



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**KAN KÜLTÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN
Escherichia coli SUŞLARINDA İNTEGRON
GEN KASETLERİNİN MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU**

Ahu REİS

DOKTORA TEZİ

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

TRABZON – 2017

ONAY

Bu Tez Doktora Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Faruk AYDIN

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı



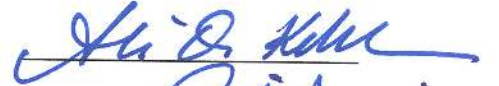
Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora öğrencisi Ahu Reis'in hazırladığı 'Kan Kültürlerinden İzole Edilen Escherichia coli Suşlarında İntegron Gen Kasetlerinin Moleküler Karakterizasyonu' başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ



Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

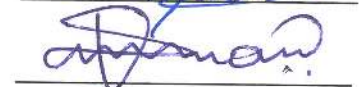
Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ



Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA



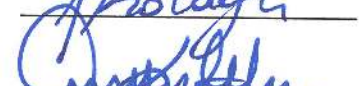
Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ



Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI



Doç. Dr. Celal Kurtuluş BURUK



Tarih: / /2017

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eseri olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi, kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

21.08.2017

Ahu REİS

İthaf

Çalışmalarımda her zaman yanımda olan ve varlıklarıyla beni mutlu eden sevgili eşim Fatih REİS ve oğullarım Berkay ve İsmail Asaf REİS'e ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her konuda destek, hoşgörü ve anlayışını benden esirgemeyen, çalışmalarımız boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ'a, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Faruk AYDIN'a, bölüm hocalarımız Prof. Dr. Neşe KAKLIKKAYA, Doç. Dr. Gülçin BAYRAMOĞLU, Doç. Dr. Kurtuluş BURUK ve Yrd. Doç. Dr. Esra ÖZKAYA'ya hoşgörü ve bilimsel paylaşımları için teşekkür ederim.

Eğitim hayatım boyunca bana güvenip bilimsel çalışmalarda yer almama katkıda bulunan ve akademik anlamda gelişmemi sağlayan sevgili hocam Prof. Dr. İlknur TOSUN'a destekleri için teşekkür ederim. Lisans ve doktora eğitimim süresince desteğini hep üzerimde hissettiğim, her konuda kapısını çalmaktan çekinmeyeceğim ve çalışma hayatım boyunca tüm bilgi ve deneyimlerini eksiksiz olarak benimle paylaşan çok değerli hocam Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ hocama ve tezimi titizlikle okuyarak verdiği öneriler için Prof. Dr. Fetiye KOLAYLI'ya teşekkür ederim.

DNA dizi analizi çalışmalarımda bilgi ve teknik imkânlarını benimle paylaşan Prof. Dr. Ersan KALAY'a, Yrd. Doç. Dr. Bayram TORAMAN'a ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı diğer öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Çalışmalarım boyunca gerek bilimsel gerekse manevi desteklerini benden esirgemeyen ve yanımda olan sevgili dostlarım-bölüm arkadaşlarım Arş. Gör. Gülşen ULUÇAM ATAY, Arş. Gör. Merve CORA, Arş. Gör. İnci DURUKAN ve Arş. Gör. Enis Fuat TÜFEKÇİ'ye teşekkür ederim. Tecrübelerinden faydalandığım doktora öğrencisi Sana TABBOUCHE, Muhib ABDULKADIR ABDURRAHMAN ve yüksek lisans öğrencisi Mona KHORSHIDTALAB'a teşekkür ederim. Desteklerini benden esirgemeyen anneme, babama ve kardeşlerime teşekkür ederim.

En zor zamanlarımda bana her konuda destek olduğu ve anlayışla yaklaştığı için hayatımın vazgeçilmez parçaları olan sevgili eşim Fatih'e ve canım oğullarım Berkay ve İsmail Asaf'a teşekkür ederim. Eğitim ve iş hayatım boyunca sürekli desteğini gördüğüm, bu zor zamanlarımda hep yanımda olan ve tez çalışmamı bitirmemde bana sonsuz destek veren Nilgün ve İsmail REİS'e çok teşekkür ederim.

Prof. Dr. Ali O. KILIÇ yönetimindeki bu tez çalışmasına TDK-2015-5335 sayılı proje ile destek sağladığı için Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne teşekkür ederim.

Ahu REİS
Trabzon, 2017



İÇİNDEKİLER DİZİNİ**Sayfa****ONAY****BEYAN****İTHAF****TEŞEKKÜR****İÇİNDEKİLER DİZİNİ****iv****TABLolar DİZİNİ****vii****ŞEKİLLER DİZİNİ****viii****RESİMLER DİZİNİ****ix****KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ****x****1. ÖZET****1****2. SUMMARY****3****3. GİRİŞ ve AMAÇ****5****4. GENEL BİLGİLER****7**4.1. *Escherichia coli*

7

4.1.1. Morfoloji Özellikleri

7

4.1.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

7

4.1.3. Doğal Ortamı

8

4.1.4. Klinik Önemi

8

4.2. Antibiyotik Direnci

8

4.3. Yatay Gen Aktarımı ile Antibiyotik Direncinin Yayılımı

10

4.3.1. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Yatay Gen Aktarım Mekanizmaları

11

4.3.2. Yatay Gen Aktarılmasında Rol Oynayan Hareketli Elemanlar

13

4.3.2.1. Plazmidler

13

4.3.2.2. Transpozonlar

16

4.3.2.3. İntegronlar

16

5. GEREÇ ve YÖNTEM**22**

5.1. Gereç

22

5.1.1. Çalışma Grubu

22

5.1.2. Araç ve Gereçler

22

5.1.3. Kimyasallar	23
5.1.4. Besiyerleri	23
5.1.5. Çözeltiler	23
5.1.5.1. Master Mix İçin Kullanılan Çözeltiler	23
5.1.5.2. Agaroze Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Çözeltiler	24
5.1.5.3. Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler	24
5.2. Yöntem	26
5.2.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri	26
5.2.2. Moleküler Yöntemler	26
5.2.2.1. DNA İzolasyonu	26
5.2.2.2. Master Mix Hazırlanması	27
5.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	28
5.2.3. İzolatlardaki İntegronlarda Bulunan Gen Kasetlerinin Analizleri	28
5.2.4. Agaroze Jel Elektroforez Aşaması ve Jelin Görüntülenmesi	29
5.2.5. İzolatlardaki İntegronların Klonlanması	29
5.2.5.1. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi	29
5.2.5.2. pGEM-T Easy Vektör Sistemine Ligasyon Aşaması	30
5.2.5.3. Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyonu	31
5.2.5.4. Klonların Seçilmesi ve Plazmit DNA İzolasyonu	32
5.2.6. Plazmit DNA'ların Sekans Analizleri	33
5.2.7. İntegron İçeren İzolatlarda Konjugasyon Deneyi ile Plazmit DNA Transferi	34
5.2.7.1. Verici İzolatların Canlı Bakteri Sayısının Hesaplanması	35
5.2.7.2. Konjugasyon Etkinliğinin Hesaplanması	36
5.2.8. Transkonjugantlardan Plazmit DNA İzolasyonu	36
5.2.9. Transkonjugantlarda İntegron Varlığının PZR ile Doğrulanması	36
5.2.10. Konjugatif Plazmitlerin Incompatibility (Uyumsuzluk) Gruplarının Belirlenmesi	36
6. BULGULAR	38
6.1. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları	38
6.1.1. İzolatların Antibiyotiklere Direnç Oranları	45
6.2. PZR Yöntemiyle İntegraz Genlerinin ve İntegron Varlığının Belirlenmesi	46
6.2.1. <i>intI</i> -1 Gen Amplifikasyonu	46
6.2.2. <i>intI</i> -2 Gen Amplifikasyonu	46

6.2.3. Sınıf 1 İntegron Amplifikasyonu	47
6.2.4. Sınıf 2 İntegron Amplifikasyonu	47
6.3. İntegron İçeren İzolatlarda İntegron Gen Kasetlerinin Analizi	50
6.3.1. Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegronlara Ait Gen Kasetlerinin Belirlenmesi	50
6.5. Transkonjugantlarda İntegron Varlığının Belirlenmesi	53
6.6. Konjugatif Plazmitlerin Uyumsuzluk Gruplarının Belirlenmesi	53
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	55
8. SONUÇ ve ÖNERİLER	65
9. KAYNAKLAR	67
10. ETİK KURUL ONAYI	81
11. ÖZGEÇMİŞ	82

