı temsil edip piyelonefriti ve bakteriyemi ile ilişkilidir. *papGIII* sınıfı insanlarda sistite neden olurken kedi ve köpeklerde ise genitoüriner enfeksiyonlarla ilişkili bulunmuştur. Tespit edilen 3 izosınıfa dahil 4 farklı *papG* adezini Gal (α 1-4) Gal şeklindeki ortak kısmını barındıran böbrek epitel yüzeyindeki glikosfingolipitlere bağlanmaktadır [147]. Mannoza dirençli P fimbrialar UPEC'lerin ¾'üne yakınında (%70) gözlenir [139]. UPEC'lerde yaygın gözlenen P fimbriaların *papG* izosınıflarının kromozomdaki yerleşimleri farklı olmakla birlikte *pap* gen operonunun spesifik tRNA genleri içinde ya da bitişiğindeki PAI'ları içinde bulunmuş ve HGT ile kazanılmıştır [147]. UPEC'lerde gözlenen CU grubu diğer bir virülans faktörü 7 genden oluşan auf operonu (*aufABCDEFG*) tarafından sentezlenen auf fimbria'dır [148]. Fimbrianın tabanının sentezinde *aufA* geni görev alırken adezyonda görevli bileşiğin sentezi *aufG* geni tarafından yapılmaktadır. Adezyon biriminin yapıldığı reseptör henüz netleşmemiştir. UPEC patotiplerinde auf fimbria görülme oranı izolasyonu yapılanların ¾

kadardır [139]. Fimbrial adezinleri ile patojeniteden sorumlu F9 fimbria izole edilen UPEC'lerin %78'inde rastlanan f9 operonu tarafından kodlanan diğer bir virülans etkenidir [139]. F9 fimbriaların sentezinde görev alan genlerden *c1936* geni fimbrianın taban kısmını oluşturan majör alt birimi kodlarken, *c1931* geni adezinden sorumlu birimi kodlar. CU grubu fimbrialar içinde yer alan f9 fimbria sahip olduğu gen kümesini (*c1931-c1936*) HGT ile kazanmış ve biyofilm oluşumunu teşvik etmiştir [148]. F9 fimbrialarının adezini konağa Galβ1-3GlcNAc ve lakto-N-tetraoz glikan reseptörleri ile yapışmaktadır [149]. Dr fimbria UPEC'lerde gözlenen diğer bir virülans faktörü olup *draABCDPE* gen kümesi tarafından kodlanmaktadır. Bu fimbria F1-G1 loop long (FGL) üyesi bir Şaperon-Usher fimbria (CUF)'dır ve İYE'lerde daha fazla kronik tekrarlayan sistit ve piyelonefrit oluşumunda önemli rol oynar. Dr fimbrial adezinlerinin sentezinden sorumlu olan fimbrianın *draA* geni transkripsiyonel alt birimin sentezini kodlarken, *draE* adezyondan sorumlu birimlerin kodlanmasında görevlidir. İlk olarak 1984 yılında keşfedilen Dr fimbriaların adezinleri farklı reseptörlerle bağlanma özelliği gösterirler. Bunlar; Dr kan grubu antijeni (Dra), DAF, α5β1-integrin, CEACAM'lar ve Tip-IV kollajenler'dir [150]. H1845 fimbriaları *daa* gen operonu (*daaFABCDPE*) tarafından kodlanmakta olup bu genlerden *daaE* adezinden sorumlu birimi kodlar. CU grubu fimbriaları içinde yer alan F1845 fimbriaları *daaB* şaperon birimini *daaC* usher grubunu kodlayan diyare vakalarından izole edilen bir virülans faktörüdür [151]. UPEC'lerde fimbrial olmayan adezinler curli ve Afa'dır. Curli adezinleri iki operon (*csgBAC* ve *csgDEFG*) tarafından ekspre edilen insan idrar kesesi yüzeyine yapışma ve biyofilm oluşumunda rol alan amiloid lifler grubundaki virülans faktörleri arasında yer alır [152]. Curli adezinleri; insanda kan hücreleri, epitel hücreler, mukozal hücreler, ürotelyal hücreler, endotel hücreler ve matris proteinlerine yapışma özelliği gösteren sarmal yapılı lifli uzantılardır [139]. Curli adezin ekspresyonunda artış, bakteriyemili hasta idrarlarında gözlenirken, sistit ve üst üriner sistem enfeksiyonları olan kadınlardan izole edilen UPEC'lerin ¾'ü ve daha fazlasında (%74-89); sistit ve piyelonefrit'li çocuk hastalardan izole edilen UPEC'lerin yarısından fazlasında (%56-60) gözlenmiştir. Curli liflerinin alt ana kıvrım bölümünü kodlayan *csgA* geninin görülme frekansının İYE'lerden izole edilen çoklu direnç gösteren UPEC'lerde %95'den fazla olduğu gözlenmiştir [152]. Diğer afimbrial virülans faktörleri arasında yer alan Afa adezinleri bir grup genden oluşan operon (*afaA*, *afaB*, *afaC*, *afaD* ve *AfaE*) tarafından kodlanır. Afa adezinlerinin semptom göstermeyen bakteriüremi izole edilen UPEC'lerin 1/10'undan azında (%6), piyelonefrit vakalarından izole edilenlerin ¼'üne yakınında (%56) ve sistite neden olan UPEC'lerin yarısından

fazlasında (%65) görülmektedir [139]. UPEC'lerde yüzeysel virülans faktörlerinden olan kapsüller, polisakkarit içerikli yapılardır. Bu yapılar; bakterileri hem kompleman aracılı öldürmeye hem de bağışıklığa dayalı nötrofiller gibi fagositoz kaynaklı savunmaya karşı korur [153]. Hücre dışı kapsülleme, enfeksiyon durumunda doğuştan ya da sonradan kazanılan bağışıklıklara karşı koruyucu rolünü üstlenirken ayrıca antimikrobiyal peptitlerin etkinliğini nötürleştirmede ayırıcı rol almaktadır. Hücre dışı kapsüllemeye UPEC'ler için sıklıkla gözlenen K tipi polisakkarit kapsül antijenleri K1, K9, K30 ve K92'dir [154]. K1 ve K5 tipi kapsüller konak doku bileşenlerini moleküler düzeyde taklit edebilme özelliğine sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde enfekte dokunun humoral yanıt oluşturmaya engellenir [138]. K kapsülü UPEC'ler için hücre içinde mesane epitel hücrelerinde Tip 1 pili ile birlikte işlev görerek biyofilm benzeri topluluk (IBC) oluşumunu tetiklerler. K kapsülü IBC'lere bağlı nötrofillerin infiltrasyonunu engelleyerek savunmadan kaçtığı, eksikliğinde ise bu filtrasyonun sağlanamadığı gözlenmiştir [154]. Diğer bir yüzeysel virülans faktörü ise UPEC'ler için lipopolisakkarit (LPS)'lerdir. LPS'ler UPEC'lerde hücre duvarının bileşeni olup lipit A, core ve O-antijenden oluşurlar [155]. LPS'ler bazı UPEC suşlarına bağışıklık yanıtından kaçma özelliği kazandırmıştır. Bunu sağlayan Toll benzeri reseptör 4 (TLR4) ligand lipopolisakkarittir. Proinflamatuvar NF- κ B'ye bağlı sitokinlerin salınımını azaltan UPEC izolatlarından NU14'ün LPS yapısında modifikasyona neden olan O-antijen ligaz enzim geninin (*wall*) silinmesi durumunda salınımın ve nötrofil infiltrasyonunun arttığı gözlenmiştir. Bu durum konak tepkisini ve bağışıklık tanıma sistemini düzenlemede UPEC LPS'lerin etkili olduğu fikrini belirginleştirir [156]. UPEC kaynaklı İYE'lerin %70-90'ından sorumlu olan bir diğer virülans faktörü bakterinin idrar yolu epitel hücreleri ile temasını sağlayan flagellalardır. Bakterilerin motilitesinden sorumlu flagellaların mesaneden yukarı doğru çıkarak böbrek enfeksiyonlarına da neden olduğu düşünülmektedir. İnvazin görevi üstlenen flagellaların idrar toplama kanallarını istila yeteneği piyelonefrit vakalarında gözlenmiştir [136]. Kadınlarda gözlenen akut, semptomsuz veya tekrarlı İYE nedeni olan UPEC flagellaları yapışma ve istila yanında biyofilm oluşumunu da tetikler. Flagellanın farklı aşamalarını (oluşum, olgunlaşma ve yayılma) düzenleyen gen regülasyonunun biyofilm oluşum ve büyüme safhaları ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [157].

UPEC patojenitesinde ikinci büyük sınıfı oluşturan salgılanan ya da ihraç edilen virülans faktörlerini ise toksinler ve demir alım sistemleri teşkil eder. Toksinler, UPEC'ler tarafından salgılanan konak hücrede zarar oluşumu ya da inflamatuvar yanıtın etkinleştirilmesinde görev alan bileşiklerdir. Bunlar içinde en öldürücü olanı α -hemolizin

(HlyA) adlı İYE'lerle ilişkili olan (piyelonefrit gibi) lipopolisakkarittir [155]. Konsantrasyonuna bağlı olarak konağa uyguladığı hasar miktarı değişmektedir. HlyA düşük konsantrasyonda hedef konakçı hücrelerinin (nötrofiller, lenfositler, böbrek hücreleri gibi) kontrollü ölümü olan apoptozunu indüklerken idrar kesesi hücrelerinin pullanarak dökülmesine neden olur. Yüksek konsantrasyonda ise UPEC'lerin mukozal bariyeri aşmasını sağlar, efektör bağışıklık bölgelerinin zarar görmesi ile konak besinleri ve demir depolarının patojen tarafından tüketilmesine neden olur; eritrositler ile çekirdeğe sahip konak hücrelerinin ölümünü de sağlarlar. Piyelonefrit vakalarının %50'sinde gözlenen hlyA ayrıca Ca²⁺ salınımı tetikleyerek idrar akışını da bozmaktadır [136]. Piyelonefrit etkeni UPEC'lerin 1/3'ü tarafından salgılanan diğer bir toksin olan Sitotoksik nekrotizan faktör 1 (CNF1); RhoGTPaz'a bağlı olarak görev yaparak membran kıvrımlanması ve aktin stres lif oluşumunu tetikler ve patojenin böbreğe invazyonunu sağlar. CNF1'ler üzerine yapılan çalışmalar mesane epitel hücrelerinin ölümünü sağlayan toksinin polimorfonükleer fagositik faktörlerinin görevine müdahale etmenin (in vitro) yanında idrar kesesinde oluşan ölü hücrelerin arındırılmasını tetikleyerek patojenin alt hücre tabakalarına ulaşımını (in vivo) da tetikler [136]. Piyelonefrit vaka etkeni olan SAT, İYE'lerde tespit edilen CDT, üropatojenik spesifik protein (usp) ve Toll/interlökin (IL-1) reseptörü (TIR) alanı içeren protein (Tcp)'ler mesane ve böbrekte patojeniteye neden olan diğer virülans faktörü olan toksinlerdir [155]. Diğer salgılanan virülans faktörleri ise UPEC'lerin konakta hayatta kalmasını sağlayan demir toplama sistemleridir. Konakta bulunan sınırlı miktardaki Fe³⁺ (ferrik demir)'i toplayan ve en bilinenleri yersiniabactin, salmochelin ve aerobaktin olan siderofor isimli küçük demir şelatör moleküller UPEC'ler tarafından sentezlenir. Bu moleküllerce toplanan demirle hem hayatta kalma sağlanırken biyofilm oluşumu da tetiklenmektedir [155].

Sepsis ile ilgili E. coli (SEPEC)

Sepsis ile ilgili *E. coli* (SEPEC) suşları D- Mannoze olan ortamda Vero hücrelerine yapıştığı ve hücreyi istila ettiği gözlenmiştir. Bu durum SEPEC'lerin böbrek hücrelerinden kan damarlarına geçişini açıklamada dayanak olarak düşünülmektedir. UPEC'lerde netleşmiş olan virülans faktörleri gözlenirken SEPEC'lerde faktörlerde henüz bir netlik yoktur. DEC ve ExPEC'lere ait virülans özelliklerinin bir kombinasyonuna sahip gibi görünürler. İzole edilen SEPEC suşlarının %98'inde gözlenen *fimH* geninin aktivitesi tam netleşmese de diğer ExPEC'lerde gözlenen Tip 1 fimbriayla aynı görevi üstlendiği düşünülmektedir. Böylece SEPEC'lerin konak hücreye yapışması açıklanabilmektedir.

Ayrıca SEPEC suşları sadece konak hücreye geçmek değil sepsisemiye neden olmak için kan dokusunda yaşayabilecek mekanizmaları sağlayacak genetik içeriğe sahip olmalıdır. SEPEC’lerde bulunan kan pıhtılaşması ve kan basıncında bozukluklara sebep olan *csgA* geninin varlığı septik şoka katkısını destekleyici bir veridir [158]. SEPEC suşlarının patotiplerinde ekstraintestinal yüzeylere kolonizasyona ve biyofilm oluşumuna neden olan Tip 1 fimbrianın kodlanmasından sorumlu *fim* operonuna rastlanır. Ekstraintestinal alanlarda kolonizasyonda görev alan bir diğer fimbria *pap* gen operonu tarafından kodlanan P fimbriadır ve adezyon biriminin tutulması sonrasında T lenfositler tarafından sitokin salınımının uyarılmasını da sağlar. SEPEC patotiplerinde tespit edilen curli lifini tanımlayan *csg*, *crl* genleri patojenitenin ve biyofilm oluşumunun teşvik edilmesini sağlar [159]. SEPEC bazı suşlarında adezyon dışında istiladan sorumlu *ibeA*, *B*, *C* genlerine rastlanmıştır [158, 159]. SEPEC’lerde hücreden salgılanan virülans faktörleri arasında yer alan demir alım mekanizmalarını; salmochelin isimli sifedoforun kodlanmasında *ütü* geni ile konak hemoglobindeki Fe’den faydalanmayı sağlayan *hma* ile *chu* genleri ekspre eder [159]. SEPEC patotiplerinde gözlenen fagositozdan (*iss*) ve kompleman koruyucu sistemlerinden kaçış (*traT*) ve kolonizasyonun kolaylaştırılmasını sağlayan (*colV*, *cvaC*) virülans genleri bulunmaktadır. Ayrıca kapsül oluşumunda görev alarak fagositoza karşı korunmayı sağlayan *KpsMI-neuA*, *KpsMII* genleri kapsül oluşumu sağlayarak patojenin yayılımcı tutumunu destekler. SEPEC’ler tarafından salgılanan toksinler arasında; *cnf* geni tarafından ekspre edilen hücre nekrozunu tetikleyen faktör ile *cdt* geni tarafından ekspre edilen sitoletal şişme faktörü denen konakta hücre sel döngünün durması ve ölen hücrenin şişmesine neden olan toksin yer almaktadır [159].

Neonatal bakteriyel menenjitte neden olan *E. coli* (NMEC)

ExPEC’lere dahil olup kanda hayatta kalma ve yenidoğanların menenjitini istila etme özelliğine sahip diğer bir patotip yeni doğan menenjitine neden olan *E. coli* (NMEC)’lerdir. NMEC’lerin izole edilen patotiplerinde patojeniteden sorumlu büyük virülans plazmitler üzerinde taşınan düşük demir durumunda hayatta kalmasını sağlayan aerobaktin sistemi (*iutA/iucABCD*), salmochelin siderofor sistemi (*iroBCDEN*) ve sit (*sitABCD*) sisteminin kodlanmasını sağlayan operonlar bulunmaktadır [160]. NMEC’lerden izole edilen genlerden *iss* geni serum sağaltımı yoluyla konak hücre savunmasından korunmayı sağlayan bir diğer virülans genidir. NMEC suşlarında virülans özelliklerinin oluşumunda görevli *ibeA*, *B*, *C*, *traT*, *iss*, *colV*, *cvaC*, *gimB*, *sfa/foc* genleri plazmit üzerinde yer almaktadır. Ayrıca

NMEC’lerde yüzeysel virülans faktörleri arasında yer alan Tip 1 fimbria, S fimbria, Menenjit ve ısı kaynaklı fimbriaların sentezinden sorumlu gen operonları (fim operonu, odak operonu ve mat operonu) yer almaktadır [159]. NMEC’lerde istiladan sorumlu *ibe A, B, C* genleri tarafından sentezlenen proteinler beyin endotel hücrelerine patojenlerin kolayca girip istila etmesi sağlar. Ayrıca K1 kapsüller genleri olan *kpsM, neuA* ile sentezlenen kapsül antijenleri fagositozdan kaçmada görev alırlar [161]. Toksin üretiminden sorumlu *hlyF, tsh, astA* ve *cdtB* genlerinin NMEC izolatlarında ikili ya da üçlü gruplar şeklinde bulunduğu gözlenmiştir. Demir taşıma mekanizması olan *fyuA, iron, iutA, ire* siderefor genlerinin NMEC’lerde gruplar halinde (ikili ya da daha fazla sayıda) patotiplerde bulunarak patojeniteyi güçlendirdiği gözlenmiştir [162].

Avian patojenik *E. coli* (APEC)

Tavuklar, hindiler ve diğer kuş türleri gibi kanatlı kümes hayvanlarında çeşitli lokal ve sistemik enfeksiyonların oluşumundan sorumlu Avian Patojenik *E. coli* (APEC) ExPEC grubu patotiplerdir. APEC’ler kuş kolibasilozu olarak adlandırılan kuşlarda görülen yaygın enfeksiyonların (perihepatit, hava kesesi iltihabı, perikardit, yumurta peritoniti, salfinjit, koligranülom, omfalit, selülit ve osteomiyelit/artrit) oluşumunda görev alır [163]. Kanatlı kuşlarda gözlenen APEC’ler; gen tavuklarının yarısından fazlasının (%53,5) ve kanatlıların 1/5’inin ölümüne, et miktarı ve yumurta sayısının azalmasına neden olan enfeksiyon sebepleridir.

APEC’lerde patojeniteden sorumlu çeşitli virülans faktörleri bulunmaktadır. Bunlar arasında; adezyon, kolonileşme, proliferasyon, istila ve konak immün yanıtlarından kaçma görevlerini yerine getiren fimbrialar, adezinler, toksinler, demir alım sistemleri, invazinler ve koruyucular görev alırlar. Patojenitede bunların yanında transkripsiyonel düzenleyiciler, metabolizmada görevli genler, quorum sistemleri (QS), TipIII ve Tip IV segresyon sistemleri gibi ek virülans faktörleri de görev alır [164]. APEC’lerde Tip 1 fimbria, P fimbria, S fimbria ailesinden Avian *E. coli* 1 (AC/1) fimbria ve Tip IV fimbrialara rastlanmıştır [163]. İzole edilen APEC suşlarında Tip 1 fimbria’nın görülme oranı %92,7’dir [165]. P fimbriaların görülme oranı %25 olup bu fimbriaların sentezinden sorumlu 11 genin dahil olduğu pap operonu PAI üzerinde yer alır [166]. S fimbria ailesine dahil AC/1 fimbria ya da diğer adı ile *fac* fimbriasının APEC’lerde görülme oranı %10’dur ve kuş koliseptisemide görevli virülans faktörüdür [167]. Stg fimbria *stgABCD* operonundan oluşan bulunması durumunda APEC’lerde adezyonu tetiklediği gözlenen ve APEC izolatlarının yaklaşık yarısında

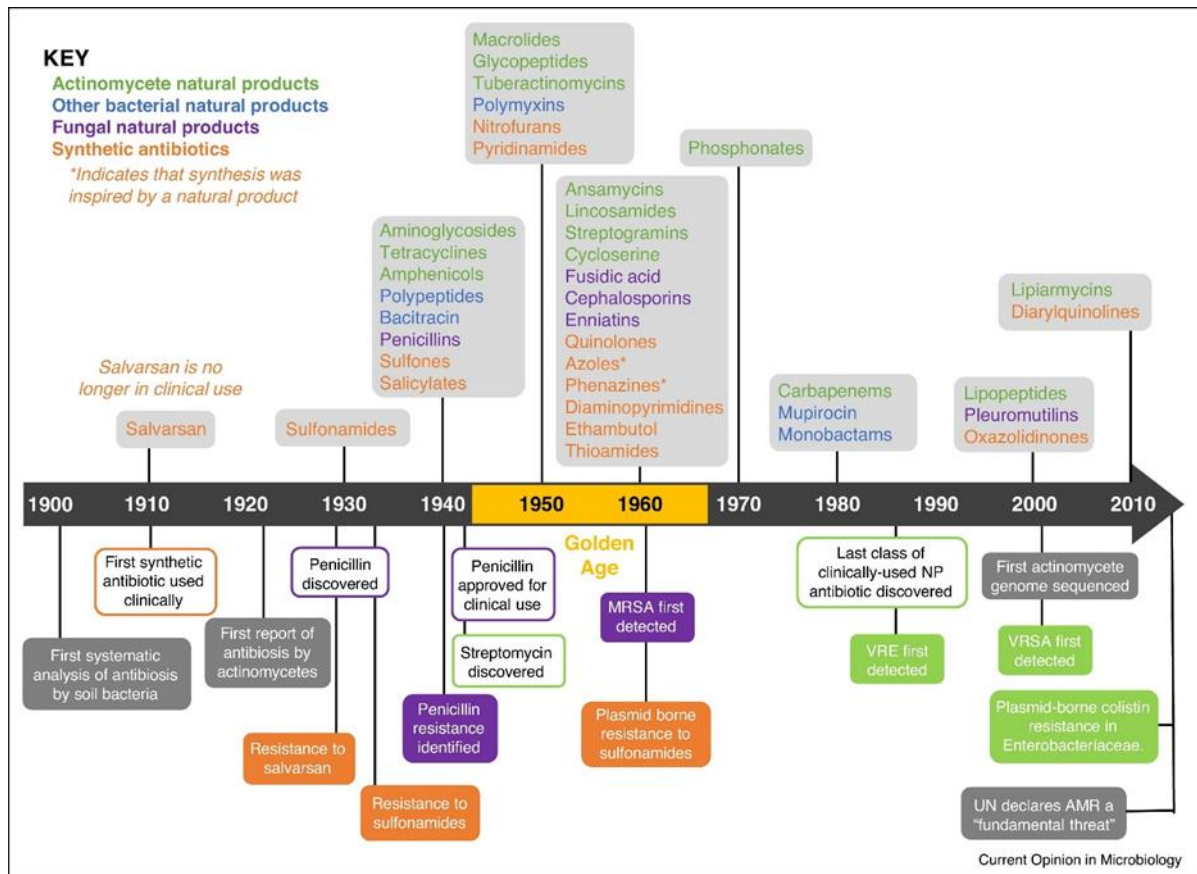
(%44,5) rastlanan diğ er adetif vir ulans fakt or udur [168]. Curli lifi genellikle insan patojenitesinde kendini göstermesine rağ men kuşlardan elde edilen *E. coli* izolatlarının %99'nunda curli operonları olan *csgABC* ve *csgDEFG*'nin *csgA* genine rastlanmıştır ve APEC'lerde hemogl tinasyon ve fibronektin bağlanma düzeyinde artışla ilişkilidir [169]. Hem patojen hem de patojen olmayan suşlarda gözlenen mat fimbria diye belirtilen (menenjitte ilişkili ve sıcaklık kontrollü) *ecpRABCDE* operonu tarafından kodlanan *E. coli* yaygın fimbria (ECP)'ların *ecpA* geni izole APEC'lerin %76'sında gözlenip enfeksiyonun erken evrelerinde etkili olduğu düşünülmektedir [170]. Adezif faktör sentezleyen fimbria APEC izolatlarının %54,4'ünde görülen ve Ygi fimbria denilen yapışma fakt r n n n kodlanmasında *ygiL* genine sahip olduğu bilinen ExPEC'ler için önemli bir vir ulans faktörüdür [171]. APEC'ler için adezin sentezleyerek yapışmada görev alan bir diğ er fimbria yad olup *yadL* geninin silinmesinin yapışmayı azalttığı gözlenmiştir [172]. APEC suşlarında fimbrial olmayan adezinler arasında AFA'lar, Tip V salgılama sistemi içinde sınıflandırılan ototransporter'lar (AatA, AatB, TSH ve FdeC) sayılır ve bu genlerdeki hasarların yapışmayı azalttığı gözlenmiştir. Ayrıca bakteri hareketinden sorumlu olan ve biyofilm oluşumunu tetikleyen flagella; kompleman savunma sistemine karşı direnç oluşumu ve kolonizasyonda görevli bakteri membran parçası LPS'ler; adezyon, proliferasyon ve fagositozdan kaçarak makrofaj içinde hayatta kalmada görev alan Tip VI salgılama sistemleri (T6SS) proteinleri APEC'ler için önemli diğ er vir ulans faktörleridir [169].

2.2. Antibiyotikler ve Antimikrobiyal Direnç

2.2.1. Antibiyotikler

Korunmuş en eski tıbbi eser olarak nitelendirilen M. .1550 tarihli Eber papir s nde küflü ekmek ve şıfalı toprak ilaç listesi içinde yer almaktadır [173]. 2000 yıl öncesinde küflü ekmek lapalarının   n, Sırbistan, Yunanistan, Roma ve Mısır'da açık yaraları tedavi etmede kullanımı; küflerin yararlarına ilişkin konunun çeşitli referanslarla belirtildiği 1940'larda yayınlanan John Parkinson'un *Theatrum Botanicum* isimli kitabıyla birlikte yıllarca devam etmesini sağlamıştır [174]. Bitki temelli antimikrobiyal ajanların kullanımı ile ilgili gözdeki arpacık etkeni *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)  yesi Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'ların öldürülmesi için 10. yy.'a ait Bald's Leechbook isimli el yazması metinde Anglo-Sakson tarifinin başarılı olduğu yer almaktadır [175]. Modern antimikrobiyal kemoterapi çağının başlaması; tam olarak antibiyotik olarak değerlendirilemeyen arsenik bazlı bir kimyasal olan Salvarsan'ın 1909 yılında Paul Ehrlich tarafından frengi hastalık

etkeni *Treponema pallidum* üzerine çalışmaları ile bulunmasıyla başlamış ve 1910 yılında klinik olarak kullanılmıştır [174]. Yalnız ürünün çözünme ile ilgili sorunları nedeniyle geliştirilerek neo-salvarsan adıyla 1912 yılında kullanılmaya başlanmıştır [176]. Paul Ehrlich'in sistematik tarama yaklaşımını takip eden ve ilaç endüstrisi için antibiyotik arayışındaki Bayer kimyagerlerince (Josef Klarer ve Fritz Mietzsch) sentezi yapılan ve antibakteriyel aktivite tespiti için testleri Gerhard Domagk tarafından yapılan Sülfonamid'lerin bir öncülü olan Prontosil'in keşfedilmesine neden olmuştur. 1899'da Emmerich ve Löw tarafından hastanede klinik amaçlı kullanılan ilk antibiyotik olarak ifade edilecek Pyocyanase sonrasında klinik amaçlı olarak etkili ve geniş spektrumlu etkiye sahip ilk antimikrobiyaller Sülfonamidlerdir [177]. Ancak 1928'de Alexander Fleming tarafından keşfedilen saflaştırılması Norman Heatley, Howard Florey, Ernst Chain ve Oxford'daki meslektaşları tarafından yapılarak 1945'de ilaç olarak klinik çalışmalarda kullanılır haline getirilmesi ile bugünde kullanımı devam eden Sülfonamidlerin yerini almıştır [173]. Antimikrobiyal ajanlar olarak aktinomisetlerin ürünlerinin kullanılabilirliği 1940'larda Waksman ve öğrencilerinin en bilineni tüberküloz üzerinde etkisi olan Streptomisin'in dahil olduğu onbeş kadar antibiyotiğin izolasyonu ile gerçekleşmiştir ve 1945'de klinik hayvan deneylerinin istenilen olumlu sonuçları doğrulamış ve 33 hastada olumlu sonuçlarla karşılaşılmıştır [178]. (Şekil 2.2) (Çizelge 2.1.)



Şekil 2.2. Kliniğe ulaşan on yıllık yeni antibiyotik sınıflarını gösteren zaman çizelgesi.

Antibiyotikler, kaynaklarına göre renklendirilir: yeşil = aktinomisetler, mavi = diğer bakteriler, mor = mantarlar ve turuncu = sentetik. Zaman çizelgesinin alt kısmında, ilaca dirençli suşlar metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA), vankomisin dirençli enterokoklar (VRE), vankomisin dirençli *S. aureus* (VRSA) ve *Enterobacteriaceae*'de plazmid kaynaklı kolistin direnci [173].

Sentetik ilaçların etki gücüne rağmen klinik alanda kullanılması sonucu meydana gelen yan etkileri nedeni ile anti enfektif etki göstermeyen doğal mikrobiyal ajanların (NPs) arayışına gidilmiştir. Kimyasal içeriği ve etki gücü bakımından NPs’ler antibiyotik içeriği bakımından zengin olup NP kaynaklı antibiyotiklerin %64’lük büyük kısmı filamentli aktinomisetlerden sağlanırken geri kalan %36’sı ise diğer bakteri grubu ve mantarlardan sağlanır [173]. (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Klinik olarak kullanılan tüm antibiyotik sınıfları ve kaynakları

^a Sınıfı	Keşif bildirildi ^b	Klinik olarak tanıtıldı	Örnek (ve üreten organizma)	Moleküler hedef
Aktinomisetlerden elde edilen antibiyotikler				
Aminoglikozitler	1944	1946	Kanamisin A (<i>Streptomyces kanamyceticus</i>)	Protein sentezi: 30S ribozomal alt birim
Tetrasiklinler	1948	1948	Tetrasiklin (<i>Streptomyces aureofaciens</i>)	Protein sentezi: 30S ribozomal alt birim
Amfenikoller	1947	1949	Kloramfenikol (<i>Streptomyces venezuelae</i>)	Protein sentezi: 50S ribozomal alt birim
Makrolidler	1952	1952	Eritromisin (<i>Saccharopolyspora erythraea</i>)	Protein sentezi: 50S ribozomal alt birim
Tuberaktinomycinler	1951	1953	Viomycin (<i>Streptomyces puniceus</i>)	Protein sentezi: 30S ve 50S ribozomal alt birimleri (alt birimler arası köprü B2a'ya bağlanır)
Glikopeptidler	1954	1958	Vankomisin (<i>Amycolatopsis orientalis</i>)	Hücre duvarı sentezi: Lipid II'nin D-Ala-D-Ala terminalleri
Linkozamidler	1962	1963	Klindamisin Linkomisin yarı sentetik türevi (<i>Streptomyces lincolnensis</i>)	Protein sentezi: 50S ribozomal alt birim
Ansamisinler	1959	1963	rifamisin SV Rifamisin yarı sentetik türevi (<i>Amycolatopsis rifamycinica</i>)	Nükleik asit sentezi: RNA polimeraz
Sikloserinler	1955	1964	Seromisin (<i>Streptomyces orchidaceus</i>)	Hücre duvarı sentezi: alanin rasemaz ve D-alanin-D-alanin ligazın inhibisyonu
Streptograminler	1953	1965	Pristinamisin (<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>)	Protein sentezi: 50S ribozomal alt birim

Çizelge 2.1. (Devam) Klinik olarak kullanılan tüm antibiyotik sınıfları ve kaynakları

^a Sınıfı	Keşif bildirildi ^b	Klinik olarak tanıtıldı	Örnek (ve üreten organizma)	Moleküler hedef
Fosfonatlar	1969	1971	Fosfomisin (<i>Streptomyces fradiae</i>)	Hücre duvarı sentezi: MurA (UDP-GlcNAc-3-enolpiruviltransferaz) inhibisyonu
Karbapenemler	1976	1985	Meropenem	Hücre duvarı sentezi: penisilin bağlayıcı proteinler
Lipopeptidler	1987	2003	Tienamisine dayalı sentetik molekül (<i>Streptomyces cattleya</i>) Daptomisin (<i>Streptomyces roseosporus</i>)	Hücre duvarı: hücre zarı bozulması.
Liparmisinler	1975	2011	Fidaxomicin (<i>Dactylosporangium aurantiacum</i> subsp. <i>hamdenesis</i>)	Nükleik asit sentezi: RNA polimeraz
Diğer bakterilerden antibiyotikler				
Polipeptitler	1939	1941	Gramicidin A (<i>Bacillus brevis</i>)	Hücre duvarı: Bakteri hücre zarının geçirgenliğini artıran iyon kanalları oluşturur.
Basitrasin	1945	1948	Basitrasin A (<i>Bacillus subtilis</i>)	Hücre duvarı sentezi: C55-izoprenil pirofosfatın fosforilasyonunun inhibisyonu
Polimiksinler	1950	1959	Colistin (<i>Paenibacillus polymyxa</i>)	Hücre duvarı: hücre zarı bozulması
Mupirosin	1971	1985	Mupirosin (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	Protein sentezi: izölösil t-RNA sentetaz
Monobaktamlar	1981	1986	Aztreonam	Hücre duvarı sentezi: penisilin bağlayıcı proteinler
			SQ 26,180'e dayalı sentetik molekül (<i>Chromobacterium violaceum</i>)	
Mantarlardan elde edilen antibiyotikler				
Penisilinler	1929	1943	Amoksisilin Penisilin yarı sentetik türevi (<i>Penicillium chrysogenum</i>)	Hücre duvarı sentezi: penisilin bağlayıcı proteinler
Fusidik asit	1958	1962	Fusidik asit (<i>Fusidium coccineum</i>)	Protein sentezi: uzama faktörü G
Enniatinler ^c	1953	1963	Fusafungin (<i>Fusarium lateritium</i>)	Hücre duvarı: hücre zarı bozulması

Çizelge 2.1. (Devam) Klinik olarak kullanılan tüm antibiyotik sınıfları ve kaynakları

^a Sınıfı	Keşif bildirildi ^b	Klinik olarak tanıtıldı	Örnek (ve üreten organizma)	Moleküler hedef
Sefalosporinler	1948	1964	Sefasetril Sefalosporin C'nin yarı sentetik türevi (<i>Acremonium chrysogenum</i>)	Hücre duvarı sentezi: penisilin bağlayıcı proteinler
Plöromutilinler	1951	2007	Retapamulin Pleuromutilin'in yarı sentetik türevi (<i>Pleurotus mutilus</i>)	Protein sentezi: 50S ribozomal alt birim
Sentetik antibiyotikler				
Arsfenaminler ^d	1907	1910	Salvarsan	Bilinmeyen
Sülfonamidler	1932	1936	Mafenid	Folat sentezi: dihidropteroat sentetazın inhibisyonu
Salisilatlar ^e	1902	1943	4-Aminosalisilik asit	Folat sentezi: dihidrofolat redüktazı inhibe eden ön ilaç
Piridinamidler	1952	1952	İzoniazid	Hücre duvarı: mikolik asitlerin sentezini engelleyen ön ilaç
Nitrofuranlar	1945	1953	Nitrofurantoin	DNA sentezi: DNA hasarı
Azoller ^f	1959	1960	Metronidazol	DNA sentezi: DNA hasarı
(Floro)kinolonlar	1962	1962	Siprofloksasin	DNA sentezi: DNA giraz ve topoizomerez IV'ün inhibisyonu
Diaminopirimidinler	1950	1962	Trimetoprim	Folat sentezi: dihidrofolat redüktazın inhibisyonu
Etambutol	1962	1962	Etambutol	Hücre duvarı: arabinosil transferaz inhibisyonu
Tiyoamidler	1956	1965	Etionamid	Hücre duvarı: mikolik asitlerin sentezini engelleyen ön ilaç
Fenazinler ^f	1954	1969	Klofazimin	DNA sentezi: guanin bazlarına bağlanır

Çizelge 2.1. (Devam) Klinik olarak kullanılan tüm antibiyotik sınıfları ve kaynakları

^a Sınıfı	Keşif bildirildi ^b	Klinik olarak tanıtıldı	Örnek (ve üreten organizma)	Moleküler hedef
Oksazolidinonlar	1987	2000	Linezolid	Protein sentezi: 50S ribozomal alt birim
Diarilkinolinler	2004	2012	Bedakuilin	ATP sentezi: proton pompası inhibisyonu

a Sınıflar, örneğin basitrasın, kolistin ve daptomisin arasında ayrım yapan köken, yapı ve/veya etki mekanizması ile tanımlanır.

b Raporlama yılı, literatürdeki ilk raporu ifade eder.

c Avrupa İlaç Ajansı, fusafungin'in Şubat 2016'da piyasadan çekilmesini tavsiye etti.

d Salvarsan artık klinik kullanımda değil.

e Salisilik asitler doğada bulunur, ancak bu antibiyotik sınıfının kaynağı bu değildi.

f Bileşik sentezi, doğal antibiyotik sınıflarından ilham almıştır.

Antibiyotiklerin hastalıkların tedavisine yönelik kullanımı sonrasında 1958 yıllarında ilk defa penisilline yönelik antimikrobiyal direnç gözlemlendi ve buna yönelik 1959 yılında penisiline dirençli Beta (β)-laktam antibiyotik olan metisilin geliştirildi. Spektrum aralığı fazla olan antibiyotiklerin gelişimine paralel olarak dirençli bakterilerin artması araştırmacıları bu duruma yönelik yeni antibiyotik bulma arayışına itmiştir [174].

2.2.2. Antibiyotik sınıfları

Antibiyotik; insan ve hayvan enfeksiyonlarında tedavi amaçlı yaygın kullanılan antimikrobiyal ilaçlar olup [179] antibiyotikler yaşama karşı anlamındaki “antibiyoz” kelimesinden türetilmiştir [180].

Bakterilerin çoğalmasını engelleme veya bakterileri öldürmede kullanılan doğal, yarı sentetik ya da sentetik kökenli kimyasallar diye ifade edilen antibiyotikler [179], güncel tanımlama ile tamamen veya kısmen sentetik yolla üretilen antimikrobiyollerini içeren bileşikler diye adlandırılabilir. Penisillin'in tesadüfi keşfiyle başlayan 1889'da Vuillemin tarafından antibiosis denilen ve daha sonra Waksman'ın tanımı ile antibiyotik diye adlandırılan bu bileşikler üzerine yoğunlaşan çalışmalar keşfedilen antibiyotik sayısını artırmıştır. Listeye eklenen antibiyotiklerin belirli gruplar altında sınıflandırılmasında genellikle kimyasal yapıları, etki mekanizmaları ve spektrum genişliği dikkate alınır. Antimikrobiyaller güçlerini bakterinin yaşamsal ya da büyümeyle ilgili işlevlerini inhibe ederek gösterirler. Bu inhibisyonlar; nükleik asit sentezi, protein sentezi, hücre duvarı sentezi üzerinde gerçekleşebildiği gibi hücre membran fonksiyonlarının bozulması yoluyla da olabilir [181] (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. *Etki mekanizmasına dayalı antimikrobiyal gruplar [182]*

Hareket mekanizması	Antimikrobiyal gruplar
Hücre duvarı sentezini engelle	B-laktamlar Karbapenemler Sefalosporinler Monobaktamlar Penisilinler Glikopeptidler
Depolarize hücre zarı	Lipopeptidler
Protein sentezini engelleyen	30S ribozomal alt birime bağlanma Aminoglikozitler Tetrasiklinler 50S ribozomal alt birime bağlanma Kloramfenikol Linkozamidler Makrolidler Oksazolidinonlar Streptograminler
Nükleik asit sentezini engelleyen	Kinolonlar Florokinolonlar
Metabolik yolları engelleyen	Sülfonamidler Trimetoprim

Ayrıca bakteri üzerindeki etki düzeyine göre de (bakteriosidal ya da bakteriosit) sınıflandırılır [181] (Çizelge 2.3.).