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa
Tablo 1. PZR reaksiyonunda kullanılan master mix bileşenleri ve miktarları	27
Tablo 2. PZR deneylerinde kullanılan oligonükleotid primerler	28
Tablo 3. PZR reaksiyon koşulları	29
Tablo 4. Ligasyon aşamasında kullanılan bileşenler ve miktarları	30
Tablo 5. DNA sekans reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları	34
Tablo 6. Inc gruplarının belirlenmesinde kullanılan primerler (86)	37
Tablo 7. Çalışmada kullanılan <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları	39
Tablo 8. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları	44
Tablo 9. İntegrona spesifik PZR sonuçları	48
Tablo 10. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif izolatların ve içerdikleri integronların özellikleri	51
Tablo 11. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren izolatların konjugatif plazmit içerikleri ve transkonjugantların konjugasyon etkinlikleri	52

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Sınıf 1 integronun yapısı	17
Şekil 2. Sınıf 2 integronun yapısı	18
Şekil 3. Çalışmaya dahil edilen <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik direnç oranları	45
Şekil 4. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren <i>E. coli</i> izolatların antibiyotik direnç oranları	46



RESİMLER DİZİNİ**Sayfa**

Resim 1.	Bazı izolatlardaki sınıf 1 ve sınıf 2 integron amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü	47
Resim 2.	IncN spesifik PZR amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü	54
Resim 3.	IncQ spesifik PZR amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü	54



KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair (baz çifti)
CS	Conserved region
°C	Santigrat derece
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik Asit
EMB	Eozin Metilen Blue Agar
EtBr	Etidyum Bromür
Inc	Incompatibility
LB	Luria Bertani
MHB	Mueller Hinton broth
PBS	Fosfat Tampon Solüsyonu
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rpm	Revolutions Per Minute
TE	Tris EDTA
UV	Ultraviyole
IPTG	İzopropil β -D-1-tiyogalaktopiranosid

Formüller

NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit

Simgeler

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
M	Molarite
mg	Miligram
mM	Milimolar

1. ÖZET

Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında İntegron Gen Kasetlerinin Moleküler Karakterizasyonu

Antibiyotiklerin insan sağlığında çok önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Fakat yanlış ve aşırı kullanılmaları sonucu dirençli bakterilerin artışına ve direnç genlerinin hızlı bir şekilde yayılması ile beraber pek çok bakterinin çoklu antibiyotik dirençli olmasına yol açmaktadır. Kazanılan bu direnç plazmid, transpozon ve integron gibi çeşitli hareketli genetik elemanlarla bakteriler arasında yayılmaktadır. İntegronlar birçok antibiyotik direnç determinantını kodlayan, belirli gen kasetlerini taşıma veya entegre olma yeteneğine sahip genetik elemanlardır.

Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Eğitim ve Hizmet Laboratuvarı'na Ocak - Aralık 2014 tarihleri arasında gönderilen kan kültüründen izole edilen 112 *E. coli* izolatında integron gen kaset varlığı ve içerdiği direnç paternlerinin belirlenmesi, ayrıca integronların aktarılmasında rol oynayan konjugatif plazmidlerin varlığının belirlenmesi ve bu plazmidlerin incompatibility (Inc) gruplarının replikon tiplendirme yöntemiyle gruplandırılması amaçlanmıştır.

Bu amaçla 112 *E. coli* izolatında sınıf 1 integrone ait integrin gen bölgesinin belirlenmesi için *intI1* genine özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) işlemi gerçekleştirildi. Buna göre 112 *E. coli* izolatının 51'i (%45.5) *intI1* pozitif olarak saptandı. Sınıf 2 integrone ait integrin gen bölgesinin belirlenmesi için *intI2* genine özgü primerler kullanılarak yapılan PZR işlemi sonucu 112 *E. coli* izolatının 7'si (%6.3) *intI2* pozitif olarak belirlendi. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron varlığının belirlenmesi amacıyla yapılan PZR reaksiyonu sonucu 112 izolatın 38'inde (%33.9) sınıf 1 integron varlığı belirlenirken 13 izolatın boş integron içerdiği belirlendi. Sınıf 2 integron için 112 izolatın 7'sinde (%6.3) sınıf 2 integron varlığı belirlendi.

Sınıf 1 integron içeren 38 izolata yapılan sekans analizi sonucu trimetoprim ve streptomisin-spektinomisin direncinden sorumlu *dfrA7*, *dfr17-aadA5*, *dfrV*, *dfrA1-aadA1* ve *dfrA12-aadA2* olarak adlandırılan 5 tip gen kaseti belirlendi. Sınıf 2 integron amplifikasyonu sonucunda pozitif bulunan 7 izolatın yapılan sekans analizi sonucu

dfrA1-sat2-aadA1 ve *dfrA1-sat2-aadA30* olarak belirtilen 2 tip gen kaseti bulundu. 14 izolatın sekans analiz sonuç verileri elde edilemedi.

Konjugasyon deneyleri sıvıda çiftleşme yöntemiyle gerçekleştirildi. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren 45 izolatın donör olarak kullanıldığı konjugasyon deneylerinde 35 *E. coli* J53-2 transkonjugantı elde edildi. Konjugasyon etkinliklerinin 10^{-6} ve 10^{-10} arasında oldukları belirlendi.

Otuzbeş transkonjuganttaki plazmitlerin Inc gruplarının belirlenmesi amacıyla yapılan PZR reaksiyon sonucuna göre 6 plazmidin (%17) IncN, 1 plazmidin de (%3) IncQ pozitif olduğu belirlendi. Hiçbir transkonjugantta IncP ve IncW gruplarına ait plazmide rastlanmadı.

Anahtar Kelimeler: *Escherichia coli*, gen kaseti, integron, konjugasyon, plazmit, Polimeraz zincir reaksiyonu

2. SUMMARY

Molecular Characterization of Integron Gene Cassettes in *Escherichia coli* Strains Isolated from Blood Cultures

Antibiotics are known to play a very important role in human health. However, incorrect and excessive use leads to multiple antibiotic resistance of many bacteria and the rapid spread of resistance genes.

These resistance genes are spreading among bacterial species with various mobile genetic elements such as plasmids, transposons and integrons. Integrons are known genetic elements that encode many antibiotic resistance determinants and have the ability to carry or integrate specific gene cassettes.

In this study, identification of the presence of integron gene cassette and its resistance patterns in 112 *E. coli* isolates isolated from blood cultures sent to Farabi Hospital Medical Microbiology Training and Service Laboratory of Karadeniz Technical University between January and December 2014, and determination of the resistance patterns of the conjugative plasmids involved in the transfer of integrons, and the incompatibility (Inc) groups of these plasmids were grouped by replicon typing method.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed by using *intI1* gene specific primers to identify the integron gene region of the class 1 integron in the 112 *E. coli* isolates. Based on PCR results, in 51 (45.5%) of the 112 *E. coli* isolates were detected positive for *intI1*. For the identification of the integrase gene region of the class 2 integron, in 7 of the 112 *E. coli* isolates (6.3%) were identified as *intI2* positive using *intI2* gene specific primers. It was determined that 13 isolates contained empty integrons while class 1 integron presence was detected in 38 (33.9%) of the 112 isolates resulting from the PCR reaction to determine the presence of class 1 and class 2 integron. In 7 (6.3%) of 112 isolates class 2 integrons were present.

Sequence analysis of 38 isolates with class 1 integron revealed 5 types of gene cassettes called *dfrA7*, *dfr17-aadA5*, *dfrV*, *dfrA1-aadA1* and *dfrA12-aadA2*, which are responsible for resistance to trimethoprim and streptomycin-spectinomycin resistance. Sequence analysis of 7 isolates found to be positive for class 2 integron amplification

revealed two types of gene cassettes identified as *dfrA1-sat2-aadA1* and *dfrA1-sat2-aadA30*. Sequence analysis results of 14 isolates could not be obtained.

Conjugation experiment was performed based on the principle of broth mating method. Of the 45 *E. coli* having class 1 and class 2 integron tested, 35 (78%) of them were found to be conjugated to the recipient cell (*E. coli* J53-2 met pro Rif^R) and conjugation efficiency was ranged from 10^{-6} to 10^{-10} .

PCR amplification for the identification of Inc groups in the 35 transconjugant containing conjugated plasmid resulted in IncN in 6 (17%) isolates, IncQ in 1 (3%) isolates. And no isolates were found in IncP and IncW.

Key Words: *Escherichia coli*, gene cassette, integron, conjugation, plasmid, polymerase chain reaction

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Enfeksiyon hastalıkları 1900’lü yıllarda dünyanın önde gelen ölüm nedenlerinden biri olarak bilinmekteydi (1). Yirminci yüzyılın ilk yarısında antibiyotiklerin keşfi ve üretimi, tıp alanında başarılarla yol açmıştır ve antibiyotikler modern tıbbın temelini oluşturmuştur (2). Antimikrobiyal ajanların kullanımı mortalite ve morbidite oranlarını düşürmekle beraber özellikle çocuk ölümlerinde azalma, yaşam süresinin uzaması, invaziv cerrahi ve kemoterapi gibi tedaviler için çok önemli hale gelmiştir (3).

Antimikrobisallerin aşırı kullanımları sonucu gelişen antimikrobiyal direnç 21. yüzyılda önemli halk sağlığı sorunlarından biri haline gelmiştir (4). Antibiyotiklerin bilinçsiz olarak kullanılması dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına ve bu bakterilerin yayılmalarına neden olmaktadır. Bu nedenle antimikrobiyal ilaçların zamanında ve etkili bir şekilde kullanılması direncin önlenmesinde önemli rol oynamaktadır (5). Yeni antibakteriyal ilaçların kullanıma girmesiyle birlikte toplumda yeni ilaçlara dirençli bakteriler tarafından oluşturulan enfeksiyonların sayısı gittikçe artmaktadır. Bakterilerde görülen ve yayılabilen bu direnç, çeşitli mekanizmalar sonucu ortaya çıkmaktadır. Direnç, bazı bakterilerde doğal olarak bulundurduğu özelliklerinin sonucu olarak görülürken; bazılarında ise kromozomal mutasyonlar veya plazmid, transpozon ve integron gibi hareketli genetik elemanlar aracılığıyla ektrakromozomal yapılarla ortaya çıkmaktadır (6).

Bazı antibiyotik direnç mekanizmaları doğal olarak bakterilerde bulunur ve yatay gen aktarımı (YGA) ile kolayca diğer bakteriyel patojenlere aktarılabilirler. Yatay gen aktarımında rol oynayan hareketli genetik elemanlar (HGE) bakterinin genom boyutu ve patojenite gibi özelliklerinde değişikliklere yol açmaktadırlar. Bakteriler YGA’ya dirençli olmak için birçok mekanizmaya sahip olsalar da HGE’ler bakteriyel evolüsyonda önemli rol oynarlar ve yeni, değişen ekolojik nişlere adaptasyonda büyük katkı sağlarlar (7).

Antibiyotik direncinin yayılımına zıt olarak yeni antimikrobiyal ilaç keşfinin ve klinik araştırmaların uzun sürmesi, son zamanlarda sadece birkaç yeni antimikrobiyal ajanın kullanımı için onay verilmesi gibi durumlara bağlı olarak yeni antimikrobiyal maddelerin geliştirilmesi konusunda sorunlar yaşanmaktadır. Bu sorunlar enfeksiyon hastalıkları tedavisinde kullanılan antibiyotik seçeneklerini kısıtlamaktadır (8).

Enterobacteriaceae'larda plazmid kaynaklı konjugasyon ana YGA mekanizmalarından biridir ve konjugatif plazmidlerin sıklıkla aktarılmaları çoklu ilaç direnç genlerinin ortaya çıkmasına sebep olmaktadır (4). Bakterilerin bu mekanizmalarla direnç kazanmaları tedavinin planlanmasında ciddi sorunlara yol açmaktadır. Bu nedenle direncin yayılmasında rol oynayan ve HGE'lerden olan R-plazmidleri ve içerdikleri integron gen kasetlerinin sahip oldukları direnç paternlerinin belirlenmesi büyük önem arz etmektedir.

Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Eğitim ve Hizmet Laboratuvarı'nda kan kültürlerinden izole edilmiş *E. coli* izolatlarında integron gen kaset varlığı ve içerdği direnç paternlerinin belirlenmesi, ayrıca integronların yayılımında rol oynayan konjugatif plazmitlerin varlığının belirlenmesi ve bu plazmidlerin incompatibility (Inc) gruplarının replikon tiplendirme yöntemiyle gruplandırılması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. *Escherichia coli*

4.1.1. Morfoloji Özellikleri

Escherichia coli, ilk kez 1885 yılında Escherich adında bir araştırmacı tarafından infantların dışkılarından izole edilmiş ve *Bacterium coli* olarak tanımlanmıştır. Sonrasında ise izole eden kişinin adı verilerek *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır. *E. coli*, *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde yer alır ve kuşların, memelilerin normal bağırsak florasında bulunan 2-6 µm boyunda, 1-1.5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak gram negatif bir basildir. Etrafında yer alan kirpikleri sayesinde yavaş bir hareket yeteneğine sahiptir. Bazı izolatlarında kapsül veya mikrokapsül bulunmaktadır (9, 10).

4.1.2. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

Fakültatif anaerob bakterilerden olan *E. coli*, 15-45°C’de üreyebilmesine rağmen optimal üreme sıcaklıkları 37°C’dir. Ortalama pH 7-7.2’de, buyyon ve jeloz gibi genel besiyerlerinde kolayca ürer. Buyyon ve peptonlu suda yoğun üreme gösterir ve homojen bulanıklık yapar. Agar yüzeyinde genellikle 2-3 mm çapında parlak, düzgün kenarlı, konveks, gri-beyaz renkte S tipi koloniler oluşturur. Tekrarlanan pasajlarda ise kabarmat ve granüler R tipi koloniler oluşturur. Özellikle idrar yolu enfeksiyonundan (İYE) soyutlanan bazı *E. coli* kökenleri kanlı agarda hemoliz yapabilirler. Kapsüllü suşlar ise mukoid koloniler oluşturabilirler. Şekerleri ve diğer karbonhidratları asit ve gaz oluşturarak parçalarlar. İçinde laktoz ve eozin metilen mavisi bulunan eozin metilen blue (EMB) agarda mavi-yeşil parlaklık veren koloniler oluştururken, McConkey ve Salmonella-Shigella (SS) agarda pembe-kırmızı koloniler oluştururlar (8, 9, 10). *E. coli*’nin IMVIC olarak bilinen biyokimyasal özellikleri (Tryptofandan indol oluşturma, Metil kırmızısı testi, Voges Proskauer testi, sitratı kullanma) (+ + – –) olarak gösterilir. Ayrıca oksidaz negatif olup üreyi parçalayamaz. Bazı kökenleri dışında hidrojen sülfür (H₂S) oluşturamaz, ancak sisteinli besiyerinde az miktarda H₂S yaptıkları saptanmıştır. Katalaz pozitif, potasyum siyanür testi negatiftir (9, 10).

E. coli dış etkilere oldukça dayanıklı bir bakteridir. 55°C’de 1 saat, 60°C’ de 20-30 dk, oda ısısında uzun süre canlı kalabilme özelliğine sahiptir. Soğuğa dirençli ve dezenfektanlara karşı dirençsiz olmaları diğer özellikleridir. *E. coli*’nin O (somatik), H

(kirpik), K (kapsül) antijenleri bulunmaktadır. O antijenlerine göre gruplara, H ve K antijenleriyle de serotiplere ayrılır (9, 11).

4.1.3. Doğal Ortamı

E. coli kuşların ve memelilerin normal bağırsak florasında bulunur. Burada diğer flora bakterileri ve organizma ile bir denge içinde kaldığı sürece hastalık oluşturmaz. Normal koşullarda kokuşmada (putrefaksiyon) rol oynar, fermentasyonun düzenlenmesinde ve besinlerin sindirilmesi ile ilgili bazı hususlarda yardımcı olur. Ancak bazı *E. coli* suşları insanlar ve hayvanlar için patojen olup bağırsak hastalıklarına neden olabilir. Bağırsak kanalı dışına çıkıp diğer dokulara yerleşmeleri ve çeşitli klinik tablolara yol açmaları sık görülen durumlardır (12).

4.1.4. Klinik Önemi

Özellikle idrar yolları, safra kesesi, periton ve meninkslere ulaşan *E. coli* önemli hastalıklara yol açar. Yeni doğanlarda, yaşlılarda bazı hastalıkların terminal dönemlerinde, immünsüprese durumlarda, venöz ve üretra kateterizasyonları gibi organizmanın savunma gücünün azaldığı durumlarda koliform bakterilerin dokulara ve kana yayılması için gerekli koşullar ortaya çıkabilir (12). *E. coli*'nin neden olduğu hastalıkları, gastrointestinal sistem (GİS) enfeksiyonları ve diğer doku enfeksiyonları olarak iki gruba ayırabiliriz. Daha çok diyare sendromu şeklinde ortaya çıkan GİS enfeksiyonları, *E. coli*'nin “O” grubu tarafından meydana getirilirler. Küçük çocuklarda ortaya çıkan ishaller daha çok kreşlerde salgınlar şeklinde görülür. Erişkinler çoğu kez hasta çocuklardan enfekte olurlar. Turist diyaresinden sorumlu etkenin enteropatojenik *E. coli* suşları olduğu bilinmektedir. Ağır ishal olgularında bu suşlar çocukların ince bağırsaklarında hatta duodenumda bol sayıda bulunmaktadır. Değişik mekanizmalarla ishale neden olan *E. coli*'lerin Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), Enteroinvazif *E. coli* (EIEC), Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve Difüz aderens *E. coli* (DEAC) olmak üzere 6 tipi tanımlanmıştır (12, 13, 14).