Çizelge 2.3. *Antibiyotik etki mekanizmaları ve etkinlik tanımları [181]*

Bakteriyel Hücre Duvarı Sentezinin İnhibisyonu	Protein Sentezinin İnhibisyonu
Penisilinler (sidal) Sefalosporinler (sidal) Karbapenemler (sidal) Monobaktamlar (sidal) Glikopeptidler (sidal)	Florokinolonlar (sidal) Rifamisinler (sidal) Sülfonamidler (sidal) Trimetoprim (sidal) Siklik lipopeptitler (sidal)
Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu	Hücre Zarı Fonksiyonunun İnhibisyonu
Aminoglikozitler (sidal)	Amfoterisin B

Çizelge 2.3. (Devam) Antibiyotik etki mekanizmaları ve etkinlik tanımları [181]

Nükleik Asit Sentezinin İnhibisyonu	Hücre Zarı Fonksiyonunun İnhibisyonu
Tetrasiklinler (statik) Glisilsiklinler Kloramfenikol (statik) Klindamisin (statik) Makrolidler (statik veya öldürücü) Ketolidler Oksazolidinonlar Streptograminler (sidal)	İmidazoller (fungistatik) Triazoller (fungistatik) Ekinokandinler

2.2.3. Antibiyotikler ve direnç mekanizmaları

2.2.3.1. Penisillin etki ve direnç mekanizmaları

Penisillinler 6-aminopenisilanicasit çekirdeğinden üretilen bir beş üyeli penam halkası, bir dört üyeli β -laktam halkası ve bir yan zincirden oluşur. Penisillinler içindeki farklılık; aktivite spektrumu ve farmakokinetik özelliklerinde farklılıkların oluşumuna neden olan yan zincirdeki farklılıklardan kaynaklanır. β -laktam halkası ise antimikrobiyal faaliyetlerden sorumludur ve penisilloikasit oluşumu ile sonuçlanan her türlü bu halkadaki değişiklik antibakteriyel aktivitenin bozulmasına neden olur [183]. Tüm penisillinler bakterisidal etki göstererek bakterilerin ölümüne sebep olurlar. Bunu bakteri sitoplazmik membranında bulunan penisillin bağlayıcı proteinler (PBP) olan endopeptidazlar, karboksipeptidazlar ya da transpeptidazlardan biri ya da birkaçına bağlanıp peptit çapraz zincirlerin oluşumunu engelleyerek ve anormal yapıli peptidoglikan gelişimi ile hücre duvara sentezi inhibisyonu ile başlatır. Otolitik enzimlerin (otolizinler ve mürein hidrolazlar) etkisiyle hücrenin öldürülmesiyle sonuçlanır [184]. β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştiren bakterilerde direnç üç farklı mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar; bakterinin sentezlediği β -laktamaz enzimleri tarafından antibiyotiğin parçalanması, antibiyotiğin penetrasyonunun azaltılması ile PBP'lere ulaşımın engellenmesi veya antibiyotiğin bağlandığı PBP'lerin antibiyotiğe afinitesinin azalması'dır [181]. Bakterilerinin farklılığı onların seçtikleri direnç mekanizmalarının da çeşitlenmesine neden olmuştur. β -laktamlara karşı Gram negatif bakterilerde baskın görünen direnç mekanizması β -laktamaz üretimi iken Gram pozitif bakterilerde ise PBP'lerdeki modifikasyonlar olup farklılık nedeninin büyük olasılıkla hücre zarı farklılığı olduğu düşünülmektedir [185]. β -laktamaz üretimi, geçirgenlik değişiklikleri, akış pompaları ile ekstrüzyon ve PBP değişiklikleri Gram negatif bakterilerde

β -laktamlara karşı en yaygın görülen direnç mekanizmasından en az görülene doğru sıralamasıdır [186]. Gram negatiflerde β -laktamların iç zarda yer alan porinlerden hareket ederek PBP'lere ulaşması dış zarın varlığı ile kontrol edilir ve β -laktamların bu kinetiği sırasında sentezlenen β -laktamazların yeterli seviyeye ulaşarak antibiyotiğin yok edilmesi ile sağlanır [185]. Zarda görev alan dirençten sorumlu porinler arasında *Acinetobacter baumannii* (*A. Baumannii*)'de OmpA, Omp33-36, CarO ve OprD porin kanalları ve *Enterobacteriaceae*'de ise OmpC/OmpF ve OmpK35/OmpK36 kanalları bu kontrolde görev alan gözeneklerdir [186]. *E. coli*'lerde gözlenen OmpA, OmpC ve OmpF porinlerinden ekspresyonunda ozmolaritenin etkili olduğu OmpC ve OmpF'nin kaybı, genişletilmiş spektrumlu β -laktamaz (ESBL) ile ilişkili olup antimikrobiyal direnç gelişimini olumsuz etkiler. Ayrıca OmpC'nin kaybı bakterisidal etkiyi de azaltır [187]. Akış pompaları Gram negatiflerde üçüncü sırada gözlenen direnç mekanizmaları olup hem içsel hemde kazanılmış dirençle antimikrobiyal ajanlara karşı direnç oluşumunda görevlidirler. Bakteri üremesi ve kolonizasyonunda görev alan akış pompaları bakteriyal virülans etkenleridir [186]. Bu pompalarda ilaç akışının yönlendirilmesinde bir proton gradyanı ve ATP hidrolizinden (ATP bağlayıcı kaset [ABC]) türetilen enerji görev alır. Proton gradyanı olarak görevli birimler ise direnç-nodülasyon-bölünmesi [RND], küçük çoklu ilaç direnci [SMR], çoklu ilaç ve toksik bileşik ekstrüzyonu [MATE] ve ana kolaylaştırıcı süper ailesi [MFS] taşıyıcılarıdır [188]. AcrAB-TolC akış pompası *Enterobacteriaceae* ve diğer Gram negatif bakteriler arasında gözlenmekte olup *E. coli*'nin de dahil olduğu bir grup klinik öneme sahip bakteri üzerinde (*K. pneumoniae*, *S. enterica* serovar *typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Vibrio cholerae*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia pseudomallei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Brucella* spp., *Ralstonia solanacearum* ve *Erwinia* spp.) geniş çaplı araştırılarak β -laktamlar, tigesiklin ve diğer antimikrobiyollere karşı direnç oluşumunda ve bakteri virülansında etkili olduğu görülmüştür [186]. Gram pozitiflerde zar yapısı farklılığı nedeni ile böyle bir bölümlendirme olmamasına rağmen *Staphylococcus*'larda penisilinaz senteziyle gözlenen direnç durumlardan biridir [185]. Yalnız yaygın olan direnç mekanizması PBP'lerde gözlenen mutasyonlar ve/veya sayıca azalma veya ekspresyon değişiklikleri iken bunu takip eden β -laktamaz üretimi daha az gözlenir. Yaygın gözlenen PBP modifikasyonları arasında; *S. aureus*'ta *mecA* tarafından kodlanan PBP2, *Streptococcus pneumoniae*'de PBP2b-PBPX ve *A. baumannii*'de PBP7-8 verilebilir [186]. *S. aureus*'larda direnç mekanizmasında β -laktamazların görev alması, endojen PBP'lerin afinitesini azaltma ve β -laktamlardan etkilenmeyen ilave bir PBP eldesi

yer alır. PBP2 dışında; düşük afinite özelliğine sahip PBP1 ve yüksek düzeyde ifade edilen nokta mutasyonu ile oluşan ekzojen orjinli PBP2a şeklindeki modifiye PBP'lere de rastlanır [189]. PBP1a, PBP1b, PBP2a, PBP2b ve PBP2x olmak üzere 5'i yüksek moleküler ağırlıklı (hmw) PBP'ler ve 1 tanesi düşük moleküler ağırlıklı PBP3 olarak *S. pneumoniae* kaynaklı 6 PBP bulunmaktadır. Bu PBP'lerden klinik izolatlardan dirençli olanlarda PBP1a, PBP2b, PBP2x ve bazen PBP2a'nın değiştiği gözlenmiştir [190]. *Neisseria gonorrhoeae* suşlarında 3 farklı molekül ağırlığında PBP'ler (PBP1, PBP2 ve PBP3) bulunmakta olup klinik örneklerde penisillin direncine bağlı olarak PBP1 ve PBP2'ye bağlanmanın azalması gözlenmiştir. PBP1'de gözlenen bağlanma azalmasının iki gen (*Tem* ve *Pem*) ile ilişkili olduğu belirtilmiştir [191]. Enterokoklarda β -laktamlara karşı intrinsik orta direncin antibiyotik kaynaklı inhibisyonu durumunda daha düşük afiniteli hmw'li PBP'ler göreve başlar. Bu PBP'nin kromozomal kaynaklı PBP5 olduğu penisiline yüksek direnç gösteren örneklerde bu PBP'nin ekspresyonu artarken, PBP5 ekspresyonunun olmadığı mutant suşta ise penisiline yüksek duyarlılık gözlenmiştir [192]. Enterokokların bazı suşlarında (*Enterococcus hirae*'nin bir suşunda) plazmid kaynaklı olup PBP3r diye adlandırılan PBP5'e ek düşük afiniteye sahip diğer bir transpeptidaz bulunmaktadır [193]. Gram pozitiflerde β -laktamlarda yer alan β -laktam halkasının kırılması ile antibiyotik etkisiz hale getirilir. Bunu sağlayan β -laktamazların ilk tespitinin doğal antibiyotik olan penisillin'in klinik amaçlı piyasada yerini almasından önce yapılmış olup bunlara duyarlılığı az olan antibiyotiklerin gelişimini yenilere dirençler izlemiştir (Ampisilin direnci gibi). Şu süreçte tespit edilen β -laktamaz sayısı yaklaşık 1000 civarında olup bu sayı her geçen gün artmaktadır. Elde edilen β -laktamazlardaki farklılık onların sınıflandırılması neden olmuş ve protein benzerliği (Ambler sınıflandırması) ya da biyokimyasala özelliklerine (Bush-Jacoby sınıflandırması) göre farklı sınıflandırmalar çeşitlenmiştir. β -laktamazları sınıflandıran her iki sınıflandırmada 4 grup dikkati çeker (sırayla A, B, C, D ve 1, 2, 2 β , 3). Direnç oluşumundan sorumlu olan Ambler A grubunda yer alan genler; Penisilinaz'lara özgü *TEM-1* ve *SHV-1* genleri, Karbapenamazlara özgü *KPC* geni ve ESBL'lara özgü *CTX-M* ve *TEM-3* genleridir. D grubunda yer alan genler; ESBL'lara özgü *OXA-11* geni, Karbapenamazlara özgü *OXA-23* ve *OXA-48* genleridir. *IMP*, *VIM* ve *NDM* genleri ise C grubuna dahil karbapenamazları ifade ederken; *AmpC* ise B grubuna ait ESBL'ları ifade eder. β -laktamaz sentezini ekspre eden genler *bla* genleri olarak ifade edilen kromozom üzerinde bulunup MGE'ler vasıtası ile taşınan ya da integronlarda bulunarak direnç yayılımında görev alırlar [185].

2.2.3.2. Sefalosporin etki ve direnç mekanizmaları

1948 yılında bakteriyoloji profesörü Giuseppe Brotzu tarafından gözlem sonucu bulunan *Cephalosporium acremonium* diye sınıflandırılan güncel adıyla *Acremonium chrysogenum*'nin kültürü üzerinde 1953 yılında Howard Florey tarafından yapılan yoğun çalışmalar sonucu sefalosporin C isimli antimikrobiyalin keşfi gerçekleşmiştir [194].

β -laktam grubu antibiyotiklerin bir alt grubu olan Cephem grubu üyeleridir. Kimyasal yapı olarak Penam (Penisillinler), Penem (Karbapenemler) grubu antibiyotikler gibi β -laktam halkasına kaynamış kükürt içeren 6 üyeye sahip bir dihidrotiazin halkası içerir. Çekirdek gelişimi 7-aminosefalosporanik asit'ten (7-ACA) başlayan Sefalosporinlerde penisillin grubundaki 6-aminopenisilanik asit yan zincirine benzer olan antibiyotiğin biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerinin değişiminde görev alan iki yan zincir (R1 ve R2) bulunmaktadır. R1 yan zincirinde meydana gelen değişiklikler; β -laktamazlara karşı antibiyotiğin stabilitesini ile PBP'ler gibi ilaç hedeflerine afinitesini etkilemek yoluyla mikrobiyal aktiviteyi etkilemektedir. R2 yan zincirinde meydana gelen değişiklikler ise antibiyotiğin yarılanma ömrünün uzatılması veya etki edeceği hedef bölgeye ulaşımının kolaylaştırılması gibi farmokolojik özellikleri etkilemektedir [195].

Sefalosporinler'de Penisillinler gibi β -laktam halkası aracılığıyla PBP'lere bağlanarak bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek bakteri ölümüne sebep olan büyük çaplı bir bakterisidal grubu oluştururlar [196]. Sefalosporinlere karşı bakteriler tarafından oluşturulan direnç mekanizmalarını 3 alt grupta toplayabiliriz. Bunlar; PBP modifikasyonu, β -laktamaz üretimi ve porinlerdeki denetim sonucu geçirimsizlik ya da antimikrobiyalin hedefe ulaşımının engellenmesidir. PBP'lerde antimikrobiyale afinite azalması ya da β -laktama duyarlılık göstermeyen yeni bir PBP edinilmesi yoluyla gerçekleşen PBP modifikasyonu hedef aracılı sefalosporin direncine neden olmaktadır. İkinci direnç mekanizmasını oluşturan β -laktamaz üretimi kromozomal ya da plazmid kaynaklı olabilmektedir. Kromozomal kaynaklı enzimler genellikle türe özgü özellikte iken plazmit kaynaklılar ise türler arası ya da daha geniş sınırlara ulaşma eğilimindedir. Üretilen enzimin konumu, enzimin aktivite kinetiği ve enzimin miktarı β -laktamaz aracılı direnç şiddetini belirlemektedir. Enzimin konumu; bakterinin Gram pozitif (hücre dışı ortam) veya Gram negatif (periplazmik boşluk) olmasına bağlı olarak değişerek β -laktamın kırılması için en uygun olacak şekilde belirlenmiştir. Üçüncü mekanizma olan geçirimsizlik Gram pozitif bakteriler için söz konusu değildir; çünkü PBP'ler dış zar üzerinde yer almaktadır. Enterobakterilerinde dahil olduğu Gram negatiflerde ise PBP'ler porinlerin içinde yer alarak konurlar ve bu

bakterilerde porin sayısı ile sefalosporin direnci arasındaki pozitif ilişki dış zarın ilaç girişi için tek engel olabileceği düşüncesini oluşturmaktadır. Bu düşüncelere rağmen sefalosporinlere karşı gösterilen yüksek direnç durumunun birden fazla engelin birlikte etkisi ile olabileceğini yansıtmaktadır [197].

Beş kuşak olarak gruplandırılan sefalosporinlerin gruplandırılması da keşif zamanları kadar etki ettikleri bakteri grubu (Gram pozitif ve Gram negatif) spektrumu da etkili olmuştur. Birinci Kuşak Sefalosporinler Gram Pozitif kokların çoğu ve bir grup Gram Negatif (*E. coli*, *Proteus mirabilis* ve *K. pneumoniae*) üzerinde; İkinci Kuşak *Haemophilus influenza*, *Moraxella catarrhalis* ve *Bacteroides* spp.'lar üzerinde etkilidir. Üçüncü kuşak Gram boyama, familya ve tür bakımından farklılık gösteren grup üzerinde (Gram negatif *Enterobacteriaceae*, *Neisseria* spp. ve *H. influenza*'larda fazla, Gram pozitiflerde az etkili); Dördüncü Kuşak bir önce keşfedilen kuşakla aynı kapsam yanında β -laktamazlar gibi antimikrobiyal dirençli Gram negatifler üzerinde; son kuşak ise MRSA'lar ve Penisilline dirençli pnemokoklar üzerinde etkilidir [196]. Sefalosporinlerin dahil oldukları kuşaklara bağlı olarak onlara etki eden β -laktamazlar ve etki düzeyleri çeşitlilik göstermektedir. Örneğin bir ESBL enzimi 3. Kuşak Sefalosporinleri (ayrıca Penisillinleri, Monobaktamları) hidrolize etme yeteneğine sahipken 2. Kuşağa dahil Sefamisinler (ayrıca Karbapenemler) üzerinde orta düzeyde ya da sıfır etki göstermektedir. ESBL'ların çoğu klavulanik asit veya tazobaktam inhibitörlerince inhibe edilirken, 3. Kuşak sefalosporinleri inhibe edemezler. Bunların inhibisyonunda Ambler sınıflandırmasında D sınıfı içinde yer alan OXA enzimleri görev alır ki bunlarda ESBL'ların bir alt grubuna dâhildir. Plazmid kodlu bir ESBL olan CTX-M geninden ekspresyonu yapılan enzimler *K. pneumoniae*, *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae*'lerde yaygın gözlenen transpozon gibi MGE aracılığıyla plazmidlere kazandırılan sefalosporin direncinin büyük bir kısmından sorumlulardır. İnhibitör klavulanik asit veya tazobaktam tarafından Metallo- β -laktamazlar inhibe edilmezken aynı inhibitörler sefamisini başarılı şekilde hidrolize etme yeteneği gösterir. β -laktamazlar içinde C sınıfı üyeleri sefepim'de zayıf olmak üzere Penisillin ve Sefalosporinlere karşı bakteride direnç oluşumunda görevli enzimlerdir. Bu grup içinde en bilineni *bla*_{AmpC} geni tarafından sentezlenen enzim olup kromozomal kaynaklı (*Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Providencia* sp., *Morganella morganii* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da) olduğu belirtilmiş olmakla birlikte bazı bakterilerde (*Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* spp. ve *Stenotrophomonas* spp.'de) plazmid kaynaklı olanlarına da rastlanmıştır. D sınıfı β -laktamazların sentezinden

sorumlu çeşitli OXA varyantları bulunmaktadır. *P. aeruginosa*'da *bla*_{OXA} genleri tarafından ekspre edilen OXA-11 gibi enzimler 3. Kuşak Sefalosporinleri parçalama yeteneğindeki enzimlerdir [185].

2.2.3.3. Karbapenemlerin etki ve direnç mekanizmaları

β -laktam sınıfı içinde yer alan geniş spektrumlu bir antibiyotik grubu olan karbapenemlerin ilk üyesi 1970 yılında piyasa çıkan kararsızlığı nedeni ile C-2 kısmına eklenen bir eklenti ile stabil haldeki İmipenem'e dönüştürülen Tienamisin'dir [198; 199]. 4 üyeli β -laktam halkası ve 5 üyeli Pirolin halkası olmak üzere birbirine kaynaşmış 2 halkalı bir çekirdeğe sahip β -laktam grubu antibiyotiklerdir. Bitişik bu iki halkalı çekirdeğin işlevselleşmesinde görevli iki yan zincire (C-2 tiyoeter ile C-6 hidroksietil) sahiptir [200]. Karbapenemler; Gram negatif, Gram pozitif, aerob ve anaerob bakteriler üzerinde geniş bir antimikrobiyal etkiye sahip olup en popülerlerini imipenem ve meropenem oluşturur [201]. Karbapenemler diğer β -laktam antibiyotikleri gibi bakteri hücre duvarı oluşumunu engelleyerek bakterilerin ölümüne neden olurlar. Gram negatif bakterilerde antibiyotikğin bakteriye etkisi önce porin adlı dış zar proteinlerinden (OMP) geçerek peptit bağlarının çapraz bağlanması ile hücre duvarı peptidoglikan yapısının oluşmasını katalizleyen enzimler olan PBP'lere bağlanırlar. Hücre duvarı oluşum sürecinde hücrede otoliz devam eder, PBP'lerin görev yapamaması sonucu peptidoglikan zayıflarken artan osmotik basınç nedeniyle hücre patlar [202]. Karbapenemlerin bağlanarak inhibe ettiği PBP'ler farklılık göstermektedir. Gram negatif bakterilerde öncelikle PBP2'ye güçlü bir bağlanım yanında PBP1a, PBP 3'e de bağlanma özelliği gösterirler [203]. Örneğin; *E. coli* ve *P. aureginosa* için karbapenemlerin tamamı PBP2'ye öncelikle bağlanmanın yanında Biapenem her iki tür için PBP1'e (*E. coli*=PBP1a, *P. aureginosa*=PBP1b) güçlü bir afiniteye sahiptir [204]. Meropenem'lerin *E. coli*'ye etkisinde yüksek afinite gösterilen PBP'ler arasında PBP2 ve PBP3'ün yer alması diğer bir örnektir. Bu durum bakterilerde direnç gelişiminin önüne geçerek karbapenemlerin etki spektrumunun genişliğini göstermektedir [205]. Karbapenemlerden imipenem pirolin halkası içinde bir β -Hidrojen yapısına sahip olması onun insan dehidropeptidazı tarafından hidrolizi için stabilasyon oluşturmazken diğer karbapenemlerdeki bir β -CH₃ grubu bulundurması (meropenem, ertapenem gibi karbapenemler) bu enzime karşı duyarlılığı azaltarak hidrolizasyonu yavaşlatır [206].

Bakterilerde karbapenemlere karşı oluşturulan direnç mekanizmalarını; β -laktamaz üretimi, akış pompaları, porinler ve PBP'lerin ekspresyon ya da fonksiyonel değişimlerine

neden olan mutasyonlar oluşturmaktadır. Bazı bakterilerde (*K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* gibi) bu direnç mekanizmalarının bir kombinasyonu bulunmakta olup oluşan karbapenem direnci bu bakterilerle mücadeleyi zorlaştırmaktadır. Penisillin ve sefalosporinlerden daha geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olan Karbapenemlere karşı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin geliştirdikleri direnç mekanizmaları farklılık göstermektedir. Gram pozitif koklarda PBP'lerde modifikasyon ya da karbapenem dirençli yeni PBP'lerin eldesi yoluyla direnç sağlanırken; Gram negatif çubuklarda da PBP modifikasyonu ve PBP'lerin yerleştiği porinlerin kaybı direnç mekanizmaları yanında akış pompası ve β -laktamaz ekspresyonunun bulunması yer alır. Karbapenem dirençlerinden en yaygın gözlenen β -laktamazlardan yaygınlaşan oranlarda; KPC ve GES enzimleri gibi A sınıfı karbapenemazlar, VIM, IMP ve NDM β -laktamazlar gibi B sınıfı karbapenemazlar gözlenir. Ayrıca OXA-23, -24, -40, -48, -51, -55, -58 ve -143 gibi D sınıfı karbapenemazlar ile CMY-10 ve PDC β -laktamazlar gibi zayıf özellikte karbapenemazlardan C sınıfı β -laktamazlar da gözlenmektedir. Zayıf karbapenemazlara porin kaybının eklenmesi direnç gücü artmaktadır [202]. Karbapenemlere karşı geliştirilen ikinci bir direnç mekanizması antibiyotığın hedef PBP'ye transferinden sorumlu porinlerin ekspresyonundaki değişiklikler veya bu proteinlerin üretiminin durmasıdır. Porinlerin karbapenemler üzerindeki etkileri de spesifik olup olmamasına göre değişiklik gösterir. Örneğin *P. aeruginosa* izolatlarının imipenem direnci OprD porin inaktivasyonu kaynaklı iken, diğer iki karbapenem olan meropenem ve doripenem direncinde ise AmpC'nin ve dışa akış pompalarının (mexB ve mexY'nin) artan ekspresyonu durumunda doripenem direncinin meropenem'den daha yüksek olduğu gözlenmiştir [207]. *E. coli* suşlarının bazılarında imipenem direnç gelişiminde OmpC ve OmpF porinlerinin ekspresyonunun eksikliği rol almaktadır [208]. Akış pompası üst ailelerinden biri olan RND ailesindeki AcrB akış pompası promotorleri ile karbapenem direnci arasında ilişki çoklu antimikrobiyal direnç durumlarında gözlenmektedir [209]. *P. aeruginosa*'da karbapenem direncinde; iki dışa akış porini (OprM ve OprJ), bir periferik sitoplazmik membran bağlayıcı (MexA, MexC veya MexX) ve bir sitoplazmik membran pompasının (MexB, MexD veya MexY) birleşmesi ile oluşan tamamlanan bir akış kompleksi rol alır [210].

2.2.3.4. Monobaktamlar etki ve direnç mekanizmaları

Tek bir β -laktam halkası bulunduran Monobaktamların ilk örnekleri 1970'li yılların ortalarında *Nocardia uniformis* subsp. *tsuyamanensis* aktinomiset suşundan elde edilen

Nocardicin A isimli monosiklik β -laktam'dır. Gram negatif bakteriler üzerinde orta düzeyde geniş bir spektruma sahip olan antibiyotiktir [211]. Antimikrobiyal aktiviteden sorumlu yapının Monosiklik Nocardisinlerin keşfi ile kaynaşık halka sistemi olduğu düşüncesi yıkılmıştır. Doğal olarak bulunan monobaktamlarda β -laktam halkasının 3-alfa veya 3- β yan zincirinde bulunan asidik içerik (2-oksoazetidin-1-sülfonik asit) bulunmaktadır ve bu zincirdeki değişikliğin etki edilen mikroorganizmalarda çeşitliliğe sebep olmaktadır. Monosiklik β -laktamlarda karboksil grubu aktivasyonundan sorumlu yapı halkaya (halka nitrojenine) bağlanan sülfonik asit iken β -laktamaz stabilitesinde ise alfa metil grubunun 4. pozisyona eklenmesi etkilidir. Eklenen metil grubu antimikrobiyal aktiviteyi de artırır [212]. Monobaktamlar üzerine yapılan çalışmalar sonucu ticareti yapılan ilk monobaktam olarak ticereti yapılan Aztreonam; *P. aureginosa*'nında dahil olduğu aerob Gram negatif bakteriler üzerinde oldukça etkilidir. Aztreonam kromozomal kaynaklı β -laktamazları zayıf indükleyici özellikte iken R plazmitleri kaynaklı β -laktamazlara karşı direnç gücü yüksektir [213]. Aztreonam antibiyotiği diğer β -laktam antibiyotikleri gibi PBP'lere bağlanıp hücre duvarı sentezi inhibisyonunu sağlayarak etki gösterir. Bu etki Gram negatif bakterilerde PBP-3'e bağlanarak gösterilirken Gram pozitiflerdeki PBP'lere afinite çok düşük olduğundan bağlanmaz [181]. Aztreonam'ın Gram boyanma özelliğine bağlı olarak PBP afinite farklılığı gözlenmekte olup yüksek afiniteli PBP ile etkileşimi sonrasında diğer bir grup β -laktam antibiyotiğinde (sefalosporinler) olduğu gibi filamentasyon oluşumu ve hücre duvarı kırılımı gerçekleşir. Bunu lizis ve hücre ölümünün takip ettiği bakterisidal etki gözlenir. Bu etkinin inhibitör konsantrasyonu ile ilişkili olduğu gözlenmiştir [213]. Bakterilerin β -laktam antibiyotiklerine karşı etkili direnç mekanizmaları arasında ana rol sahibi β -laktamazlardır. Plazmid ya da kromozom kaynaklı β -laktamazların üretimi ile β -laktam grubu antibiyotiklerin inhibisyonu gerçekleşmekte olmasına rağmen plazmid kaynaklı β -laktamazlar rastgele bakteriler arasında (*Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *N. gonorrhoeae* ve *Haemophilus influenzae*) transfer edilen genler (*TEM* gibi) nedeni ile tedavi süreci için önemli bir sorun teşkil eder. Kromozomal kaynaklı β -laktamazlar üreten gen transferi *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus* ve *Pseudomonas* türleri gibi bazı bakteri grupları ile sınırlılık göstermektedir [214]. *E. coli*'ye karşı inhibisyon özelliğine sahip olan Aztreonam antibiyotiğinin Gram negatifler tarafından üretilen β -laktamazların çoğunluğuna karşı stabilitesi yüksektir. Bu kuralı bozan enzimler arasında kromozomal ya da plazmid kaynaklı olanlar vardır. Aztreonam üzerinde etkiye sahip olan enzimlerin kaynağı kadar etki düzeyleri de farklılık gösterir. *Klebsiella oxytoca*'nın bazı suşlarınca üretilen kromozomal kaynaklı K1

β -laktamaz (orta düzeyde) ile plazmid kaynaklı PSE-2 enzimleri (düşük düzeyde) bu farklılığı gösteren örneklerdir [215].

2.2.3.5. Glikopeptidler etki ve direnç mekanizmaları

Mevcut antimikrobiallerin piyasada etkin rol alması sonucu *Staphylococcus*'larda bunlara karşı gerçekleşen artan direnç oluşumu 1950'li yıllarda antistaphylococ özelliğe sahip alternatif antimikrobiyal ajanların arayış sürecini tetiklemiştir. 1957 yılında bunun için Eli Lilly ve Company tarafından geniş çaplı stafilokoklar üzerinde etki düzeyi fazla ve onlara karşı özgüllüğü yüksek antimikrobiyal arayışı başlamıştır. Çalışmada kimyager olarak görev alan Dr. E.C. Kornfeld'e Bornea'dan gelen orman toprağı örneklerinde yaptığı inceleme sonucu *Streptomyces orientalis* isimli bir organizmanın varlığını tespit etmiştir. Bunun fermente ürününden başta Staphylococlar olmak üzere birçok Gram pozitif bakteri üzerinde yüksek düzeyde bakterisidal etki gösteren 05856 kodlu bir bileşik izole etmiştir [216]. Eli Lilly bilim insanları %70'e yakın oranda safsızlığın gözlendiği ve bunun rengine yansıdığı bu bileşiğe "Mississippi çamuru" adını vermiş ve sonraları vanquish kelimesinden türetilen bir terim olan "vankomisin" olarak etiketlenerek 1958 yılında ABD Gıda ve İlaç İdaresi tarafından klinik kullanım amaçlı hızlıca onay almıştır. Buna rağmen toksik etkisi az olan yarı sentetik penisillinlerin piyasada yer alması klinik kullanımını geciktirmiş ve bu yarı sentetik ürünlere de direncin gözlenmesi Vankomisin'in kullanım oranında artışı sağlamıştır [217]. Gram negatiflere karşı aktivite göstermeyen Vankomisin duyarlı tüm Gram pozitifler üzerinde bakterisidal etki gösterir. Enterokoklar üzerinde bakteriyostatik aktiviyete sahip olan Vankomisin'in bu bakteri grubunda bakterisidal etkinlik göstermesi için bir aminoglikozid ile kombinasyon oluşturması gerekmektedir. Vankomisin anaerob Gram pozitif bakteriler üzerinde de etkiye sahiptir [218]. 1970'li yıllarda yapılan çalışmalar Vankomisin ile yapısal ilişkili diğer glikopeptidlerden Teikomisin antibiyotiklerinin izolasyonunu sağlamıştır. Bu grubun üyesi olan Teikoplanin 1984 yılında klinik kullanım izni almış ve 1988 yılında ise Almanya'da ruhsatlanmış ve yoğun bakım ünitelerinde en fazla kullanılan antimikrobiyal ajan olmuştur. Bu hızlı yükselişin altında Vankomisin'e olan serum yarılanma ömür uzunluğu, yan etki azlığı ve uygulanma işlemlerinin kolaylığı üstünlükleri yatmaktadır [219]. Teikoplaninden sonraki klinik çalışmalar ile lipoglikopeptit ajanlardan ikinci nesil üyeleri dalbavancin (BI-387) ve oritavancin (LY-3333328) ve üçüncü nesil telavansin (TD-6424) elde edilmiştir [220].

Glikopeptid grubu antibiyotikler bakterilerde hücre duvarı oluşumunu β -laktamlardan farklı bir yolla inhibisyona uğratarak bakteriler üzerinde bakterisidal etki göstermektedir. Vankomisin bu etkiyi peptidoglikan öncülleri olan mürein monomerlerine bağlanıp onların hücre zarına geçmesi sağlar ve bu monomerlerin glikopeptidana eklenmesindeki transglikosilasyon ve transpeptidasyon basamaklarını bozarak gösterir [218]. Teikoplanin'deki antimikrobiyal etki D-alanin D-alanine bağlanıp lipid II substratının sekestrasyonuna neden olarak bakteriyel peptidoglikan inhibisyonuna sebep olur [221]. İkinci nesil üyelerinden dalbavancin'in etki mekanizması Teikoplanin ile aynı iken oritavancin etkisini güçlendiren ilave mekanizmalara sahiptir. Bunlara arasında D-alanin D-laktata bağlanıp hücre duvarı tutunumu öncesi dimer oluşumu ile lipid II ile etkileşimi sırasında ek stabilite oluşumunu sağlayıp hücre duvarına tutunumunu kolaylaştıran yan zincir varlığı (hidrofobik 4'-klorobifenilmetil yan zincir) yer alır [222]. Üçüncü nesil üyesi olan Telavansin Vankomisin gibi hücre duvarı öncüllerinde bağlanılan D-alanin D-alanin terminali içeren çekirdeğe sahiptir ve geç dönem peptidoglikan öncüllerine bağlanarak çapraz bağlanmaları önler [223].

Glikopeptidlerin (vankomisin ve diğer lipoglikopeptidler) Gram negatiflere karşı antibakteriyel etki göstermemesinin altında Gram negatiflerin hücre duvarında mevcut dış zar varlığıdır. Gram pozitiflerde ise bu engelin yer almaması glikopeptidlerin mevcut hedefi olmalarını sağlar. Bu durum bakterilerde Glikopeptid grubu antibiyotiklerine yönelik direnç mekanizmalarının gelişmesini tetiklemiştir. Piyasaya sürülümünden itibaren 30 yıl sonra 1986 yılında yüksek düzeyli Vankomisin direncine Enterokoklarda rastlanmıştır [224]. Enterokoklarda tespit edilen (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. gallinarum* ve diğerleri) taşınan transpozon ile plazmid kaynaklı Vankomisin direncinin diğer Gram pozitiflere (*S. aureus*, *Clostridium difficile* ve *Streptococcus bovis*) aktarılmıştır. HGT yoluyla olan bu taşınım Gram pozitiflerin neden olduğu önemli enfeksiyonlar için son çare olan Glikopeptidlere alternatiflerin bulunması gibi yeni bir sorunu meydana getirmiştir. Glikopeptid grubu antibiyotik direncine MGE'lerin dışında bazı bakterilerde gözlenen kromozom kaynaklı intrensik direnç mekanizmaları da neden olur [223]. Vankomisin direncinin oluşumunda iki önemli mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan biri bir hidrojen bağı etkileşim kaybı sonucu Vankomisin'in bağlandığı öncüllerin değişimi ile 1000 kez daha az bağlanma afinitesi ile sonuçlanan karboksi-terminal d-alanin kalıntısının d-laktat ile değiştirilmesine neden olan enzimlerin mevcudiyetidir [225]. İkincisi ise d-serin kaybına bağlı olarak sterik engelleme ile sonuçlanan bağlanma öncüllerine altı kat daha düşük afiniteye neden olan enzim varlığı

kaynaklıdır. Vankomisin ve diğer glikopeptid grubu antimikrobiyallere direnç gelişimde plazmid ve kromozom kaynaklı farklı moleküler direnç elemanları kaynaklı 6 farklı direnç mekanizması tespit edilmiştir. Bunların ekspresyonundan sorumlu genlerden *VanA* ve *VanB*, plazmid kaynaklı iken *VanC*, *VanD*, *VanE* ve *VanG* kromozomal kaynaklıdır. Bu direnç mekanizmalarının tümü hem Vankomisin hem de Teikoplanin etkisi üzerinde inhibisyon yaparken etki güçleri farklılık gösterir. Oritavancin üzerinde 3 direnç geni (*VanA*, *VanB* ve *VanC*) Telavancin üzerinde bir direnç geninin (*VanA*) etkili olduğu gözlenmiştir [226].

2.2.3.6. Lipopeptidlerin etki ve direnç mekanizması

Bir lipit kuyruğunun bağlandığı peptit çekirdeğine sahip olan çeşitli bileşiklerden oluşan antimikrobiyal bir sınıfı ifade ederler. Toprak bakterisi ya da mantarlarca üretilen bu bileşikler şu an klinik kullanıma sahip geniş bir terapötik ajan grubunu oluştururlar. Bunlar arasında; polimiksinler (polimiksin B ve kolistin), ekinokandinler (kaspofungin, mikafungin ve anidulafungin) ve daptomisin yer alır [227]. İzole edilen ilk örneklerde linear yapıları olduğu düşünülen bu bileşiklerin siklik yapısı Daptomisin'in keşfinden sonra anlaşılmıştır [228].

Bakterilerde antibiyotiklere yönelik direnç gelişimi dirençli bu bakterileri antibiyotiklerden dirence bağlı daha hızlı etkisiz hale getirecek antibiyotik membran aktif molekül analogları üzerindeki ilgiyi artırmıştır [229]. Bakteri membranını hedef alarak çoklu hücre zarı bozunumuna neden olan bu bileşiklere yönelik aktinomisetler üzerindeki (*Streptomyces canus*'da) ilk tespit 1950 yıllarda Amphomycin'in bulunması ile gerçekleşmiştir [228]. Bu antibiyotik sınıfı üzerine yoğunlaşan bu çalışmalar 1959'da Kristallomisin, 1960'da Aspertisin, 1962'de Glumamisin, 1968'de Laspertomisin ve Tsushimycin yeni lipopeptidlerin bulunması ile devam etmiştir [227]. 1980'li yıllarda Eli Lilly şirketindeki bilim insanları tarafından Ağrı Dağından getirilen topraktan izole edilen *Streptomyces roseosporus*'dan A21987C diye isimlendirilen lipopeptid grubu bir antibiyotik öncülü elde edilmiştir [228]. Bu öncül üzerine yapılan çalışmalar ile Gram pozitif bakterileri hedef alarak ciddi cilt enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılmak üzere 2003 yılında ve dirençli özelliğe sahip bakterilerin (MRSA ile Vankomisine dirençli *Enterococcus faecium*=VRE) neden olduğu hastalıkların tedavisi için 2006 yılında Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kullanılması onaylanan Daptomisin'in ön saflarda yer almasını sağlamıştır [227].

Bakterilerde çoklu bozunum ile hücre ölümünü neden olan bu antimikrobiyoller öncelikle lipit kuyruğunu bakteri hücre mebranına sokar. Bu işlemin gerçekleşmesi kalsiyum varlığına ihtiyaç duyulup gerçekleşen bu durumla hücreden iyon (potasyum gibi) pompalanır [230]. Daptomisin'in Gram pozitiflerde foffatidilgliserol içeren stabil yapılı hücre membranının stabilizasyonunu lipit tabakasındaki hem vezikül füzyonu hem de flip flop gerçekleşmesini kalsiyum varlığında indükleyerek bozmaktadır [231]. Sonrasında öncelikli olarak DNA, RNA ve protein sentezindeki bozulmalar ile gerçekleşen yaygın etki hücre ölümü ile sonuçlanır. Gram pozitif bakterileri hedef alan Lipopeptidlerin Gram negatiflere etki edememesinin sebebi dış zarla temasın sağlanamamasından dolayıdır [230].

Özellikle Vankomisin direnci durumunda öncelikli etken ajan olarak kullanılan Daptomisin direncinin altında yatan mekanizma tam netleşmemiş olup sürecin genetik temeli çeşitli, karmaşık ve mutasyonel faktörler nedeni ile çokboyutluluk göstermektedir [232]. *S. aureus*'larda Daptomisin direncinde etkili mekanizma hücre yüzeyindeki pozitif yüklerin artması sonucu kalsiyum ve daptomisin kompleksinin yüzeyden itilmesi şeklindedir. Daptomisin direncinin bu bakterilerdeki dirençleri çeşitlilik göstermekte olup bu direncin gözleendiği örneklerde *mprF* geni ve *yycFGHI* operonundaki *yycFG* bileşenlerinde biriken tek nükleotid polimorfizmi gözlenmektedir. Bunlardan *yyc* operonu stres faktörlerine (ör; antimikrobiyaller gibi) karşı gösterilen genel tepkilerden, *mprF* operonu ise pozitif yükle yüklenmiş fosfolipit sentezi ve hücre membranının translokasyonundan sorumlu olarak direnç gelişimine destek olurlar. Bunun dışında gözlenen hücre membran geçirgenliğinde ve depolarizasyonunda direnç gözlenimi ve hücre membranında daptomisin tutunma noktalarında azalmanın gerçekleşmesi gibi daptomisin direnç çeşitleri de gözlenmektedir [233]. Hücre yüzeyinden Daptomisin'in itilmesine dayalı direnç Enterokokların (*E. faecium*'un bazı suşları) bazı suşlarında da gözlenmektedir. Enterokoklarda gözlenen diğer bir direnç mekanizması ise *E. faecalis* suşlarında gözlenen anyonik fosfolipit mikroalanlarının septal düzlemden uzaklaştırılması şeklinde işlev görür. Bunun nedeni ise Daptomisin ve kalsiyum kompleksinin septal düzleme tutunarak etki göstermesinden dolayıdır [234].

2.2.3.7. Oksazolidinonların etki ve direnç mekanizması

1980'li yıllarda tespit edilmiş mevcut antibiyotik skalasının genişliği ve buna rağmen oluşan direnç mekanizmalarına müdahale ajanlarındaki yetersizlik, yeni antimikrobiyal ajan arayışını yönlendirse de doğal ürünlerden elde edilen ajanların temininde hücre tanılama

yöntemindeki yetersizlikler ve yeni moleküler tanılamamanın gerekliliğini gibi sorunları meydana getirmiştir [235]. Ayrıca doğal ürünlerde gözlenen karmaşık yapı ve bunların modifiye antimikrobiyal ürünlerinin eldesinde zorluklar sentetik bazlı antimikrobiyallerin keşfine yol aralamıştır. Bunun sonucu ilk sentetik antibiyotik sınıfı olan oksazolidinonların ilk üyesi Linezolid'in keşfi gerçekleşmiştir. Tamamen sentetik olan bu antibiyotik komplike ve komplike olamayan Gram pozitif bakterilerce meydana getirilen cilt enfeksiyonlarında etkin bir ajan olması yanında hastane ve toplum kökenli dirençli Gram pozitif bakterilerin (MRSA gibi) neden olduğu enfeksiyonlarda FDA'dan 2008 yılında kullanım izni alan ilk oral antibiyotiktir [236].

Linezolid, diğer Oksazolidinonların tamamı gibi yapısında 2-oksazolidinon içeren ve bakterilerin 50S'lik ribozom alt birimine bağlanarak bakterilerin protein sentezini inhibe ederek etki gösteren bir antibiyotiktir. Ayrıca protein sentezinde 30S birimine bağlanma kanıtı bulunmadan inhibisyona sebep olarak bakteriler üzerinde etkili bu antibiyotik peptit uzama ve translokasyonu sonlandırma adımlarını etkilemeyerek etkiyi oluşturması nedeni ile diğer protein sentez inhibisyonuna neden olan antibiyotiklerden de farklı özellikler göstermektedir [236]. Bu farklı etki mekanizması nedeni ile diğer antimikrobiyaller ile linezolidler arasında çapraz bir direnç olasılığı yoktur [237]. Oksazolidinonlar içinde bulunan Gram pozitif bakteri kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılan mevcut antibiyotikler arasında Linezolid ve Tedizolid yer almaktadır. Bu antibiyotikler bakteritel ribozomun 50S alt birimindeki A bölgesine bağlanarak protein sentezini inhibe ettiği bilinmektedir.

Streptokok türlerinin çoğu üzerinde bakterisidal, Stafilokok ve Enterokoklar üzerinde bakteriyostatik etki gösteren oksazolidinonlara [237], karşı direnç mekanizmaları çeşitlik göstermektedir. Bunlar arasında; 23S rRNA'nın kloramfenikal (Cfr) isimli bir metilaz tarafından metilasyonu, 23S rRNA'yı kodlayan gen mutasyonları ve L3/L4 grubu ribozomal protein değişiklikleri yer almaktadır. Bunlar arasında yer alan 23S rRNA mutasyonlarından V alanı mutasyonu olan G2576U mutasyonu linezolit direnci ile bağlantılıdır. Enterokoklarda birden fazla ifade edilen 23S rRNA gen mutasyonlarının sayısal fazlalığı ile direnç miktarı arasında ilişki [238], en sık gözlenen bu direncin dışında L3/L4 protein grubundaki ikame değişiklikleri ya tek başına ya da diğer direnç belirteçleri ile birlikte kombinasyon halinde linezolit direnci teşekkülünde görev alırlar [185]. Linezolid direncinin gelişiminde hedef bölgelerdeki değişim de etkili olmaktadır. Linezolid ve ribozom kompleksinde 23S rRNA A 2503 ilaç bağlama bölgesinde konumlanmaktadır. *cfr* tarafından kodlanan adenosinde modifikasyon oluşumu ile *ermB* tarafından kodlanan 23S rRNA A2058

bölgesinde dimetilasyon oluşumuna neden olan genler dirençten sorumlu kılınan ve *cfr* operonunda yer almaktadır. *cfr*, linezolid ile etki alanı örtüşen doğal antibiyotiklere karşı direnç oluşumunda görev almakta olup her iki genin (*cfr* ve *ermB*) ekspresyonunun gerçekleşmesi büyük ribozom alt birimi hedefine sahip tüm antibiyotiklere direnç oluşumunda görevlidir. Linezolid direncinde görevli *ermB*'nin plazmid ve transpozon gibi MGE'lar ile olan ilişkileri nedeni ile diğer Gram pozitif bakterilerile de aktarımı direnç seyrini büyötmektedir [238]. Stafilokoklarda L3/L4 proteinlerindeki değışimler en sık gözlenen direnç iken farklı türlerde (*S. aureus* ve *S. epidermidis*) *cfr* genleri varlığına bağılı oluşan dirence de rastlanmıştır. Enterokoklarda (*E. faecalis* ve *E. faecium*) en sık rastlanan linezolid direnci (LNZ-R) 23S rRNA gen mutasyonları iken bazı türlerde (*E. faecium*) L3/L4 ribozomal protein değışikliğine bağılı dirençte gözlenmiştir [240]. Streptokoklarda LNZ-R az gözlenmekle birlikte bazı türlerde (*Streptococcus suis*) *cfr* geni varlıklı bir direnç gözlenmiştir [241].