4.2. Antibiyotik Direnci

Antibiyotikler insanlarda bakteriyel menenjit, endokardit, deri, idrar yolu ve daha birçok bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan ve şimdiye kadar geliştirilen en iyi ilaçlar arasındadır (15). Antibiyotiklerin keşfinden kısa bir süre sonra bakterilerin

antibiyotiklere karşı dirençli hale gelebilecekleri bilinmekteydi (16). Antibiyotiklere karşı gelişen bu direnç klinisyenlerin, araştırmacıların, politikacıların ve genel olarak halkın dikkatini çekmiştir (17). Enfeksiyonlara neden olan bakterilerin, tedavide yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmelerinden dolayı antibiyotik direnci küresel bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir. Tüm dünyada gelişen antibiyotik direnci enfeksiyon hastalıklarında hastalık süresinin uzamasına ve ölümcül sonuçlara yol açmaktadır (17). Son 70 yıldır aşırı antibiyotik kullanımına bağlı olarak sadece hastane ortamındaki bakterilerde değil çevresel ortamlarda yer alan bakterilerdede antibiyotiklere karşı direnç hızlı bir şekilde gelişmektedir (18).

Direnç gelişiminin insanlarda ve hayvanlarda antibiyotiklerin aşırı veya yalnız kullanımı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (19). Antimikrobiyal direnç denildiğinde aklımıza doğal direnç ve kazanılmış direnç olmak üzere iki fenotip gelmektedir. Bu mekanizmalardan doğal direnç, bakteri kromozomunun doğal olarak yapısında bulunan genler tarafından oluşan bir direnç fenotipidir. Gram negatif bakterilerde bulunan AmpC β -laktamaz ve bazı çoklu ilaç dirençli efluks sistemi örnek olarak verilebilir (20). Direnç fenotipinde mutasyonlara bağlı olarak gelişen birçok biyokimyasal mekanizma vardır. Bunlardan ilki bazı antibiyotiklerin bağlanacağı hedef bölgeleri kodlayan gen dizilerinde mutasyon meydana gelmesidir. Rifampisin ve florokinolonlara direnç neden olan RpoB and DNA topoizomeraaz enzimlerini kodlayan genlerde mutasyon olması bu duruma örnek olarak gösterilebilir. Diğer bir mekanizma ise antibiyotiklerin hücre içine alımında görevli olan efluks pompa sisteminin mutasyon ile modifiye edilmesidir. Örnek olarak *Pseudomonas aeruginosa* daki OprD porin yokluğu veya ekspresyonundaki azalma, karbapenem grubu antibiyotiklerin hücre duvar geçirgenliğini azaltmasına yol açması verilebilir (21).

Kazanılmış direnç ise bakterinin yapısal veya düzenleyici genlerinde mutasyon olması veya plazmit, bakteriyofaj, transpozon ve diğer hareketli genetik elemanlar aracılığıyla yabancı bir direnç geninin bakteriye girmesi ile oluşur. Kazanılmış direnç çeşitli mekanizmalarla gerçekleşmektedir. Bu mekanizmalar;

- 1. İlacın hedefinde değişiklik olması:** Penisilin bağlayan proteinlerin değişimi β -laktamlara karşı direnç oluşmasına, ribozomal hedefin değişimi aminoglikozit, makrolit, linkozamitlere karşı direnç gelişmesine, değişmiş

enzimatik hedef ise sulfonamid, trimetoprim, rifampin, kinolon direncinin oluşmasına yol açar.

2. Sentezlenen enzimle ilacın inaktif veya modifiye edilmesi: β -laktamaz, asetilaz, adenilaz ve fosforilaz gibi aminoglikozitleri modifiye eden enzimler ve kloramfenikol asetil transferaz gibi enzimlerin ilacı inaktif veya modifiye etmesine bağlı olarak direnç kazanılabilir.

3. Hücreye giren veya biriken ilaç miktarının azalması

- a. Geçirgenliğin (permeabilite) azalması,
- b. Antibiyotiğin alım ve transport sisteminin zayıflığı veya yokluğu,
- c. Aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması gibi nedenlerden dolayı direnç gelişebilir (22).

4.3. Yatay Gen Aktarımı ile Antibiyotik Direncinin Yayılımı

Yatay gen aktarımı (YGA) aynı jenerasyondaki bakteriler arasında genetik materyalin transferi olarak adlandırılır ve bakteri popülasyonunda genetik çeşitliliğe yol açar (23). Yatay gen transferi ile aktarılan yabancı DNA konak bakteri içinde hareketli genetik elemanlar aracılığıyla mobilize olurlar (24). Yabancı DNA'nın YGA aracılığıyla kazanılması antimikrobiyal direnç gelişiminde önemlidir. Klinik uygulamalarda kullanılan çoğu antimikrobiyal ajan doğal olarak çevrede çoğunlukla da toprakta bulunur veya topraktan köken alır. Doğal olarak antibiyotik direnç genlerini içeren bakteriler çevreyle ilişkili oldukları için hastane kökenli izolatların bu direnç genlerini kazanmasında çevrenin verimli bir kaynak olduğunu düşündüren güçlü kanıtlar vardır. Bu genetik değişim antibiyotik direncinin yayılmasında önemli rol oynamaktadır (25).

Hareketli genetik elemanlar (HGE) konak genom arasında fiziksel olarak hareket etme kapasitesine sahip olduklarından dolayı bakteri popülasyonunda yaygın olarak bulunurlar (23). Bu genetik elemanlar bakterinin genom boyutunda ve bakteri patojenitesinde değişikliklere sebep olarak bakterilerin genomunun değişimine yol açarlar (24). HGE'ler iki şekilde karşımıza çıkabilir. Bunlardan ilki bir bakteriden diğerine antibiyotik direncinin aktarılmasında görevli konjugatif direnç plazmidleri ve direnç transpozonları, diğeri ise aynı hücrede bir genetik bölgeden diğerine hareket

etmekte görevli elemanlardır (26). Bu elemanlar plazmidler, bakteriyofajlar, genomik adalar, integratif ve konjugatif elementler, insersiyon sekansları, transpozonlar, integronlar ve küçük ters tekrarlı dönüştürülebilir elementlerdir. Hareketli genetik elemanların yatay gen transferi patojen bakteriler arasında çoklu ilaç direncinin yayılması ve rekombinasyonun ortaya çıkmasına neden olur (23).

4.3.1. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Yatay Gen Aktarım Mekanizmaları

Antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında çeşitli yatay gen aktarım mekanizmaları bulunmaktadır. Bu mekanizmalar konjugasyon, transformasyon, transdüksiyon olarak adlandırılır (26).

4.3.1.1. Konjugasyon

Bakteriyel konjugasyon, hücreler arasında doğrudan temas gerektiren ve plazmid, konjugatif transpozon gibi mobilize olabilen DNA moleküllerinin verici hücreden alıcı hücreye aktarılmasını sağlayan genetik değişim mekanizmasıdır. İlk kez *E. coli*'nin farklı suşları arasındaki DNA transferini tanımlamak için önerilmiştir (27, 28).

Günümüzde, konjugasyon teknikleri hemen hemen tüm kültür edilebilen gram negatif bakterilerde kullanılmış, bunun yanında bazı gram pozitif bakterilerde de rapor edilmiştir (29). *E. coli*'deki konjugasyon ve gen transferi, fertility faktör veya seks faktörü (F) olarak adlandırılan sirküler bir plazmit DNA tarafından gerçekleştirilir. Eğer bir hücre F plazmiti taşıyorsa F^+ , taşımıyorsa F^- olarak adlandırılır. F plazmitleri, plazmitlere birçok önemli özellik kazandıran yaklaşık 100 gen içerirler. Bu özellikler:

1. F plazmit, hücre bölünmesi sırasında kendi DNA'sını çoğaltabilir.
2. F plazmit taşıyan hücre, bakteri hücre yüzeyinde bulunan ve hücrelerin birbirine yapışmasını sağlayan pili denilen yapıları sentezler. Bu sayede iki hücre birbirine konjuge olur.
3. F^+ ve F^- hücreler arasında konjugasyon olabilir. Konjugasyon meydana geleceği zaman F^+ hücre verici hücre olarak görev yapar. F plazmit DNA'sı replike olur ve yeni sentezlenen sirküler F molekülünün kopyası F^- hücrelere aktarılır. Alıcı hücre artık sirküler F genomuna sahip olduğu için F^- 'den F^+ 'ya dönüşmüştür.
4. F^+ hücreler daima diğer F^+ hücrelerle temastan kaçınırlar. Bu yüzden F plazmitler F^+ hücreden F^+ hücreye aktarılmazlar.

5. Bazen F hücre kendi genomunda, insersiyon sekansı (IS elementleri) olarak adlandırılan hareketli genetik elemanları taşıyabilir. Bu IS elementleri konak kromozomu içinde bir yerden başka bir yere veya kromozom ve plazmit arasında hareket edebilir. IS elementlerinin hem plazmit içinde hem de kromozomda bulunması crossing-over (çapraz geçiş) olayına yol açar. İki sirküler DNA arasında çapraz geçiş olması plazmitin bakteri kromozomuna entegre olmasına neden olur. Entegrasyon gerçekleştiği zaman F kendi DNA'sı ile alıcı hücredeki bütün konak kromozomunda transfer edebilir. Bazen F faktör konak kromozomuna entegre olabilir. Bu yapı "high frequency of recombination" (Hfr) olarak adlandırılır.
6. Entegre olmuş F faktör bazen bir Hfr hücresinin kromozomundan ayrılır ve bazı nadir durumlarda birkaç konak kromozomuna ait genlerle birlikte sitoplazmaya geri döner. F' olarak adlandırılan bu değiştirilmiş F taşıdığı bu konakçı genleri alıcı bir hücreye (F⁻) aktarabilir. Böylece alıcı hücre aynı genin iki kopyasını içermektedir. Bu iki kopyadan biri bakteri kromozomu üzerinde diğeri ise yeni aktarılan F' faktöründe bulunmaktadır (30).

Relaksaz, konjugasyonda önemli bir proteindir. Çünkü kısa DNA sekansı olarak adlandırılan ve bir plazmitin konjugal olarak aktarılması için gerekli, *cis* formunda olan tek DNA sekans dizisini tanımaktadır. Relaksaz konjugasyonun başlangıç ve bitiş aşamalarını katalizler. Diğer bir deyişle verici hücredeki *oriT*'nin ayrılmasını katalizler. Sonuç olarak aktarılacak olan DNA zinciri üretilir ve alıcı hücreye taşınan DNA'nın son ligasyonu konjuge plazmit olarak yeniden oluşturulur (31).

4.3.1.2. Transformasyon

Doğal transformasyon verici hücre tarafından serbest bırakılan serbest DNA'nın bir alıcı hücre tarafından alınıp genomun bir parçası haline gelmesi olarak adlandırılır. İlk kez 1928'de Frederick Griffith tarafından *Streptococcus pneumoniae*'da yapılan bir deneyde bu suşun doğal transformasyon yaptığı gösterilmiştir.

Birçok bakteri çevreden DNA'yı almak için fiziksel olarak hazır bir hale gelmesi gerekmektedir. Competence (uyumluluk) olarak adlandırılan bu durumda bakteri DNA'yı alır ve bu DNA'yı genomunun bir parçası haline getirir. DNA'nın hücreye alımı üç safhada gerçekleştirilir. Bu safhalar çift iplikli DNA'nın (dsDNA) alıcı hücre duvarına bağlanması, DNA zincirinin tek iplik (ssDNA) haline getirilmesi için

parçalanması ve tek ipliğin hücre içine aktarılmasıdır (32). Eğer tek iplikli DNA genoma entegre olursa, bakteri genetik rekombinasyon sayesinde doğal olarak transform edilmiş olur. Bazı bakteriler doğal olarak transformasyon için uyumludurlar (33). En az 60 bakteri türünün transformasyon için doğal olarak uyumlu olduğu tanımlanmıştır. *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Acinetobacter baylyi* bu bakterilere örnek olarak verilebilir (34, 35).

4.3.1.3. Transdüksiyon

Transdüksiyon, bağımsız olarak çoğalabilen bakteriyofaj veya fajlar aracılığıyla DNA'nın bakterilere aktarılmasıyla oluşan genetik değişim mekanizmasıdır. Bu mekanizmada enfekte eden bir faj, bakteri kromozomunu parçalayıp kendi DNA'sını çoğaltmak için konağı aracı olarak kullanır (36). Transdüksiyon olayı iki şekilde karşımıza çıkabilir. Bunlardan genelleştirilmiş transdüksiyon, verici hücre genomunun bir parçasının alıcı hücreye ya litik ya da lizojenik (ılımlı) bir faj aracılığıyla aktarılmasıdır. Özelleşmiş transdüksiyon ise yalnızca lizojenik fajlar aracılığıyla verici hücreye ait birkaç spesifik genin alıcı hücreye aktarılmasıdır (37).

Litik siklusta, litik faj üretken olan bir safhaya girer. Bu safhada faj genomu replike olur, faj kapsiti ve kuyruk proteinleri bakteriyal hücre mekanizmalarını kullanılarak sentez edilir. Sonrasında faj genomu yeniden oluşmuş faj parçalarının içine yerleşir ve bu yapılar bakteri lizisi sonucu serbest kalırlar. Lizojenik siklusta, lizojenik bir faj genomu bakteri kromozomuna entegre olur (profaj) ve latent veya dormant bir şekilde kalır. (c) Pseudo siklusta ise faj genomu konak hücreye aktarılır fakat bu hücrede uygun koşullar olmadığı için (besin eksikliği) genom replike olmadan hücrede kalır. Yeniden uygun koşullar sağlandığında replike olmamış preprofaj ya litik siklusa ya da lizojenik siklusa uğrayarak yaşamına devam eder (38).

4.3.2. Yatay Gen Aktarılmasında Rol Oynayan Hareketli Elemanlar

4.3.2.1. Plazmidler

Plazmidler bakterilerde yaygın olarak bulunan ekstrakromozomal genetik elementlerdir. Bu DNA molekülleri, bakteri kromozomuna kıyasla nispeten küçüktürler. Boyutları birkaç kilobaz olacağı gibi 150 kb'den daha büyük boyutlara da sahip olabilirler. Plazmitler genellikle sirküler yapıdadır ancak *Borrelia* ve *Streptomyces*'lerin bazı türlerinde lineer halde bulunurlar. Plazmitler antibiyotik direnç genleri gibi konakçı

bakteri için yararlı genleri taşırlar. Plazmitler direnç gen belirleyicilerini taşımalarının yanında Hg^{+2} gibi metal iyonlarına, klorheksidin veya kuaterner amonyum bileşikleri gibi bazı antiseptik/dezenfektan bileşiklere ve hatta UV ışınlarına karşı direnç genleri taşıyabilirler (39). Birçok direnç plazmiti konjugatif, yani hücreden hücreye DNA aktarımını, özellikle de kendi transferini teşvik etmek için gerekli olan fonksiyonları kodlarlar. Diğer plazmitler ise hücrede bulunan konjugatif bir plazmit tarafından desteklendiklerinde mobilize olabilirler.

Genel olarak, mobilize olabilen plazmitler iki hücrenin hücre-hücre temasında rol oynayan genlerden yoksundurlar. Ancak kendi DNA'larının aktarılmaları için gerekli olan genleri kodlarlar. İki hücrenin teması konjugatif plazmitler aracılığıyla gerçekleşir. Dolayısıyla, mobilize olabilen direnç plazmitleri, direnç geni dahil olmak üzere bazı genleri kodlayan, nispeten 10 kb'den daha küçük iken, konjugatif plazmitler, 30 kb ya da 100 kb'den daha büyük plazmitlerdir (24).

Bir plazmitin replikasyonu temel olarak plazmitin mutlak kopya sayısını ve farklı konakta ve büyüme koşullarındaki stabilitesini belirler. Kopya sayısının belirlenmesi plazmit populasyon biyolojisinde önemlidir çünkü kopya sayısı ne kadar yüksek olursa replikasyon olasılığı da o kadar yüksek olur. Böylece evrim diğer plazmitleri ortaya çıkarmak için bir plazmitin kopya sayısını artırma eğiliminde olacaktır (40).

Plazmit replikonları bir veya daha fazla replikasyon orjini (ori) ve Rep proteinleri gibi birkaç düzenleyici elemanlardan oluşurlar ve DNA fragmanının 4 kb'lık bölgesine yerleşirler. Ayrıca plazmitler, DNA replikasyonuna yardımcı olan birkaç temel gene de sahiptirler. Bakteri plazmit replikasyonunun moleküler mekanizması, *E. coli* kromozomunun replikasyon orijinine benzerlik gösterir.