2.2.3.8. Aminoglikozitlerin etki ve direnç mekanizmaları

Aminoglikozitler, doğal ve yarısentetik antibiyotiklere sahip aktinomisetlerden elde edilen antimikrobiyal grubu ifade eder. İlk üyesi Streptomisin, 1944 yılında Selman Waksman'ın araştırma grubunda bulunan yüksek lisans öğrencisi Albert Schatz'ın Rutgers Tarım Okulu toprağından izole ettiğı *Streptomyces griseus*'den elde edilmiştir [242]. Streptomisin'in klinik kullanıma başlaması ile yeni aminoglikozitlerin keşfine yönelik hızlanan çalışmalar; *Streptomyces* spp.'den 1949'da Neomisin (*Streptomyces fradiae*), 1957'de Kanamisin (*Streptomyces kanamyceticus*), 1967'de Tobramisin (*Streptomyces tenebrarius*), 1960'larda Paromomisin (*Streptomyces krestomuceticus*), *Micromonospora* spp.'den 1963'de Gentamisin (*Micromonospora purpurea*), Sisomisin (*Micromonospora inositol*) isimli doğal antibiyotik olan aminoglikozitlerin bulunması ile devam etmiştir. Elde edilen doğal antibiyotiklerden Sisomisin'den 1967 yılında elde edilen Netilmisin, Kanamisin'den 1972 yılında Amikasin isimli yarı sentetik antibiyotikler kullanılmaya başlanmıştır. Klinik kullanımda kemoterapötik ajan olarak yerini alan Aminoglikozitlerin rolü; toksik gücü daha az olan Sefalosporinler, Florokinolonlar ve Karbepenemlere 1980'li yıllarda aktarılmıştır [243]. Aminoglikozitlerinin kullanımına bağılı bakterilerde direnç gelişimi sonucu bu grubun gençleştirilmiş sınıfını ifade ederek mevcut direnç mekanizmalarından kaçan yeni aminoglikozitler üretilmiştir. Bunlar arasında Arbekasin ve Plazomisin gibi yeni aminoglikozitler yer alır. Plazomisin, *Enterobacteriaceae* için en

yaygın direnç mekanizması olan aminoglikozit değiştirici enzimler (AME) ile geleneksel 1981’de FDA tarafından onaylanarak kullanıma giren Amikasin ve Gentamisin, Tobramisin gibi eski aminoglikozitlerde *Enterobacteriaceae* için en yaygın direnç mekanizması olan aminoglikozit değiştirici enzimlerin etkisinden kurtulmak için yapısal modifikasyonları içeren değişikliklere sahip olur şekilde Sisomisin’den üretilmiştir [244, 245].

Aminoglikozitler, hem Gram pozitifler hem de Gram negatif bakteriler üzerinde konsantrasyona ve çeşidine bağlı geniş spektrumlu bakterisidal etkiye sahiptir [246]. *Enterobacteriaceae* ailesi üyelerinden bazıları (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *E. aerogenes*, *Providencia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp. ve *Serratia* spp.) üzerinde güçlü antimikrobiyal etkiye, bazı üyeleri (*P. aeruginosa*, *Yersinia pestis*) üzerinde daha düşük etkiye sahiptir. Ayrıca Francisellaceae ailesi üyelerinden *Francisella tularensis* üzerinde de etkili olan aminoglikozitler Moraxellaceae ailesi üyelerinden *Acinetobacter* spp. üzerinde düşük etkiye sahiptir. Ayrıca MRSA ve orta düzeyde VRSA izolatları gibi Gram pozitif bakteriler [244] ile *Mycobacterium* spp.’den bazılarına (*Mycobacterium tuberculosis*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* ve *M. avium*) karşı güçlü aktivite gösterirler [243]. Aminoglikozitlerin gençleştirilmiş sınıf üyeleri (Plazomisin gibi) aminoglikozit dirençli, karbapenemaz dirençli ve ESBL dirençli *Enterobacteriaceae* grubu MDR’ne sahip bakteriler üzerinde etki düzeyinin yüksek olduğu in vitro çalışmalar ile anlaşılmıştır [247].

Aminoglikozitler bakterilerin protein sentezini inhibe ederek onlar üzerinde etkilerini gösterirler. Ribozomun küçük alt birimi olan 30S biriminin 16S rRNA A bölgesine yüksek afinite ile bağlanma özelliği gösterirler. Antibiyotiğin çeşidine göre bağlanılan A bölgesinde değişikliğe rağmen etkileri ile bölgenin konformasyonu bozulur. Ribozomun yanlış okumayı düzeltme yeteneğinin elimine edilmesi ile sonuçlanan süreç mRNA’daki bilgi yanlış okunmasını tetikler [248]. Bazı grup üyeleri ise ya protein sentezinin başlamasını bloke ederek ya da uzamasını engelleyerek etki gösterir. Aminoglikozitlerin etkisi ile yanlış ürünlerin sentezine neden olarak oluşan ürünler stoplazmik membrana ya da diğer hücre kısımlarına ulaşarak oralarda zarara sebep olur. Bu zararın başlangıcını aminoglikozitlerin bakteri membranındaki negatif yüklü moleküllere bağlanarak (Gram-pozitiflerde = fosfolipidleri ve teikoik asitler, Gram-negatiflerde= fosfolipidleri ve LPS gibi) lipid tabakasının çapraz konumlanması ile stabilizasyonundan sorumlu magnezyum iyonlarının yer değişimine neden olması ile dış zarın bozunması ile olur. Geçirgenliği artan zar stoplazmada inhibe edilmiş protein sentezi ya da bozuk sentezlenen proteinler zar ve diğer

hücre kısımlarında meydana getirdiği hasar ile aminoglikozit geçirgenliğini artırarak hücreyi ölüme götürür [243].

Aminoglozitlere karşı bakterilerin oluşturduğu direnç mekanizmaları farklılıklar göstermektedir. Bunlar arasında; AME'lerin etkinliği, hedef bölge modifikasyonları (bir kromozom ya da enzim mutasyonu kaynaklı) ve akış pompaları yer alır. Antibiyotiğin çeşidine uygun direnç mekanizmaları farklılaşabildiği gibi bazı izolatlar birkaç çeşidi birlikte bulundurarak direnç göstermektedir.

AME'ler, aminoglikozitlerdeki 2-deoksistreptamin çekirdeği ya da şeker kısımlarındaki amino ya da hidroksil gruplarında modifikasyonun gerçekleşmesini katalize eden enzimlerdir. Aminoglikozitlerde inhibisyonun gerçekleşmesi modifiye edilecek kısımlarda asetilleme, fosforilleme ya da adenilatlama işlemlerini gerçekleştiren AME'lerin 3 farklı grubu tarafından olur. Asetiltransferazlar (AAC'ler), Nükleotidiltransferazlar (ANT'ler) veya Fosfotransferazlar (APH'ler) gruplarından oluşurlar. AME direnç mekanizmalarını kodlayan genler; İntegronlar, gen kasetleri, transpozonlar ya da integratif birimler üzerinde konjugatif elementler yoluyla doğal olarak taşınarak ve transdüksiyonlar veya transformasyonlar ile taşınımı mevcut antibiyotiklerden farklı substratlar üzerinde etki eden mutajenik kombinasyonlar tüm bakterilere MGE ile taşınarak direnç sorununu büyütüştür [248]. AME'lerin faaliyeti sonucu meydana gelen modifiye aminoglikozitler hedef bölgeye duydukları düşük afinite sebebi ile antibakteriyel olarak gücü zayıflamış hale gelir [249]. Aminoglikozitlere direnç oluşumunda ikinci ana grubu hedef bölge modifikasyonları oluşturur. Bu modifikasyonlar 16S rRNA'nın A bölgesindeki nükleotidlere S-adenosil-L-metioninin (SAM) metil grubunun eklenmesinden sorumlu 16S rRNA metiltransferaz (16S-RMTase) enzimleri ile gerçekleştirilir. Burada görevli iki grup 16S-RMTase (N7-G1405 16S-RMTazlar ve N1-A1408 16S-RMTazlar) tespit edilmiştir. 16S-RMTazların kodlanmasından sorumlu genler ekzogenik olup genellikle transpozonlar gibi MGE aracılığıyla kazanılır ve plazmitlerde ve kromozomlar üzerinde de varlıkları tespit edilmiştir. Yatay transferle kazanılan direnç genlerinin varlığı dünyada birçok ülkede (30 ülke ve bölge) elde edilen izolatlarda rastlanmıştır. Bu direnç genlerini taşıyan bazı bakteri gruplarında (*Salmonella* spp.) diğer direnç mekanizmalarının (*NDM-1* metallo- β -laktamaz ve *CTX-M* tipi ESBL direnç mekanizması) kombinasyon halinde bulundurulması tehlikenin boyutunu artırmaktadır [250]. Üçüncü direnç mekanizması olan akış pompaları bazı bakterilerde gözlenen içsel direnç özelliğine sahip aminoglikozitlerin dışarı akışını sağlayan sistemler olarak görev alırlar. RND ailesine dahil olan birçok üyenin aminoglikozitlerin dışa

akışında görev aldıkları tespit edilmiştir. Bunlar arasında *P. aureginosa*'da aminoglikozitlere karşı içsel direnç MexXY akış pompaları ile sağlanır [251]. *E. coli* için RND ailesi üyesi içinde yer alan bir taşıyıcı olan AcrD'nin aminoglikozit direncinde görev aldığı bu proteini kodlayan gen silinmesinin aminoglikozit miktarını artırdığı belirlenmiştir [252]. β -laktamlar, aminoglikozitler, makrolidler ve polimiksinlere doğal dirence sahip olan *Burkholderia pseudomallei* türlerinde hem aminoglikozit hemde makrolidlere karşı çoklu akış sistemi olarak AmrAB-OprA akış pompası görev alır [253]. *A. baumannii* RND proteininin sentezinden sorumlu *adeB* geni aminoglikozid direncinde görev alırken florokinolonlar, tetrasiklinler, kloramfenikol, eritromisin, trimetoprim ve etidyum bromüre karşı duyarlılıkta görev alır [254].

2.2.3.9. Tetrasiklinlerin etki ve direnç mekanizmaları

Tetrasiklinler etki spektrumu geniş olan bir antibiyotik grubudur. Birçok Gram negatif ve Gram pozitif anaerob ve aerob bakteriler, hücre duvarı mevcudiyeti olmayan mikoplazmalar, riketsiya, klamidya, helicobacter, Listeria, Mikobakteri ile *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* ve *Plasmodium falciparum* gibi patojen protozoonlar bu antibiyotiğin etkilendiği grup üyeleridir. Etki alanının genişliği nedeni ile “geniş spektrumlu” antibiyotik olarak ifade bulan ilk gruptur [255]. Benjamin M. Duggar isimli mikologun bir aktinomiset olan *Streptomyces aureofaciens*'ten 1948 yılında ilk tetrasiklin olan Klortetrasiklin'i keşfiyle başlayan bu antibiyotik ailesinin serüveni 1950'de *Streptomyces aureofaciens*'ten Oksitetrasiklin'in keşfi ile devam etmiştir. Tetrasiklin'in bağımsız eldesi ise 1953 yılındaki laboratuvar çalışmaları sonucu (Lederle Laboratories'de klortetrasiklinin ve Pfizer Laboratuvarlarında oksitetrasiklinden) olmuştur. Yapılan çalışmalar ile yarı sentetik Tetrasiklinlerin üretimi gerçekleştirilmeye başlanmış ve Doksisisiklin'in 1967'de (Oksisisiklin'den), Minosiklin 1972'de piyasaya sürülmüştür [256]. Erken dönemde üretilen tetrasiklinlerin parenteral uygulamalarla kullanılmasının sağlanması ve oral yolla absorpsiyonlarının yükseltilmesi için suda çözünürlüğü yüksek yarı sentetik tetrasiklinlerin (Rolitetrasiklin ve Lymesiklin) üretilmesine geçilmiştir. En son keşfedilen yarı sentetik tetrasiklinler Glisilsiklinler olarak adlandırılan 9-glisilamido ikamesine sahip antibiyotiklerdir. Tetrasiklinleri geçirdikleri sürece göre 3 grup altında ele almak mümkündür. Bunlar; 1948 ila 1963 yılları arasında üretilen birinci nesil, 1965 ila 1972 yılları arasında üretilen ikinci nesil ve üçüncü nesil (glisilsiklin) tetrasiklinler olarak adlandırılabilir [257].

Tetrasiklinler bakteri ribozomunda 30S alt birime geri dönüşümlü bağlanarak protein sentezini inhibe eder, bağlanma geri dönüşümlü olduğundan bakteriyostatik etki gösterir. Aminoasil-tRNA'nın ribozom 30S alt birimindeki alıcı siteye bağlanmasını enzim kaynaklı engeller. Böylece protein uzaması ve sentezi inhibe olur, bakterinin büyümesini engeller [256]. Gram negatiflerde tetrasiklinin magnezyum gibi pozitif yüklü bir katyon ile birleşmesi sonucu oluşan kompleks OmpF ve OmpC porin kanalları aracılığıyla dış membranı geçmektedir. Oluşmuş kompleks Donnan potansiyeli nedeni ile çekildiğinde zayıf lipofilik yüksüz olan tetrasiklinlerin periplazmik boşlukta birikimi ile sonuçlanır ve buradan lipid tabakasından hücre içine nüfuz eder. Gram pozitiflerde ise kompleksin benzer bir mekanizma ile membrandan geçtiği geçişte pH'a dayalı enerji harcanarak aktif bir taşıma gerçekleşmektedir [257]. Ayrıca Tetrasiklinlerden bazılarının (minosiklin gibi) memeli hücre yüzeyine bağlanmalarını sağlayan bakteri pilusların (*E. coli*'deki K88 gibi) üretiminde sorumlu proteinlerin sentezini inhibe ederek bakteri üzerinde bakteriyostatik etki gösterir [258]. Tetrasiklinlerin bazı protozalarda mitokondri ve apikoplastlarındaki ribozomlarda etki ettiği gözlenmiştir. Hem ve primidin sentezinden sorumlu bir dizi enzimi barındıran mitokondrideki ve tip II yağ asidi sentezinde yer alan enzimleri, hem biyosentez yollarını barındıran apikoplastlarda tetrasiklinler (Doksisiklin gibi) nedeni ile meydana gelen bozulmuş organellerin yeni oluşan merozoitlere aktarıldığı tespit edilmiştir [259].

Tetrasiklinlerin kullanım spektrumlarının genişliği ve maliyetlerinin düşüklüğü nedeni ile yaygın kullanımı sonucu tetrasiklinlere karşı tespit edilen ilk direnç oluşumu 1953 yılında *Shigella dysenteriae* izole edilmiştir [255]. İlerleyen yıllarda artan sayıdaki tür ve cinsten direnç tespit edilmiştir. Direncin transpozon ya da plazmit gibi MGE'ler aracılığıyla yatay transferinin sonucu 1970'lerde *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* ve *Bacteroides* türlerinde gözlenen direnç, 1980'lerde Gram pozitiflerden *N. gonorrhoeae*'de artan bir oranda rastlanmıştır. Yatay yolla aktarılan birçok bakteride tespit edilen genler arasında, tetrasiklinlere karşı dirençten sorumlu 33 farklı *tet* geni ile oksitetrasiklinler dirençten sorumlu *otr* genleri yer alır [257]. Mikroorganizmalarda gerçekleşen direnç mekanizmaları tetrasiklinin aktivitesi üzerinde etkili olmayıp ribozomun korunması temeline dayalıdır. Bu işlevde görevli direnç mekanizmaları; hücre içindeki tetrasiklin direncinin azaltılmasına yönelik çalışan MGE'lar aracılığıyla aktarılan genlerle proteinleri kodlanan akış pompaları ile tetrasiklinlerin ribozoma bağlanmasını önleyerek kendi ribozomla etkileşime geçen ribozom koruma proteinlerinin (RPP) üretilmesidir [260]. Klinik ortamlarda görülme sıklığı yüksek olan bu mekanizmalar dışında ilaç geçirgenliğini azaltma,

antibiyotik hedeflerinde mutasyonlar ve enzimlerin bozunumu şeklindeki direnç mekanizmaları da vardır [261]. Bakterilerde dış zara ait kromozomal mutasyonlar nedeni ile yaygın gözlenen dirençte hücre içine penetrasyon azaltılmaktadır. Genellikle bir mikroorganizmada bir tetrasiklin direnci gözleendiğinde bu direnç antibiyotiğin tüm sınıfını kapsamaktadır [181]. Bazı Tetrasiklinlerde (tigesiklin gibi) ise bu genelleme geçerlilik göstermez. Bu antibiyotiklerde ribozomu koruyan her iki direnç mekanizmasından da etkilenmeyerek pekçok patojene karşı etkinliğini devam ettirir. Tetrasiklinlerden tigesiklin'e karşı direkte kromozomal kaynaklı akış pompası ekspresyonunun artırılması etkili olabilir [260].

Klinik ortamlarda baskın gözlenen dirençlerden biri olan Akış pompaları ile ribozomun korunması hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde gözlenen etkinliği erken dönem tetrasiklinlerini kapsayan (minosiklin ve doksisisiklin'lerde etkisiz olan) bir direnç mekanizmasıdır [261]. Tetrasiklinlerin hücre dışı aktarılmasından sorumlu genler tarafından kodalan proteinler MFS grubu olan bütünleyici zar taşıyıcılarının ana kolaylaştırıcı süper ailesinin üyeleridir. Enerji kullanılarak gerçekleşen bu akışta görevli 26 farklı akış sınıfının 18 tanesi tetrasiklin akışında görevlidir [257]. İkinci yaygın gözlenen klinik ortam kaynaklı direnç mekanizması RPP'lerin üretimidir ve Gram pozitif Gram negatif bakterilerde 3 grup altında 11 farklı RPP türü (Grup-1: *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(32)* ve *tet(36)*, Grup-2: *tetB(P)*, *otr(A)* ve *tet*. Grup-3: *tet(Q)* ve *tet(T)*) dirence rastlanmıştır [261]. Bu dirençte akış pompaları gibi tüm tetrasiklinler üzerinde etkili değildir. Birinci ve ikinci nesile etkili olan RPP'ler üçüncü nesil tetrasiklinler olan glisilsiklinlere etki göstermezler. Üçüncü nesil içinde yer alan Tigesiklin bakteri tarafından *tet(M)* aracılığıyla kodlanan RPP'lere karşı güçlü bir antibakteriyal etki gösterir [262]. Bazı antibiyotik grupları (β -laktamlar ve aminoglikozitler gibi) için yaygın gözlenen bir direnç mekanizması olan ilaç inaktivasyonu tetrasiklinlerde üç *tet* geni (*tet(X)*, *tet(34)* ve *tet(37)*) ile ilişkili olup daha az gözlenir. Bu dirence yönelik ilk tetrasiklin etkisizleştiricisinin tanımlaması 1989 yılında *Bacteroides fragilis* türünde keşfedilen *tet(X)* ile olmuştur. Yapılan çalışmalar *tet(X)*'in tetrasiklinin C-11'a bölgesine bir hidroksil grubu bağlanmasını sağlayarak antibiyotiğin inaktivasyonundan sorumlu, ortamda siyah renkli bir polimer oluşumuna neden olan flavine bağımlı bir monooksijenaz olduğunu göstermiştir. *Tet(X)* in aktivitesi tetrasiklinlerin her üç kuşağı içinde (tigesiklin'ler dâhil) etkinlik gösterir. Ayrıca *tet(X)* tigesiklini NADPH'ı kullanarak (mağnezyum varlığında) 11a-hidroksitigesikline dönüştürerek ribozoma turunmasını zayıflatır [261]. Bakteriler tarafından az ifade bulan diğer bir direnç

mekanizması ilaç geçirgenliğinin azalması ve hedef mutasyonları olarak gruplanırlar. Tetrasiklinlerin Gram negatif bakterileriye penetrasyonu için öncelikle LPS membrandan magnezyum-tetrasiklin yaparak geçmesi ve sonrasında hücre membranından porinler aracılığıyla taşınımı ile gerçekleşir. Çoklu antibiyotik direncine sahip olan *E. coli*'lerde marA lokusunun aşırı ifade edilmesi ile dışa akış pompaları (AcrAB) indüklenirken, porin ekspresyonun (OmpF) yavaşladığı gözlenebilir ve tetrasiklinlerin hücrede birikimi azalabilir [263]. Hedef mutasyonuna dayalı tetrasiklin direncine yönelik incelenen tetrasiklin dirençli *H. pylori*'nin izolatlarında bu direncin sorumluluğunun 926, 927 ve 928 pozisyonlarındaki nükleotidlerin yer değişmesi kaynaklı olabileceği ve bunların direnç etki düzeyinde kümülatif bir soruç oluşturabileceği düşünülmektedir [256].

2.2.3.10. Makrolidlerin etki ve direnç mekanizmaları

Makrolidler, makrosiklik bir lakton halkasına aminoşeker ya da deoksişeker kalıntısının eklenmesi ile oluşan antibiyotik grubudur. İnsanlarda gözlenen enfeksiyonlarda protein inhibisyonundan sorumlu geniş bir gruptur [264]. 1950 yılında W. Lindenbein ve I. Olfermann tarafından bir *Streptomyces* sp. suşundan (suş 326) izole edilen acı tadı nedeniyle Pikromisin adı verilen antibiyotik ilk makrolid üyesidir [265]. Makrolidlere ismini veren makrosiklik lakton halkasının üye sayısındaki farklılık makrolidlerin gruplandırılmasında görev almıştır ve makrolidler 12, 14, 15, 16 üyeli makrolidler diye gruplandırılmışlardır. Bunlardan ilk nesli 12, 14, 16 üyeli doğal antibiyotikler oluşturken, ikinci nesil birinci neslin üyesi olan Eritromisinin modifikasyonu sonucu meydana gelen 14, 15 üyeli yarı sentetik antibiyotiklerden oluşur. Metimisin 12, Eritromisin 14 üyelikli antibiyotiklerin en bilinen üyeleridir. Azitromisin 15 üyelikli bir antibiyotikken, karbomisin, niddamisin ve tilosin 16 üyeliklidir. *Streptomyces* sp. tarafından neredeyse tüm makrolidler üretilirken, *Micromonospora* cinsine ait türler tarafından bazı makrolidlerin (14 ve 16 üyeli) üretildiği yapılan izolasyon çalışmaları ile elde edilmiştir [264]. Birinci nesil makrolidlerin farmakokinetik özellikleri ve sindirim sistemindeki asiditenin yüksek olduğu noktalardaki (ör; mide) stabilitesini koruyamama gibi özellikleri nedeni ile ikinci nesil makrolidlerin üretimini teşvik etmiştir [266]. Üretilen ikinci nesil antibiyotikler birinci nesillerin eksikliklerine karşı (farmakokinetikte gelişmişlik, düşük asiditede kararlılık gibi) üstün olsada kendilerine karşı gelişen dirence karşı etki güçleri düşüktür. Artan makrolid direncinin yönlendirmesi ile oluşan araştırmalar; ikinci nesil makrolidlerde lakton halkasında bulunan L -kladinozun yerini 3-keto grubunu alması ile oluşan üçüncü nesil

makrolidlerin sahip olduğu keto grubu nedeni ile ketolidler diye adlandırılan grup üyelerinin oluşturulması ile sonuçlanmıştır. Telitromisin, 2004 yılında klinik kullanıma onay alan yarı sentetik eritromisin türevi klaritromisin (2. Nesil makrolid) kaynaklı tek üçüncü nesil makroliddir [267].

Protein sentezi inhibitörü olan makrolidler bu görevlerini ribozom 50S birimindeki 23S alt birimine ya da çeşitli proteinlerle yaptığı spesifik bağlanmalar ile gerçekleştirir. Peptit zincirinin uzamasını engelleyerek inhibisyonu sağlayan makrolidlerden geniş hacime sahip olanlar iki aa'lık peptitlerin blokasyonunda görev alırken, küçük hacimli makrolidler ise daha büyük (6 ya da 8 aa'lık) kesilmiş peptidlerin oluşumunu sağlayarak etki gösterir [268]. 16 üyeli makrolidler üzerlerinde yer alan 5-disakkarit 23S ribozomal birimi peptidil transferaz merkez tüneline yedekleyerek doğrudan peptid bağı oluşumunu engeller [269]. Ayrıca ribozomal alt birimlerinde yeni 50S alt ünitelerin üretimini r-protein ve rRNA bileşimlerinde görevli öncü moleküllere bağlanarak engeller [270].

Makrolidlerin kullanılması sonucu bakterilerde gözlenen direnç; plazmid, transpozon ve genomik adalarda bulunan direnç genlerinin tür ve suşlar arasında yatay transferi ile yayılım gösterir. Gram negatiflerde makrolid direnci dört mekanizma ile tanımlanır. Bunlar; hedef bölge modifikasyonu, ATP bağlayıcı kaset ailesi proteinleri (ABC-F) vasıtasıyla ribozom koruması, MFS taşıyıcıları tarafından gerçekleştirilen aktif akış ve enzimatik inaktivasyondur [271]. Makrolidler, genellikle 50S ribozomunun 23S rRNA bölgesinin V bölgesinde yer alan iki nükleotide (A2058 ve A2059) bağlanır ve II bölgesinde yer alan bir nükleotide (A752) ise nadiren bağlanır. Linkozamidler ve streptograminler B antibiyotikleri ile aynı hedef bölgelerine bağlanan makrolidlerin hedef bölgeleri, *erm* genleri tarafından kodlanan metilaz (adenil-N-metiltransferaz) enzimleri vasıtasıyla adeninin metilasyonunu (N-metil adenin veya N, N-dimetil adenin şekillerinde) sağlar ve transkripsiyon sonrası modifikasyon grubunda yer alan modifikasyonu oluşturur [272]. İkinci direnç mekanizması; dört tipi bulunan (A, B, C, D) Msr proteinleri tarafından ribozomdan antibiyotiğin uzaklaştırılması ile ribozomun korunmasını sağlar. Bu işlemi gerçekleştiren ATP bağlayıcı ailesi üyesi proteinler bir akış pompası mekanizması gibi çalıştığı düşünülmektedir. Ana kolaylaştırıcı süper ailesi olan Mef'e ait pompalar bir antiporter gibi görev alarak makrolidlerin bir proton karşılığında dışa aktarılmasından sorumludur. Gram pozitiflerde de gözlenen bu akış pompaları, Mef(A) ve mef(E) iki ana alt sınıfa ayrılır ve %80'den daha fazla AA dizilim homolojisine sahip olup 14 ve 15 üyeli makrolidlere dirençte görev alırken 16 üyelilere karşı etkisizdir. Dördüncü mekanizma olan enzimlerce makrolidlerin inaktive

edilmesi düşük insidansa sahiptir. Bir grup gen (*empC*, *ereA* ve *ereB*) tarafından katalizlenen esterazlar vasıtasıyla gerçekleşen hidrolitik inaktivasyon 14 ve 15 üyeli makrolidlere güçlü direnç oluşumunu sağlarken, 16 üyeli makrolidlere karşı etkisizdir [273]. Sahip olduğu lipoprotein yapılı dış zar nedeniyle Gram negatiflerin makrolidlere karşı mevcut fizikokimyasal özelliklerden dolayı içsel bir dirence sahiptir. Bu engeli aşan makrolidler için Mef akış pompaları ikinci direnç mekanizmasını oluşturur [274].

2.2.3.11. Kinolonların etki ve direnç mekanizmaları

Aktivitesi 3. pozisyonda sahip olduğu karboksilik asit grubu ve 4. pozisyonundaki karbonile gereklilik gösteren bisiklik çekirdek yapısına sahip sentetik antibiyotik grubudur. Bisiklik çekirdeğin 1 ve 7 ve/veya 8 konumundan bağlı ikameleri kinolon spektrumunun belirlenmesinde görev alır. İkamelere göre piperazinil-, pirolidinil- ve piperidinil- diye üç kategoriye ayrılırlar. Piperazinil- grubu kinolonlar 1 ve 7 konumunda, 1 ve 7 ve 8 konumunda yan zincirlere sahipken; pirolidinil- ve piperidinil- grubu kinolonlarda her üç konumda yan zincirler bulundurmaktadır [275]. Genel olarak 3-amino-piperidinil tipi yan zincirler, 3-amino-pirolidinil yan zincirlerine sahip olanlarla eşdeğer olan Gram negatif ve Gram pozitiflere karşı dengeli bir etki gösterirken [276], piperazinil tipi kinolonlar Gram negatifler üzerinde daha geniş Gram pozitiflerde daha dar kapsamlı etki spektrumuna sahiptirler [277]. Kinolonların ilk üyesi Nalidiksik asit tesadüfi olarak Leshner ve ark. tarafından sıtma önleyici bileşik olan klorokin sentezinin bir yan ürünü şeklinde bulunmuştur [278]. Kaynağı farklı olan (hastane ve toplum kaynaklı) ciddi hastalıkların tedavisinde geleneksel ajanların başarı göstermemesi ya da bunlara karşı gözlenen dirençlerde önerilen antibiyotik sınıfıdır [279]. Kinolonların ilk üyeleri üzerine yapılan farmakokinetik profili, antimikrobiyal aktivite ve moleküler yapılarını güçlendirmeye yönelik çalışmalar kinolonların sınıflandırılmasına neden olan florlanmış yeni nesil kinolonların üretilmesine yol açmıştır. Kinolon molekülünün C6 pozisyonunda meydana gelen florlama ile florokinolon ismiyle anılan ikinci nesil kinolonların süreci başlamıştır. Bu süreci başlatan ilk florokinon norfloksasin 1978 yılında üretilmiş olup üzerinde yapılan çalışmalar ile 1986 yılında klinik kullanıma sunulmuştur. İkinci nesil kinolonların Gram pozitifler ve anaeroblara karşı düşük aktivitesini güçlendirmek üzere yapılan çalışmalar Gram pozitifler üzerinde daha güçlü bakterisidal etkiye sahip üçüncü nesil florokinolonların (levofloksasin, gatifloksasin ve moksifloksasin gibi) gelişmesi ile devam etmiştir. Gram pozitifler üzerinde

aktivitenin daha iyileştirildiği ve anaeroblar üzerinde etki gücüne sahip Gemifloksasin gibi dördüncü nesil florokinonların keşfini getirmiştir [280].

Kinolonlar etki gücü mikobakteri, anaerob bakteriler, Gram pozitif ve Gram negatifler gibi geniş bir alana sahip olup bu etkiyi; bakteri nükleik asit replikasyonunda görevli topoizomera IV ve DNA giraz gibi enzimleri bozarak bakteriyal nükleik asit sentezini inhibe ederek gerçekleştirir [281].

Çoğu Gram negatif bakteride dirence yönelik ana hedef olan DNA giraz enzimi Topoizomera IV enzimlerin tip II grubuna dahil olup, DNA replikasyonu sırasında oluşan pozitif sarmal bükülmeleri ortadan kaldırma görevine sahiptir. Aynı gruba dahil olan çoğu Gram pozitif bakteriler için ana hedef olan topoizomera IV ise DNA'nın yavru hücrelere ayrılması için DNA sarmalını bozma görevini üstlenir. *M. tuberculosis*, *T. pallidum*, *H. pylori* gibi bazı bakteri gruplarında eksik olan topoizomera IV'ün görevini DNA giraz üstlenir [281].

Bakterilerde gözlenen kinolon direnci kromozomal ya da plazmit kaynaklı mutasyonlar nedeni ile meydana gelir. Kromozomal mutasyonlar kinolonların hedefi olan proteinlerin A ve B alt birimlerini kodlayan gen (topoizomera IV için *gyrA* ve *gyrB*, DNA giraz için *parC* ve *parE*) mutasyonları ya da ilaç birikimini azaltan atımı artırıp alımı azaltan mutasyonlardır. Plazmit kaynaklı mutasyonlar ise plazmit kaynaklı direnç genlerinde gözlenir. Plazmit kaynaklı bu direnç; *qnr* geni tarafından kodlanan bir pentapeptidi kinolonun DNA giraz ve topoizomera IV üzerindeki etkisini bloke etme, *aac(6')-Ib-cr* geni tarafından kodlanan asetilaz ile piperazin halkasındaki amino grubunun değiştirilmesi ve *qepA* geni tarafından kodlanan hücre içi antibiyotik direncini azaltan akış pompası tarafından sağlanır. Plazmit aracılı bu direnç mekanizmalarının sağladığı direnç düşük olmasına rağmen kromozomal kaynaklı ek kinolon direnç mekanizmalarının seçiminin arka planının oluşumunda görev alırlar [280].

Kromozomal kaynaklı kinolon direnci için Enterobakterilerdeki düşük seviyedeki direnç *gyrA* geninde mutasyon olması ile yüksek direnç ise birden fazla mutasyonun olması ile sağlanır. Bu grup üyesi *E. coli*'de kinolon direnç oluşumu *gyrA* genindeki mutasyon ile olup *gyrB* genindeki mutasyon düşük seviyeli dirence katkı da görev almaktadır [282]. Enterobacteriaceae'lerde kinolonların ekstrüde edilmesinde sorumlu ana akış pompası için AcrAB/TolC aşırı ekspresyonunun rolünün önemli olduğu gözlenmiştir [283]. *E. coli*'de florokinolon direncinde görevli AcrAB akış pompasının silindiği bir mutantta AcrEF akış pompasının görevi üstlendiği anlaşılmıştır [284]. Dış zar proteinlerinin regülasyonundaki

aşağı yönlü eğim *E. coli* (OmpF ve OmpC) ve *K. pneumoniae*'de (OmpK35 ve OmpK36) florokinonların zardan geçişini azaltmaktadır [285]. Gram negatiflerden *P. aeruginosa* ve *A. baumannii*'de, *gyrA* genindeki tek mutasyonun gerçekleşmesi önemli bir florokinolon direnci gelişiminde önemlidir. Tek mutasyonun bu etkiyi oluşturması; bazı akış pompalarının ifadesini bulması, zardan düşük seviyedeki geçirme ve yapısal ekspresyonlar ya da her iki durumdaki etkileşimlerin antimikrobiyallara karşı içsel direnç kaynaklı olması nedeniyledir [280]. Topoizomeraz IV'den yoksun olan *Campylobacter* spp. için yüksek seviyeli moksifloksasine direncin gelişimi, siprofloksasine yüksek dirençte olduğu gibi *gyrA* genindeki tek mutasyonla değil çift mutasyonla sağlanmaktadır [286]. Gram pozitif bakterilerdeki florokinolon dirençleri hedef alınan enzime göre türler arasında farklılık gösterir. Örneğin *S. aureus*'da bu direnç Topoizomeraz IV'ü hedef alırken [287]. *Streptococcus pneumoniae*'de ise her iki enzim (DNA giraz ve Topoizomeraz) ilk hedefleri oluşturur [288]. Gram pozitif bakterilerde gözlenen kinolon direncinde görevli akış pompalarında esas görevi MFS süper ailesi üstlense de Gram negatiflerde daha belirgin gözlenen MATE ailesine sahip olan örneklerle rastlanmıştır [289].

Plazmid aracılı dirençler arasında *qnr* geni *E. coli*'de kinolon direncinin tamamlanmasında görev alır ve bakteri DNA giraz'ını siprofloksasine karşı koruyarak bunu yapar [290]. Aynı gen Topoizomeraz IV'ün Enterobacteriaceae'larda flokinon direncine karşı korumaktadır [280]. Bir diğer plazmik kaynaklı direnç mekanizması, hidrofilik kinolonlar olan norfloksasin ve siprofloksasine karşı dirençten sorumlu *qepA* geni tarafından kodlanan bir akış pompasıdır ve MFS ailesi üyeleri ile benzer homolojiye sahiplerdir [291].

2.2.3.12. Sülfonamid ve trimetoprim etki ve direnç mekanizmaları

Sülfonamidler ve trimetoprinler sentetik bazlı antibiyotik grubu olup insanlar ve hayvanlar üzerinde uzun yıllar boyunca etkili ve ucuz olma gibi üstünlükleri nedeniyle kullanılmışlardır [292]. Endüstriyel bir boya olan sülfakrisoidinin antimikrobiyal özellikte olduğunun 1930'lu yıllarda keşfi ile bu antibiyotik ailesinin ilk üyesine yönelik çalışmalar başlamıştır. Boyanın antimikrobiyal etki göstermesine neden olan metaboliti sülfonilamidin (para-aminobenzen-sülfonamid) aktif bir bileşik olduğu bulunmuştur [293]. Bu bulgunun eldesi, Prontosil rubrum ismiyle anılan sülfonilamid öncülünün Gerhard Domagk tarafından *Streptococcus pyogenes* ile enfekte edilmiş fareler üzerinde denenerek farelerde peritonit gelişimini engellemeye yönelik 1932 yılındaki çalışmalar [294] ve Trefouel ve meslektaşlarının 1935 yılında Prontosil'in azo bağını kırması ile oluşan yan ürünlerinin

antimikrobiyal aktivitesinin testi ile olmuştur [181]. Prontosil'den daha az toksik ve genişlemiş antimikrobiyal aktiviteye sahip sülfonamidler üzerinde yapılan çalışmalar ile atılımı, çözünürlüğü ve absorpsiyonu farklı türlerinin eldesi ile sonuçlansa da bunlar paraaminobenzoik asidin (PABA) yapısal analoglarıdır [293]. Üretilen farklı modifikasyonlara rağmen hepsi tetrahidropteroik aside bağlanan PABA yerini alarak mikrobiyal folik asit sentezini inhibe eder ve bakteriyosistik etki ile bakteri bölünmesini engeller [295]. Diaminopirimidinler grubu üyesi olan (2,4-diaminopirimidin) Trimetoprinler dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe etme özelliği ile folik asit ve bakteri pirimidin sentezi üzerinde etkiye sahiptir. Trimidinlerin sentezi antimikrobiyal ajan arayışında olan 1950 ve 1960'larda bu alanda çalışmalar yürüten Hitchings ve çalışma arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir [295]. 1961 yılında gerçekleşen bu sentezden sonra Trimetoprinlerin kullanımına 1962 yılında İngiltere'de geçilmiştir [296]. Üretilen bu antimikrobiyal grup linozolidler hariç olmak üzere eski antibiyotiklerin çapraz dirence karşı modifiye formları olmayan son yeni antimikrobiyal gruptur [292]. Trimetoprim'ler 1968 yılında Bushby ve Hitchings tarafından sülfonamidlerdeki aktiviteyi güçlendirmek için trimetoprim ile kombinasyonu tanıtılıp ilerleyen 10 yıllık süreçte birçok bulaşıcı hastalık için kemoterapötik ajan olarak bu kombinasyonun kullanımı gerçekleşmiştir. Toplum kökenli ve hastane kökenli Streptokoklar, Stafilokoklar, *Enterobacteriaceae*, *Neisseria* spp. ve *Pseudomonas* spp. suşlarında giderek artan oranda gözlenen Sülfonamid direnci yanında bunların çapraz dirençlerine de rastlanmaktadır [295]. Sülfonamide karşı mikroorganizmaların geliştirdiği direnç mekanizmaları arasında *E. coli* mutant suşunda gözlenen dihidropteroat sentetaz'daki değişiklik yer almaktadır [297]. Ayrıca *N. gonorrhoeae* ve *S. aureus* suşlarında PABA ekspresyonundaki artışa bağlı direnç bulunmuştur. Farklı bakterilerde gözlenen sülfonamid direnç gelişimleri plazmit kaynaklı (*Enterobacteriaceae* türlerinde) olduğu gibi hem plazmid hem de kromozol kaynaklı (*Neisseria* spp.) da olabilmektedir. Dirençten sorumlu genler *sul* genleridir [298]. Trimetoprim direncinde plazmit ve kromozomal kaynaklı örneklerine rastlanmış olup dirençte; dihidrofolat redüktazda aşırı üretim veya modifiye formlarının devreye girmesi (*Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* ve *Campylobacter* spp.), hücre geçirgenliğin azalması, ilaç bağlanma afinitelerindeki kayıp görev almaktadır [295].

2.3. Bakterilerde Direnç Tanımlanması

Bakteriyel enfeksiyonlarda patojene yönelik kullanılan terapötik ajanların ilk uygulamalarında gözlenen başarının azalmasında antimikrobiyale karşı geliştirilen direnç ve potansiyel tolerans yatmaktadır. Gerek hastane kaynaklı gerek toplum ve çevre kaynaklı olsun, bakterilerde gözlenen çoklu direnç mekanizmalarının temelinde insan kaynaklı kullanılan antimikrobiyal ajana karşı geliştirilen direnç geninin HGT ile kazanımı temeline dayanmaktadır [299]. Direncin gözlemlendiği bakterilerde direnç geni tespitinde fenotipik ve genotipik farklı yöntemler kullanılmaktadır. Bu farklılık Gram negatif ve pozitif bakteriler arasında da değişmektedir [300].

2.3.1. Gram negatif bakterilerde fenotipik direnç tanımlama

Gram negatif bakterilerde gözlenen direnç tespitine yönelik kullanılan fenotipik yöntemler arasında difüzyon ve dilüsyon yöntemleri sayılabilir [300]. Difüzyon yöntemleri içindeki disk difüzyon yöntemlerini yedi başlık altında toplamak mümkündür. Bunlar; çift disk sinerji testi (DDST), Karbonil siyanür m-klorofenil hidrazon (CCCP) testi, D testi, hodge testi, Boronik asit testi, Imipenem-EDTA sinerji testi, Kombinasyon meropenem disk testidir.

Çift disk sinerji testi (DDST); özellikle ESBL olmak üzere, Ampiler A Sınıf β -laktamazlarda da inhibisyona neden olan klavulanik asit gibi inhibitörlerle β -laktamaz tespitinin yapıldığı yöntemdir.

Karbonil siyanür m-klorofenil hidrazon (CCCP) testi; karbapenem direncinin saptanmasında bir efflux pompası inhibitörü olan Karbonil siyanür m-klorofenil hidrazon'un kullanılması ile akış pompasının aşırı ekspresyonuna dayanır.

D testi; imipenem veya sefoksitin indükleyici ajan olarak kullanılması ile indüklenebilen *AmpC* β -laktamazların varlığının tespitine dayalıdır.

Hodge testi; karbapeneme duyarlı bir indikatör suş ile karbapenemaz üreten izolatın birlikte inoküle edilmesi sonucu indikatör suş inhibisyon bölgesi çevresindeki bozunma ile karbapenemaz varlığının tespitine dayanır. Kullanışlılığına bağlı üstünlüğünün yanında KPC ve MBL gibi karbapenemaz türlerinin ayrımını yapamaması gibi bir zayıflığa sahiptir.

Imipenem-EDTA sinerji testi; MBL üreten klinik örneklerin tespitinde kullanılan yöntem; poliaminokarboksilik asit olan ve çinko iyonlarına bağlanarak MBL'ların inaktivasyonuna neden olan etilen-diamin-tetraasetik asitin kullanımına dayanır.

Boronik asit testi; *K. pneumoniae* karbapenemazların (KPC) ile A ve C sınıfı β -laktamazları inhibe ederek fenotipik tanımlamada görevli bu testte inhibitör görevini

fenilboronik asit gerçekleştirir. Test DDST'ne göre ESBL'lerin veya *AmpC* β -laktamazların varlığı durumunda hatalı pozitifliği azaltması ve uygulama kolaylığı sağlaması gibi özellikleri ile üstünlüklere sahiptir.

Kombinasyon meropenem disk testi; boronik asit ve EDTA testlerinin bir kombinasyonu olan testin doğuşunda incelenen izolatlarda KPC ve MBL'ların birlikte rastlanması temel oluşturmuştur. KPC üreten, MBL üreten, çift karbapenamaz üreten veya karbapenem duyarlı izolatların ayırımını yapabilmesi bu testin üstünlüğüdür [301].

Gradyan difüzyon testi (E test); Gram negatif bakterilerde kullanılan bakteri minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) değerlerinin EUCAST önerileri doğrultusunda değerlendirildiği direnç tanımlama fenotipik yöntemlerindendir [302].

Gram negatiflerin direnç tanımlamasında kullanılan Dilüsyon yöntemleri; Agar dilüsyon, makrodilüsyon ve mikrodilüsyon olmak üzere 3 başlık altında ele alınabilir [303, 304].

Kolorimetrik yöntemler besiyerinde gözlenen renk değişime bağlı olarak Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin ayırımında kullanılan diğer bir fenotipik yöntemdir [305].

Bakterilerde tanımlamanın ve antimikrobiyal duyarlılık tespitinin hızını artırmak için gelişen teknolojiye paralel olarak üretilen otomatize edilmiş fenotipik tanımlama yöntemleri de bulunmaktadır. Bunlar arasında; mikroakışkan cihaz tabanlı kültür sistemleri, görüntüleme teknolojileri ve Hücresel kütle ve yoğunluk tespit sistemleri yer alır [306]. Mikroakışkan cihaz tabanlı kültür sistemleri; bakterilerin tek hücrelerinin ayrılarak nanolitre tıkaçları içinde hapsedilerek hem bakteri tanımlamasını (bir bakteri için yaklaşık 2 saat) hem de yöntemin hibrid formları ile birçok antibiyotiğe karşı MIC değerlerinin ortamdan yayılan floresans yoğunluğuna bağlı olarak bir çalışmada elde edilme (yaklaşık 7 saat) süresini hızlandırmaktadır [307]. Hassas ve hızlı Antimikrobiyal duyarlılık testi (AST) tayini yapan floresans yayımlı mikroakışkan platformların kullanıldığı yöntemin *E. coli* üzerinde kombine ve tek olarak antibiyotik (ampisilin, sefalekssin, kloramfenikol, tetrasiklin) uygulamaları ile denenmesi 4 saatte duyarlılık sonucunun alınmasını sağlamıştır [308].

Görüntüleme teknolojileri; ortamda yer alan bakterileri sayısına bağlı bulanıklık ya da kolorimetrik değişiklikleri ölçerek antimikrobiyal duyarlılık ve direnç tespitini 1 dakika gibi kısa sürede sağlayan geleneksel otomatik görüntüleme sistemleri (VITEK 2 ve MicroScan) bulunmaktadır. Bunun yanında tek bakteri hücrelerinde meydana gelen morfolojik değişiklikleri ortamdaki mikroakışkan agaroz kuyularına eklenmiş antibiyotiklerin jel kanallarında difüzyon esasına dayalı tek hücre morfolojik analiz (SCMA) yöntemi ile

antimikrobiyal ajan duyarlılığı kuyu çevresinden alınan görüntülerle tespitinin yapıldığı görüntüleme sistemleri de vardır [309]. Otomatik görüntüleme teknolojileri arasında yer alan oCelloScope; bakterilerin 6-30 dakika gibi kısa sürede AST'nin yapılmasını sağlayan hassas ve hızlı sonuç veren bir sistem olmanın yanında dirençli suşların (MRSA, ESBL, VRA gibi) büyümesinin dijital mikroskopik görüntüleme ile 3 saat gibi bir sürede direnç tanımlamasının sağlandığı bir sistemdir. Aynı gün içinde AST ve dirence bağlı MIC değerlerinin tespitinin yapıldığı 96 kuyucuklu sistemlerden aynı süreçte dijital filmlerin görüntülenmektedir. oCelloScope; özellikleri ile en fazla piyasada kullanılan otomatik AST (Vitex 2) sistemlerinden daha hızlı sonuç veren (8 saat yerine 1 saat) bir tekniktir. Ayrıca piyasada yer alan direnç tespitine yönelik mikrodilüsyon hazır plakları ile sonuçlarının %91 oranında tutarlılık gösterdiği ve bu yöntemden daha kısa sürede (yaklaşık 5 saat) sonuç alınan bir sistemdir [310]. Bakteri tanımlamada kullanılan bir diğer yöntem olan Growth Direct sistemi, agar besiyeri içinde filtrasyon sonrası büyütülen bakterilerin henüz gözle görünür koloni oluşturmada (E. coli için 120 hücre içinde tespit) mikrokoloninin birkaç nesil öncesinde tespiti ve mikrokolonideki otofloresans yayılımının otomatik dijital okuyucular tarafından sayılması esasına dayanır. Bu sistem ile sonuç eldesinin hızlanması sağlanır ve manuel sayımdan kaynaklı insan hatasını ortadan kaldırır [311].

Bakteri hücre kütle ve yoğunluklarının ayrılması; prokaryot ve ökaryot hücrelerin ve hatta sporların asılı mikrokanal rezonatörü (SMR) kullanılarak hücre yüzey kütlesi ve hücre kaldırma yoğunluk farklılıkları kaynaklı sağlanmasıdır. Yöntem aynı zamanda dirençli ve duyarlı Gram negatif bakterilerin (*Citrobacter rodentium* gibi) ayrılmasını sağlar [312].

Boncuk döndürme ve harekete dayalı bakteriyel tanımlama sistemi; manyetik bir alan içine yerleştirilen manyetik bir boncuğun kendisine yapışan bakteriye bağlı hacmindeki değişiklik nedeni ile dönme hızındaki azalmanın tespiti ve buna bağlı bakteriyel tanımlamanın gerçekleştirilmesine dayanır. Eş-zamansız manyetik boncuk döndürme sistemi (AMBR) diye adlandırılan ve biyosensör olan mikroakışkan damlacıklar içinde uygulanan antimikrobiyallere bağlı olarak bakteri hücresindeki büyüme ve bölünmenin ortam yoğunluğuna bağlı olarak tespiti yapılmaktadır. Gram negatif bakteriler (*E. coli*) üzerinde yapılan çalışmada gentamisin antibiyotığının değişen konsantrasyonlarına maruziyete bağlı duyarlılık ve direnç durumunun tespiti 15 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleşmiş olup, tespitite ortamdaki alanda dönme hızındaki %52'lik değişiklik etkili olmuştur [313].

Bir diğ er fenotipik yöntem; boncuk temelli immünolojik teste eklenen mikroskop ve kamera kaynaklı optik difüzyon ölçümü ile canlı bakterilerin parçacıklara bağlanıp bağlanmamasına dayalı olarak yayılımın artıp azalmasının ölçümü temelli AST tespiti dir. Bu yöntemde partikül yayılımı canlı bakteri bağlanımına bağlı artar,  l  bakteri bağlanımı ile azalır. Bu yöntemin avantajları arasında düşük bakteri yoğunluğu, tek partiküle yapışık tek bakteri olması, kısa s re de sonuç eldesi sayılabilir. Gram negatif bakteriler (*P. aereginosa*)  zerinde denenen yöntem 2 saat gibi kısa süreçte sonuç eldesi sağlar [314].

Dielektroforez yöntemi; bakterilerin dörtlü elektrot dizisi üzerinde antibiyotiklerle teması sonrası hücre duvarı oluşumunun engellenmesine dayalı boyunun uzaması ve antibiyotik yoğunluğuna bağlı ölümünün sağlandığı hızlı sonuç alınan AST uygulaması dır. Gram negatif bakterilerden *E. coli* ve *K. pneumoniae*'nin  -laktam ile teması sonrası bu bakterilerdeki dielektroforetik davranış değişikliği sonucu M C değeri eldesi 2 saat gibi kısa bir s re de gerçekleşmektedir [315].

Atomik kuvvet mikroskobunun (AFM) kullanıldığı ve antibiyotik  z ltisi içinde mikroskop konsolundaki dalgalanmaların mikroskop aydınlatma sistemi tarafından algılandığı, düşük konsantrasyonlarda bile bakteri tespiti ve karakterizasyonunun yapıldığı bir tekniktir. Gram negatif bakterilerden *E. coli*  zerinde de kullanılan teknikte antibiyotikle temas durumunda konsolda dalgalanmalar güçlenmektedir [316].

2.3.2. Gram pozitif bakterilerde fenotipik direnç tanımlama

Gram pozitif bakterilerde Gram negatiflerde olduğu gibi disk difüzyon antibiyogram testi kullanım kolaylığı ve ekonomikliği nedeniyle tercih edilmektedir. Sağlık kuruluşlarında AST olarak yaygın kullanıma sahip olup direnç ve duyarlılık durumlarını belirten disk difüzyon yöntemi sonuçları ile bakteriler için diğ er bir duyarlılık testi olan E test sonuçlarının uyumluluk gösterdiği ve direnç tanımlamada Gram pozitifler için alternatif fenotipik bir yöntem olarak önerilebileceği sonucuna varılmıştır [317].

Çift disk sinerji testi (DDST); Gram pozitif bakterilerde kullanılan disk difüzyon yöntemlerinden biri olup birden fazla antibiyotik diski ne bağlı oluşan direnç durumu tespitinde kullanılır. ESBL  reten Gram pozitiflerde (*Enterobacter spp.*) farklı  -laktamlara karşı direnç tespitinde kullanılmaktadır [318].

Fenotipik olarak fenotipik doğrulayıcı disk difüzyon testi (PCDDT); DDST gibi tek antibiyotiğin kullanılmadığı direnç tespitinde görevli fenotipik bir yöntemdir. İki antibiyotik diskinin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının birbirine temas noktalarının dikkate alındığı

bir yöntemdir. β -laktamaz üreten Gram pozitiflerde DDST ile birlikte kullanıldığında sonuçlarının birbiri ile uyumlu olduğu ve direnç tespitinde kullanılabilirliği belirtilmiştir [318].

Difüzyon yöntemleri yanında Gram pozitiflerde AST uygulaması ve direnç tespitinde kullanılan fenotipik yöntemler arasında dilüsyon yöntemleri de yer alır. Agar dilüsyon ve sıvı dilüsyon yöntemleri de MİK tespitinde Gradyent testiyle ile Gram pozitif bakteriler için karşılaştırmalı olarak kullanılarak AST olarak kullanılabilirliğini göstermektedir [304].

SCMA görüntüleme tekniği; tek bakteri hücreindeki morfolojik değişikliklerin otomatik analizine dayalı olarak AST'nin yapılmasını sağlar. 30 antimikrobiyalın kullanıldığı çalışmada Gram pozitiflerde (4 saat) Gram negatiflere (3 saat) nazaran ilaç uygulanmasından sonra biraz geç bakteriyel alan ölçümü (BAM) görüntüleme sistemi ile yapılarak AST sonucu elde edilmiştir. 1 saatlik gecikme ölçüm için büyüklük farkı kaynaklıdır. Ölçüm alanındaki yoğunluk artışı bakteriyel direnci gösterirken, azlığı ise duyarlılığı gösterir [309].

Mikroakışkan sistem; tek hücre düzeyinde hızlı bakteri tanımlama, hızlı AST tespiti, polimikrobiyal analiz gerçekleştirme işlemlerini sağlayan sistemlerdir. Ayrıca bu sistemlerin optik algılayıcılar ile desteklenmesi sonucu mikroakışkan valflerin birleştirilmesi esasına dayalı olarak patojenlerin yakalanması sağlanır ve bu bakteriler morfolojilerine ve boyutlarına göre sınıflandırılması gerçekleştirilir. Bazı Gram pozitifler (*S. epidermidis*) üzerinde de uygulanan sistem AST'lerin sonuç eldesinin sistem tarafından yakalanan bakterilerin gözlenmesine dayalı 30 dakika gibi kısa bir sürede gerçekleşmesini sağlar. Ayrıca elde edilen veriler moleküler çalışmalar için ışık tutma özelliğine sahiptir [319]. Mikroakışkan sistemlerdeki tıkaçlara bir hücreden fazla olmayacak şekilde yüklemeler yapıp tıkaçlar kapatılarak stokastik sınırlama denilen bu hibrit sistem ile *S. aureus* gibi Gram pozitiflerin antibiyotiklere direnç ve hassasiyet durumları tespit edilmiştir [307].

Boncuk bazlı optik difüzometri; mikroboncuklar ile optik difüzometrinin birlikte uygulandığı bir sistemdir. Antibiyotikle kaplanan mikroboncuklara bakterilerin bağlanıp bağlanmaması sonucu ortam viskozitesinde meydana gelen dalgalanmaların bir floresan mikroskop ve bir kameradan oluşan optik difüzometrik platform tarafından görüntülediği uygulamadır. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin Brownian hareketinin gözlemlendiği çalışmada 2 saatlik uygulamanın son 40 dakikasının görüntülenmesi ile dirençli ve duyarlı suşların ayrımının yapılabilinmektedir ve kullanılan antibiyotik çeşitlerine bağlı Vitek 2 sonuçları ile uyumu ufak değişiklikler gösterse de %90'nın üzerindedir. AST'nin hızlı sonuç

vermesi için oluşturulan platformda antibiyotik dirençlerinin mevcut otomasyon sistemi ve konvansiyonel uygulamalara nazaran kısa sürede tespiti sağlanmaktadır [320].

Dielektroforetik yöntem; Antibiyotiğe duyarlı ve dirençli suşların dielektroforetik toplama spektrumları ile eldesi ile gerçekleştirilir. Suşlardaki ilgili farklılığın tespiti için antibiyotik ile 24 saatlik süreçte maruziyet gerekmektedir. Gram pozitif bakterilerden *Staphylococcus epidermidis* üzerinde uygulanan çalışmada antibiyotik uygulama süreci sonunda dirençli ve duyarlı suşların ayrımı yapılmaktadır [321].

AFM; Gram pozitif bakteriler (*S. aureus*) üzerinde kullanılan antibiyotik çözeltisi içinde bulunan üzerinde bakteri taşıyan bakteri metabolizması değişikliklerini sensördeki dalgalanmalara bağlı aydınlatma sistemi ile algılayan bir tekniktir [316].

2.3.3. Gram negatif bakterilerde direnç tespitinde genotipik yöntemler

Tam genom dizileme (WGS); antimikrobiyal direnci belirlemek için sıklıkla kullanılan fenotipik tanımlama yöntemlerinin tekrarlanma gibi üstünlükleri yanında uygulama koşullarındaki farklılık nedeni ile elde edilen sonuçlarının güvenilirliğini tehlikeye düşürdüğünden bu sorunu ortadan kaldıran genotipik tanımlama yöntemlerinden biridir. Gram negatif bakterilerde WGS; direnç genotiplerinin tanımlanması ile mevcut direnç fenotipleri hakkında yapılan tahminlerin doğruluğunu sağlar ve hastalık sürveyansı için değeri yüksek olan bu durum antienfektif tedavi seçimi için öneme sahiptir. Yalnız yöntemin belirli genleri tanımlarken nadir görülen direnç mekanizmalarını tanımlamadaki yetersizliği ve maliyet yüksekliği dezavantajları arasındadır [322].

DNA mikroarray; bir bakteride genomik çeşitliliği değerlendirmek ve araştırılan genlerin varlık veya yokluğunu ortaya çıkarmak için kullanılan genomik araçlardır [323]. DNA mikroarray tekniği; plazmid, transpozonlar gibi MGE'nin farklı noktalarında konumlanmış virülans genleri ve AMR genlerinin tespitinde kullanılmaktadır [324]. Mikrodiziler vasıtasıyla sadece tek direnç deni değil çoklu dirençlerin tespitinde sağlanmaktadır. Gram negatif bakterilerde tekli ve çoklu direncin tespitinde (antimikrobiyal direnç de dahil) mikrodiziler kullanılmaktadır. *S. typhimurium* plazmid ve kromozomal kaynaklı AMR genlerini biriktirme eğiliminde olan ve farklı hayvanlarda gözlenip gıda yoluyla taşınım riski bulunduran bir bakteri olup sahip olunan farklı konumlu tekli ve çoklu direnç genlerinin tespitinde mikroarray yönteminin kullanılan fenotipik yöntemlerle uyumlu sonuçlar verdiği ve direnç tanımlama kullanılabilirliğini göstermiştir [325]. Gram negatif bakterilerin farklı türleri (*Pseudomonas* ve *Acinetobacter* dahil olmak üzere çeşitli

Enterobacteriaceae üyeleri) üzerinde yapılan AMR tespitinde kullanılan mikroarray tekniğinden elde edilen sonuçlar ile uygulanan fenotipik tespit yöntemleri (agar dilüsyon, disk difüzyon) sonuç korelasyonu %91'den fazla iken, fenotipik tespiti yapılamayan direncin tespitinde kullanılan diğer bir genotipik yöntem sonucuyla uyumluluğu %94'tür. Bu avantajları yanında mikro dizilerin sınırlı sayıda direnç genini ifade etmesi ve oluşan mutasyon kaynaklı yeni dirençler nedeni ile direnç geni tespitinde düşük duyarlılık ve negatif tahminlere neden olmaktadır [326].

Floresan in situ hibridizasyon (FISH); bakteri ya da hayvan hücresi gibi organizmalardan gelen floresan etiketli oligonükleotidler ile hibridizasyon yapan hedef sekansların konfokal lazer tarama ya da epifloresan mikroskoplar ile tanımlanması esasına dayalı bir tekniktir [327]. Teknik; mikroorganizmaların doğal olarak incelenmesini sağlayan, düşük popülasyon yoğunluğunda bile mikroorganizmanın tür seviyesinden şube düzeyine kadar farklı özgüllükte üretilen artan rRNA prob veri tabanına bağlı güvenilir ve hızlı şekilde tanımlanmasını sağlar [328]. Dirençli Gram negatif bakterilerde direncin tespitinde kullanılan güvenilir ve hassasiyeti yüksek olan bir tekniktir. Metisilin direncine sahip *H. pylori*'de direncin tespitinde kullanılan ve dirençli olduğu E test yöntemiyle de tespit edilmiş örnekler FISH tekniği ile çalışılarak %92,4 oranında uyum gözlenmesi direnç tespitinde kullanıma uygunluğunu göstermiştir [329].

PCR; tasarlanması kolay olan primerler aracılığıyla bir bakteri izolatındaki AMR'in tespitinde hem aerob hem de anaerob bakteriler için tercih edilen bir tekniktir. PCR ile ortamdan alınan örneklerdeki bakterilerde mevcut direncin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanmasına olanak verir. Enterokoklar, stafilokoklar, *Enterobacteriaceae*'da *AmpC* geni gibi karbapenemaz direnç genlerinin ve Enterokoklar'daki *van* geni gibi Vankomisin direnç genlerinin hızlı tespiti yapılarak direncin kaynağının belirlenmesi sağlanır [3].

MALDI-TOF MS; biyomoleküllerin (karbonhidratlar, proteinler ve DNA gibi) iyon fazına geçme yeteneğini analiz ederek kütle/yük (m/z) oranından moleküler bir imza üreten teknik; bakteriler, mantarlar ve mikrobakterilerin tanımlanmasında kullanılan ekonomik, doğru ve hızlı bir tekniktir [330]. Moleküler genetik teknikler mevcut genlere bağlı tanımlama yaparken bu teknik β -laktamazlar gibi direnç ürünlerinin hem Gram negatif hem de Gram pozitiflerde hızlı ve ekonomik tespitinde kullanılabilir [324].

2.3.4. Gram pozitif bakterilerde direnç tespitinde genotipik yöntemler

Tam genom dizileme (WGS); Gram negatif bakterilerde direnç tanımlamada kullanılan bu genotipik yöntem Gram pozitif bakterilerde de direnç geninin ve dirençle ilişkili mutasyonların tespitinde kullanılmaktadır. Elde edilen veriler fenotipik sonuçlarla pozitif bir ilişki içinde olmaktadır. Yalnız fenotipik olarak direnç tespiti yapılan örneklerin genetik alt yapısı bilinmediğinden genotipik direnç taraması yapılamamaktadır [331].

Mikroarray tekniği; Gram pozitif bakterilerde virülans genleri, toksin ve adezyon ile ilişkili genler ve dirençten sorumlu genlerin tanımlanmasında tercih edilen metotlardır. Özellikle hayvansal kaynaklı Gram pozitif patojenler ile sağlıklı hayvanlardaki Gram pozitif bakterilerde gözlenen çoklu antimikrobiyal direncin saptanması direncin yayılımını engellenmek için önem ifade etmekte olup bunların tanımlanmasında kullanılan mikro diziler PCR dizileri ile doğrulanmakta ve elde edilen verilerin doğruluğu desteklenmektedir. MRSA' lar hayvansal kaynaklı besinlerde sıklıkla sorun teşkil eden ve sağlıklı hayvanlardan da izole edilebilen bakteriler olup bunların sağlıklı tanımlanmasında tercih edilen genotipik yöntemlerdir [332].

PCR; direnç tanımlamada fenotipik yöntemlerin eksikliklerini gidermek ve tanılama sürecini kısaltmak adına tercih edilen yöntemler içinde öne çıkmakta olan bir tekniktir. Hem tekli hem çoklu direnç tanımlamasında kullanılan doğrudan koloni üzerinde gerçekleştirilebilen özgüllük ve duyarlılığı yüksek olan hızlı sonuç alınan bir tekniktir [333]. MRSA'ların sahip olduğu *mecA* direnç geni varlığına bağlı direncin tespitinde hızlı tanımlama yapan tekniktir. Ayrıca bakterilerde gözlenen metisilin direnci *mecA* geninden yoksun suşlarda da rastlanan heterojen ifade göstermektedir. Heterojenliğe neden olan düşük direncin kaynağı çeşitli (doğal PBP'lerdeki, β -laktamaz yüksek düzeyli üretimindeki veya büyük ihtimalle bir metisilinazdaki) modifikasyonlarla bağlantılıdır. Metisilin direncinde gözlenen bu heterojen ifadenin tespiti duyarlılık testinin doğruluğunu göstermesi için önemlidir. Bu nedenle PCR heterojen ifadeli metisilin direnci için altın standart olarak ifade edilir [334]. 20. Yüzyılın sonlarına doğru hastane kaynaklı MRSA izolatlarında direnç oluşturulan antibiyotiklerde değişiklik gözlenmiş, eski tip dirençlerin oranında azalma ve yeni tip dirençlerde artış PCR yöntemi ile tespit edilmiştir [335]. MRSA'larda gözlenen ve ideal terapötik ajan olarak kullanılan glikopeptidlere (vankomisin) direncin tespit edilmesi eski tip antibiyotik (makrolidler, linkosamidinler, gentamisin ve tetrasiklinler gibi) dirençlerinin de dahil edildiği tanımlamalarda PCR tercih edilmiştir [336]. Çoklu direncin tanımlamasında basitliği, hızlı ve doğru sonuç vermesi açısından multipleks PCR öncelikli tercih olup direnç yayılımının epidemiyolojik tanımlaması için de önemlidir [337].

Floresan in situ hibridizasyon (FISH); oligonükleotid problemlerinin genellikle hedef olarak seçtiği noktalar 16S rRNA'ların belirli bölgelerini kapsar. Yalnız teknik, kromozomal ya da plazmid kaynaklı direnç genlerinin tespitinde az kopya bulunduran hedef bölgelerin tespitinde sınırlılık yaşamaktadır. FISH tekniğinde yaşanan bu sınırlılıkları azaltmak ve tanımlama gücünü artırmak için çeşitli geliştirme uygulamaları yapılmaktadır. Bunlar arasında Individual Gens (RING) – FISH Tanıma diye adlandırılan çoklu prob ile düşük hedef bölge tespitinde güçlendirilen teknik; katalize raportör biriktirme (CARD) – FISH denen düşük hibridizasyon sayısının sinyalizasyon sayısını 7 ila 20 katına çıkaran teknik yer almaktadır [338]. Gram pozitiflerde kullanılan CARD-FISH yöntemi ile düşük tekrarlı genlerin tespiti yanında sporlardaki direnç genlerinin 6 saat gibi kısa sürede tespitini sağlar. Çalışmanın veri doğruluğu PCR yöntemi ile sınanmış ve uyumlu sonuçlar alınmıştır [338].

2.3.5. Direnç tanımlamada PCR tekniğinin avantajları

Bakteri tanımlamada kullanılan geleneksel yöntemlerin; spesifik besiyeri ile izolasyon ve devamında morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testler ile sonuçlanan sürece dayalı maliyet, uğraşı ve varsayıma dayalı olma eksikliklerini gidermek için hızlı, hassas ve doğru tanımlama özellikleri ile öncelikli tercih edilen moleküler yöntemler arasında PCR tekniği yer alır. PCR; çevrede kokoidal formda bulunan in vitro koşullarda kültürlenmesi gerçekleştirilemeyen bakterileri türlerinin (*Campylobacter* türleri) hızlı ve hassas tanımlamasını yapar [339]. Hippurat testi; bakterilerde bulunan sodyum hippuratın glisine parçalanması ile gıda kaynaklı öncelikli bakteriyel enterit etkeni *Campylobacter* türlerinin (*C. jejuni* ve *C. coli*) birbirinden ayrılmasını sağlayan fenotipik yöntem olup *C. jejuni* için yanlış negatiflik ile *C. coli* olarak tanımlama gibi yanılsamalara neden olmaktadır. Çalışmada bu fenotipik test ile beraber uygulanan multipleks PCR tekniği yanılsamayı ortadan kaldırarak suş düzeyli doğru tanımlamanın yapılmasını sağlamaktadır [340]. PCR tekniğinin gen tanımlamadaki bu hassasiyetine rağmen canlı ve ölü hücrelerin her ikisinde de aynı kromozomal yapının varlığından canlı hücrenin tanımlanmasında yetersizlikle karşılaşmaktadır. Bu yetersizliğin giderilmesi için evrensel bir bakteriyel parça olan rRNA'lar değil ama belirli süreli ekspresyonu olan mRNA'ların varlığına dayalı tanımlama ile giderilmektedir. Böylece işlem görmüş ya da görmemiş farklı koşullardaki gıda, çevre vb. örneklerde canlı bakteri tanımlamasında PCR kullanılabilir [341]. Bakteri tanımlamada kullanılan PCR yöntemleri tek primer kullanılıp tek genin tarandığı veya çok primerin kullanıldığı çoklu taramanın aynı anda yapıldığı PCR diye ayrılmaktadır.

Çalışmalarda tanımlama çeşitliliğine bağlı sıklıkla kullanılan PCR teknikleri; Klasik PCR, Ters transkriptaz PCR, Nested PCR ve Gerçek zamanlı PCR'dır. Klasik PCR; tek ya da çok çeşitli bakterinin hızlı tanımlamasını yapar. Gerçek zamanlı PCR (Real Time-PCR); amplifiye ürünlerin reaksiyon sonunu beklemeden reaksiyon sürecinde gerçek zamanlı daha hızlı tespitini yapar. Ters Transkriptaz PCR; canlı patojenlerin tespitine yönelik olan mevcut RNA'dan DNA'nın sentezlenmesi ve tespitine yönelik yöntem üst düzey beceri istemesi ile bilinmektedir. Nested PCR; bir PCR ürününün diğer PCR için primer olarak kullanılarak gıda kaynaklı patojen tespitinde yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahip olmanın yanında ikinci PCR uygulamasında primer transferinin kontaminasyona neden olmasından dolayı iç içe PCR olarak adlandırılan tekniğin dezavantajları bulunmaktadır [342]. Çalışmanın özgüllüğüne bağlı tercih edilen diğer PCR teknikleri arasında Alele özgü PCR (AS-PCR), koloni PCR, sıcak başlatma PCR, dijital PCR, PCR-Klonlama ve Sıralama teknikleri de yer alır [343]. Diğer bir teknik olan RAPD-PCR; türe özgü genomik DNA'dan rastgele seçilmiş 9-10 baz çiftlik bölümlerin düşük bağlanma sıcaklığında çoğaltılarak tanımlanmasına dayalı PCR temelli bir tekniktir. Bu teknik ile her bir suşa özel farklı boyutlardaki DNA parmak izi modellerinin oluşturulması esasına dayanan Amlifikasyon polimorfizmi PCR (AP-PCR) olarakta tanımlanan bir tekniktir [344].

PCR tekniği; AMR genlerinin tespiti yanında birden fazla ortamdan alınan çeşitli bakterilerin hızlı bir şekilde fenotipik yöntemlerden daha hassas tanımlanmasını sağlamaktadır. Geleneksel PCR yanında birden çok primerin kullanılması esasına dayanan multiplex PCR ile aynı anda 9 genin tanımlanması gibi çoklu direncin tespitini de hızlı şekilde sağlamaktadır. Gram pozitif (*Enterococcus*'lar ve *S. aureus*) ve Gram negatif (*E. coli*) bakteri izolatları üzerinde yapılan direnç genlerinin PCR tespiti ile gıda kaynaklı (et ürünleri, süt, yumurta, un vb.) ürünlerdeki çok sayıda antimikrobiyal direnç geni aynı anda tanımlanmıştır. Geleneksel PCR kullanımı, canlı hücre ile ölü hücrelerin ayrımını yapmadan tanımlama yaptığından bu sıkıntı geliştirilmiş yeni PCR tekniklerinin (Ters transkriptaz PCR ve kantitatif PCR) kullanımı ile giderilebilmektedir [345]. Kantitatif PCR (qPCR)'ın geleneksel PCR'a göre amplifikasyonların gerçek zamanlı gözlenmesi ile elektroforeze gerek duyulmadan sonuçların alınımındaki hız da üstünlüklerdendir. Direnç tanımlamada kullanılan diğer bir teknik olan WGS multiplex PCR gibi çoklu direnç genlerinin hızlı ve hassas tespitini yapma özelliğine sahip olmanın yanında mevcut dizilerin oluşturulması geniş bir repertuvar karmaşası oluşturma gibi sıkıntıları da barındırmaktadır [346]. Döngü aracılı izotermal amplifikasyon (LAMP) tekniği; PCR'ın yaygınlaşması sonrasında

geliştirilen izotermal patojen tanımlamada ekstra cihaza gereksinimi azaltan bir tekniktir. PCR'in tanımlama yanında klonlama yapabilmesine rağmen LAMP sadece tanımlama yapar. LAMP uygulamasında 4 veya 6 primer kullanılmasına rağmen PCR'da 2 primerin kullanılır. LAMP'da PCR'a göre tanımlama hassasiyet ve üstünlüğünün yanında PCR'da kolaylığa rağmen multipleks çalışmanın zorluğu gibi dezavantajları bulunmaktadır [347]. Dizileme tekniği; direnç tanımlamada kullanılan ve çoklu direnç ve patojen tanımlamasını yapabilen teknikler arasında yer almakta olup teknikte kullanılan problemlerin üretimi için PCR'a dayalı bir tekniktir. Line Probe Assay (LPA) tekniği; çoklu direncin tespitinde hızlı sonuç vermesi yanında ön işlem için PCR'a dayalı olan bir tekniktir. Nükleik asit yanal akış deneyleri tekniği (LFA); LPA tekniği gibi çoklu direncin tespitinde de görevli hızlı sonuç alınan ve ön işlem için PCR'a dayalı bir tekniktir [346].

2.3.5.1. PCR tekniği ile karakterize edilen genler

Beta laktamaz genleri

Yaygın kullanıma sahip olan β -laktam grubu antibiyotiklerin (penisilinler, sefalosporinler, monolaktamlar ve karbapenemler) ESBL üreten bakteriler tarafından inhibisyonun klinik kaynaklı örneklerde yaygın olarak ciddi ve tedavisi zorlu enfeksiyonların baş göstermesine neden olmaktadır. İntrensik ya da plazmid kaynaklı olan β -laktam direncine *Enterobacteriaceae* 'lerde rastlanmakta olup bunların kombinasyonu olan çoklu antimikrobiyal direncin esas nedenini plazmitler oluşturmaktadır. *E. coli*'nin dahil olduğu *Enterobacteriaceae*'larda çoklu β -laktam direncinin gelişiminde görevli genler genellikle plazmid kaynaklı olan *TEM*, *SHV*, *CTX-M*, *KPC*, *VIM*, *IMP*, *NDM*, *CMY-2*, *DHA-1*, *FOX-1*, *OXA* ve diğer genlerin ürettiği enzimler aracılığıyla gerçekleşir [348]. β -laktam dirençleri klinik örnekler dışında çevresel kaynaklardan da temin edilmiş (toprak, su ve gıda gibi) olup temelinde hastane kaynaklarının atık sular yoluyla taşınımı yatmaktadır. Bitkilere sulama yoluyla geçen direnç hayvanlara ise içtikleri atık sular yoluyla geçmekte ve bu iki kaynak yoluyla tekrar insanlara ulaşmaktadır [349]. ESBL üreten bakterilerin insanlara ulaşmasında hayvansal ürünler içinde et ürünleri (öncelikli kümes hayvanları eti, domuz eti ve sığır eti) yer almakta olup bu ürünlerde sıklıkla rastlanan β -laktam genleri arasında *CTX-M*, *TEM* ve *SHV* genleri gözlenme oranına göre bu sıra ile yer almaktadır. Et örneklerinden izole edilen suşlardaki direnç genleri üç ve daha fazla genin bir arada yer aldığı çoklu direnç görünümlerine de sahiptir [350]. Moleküler olarak 4 sınıf (A, B, C ve D) altında ele alınan β -laktamaz enzimlerinin ekspresyonundan sorumlu genler; A sınıfı diye adlandırılan

ESBL'ler için *TEM*, *SHV* ve *CTX-M* genleri, D sınıfı altında ele alınan ESBL'ler için *OXA* genleridir [351].

Sülfonamid direnç genleri

E. coli'de tespit edilen kazanılmış Sülfonamid direnç genleri üç tanedir (*sul1*, *sul2* ve *sul3*) ve bunlardan ilk ikisi sıklıkla İYE'na bağlı insanlarda rastlanmaktadır. Klinik izolatlarda tespit edilen *sul2* geni *sul1*'e kıyasla daha yüksek oranla görülmesine rağmen bazen sınıf 1 integronla ilişkili olduğu düşünülen *sul1* ile birlikte kombine halde de görülmektedir. *Sul2*'nin konjugatif veya konjugatif olmayan plazmidler üzerinde konumlanarak sülfonamid direnç transferinde tekli ya da diğer *sul* geni ile direnç gelişiminde görev aldığı tespit edilmiştir [352].

Gıda kaynaklı patojenler içinde ilk sıralarda yer alan *E. coli* suşlarında gözlenen antibiyotik dirençleri arasındaki sülfonamidlere dirençe farklı hayvansal ürünlerde rastlanmaktadır [353]. Tüketime hazır et örneklerinden izole edilen suşlar üzerinde yapılan tanımlamalarda sülfonamid-trimetoprim direncinin azımsanmayacak (%58'lik) bir oranda gözleendiği tespit edilmiştir [354]. Sülfonamidler geniş spektruma sahip antibiyotikler olmakla birlikte hayvancılıkta sıklıkla kullanılmalarında maliyetlerinin azlığı ve yan etki göstermemeleri yatmaktadır. İntegron, transpozon ve plazmidlerle ilişkilendirilen gen tetrasiklinler gibi diğer bakterilere aktararak hayvanlarda ve hayvansal ürün ve ortamlarda çoklu direncin gelişiminde önemli rol oynarlar. Bu nedenle hayvansal ürünlere ortamdan kontaminasyonla buluşan ve üzerinde direnç tespitine yönelik çalışılan genler arasında sıklıkla yer almaktadırlar. Sülfonamid direnç tanımlamada *sul1*, *sul2* ve *sul3* genleri tekli ya da çoklu şekilde uygulanmaktadır. Gıda kaynaklı örneklerde sıklıkla *tet* genleri ile birlikte çoklu direnç şeklinde tanınlanmaktadır. Et örneklerinden izole suşlarda *sul2* geni *sul1*'den daha yüksek oranlarda da gözlenmektedir [355].

İntegron genleri

İntegronlar antimikrobiyal dirençe ilişkilendirilen ve genellikle bir plazmid tarafından taşınan veya bir transpozon içinde yer alan önemli direnç araştırma kaynaklarıdır. Sahip oldukları integras genine göre sınıflandırılırlar. Bunlardan *int1* genine sahip olan Class 1 integron, *int2*'ye sahip olan Class 2 integron, *int3*'e sahip olan Class 3 integron MGE'ler ile ilişkilendirilirken diğer integronlar (*int4* genine sahip olanlar ve diğerleri) kromozomal yapılarla ilişkilendirilmiştir. Direnç genleri ile bağlantılı olduğu düşünülen integronlar MDR

için potansiyel alanlar olarak görülüp bu dirençlere sahip bakterilerin ortaya çıkışında rolleri olduğu düşünülmektedir [356]. Et ve et ürünlerinde tespit edilen kontamine *E. coli* suşları filogenetik olarak B2 sınıfı hariç diğer sınıflara dahil olabileceği düşünülmektedir. Klinik ve gıda (farklı canlı et örnekleri) kaynaklarından izole edilen *E. coli* suşlarında her 3 MGE kaynaklı *int* geninin PCR ile karakterizasyonu çalışmasında Class 1 ve Class 2 integronların klinik örneklerde et örneklerine kıyasla daha fazla grldği ve her iki sınıfında klinik ve gıda örneklerinde rastlandığı tespit edilmiştir [357].



3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Cihazlar ve Aletler

3.1.1. Buzdolabı

PCR için gerekli primerler, Taq Polimeraz, dNTPs, Buffer, MgCl₂, Marker, su ile bakteri örneklerinin saklandığı üst bölümü -20°C olan ve alt bölümü +4°C olan Arçelik marka buzdolabı kullanılmıştır.

3.1.2. Etüv

Bakterilerin çoğaltılması için NÜVE marka EN-120 model etüv kullanılmıştır.

3.1.3. Termal döngüleyici (thermal cycler)

Örneklerden elde edilen tüm DNA'ların çoğaltımında APPLIED BIOSYSTEMS marka Veriti modeli kullanılmıştır.

3.1.4. Sıcak su banyosu

Bakteri örneklerinin DNA izolasyonu için kaynatma işleminde WISEBATH marka su banyosu kullanılmıştır.

3.1.5. Santrifüj

Bakteri örneklerinin DNA izolasyonunda Hettich ZENTRİFUGEN marka UNIVERSAL 320 R model Santrifüj cihazı kullanılmıştır.

3.1.6. Elektroforez ve güç kaynağı

DNA amplikonlarının agaroz jellerde elektriksel yük zıtlığına bağlı olarak boyutları doğrultusunda ilerlemesi için sağlamak için THERMO marka Scientific EC 1000 XL model elektroforez güç kaynağı ve elektroforez teknesi (yatay) kullanılmıştır.

3.1.7. Otoklav

Besiyerlerin hazırlanması, DNA izolasyonun yapıldığı bakteri kalıntılarının sterilizasyonunda WiseClave marka otoklav kullanılmıştır.

3.1.8. Mikropipetler

PCR yükleme örneklerinin hazırlanması, PCR tüplerine yüklenmesi ve agaroz jele yükleme yapılması gibi sıvı örneklerin ölçülmesinde fark hacimleri (0,1-2 µL, 2-20 µL, 20-100 µL ve 100-1000 µL) kapasiteli Gilson marka mikropipetler kullanılmıştır.

3.1.9. UV jel görüntüleme kabini

Agaroz jel içinde ampikonların hareket etme seviyelerini ölçerek büyüklüklerini saptamak için Vilber Lourmat marka UV Jel Görüntüleme Kabini kullanılmıştır.

3.1.10. Güvenlik kabini

Besiyerlerin petrilere dökülmesinde, inkübasyon tüplerine besiyeri transferi ve bakteri ekimlerinde oluşabilecek olası kontaminasyonu engellemek için ESCO marka Airscream Flov kabin kullanılmıştır.

3.1.11. Mikrodalga

Agaroz jellerin hazırlanması için Arçelik marka MD 564 model mikrodalga fırın kullanılmıştır.

3.1.12. Blender

Et rneklerinin homojenizasyonunda WARING COMMERCIAL marka blender kullanılmıştır.

3.1.13. Kaba terazi

Et rneklerinin, Agaroz'un tartılması için 0,1 g duyarlılığa sahip 6000 g kapasiteli hassas terazi kullanılmıştır.

3.1.14. Hassas terazi

Tüm küçük ağırlıklar, 0,0001 g duyarlılığı olan OHAUS marka hassas terazi ile ölçülmüştür.

3.1.15. Karıştırıcı (Vortex)

Örneklerin PCR tüplerine eklenmesi öncesinde ve PCR yükleme karışımının homojenizasyonunun sağlanması Labart marka karıştırıcı kullanılmıştır.

3.1.16. Isıtıcı manyetik karıştırıcı

Bakteri örneklerinin DNA izolasyonu için kaynatılma işlemleri ve besiyerlerinin saf su içerisinde çözdürülme işlemlerinin tamamı VELP marka ARE model ısıtıcılı manyetik karıştırıcı ile yapıldı.