Plazmit Replikasyon Mekanizmaları

Plazmitlerde replikasyon vejetatif replikasyon orjini oriV olarak bilinen bölgede başlamaktadır. Plazmitlerde teta tip, rolling circle ve strand displacement (iplik yer değiştirme) replikasyon olmak üzere 3 çeşit replikasyon mekanizması bulunmaktadır. Bazı teta tip replikasyon yapan plazmitler tekrarlı DNA sekansları veya iteron adı verilen 20 bp'lık DNA tekrarlarını içerirler. Bu DNA tekrarları replikasyon başlatıcı protein olan Rep proteinine bağlanarak replikasyonu başlatırlar. Replikasyon kontrol mekanizması yaygın olarak iki iteron içeren plazmit olan pPS10 ve R6K'da

çalışılmıştır. ColE1 ailesi plazmitleri diğer bir teta tip replikasyon yapan plazmitlerdendir. Bu plazmitlerin çoğalmasa kesinlikle bir antisens RNA ile kontrol edilir (41). Rolling-circle replikasyon mekanizması bazı küçük çok kopyalı plazmitlerde bulunur. Bu plazmitlere örnek olarak stafilokoklarda identifiye edilmiş pT181 (Inc14), pC194 (Inc8), pMV158 (Inc11), pUB110 (Inc13) plazmitleri verebiliriz (42). Benzer plazmitler *Bacillus* ve *Actinobacteria*'larda da bulunmaktadır (43, 44).

Plazmitler replikasyon şekilleri ve bir bakteride yaşamlarını sürdürme durumlarına göre incompatibility (Inc) – uyumsuzluk grupları içinde kategorize edilirler (45). Plazmit uyumsuzluğu, iki plazmitin aynı bakteri hücresinde birkaç nesilde stabil olarak birlikte bulunamaması olarak ifade edilir. Genellikle yakından ilişkili olan plazmitler uyumsuz olma eğilimindedirler. İki plazmitin uyumsuz olmasının en önemli sebebi her iki plazmitin de aynı özgüllüğü olan Rep proteini ya da kontrol elemanları olan bir replikasyon mekanizmalarına sahip olmalarıdır (46). Inc gruplarında replikasyon benzerliğinden dolayı aynı Inc grup plazmitleri aynı bakteri hücresinde bulunamazlar (47, 48). Plazmitlerin identifikasyonu ve sınıflandırılmasında kullanılan Inc grupları konjugatif plazmitlerle ilişkilidir. Inc gruplarında yer alan plazmitlerin direnç genlerinin yayılmasında önemli rolleri vardır (48, 49). Konjugatif olduğu bilinen birçok plazmid incompatibility grubu vardır (50). Genetik benzerlik ve pilus yapılarına göre Inc grup plazmitler 4 grupta incelenir. İlk grup IncF-benzeri konjugatif plazmit olarak adlandırılır ve IncF, IncS, IncC, IncD ve IncJ gibi plazmit gruplarını kapsar. İkinci grup IncP-benzeri konjugatif plazmit grubudur ve IncP, IncU, IncM, IncQ ve IncW gruplarını içermektedir. Üçüncü grup plazmitler IncP plazmit grubuyla benzerlik gösterirler fakat farklı pilus yapılarına sahiptirler. Bu gruptaki plazmitler Ti plazmit grubu olarak adlandırılırlar ve IncX, IncH, IncN ve IncT plazmitleri içerirler. Dördüncü grup IncI grup ise IncP plazmitler ile genetik benzerliği olan fakat kendine özgü pilus özellikleri olan plazmitlerdir. IncI, IncB ve IncK gruplarından oluşur. İlk iki grupta yer alan plazmitler özellikle klinik izolatlarda birçok ilaç direncinin konjugatif aktarılmasında rol oynar. İlk konjugatif plazmitler olan 100 kb IncF ve 60 kb RK2 (IncP) plazmitleri tamamen sekanslanmıştır. Gram negatif bakteriler için prototipik plazmit sistemleri olarak bilinirler (51).

Hem insan hem de hayvanlarda direnç genleri asıl olarak IncF, IncI, IncN, IncA/C, IncL/M ve IncK plazmit ailesi üyeleri tarafından aktarılmaktadır. Bunlardan

IncF grubuna ait plazmitler daha az çeşit bakteri türleri arasında yayılmaları nedeniyle dar konak spektrumlu, IncA/C ve IncN gruplarına ait olan plazmitler ise daha geniş bakteri popülasyonları arasında yayılmalarından dolayı geniş spektrumlu olarak da adlandırılırlar. Dar ve geniş spektrumlu plazmitler direnç genleri kazanma eğilimleri ve *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında hızlıca yayılma yeteneklerine sahiptirler (52). Epidemik plazmitlerdeki antimikrobiyal direnç belirleyicileri, yüksek riskli klonlara seçici bir avantaj sağlar ve muhtemelen dirençli hale gelmeleri ve yayılmalarında önemli rol oynarlar (53). Patojen bakterilerde yer alan plazmitler ile direnç genlerinin yayılması tüm dünyada β -laktamlar, kinolonlar, aminoglikozitler, tetrasiklinler, sulfonamidler ve birçok diğer antibiyotiklere karşı direnç gelişmesine sebep olur (27).

4.3.2.2. Transpozonlar

Transpozonlar, bir hücrenin genomunda farklı yerlere hareket edebilen sıçrayıcı gen sistemi olarak adlandırılan elemanlardır. Yapılarındaki farklılık, genetik ilişkiler, transpozisyon mekanizması ve taşıdıkları direnç genlerinin çeşitlerine göre farklı yapıda bulunabilirler (26). Transpozonlar genellikle *Enterobacteriaceae* ailesindeki klinik dirençten sorumludur (54).

Transpozonlar, insersiyon sekansları (IS elementleri), transpoze olabilen bakteriyofajlar olarak adlandırılan küçük elemanları kapsarlar ve plazmitlere veya konak kromozomuna entegre olabilirler. Rekombinasyonda rol oynayan terminal tekrar dizileri vardır ve spesifik genom bölgelerinden bir transpozonu eklemek veya çıkarmak için gerekli olan bir proteini (örneğin, transposaz veya rekombinaz) tanırlar. Transpozonlar konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyon yoluyla aktarılırlar (örneğin, MRSA'da bulunan *mecA* geni) ve kromozomlardaki genlerden daha hızlı yayılır. Konjugatif transpozonlar plazmitlerin özelliklerine sahiptirler ve endojen plazmitlerin bir mikroorganizmadan diğerine transfer edilmelerine yardımcı olabilirler (55).

4.3.2.3. İntegronlar

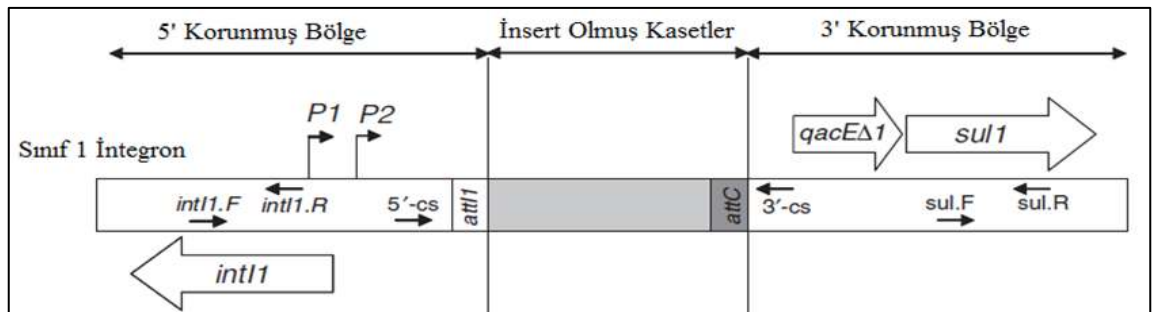
İntegronlar, antibiyotik direnç gen kasetlerini içeren bu yüzden direnç determinantlarının yakalanması, yayılımı ve rekombinasyonunda rol oynayan mobil genetik elemanlardır (15). Genellikle hareketsizdirler ve sıklıkla transpozon ve plazmit gibi hareketli genetik elemanlar üzerine yerleşmişlerdir. İntegronlar çoğunlukla

antibiyotik direnç genlerinin tür içi ve türler arasında yayılmalarına aracılık ederler (56). İlk kez 1989'da Ruth M. Hall ve Christina M. Collis tarafından rapor edilmelerinin ardından ilerleyen yıllarda integronların hareketliliği ve gen kasetlerinin integrasyon ve eksizyonlarının da dahil olduğu moleküler mekanizmaları araştırılmış ve doğrulanmıştır. Son on yıldır integronların klinik mikroorganizmalardaki varlıkları ve antibiyotik direncinde rol oynadıkları ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır (23). Biyoinformatikçiler yaptıkları çalışmalarda integron içeren bakteri genomunun bir kısmını veya tamamını sekansladıklarında integronların veya integras genlerinin genomun yaklaşık %10-17'sini oluşturduklarını analiz etmişlerdir. İntegronların çoğu başlangıçta insan klinik izolatlarında tanımlanmalarına rağmen şimdilerde su ve toprak gibi klinik olmayan ortamlarda da varlıkları gösterilmiştir (57).