3.2. Kullanılan Kimyasallar

3.2.1. Tryptic soy broth

Bakteri örneklerinin çoğaltılması için MERCK marka Tryptic Soy Broth besiyeri kullanılmıştır.

3.2.2. EMB (eosin methilen blue) agar

Enterobacteriaceae ailesine dahil patojenlerin in vitro ortamda fenotipik tanımlanması için kullanılan spesifik bir besiyeri olarak yeşilimsi parlak koloniler ile *E. coli* varlığının tanımlanmasında MERCK marka Eosin Methilen Blue agar kullanılmıştır.

3.2.3. MacConkey agar

Gram negatif bakterilerden laktoz negatif ve pozitiflerin in vitro ortamda fenotipik tanımlanmasında kullanılan spesifik besiyerleri olarak MERCK marka MacConkey Agar besiyeri kullanılmıştır.

3.2.4. Agaroz

Elektroforez tankında DNA amplikonlarının yüklenip yürütülmesi için SİGMA marka agaroz kullanılmıştır.

3.2.5. Ethidium bromür

Agaroz jellerde DNA'ya bağlanarak flüoresan ışımayla nükleik asit işaretlemede SIGMA marka ethidium bromür kullanılmıştır.

3.2.6. 10X Tris-borate-EDTA (10X TBE)

Elektroforez jellerde ve Elektroforez tank solüsyonu olarak THERMO SCIENTIFIC marka 10 X TBE solüsyonu 1X oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

3.2.7. Loading dye (yükleme boyası)

DNA amplikonlarının jelde yürümesini görünür kılmak için THERMO SCIENTIFIC marka DNA Gel Loading Dye (6X) kullanılmıştır.

3.2.8. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'da kullanılan çözeltiler

3.2.8.1. MgCl₂

PCR ependorf tüplerine eklenen karışıma THERMO SCIENTIFIC marka 25 mM MgCl₂ kullanılmıştır.

3.2.8.2. Nükleotit karışımı (dNTP mix)

PCR'a yüklenecek karışıma eklemek için FERMENTAS marka her 1 ml için 2 mM dNTP Mix (dATP, dGTP, dTTP, dCTP karışımı) kullanılmıştır.

3.2.8.3. Taq polimeraz tamponu 10X

PCR'da DNA amplifikasyonu için karışıma THERMO SCIENTIFIC marka (NH₄)₂SO₄ katkılı 10X Taq polimeraz tamponu kullanılmıştır.

3.2.8.4. Deiyonize su (dH₂O)

Tüm çözeltilerin hazırlanmasında kullanılmak üzere Millipore marka Rios8 model saf su cihazının ürettiği distile su kullanılmıştır.

3.2.8.5. Taq polimeraz

Örneklerdeki DNA'ların çoğaltılmasında görevli SOLIS BIODYNE marka FIREPOL Taq polimeraz enzimi kullanılmıştır.

3.2.8.6. Primerler

DNA örneklerinin ilişkili olduğu gene bağlanarak amplifikasyonlarını sağlamada görevli primerler SENTEBİOLAB firmasından temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan primerlere ait bilgiler Çizelge 3.1, Çizelge 3.2, Çizelge 3.3 ve Çizelge 3.4'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. *E. coli* genotipik ve filogenetik tanımlama genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

	Gen	Primer Dizisi (5'→3' yönü)	Amplikon Boyutu (bp)	Referans
Genotipik Tanımlama Geni (<i>E. coli</i> -spesifik)	<i>uspA</i>	F: CCGATACGCTGCCAATCAGT	884	[358]
		R: ACGCAGACCGTAGGCCAGAT		
	<i>chuA</i>	F: ATGGTACCGGACGAACCAAC	288	[359]
		R: TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
Filogenetik Tanımlama Geni	<i>yjaA</i>	F: CAAACGTGAAGTGTCTCAGGAG	211	[359]
		R: AATGCGTTCCTCAACCTGTG		
	Tspe4.C2	F: CACTATTCGTAAGGTCATCC	152	[359]
		R: AGTTTATCGCTGCGGGTCGC		
	<i>arpA1</i>	F: -AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	[359]
		R: TCTCCCCATACCGTACGCTA		
	<i>arpA2</i>	F: GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301	[359]
		R: GAAAAGAAAAAGAATTCCCAAGAG		
	<i>trpA</i>	F: AGTTTTATGCCAGTGCGAG	219	[359]
		R: TCTGCGCCGGTCACGCC		

Çizelge 3.2. *E. coli* ESBL gen varyantları ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

ESBL Gen Varyantları	Primer Dizisi (5'→3' yönü)	Amplikon Boyutu (bp)	Referans
<i>bla_{CTXM}</i>	F: CGCTTTGCGATGTGCAG R: ACCGCGATATCGTTGGT	551	
<i>bla_{OXA}</i>	F: TCAACTTTCAAGATCGCA R: GTGTGTTTAGAATGGTGA	610	
<i>bla_{SHV}</i>	F: TTATTTCCCTGTTAGCCACC R: GATTGCTGATTCGCTCCGG	727	[360]
<i>bla_{TEM}</i>	F: ATAAAATTCTTGAAGACGAAA R: GACAGTTACCAATGCTTAATC	1080	

Çizelge 3.3. *E. coli* sülfonamid direnç genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

Sülfonamid Direnç Genleri	Primer Dizisi (5'→3' yönü)	Amplikon Boyutu (bp)	Referans
<i>sul 1</i>	F: CGGCGTGGGCTACCTGAACG R: GCCGATCGCGTGAAGTTCCG	433	[361]
<i>sul 2</i>	F: GCGCTCAAGGCAGATGGCATT R: GCGTTTGATACCGGCACCCGT	293	[361]
<i>sul 3</i>	F: GAGCAAGATTTTTGGAATCG R: CTAACCTAGGGCTTTGGATAT	750	[362]

Çizelge 3.4. *E. coli* integron genleri ve PCR amplifikasyonu için kullanılan primer dizileri

İntegron Genleri	Primer Dizisi (5'→3' yönü)	Amplikon Boyutu (bp)	Referans
<i>int1</i>	F: CCCGAGGCATAGACTGTA R: CAGTGGACATAAGCCTGTTC	160	
<i>int2</i>	F: CACGGATATGCGACAAAAAG R: GATGACAACGAGTGACGAAA	788	[363]
<i>int3</i>	F: GCCTCCGGCAGCGACTTTCAG R: ACGGATCTGCCAAACCTGACT	979	

3.2.8.7. DNA belirteci

DNA belirteci olarak 100bp boyutlu THERMO SCİENTİFİC marka marker kullanılmıştır.

3.3. İzolatların Eldesi

Çalışmada gıda ve klinik kaynaklı örneklerden izole edilen fenotipik olarak tanımlaması yapılan *E. coli* suşlarının genotipik tanımlanması ve bu suşlardaki ESBL gen varyantları, sülfonamid direnç genleri ve integron genlerinin PCR ile karakterizasyonu yapılmaya çalışılmıştır. Çalışmada kullanılacak gıda örnekleri Adıyaman, Gaziantep, Hatay ve Kahramanmaraş illeri sınırları içinde satışı sunulan kırmızı et ve mamullerinden temin edilmiştir. Temini yapılan et örneklerinin 25 tanesini sığır eti, 10 tanesini koyun ve 10 tanesi keçi eti oluşturmaktadır. Klinik kaynaklı örnekler ise Şanlıurfa Mehmet Akif İnan Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden sıvı besiyeri içinde alınmıştır. Alınan örneklerin tamamı İYE kaynaklıdır.

3.4. Pozitif Kontrol

Örnekler için pozitif kontrol olarak Mustafa Kemal Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan temini yapılan referans organizma olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır.

3.5. Örneklerinden Bakteri İzolasyonu ve İzole Bakterilerden DNA'nın Deteksiyonu

Bakteri izolasyonu için tartılan 25'er gr gıda örneklerinin Ph'sı 7,6 olan süspansiyon tuzu 1X phosphate buffered saline (PBS) içinde (225 ml) homojenizasyonu gerçekleştirilmiştir. Homojenatlardan alınan bakteri örnekleri MacConkey ve Eosin metilen blue (EMB) agar besiyerlerine ekim yapılmış ve koloni oluşturan birim (CFU) sayıları tespit edilmiştir. MacConkey besiyerinde gözlenen yeşilimtırak turkuaz renkli koloniler ile EMB agar besiyerindeki kırmızıdan mora doğru renkteki koloniler tespit edilmiştir. Kolonilerden alınan örnekler 37°C'de 18 saat inkübasyon sonrası seri dilüsyonu yapılmıştır. 1×10^6 CFU'ya sahip sulandırılmış örneklerden 1'er ml alınıp 95°C'de 5 dk süre ile sıcak su banyosunda kaynatma işlemine tabi tutulmuştur. Kaynatma sonrası alınan örnekler 17.000g'da 5dk. santrifüjlenmiş ve izole DNA'ları içeren süpernatantlar alınarak -20°C kullanıma kadar bekletilmiştir [364].

Klinik örnekler hastaneden sıvı besiyeri içinde alınıp 37°C'de 18 saat inkübasyona tabi tutulmuştur. İnkübasyon sonrası 1×10^6 CFU olacak şekilde seyreltmesi yapılan örneklerden 1'er ml alınıp 95°C'de 5 dk. kaynatılmış ve akabinde 2000 rpm'de 5dk. santrifüj edilerek süpernatantlar alınmış ve PCR'da kullanılmak üzere -20°C'de bekletilmiştir [364].

3.6. İzole DNA'larda *E. coli* Moleküler İdentifikasyonu

Gıda ve klinik kaynaklı örneklerden fenotipik olarak deteksiyonu yapılan *E. coli* suşları tanımlamanın doğruluğunu teyit etmek için moleküler identifikasyona tabi tutulmuştur. Bunun için *E. coli* bakterilerinde bulunan beş küçük Usp proteininin ekspresyonunu yapan *usp* genlerinden *uspA* genini amplifikasyon bölgesi olarak seçen bir çift primerin kullanıldığı PCR yöntemi tercih edilmiştir [365, 366]. İdentifikasyonda tercih edilen *uspA* geninin doğruluğu için primer çifti öncelikle referans mikroorganizma (*E. coli* ATCC 25922)'dan izole edilen DNA üzerinde uygulanmıştır. Sonra aynı PCR koşulları gıda ve klinik kaynaklı tüm örnekler üzerinde denenmiştir. Tanımlamada kullanılan PCR koşulları Kürekçi ve ark.'nın [367] çalışmasında belirtildiği şekilde olup Çizelge 3.5'de yer almaktadır.

3.7. *E. coli*'de Filogenetik Karakterizasyon

E. coli izolatlarının filogenetik tanımlaması 6 primer çiftinin kullanıldığı PCR uygulaması ile gerçekleştirilmiştir. *E. coli* suşları A, B1, B2, C, D, E, F ve klan 1 olmak üzere 8 farklı filogrupta toplanmış olup, bunların sınıflandırılmasında kullanılan amplifikasyon bölgelerini *chuA*, *yjaA* ve *arpA* genleri (*arpA1*, *arpA2* ve *trpA*) ile TSPE4C2

DNA fragmanı ifade etmiştir [368]. Tanımlama 3 basamakta gerçekleşmiştir. İlki, dört primer çiftinin (*chuA*, *yjaA*, TSPE4C2 ve *arpA1*) birlikte kullanıldığı quadruplex PCR uygulaması ile gerçekleştirilmiştir ve tanımlama amplifikasyon görülen genlere bağlı olarak yapılmıştır [359]. İkinci basamak, *arpA2* primerinin kullanıldığı PCR uygulaması olup 301 bp'lik bant varlığı örneğin E sınıfına dahilliğini, 219 bp'lik ampikon varlığı ise örneğin iki sınıftan birine (A veya C) dahilliğini göstermiştir. Fenotipik tanımlaması pozitif fakat filogenetik sınıflandırması negatif olan örnekler ise Multilocus sequence typing (MLST) taraması yapılması önerilmiştir [368]. Tanımlamada kullanılan PCR koşulları Clermont vd.'nin [359] çalışmasındaki gibi olup Çizelge 3.5'de belirtilmiştir.

3.8. *E. coli* İzolatlarında ESBL Gen Varyatlarının İdentifikasyonu

İzolatlardaki ESBL gen varyantlarının tanımlanmasında hedef genler olarak *bla_{CTXM}*, *bla_{OXA}*, *bla_{SHV}* ve *bla_{TEM}* genlerini seçen dört primer çifti (4F ve 4R) kullanılmıştır. Tanımlama dört geninde aynı anda tarandığı multipleks PCR yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. PCR koşulları Kürekçi vd.'nin [367] çalışmasında belirttiği koşullarda gerçekleştirilmiş olup Çizelge 3.5'de belirtilmiştir.

3.9. *E. coli* İzolatlarında Sülfonamid Direnç Genlerinin İdentifikasyonu

E. coli izolatlarında sülfonamid direnç genleri olan *sul1*, *sul2* ve *sul3* genleri multipleks PCR yöntemi ile 3 primer çifti (3F ve 3R) kullanılarak tanımlanmıştır. Kullanılan primerlerin ampikon uzunlukları Çizelge 3.4'te belirtilmiştir. Uygulanan PCR koşulları Gündoğdu vd.'nin [363] uygulama koşulları ile aynıdır ve Çizelge 3.5'de gösterilmiştir.

3.10. *E. coli* İzolatlarında İntegron Sınıflarının İdentifikasyonu

İzolatlarda farklı integron sınıflarının identifikasyonunda *int1*, *int2* ve *int3* olmak üzere üç gene tanımlı üç primer çifti kullanılmış ve multiple PCR uygulaması ile tanımlama yapılmıştır. Tanımlamada uygulanan PCR koşulları Gündoğdu vd.'nin [363] çalışmasındaki şekliyle uygulanmış ve Çizelge 3.5'de tanımlanmıştır.

Çizelge 3.5. *E. coli* izolatlarında çalışılan primerlere ait PCR amplifikasyon koşulları

Hedef Gen	Birincil Denatürasyon	İkincil Denatürasyon	Annealing	Birincil Uzama	Son Uzama	Döngü Sayısı	Referans
<i>uspA</i>	94°C, 5 dk.	94°C, 30 sn.	56 °C, 30 sn.	72°C, 30 sn.	72°C, 5dk.	30	[358]
<i>chuA</i>							
<i>yjaA</i>	94°C, 4 dk	94°C, 5 sn	59°C, 20 sn	72°C, 30 sn.	72°C, 5 dk	30	
<i>Tspe4.C2</i>							[359]
<i>arpA1</i>							
<i>arpA2</i>	94°C, 4 dk	94°C, 5 sn	57°C, 20 sn	72°C, 30 sn.	72°C, 5 dk	30	
<i>trpA</i>	94°C, 4 dk	94°C, 5 sn	59°C, 20 sn	72°C, 30 sn.	72°C, 5 dk	30	
<i>bla_{CTX-M}</i>							
<i>bla_{OXA}</i>	95°C, 13 dk	95°C, 30 sn	56°C, 30 sn	72°C, 30 sn	72°C, 5 dk	35	[367]
<i>bla_{SHV}</i>							
<i>bla_{TEM}</i>							
<i>sul1</i>							
<i>sul2</i>	94°C, 5 dk	94°C, 15 sn	67°C, 30 sn	72°C, 1 dk.	72°C,7 dk.	36	[361]
<i>sul3</i>							
<i>int 1</i>							
<i>int 2</i>	94°C, 10 dk	95°C, 30 sn	59°C, 30 sn	72°C, 30 sn	72°C,10dk.	32	[363]
<i>int 3</i>							

3.11. PCR Ürünlerinin Agaroz Jelde Yürütülmesi

Çizelge 3.5’de amplifikasyon koşullarına göre çoğaltılan PCR ürünlerinin jelde yürütülmesi için 1,5 g Agaroz 100 ml 1X TBE içinde çözünmesi için bir mikro dalga fırında 1,5 dakika ısıtılmıştır. Tamamen homojen şeffaf bir karışımdan oluşan jelin ilk sıcaklığı

ıkınca içine 6 µl Ethidium Bromür  zeltisi eklenip karışması sağlanmıştır. Yatay konumda yerleştirilmiş tarakları takılmış Jel döküm tankına boşaltılarak katılaşması beklenmiştir. Katılaşan jelden taraklar uzaklaştırılarak Elektroforez tankına yerleştirilir. PCR örneklerinden 6 µl mikropipetle alınıp parafin üzerinde bulunan 4 µl'lik Loading Dye ile karıştırılır ve kuyucuklara 10 µl olacak şekilde yüklenmiştir. Her dizide bir kuyuya 100 bp uzunluğundaki Marker'dan 5 µl Loading Dye boyası ile karıştırılması yükleme yapılmıştır. Yüklemeleri tamamlanan kuyulardan DNA  rneklerinin hareket etmesi için 100 V, 150 mA ve 10 watt şeklinde ayarlanmış akım oluşturulmuştur. 35 dk süre ile bu parametrelerde ilerleyen amplikonlar süreç sonunda UV Görüntüleme sisteminde bantlaşmaları izlenmiş ve görüntüler kayıt altına alınmıştır.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. Gıda ve Klinik Örneklerde *E. coli*'nin Genotipik Tanımlanması

Gıda örnekleri olarak Adıyaman, Kahramanmaraş, Gaziantep ve Hatay il sınırları içinde olmak üzere et ve et mamulleri satışı yapan yerel marketlerden temin edilen 25 büyükbaş ve 20 küçükbaş olmak üzere toplam 45 örnekten izole edilen seçici spesifik besiyerlerinde çoğaltılarak fenotipik olarak tespit edilen bakterilerin genotipik olarak *E. coli* olduğunun deteksiyonu yapılmak istenmiştir. Tanımlamada *E. coli* suşları spesifik özellikteki *uspA* (universal stres proteinini) kodlayan genin varlığı PCR ile tespitiyle elde edilen izolatların *E. coli* olduğu genotipik olarak doğrulanmaya çalışılmıştır [366]. *E. coli*'ninde ayırımında kullanılan kromojenik besiyerlerinde (MacConkey agar, EMB) inkübe olmuş kolonilerin verdiği renk farklılıkları ile fenotipik olarak 67 koloninin *E. coli* suşlarına ait olduğu tespit edilmiştir. Fenotipik tespiti yapılan kolonilerdeki bakterilerin *uspA* geni varlığına yönelik PCR merkezli genotipik taranması sonucu sadece 4 koloninin *E. coli*'ye ait olmadığı diğer 63 koloninin *E. coli* olduğu tespit edilmiştir. Fenotipik tanımlamanın %94 oranıyla Genotipik tanımlama ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Etlerin temin edildiği hayvan grubu açısından ise küçükbaş hayvan numunelerinde koloni oluşumun gözlemlendiği tüm bakterilerin, büyükbaş hayvan numunelerinde ise %90,2'lik bir oranda *uspA* pozitif çıktığı gözlenmiştir. İzole edilen *E. coli* kolonileri açısından değerlendirildiğinde 25 örnekten 37 koloni, 20 örnekten 18 koloni *uspA* pozitif gözlenmiştir. Uyanık'ın 2022 yılında yapmış olduğu ESBL üreten *E. coli* izolatların tüketime hazır halde sunulan gıda örneklerinden yaptığı ekimler sonucu çalıştığı gıda örneklerinden kromojenik besiyerinde *E. coli* şüphelisi olan 87 koloni PCR uygulaması ile *uspA* gen varlığı yönünden taranmış ve tamamı pozitif çıkmıştır [366].

Klinik örnekler Triptic Soy Broth besiyerinde inkübasyona alınmış ve hastane kromojenik testleri ile fenotipik olarak *E. coli* pozitif tanısı konulan 33 örneğin tamamı genotipik tanımlama ile *uspA* pozitif çıkmıştır. Hinata vd.'nin 2004 yılında İYE'lu hastalardaki idrar örneklerinden izole edilen *E. coli*'lerin kantitatif tespitine yönelik geleneksel yöntemle kıyasla kullanılan *uspA* *E. coli* spesifik geninin kantitatif PCR ile hızlı ve basit şekilde pozitifliği tanımlaması yanında idrar örneklerindeki *E. coli* sayısal verilerini de ortaya koyması açısından önem ifade etmektedir [369]. Gündoğdu vd.'nin 2011 yılında Queensland şehrinde üropatolojik *E. coli*'lerde antimikrobiyal direnç genleri ile integrin bağlantılı genlerin tespitine yönelik çalışmalarında spesifik *E. coli* tanımlayıcı olarak *uspA* primerleri kullanılarak PCR ile tarama yapılmıştır [363].

4.2. Filogenetik Sınıflandırma

Gıda örneklerinde Quadrupeks PCR tekniği kullanılarak 4 gen taramasında 8 primer kullanılmış ve örneklerin farklı filogruplara ait oldukları tespit edilmiştir. Dahil olduğu filogrupların tespitine yoğunlaşıl原因 örneklerden %26,3'ünün mevcut herhangi bir sınıfa dahil edilemediği MLST uygulamaları ile daha detaylı inceleme gerektiren U filogrubu üyesi oldukları tespit edilmiştir. %21,1'nin B1 sınıfına, %15,8'inin B2 sınıfına, %10,5'inin F sınıfına, %11,5'inin A veya C sınıfına ve %5,3'ünün D veya E sınıfına dahil olduğu tespit edilmiştir.

4.3. *E. coli* İzolatlarında ESBL Gen Varyantlarının İdentifikasyonu

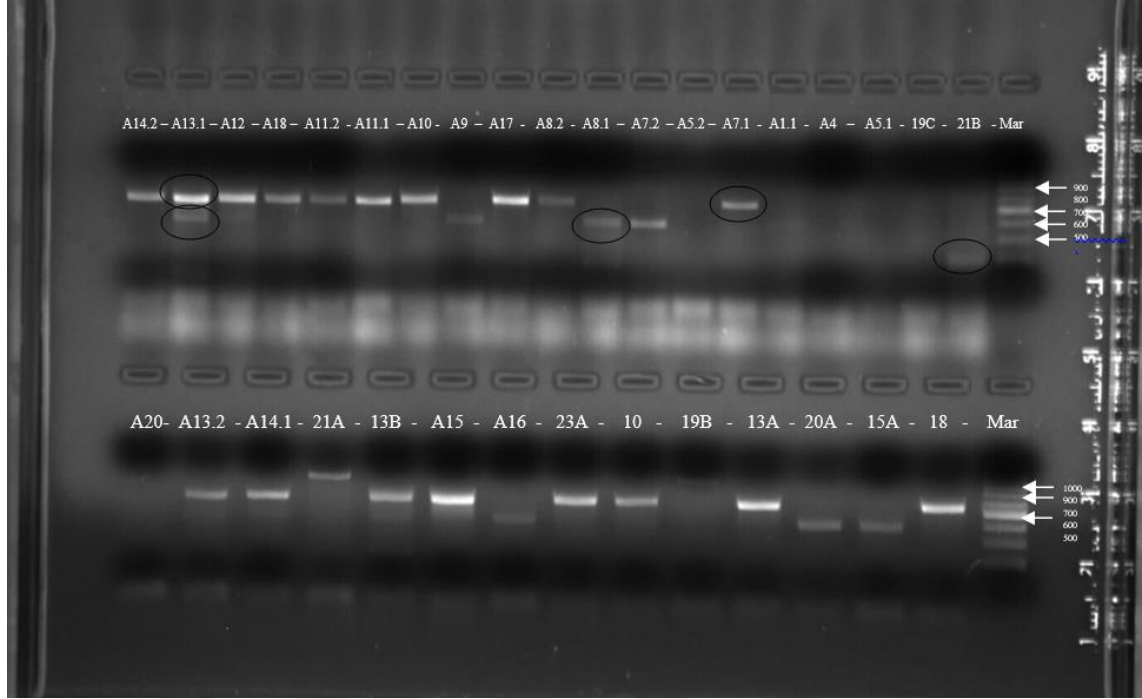
E. coli izolatlarından izole edilen DNA örneklerindeki ESBL gen varyantlarının 4 hedef geni hedefleyen 8 primerin kullanılması ile oluşan identifikasyonu sonucu *uspA* pozitif çıkan 63 koloniye ait izolatlardan 16 tanesinde (%25,40) çalışılan 4 *bla* geninden hiç birine rastlanmamıştır. Bu durum büyük ve küçükbaşlardan alınan izolatlar açısından değerlendirildiğinde 37 büyükbaş et kolonisinden 12'sinde (büyükbaş kolonilerinin %32,43'ünde); 26 küçükbaş kolonisinin 4'sinde (küçükbaş kolonilerin %15,39'unda) *bla* genlerine rastlanmadığı gözlenmiştir. *bla* genlerinden *bla*_{CTX-M} genine 8 izolatta (izolatların %12,70'inde) rastlanmış olup bunlardan 7'ini büyük baş et örneklerinden elde edilen izolatlar (büyükbaş izolatların %18,92'sini) oluştururken birini (küçükbaş izolatların %3,85'ini) ise küçükbaş et izolatu oluşturmuştur. *bla*_{OXA} geni açısından 14 izolat (tüm izolatların %22,22'si) pozitif sonuç vermiş olup bunlardan 8'i (büyükbaş izolatların %21,62'si) büyükbaş, 6'sının (küçükbaş izolatların %23,08'inde) ise küçük baş örnek kolonisine ait olduğu saptanmıştır. *bla*_{SHV} genine çalışılan izolatlardan 16 küçükbaş (küçükbaş izolatların %61,53'ünde) ve 12 büyükbaş (küçükbaş izolatların %32,43'ü) olmak üzere 28 izolatta (et izolatlarının %44,44'ünde) rastlanmıştır. *bla*_{TEM} genine 3 küçükbaş (küçükbaş izolatların %11,54'ünde) 6 büyükbaş (büyükbaş izolatların %16,22'sinde) örnek kolonisinde rastlanmıştır. 63 koloni izolatından sadece birinde (A13.1 isimli numune) (tüm gıda izolatlarının %1,59'unda) 4 *bla* genin tamamına, bir izolatta (19B) (tüm gıda izolatlarının %1,59'unda) 3 gene birlikte rastlanmıştır. 7 izolatta (22, 7B, 6, 11, 20B, 21B, A3.1) (tüm gıda izolatlarının %11,11'inde) çift gene, 38 izolatta (tüm gıda izolatlarının %60,38'inde) tek gene rastlanmış ve Çizelge 4.1.'e veriler aktarılmıştır. Çalışmaya ait *bla* gen PCR görüntüleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de yansıtılmıştır.

Çizelge 4.1. Gıda örnekleri izolatlardaki direnç gen ve gen varyantları verileri

Sayı	Örnekler/ Genler	blaCTXM	blaOXA	blaSHV	blaTEM	sul 1	sul 2	sul 3	int 1	int 2	int 3
1	21B(SİYAH)	+	+								
2	19C(S)						+		+		
3	A5.1(S)					+			+	+	
4	A4(S)								+		
5	A1.1(S)			+		+			+	+	
6	A7.1(S)			+		+			+		
7	A5.2(S)					+	+		+	+	
8	A7.2(S)		+			+		+	+	+	
9	A8.1(S)		+			+		+	+	+	
10	A8.2(S)			+		+	+		+	+	
11	A17(S)			+		+		+	+	+	
12	A9(S)		+			+	+		+	+	+
13	A10(S)			+		+					
14	A11.1(S)			+		+				+	
15	A11.2(S)			+		+			+	+	
16	A18(S)			+		+		+	+	+	
17	A12(S)			+		+			+	+	+
18	A13.1(S)	+	+	++	+	+			+	+	
19	A14.2(S)			+		+			+	+	
20	A20(S)				+	+		+		+	
21	A13.2(S)			+						+	
22	A14.1(S)			+						+	+
23	21A(S)				+				+		
24	13B(S)			+		+					
25	A15(S)			+		+					
26	A16(S)		+							+	
27	23A(S)			+				+		+	
28	10(MAVİ)			+		+				+	
29	19B(M)		+	+	+	+				+	
30	13A(M)			+		+				+	
31	20A(M)		+			+			+	+	
32	15A(M)		+						+	+	+
33	18(M)			+		+					
34	12B(M)								+		
35	15B(M)		+							+	
36	20B(M)		+	+		+			++		+
37	12A(M)				+	+			+		

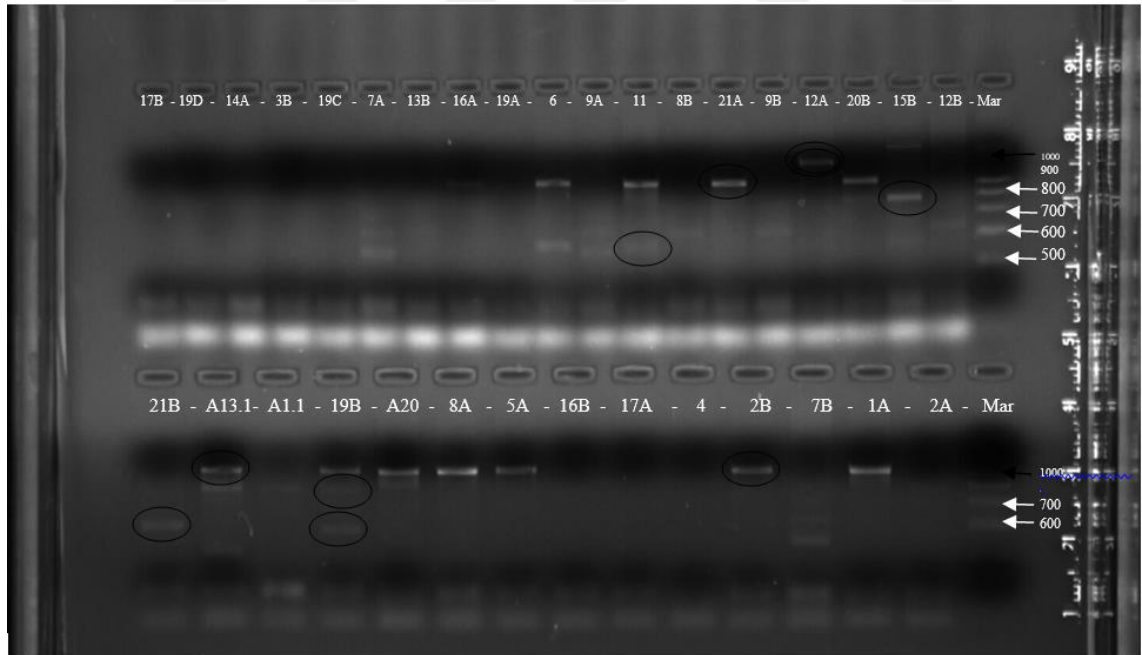
Çizelge 4.1. (Devam) Gıda örnekleri izolatlardaki direnç gen ve gen varyantları verileri

38	9B(M)	+					+			++	
39	21A(M)			+						+	
40	8B(M)	+					+			++	
41	11(M)	+		+		+		+	+		
42	9A(M)									+	
43	6(M)	+		+		+		+	+	+	
44	19A(M)					+	+	+	+	+	
45	16A(M)					+	+				
46	13B(M)					+	+		++	++	
47	7A(M)	+					+		+	+	
48	19C(M)						+		+	++	
49	3B(M)						+	+	+	+	
50	14A(M)					+			++	+	
51	19D(M)								++	+	+
52	17B(M)					+			+	+	
53	2A(M)					+		+	++	+	
54	1A(M)				+				+++	++	
55	7B(M)	+	+						+	+	
56	2B(M)				+	+			++	+	
57	4(M)					+			+	+	
58	17A(M)					+			++		
59	16B(M)					+			++		
60	5A(M)				+			+	+	+	
61	8A(M)				+	+			+	++	
62	3A(M)					+			++	+	+
63	A3.2(S)			+		+			++	+	
64	21C(S)			+					+	+	
65	21D(S)		+			+			++	++	
66	A1.2(S)							+			
67	19D(S)						+				
68	A3.1(S)		+		+	+					
69	A2(S)			+		+					
70	22(S)	+		+							
71	24B(S)			+		+					
72	24A(S)			+		+			++	+	



Şekil 4.1. Gıda örnekleri bla genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Mar: DNA marker.



Şekil 4.2. Gıda örnekleri bla genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Mar: DNA marker.

Uyanık'ın 2022 yılında hastane kantinlerindeki hazırlanmış sandviç örneklerinde ESBL üreten bakterileri kullanarak yaptığı çalışmada 32 *E. coli* bakteri izolatu üzerinde

*bla*_{CTXM}, *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} genlerinin varlığı taranmış olup 20'sinde *bla*_{TEM} genine rastlanırken 11 izolatta da *bla*_{CTXM} genine rastlanmıştır [366]. Montso vd.'nin 2019 yılında sığır dışkısı ve çiğ sığır etlerinde ESBL varlığını ERIC PCR yoluyla incelediği çalışmada *E. coli* izolatlarının %85,5'inde *bla*_{TEM}, %69,6'sında *bla*_{SHV} ve % 58'inde *bla*_{CTXM} genleri tespit edilmiştir [370].

2013 yılında Potekiz'de yapılan kesimlik sığır ve koyun dışkı örneklerinde ESBL üreten *E. coli* izolasyonu ve identifikasyonunun yapıldığı çalışmada PCR karakterizasyonda kullanılmış olup sığır örneklerinin %9,3'ünde koyun örneklerinin %5,5'inde *bla*_{CTXM} genine rastlandığı rapor edilmiştir. Ayrıca çalışmada taranan diğer β -laktamaz geni olan *bla*_{TEM} geni ve *bla*_{CTXM} geninin kombinasyon haline sadece koyun örneklerinde rastlanmıştır. Çalışmanın gerek *bla*_{CTXM} geni varlığı ve gerekse *bla*_{TEM} + *bla*_{CTXM} kombinasyonun çalışılan her iki hayvan grubunda da gözlenmesi ile çalışma verilerimizle uyumluluk göstermektedir [371].

Mısır'ın Zagazig şehrinde perakende olarak satışa sunulan koyun etlerinden izole edilen 101 izolatın 17'sinde ESBL tespit edilmiş olup tanımlamada tamamının *E. coli* olduğu belirtilmiştir. Bu izolatlar üzerinde yapılan *bla* gen tanımlaması ile en yüksek oranda (7 izolatta) *bla*_{CTX-M} genine rastlanırken bunu 3 izolatla *bla*_{TEM} ve 2 izolatla *bla*_{SHV} genlerinin takip ettiği rapor edilmiştir [372].

Geser vd.'nin 2012 yılında kesime hazır hayvanların dışkılarından alınan örneklerden izole edilen 79 *E. coli* izolatının koyun ve sığırlardan elde edilenlerin sayısı 20 olup bunlardan 16 tanesi sığırlardan, 4 tanesi koyunlardan elde edilmiştir. ESBL pozitif bu sığır izolatlarının %68,75 (11)'inde *bla*_{CTX-M} genine %31,75 (6)'inde *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} kombinasyonlarına rastlandığı belirtilmiş olup, ESBL pozitif koyun izolatlarının %80 (4)'inde *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M} kombinasyonuna %20(1)'sinde *bla*_{TEM} + *bla*_{SHV} kombinasyonu rapor edilmiştir. Ayrıca aynı çalışmada bakteri izolasyonunda tercih edilen kıyılmış et parçalarında ve süt tanklarında ESBL pozitif izolatlara rastlanmamıştır [373].

Klinik izolatlarda yapılan *bla* gen taramasında çalışılan 33 örnekten sadece 5'i pozitif gözlemlenmiş olup bunların tamamında *bla*_{CTXM} genine rastlanmıştır. Veriler Çizelge 4.2.'ye yansıtılmıştır.

Çizelge 4.2. Klinik örnek izolatlarındaki direnç gen ve gen varyantları verileri

Sayı	Örnekler/ Genler	<i>blaCTXM</i>	<i>blaOXA</i>	<i>blaSHV</i>	<i>blaTEM</i>	<i>sul 1</i>	<i>sul 2</i>	<i>sul 3</i>	<i>int 1</i>	<i>int 2</i>	<i>int 3</i>
1	34						+				
2	35						+				
3	36					+					
4	37						+	+	+		
5	38						+	+	+		
6	39						++		+		
7	40	+				+		+	+		
8	41					+	+	+	+		
9	42					+	+	+	+		
10	43					+	+	+	+		
11	44	+				+	+				
12	45					+		+	+		
13	46					+	+				
14	47					+	+				
15	48						+				
16	49	+					+				
17	50						+				
18	51						+				
19	52						+	+			
20	53	+					+				
21	54						+		+		
22	55						+	+	+		
23	56						+	+	+		
24	57						+		+		
25	58					+		+	+		
26	59						+	+	+		
27	60						+	+	+		
28	61					+		+	+		
29	62						+	+			
30	32					+	+				
31	31						+		+		
32	18	+				+		+	+		
33	23						+				

Ambar vd.'nin 2019 yılında *E. coli*'ninde dahil edildiği ESBL üreten bakteriler üzerinde çalışmamızda kullanılan 4 *bla* geninin klinik izolatlarda varlık yokluğu single PCR tekniği ile çalışılmış ve en yüksek oranın *bla*_{CTXM} geninde %72'lik oranla gözlemlendiği, çalışmada *E. coli* izolatlarından %83'ünde bu gene rastlandığı diğer genlerin daha az oranda gözlemlendiği anlaşılmıştır. Çalışmadaki veriler doğrultusunda *bla*_{CTXM} geni varlığı bir pandemik durum olarak ifade bulmuştur [374]. Kluytmans vd.'nin 2013 yılında insanlardan izole edilen ESBL üreten 44 *E. coli* izolatının 34'ünde *bla*_{CTXM}, 9'unda *bla*_{TEM} ve 1'inde *bla*_{SHV} geni varlığı rapor edilmiştir [375]. Benzer bir şekilde Kuznetsova ve Gizatullina'nın İYE'na sahip hastalardan izole edilen UPEC izolatlarının %79,31'inde *bla*_{CTXM} genine rastlanmış, bunu %58,62 ile *bla*_{TEM} ve *bla*_{OXA} takip ederken, *bla*_{SHV} 'ye rastlanmamıştır [376].

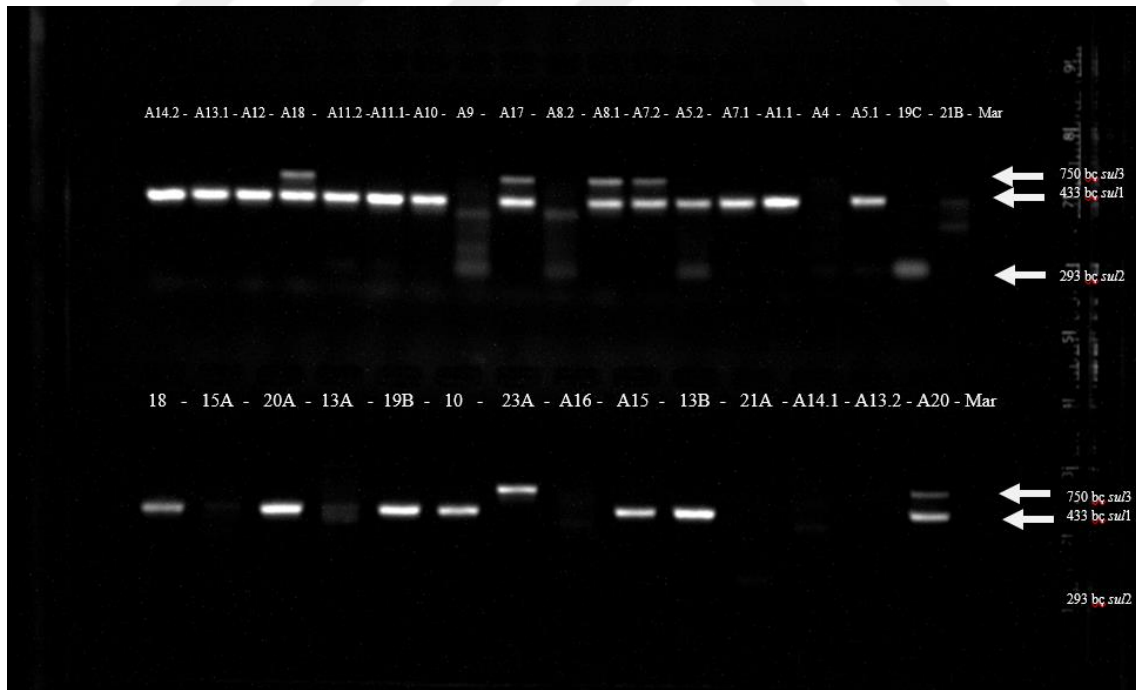
4.4. *E. coli* izolatlarında Sülfonamid direnç geni identifikasyonu

Sülfonamid direnç genlerinden üçünün tespitinin dâhil edildiği 63 gıda kaynaklı *E. coli* izolatlarının 4'ü küçükbaş (küçükbaş izolatların %15,38'inde) ve 9'u büyükbaş (büyükbaş izolatların %24,32'sinde) olmak üzere 13'ünde (gıda izolatlarının %20,63'ünde) her üç genede rastlanmamıştır. İzolatların 11'ünde (%17,46'sı) çift direnç genine, ikisinde (19A ile aynı izolattan çalışılan 3A-3B) (gıda izolatlarının %3,17'sinde) ise genlerin üçüne de rastlanmıştır. Çift *sul* geni bulunduran izolatların 8'i küçükbaş (küçükbaş izolatların %30,77'sinde), 3'i büyükbaş (büyükbaş izolatların %8,11'inde) et izolatları olduğu gözlemlenmiştir. Küçükbaş 3 izolat ve büyükbaş 1 izolatta *sul1* ve *sul2*; küçükbaş 5 ve büyükbaş 2 izolatta *sul1* ve *sul3* genine birlikte rastlanırken *sul2* ve *sul3* genine birlikte sahip olan izolata rastlanmamıştır. İzolatların 38'inde (izolatların %60,32'sinde) tek sülfonamid direnç geni tespit edilmiştir. İzolatların % 69,84'ü (44 izolat) *sul1* pozitif olup bunların 21 izolatını küçükbaş (küçükbaş izolatların %80,77'sini), 23 izolatını büyükbaş (büyükbaş izolatların %62,16'sını) örnekleri oluşturmuştur. Tüm izolatların %15,87'si *sul2* pozitif olup 3'ünü küçükbaş (küçükbaş izolatların %11,53'ünü), 7'sini büyükbaş örnekler (büyükbaş izolatların %18,92'sini) teşkil etmiştir. İzolatların %20,63'ü *sul3* pozitif olup bunların 6'sını küçükbaş (küçükbaş izolatların %23,8'ini), 7'sini büyükbaş örnekler (büyükbaş örneklerin %18,92'sini) oluşturur (Şekil 4.3, Şekil 4.4). Li vd.'nin 2022 yılında tavuk ve domuz etlerinden izole ettikleri 166 *E. coli* izolatlarında her üç *sul* genini de PCR ile taradıkları çalışmada *sul1* geni izolatların %16,9'sında, *sul2* %32,5'de ve *sul3* %13,9'de gözlemlenmiştir [377].