İntegronların Yapısı

Sınıf 1 İntegronların Yapısı

Sınıf 1 integronlar genel olarak korunmuş bölgeler olan 5'korunmuş bölge (5'CS) ve 3' korunmuş bölge (3'CS) ile gen kasetlerinin yerleşmiş olduğu variable region (VR) olarak adlandırılan değişken bir bölge içerirler (58). 5'korunmuş bölge temel olarak 3 yapı içerir. Bu yapılar tirozin rekombinaz enzimini kodlayan integras gen (*intI*), *attI* olarak bilinen rekombinasyon bölgesi ve insert olan gen veya gen kasetlerinin ekspresyonunda görevli olan bir promotor bölgeden (P) oluşur. 3'CS bölgesi ise *qacEΔ1* olarak adlandırılan defektif kuaterner amonyum direnç geni ve sulfonamidlere dirençten sorumlu olan *sulI* geni içerirler. Bu iki korunmuş bölge arasında bulunan değişken bölge ise çeşitli antibiyotik direnç kasetlerinin girdiği 59 baz çiftlik *attC* gen bölgesi içerir. Bu bölge rekombinasyonun olduğu bölgedir (59).

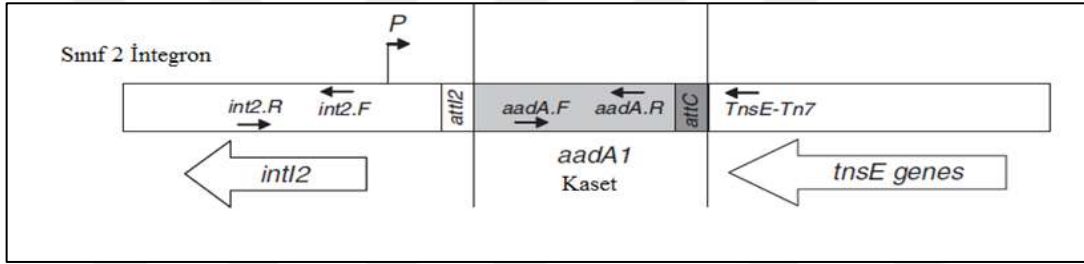


Şekil 1. Sınıf 1 integronun yapısı (60).

Ayrıca sınıf 1 integronlar MITE olarak adlandırılan minyatür ters tekrarlı transpoze olabilen elemanlar, *tniR*, *tniQ*, *tniB*, *tniA* genlerini içeren *Tn402* transpozon, mercury direnç transpozon taşıyan *mer* operon bölgesi ve IS olarak adlandırılan transpoze olabilen eleman bölgelerini de içermektedir (61).

Sınıf 2 İntegronların Yapısı

Sınıf 2 integronların yapısına baktığımız zaman sınıf 1 integronlara benzer yapılar görülmektedir. 5' korunmuş bölgesinde sınıf 1 integronlardaki aynı fonksiyona sahip *intI2*, *attI2* ve bir promotor bölge (P) yer alır. 3' korunmuş bölgesinde sınıf 1 integronlardan farklı olarak *sul* genlerini içermezler. Genellikle *Tn7* transpozon üzerinde bulunduklarından *tnsE* genlerini içermektedirler. Sınıf 2 integronlar yaygın olarak *dfrA1*, *sat2* ve *aadA1* direnç gen kasetlerini içermektedirler (62).



Şekil 2. Sınıf 2 integronun yapısı (60).

Gen Kasetleri

Gen kasetleri integronların değişken bölgelerine *attI* ve *attC* olarak adlandırılan rekombinasyon bölgelerinden girerler ve integronların bir parçası haline gelirler (57). Antibiyotik direnci taşıdığı bilinen en az 130 farklı gen kaseti tanımlanmıştır. Gen kasetlerinde bulunan direncin β laktam, aminoglikozit, kloramfenikol, streptotrisin, trimetoprim, rifampin, eritromisin, kinolon, fosfomisin, linkomisin ve antiseptik olan kuaterner amonyum bileşikleridir (63).

İntegronların Sınıflandırılması

İntegronlar bazı bakteri türlerinde bulunan, gen kasetleri olarak adlandırılan küçük hareketli elemanları yakalama kapasitesine sahip genetik yapılardır (64). Eskiden integronlar 2 major grup altında incelenmiş, direnç integronları ve süper integronlar olarak adlandırılmıştır. Direnç integronları çoğunlukla antibiyotik ve dezenfektanlara karşı direnç genlerini içeren gen kasetlerini taşırlar. Bu integronlar ya kromozom ya da

plazmit üzerinde yerleşmiş olabilirler. Süper integronlar ise büyük kromozomlara yerleşmiş integronlar olarak bilinirler ve birçok fonksiyona sahip gen kasetlerini içerirler. Üç sınıf direnç integronları bilinmektedir. Bunlar sınıf 1, sınıf 2 ve sınıf 3 olarak adlandırılmaktadır. Çoğu direnç integronları sınıf 1 integron sınıfına aittir. Süper integronlar *Geobacter sulfurreducens*, *Listonella pelagia*, *Nitrosomonas europaea*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas mendocina*, *Pseudomonas* spp., *Pseudomonas stutzeri*, *Shewanella oneidensis*, *Shewanella putrefaciens*, *Treponema denticola*, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio fischerii*, *Vibrio metschnikovii*, *Vibrio mimicus*, *Vibrio parahaemolyticus* ve *Xanthomonas campestris* türlerinde tanımlanmıştır (65).

İntegronlar ilk önce antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında rol oynamaları nedeniyle klinik çalışmalarda keşfedilmiş ve büyük ölçüde bu alanda çalışılmıştır. Bu çalışmalarda sınıf 1, sınıf 2 ve sınıf 3 olarak bilinen 3 sınıf integron tanımlanmıştır. Daha sonraları diğer integronlara ait integras genleri (*intI*4, 5, 6, 7 ve 8) farklı çevrelerden izole edilmiş ve böylece yeni integron sınıfları keşfedilmiştir. Günümüzde sekans analizleri sayesinde çevresel örneklerden yüzlerce integrona ait integras genleri tespit edilmiştir (66).

Sınıf 1 İntegronlar

Sınıf 1 integronlar yaygın olarak gram negatif bakterilerde bulunur ve bu integronlarda 60 tane gen kaseti identifiye edilmiştir (67). Sınıf 1 integronlar *Tn21* gibi transpozonlar üzerinde tespit edilmişlerdir ve prototip sayılırlar (59). *Tn21* transpozonlar büyük konjugatif plazmitler üzerinde bulunurlar (68). Sulfonamid direncinden sorumlu *sul1* ve streptomisin ve spektinomisin direncinden sorumlu *aadA1* gen kasetlerini içerirler (69). Klinik suşlarda yapılan çalışmalarda sınıf 1 integronların en yaygın bulunan integron sınıfı oldukları ve antibiyotik direncinin yayılmasında sorunlara yol açtıkları gösterilmiştir (23). Sınıf 1 integronlar *Acinetobacter*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Proteus*, *Burkholderia*, *Alcaligenes*, *Campylobacter*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Escherichia* gibi gram negatif bakterilerde rapor edilmiştir (70).

Sınıf 2 İntegronlar

Sınıf 2 integronlar çoğu kez replike olmayan *Tn7* transpozon ailesi ile ilişkilidir (71). *Tn7* transpozonlar 14 kb'lık bakteri transpozonudur ve hücrede spesifik bir bölge bulunduğu zaman transpozisyon mekanizmasını aktive ederler (72). *Tn7* transpozonları hücreye transpoze olacakları zaman konjugatif plazmitleri tercih ederler. Bu transpozonlar diğer bakteriyel transpozonlar gibi antibiyotik direnç genlerini taşırlar (73). *Tn7*'nin integronu ve sınıf 1 integron benzer organizasyonlara sahiptir ve üç tane direnç gen kaseti taşırlar. Bunlar trimetoprim direncinden sorumlu dihidrofolat redüktaz (*dfrA1*), streptotrisin direncinden sorumlu streptotrisin asetil transferaz (*sat2*) ve streptomisin/spektinomisin direncinden sorumlu aminoglikozit adenil transferaz (*aadA1*) gen kasetleridir (71). Sınıf 2 integronlar *Salmonella*, *Acinetobacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Aeromonas* ve *Morganella*'da bulunmuştur (70).

Sınıf 3 İntegronlar

Sınıf 3 integronlar *Tn402* transpozonlar tarafından yakalanırlar. Sınıf 1 integronlarda olduğu gibi transpozona ters oryantasyonda yerleşirler. Sınıf 3 integraz geni (*intI3*) sınıf 1 integraz genine (*intI1*) %60 oranında benzerlik gösterir. Sınıf 3 integronlar integron sınıfları arasında en az bulunmalarına rağmen hızla gelişmekte, yeni türlere aktarılmakta ve yeni direnç kasetleri kazanmaktadırlar (74). Sıklıkla *Serratia*, *Klebsiella*, *Escherichia*, çevresel *Enterobacter*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Alcaligenes xylosoxidans* ve son zamanlarda *Citrobacter* türlerinde karakterize edilmişlerdir (75).