Badi vd.'nin hayvanlara ve hayvansal ürünlerden izole ettiği *E. coli* bakterileri üzerinde *sul* genlerinin tespitinde gerçekleştirildiği 2018 yılındaki çalışmasında 65 izolatın sadece 1'inde *sul1* geni, 4'ünde *sul2* geni ve 3'ünde *sul3* geninin varlığı rapor edilmiştir [378].

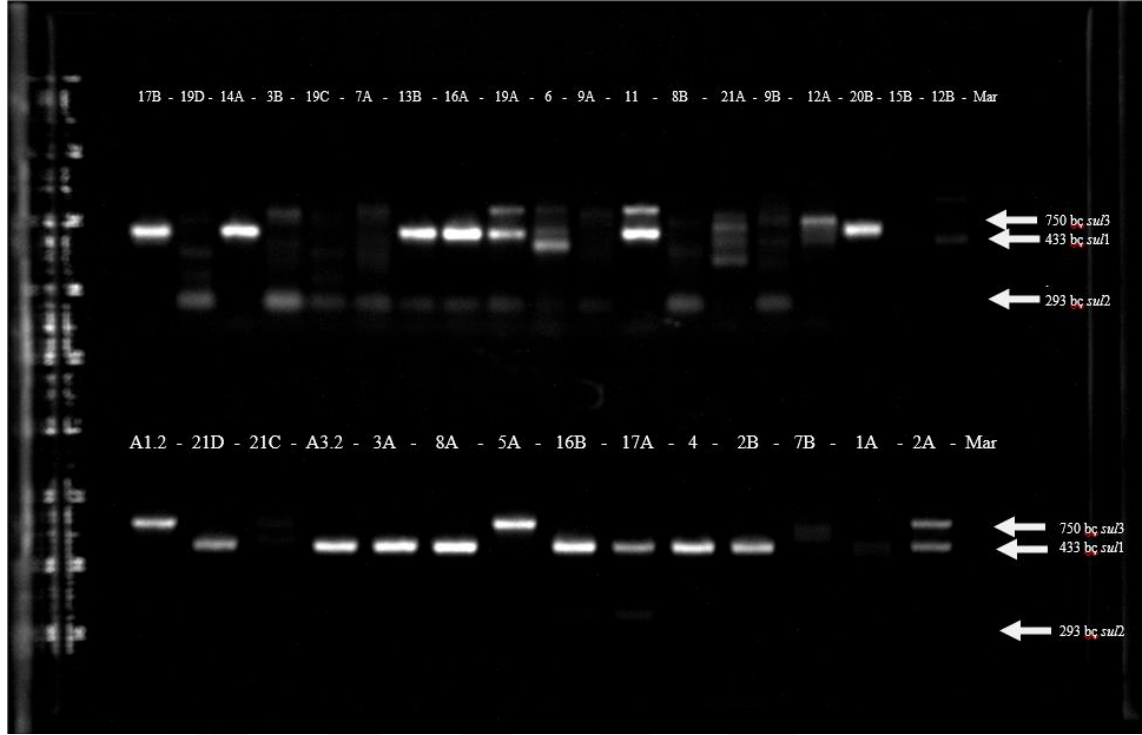
Birleşik Arap Emirlikleri, Abu Dabi Emirliğinde 2014-2019 yılları arasında deve, koyun, keçi ve kümes hayvanlarının dışkı, akıntı ve organlarından izole edilen *E. coli* izolatlarında 3 Sülfonamid direnç geninin taranması sonucu izolatların %20,7 (34)'sinde *sul2* ya da *sul3* genine rastlandığı rapor edilmiştir. Çalışmada izolatların %79,3 (130)'ünde her iki *sul* genine de rastlanmış, fakat izolatların hiçbirinde *sul1* geni tespit edilememiştir [379].

Lerma vd.'nin 2014 yılında kesimhane yüzeyleri ve et (keçi, koyun) örneklerinden izole ettiği bakteriler üzerinde AMR'lerin varlığının tespitine yönelik sülfonamid direnç genlerinin 3'ünü taramış olup kesimhane yüzeylerinin 25 (%78)'inde en yüksek oranla *sul3* genine rastlanırken, bunu *sul2+sul1* kombinasyonu takip etmiştir. Çalışmada ayrıca et örneklerinin tamamında *sul3* geni tespit edilmiştir [380].



Şekil 4.3. Gıda örnekleri *sul* genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Mar: DNA marker.



Şekil 4.4. Gıda örnekleri *sul* genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Mar: DNA marker.

Klinik kaynaklı izolatlarımızda sülfonamid direnç gen taramasında izolatların %39,39'unda *sul1* geni, %81,82'sinde *sul2*, %48,49'unda *sul3* pozitif çıkmıştır. İzolatların %9,1'inde 3 genin, %12,12'sinde *sul1* ve *sul2*, %15,15'inde *sul1* ve *sul3*, %24,24'ünde *sul2* ve *sul3* genlerinin çoklu direnç oluşturduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.5). Arabi ve arkadaşlarının İran hastanelerinde klinik örneklerden temin ettikleri 144 *E. coli* izolatın 116'sında *sul1*, 96'sında *sul2* ve 3'ünde *sul3* genine rastlanmıştır [381].

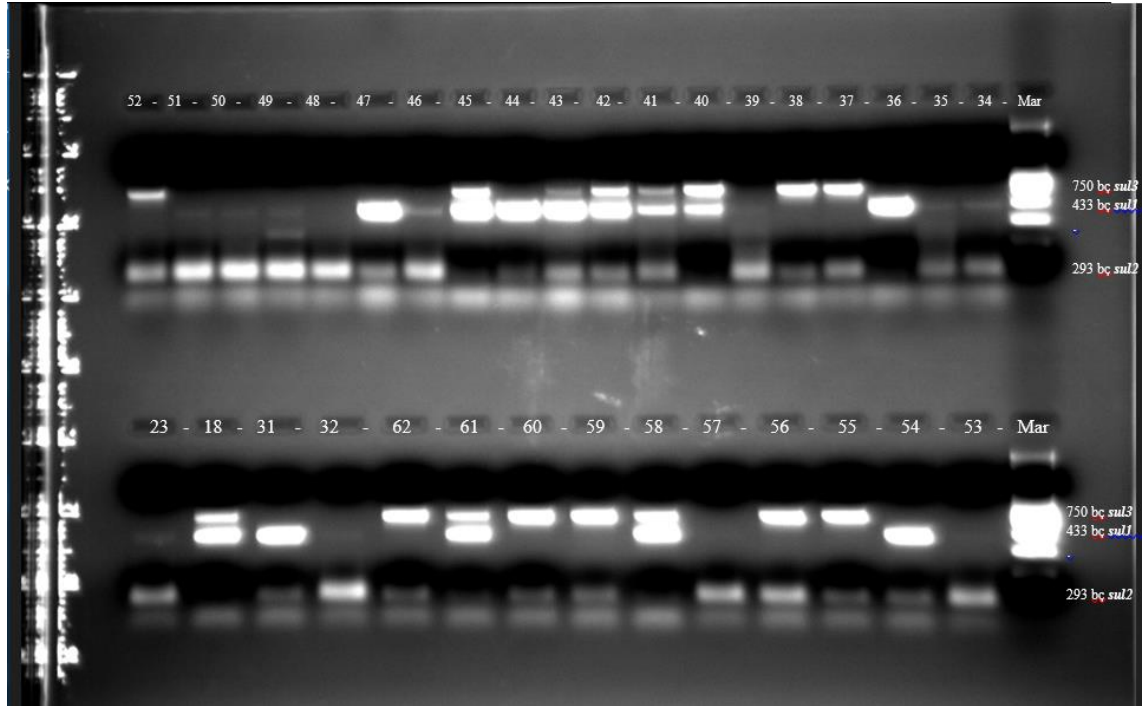
Wu vd.'nin 2010 yılında donör olarak insan dışkıсында kullanıldığı çalışmada izole edilen *E. coli* izolatlarının (26) %46 (12)'sında *sul2* genine, %23 (6)'ünde *sul1* genine ve %31 (8)'inde her iki gene birlikte rastlandığı *sul3* genine ise hiçbir izolatta rastlanmadığı rapor edilmiştir [382].

Uruguaylı çocuklarda İYE etkeni *E. coli* izolatlarındaki sülfonamid direnç genlerinin tespitine yönelik yapılan çalışmada örneklerin %37,9'unda trimetoprim/sülfametoksazole direnç tespit edilmiş olup bunların %85,5'inde *sul* direnç genine rastlandığı belirtilmiştir [383].

Polonya'da 2005-2007 yılları arasında İYE'li hastalardan alınan idrar örneklerinden izole edilen *E. coli* bakterileri üzerinde sülfonamid direnç genlerinin tespitine yönelik 3 *sul*

gen taraması yapılmış, 127 izolattan en yüksek oranla (%96) *sul2* genine, ardından %86 oranla *sul1* genine en düşük olarak %33 ile *sul3* genine taramada rastlanmıştır [384].

İssa vd.'nin 2022 yılında yılında Bağdat'ta bir hastanede İYE hastalarından izole edilen *E. coli* izolatlarında *sul1* ve *sul2* genlerinin PCR ile taramasını yapıp 11 izzolatta *sul1* geni ve 8 izolatta *sul2* geni varlığı rapor edilmiştir [385].



Şekil 4.5. Klinik örnekleri *sul* genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Mar: DNA marker.

4.4.1. Beta laktam ve sülfonamid direnç genlerinin birlikte bulunma durumu

Et örneklerinde sülfonamid ve *bla* gen kombinasyonlarını birlikte bulundurma açısından verileri değerlendirdiğimizde en az bir *bla* geni ile *sul1* geni birlikte bulundurma oranı küçükbaş örneklerde %42,31 (11) iken büyükbaş örneklerinde %37,84 (14)'tür. En az bir *bla* geni ile *sul2* geni birlikte bulundurma oranı büyükbaşlarda %5,4 (2) olup küçükbaş örneklerde bu birlikteliğe rastlanmamıştır. En az bir *bla* geni ile *sul3* gen kombinasyonu sonucuda sadece büyükbaş örneklerde olmak üzere yine %5,4'tür. En az bir *bla+sul1+sul2* kombinasyonu %7,69 (2) oranıyla sadece küçükbaş örneklerde gözlenmiştir. En az bir *bla+sul1+sul3* kombinasyonuna %19,23 (5) ile küçükbaş örneklerinde, %2,70 (1) ile büyükbaş örneklerde rastlanır. En az bir *bla+sul2+sul3* kombinasyonuna %2,70 (1) ile

sadece büyükbaş örneklerde rastlanmış olup *bla* geni/genleri ile çalışılan 3 *sul* genini birlikte bulunduran örneğe rastlanmamıştır (Çizelge 4.3.).

Çizelge 4.3. Gıda izolatlarında beta laktam ve sülfonamid direnç genlerinin birlikte bulunma oranları

Örnekler / Genler	$1 \geq bla+sul1$	$1 \geq bla+sul2$	$1 \geq bla+sul3$	$1 \geq bla+sul1+sul2$	$1 \geq bla+sul1+sul3$	$1 \geq bla+sul2+sul3$
Küçükbaş	%42,31 (11)	0	0	%7,69 (2)	%19,23 (5)	0
Büyükbaş	%37,84 (14)	%5,4 (2)	%5,4 (2)	0	%2,70 (1)	%2,70 (1)

Ramos ve diğerlerine (2013) göre sığır ve koyun örneklerinden izole edilen *E. coli* bakterilerinde *bla*_{CTXM} + *sul3* gen kombinasyonuna 2 koyun ve bir sığır örneğinde, *bla*_{CTXM} + *sul1* kombinasyonuna ise sadece bir sığır örneğinde rastlanmıştır. *bla*_{CTXM} + *bla*_{TEM} + *sul1* + *sul2* kombinasyonuna ise sadece 2 sığır örneğinde rastlanmıştır [371]. Çalışmamızda *bla*_{CTXM} + *sul3* gen kombinasyonuna sadece 2 sığır örneğinde; *bla*_{CTXM} + *sul1* kombinasyonuna ise 2 büyükbaş ve 1 küçükbaş örnekte rastlanmıştır. İlgili çalışmada kullanılan *E. coli* kaynaklarının büyük bir kısmını (73 koyun) küçükbaş örnekler oluşturmuş olup çalışmamızda ise çoğunluğu büyükbaş örnekler (37) oluşturmuştur, bu farklılık *bla*_{CTXM} + *sul3* kombinasyonu bakımından öne çıkan kaynaklardaki değişiklik etkeni olarak değerlendirilebilir.

Tunus'da hayvan çiftliklerinden dışkı örnekleri ile tüketime hazır gıdaların olduğu reyondan temini yapılan 27'si sığır ve 1'i koyun olmak üzere çeşitli çeşitli et örneklerinden izolasyonu yapılan 11 sefalosporin'e dirençli *E. coli* örneklerinin gen karakterizasyonu sonucu çalışılan 5 et örneğinin 3'ünde *bla*_{CTXM} + *sul1* gen kombinasyonuna rastlanmış olup aynı örneklerin 1.sınıf integron bakımından pozitif olduğu rapor edilmiştir [386].

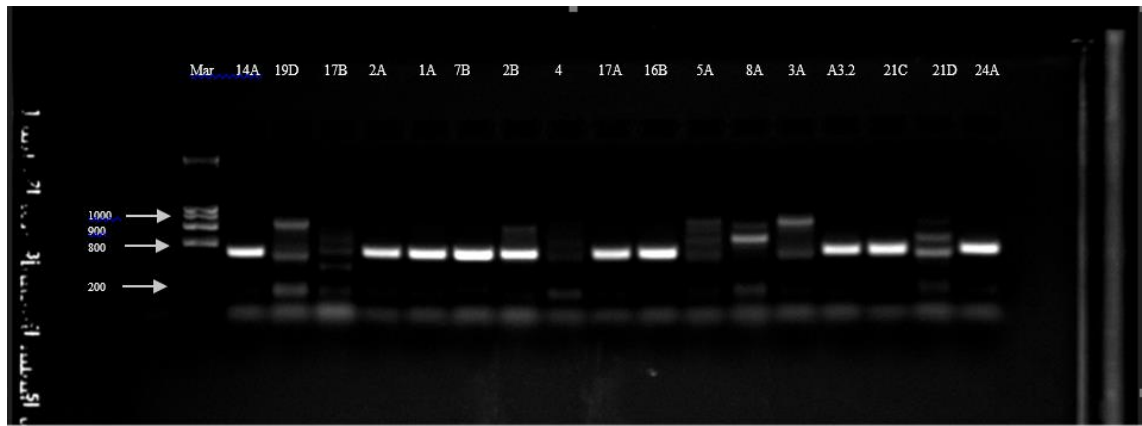
Klinik örneklerde *bla* + *sul2* kombinasyonuna %6,06 ile 2 örnekte; *bla* + *sul1* + *sul2* kombinasyonuna %3,03 ile bir örnekte; *bla* + *sul1* + *sul3* kombinasyonuna %6,06 ile iki örnekte rastlanıp diğer kombinasyonlar klinik örneklerin hiçbirinde gözlenmemiştir.

Adamus-Bialek vd.'nin *sul* ve *bla* genlerinin klinik UPEC izolatlarında çalışmaya dahil edilen 116 izolatın tamamı *bla*_{TEM} geni bakımından pozitifdir. Aynı çalışmada *sul* genlerinden %96 oranla en fazla *sul2*, %86 oranla *sul1* ve %33 oranla *sul3* genine rastlanmıştır [387].

Arabi vd.'nin Tahran'daki bir hastanede izolasyonu yapılan *E. coli* izolatlarında β -laktam, sülfonamid direnç ve integron genlerinin karakterizasyonu yaptığı çalışmada sul genleri bakımından 116 izolat *sul1*, 96 izolat *sul2*, üç izolat *sul3* genine sahiptir. Aynı çalışmada β -laktam genleri bakımından 122 izolat *bla*_{TEM} genine, 76 izolat *bla*_{SHV} genine ve 37 izolat *bla*_{CTXM} genine sahip çıkmıştır. Ayrıca 68 suş integron genlerinden *int1* bakımından pozitifdir [381].

4.5. *E. coli* izolatları İntegran gen identifikasyonu

Et örneklerinden izole edilen 63 izolatta 3 *int* geninin PCR ile tarandığı çalışmamızda 11 izolatta (gıda izolatlarının %17,46'sında) bu genlerden hiçbirine rastlanmamıştır. İzolatların % 44,44'ünde (11 küçükbaş ve 17 büyükbaş izolatta) *int1* ve *int2*, %1,59'unda (20B) *int1* ve *int3*, %1,59'unda (A14.1) *int2* ve *int3* ve %7,94'ünde her üç gen pozitif çıkmıştır. Üçlü direnç genine sahip olan izolatların 2'si küçükbaş 3'ü büyükbaş et kaynaklıdır. İzolatların %26,98'inde ise tek *int* genine rastlanmıştır. İzolatlarda genlerin görülme oranı bakımından en yüksek oranda %73,02 ile *int2* olurken bunu *int1* (%63,49) ve *int3* (%11,11) genleri takip etmiştir (Şekil 4.6). Martínez-Vázquez'in 2022 yılında perakende satışa sunulan et örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarının %40'ında çalışılan *int1* geni bakımından pozitif olduğu tespit edilmiştir [386].

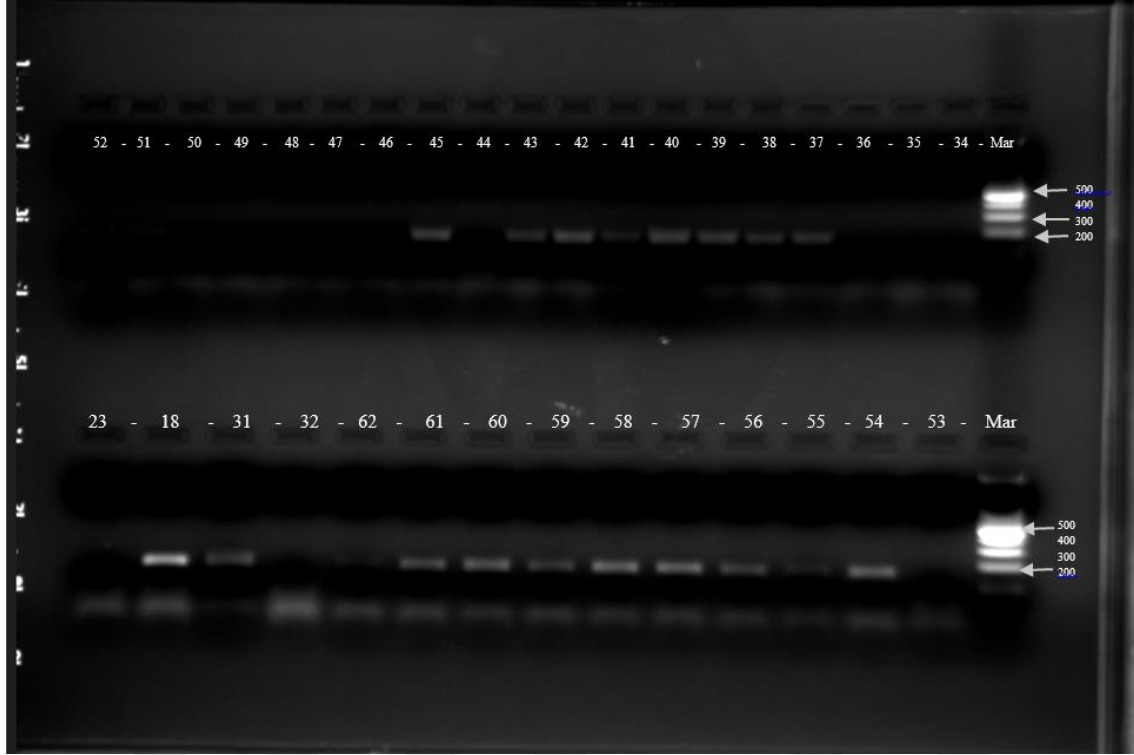


Şekil 4.6. Gıda örnekleri *int* genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Mar: DNA marker.

Klinik örneklerde araştırılan integron genlerinden *int1* geni izolatların %54,55'inde (18 izolatta) rastlanırken, *int2* ve *int3* genine rastlanmamıştır (Şekil 4.7). Lavakhamseh'in 2016 yılındaki çalışmasında hastane kaynaklı *E. coli* izolatlarında *int1* ve *int2* gen varlığı

taranmış ve çoklu direnç gözlenen izolatların % 47,05’inde *int1* %3,92’sinde *int2* geni tespit edilmiştir [387].



Şekil 4.7. Klinik örnekleri *int* genleri PCR ürünü agaroz jel elektroforez görüntüsü.

Mar: DNA marker.

4.5.1. Beta laktam ve integron genlerinin birlikte bulunma durumları

Gıda örneklerini en az bir *bla* geni integron geni/genlerini birlikte bulundurma açısından verileri değerlendirdiğimizde; $1 \geq bla+int1$ kombinasyonuna %4,35 (1) ile küçükbaş örneklerde, %5,41 (2) ile büyükbaş örneklerde rastlanmıştır. $1 \geq bla+int2$ kombinasyonuna %15,38 (4) ile küçükbaş örneklerde, %18,92 (7) ile büyükbaş örneklerde rastlanmıştır. $1 \geq bla+int3$ kombinasyonuna çalışılan hiçbir örnekte rastlanmamıştır. $1 \geq bla+int1+int2$ kombinasyonu %38,46 (10) oranıyla küçükbaş ve %27,03(10) oranıyla büyükbaş örneklerde gözlenmiştir. $1 \geq bla+int1+int3$ kombinasyonuna %2,70 (1) oranıyla sadece büyükbaş örneklerde; $1 \geq bla+int2+int3$ kombinasyonu %3,85 (1) oranıyla sadece küçükbaş örneklerde rastlanmıştır. $1 \geq bla+int1+int2+int3$ kombinasyonu ise %7,69 (2) ile küçükbaş örneklerde, %2,70 (1) ile büyükbaş örneklerde gözlenmiştir (Çizelge 4.4.).

Çizelge 4.4. Gıda izolatlarında beta laktam ve integron genlerinin birlikte bulunma oranları

Örnekler/Genler	Küçükbaş	Büyükbaş
$I \geq bla+int1$	%4,35 (1)	%5,41 (2)
$I \geq bla+int2$	%15,38 (4)	%18,92 (7)
$I \geq bla+sul3$	%0	%0
$I \geq bla +int1+int2$	%38,46 (10)	%27,03 (10)
$I \geq bla+int1+int3$	%0	%2,70 (1)
$I \geq bla+int2+int3$	%3,85 (1)	%0
$I \geq bla+int1+int2+int3$	%7,69 (2)	%2,70 (1)

Klinik örneklerde sadece iki örnekte (%6,06) *bla+int1* kombinasyonuna rastlanırken diğer kombinasyonlar çalışılan örneklerde gözlenmemiştir. Machado ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmaya göre 12 yıllık süre zarfında İspanya’da bir hastaneden temin edilen ESBL üreten ve üretmeyen *E. coli* izolatları ile sağlıklı bireylerden temin edilen ESBL üretmeyen *E. coli* izolatlarının integron ilişkisi açıklanmaya çalışılmıştır. Çalışmada 52 ESBL pozitif örneğin 35’inde *int1* geni, 13’ünde *int2* geni ve 4’ünde her iki gen birlikte tespit edilirken *int3* geni bulunduran izolata rastlanmamıştır. Klinik izolatlardan ESBL üretenlerin %67’sinde üretmeyenlerin ise %40’ında *int1* genine rastlanmış olup *int2* genine ise klinik izolatlarda %13 gibi düşük bir oranda rastlanmıştır. Benzer bir *int2* görülme oranı klinik olmayan izolatlarda da görülmüştür. 1.sınıf integronların yayılımının diğer integronlara göre yüksek olduğu gözlenmiş olup bunun *bla* gen taşınımı ile ilişkisi noktasında *bla_{CTXM}* genlerinin %95’inde, *bla_{TEM}* genlerinin %23’ünde ve *bla_{SHV}* genlerinin %33’ünde bu pozitif ilişki rapor edilmiştir [388]. Çalışmamızda *E. coli* izolatlarında diğer *bla* genlerine nazaran *bla_{CTXM}* genlerinin daha yüksek görülme oranı ve çalışmada izolatlarda integron genlerinden sadece *int1* genine rastlanması iki çalışma verilerinin uyumluluğunu göstermektedir.

Moghaddam vd.’nin 2015 yılında İran’da bir hastanede yatan hastalardan izole edilen 33 MDR *E. coli* izolatının %97’sinde *int1* genine rastlanmış olup integron gen kasetleri bakımında da örneklerde benzerlikler görüldüğü belirtilmiştir. Aynı çalışmada izolatların ESBL pozitif örneklerin %87,5 (7/8)’unda *int1* geni varlığı rapor edilmiştir [389].

Sistit ve piyelonefrit etkeni olarak görülen UPEC bakterilerinden 50 izolatın dahil edildiği ve sahip olunan integron genlerinin tespitinin yapıldığı çalışmada izolatların %74’ünde *int1* genine rastlanırken, bunu 22 örnekle *int2* ve 1 örnekle *int3* geni takip eder.

Çalışmada verilere dayanarak 1. Sınıf integronun UPEC’lerde antimikrobiyal direnç ile ilişkisinin diğer integronlardan belirgin üstünlüğü yansıtılmıştır [390].

4.5.2. Sülfonamid direnç ve integron genlerinin birlikte bulunma durumları

Et örneklerinde en az bir $sul+int1$ genini birlikte bulundurma oranı %3,85 (1) ile küçükbaş, %8,11 (3) ile büyükbaş örneklerde rastlanmıştır. Çalışmada araştırılan $1 \geq sul+int2$ gen kombinasyonlarına %7,69 (2) ile küçükbaş, %16,22(6) ile büyükbaş örneklerde rastlanmaktadır. $1 \geq sul+int3$ kombinasyonu ile $1 \geq sul+int2+int3$ kombinasyonuna hiçbir örnekte rastlanmazken; $1 \geq sul+int1+int2$ kombinasyonuna %46,15 (12) ile küçükbaş, %32,43 (12) ile büyükbaş örneklerde rastlanmıştır. $1 \geq sul+int1+int3$ kombinasyonu ise %2,70 (1) oranıyla sadece büyükbaş örneklerde gözlenmiştir. $1 \geq sul+int1+int2+int3$ kombinasyonuna ise sadece küçükbaş örneklerde rastlanıp tüm küçükbaş örneklerine oranı %11,54 (3) olarak bulunmuştur (Çizelge 4.5.).

Çizelge 4.5. Gıda izolatlarında sülfonamid direnç ve integron genlerinin birlikte bulunma oranları

Örnekler/Genler	Küçükbaş	Büyükbaş
$1 \geq sul+int1$	%3,85 (1)	%8,11 (3)
$1 \geq sul+int2$	%7,69 (2)	%16,22 (6)
$1 \geq sul+int3$	%0	%0
$1 \geq sul+int1+int2$	%46,15 (12)	%32,43 (12)
$1 \geq sul+int1+int3$	%0	%2,70 (1)
$1 \geq sul+int2+int3$	%0	%0
$1 \geq sul+int1+int2+int3$	%11,54 (3)	%0

Sunde vd.’nin 2006 yılında Norveç’te et ve et ürünlerinden izole edilen izolatlarda $sul1$ ve $sul2$ genleri ile $int1$ ve $int2$ genleri bakımından yapılan taramada sul genleri ile $int1$ arasında belirgin bir ilişki olduğu rapor edilmiştir [357].

Klinik örneklerde $1 \geq sul+int1$ kombinasyonuna %54,55 (18) oranında rastlanmıştır. sul genlerinin $int1$ ile ayrı ayrı kombinasyonlarını değerlendirdiğimizde; $sul2+int1$ kombinasyonuna %12,12(4) oranıyla, $sul1+sul3+int1$ kombinasyonuna %15,15(5) oranıyla, $sul2+sul3+int1$ kombinasyonuna % 18,18 (6) oranıyla ve çalışılan tüm sul genleri ile $int1$ geninin birlikte bulundurmayan %9,09 oranıyla 3 örnekte rastlanmıştır. Gündoğdu vd.’nin

2011 yılında Avustralya'nın Queensland şehrinde hastanedeki hastalardan izole edilen 137 UPEC izolatının 69'unda varlığı araştırılan *sul1* geni bakımından pozitif olup bu pozitif suşların %55,1 (38)'inde 1. Sınıf integraz genlerine rastlanmıştır [391]. Çalışmamızda 13 izolatta *sul1* genine rastlanmış olup bunların %61,54 (8)'ünde gen *int1* geni ile birlikte bulunmaktadır. Arabi vd.'nin 2015 yılındaki çalışmasında 144 izolattan 68'inde *int1* geni mevcutken *sul1* geni 116 izolatta, *sul2* 96 izolatta *sul3* 3 izolatta olduğu yapılan taramada anlaşılmıştır [381].

4.5.3. Sülfonamid direnç, beta laktamaz ve/veya integron genlerinin birlikte bulunma durumları

Çalışmada incelenen ESBL gen varyantı, Sülfonamid direnç ve integron genlerinin birlikte bulundurulma oranlarını değerlendirildiğimizde gıda örnekleri için $1 \geq bla+1 \geq sul+1 \geq int$ gen birlikteliğine 15 küçükbaş örnek ve 16 büyükbaş örnekte olmak üzere 31 izolatta; klinik örnekler için 2 izolatta rastlanmıştır (Çizelge 4.6.)

Çizelge 4.6. Sülfonamid direnç, beta laktamaz ve integron genlerinin birlikte bulunma durumları

Örnekler/ Genler	Küçükbaş	Büyükbaş	Klinik
$1 \geq bla+1 \geq sul$	%73,08 (19)	%48,65 (18)	%15,15 (5)
$1 \geq bla+1 \geq int$	%69,23 (18)	%56,76 (21)	%6,06 (2)
$1 \geq sul+1 \geq int$	%65,38 (17)	%70,27 (26)	%54,55 (18)
$1 \geq bla+1 \geq sul+1 \geq int$	%57,69 (15)	%43,24 (16)	%6,06 (2)

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

İnsan ve hayvanların gastrointestinal sistemlerinin doğal üyesi olan *E. coli* bakterileri açık sistemlerde hızlı yayılım özellikleri nedeni ile bitkisel ve hayvansal gıdalar yoluyla insanlara tekrar ulaşan önemli virulent faktörler arasında yer alır [305]. Çevre ve hastane kaynaklı birçok ortamda rastlanan *E. coli* izolatlarından klinik kaynaklı olan UPEC'ler yaygın görülen nozokomiyal ve toplum kaynaklı enfeksiyonlardan biri olan İYE'lerin öncelikli nedensel faktörü rolünü üstlenmektedir. Enfeksiyonunun tedavisindeki ampirik antibiyotik uygulamaları UPEC'lerde dahil patojen ve kommensal *E. coli*'lerde MDR gelişimini tetiklemiştir [376]. Gıda kommensali ya da insan patojeni rolündeki *E. coli* suşları sahip oldukları geniş direnç rezervuarları ile hem kendi içinde hemde diğer türlerle direnç yanal yayılımı insan sağlığı üzerindeki tehdidini her geçen gün artırmaktadır [357].

Klinik ve gıda (et ürünleri) kaynaklı 96 *E. coli* izolatı üzerinde β -laktamaz gen varyantının PCR taraması sonucu; gıda izolatlarının %1,59'unda 4 *bla* geninin tamamına, %1,59'unda 3 *bla* genine (*bla_{OXA}*, *bla_{SHV}* ve *bla_{TEM}*), %11,11'inde çift *bla* genine, %60,32'sinde tek *bla* genine rastlanmıştır. Gıda izolatlarının %25,40'ında çalışılan 4 genede rastlanmamış olup bunların %19,05'lik kısmını büyükbaş örnekleri, %6,35'lik kısmını küçükbaş örnekleri oluşturmaktadır. 63 gıda *E. coli* izolatında en fazla gözlenen gen *bla_{SHV}* (%44,44) olup bunu *bla_{OXA}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTXM}* azalan oranlarla takip etmektedir (%22,22, %14,29 ve %12). Çalışılan 33 İYE kaynaklı klinik izolatın %15,15'inde pozitiflik gözlenmekte olup bunu sadece *bla_{CTXM}* genleri sağlamıştır ve diğer *bla* genlerine rastlanmamıştır.

E. coli izolatlarında Sülfonamid direnç geni PCR taramasında gıda izolatlarının %20,63'ünde çalışılan üç gene de rastlanmazken, %58,73'ünde tek *sul* genine, %17,46'sında çift *sul* genine, %3,17'si üç *sul* genine rastlanmıştır. İzolatlarda en yüksek oranla (%69,84) *sul1* geni pozitif sonuç verirken bunu %20,63 ile *sul3* geni %15,87 ile *sul2* geni takip etmiştir. Çalışılan 33 klinik izolatta %9,1'lik oranda her üç *sul* genine, %48,48'inde çift *sul* genine ve %39,39'unda tek *sul* genine rastlanmıştır. *sul* genlerinden en yüksek oran %81,82 ile *sul2*'de rastlanırken, bunu *sul3* (%48,49) ve *sul1* (%39,39) genleri takip etmiştir.

Üç integron geninin taraması sonucu; gıda örneklerinin %17,46'sında hiçbirine rastlanmazken, %7,94'ünde 3 genin tamamına, %47,62'sinde çift gene, %26,98'inde tek gene rastlanmıştır. En yüksek oranda görülen gen %73,02 ile *int2* olurken bunu *int1*

(%63,49) ve *int3* (%11,11) genleri takip etmiştir. Klinik örneklerde ise *int* genlerinden sadece *int1* genine %54,55 oranında rastlanırken diğer genlere rastlanmamıştır.

Gıda izolatlarının 37'si (19 küçükbaş ve 18 büyükbaş) *bla* ve *sul* genlerinden; 39 izolat (18 küçükbaş ve 21 büyükbaş) *bla* ve *int* genlerinden, 43 izolat (17 küçükbaş ve 26 büyükbaş) *sul* ve *int* genlerinden en az birer tanesine sahip olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca 31 izolatta (15 küçükbaş ve 16 büyükbaş) *bla*, *sul* ve *int* genlerinin her birinden en az birer tanesini bulundurduğu gözlenmiştir. Klinik izolatlarda ise 2 izolat her üç gruptan, 5 izolat *bla* ve *sul* genlerinden, 2 izolat *bla* ve *int* genlerinden ve 18 izolat *sul* ve *int* genlerinden en az birer gene sahip olduğu tespit edilmiştir.

Bakteriler için güçlü bir savunma mekanizması olan direnç geliştirme insanoğlu için tehdidini her geçen gün artırmaktadır. Çoklu direnç mekanizmalarına sahip olma bu tehdidi güçlendirmektedir. Tehdine neden olun MDR'e sahip bakteri çeşitliliği HGT yoluyla MGE aracılığıyla artış eğilimine hızlanarak devam etmektedir. Bu eğilime sahip bakteriler arasında karşılaşılan *E. coli* suşları kaynağı değişken (gıda ve klinik kaynaklı) olmakla birlikte örneklerden sıklıkla izole edilmektedir. Bu bağlamda gıda ve klinik kaynaklı farklı örneklerden izole edilen *E. coli* izolatları üzerinde çoklu direnç genlerinin tespitine yönelik PCR uygulaması ile gen tarama yapılmıştır. ESBL gen varyantları açısından 4 gen, sülfonamid direnci açısından 3 gen ve direnç genlerinin transferinde görev aldığı bilim dünyası tarafından düşünülen integronlar açısından 3 gen 3 farklı multipleks PCR uygulaması ile izolatlarda taranmıştır. Çalışma 3 gen grubunun kendine özgü koşullarda multipleks olarak taranması, *bla* genleri açısından D grubu OXA genininde literatürdeki çalışmalarda rastlanan A grubu genlerle aynı koşullarda taranması ve mevcut taramaya aynı PCR koşullarında rastlanmaması açısından literatürden farklılık göstermektedir. Farklılık sadece birlikte taranan genlerin PCR koşullarıyla sınırlı olmayıp taranan ampikon uzunlukları bakımından gözlenmektedir. Çalışmada taranan 3 grup verinin ikili ve üçlü pozitif korelasyonlarında verilmesi açısından literatüre sağlayacağı katkının önemli olduğu düşünülmekte olup üçlü korelasyon ilişki detayı önemlidir. Ayrıca çalışma iki ana kaynaktan elde edilen verileri karşılaştırarak olası MDR riskinin kaynaklar boyutlu karşılaştırılmasına olanak sağlaması açısından da önemlidir. Çalışma direnç geni transferlerinde sıklıkla bahsi geçen integronlarla direnç gen bağlantılarını iki farklı direnç grubu açısından değerlendirmesi bakımından önem ihtiva etmektedir.

Multipleks PCR ile kısa sürede moleküler temelli hızlı, hassas ve ekonomik olarak çalışmada kullanılan gen gruplarının birlikte uygulanacağı kitler oluşturularak ve araştırılan

gen sayısı artırılarak besin ve klinik örneklerinin taranması yapılabilir. Böylece gıda güvenliği tespiti hızlandırılacağı gibi klinik kaynaklı patojene uygun antimikrobiyalin kullanılması ile direnç yayılımının ve sağlık harcamalarının azalması sağlanabilir.

Çalışmamızda gerek gıda gerekse klinik örneklerde her üç grup üyesi genlere sahip izolat sayısı azımsanmayacak seviyede olup bu seviye gıdalarda daha yüksek seyretmiştir. Bu nedenle gıda kaynaklı MDR patojenitesinin yayılımının engellenmesi ve insan için virulent faktör olmaktan çıkarılması için gıda kaynağı hayvan ve hayvansal ürünlerin hazırlanması, saklanması ve tüketilmesi süreçlerine yönelik hijyen koşullarının önemi hakkında üreticilerin MDR yayılım tehditi konusunda bilgilendirilmesi önem arz etmektedir.

Literatüre eklenecek yeni çalışmalarda MDR'lerinin altında yatan moleküler temelin PCR ile taranmalarında elde edilen direnç genlerinin direnci fonksiyonel olarak gösterip göstermediğinin anlaşılması açısından antibiyotiklere verdikleri yanıtın fenotipik olarak taranması da önemli verilere ulaşılmasını sağlaması bakımından değerli olacaktır.

KAYNAKÇA

- [1] Tanwar, J., Das, S., Fatima, Z., & Hameed, S. (2014). "Multidrug resistance: an emerging crisis". *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2014: 2014:541340.
- [2] Tenover, F. C. (2006). "Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria". *The American journal of medicine*, 119(6), 3-10.
- [3] 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". *FEMS microbiology ecology*, 43(3), 325-335.
- [4] Chang, H. H., Cohen, T., Grad, Y. H., Hanage, W. P., O'Brien, T. F., & Lipsitch, M. (2015). "Origin and proliferation of multiple-drug resistance in bacterial pathogens". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 79(1), 101-116.
- [5] Leski, T. A., Vora, G. J., Barrows, B. R., Pimentel, G., House, B. L., Nicklasson, M., ... & Taitt, C. R. (2013). "Molecular characterization of multidrug resistant hospital isolates using the Antimicrobial Resistance Determinant Microarray". *PloS one*, 8(7), e69507.
- [6] Octavia, S. & Lan, R. (2014). "The Family *Enterobacteriaceae*". E. Rosenberg, E. F. DeLong, S. Lory, E. Stackebrandt & F. Thompson (Eds), *The Prokaryotes içinde* (pp. 225-286). Berlin, Heidelberg: Springer.
- [7] Cordier, J. L. (2006). "*Enterobacteriaceae*". Y. Motarjemi & M. Adams (Eds.) *Emerging Foodborne Pathogens* (pp. 450-475). Woodhead Publishing.
- [8] Halkman, H.B.D. & Halkman, A.K. (2014). "Indicator Organisms". C. A. Batt & M. L. Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*" (Second Edition) (pp. 358-363). Amsterdam: Academic Press.
- [9] Escherich T (1885), "Die Darmbakterien des Neugeborenen und Sauglinge", *Fortschr Med.*, 3, 515-522.
- [10] Escherich, T. (1988). "The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed Infant". *Clinical Infectious Diseases*, 10(6), 1220-1225.
- [11] Al-Helwany, Z., Alomar, A., Kseibi, B., & Keshe, M. (2017) "Studying and Determination of *Escherichia coli* from for Kinds of Food Samples are Fit for Human Consumption". *Food Science and Quality Management*, 63, 13-17.
- [12] Migula, W. (1895). "Bacteriaceae". Engler, A. & K. Prantl (Eds.), *Die Natürlichen Pflanzenfamilien Nebst Ihren Gattungen Und Wichtigeren Arten, Insbesondere Den Nutzpflanzen, Unter Mitwirkung Zahlreicher Hervorragender Fachgelehrten Begründet* (pp. 20-30). Leipzig, W. Engelmann: MBLWHOI Libraries.
- [13] Castellani, A. and Chalmers, A.J. (1919). "*Schizomycetes*". Bailliere, Tindall & Cox (Eds.). *A Manual of Tropical Medicine*, (3th Ed.) (pp.935-941). Londra: Smithsonian Libraries.

- [14] Jackson, D. D. (1911). "Classification of the *B. coli* Group". American Journal of Public Health, 1(12), 930-938.
- [15] Friedmann, H. C. (2006). "Escherich and *Escherichia*". Advances in applied microbiology, 60, 33-196.
- [16] Hassan, A.N. & Frank, J.F. (2011). "Microorganisms associated with milk". J. W., Fuquay (Ed.), Encyclopedia of Dairy Sciences (Second Edition) (pp. 447-457). Amsterdam: Akademik Press, Elsevier.
- [17] Scheutz, F., & Strockbine, N. A. (2015). "*Escherichia*". Prof. W. B., Whitman (Ed.) Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria içinde (pp.1-49). Wiley, Hoboken, New Jersey: Published by John Wiley & Sons, Inc., in association with Bergey's Manual Trust.
- [18] Mears, P. J., Koirala, S., Rao, C. V., Golding, I., & Chemla, Y. R. (2014). "*Escherichia coli* swimming is robust against variations in flagellar number". Elife, 3:e01916.
- [19] Clark, D. P. (1989). "The fermentation pathways of *Escherichia coli*", FEMS microbiology reviews, 5(3), 223-234.
- [20] Palmer, C., Bik, E. M., DiGiulio, D. B., Relman, D. A., & Brown, P. O. (2007). "Development of the human infant intestinal microbiota", PLoS biology, 5(7), e177, 1557-1573.
- [21] Secher, T., Brehin, C., & Oswald, E. (2016). "Early settlers: which *E. coli* strains do you not want at birth?", American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology, 311(1), G123-G129.
- [22] Friedman, E. S., Bittinger, K., Esipova, T. V., Hou, L., Chau, L., Jiang, J., Mesaros, C., Lund, P. J., Liang, X., FitzGerald, G. A., Goulian, M., Lee, D., Garcia, B. A., Blair, I. A., Vinogradov, S. A. & Wu, G. D. (2018). "Microbes vs. chemistry in the origin of the anaerobic gut lumen", Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(16), 4170-4175.
- [23] von Wulffen, J., RecogNice-Team, Sawodny, O., & Feuer, R. (2016). "Transition of an anaerobic *Escherichia coli* culture to aerobiosis: Balancing mRNA and protein levels in a demand-directed dynamic flux balance analysis", PLoS One, 11(7), e0158711.
- [24] Smith, M. W., & Neidhardt, F. C. (1983). "Proteins induced by anaerobiosis in *Escherichia coli*", Journal of bacteriology, 154(1), 336-343.
- [25] Kaleta, C., Schäuble, S., Rinas, U., & Schuster, S. (2013). "Metabolic costs of amino acid and protein production in *Escherichia coli*", Biotechnology journal, 8(9), 1105-1114.
- [26] Gunsalus, R. P., & Park, S.-J. (1994). "Aerobic-anaerobic gene regulation in *Escherichia coli*: control by the ArcAB and Fnr regulons". Research in Microbiology, 45(5-6), 437-450.

- [27] Lee, H., Popodi, E., Tang, H., & Foster, P. L. (2012). "Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(41), E2774-E2783.
- [28] Kator, H., & Rhodes, M. (2003). "Detection, enumeration and identification of environmental microorganisms of public health significance". D., Mara, & N. J., Horan (Eds.), *The handbook of water and wastewater microbiology* (pp.113-126). Amsterdam: Academic Press, Elsevier Inc.
- [29] Schaechter, M. (2009). "*Escherichia coli*". S. L., Baldauf (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology* (third Edition) (pp. 125-132). Amsterdam: Academic Press, Elsevier Inc.
- [30] Liu, D. (2014). "*Escherichia coli*". R., Mitchell, R., Bradshaw & L., McManus (Eds.), *Reference Module in Biomedical Sciences* (pp. 1-13). Amsterdam: Elsevier inc.
- [31] Scheutz F, Strockbine, N. A. And Genus I. (2005). "The Proteobacteria". Brenner D. J., Krieg N. R. & Staley J. T. (Eds.). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Second edition) (pp. 607-624), New York: Springer Inc.
- [32] Meier-Kolthoff, J. P., Hahnke, R. L., Petersen, J., Scheuner, C., Michael, V., Fiebig, A., Rohde, C., Rohde, M., Fartmann, B., Goodwin, L. A., Çertkov, O., Reddy, TBK., Pati, A., Ivanova, N. N., Markowitz, V., Kyrpides, N. C., Woyke, T., Göker, M. & Klenk, H. P. (2014). "Complete genome sequence of DSM 30083T, the type strain (U5/41T) of *Escherichia coli*, and a proposal for delineating subspecies in microbial taxonomy", *Standards in genomic sciences*, 9(1), 1-19.
- [33] Stokes, H. W., & Gillings, M. R. (2011). "Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens". *FEMS microbiology reviews*, 35(5), 790-819.
- [34] Poirel, L., Madec, J. Y., Lupo, A., Schink, A. K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). "Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*". *Microbiology Spectrum*, 6(4), 6-4.
- [35] Frazão, N., Sousa, A., Lässig, M., & Gordo, I. (2019). "Horizontal gene transfer overrides mutation in *Escherichia coli* colonizing the mammalian gut". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(36), 17906-17915.
- [36] Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). "The population genetics of commensal *Escherichia coli*". *Nature reviews microbiology*, 8(3), 207-217.
- [37] Jarocki, V. M., Reid, C. J., Chapman, T. A., & Djordjevic, S. P. (2020). "*Escherichia coli* ST302: genomic analysis of virulence potential and antimicrobial resistance mediated by mobile genetic elements". *Frontiers in microbiology*, 10, 3098.
- [38] Jung, D., Park, S., Ruffini, J., Dussault, F., Dufour, S., & Ronholm, J. (2021). "Comparative genomic analysis of *Escherichia coli* isolates from cases of bovine clinical mastitis identifies nine specific pathotype marker genes". *Microbial*

genomics, 7(7).

- [39] Horesh, G., Blackwell, G. A., Tonkin-Hill, G., Corander, J., Heinz, E., & Thomson, N. R. (2021). "A comprehensive and high-quality collection of *Escherichia coli* genomes and their genes". Microbial genomics, 7(2).
- [40] Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro, C., ... & Tauxe, R. V. (1999). "Food-related illness and death in the United States". Emerging infectious diseases, 5(5), 607-625.
- [41] Finlay, B. B., & Falkow, S. (1997). "Common themes in microbial pathogenicity Revisited". Microbiology and molecular biology reviews, 61(2), 136-169.
- [42] Kaas, R. S., Friis, C., Ussery, D. W., & Aarestrup, F. M. (2012). "Estimating variation within the genes and inferring the phylogeny of 186 sequenced diverse *Escherichia coli* genomes". BMC genomics, 13(1), 1-13.
- [43] Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). "Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*". Clinical microbiology reviews, 26(4), 822-880.
- [44] Chapman, T. A., Wu, X. Y., Barchia, I., Bettelheim, K. A., Driesen, S., Trott, D., ... & Chin, J. J. C. (2006). "Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine". Applied and environmental microbiology, 72(7), 4782-4795.
- [45] Harrington, S. M., Dudley, E. G., & Nataro, J. P. (2006). "Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection". FEMS microbiology letters, 254(1), 12-18.
- [46] Seed, P. C. (2020). "*Escherichia coli*". R. M., Kliegman, J. W., Geme, N. J., Blum, S. S., Shah, R. C., Tasker, & K. M., Wilson (Eds.), Nelson Textbook of Pediatrics (Chapter: 227, pp. 1511-1515). Amsterdam: Elsevier B.V.
- [47] Boisen, N., Krogfelt, K. A., & Nataro, J. P. (2013). "*Escherichia coli*: Chapter 8. Enteroaggregative *Escherichia coli*". M. S., Donnenberg (Ed.), *Escherichia coli* pathotypes and principles of pathogenesis (chapter 8). London, Waltham, San Diego: Academic Press (2nd edition) Elsevier Inc.
- [48] Hicks, S., Candy, D. C., & Phillips, A. D. (1996). "Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro". Infection and Immunity, 64(11), 4751-4760.
- [49] Czeizulin, J. R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M. H., ... & Nataro, J. P. (1997). "Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*". Infection and immunity, 65(10), 4135-4145.
- [50] Boisen, N., Struve, C., Scheutz, F., Krogfelt, K. A., & Nataro, J. P. (2008). "New

- adhesin of enteroaggregative *Escherichia coli* related to the Afa/Dr/AAF family". *Infection and immunity*, 76(7), 3281-3292.
- [51] Elias, W. P., Suzart, S., Trabulsi, L. R., Nataro, J. P., & Gomes, T. A. (1999). "Distribution of aggA and aafA gene sequences among *Escherichia coli* isolates with genotypic or phenotypic characteristics, or both, of enteroaggregative *E. coli*". *Journal of medical microbiology*, 48(6), 597-599.
- [52] Morin, N., Santiago, A. E., Ernst, R. K., Guillot, S. J., & Nataro, J. P. (2013). "Characterization of the AggR regulon in enteroaggregative *Escherichia coli*". *Infection and immunity*, 81(1), 122-132.
- [53] Orth, D., & Würzner, R. (2006). "What makes an enterohemorrhagic *Escherichia coli*?". *Clinical Infectious Diseases*, 43(9), 1168-1169.
- [54] Gomes, T. A., Elias, W. P., Scaletsky, I. C., Guth, B. E., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M., ... & Martinez, M. B. (2016). "Diarrheagenic *Escherichia coli*". *Brazilian journal of microbiology*, 47, 3-30.
- [55] Nguyen, Y., & Sperandio, V. (2012). "Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) Pathogenesis". *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2, 90.
- [56] Karch, H. (2001). "The role of virulence factors in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)-associated hemolytic-uremic syndrome". *Seminars in thrombosis and hemostasis* (pp. 207-214). New York: Thieme Medical Publishers, Inc.
- [57] Elliott, S. J., Wainwright, L. A., McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Deng, Y., Lai, L. C., ... & Kaper, J. B. (1998). "The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69". *Molecular microbiology*, 28(1), 1-4.
- [58] Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary Jr, J. C., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., ... & Besser, T. E. (2000). "Iha: a novel *Escherichia coli* O157: H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure". *Infection and immunity*, 68(3), 1400-1407.
- [59] Karch, H., Schubert, S., Zhang, D., Zhang, W., Schmidt, H., Olschlager, T., & Hacker, J. (1999). "A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages". *Infection and immunity*, 67(11), 5994-6001.
- [60] Melton-Celsa, A. R. (2014). "Shiga toxin (Stx) classification, structure, and Function". *Microbiology spectrum*, 2(4), 2-4.
- [61] Karmali, M. A. (2018). "Factors in the emergence of serious human infections associated with highly pathogenic strains of shiga toxin-producing *Escherichia coli*". *International Journal of Medical Microbiology*, 308(8), 1067-1072.
- [62] Zuppi, M., Tozzoli, R., Chiani, P., Quiros, P., Martinez-Velazquez, A., Michelacci, V.,

- ... & Morabito, S. (2020). "Investigation on the evolution of Shiga toxin-converting phages based on whole genome sequencing". *Frontiers in Microbiology*, 11:1472.
- [63] Brunder, W., Schmidt, H., Frosch, M., & Karch, H. (1999). "The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic Elements". *Microbiology*, 145(5), 1005-1014.
- [64] Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*". *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
- [65] Brunder, W., Schmidt, H., & Karch, H. (1996). "KatP, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7". *Microbiology*, 142(11), 3305-3315.
- [66] Brunder, W., Schmidt, H., & Karch, H. (1997). "EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 cleaves human coagulation factor V". *Molecular microbiology*, 24(4), 767-778.
- [67] Ewing, W. H., & Gravatt, J. L. (1947). "Shigella types encountered in the mediterranean area". *Journal of Bacteriology*, 53(2), 191-195.
- [68] Desmarchelier, P., & Fegan, N. (2011). "Pathogens in Milk | *Escherichia coli*". *Encyclopedia of Dairy Sciences*, 60–66.
- [69] Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*". *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140.
- [70] Pasqua, M., Michelacci, V., Di Martino, M. L., Tozzoli, R., Grossi, M., Colonna, B., ... & Prosseda, G. (2017). "The intriguing evolutionary journey of enteroinvasive *E. coli* (EIEC) toward pathogenicity". *Frontiers in microbiology*, 8, 2390.
- [71] Guth, B. E. C. (2000). "Enterotoxigenic *Escherichia coli*-an overview". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 95-97.
- [72] Qadri, F., Svennerholm, A. M., Faruque, A. S. G., & Sack, R. B. (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews*, 18(3), 465-483.
- [73] Torres, A. G. (2009). "Intestinal Pathogenic *Escherichia coli*". *Vaccines for biodefense and emerging and neglected diseases* (pp. 1013-1029). Amsterdam: Elsevier Inc.
- [74] Lothigius, Å., Sjöling, Å., Svennerholm, A. M., & Bölin, I. (2010). "Survival and gene expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* during long-term incubation in sea water and freshwater". *Journal of applied microbiology*, 108(4), 1441-1449.
- [75] Begum, Y. A., Talukder, K. A., Nair, G. B., Qadri, F., Sack, R. B., & Svennerholm, A. M. (2005). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from surface water in urban and rural areas of Bangladesh". *Journal of clinical microbiology*, 43(7), 3582-3583.

- [76] MacDonald, E., Møller, K. E., Wester, A. L., Dahle, U. R., Hermansen, N. O., Jenum, P. A., ... & Vold, L. (2015). "An outbreak of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infection in Norway, 2012: a reminder to consider uncommon pathogens in outbreaks involving imported products". *Epidemiology & Infection*, 143(3), 486-493.
- [77] Elsinghorst, E. A., & Weitz, J. A. (1994). "Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein". *Infection and immunity*, 62(8), 3463-3471.
- [78] Mortezaei, N., Epler, C. R., Shao, P. P., Shirdel, M., Singh, B., McVeigh, A., ... & Bullitt, E. (2015). "Structure and function of enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbriae from differing assembly pathways". *Molecular microbiology*, 95(1), 116-126.
- [79] Oyofe, B. A., El-Etr, S. H., Wasfy, M. O., Peruski, L., Kay, B., Mansour, M., ... & Murphy, J. R. (1995). Colonization factors of enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) from residents of northern Egypt. *Microbiological research*, 150(4), 429-436.
- [80] Gastra, W., & Svennerholm, A. M. (1996). "Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC)". *Trends in microbiology*, 4(11), 444-452.
- [81] Vidal, R. M., Muhsen, K., Tennant, S. M., Svennerholm, A. M., Sow, S. O., Sur, D., ... & Levine, M. M. (2019). "Colonization factors among enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from children with moderate-to-severe diarrhea and from matched controls in the Global Enteric Multicenter Study (GEMS)". *PLoS neglected tropical diseases*, 13(1), e0007037.
- [82] Gonzales-Siles, L., & Sjöling, Å. (2016). "The different ecological niches of enterotoxigenic *Escherichia coli*". *Environmental microbiology*, 18(3), 741-751.
- [83] So, M., Dallas, W. S., & Falkow, S. (1978). "Characterization of an *Escherichia coli* plasmid encoding for synthesis of heat-labile toxin: molecular cloning of the toxin determinant". *Infection and immunity*, 21(2), 405-411.
- [84] Fleckenstein, J. M., Hardwidge, P. R., Munson, G. P., Rasko, D. A., Sommerfelt, H., & Steinsland, H. (2010). "Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* Infection". *Microbes and infection*, 12(2), 89-98.
- [85] Levine, M. M., & Edelman, R. (1984). "Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis". *Epidemiologic reviews*, 6, 31-51.
- [86] Senerwa, D., Olsvik, O., Mutanda, L. N., Lindqvist, K. J., Gathuma, J. M., Fossum, K., & Wachsmuth, K. (1989). "Enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O111: HNT isolated from preterm neonates in Nairobi, Kenya". *Journal of clinical microbiology*, 27(6), 1307-1311.
- [87] Levine, M. M., Kaper, J. B., Black, R. E., & Clements, M. L. (1983). "New knowledge on pathogenesis of bacterial enteric infections as applied to vaccine development". *Microbiological reviews*, 47(4), 510-550.

- [88] Bray, J. (1945). "Isolation of Antigenically Homogeneous Strains of *Bact. coli neapolitanum* from Summer Diarrhoea of Infants". *Journal of Pathology and Bacteriology*, 57(2), 239-47.
- [89] Nakamura, B., Tochiara, K., Kimura, M., Morita, K., Sakanoue, M., Imi, S., ... & Yamada, K. (1960). Epidemiological and clinical studies about enteropathogenic *Escherichia coli*. *Pediatrics International*, 3(1), 12-26.
- [90] Lee, DW, Gwack, J. ve Youn, SK (2012). Lee, D. W., Gwack, J., & Youn, S. K. (2012). "Enteropathogenic *Escherichia coli* outbreak and its incubation period: is it short or long?". *Osong Public Health and Research Perspectives*, 3(1), 43-47.
- [91] Hernandez, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A., & Gomes, T. A. (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 297(2), 137-149.
- [92] Hales, B. A., Hart, C. A., Batt, R. M., & Saunders, J. R. (1992). "The large plasmids found in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* constitute a related series of transfer-defective Inc F-IIA replicons". *Plasmid*, 28(3), 183-193.
- [93] Baldini, M. M., Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1986). "Localization of a determinant for HEp-2 adherence by enteropathogenic *Escherichia coli*". *Infection and immunity*, 52(1), 334-336.
- [94] Tobe, T., Hayashi, T., Han, C. G., Schoolnik, G. K., Ohtsubo, E., & Sasakawa, C. (1999). "Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid". *Infection and Immunity*, 67(10), 5455-5462.
- [95] Stone, K. D., Zhang, H. Z., Carlson, L. K., & Donnenberg, M. S. (1996). "A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus". *Molecular microbiology*, 20(2), 325-337.
- [96] Teixeira, N. B., Rojas, T. C., da Silveira, W. D., Matheus-Guimarães, C., Silva, N. P., & Scaletsky, I. C. (2015). "Genetic analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor (EAF) plasmid reveals a new deletion within the EAF probe sequence among O119 typical EPEC strains". *BMC microbiology*, 15(1), 1-9.
- [97] Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A., & Finlay, B. B. (1997). "Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells". *Cell*, 91(4), 511-520.
- [98] Kalman, D., Weiner, O. D., Goosney, D. L., Sedat, J. W., Finlay, B. B., Abo, A. & Bishop, J. M. (1999). "Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals". *Nature cell biology*, 1(6), 389-391.
- [99] Trabulsi, L. R., Keller, R., & Gomes, T. A. T. (2002). "Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*". *Emerging infectious diseases*, 8(5), 508.
- [100] Levine, M. M., Nataro, J. P., Karch, H., Baldini, M. M., Kaper, J. B., Black, R. E., ...

- & O'Brien, A. D. (1985). "The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor". *Journal of Infectious Diseases*, 152(3), 550-559.
- [101] Bradley, D. E., Finlayson, M., & March, S. (1988). "Presence of type I-like fimbriae and thin filaments on diarrhoeagenic *Escherichia coli*". *FEMS microbiology letters*, 52(1-2), 139-143.
- [102] Girón, J. A., Ho, A. S., & Schoolnik, G. K. (1993). Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 175(22), 7391-7403.
- [103] Donnenberg, M. S., Calderwood, S. B., Donohue-Rolfe, A., Keusch, G. T., & Kaper, J. B. (1990). "Construction and analysis of TnphoA mutants of enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEp-2 cells". *Infection and Immunity*, 58(6), 1565-1571.
- [104] Boudeau, J., Glasser, A. L., Masseret, E., Joly, B., & Darfeuille-Michaud, A. (1999). "Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease". *Infection and immunity*, 67(9), 4499-4509.
- [105] Darfeuille-Michaud, A., Neut, C., Barnich, N., Lederman, E., Di Martino, P., Desreumaux, P., ... & Colombel, J. F. (1998). "Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease". *Gastroenterology*, 115(6), 1405-1413.
- [106] Lai, X. H., Xu, J. G., Melgar, S., & Uhlin, B. E. (1999). "An apoptotic response by J774 macrophage cells is common upon infection with diarrheagenic *Escherichia coli*". *FEMS microbiology letters*, 172(1), 29-34.
- [107] Glasser, A. L., Boudeau, J., Barnich, N., Perruchot, M. H., Colombel, J. F., & Darfeuille-Michaud, A. (2001). "Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without inducing host cell death". *Infection and immunity*, 69(9), 5529-5537.
- [108] Martinez-Medina, M., Mora, A., Blanco, M., López, C., Alonso, M. P., Bonacorsi, S., ... & Blanco, J. (2009). "Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains". *Journal of clinical microbiology*, 47(12), 3968-3979.
- [109] Sokurenko, E. V., Chesnokova, V., Doyle, R. J., & Hasty, D. L. (1997). "Diversity of the *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin: differential binding to mannosides and uroepithelial cells". *Journal of Biological Chemistry*, 272(28), 17880-17886.
- [110] Barnich, N., Boudeau, J., Claret, L., & Darfeuille-Michaud, A. (2003). "Regulatory and functional co-operation of flagella and type 1 pili in adhesive and invasive abilities of AIEC strain LF82 isolated from a patient with Crohn's disease". *Molecular microbiology*, 48(3), 781-794.

- [111] Chassaing, B., Rolhion, N., De Vallée, A., Sa'ad, Y. S., Prorok-Hamon, M., Neut, C., ... & Darfeuille-Michaud, A. (2011). "Crohn disease-associated adherent-invasive *E. coli* bacteria target mouse and human Peyer's patches via long polar fimbriae". The Journal of clinical investigation, 121(3), 966-975.
- [112] Meconi, S., Vercellone, A., Levillain, F., Payré, B., Al Saati, T., Capilla, F., ... & Altare, F. (2007). "Adherent-invasive *Escherichia coli* isolated from Crohn's disease patients induce granulomas in vitro". Cellular microbiology, 9(5), 1252-1261.
- [113] Saitz, W., Montero, D. A., Pardo, M., Araya, D., De la Fuente, M., Hermoso, M. A., ... & Vidal, R. M. (2022). "Characterization of Adherent-Invasive *Escherichia coli* (AIEC) Outer Membrane Proteins Provides Potential Molecular Markers to Screen Putative AIEC Strains". International Journal of Molecular Sciences, 23(16), 9005.
- [114] Dogan, B., Suzuki, H., Herlekar, D., Sartor, R. B., Campbell, B. J., Roberts, C. L., ... & Simpson, K. W. (2014). "Inflammation-associated adherent-invasive *Escherichia coli* are enriched in pathways for use of propanediol and iron and M-cell translocation". Inflammatory bowel diseases, 20(11), 1919-1932.
- [115] Cieza, R. J., Hu, J., Ross, B. N., Sbrana, E., & Torres, A. G. (2015). "The IbeA invasin of adherent-invasive *Escherichia coli* mediates interaction with intestinal epithelia and macrophages". Infection and immunity, 83(5), 1904-1918.
- [116] Abdelhalim, K. A., Uzel, A., & Ünal, N. G. (2020). "The role of major virulence factors and pathogenicity of adherent-invasive *Escherichia coli* in patients with Crohn's disease". Gastroenterology Review/Przegląd Gastroenterologiczny, 15(4), 279-288.
- [117] Gibold, L., Garenaux, E., Dalmasso, G., Gallucci, C., Cia, D., Mottet-Auselo, B., ... & Delmas, J. (2016). "The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*". Cellular Microbiology, 18(5), 617-631.
- [118] Tanimoto, Y., Tamai, S., Matsuzaki, T., Takeuchi, N., Noju, T., Yanagida, S., ... & Nishikawa, Y. (2019). "Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from healthy carriers suppress cytokine secretions of epithelial cells stimulated by inflammatory substances". Infection and immunity, 87(1), e00683-18.
- [119] Le Bouguénec, C., & Servin, A. L. (2006). "Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens". FEMS microbiology letters, 256(2), 185-194.
- [120] Servin, A. L. (2014). "Pathogenesis of human diffusely adhering *Escherichia coli* expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): current insights and future challenges". Clinical microbiology reviews, 27(4), 823-869.
- [121] Abbasi, P., Kargar, M., Doosti, A., Mardaneh, J., Ghorbani-Dalini, S., & Dehyadegari, M. A. (2017). "Molecular detection of diffusely adherent *Escherichia coli* strains associated with diarrhea in Shiraz, Iran". Archives of Pediatric Infectious Diseases, 5(2).

- [122] Mansan-Almeida, R., Pereira, A. L., & Giugliano, L. G. (2013). Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC microbiology*, 13(1), 1-14.
- [123] Servin, A. L. (2005). "Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*". *Clinical microbiology reviews*, 18(2), 264-292.
- [124] Turniak, M., & Sobieszczanska, B. (2019). "Diffusely Adhering *Escherichia coli*/*Escherichia coli* O Rozsianym Typie Adhezji". J. Bielecki (Ed.), *Advancements of Microbiology* (Vol.58, No.2, pp.143-152). New York: Exeley Inc.
- [125] Cabrera-Sosa, L., & Ochoa, T. J. (2020). "*Escherichia coli* diarrhea". E. T. Ryan, Hill D. R., Solomon T., & Aronson N. (Eds), *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (pp. 481-485). Amsterdam: Elsevier inc.
- [126] Meza-Segura, M., & Estrada-Garcia, T. (2016). "Diffusely adherent *Escherichia coli*". A. G. Torres (Ed), *Escherichia coli in the Americas* (pp. 125-147). New York: Springer Cham.
- [127] Javadi, K., Mohebi, S., Motamedifar, M., & Hadi, N. (2020). "Characterization and antibiotic resistance pattern of diffusely adherent *Escherichia coli* (DAEC), isolated from paediatric diarrhoea in Shiraz, southern Iran". P., Schlagenhauf-Lawlor (Ed.), *New Microbes and New Infections* (Vol: 38, Article No:100780). Amsterdam: Elsevier Ltd.
- [128] Pitout, J. D. (2012). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance". *Frontiers in microbiology*, 3, 9.
- [129] Manges, A. R., Geum, H. M., Guo, A., Edens, T. J., Fibke, C. D., & Pitout, J. D. (2019). "Global extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages". *Clinical microbiology reviews*, 32(3), e00135-18.
- [130] Riley, L. W. (2014). "Pandemic lineages of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*". *Clinical Microbiology and Infection*, 20(5), 380-390.
- [131] World Health Organization. (2018). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2017-2018 (who-279656). Geneva: World Health Organization.
- [132] Foxman, B. (2010). "The epidemiology of urinary tract infection". *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653-660.
- [133] Walters, M. S., & Mobley, H. L. (2009). "Identification of uropathogenic *Escherichia coli* surface proteins by shotgun proteomics". *Journal of microbiological methods*, 78(2), 131-135.
- [134] Spurbeck, R. R., Stapleton, A. E., Johnson, J. R., Walk, S. T., Hooton, T. M., & Mobley, H. L. (2011). "Fimbrial profiles predict virulence of uropathogenic *Escherichia coli* strains: contribution of ygi and yad fimbriae". *Infection and immunity*, 79(12), 4753-4763.

- [135] Agarwal, J., Srivastava, S., & Singh, M. (2012). "Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*". Indian journal of medical microbiology, 30(2), 141-149.
- [136] Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). "Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage". International journal of nephrology, 2012, 681473.
- [137] Jahandeh, N., Ranjbar, R., Behzadi, P., & Behzadi, E. (2015). "Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: invaluable approaches for designing DNA microarray probes". Central European journal of urology, 68(4), 452.
- [138] Bien, L., Kerenyi, M., & Nagy, G. (2003). "Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*". International journal of antimicrobial agents, 22, 29-33.
- [139] Behzadi, P. (2018). "Uropathogenic *Escherichia coli* and fimbrial adhesins Virulome". T., Jarzembowski, A. Daga, & M. A. Dębska-Ślizień (Eds.) Urinary Tract Infection: The Result of the Strength of the Pathogen, or the Weakness of the Host (pp. 65-83). Croatia: InTechOpen.
- [140] Mulvey, M. A. (2002). "Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*". Cellular microbiology, 4(5), 257-271.
- [141] Ong, C. L. Y., Ulett, G. C., Mabbett, A. N., Beatson, S. A., Webb, R. I., Monaghan, W., ... & Schembri, M. A. (2008). "Identification of type 3 fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation". Journal of bacteriology, 190(3), 1054-1063.
- [142] Wurpel, D. J., Beatson, S. A., Totsika, M., Petty, N. K., & Schembri, M. A. (2013). "Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*". PloS one, 8(1), e52835.
- [143] Khan, A. S., Kniep, B., Oelschlaeger, T. A., Van Die, I., Korhonen, T., & Hacker, J. (2000). "Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*". Infection and immunity, 68(6), 3541-3547.
- [144] Balsalobre, C., Morschhäuser, J., Jass, J., Hacker, J., & Uhlin, B. E. (2003). "Transcriptional analysis of the *sfa* determinant revealing multiple mRNA processing events in the biogenesis of S fimbriae in pathogenic *Escherichia coli*". Journal of bacteriology, 185(2), 620-629.
- [145] Ott, M., Hoschützky, H., Jann, K., Van Die, I., & Hacker, J. (1988). "Gene clusters for S fimbrial adhesin (*sfa*) and F1C fimbriae (*foc*) of *Escherichia coli*: comparative aspects of structure and function". Journal of bacteriology, 170(9), 3983-3990.
- [146] Zamani, H., & Salehzadeh, A. (2018). "Biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*: association with adhesion factor genes". Turkish journal of medical sciences, 48(1), 162-167.
- [147] Lane, M. C., & Mobley, H. L. T. (2007). "Role of P-fimbrial-mediated adherence in

pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney”. *Kidney international*, 72(1), 19-25.

- [148] Ulett, G. C., Mabbett, A. N., Fung, K. C., Webb, R. I., & Schembri, M. A. (2007). “The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm Formation”. *Microbiology*, 153(7), 2321-2331.
- [149] Wurpel, D. J., Totsika, M., Allsopp, L. P., Hartley-Tassell, L. E., Day, C. J., Peters, K. M., ... & Schembri, M. A. (2014). “F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* are expressed at low temperature and recognise Gal β 1-3GlcNAc-containing glycans”. *PloS one*, 9(3), e93177.
- [150] Behzadi, P. (2020). “Classical chaperone-usher (CU) adhesive fimbriome: uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and urinary tract infections (UTIs)”. *Folia microbiologica*, 65(1), 45-65.
- [151] Werneburg, G. T., & Thanassi, D. G. (2018). “Pili assembled by the chaperone/usher pathway in *Escherichia coli* and Salmonella”. *EcoSal Plus*, 8(1).
- [152] Luna-Pineda, V. M., Moreno-Fierros, L., Cázares-Domínguez, V., Ilhuicatz-Alvarado, D., Ochoa, S. A., Cruz-Córdova, A., ... & Xicohtencatl-Cortes, J. (2019). “Curli of uropathogenic *Escherichia coli* enhance urinary tract colonization as a fitness factor”. *Frontiers in microbiology*, 10, 2063.
- [153] Sarkar, S., Ulett, G. C., Totsika, M., Phan, M. D., & Schembri, M. A. (2014). “Role of capsule and O antigen in the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*”. *PloS one*, 9(4), e94786.
- [154] Goller, C. C., & Seed, P. C. (2010). “Revisiting the *Escherichia coli* polysaccharide capsule as a virulence factor during urinary tract infection: contribution to intracellular biofilm development”. *Virulence*, 1(4), 333-337.
- [155] Etefia, E. (2021). “Virulence Factors of Uropathogenic *Escherichia coli*”. Dr. M. Starčič Erjavec (Ed.), *Escherichia coli - Old and New Insights*. Londra: IntechOpen Limited.
- [156] Aguiniga, L. M., Yaggie, R. E., Schaeffer, A. J., & Klumpp, D. J. (2016). Lipopolysaccharide domains modulate urovirulence. *Infection and immunity*, 84(11), 3131-3140.
- [157] Terlizzi, M. E., Gribaudo, G., & Maffei, M. E. (2017). “UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies”. *Frontiers in microbiology*, 8, 1566.
- [158] Conceição, R. A., Ludovico, M. S., Andrade, C. G. T. J., & Yano, T. (2012). “Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture”. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45, 417-424.

- [159] Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). "Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports". *Gut pathogens*, 11(1), 1-16.
- [160] Lemaître, C., Bidet, P., Benoist, J. F., Schlemmer, D., Sobral, E., d'Humières, C., & Bonacorsi, S. (2014). "The *ssbL* gene harbored by the ColV plasmid of an *Escherichia coli* neonatal meningitis strain is an auxiliary virulence factor boosting the production of siderophores through the shikimate pathway". *Journal of bacteriology*, 196(7), 1343-1349.
- [161] Bonacorsi, S., & Bingen, E. (2005). "Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis". *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7), 373-381.
- [162] Mellata, M., Johnson, J. R., & Curtiss III, R. (2018). "*Escherichia coli* isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections". *Zoonoses and public health*, 65(1), 103-113.
- [163] Dziva, F., & Stevens, M. P. (2008). "Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts". *Avian Pathology*, 37(4), 355-366.
- [164] Kathayat, D., Lokesh, D., Ranjit, S., & Rajashekara, G. (2021). "Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC): an overview of virulence and pathogenesis factors, zoonotic potential, and control strategies". *Pathogens*, 10(4), 467.
- [165] Janßen, T., Schwarz, C., Preikschat, P., Voss, M., Philipp, H. C., & Wieler, L. H. (2001). "Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis". *International Journal of Medical Microbiology*, 291(5), 371-378.
- [166] Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kießling, S., Alt, K., Antão, E. M., ... & Wieler, L. H. (2007). "Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they?". *International journal of medical microbiology*, 297(3), 163-176.
- [167] Yerushalmi, Z., Smorodinsky, N. I., Naveh, M. W., & Ron, E. Z. (1990). "Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78". *Infection and immunity*, 58(4), 1129-1131.
- [168] Lymberopoulos, M. H., Houle, S., Daigle, F., Léveillé, S., Brée, A., Moulin-Schouleur, M., ... & Dozois, C. M. (2006). "Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78: K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract". *Journal of bacteriology*, 188(18), 6449-6459.
- [169] Aleksandrowicz, A., Khan, M. M., Sidorczyk, K., Noszka, M., & Kolenda, R. (2021). "Whatever makes them stick—Adhesins of avian pathogenic *Escherichia coli*". B., Sawatsky (Ed.), *Veterinary Microbiology* (Vol: 257, Article No:109095). Amsterdam:

Elsevier BV.

- [170] Stacy, A. K., Mitchell, N. M., Maddux, J. T., De la Cruz, M. A., Duran, L., Giron, J. A., & Mellata, M. (2014). "Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among avian pathogenic *E. coli* and its role in Virulence". PLoS one, 9(1), e86565.
- [171] Antão, E. M., Ewers, C., Gürlebeck, D., Preisinger, R., Homeier, T., Li, G., & Wieler, L. H. (2009). "Signature-tagged mutagenesis in a chicken infection model leads to the identification of a novel avian pathogenic *Escherichia coli* fimbrial adhesin". PLoS One, 4(11), e7796.
- [172] Dziva, F., Hauser, H., Connor, T. R., van Diemen, P. M., Prescott, G., Langridge, G. C., ... & Stevens, M. P. (2013). "Sequencing and functional annotation of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O78 strains reveal the evolution of *E. coli* lineages pathogenic for poultry via distinct mechanisms". Infection and immunity, 81(3), 838-849.
- [173] Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). "Antibiotics: past, present and future". Current opinion in microbiology, 51, 72-80.
- [174] Gould, K. (2016). "Antibiotics: from prehistory to the present day". Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 71(3), 572-575.
- [175] Harrison, F., Roberts, A. E., Gabriliska, R., Rumbaugh, K. P., Lee, C., & Diggle, S. P. (2015). "A 1,000-year-old antimicrobial remedy with antistaphylococcal Activity". MBio, 6(4), e01129-15.
- [176] James, R. (2011). "Infection prevention and control and the role of medical textiles". V.T., Bartels (Ed.), Handbook of Medical Textiles (pp. 297-315). Cambridge: Woodhead Publishing.
- [177] Aminov, R. I. (2010). "A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future". Frontiers in microbiology, 1, 134.
- [178] American Chemical Society (2005). Selman Waksman and Antibiotics, May24, 2005: A National Historic Chemical Landmark (commemorative booklet). Washington: American Chemical Society.
- [179] Yang, Q., Gao, Y., Ke, J., Show, P. L., Ge, Y., Liu, Y., ... & Chen, J. (2021). "Antibiotics: an overview on the environmental occurrence, toxicity, degradation, and removal methods". Bioengineered, 12(1), 7376-7416.
- [180] Etebu, E., & Ariekpar, I. (2016). "Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives". Int J Appl Microbiol Biotechnol Res, 4(2016), 90-101.
- [181] Calderon, C. B. & Sabundayo, B. P. (2007). "Antimicrobial classifications: Drugs for Bugs". R., Schwalbe, L., Steele-Moore. & A. C., Goodwin (Eds). Antimicrobial

susceptibility testing protocols (pp. 7–52). Florida: CRC Press, LLC, Taylor and Frances group.

- [182] Reygaert, W. C. (2018). “An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria”. *AIMS microbiology*, 4(3), 482.
- [183] Nathwani, D. & Wood, M. J. (1993). “Penicillins. A current review of their clinical pharmacology and therapeutic use”. *Drugs*, 45(6), 866-894.
- [184] Castle, S. S. (2007). “Penicillins”. S. J., Enna & D. B., Bylund (Eds.), *xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* (pp.1-3). Amsterdam: Elsevier Inc.
- [185] Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). “Mechanisms of antibioticResistance”. *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, 481-511.
- [186] Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2013). “Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?”. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 185-230.
- [187] Liu, Y. F., Yan, J. J., Lei, H. Y., Teng, C. H., Wang, M. C., Tseng, C. C., & Wu, J. J. (2012). “Loss of outer membrane protein C in *Escherichia coli* contributes to both antibiotic resistance and escaping antibody-dependent bactericidal activity”. *Infection and Immunity*, 80(5), 1815-1822.
- [188] Martinez, J. L., Sánchez, M. B., Martínez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A., & Alvarez-Ortega, C. (2009). “Functional role of Bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems”. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 430-449.
- [189] Zapun, A., Contreras-Martel, C., & Vernet, T. (2008). “Penicillin-binding proteins and β -lactam resistance”. *FEMS microbiology reviews*, 32(2), 361-385.
- [190] Laible, G., Spratt, B. G., & Hakenbeck, R. (1991). “Interspecies recombinational events during the evolution of altered PBP 2x genes in penicillin-resistant clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*”. *Molecular microbiology*, 5(8), 1993-2002.
- [191] Dougherty, T. J., Koller, A. E., & Tomasz, A. (1980). “Penicillin-binding proteins of penicillin-susceptible and intrinsically resistant *Neisseria gonorrhoeae*”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 18(5), 730-737.
- [192] Fontana, R., Grossato, A., Rossi, L., Cheng, Y. R., & Satta, G. (1985). “Transition from resistance to hypersusceptibility to beta-lactam antibiotics associated with loss of a low-affinity penicillin-binding protein in a *Streptococcus faecium* mutant highly resistant to penicillin”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28(5), 678-683.
- [193] Raze, D., Dardenne, O., Hallut, S., Martinez-Bueno, M., Coyette, J., & Ghuysen, J. M. (1998). “The gene encoding the low-affinity penicillin-binding protein 3r in *Enterococcus hirae* S185R is borne on a plasmid carrying other antibiotic resistance Determinants”. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(3), 534-539.

- [194] Bo, G. (2000). "Giuseppe Brotzu and the discovery of cephalosporins". *Clinical microbiology and infection*, 6 (Ek-3), 6-8.
- [195] Lepak, A. J. ve Andes D. R. (2020). "Cephalosporins". J. E. Bennett, R. Dolin & M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (ss. 268-284). Philadelphia: Elsevier Inc.
- [196] Bui, T. & Preuss, C.V. (2022). "Cephalosporins". E. Hughes & G. Rubio (Eds.) *Statpearls*. İnternet: StatPearls Publishing. Erişim adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430685/>; Erişim adresi: 14.01.2023.
- [197] Livermore, D. M. (1987). "Mechanisms of resistance to cephalosporin Antibiotics". *Drugs*, 34(2), 64-88.
- [198] Kahan, J. S., Kahan, F. M., Goegelman, R., Currie, S. A., Jackson, M., Stapley, E. O., ... & Birnbaum, J. (1979). "Thienamycin, a new β -lactam antibiotic I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties". *The Journal of antibiotics*, 32(1), 1-12.
- [199] Kropp, H., Gerckens, L., Sundelof, J. G., & Kahan, F. M. (1985). "Antibacterial activity of imipenem: the first thienamycin antibiotic". *Reviews of infectious diseases*, 7(Ek-3), 389-410.
- [200] Ratcliffe, R. W., Wildonger, K. J., Di Michele, L., Douglas, A. W., Hajdu, R., Goegelman, R. T., ... & Hirshfield, J. (1989). "Studies on the structures of imipenem, dehydropeptidase I-hydrolyzed imipenem, and related analogs". *The Journal of Organic Chemistry*, 54(3), 653-660.
- [201] Bassetti, M., Nicolini, L., Esposito, S., Righi, E., & Viscoli, C. (2009). "Current status of newer carbapenems". *Current medicinal chemistry*, 16(5), 564-575.
- [202] Papp-Wallace, K. M., Endimiani, A., Taracila, M. A., & Bonomo, R. A. (2011). "Carbapenems: past, present, and future". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(11), 4943-4960.
- [203] Bush, K., & Bradford, P. A. (2016). " β -Lactams and β -lactamase inhibitors: an Overview". *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(8), a025247.
- [204] Yang, Y., Bhachech, N., & Bush, K. (1995). "Biochemical comparison of imipenem, meropenem and biapenem: permeability, binding to penicillin-binding proteins, and stability to hydrolysis by β -lactamases". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 35(1), 75-84.
- [205] Sumita, Y., & Fakasawa, M. (1995). "Potent activity of meropenem against *Escherichia coli* arising from its simultaneous binding to penicillin-binding proteins 2 and 3". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 36(1), 53-64.
- [206] Lohans, C. T., Freeman, E. I., Groesen, E. V., Tooke, C. L., Hinchliffe, P., Spencer, J., ... & Schofield, C. J. (2019). "Mechanistic insights into β -lactamase-catalysed carbapenem degradation through product characterisation". *Scientific reports*, 9(1), 1-9.

- [207] Riera, E., Cabot, G., Mulet, X., García-Castillo, M., del Campo, R., Juan, C., ... & Oliver, A. (2011). “*Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem”. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(9), 2022-2027.
- [208] Oteo, J., Delgado-Iribarren, A., Vega, D., Bautista, V., Rodríguez, M. C., Velasco, M., ... & Campos, J. (2008). “Emergence of imipenem resistance in clinical *Escherichia coli* during therapy”. *International journal of antimicrobial agents*, 32(6), 534-537.
- [209] Atzori, A., Mallocci, G., Cardamone, F., Bosin, A., Vargiu, A. V., & Ruggerone, P. (2020). “Molecular interactions of carbapenem antibiotics with the multidrug efflux transporter AcrB of *Escherichia coli*”. *International journal of molecular sciences*, 21(3), 860.
- [210] Zihra-Zarifi, I., Llanes, C., Köhler, T., Pechere, J. C., & Plesiat, P. (1999). “In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM”. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(2), 287-291.
- [211] Aoki, H., Sakai, H. I., Kohsaka, M., Konomi, T., Hosoda, J., Kubochi, Y., ... & Imanaka, H. (1976). “Nocardicin A, a new monocyclic β -lactam Antibiotic I. Discovery, isolation and characterization”. *The Journal of antibiotics*, 29(5), 492-500.
- [212] Neu, H. C. (1986). “ β -Lactam antibiotics: structural relationships affecting in vitro activity and pharmacologic properties”. *Reviews of infectious diseases*, 8(Ek-3), 237-259.
- [213] Sykes, R. B., & Bonner, D. P. (1985). “Discovery and development of the Monobactams”. *Reviews of Infectious Diseases*, 7(Ek-4), 579-593.
- [214] Sykes, R. B., & Matthew, M. (1976). “The β -lactamases of Gram-negative bacteria and their rôle in resistance to β -lactam antibiotics”. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2(2), 115-57.
- [215] Soriano, F., & Ponte, M. C. (1984). “Comparative activities of aztreonam and cefotaxime against *Escherichia coli* and *Bacteroides* spp. in pure and mixed cultures”. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 26(1), 39-41.
- [216] Griffith, R. S. (1981). “Introduction to vancomycin”. *Reviews of infectious diseases*, 3(Ek-2), 200-204.
- [217] Moellering Jr, R. C. (2006). “Vancomycin: a 50-year reassessment”. *Clinical Infectious Diseases*, 42(Ek-1), 3-4.
- [218] Rubinstein, E., & Keynan, Y. (2014). “Vancomycin revisited—60 years Later”. *Frontiers in public health*, 2, 217.
- [219] Trautmann, M., Oethinger, M., Marre, R., Wiedeck, H., & Ruhnke, M. (1994). “Teicoplanin: 10 years of clinical experience”. *Infection*, 22(6), 430-436.

- [220] Zhanel, G. G., Calic, D., Schweizer, F., Zelenitsky, S., Adam, H., Lagacé-Wiens, P. R., ... & Karlowsky, J. A. (2010). "New lipoglycopeptides". *Drugs*, 70(7), 859-886.
- [221] Beauregard, D. A., Williams, D. H., Gwynn, M. N., & Knowles, D. J. (1995). "Dimerization and membrane anchors in extracellular targeting of vancomycin group antibiotics". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39(3), 781-785.
- [222] Allen, N. E., LeTourneau, D. L., Hobbs Jr, J. N., & Thompson, R. C. (2002). "Hexapeptide derivatives of glycopeptide antibiotics: tools for mechanism of action Studies". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(8), 2344-2348.
- [223] Karlowsky, J. A., Nichol, K., & Zhanel, G. G. (2015). "Telavancin: mechanisms of action, in vitro activity, and mechanisms of resistance". *Clinical Infectious Diseases*, 61(Ek-2), 58-68.
- [224] Leclercq, R., Derlot, E., Duval, J., & Courvalin, P. (1988). "Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*". *New England Journal of Medicine*, 319(3), 157-161.
- [225] Pootoolal, J., Neu, J., & Wright, G. D. (2002). "Glycopeptide antibiotic Resistance". *Annual review of pharmacology and toxicology*, 42, 381.
- [226] Courvalin, P. (2006). "Vancomycin resistance in gram-positive cocci". *Clinical infectious diseases*, 42(Ek-1), 25-34.
- [227] Miller, W. R., Bayer, A. S., & Arias, C. A. (2016). "Mechanism of action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and enterococci". *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(11), a026997.
- [228] Baltz, R. H., Miao, V., & Wrigley, S. K. (2005). "Natural products to drugs: daptomycin and related lipopeptide antibiotics". *Natural product reports*, 22(6), 717-741.
- [229] Konai, M. M., Adhikary, U., & Haldar, J. (2017). "Design and Solution-Phase Synthesis of Membrane-Targeting Lipopeptides with Selective Antibacterial Activity". *Chemistry—A European Journal*, 23(52), 12853-12860.
- [230] Carpenter, C. F., & Chambers, H. F. (2004). "Daptomycin: another novel agent for treating infections due to drug-resistant gram-positive pathogens". *Clinical infectious diseases*, 38(7), 994-1000.
- [231] Jung, D., Rozek, A., Okon, M., & Hancock, R. E. (2004). "Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin". *Chemistry & biology*, 11(7), 949-957.
- [232] Tran, T. T., Munita, J. M., & Arias, C. A. (2015). "Mechanisms of drug resistance: daptomycin resistance". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 32-53.
- [233] Bayer, A. S., Schneider, T., & Sahl, H. G. (2013). "Mechanisms of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall". *Annals of*

the New York Academy of Sciences, 1277(1), 139-158.

- [234] Tran, T. T., Panesso, D., Mishra, N. N., Mileykovskaya, E., Guan, Z., Munita, J. M., ... & Arias, C. A. (2013). "Daptomycin-resistant *Enterococcus faecalis* diverts the antibiotic molecule from the division septum and remodels cell membrane phospholipids". *MBio*, 4(4), e00281-13.
- [235] Ford, C. W., Zurenko, G. E., & Barbachyn, M. R. (2001). "The discovery of linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent". *Current Drug Targets-Infectious Disorders*, 1(2), 181-199.
- [236] Leach, K. L., Brickner, S. J., Noe, M. C., & Miller, P. F. (2011). "Linezolid, the first oxazolidinone antibacterial agent". *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1222(1), 49-54.
- [237] Miller, J. L. (2000). "Linezolid approval brings new treatment option for resistant Bacteria". *American Journal of Health-System Pharmacy*, 57 (11), 1018.
- [238] Marshall, S. H., Donskey, C. J., Hutton-Thomas, R., Salata, R. A., & Rice, L. B. (2002). "Gene dosage and linezolid resistance in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(10), 3334-3336.
- [239] Toh, S. M., Xiong, L., Arias, C. A., Villegas, M. V., Lolans, K., Quinn, J., & Mankin, A. S. (2007). "Acquisition of a natural resistance gene renders a clinical strain of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* resistant to the synthetic antibiotic linezolid". *Molecular microbiology*, 64(6), 1506-1514.
- [240] Munita, J. M., Bayer, A. S., & Arias, C. A. (2015). "Evolving resistance among Gram-positive pathogens". *Clinical Infectious Diseases*, 61(Ek-2), 48-57.
- [241] Wang, Y., Li, D., Song, L., Liu, Y., He, T., Liu, H., ... & Shen, J. (2013). "First report of the multiresistance gene cfr in *Streptococcus suis*". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(8), 4061-4063.
- [242] Woodruff, H. B. (2014). "Selman A. Waksman, winner of the 1952 Nobel Prize for physiology or medicine". *Applied and environmental microbiology*, 80(1), 2-8.
- [243] Krause, K. M., Serio, A. W., Kane, T. R., & Connolly, L. E. (2016). "Aminoglycosides: an overview". *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(6), a027029.
- [244] Serio, A. W., Keepers, T., Andrews, L., & Krause, K. M. (2018). "Aminoglycoside revival: review of a historically important class of antimicrobials undergoing rejuvenation". *EcoSal Plus*, 8(1).
- [245] Aggen, J. B., Armstrong, E. S., Goldblum, A. A., Dozzo, P., Linsell, M. S., Gliedt, M. J., ... & Moser, H. E. (2010). "Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(11), 4636-4642.

- [246] Landman, D., Babu, E., Shah, N., Kelly, P., Bäcker, M., Bratu, S., & Quale, J. (2010). "Activity of a novel aminoglycoside, ACHN-490, against clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from New York City". *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 65(10), 2123-2127.
- [247] Connolly, L. E., Riddle, V., Cebrik, D., Armstrong, E. S., & Miller, L. G. (2018). "A multicenter, randomized, double-blind, phase 2 study of the efficacy and safety of plazomicin compared with levofloxacin in the treatment of complicated urinary tract infection and acute pyelonephritis". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(4), e01989-17.
- [248] Ramirez, M. S., & Tolmasky, M. E. (2010). "Aminoglycoside modifying Enzymes". *Drug resistance updates*, 13(6), 151-171.
- [249] Llano-Sotelo, B., Azucena Jr, E. F., Kotra, L. P., Mobashery, S., & Chow, C. S. (2002). "Aminoglycosides modified by resistance enzymes display diminished binding to the bacterial ribosomal aminoacyl-tRNA site". *Chemistry & biology*, 9(4), 455-463.
- [250] Wachino, J. I., & Arakawa, Y. (2012). "Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update". *Drug Resistance Updates*, 15(3), 133-148.
- [251] Aires, J. R., Kohler, T., Nikaido, H., & Plésiat, P. (1999). "Involvement of an active efflux system in the natural resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to aminoglycosides". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(11), 2624-2628.
- [252] Rosenberg, E. Y., Ma, D., & Nikaido, H. (2000). "AcrD of *Escherichia coli* is an aminoglycoside efflux pump". *Journal of bacteriology*, 182(6), 1754-1756.
- [253] Moore, R. A., DeShazer, D., Reckseidler, S., Weissman, A., & Woods, D. E. (1999). "Efflux-mediated aminoglycoside and macrolide resistance in *Burkholderia pseudomallei*". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 43(3), 465-470.
- [254] Magnet, S., Courvalin, P., & Lambert, T. (2001). "Resistance-nodulation-cell division-type efflux pump involved in aminoglycoside resistance in *Acinetobacter baumannii* strain BM4454". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(12), 3375-3380.
- [255] Roberts, M. C. (1996). "Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution". *FEMS microbiology reviews*, 19(1), 1-24.
- [256] Moffa, M. and Brook, I. (2015). "Tetracyclines, Glycylcyclines, and Chloramphenicol". J. E. Bennett, R. Dolin and M. J. Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8th Edition) (pp. 322-338). Amsterdam: Saunders, Elsevier Inc.
- [257] Chopra, I., & Roberts, M. (2001). "Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance". *Microbiology and molecular biology reviews*, 65(2), 232-260.

- [258] Chopra, I., & Hacker, K. (1986). "Inhibition of K88-mediated adhesion of *Escherichia coli* to mammalian receptors by antibiotics that affect bacterial protein Synthesis". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 18(4), 441-451.
- [259] Dahl, E. L., Shock, J. L., Shenai, B. R., Gut, J., DeRisi, J. L., & Rosenthal, P. J. (2006). "Tetracyclines specifically target the apicoplast of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(9), 3124-3131.
- [260] Bal, T. (2021). "Tetracyclines". S. Gül (Ed.), *Principles Of Antimicrobial Chemotherapy* (1.Baskı) (pp.116-119). Ankara: Ankara Nobel Tıp Kitabevleri.
- [261] Thaker, M., Spanogiannopoulos, P., & Wright, G. D. (2010). "The tetracycline Resistome". *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(3), 419-431.
- [262] Rasmussen, B. A., Gluzman, Y., & Tally, F. P. (1994). "Inhibition of protein synthesis occurring on tetracycline-resistant, TetM-protected ribosomes by a novel class of tetracyclines, the glycylcyclines". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 38(7), 1658-1660.
- [263] Cohen, S. P., McMurry, L. M., & Levy, S. B. (1988). "*marA* locus causes decreased expression of OmpF porin in multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants of *Escherichia coli*". *Journal of bacteriology*, 170(12), 5416-5422.
- [264] Dinos, G. P. (2017). "The macrolide antibiotic renaissance". *British journal of pharmacology*, 174(18), 2967-2983.
- [265] Brockmann, H., & Henkel, W. (1951). "Pikromycin, ein bitter schmeckendes Antibioticum aus Actinomyceten" (*Antibiotica aus Actinomyceten*, VI. Mitteil). *Chemische Berichte*, 84(3), 284-288.
- [266] Omura, S., Morimoto, S., Nagate, T., Adachi, T., & Kohno, Y. (1992). "Research and development of clarithromycin". *Yakugaku Zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 112(9), 593-614.
- [267] Katz, L., & Ashley, G. W. (2005). "Translation and protein synthesis: Macrolides". *Chemical reviews*, 105(2), 499-528.
- [268] Tenson, T., Lovmar, M., & Ehrenberg, M. (2003). "The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome". *Journal of molecular biology*, 330(5), 1005-1014.
- [269] Poulsen, S. M., Kofoed, C., & Vester, B. (2000). "Inhibition of the ribosomal peptidyl transferase reaction by the mycarose moiety of the antibiotics carbomycin, spiramycin and tylosin". *Journal of molecular biology*, 304(3), 471-481.
- [270] Champney, W. (2003). "Bacterial ribosomal subunit assembly is an antibiotic Target". *Current topics in medicinal chemistry*, 3(9), 929-947.
- [271] Feßler, A. T., Wang, Y., Wu, C., & Schwarz, S. (2018). "Mobile macrolide resistance

genes in staphylococci". Plasmid, 99, 2-10.

- [272] Liu, M., & Douthwaite, S. (2002). "Activity of the ketolide telithromycin is refractory to Erm monomethylation of bacterial rRNA". Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(6), 1629-1633.
- [273] Fyfe, C., Grossman, T. H., Kerstein, K., & Sutcliffe, J. (2016). "Resistance to macrolide antibiotics in public health pathogens". Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 6(10), a025395.
- [274] Myers, A. G., & Clark, R. B. (2021). "Discovery of macrolide antibiotics effective against multi-drug resistant Gram-negative pathogens". Accounts of Chemical Research, 54(7), 1635-1645.
- [275] Hu, X. E., Kim, N. K., Gray, J. L., Almstead, J. I. K., Seibel, W. L., & Ledoussal, B. (2003). "Discovery of (3 S)-amino-(4 R)-ethylpiperidinyl quinolones as potent antibacterial agents with a broad spectrum of activity and activity against resistant pathogens". Journal of medicinal chemistry, 46(17), 3655-3661.
- [276] Ito, T., Otsuki, M., & Nishino, T. (1992). "In vitro antibacterial activity of Q-35, a new fluoroquinolone". Antimicrobial agents and chemotherapy, 36(8), 1708-1714.
- [277] Domagala, J. M., Hagen, S. E., Joannides, T., Kiely, J. S., Laborde, E., Schroeder, M. C., ... & Vanderroest, S. (1993). "Quinolone antibacterials containing the new 7-[3-(1-aminoethyl)-1-pyrrolidinyl] side chain: the effects of the 1-aminoethyl moiety and its stereochemical configurations on potency and in vivo efficacy". Journal of medicinal chemistry, 36(7), 871-882.
- [278] Andriole, V. T. (1994). "Session Iv: Present And Future Roles Of Quinolones: Future Role And Uses Of The Quinolones". Infectious Diseases in Clinical Practice, 3(3), S211.
- [279] Liu, H., & Mulholland, S. G. (2005). "Appropriate antibiotic treatment of genitourinary infections in hospitalized patients". The American journal of medicine, 118(7), 14-20.
- [280] Fàbrega, A., Madurga, S., Giralt, E., & Vila, J. (2009). "Mechanism of action of and resistance to quinolones". Microbial biotechnology, 2(1), 40-61.
- [281] Pham, T. D., Ziora, Z. M., & Blaskovich, M. A. (2019). "Quinolone Antibiotics". Medchemcomm, 10(10), 1719-1739.
- [282] Nakamura, S., Nakamura, M., Kojima, T., & Yoshida, H (1989). gyrA and gyrB mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 33(2), 254-255.
- [283] Baucheron, S., Tyler, S., Boyd, D., Mulvey, M. R., Chaslus-Dancla, E., & Cloeckaert, A. (2004). "AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104". Antimicrobial agents and chemotherapy, 48(10), 3729-3735.

- [284] Jellen-Ritter, A. S., & Kern, W. V. (2001). "Enhanced expression of the Multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element Transposition in *Escherichia coli* mutants selected with a fluoroquinolone". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(5), 1467-1472.
- [285] Hernández-Allés, S., Conejo, M. D. C., Pascual, A., Tomás, J. M., Benedí, V. J. & Martínez-Martínez, L. (2000). "Relationship between outer membrane alterations and susceptibility to antimicrobial agents in isogenic strains of *Klebsiella pneumoniae*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46(2), 273-277.
- [286] Ruiz, J., Moreno, A., de Anta, M. T. J., & Vila, J. (2005). "A double mutation in the *gyrA* gene is necessary to produce high levels of resistance to moxifloxacin in *Campylobacter* spp. clinical isolates". *International journal of antimicrobial agents*, 25(6), 542-545.
- [287] Sierra, J. M., Marco, F., Ruiz, J., de Anta, M. J., & Vila, J. (2002). "Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and-resistant *Staphylococcus aureus*". *Clinical microbiology and infection*, 8(12), 781-790.
- [288] Pan, X. S., & Fisher, L. M. (1999). "Streptococcus pneumoniae DNA gyrase and topoisomerase IV: overexpression, purification, and differential inhibition by fluoroquinolones". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(5), 1129-1136.
- [289] Poole, K. (2000). "Efflux-mediated resistance to fluoroquinolones in gram-positive bacteria and the mycobacteria". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(10), 2595-2599.
- [290] Tran, J. H., & Jacoby, G. A. (2002). "Mechanism of plasmid-mediated quinolone Resistance". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5638-5642.
- [291] Yamane, K., Wachino, J. I., Suzuki, S., & Arakawa, Y. (2008). "Plasmid-mediated *qepA* gene among *Escherichia coli* clinical isolates from Japan". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(4), 1564-1566.
- [292] Sköld, O. (2001). "Resistance to trimethoprim and sulfonamides". *Veterinary research*, 32(3-4), 261-273.
- [293] Smith, C. L., & Powell, K. R. (2000). "Review of the sulfonamides and Trimethoprim". *Pediatrics in review*, 21(11), 368-371.
- [294] Domagk, G. (1935). "Ein beitrag zur chemotherapie der bakteriellen Infektionen". *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 61(07), 250-253.
- [295] Zinner, S. H., & Mayer, K. H (2015). "33--Sulfonamides and Trimethoprim". J. E. Bennett, R., Dolin, & M. J., Blaser (Eds.), *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* (8th edition) (pp. 410-418), Philadelphia: Elsevier Inc.

- [296] Singh, T., Dar, S. A., Das, S., & Haque, S. (2020). "Importance of efflux pumps in subjugating antibiotic resistance". P., Kesharwani, S., Chopra, & A., Dasgupta (Eds.), *Drug Discovery Targeting Drug-Resistant Bacteria* (pp. 273-299). Cambridge: Academic Press.
- [297] Swedberg, G., Castensson, S., & Sköld, O. (1979). "Characterization of mutationally altered dihydropteroate synthase and its ability to form a sulfonamide-containing dihydrofolate analog". *Journal of Bacteriology*, 137(1), 129-136.
- [298] Wang, N., Yang, X., Jiao, S., Zhang, J., Ye, B., & Gao, S. (2014). "Sulfonamide-resistant bacteria and their resistance genes in soils fertilized with manures from Jiangsu Province", Southeastern China. *PloS one*, 9(11), e112626.
- [299] Davies, J., & Davies, D. (2010). "Origins and evolution of antibiotic Resistance". *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3), 417-433.
- [300] Muntean, M. M., Muntean, A. A., Preda, M., Manolescu, L. S. C., Dragomirescu, C., Popa, M. I., & Popa, G. L. (2022). "Phenotypic and genotypic detection methods for antimicrobial resistance in ESKAPE pathogens". *Experimental and Therapeutic Medicine*, 24(2), 1-12.
- [301] Georgios, M., Egki, T., & Effrosyni, S. (2014). "Phenotypic and molecular methods for the detection of antibiotic resistance mechanisms in Gram negative nosocomial pathogens". *Trends in infectious diseases*, 4, 139-162.
- [302] Chiu, C. T., Lai, C. H., Huang, Y. H., Yang, C. H., & Lin, J. N. (2021). "Comparative analysis of gradient diffusion and disk diffusion with agar dilution for susceptibility testing of *Elizabethkingia anophelis*". *Antibiotics*, 10(4), 450.
- [303] Simner, P. J., Bergman, Y., Trejo, M., Roberts, A. A., Marayan, R., Tekle, T., & Hindler, J. A. (2019). "Two-site evaluation of the colistin broth disk elution test to determine colistin in vitro activity against Gram-negative bacilli". *Journal of clinical microbiology*, 57(2), e01163-18.
- [304] Amsler, K., Santoro, C., Foleno, B., Bush, K., & Flamm, R. (2010). "Comparison of broth microdilution, agar dilution, and Etest for susceptibility testing of doripenem against gram-negative and gram-positive pathogens". *Journal of clinical microbiology*, 48(9), 3353-3357.
- [305] Tsukatani, T., Suenaga, H., Higuchi, T., Shiga, M., Noguchi, K., & Matsumoto, K. (2011). "Distinction of Gram-positive and-negative bacteria using a colorimetric microbial viability assay based on the reduction of water-soluble tetrazolium salts with a selection medium". *The Journal of General and Applied Microbiology*, 57(6), 331-339.
- [306] Li, Y., Yang, X., & Zhao, W. (2017). "Emerging microtechnologies and automated systems for rapid bacterial identification and antibiotic susceptibility testing". *SLAS technology*, 22(6), 585-608.
- [307] Boedicker, J. Q., Li, L., Kline, T. R., & Ismagilov, R. F. (2008). "Detecting bacteria

- and determining their susceptibility to antibiotics by stochastic confinement in nanoliter droplets using plug-based microfluidics.” *Lab on a Chip*, 8(8), 1265-1272.
- [308] Mohan, R., Mukherjee, A., Sevgen, S. E., Sanpitakseree, C., Lee, J., Schroeder, C. M., & Kenis, P. J. (2013). “A multiplexed microfluidic platform for rapid antibiotic susceptibility testing”. *Biosensors and Bioelectronics*, 49, 118-125.
- [309] Choi, J., Yoo, J., Lee, M., Kim, E. G., Lee, J. S., Lee, S., ... & Kwon, S. (2014). “A rapid antimicrobial susceptibility test based on single-cell morphological analysis”. *Science translational medicine*, 6(267), 267ra174-267ra174.
- [310] Fredborg, M., Rosenvinge, F. S., Spillum, E., Kroghsbo, S., Wang, M., & Sondergaard, T. E. (2015). “Rapid antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates by digital time-lapse microscopy”. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34(12), 2385-2394.
- [311] London, R., Schwedock, J., Sage, A., Valley, H., Meadows, J., Waddington, M. & Straus, D. (2010). “An automated system for rapid non-destructive enumeration of growing microbes”. *PloS one*, 5(1), e8609.
- [312] Knudsen, S. M., von Muhlen, M. G., Schauer, D. B., & Manalis, S. R. (2009). “Determination of bacterial antibiotic resistance based on osmotic shock Response”. *Analytical chemistry*, 81(16), 7087-7090.
- [313] Sinn, I., Kinnunen, P., Albertson, T., McNaughton, B. H., Newton, D. W., Burns, M. A., & Kopelman, R. (2011). “Asynchronous magnetic bead rotation (AMBR) biosensor in microfluidic droplets for rapid bacterial growth and susceptibility measurements”. *Lab on a Chip*, 11(15), 2604-2611.
- [314] Chung, C. Y., Wang, J. C., & Chuang, H. S. (2016). “Rapid bead-based antimicrobial susceptibility testing by optical diffusometry”. *PloS one*, 11(2), e0148864.
- [315] Chung, C. C., Cheng, I. F., Chen, H. M., Kan, H. C., Yang, W. H., & Chang, H. C. (2012). “Screening of antibiotic susceptibility to β -Lactam-Induced Elongation of gram-negative bacteria based on dielectrophoresis”. *Analytical chemistry*, 84(7), 3347-3354.
- [316] Longo, G., Alonso-Sarduy, L., Rio, L. M., Bizzini, A., Trampuz, A., Notz, J., ... & Kasas, S. (2013). “Rapid detection of bacterial resistance to antibiotics using AFM cantilevers as nanomechanical sensors”. *Nature nanotechnology*, 8(7), 522-526.
- [317] Khalili, H., Soltani, R., Negahban, S., Abdollahi, A., & Gholami, K. (2012). “Reliability of disk diffusion test results for the antimicrobial susceptibility testing of nosocomial gram-positive microorganisms: is E-test method better?”. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR*, 11(2), 559.
- [318] Sarker, J. N., Bakar, S. M., Barua, R., Sultana, H., Anwar, S., Saleh, A. A., & Sultana, S. A. (2015). “Susceptibility pattern of extended spectrum β -Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. to Ciprofloxacin, amikacin and imipenem”. *J Sci Res Rep*, 8, 1-9.

- [319] Li, H., Torab, P., Mach, K. E., Surette, C., England, M. R., Craft, D. W., ... & Wong, P. K. (2019). "Adaptable microfluidic system for single-cell pathogen classification and antimicrobial susceptibility testing". *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(21), 10270-10279.
- [320] Yang, Y. T., Wang, J. C., & Chuang, H. S. (2020). "Developing Rapid Antimicrobial Susceptibility Testing for Motile/Non-Motile Bacteria Treated with Antibiotics Covering Five Bactericidal Mechanisms on the Basis of Bead-Based Optical Diffusometry". *Biosensors*, 10(11), 181.
- [321] Johari, J., Hübner, Y., Hull, J. C., Dale, J. W., & Hughes, M. P. (2003). "Dielectrophoretic assay of bacterial resistance to antibiotics". *Physics in Medicine & Biology*, 48(14), N193.
- [322] Tyson, G. H., McDermott, P. F., Li, C., Chen, Y., Tadesse, D. A., Mukherjee, S., ... & Zhao, S. (2015). "WGS accurately predicts antimicrobial resistance in *Escherichia coli*". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(10), 2763-2769.
- [323] Carter, B., Wu, G., Woodward, M. J., & Anjum, M. F. (2008). "A process for analysis of microarray comparative genomics hybridisation studies for bacterial genomes". *BMC genomics*, 9(1), 1-16.
- [324] Anjum, M. F., Zankari, E., & Hasman, H. (2018). "Molecular methods for detection of antimicrobial resistance". S., Schwarz, L. M., Cavaco, & J., Shen (Eds.), *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals* (pp. 33-50). Washington: American Society for Microbiology Press.
- [325] Anjum, M. F., Choudhary, S., Morrison, V., Snow, L. C., Mafura, M., Slickers, P., ... & Woodward, M. J. (2011). "Identifying antimicrobial resistance genes of human clinical relevance within *Salmonella* isolated from food animals in Great Britain". *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(3), 550-559.
- [326] Card, R., Zhang, J., Das, P., Cook, C., Woodford, N., & Anjum, M. F. (2013). "Evaluation of an expanded microarray for detecting antibiotic resistance genes in a broad range of gram-negative bacterial pathogens". *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 57(1), 458-465.
- [327] Lee, W. S., Lee, S., Kang, T., Ryu, C. M., & Jeong, J. (2019). "Detection of Ampicillin-Resistant *E. coli* Using Novel Nanoprobe-Combined Fluorescence In Situ Hybridization". *Nanomaterials*, 9(5), 750.
- [328] Amann, R., & Fuchs, B. M. (2008). "Single-cell identification in microbial communities by improved fluorescence in situ hybridization techniques". *Nature Reviews Microbiology*, 6(5), 339-348.
- [329] Jüttner, S., Vieth, M., Miehle, S., Schneider-Brachert, W., Kirsch, C., Pfeuffer, T., ... & Stolte, M. (2004). "Reliable detection of macrolide-resistant *Helicobacter pylori* via fluorescence in situ hybridization in formalin-fixed tissue". *Modern Pathology*, 17(6), 684-689.

- [330] Murray, P. R. (2012). "What is new in clinical microbiology—microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry: a paper from the 2011 William Beaumont Hospital Symposium on molecular pathology". *The journal of molecular diagnostics*, 14(5), 419-423.
- [331] Tyson, G. H., Sabo, J. L., Rice-Trujillo, C., Hernandez, J., & McDermott, P. F. (2018). "Whole-genome sequencing based characterization of antimicrobial resistance in *Enterococcus*". *Pathogens and disease*, 76(2), fty018.
- [332] El-Adawy, H., Ahmed, M., Hotzel, H., Monecke, S., Schulz, J., Hartung, J., ... & Hafez, H. M. (2016). "Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from healthy turkeys and broilers using DNA microarrays". *Frontiers in microbiology*, 7, 2019.
- [333] Hrabák, J., Chudáčková, E., & Papagiannitsis, C. C. (2014). "Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: a challenge for diagnostic microbiological laboratories". *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 839-853.
- [334] Chambers, H. F. (1997). "Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications". *Clinical microbiology reviews*, 10(4), 781-791.
- [335] Witte, W., Bräulke, C., Cuny, C., Heuck, D., & Kresken, M. (2001). "Changing pattern of antibiotic resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from German hospitals". *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 22(11), 683-686.
- [336] Klein, N. C., & Cunha, B. A. (2001). "New uses of older antibiotics". *Medical Clinics of North America*, 85(1), 125-132.
- [337] Strommenger, B., Kettlitz, C., Werner, G., & Witte, W. (2003). "Multiplex PCR assay for simultaneous detection of nine clinically relevant antibiotic resistance genes in *Staphylococcus aureus*". *Journal of clinical microbiology*, 41(9), 4089-4094.
- [338] Laflamme, C., Gendron, L., Turgeon, N., Filion, G., Ho, J., & Duchaine, C. (2009). "In situ detection of antibiotic-resistance elements in single *Bacillus cereus* Spores". *Systematic and applied microbiology*, 32(5), 323-333.
- [339] Magistrado, P. A., Garcia, M. M., & Raymundo, A. K. (2001). "Isolation and polymerase chain reaction-based detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from poultry in the Philippines". *International journal of food microbiology*, 70(1-2), 197-206.
- [340] Adzitey, F., & Corry, J. (2011). "A comparison between hippurate hydrolysis and multiplex PCR for differentiating *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni*". *Tropical Life Sciences Research*, 22(1), 91.
- [341] Yaron, S., & Matthews, K. R. (2002). "A reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for detection of viable *Escherichia coli* O157: H7: investigation of specific target genes". *Journal of applied microbiology*, 92(4), 633-640.

- [342] Adzitey, F., Huda, N., & Ali, G. R. R. (2013). "Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks". 3 Biotech, 3(2), 97-107.
- [343] Maheaswari, R., Kshirsagar, J. T., & Lavanya, N. (2016). "Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology". Journal of Indian Society of Periodontology, 20(2), 128.
- [344] Farber, J. M. (1996). "An introduction to the hows and whys of molecular typing". Journal of Food Protection, 59(10), 1091-1101.
- [345] Galhano, B. S., Ferrari, R. G., Panzenhagen, P., de Jesus, A. C. S., & Conte-Junior, C. A. (2021). "Antimicrobial resistance gene detection methods for bacteria in animal-based foods: a brief review of highlights and advantages". Microorganisms, 9(5), 923.
- [346] World Health Organization. (2019). Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (GLASS): molecular methods for antimicrobial resistance (AMR) diagnostics to enhance the Global Antimicrobial Resistance Surveillance System (No. WHO/WSI/AMR/2019.1). Geneva: World Health Organization. Erişim adresi: [WHO-WSI-AMR-2019.1-eng \(1\).pdf](#), Erişim tarihi: 12.12.2022.
- [347] Arifin, M. I. (2016). Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and a polymerase chain reaction (PCR) assays for diagnosis of *Fasciola hepatica* in animal faeces and comparison with traditional diagnostic methods. Master's thesis. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences.
- [348] Delgado-Valverde, M., Sojo-Dorado, J., Pascual, Á., & Rodríguez-Baño, J. (2013). "Clinical management of infections caused by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*". Therapeutic advances in infectious disease, 1(2), 49-69.
- [349] Montero, L., Irazabal, J., Cardenas, P., Graham, J. P., & Trueba, G. (2021). "Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing-*Escherichia coli* Isolated From Irrigation Waters and Produce in Ecuador". Frontiers in microbiology, 2966.
- [350] Guo, S., Aung, K. T., Leekitcharoenphon, P., Tay, M. Y., Seow, K. L., Zhong, Y., ... & Schlundt, J. (2021). "Prevalence and genomic analysis of ESBL-producing *Escherichia coli* in retail raw meats in Singapore". Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 76(3), 601-605.
- [351] Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). "Updated functional classification of β -Lactamases". Antimicrobial agents and chemotherapy, 54(3), 969-976.
- [352] Bean, D. C., Livermore, D. M., & Hall, L. M. (2009). "Plasmids imparting sulfonamide resistance in *Escherichia coli*: implications for persistence". Antimicrobial agents and chemotherapy, 53(3), 1088-1093.
- [353] Rahman, M. A., Rahman, A. K. M. A., Islam, M. A., & Alam, M. M. (2017). "Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolated from milk, beef and chicken meat in Bangladesh". Bangladesh Journal of Veterinary Medicine, 15(2), 141-146.

- [354] Abass, A., Adzitey, F., & Huda, N. (2020). “*Escherichia coli* of ready-to-eat (RTE) meats origin showed resistance to antibiotics used by farmers”. *Antibiotics*, 9(12), 869.
- [355] Li, L., Ye, L., Zhang, S., & Meng, H. (2016). “Isolation and identification of aerobic bacteria carrying tetracycline and sulfonamide resistance genes obtained from a meat processing plant”. *Journal of food science*, 81(6), M1480-M1484.
- [356] Deng, Y., Bao, X., Ji, L., Chen, L., Liu, J., Miao, J., ... & Yu, G. (2015). “Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons”. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 14(1), 1-11.
- [357] Sunde, M., Simonsen, G. S., Slettebø, J. S., Bøckerman, I., & Norström, M. (2015). “Integron, plasmid and host strain characteristics of *Escherichia coli* from humans and food included in the Norwegian antimicrobial resistance monitoring programs”. *PLoS One*, 10(6), e0128797.
- [358] Chen, J., & Griffiths, M. W. (1998). “PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein”. *Letters in applied microbiology*, 27(6), 369-371.
- [359] Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). “The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups”. *Environmental microbiology reports*, 5(1), 58-65.
- [360] Ahmed, A. M., Motoi, Y., Sato, M., Maruyama, A., Watanabe, H., Fukumoto, Y., & Shimamoto, T. (2007). “Zoo animals as reservoirs of gram-negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes”. *Applied and environmental microbiology*, 73(20), 6686-6690.
- [361] Kern, M. B., Klemmensen, T., Frimodt-Møller, N., & Espersen, F. (2002). “Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance”. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 50(4), 513-516.
- [362] Hammerum, A. M., Sandvang, D., Andersen, S. R., Seyfarth, A. M., Porsbo, L. J., Frimodt-Møller, N., & Heuer, O. E. (2006). “Detection of sul1, sul2 and sul3 in sulphonamide resistant *Escherichia coli* isolates obtained from healthy humans, pork and pigs in Denmark”. *International journal of food microbiology*, 106(2), 235-237.
- [363] Gündoğdu, A., Long, Y. B., Vollmerhausen, T. L., & Katouli, M. (2011). “Antimicrobial resistance and distribution of sul genes and integron-associated intI genes among uropathogenic *Escherichia coli* in Queensland, Australia”. *Journal of medical microbiology*, 60(11), 1633-1642.
- [364] Arslan, E. (2006). “Hızlı Bakteriyel DNA Ekstraksiyon Metotlarının Karşılaştırılması”. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 2(27), 73-76.
- [365] Nachin, L., Nannmark, U., & Nyström, T. (2005). “Differential roles of the universal

stress proteins of *Escherichia coli* in oxidative stress resistance, adhesion, and motility". Journal of bacteriology, 187(18), 6265-6272.

- [366] Uyanık, T. (2022). "Samsun İlindeki Hastane Kantinlerinde Satışa Sunulan Tüketime Hazır Sandviçlerde Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* Varlığının Araştırılması". Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 19 (1), 37-42.
- [367] Kürekci, C., Aydın, M., Yipel, M., Katouli, M., & Gündoğdu, A. (2017). "Characterization of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Asi (Orontes) River in Turkey". Journal of water and health, 15(5), 788-798.
- [368] Omerovic, M., & Müştak, H. K. (2018). "Kanatlı Kökenli *Escherichia coli*'lerin Filogruplandırılması". Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 29(1), 70-75.
- [369] Hinata, N., Shirakawa, T., Okada, H., Shigemura, K., Kamidono, S., & Gotoh, A. (2004). "Quantitative detection of *Escherichia coli* from urine of patients with bacteriuria by real-time PCR". Molecular Diagnosis, 8(3), 179-184.
- [370] Montso, K. P., Dlamini, S. B., Kumar, A., & Ateba, C. N. (2019). "Antimicrobial resistance factors of extended-spectrum beta-lactamases producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Cattle Farms and Raw Beef in North-West Province, South Africa". BioMed research international, 2019.
- [371] Ramos, S., Igrejas, G., Silva, N., Jones-Dias, D., Capelo-Martinez, J. L., Caniça, M., & Poeta, P. (2013). "First report of CTX-M producing *Escherichia coli*, including the new ST2526, isolated from beef cattle and sheep in Portugal". Food Control, 31(1), 208-210.
- [372] Abdallah, H. M., Al Naiemi, N., Elsohaby, I., Mahmoud, A. F., Salem, G. A., & Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (2022). "Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacterales in retail sheep meat from Zagazig city, Egypt". BMC Veterinary Research, 18(1), 1-7.
- [373] Geser, N., Stephan, R., & Hächler, H. (2012). "Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk". BMC veterinary research, 8(1), 1-9.
- [374] Abrar, S., Ain, N. U., Liaqat, H., Hussain, S., Rasheed, F., & Riaz, S. (2019). "Distribution of blaCTX- M, blaTEM, blaSHV and blaOXA genes in extended-spectrum- β -lactamase-producing clinical isolates: a three-year multi-center study from Lahore, Pakistan". Antimicrobial Resistance & Infection Control, 8(1), 1-10.
- [375] Kluytmans, J. A., Overvest, I. T., Willemsen, I., Kluytmans-Van Den Bergh, M. F., Van Der Zwaluw, K., Heck, M., ... & Johnson, J. R. (2013). "Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors". Clinical Infectious Diseases, 56(4), 478-487.

- [376] Kuznetsova, M. V., & Gizatullina, J. S. (2021). “Epidemiological characteristics of uropathogenic isolates of *Escherichia coli* in hospitals”. *Klinicheskaja Laboratornaja Diagnostika*, 66(4), 248-256.
- [377] Li, H., Liu, Y., Yang, L., Wu, X., Wu, Y., & Shao, B. (2021). “Prevalence of *Escherichia coli* and Antibiotic Resistance in Animal-Derived Food Samples—Six Districts, Beijing, China, 2020”. *China CDC Weekly*, 3(47), 999.
- [378] Badi, S., Cremonesi, P., Abbassi, M. S., Ibrahim, C., Snoussi, M., Bignoli, G., & Hassen, A. (2018). “Antibiotic resistance phenotypes and virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolated from animals and animal food products in Tunisia”. *FEMS microbiology letters*, 365(10), fny088.
- [379] Abdelwahab, G. E., Ishag, H. Z. A., Al Hammadi, Z. M., Al Yammahi, S. M. S., Mohd Yusof, M. F. B., Al Yassi, M. S. Y., ... & Mohammed Al Muhairi, S. S. (2022). “Antibiotics Resistance in *Escherichia coli* Isolated from Livestock in the Emirate of Abu Dhabi, UAE, 2014–2019”. *International Journal of Microbiology*, 2022.
- [380] Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Knapp, C. W., Correa Galeote, D., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014). “Diversity, distribution and quantification of antibiotic resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products”. *PLoS One*, 9(12), e114252.
- [381] Arabi, H., Pakzad, I., Nasrollahi, A., Hosainzadegan, H., Jalilian, F. A., Taherikalani, M., ... & Sefidan, A. M. (2015). “Sulfonamide resistance genes (Sul) M in extended spectrum beta lactamase (ESBL) and non-ESBL producing *Escherichia coli* isolated from Iranian hospitals”. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 8(7).
- [382] Wu, S., Dalsgaard, A., Hammerum, A. M., Porsbo, L. J., & Jensen, L. B. (2010). “Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human”. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), 1-7.
- [383] Robino, L., García-Fulgueiras, V., Araujo, L., Algorta, G., Pérez, M. C., & Vignoli, R. (2014). “Urinary tract infection in Uruguayan children: Aetiology, antimicrobial resistance and uropathogenic *Escherichia coli* virulotyping”. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2(4), 293-298.
- [384] Adamus-Białek, W., Baraniak, A., Wawszczak, M., Głuszek, S., Gad, B., Wróbel, K., ... & Parniewski, P. (2018). “The genetic background of antibiotic resistance among clinical uropathogenic *Escherichia coli* strains”. *Molecular biology reports*, 45(5), 1055-1065.
- [385] Majeed Issa, O., Abdul-Elah Bakir, W., & Ayad Abbas, M. (2022). “Laboratory diagnosis of urinary tract infections in patients with resistance genes towards antibiotics”. *Revis Bionatura* 2022, 7(2), 46.
- [386] Martínez-Vázquez, AV, Mandujano, A., Cruz-Gonzalez, E., Guerrero, A., Vazquez, J., Cruz-Pulido, WL, ... & Bocanegra-García, V. (2022). “Evaluation of Retail Meat as a

Source of ESBL *Escherichia coli* in Tamaulipas, Mexico”. *Antibiyotikler*, 11 (12), 1795.

- [387] Lavakhamseh, H., Mohajeri, P., Rouhi, S., Shakib, P., Ramazanzadeh, R., Rasani, A., & Mansouri, M. (2016). “Multidrug-resistant *Escherichia coli* strains isolated from patients are associated with class 1 and 2 integrons”. *Chemotherapy*, 61(2), 72-76.
- [388] Machado, E., Cantón, R., Baquero, F., Galán, J. C., Rollán, A., Peixe, L., & Coque, T. M. (2005). “Integron content of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain”. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 49(5), 1823-1829.
- [389] Moghaddam, M. J. M., Mirbagheri, A. A., Salehi, Z., & Habibzade, S. M. (2015). “Prevalence of class 1 integrons and extended spectrum beta lactamases among multi-drug resistant *Escherichia coli* isolates from north of Iran”. *Iranian biomedical journal*, 19(4), 233.
- [390] Gümüş, D., Yüksek, F. K., Camadan, F. D., Oral, M., Macunluoglu, A. C., & Küçüker, A. M. (2022). “High prevalence of class 1 and class 11 integrons in uropathogenic *E. coli* strains (upecs) and their relationship with antibiotic resistance, phylogeny and virulence”. *Journal of Istanbul Faculty of Medicine*, 85(1), 77-85.
- [391] Kot, B. (2019). “Antibiotic Resistance Among Uropathogenic”. *Polish journal of microbiology*, 68(4), 403-415.