Sınıf 4 ve Sınıf 5 İntegronlar

Sınıf 4 ve sınıf 5 integronlar kapsamlı olarak çalışılmamıştır ve *Enterobacteriaceae*'nin herhangi bir üyesinde bugüne kadar rapor edilmemiştir. Sınıf 4 integronlar *Vibrio* türlerinde trimetoprim ve sülfametoksazol (SXT) direncinden sorumludurlar ve integratif ve konjugatif elemanlar içinde taşınırlar. Sınıf 5 integron ise transpozonun bir parçası olan *Vibrio salmonicida* pRSV1 plazmitinde tespit edilmiştir (74).

İntegronlarda yer alan gen kasetleri hareketli yapılar olmalarına rağmen bazı kombinasyonları integronlarda sabit halde bulunurlar. Sınıf 1 integronlardaki *dfrA17*-

aadA5, *dfrA1-aadA1* ve *dfrA12-orfAaadA2* gen kasetleri ile sınıf 2'deki *dfrA1-sat1-aadA1* gen kasetleri örnek olarak verilebilir (76).

Tüm bu sınıflandırmanın yanı sıra integronlar içeriklerine göre hareketli ve kromozomal integronlar olarak iki farklı gruba da ayrılırlar. Kromozomal integronlar sayıları 0 ila 100 arasında değişen ve genellikle antimikrobiyal direnç içermeyen gen kasetlerini taşıyabilirler. Kromozomal integronların aksine sınıf 1 integron gibi hareketli integronlar ise belirli sayıda gen kasetleri içerirler ve sıklıkla antimikrobiyal direncin yayılmasında görev alırlar (58). Kromozomal integronlar bulundukları bakteri genomunun çok büyük bir bölümünü oluşturabilirler. *Vibrio* cinsinde bulunan ve süper integron olarak adlandırılan yapılar 200'den fazla gen kasetini bulundurabilirler. Bu konu ile ilgili yapılan en iyi çalışma *Vibrio cholerae*'ya ait süper integronlardır. Bu integronlar yaklaşık 175 kaset içerir ve genomun %3'ünü oluştururlar. Kromozomal integronların klinikle alakalı bakterilerle olan ilişkileri aktarılabilir elemanlar veya konjugatif plazmitler aracılığıyla sağlanır. Bu olay aynı ve farklı türler arasında integronların aktarılmasına ve bu integronların hareketli integronlar olarak sınıflandırılmasına olanak sağlar (77).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Çalışma Grubu

Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Eğitim ve Hizmet Laboratuvarı'na Ocak - Aralık 2014 tarihleri arasında gönderilen 107 hastaya ait kan kültüründen izole edilen 112 *E. coli* izolatu kullanıldı. Her hastadan izole edilen ilk izolat ve 4 hafta veya daha uzun süre arayla izole edilen ikinci izolat farklı epizot kabul edilerek çalışmaya dahil edildi (78).

5.1.2. Araç ve Gereçler

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı ve Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ait 37°C'lik etüv (Memmert BM 600, Almanya), biyogüvenlik kabini (Class II Safety Cabinet, Powtech, Türkiye), biyogüvenlik kabini (Clean Air, Hollanda), 4°C buzdolabı (Profilo), -20°C derin dondurucu (Bosch, Almanya), UV spektrofotometre (Eppendorf, ABD), -80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific mod U570 premium, Thermo, ABD), pastör fırını (Nüve, Türkiye), vorteks (Isolab), dikey model otoklav (Kermanlar, Türkiye), çalkalayıcı su banyosu (Memmert GFL 1086, Almanya), çalkalayıcı inkübator (N-biotek, Kore), pH metre (Hanna, Romanya), manyetik karıştırıcı (Stuart, Türkiye), mikrodalga fırın (Beko, Türkiye), buz makinesi (Scotsman AF 80, İtalya), terazi (KERN & SOHN GmbH, Almanya), hassas terazi (Sartorius Laboratory, Almanya), deiyonize su cihazı (Barnstead, Türkiye), bunsen beki, santrifüj (BECKMAN COULTER, ABD), santrifüj (Eppendorf, Almanya), santrifüj (Sigma, Almanya), termal döngü cihazı (Techne, İngiltere), elektroforez tankı (OWL electrophoresis system, ABD), UV illüminatör (UUP, ABD), MALDI-TOF MS (Microflex™, BRUKER, Almanya), Phoenix™ 100 (Becton Dickinson diagnostic instrument systems, Sparks, Md, ABD) cihazları kullanıldı. Sarf malzeme olarak; 1.5 mL'lik santrifüj tüpleri, 0.2 mL'lik PZR tüpleri (Isolab, Almanya), pipet ucu (10 µL, 100 µL, 1000 µL), otomatik pipet (10 µL, 20 µL, 100 µL, 1000 µL), deney tüpleri, 250 mL'lik erlenmayer, 50 mL'lik mezür, cam balon joje, 50 mL'lik ve 15 mL'lik falkon tüpler, kaynatma kabı, jel dökümantasyon tepsi ve taraklar, Oak Ridge tüpleri kullanıldı.

5.1.3. Kimyasallar

dATP (deoksi adenin trifosfat), dGTP (deoksi guanozin trifosfat), dCTP (deoksi sitozin trifosfat), dTTP (deoksi timidin trifosfat) (Sibenzyme, Almanya), primerler (Invitrogen, ABD), master mix bileşenleri (Promega, ABD), tris (Amresco, ABD), sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, Almanya), fosfat tamponlu tuz (PBS, Sigma-Aldrich, ABD), gliserol (Riedel-de Haen, Hollanda), 1 kb DNA marker (Qiagen, Almanya), agar (Acumedia, ABD), agaroz (Quantum, Yeni Zellanda), gram boyama seti (GBL, Türkiye), 100bp DNA marker (Biomatik, ABD), bromfenol mavisi, ksilen siyanol, glukoz, etidyum bromür, sodyum dodesil sülfat (SDS), sefadeksG-50, IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), X-gal (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl β -D-Galactopyranoside) (Sigma-Aldrich, ABD), potasyum asetat (AppliChem, Almanya), glasiyal asetik asit (Merck, Almanya), rifampisin (RIF, Türkiye), trimetoprim (Sigma-Aldrich, ABD), ampisilin (Sigma-Aldrich, ABD) kullanıldı.

5.1.4. Besiyerleri

Çalışmada bakterilerin üretilmesinde koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye), Eozine Metilen Blue agar (EMB) (Oxoid, İngiltere), Luria Bertani broth (LB broth) (Lab M, İngiltere) kullanıldı.

Konjugasyon deneylerinde Luria Bertani agar (LB), 100 μ g/mL ampisilin, 300 μ g/mL rifampisin, 25 μ g/mL trimetoprim içeren LB agar kullanıldı.

5.1.5. Çözeltiler

5.1.5.1. Master Mix İçin Kullanılan Çözeltiler

dNTP mix:

Mikrosantrifüj tüplerine 100 mM'lık dATP, dGTP, dCTP, dTTP stoklarından 10'ar μ L alınıp 360 μ L deiyonize suda çözüldü. Karışım vorteksenerek 2.5 mM'lık dNTP stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan karışım steril ependorf tüplere 250 μ L'lik hacimler halinde bölündü ve kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

Primer mix:

Liyofilize haldeki primerler; üretici firmanın talimatlarına uygun olarak stok konsantrasyonları 100 pmol/ μ L olacak şekilde steril distile su ile sulandırılıp stoklar

hazırlandı. Santrifüj tüplerine stok karışımdan her bir primer çifti için 20 µL transfer edildi ve üzerine 180 µL steril enjeksiyonluk su eklenerek son konsantrasyonu 10 pmol/µL olan primer çalışma stoğu hazırlandı. Çalışma stokları kullanılıncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

5.1.5.2. Agaroze Jel Elektroföresi İçin Kullanılan Çözeltiler

50X TAE Tamponu:

Bir beher içersine 242 g Tris Base ve 500 mL distile su koyulup Tris Base çözüline kadar manyetik karıştırıcı ile karıştırıldı. Karışıma 57.1 mL glasiyal asetik asit ve 100 mL 0.5 M EDTA eklenerek karışım berraklaşana kadar karıştırıldı. Karışımın son hacmi distile su ile 1 L’ye tamamlandı. Stok solüsyon oda sıcaklığında muhafaza edildi. Çalışmada 1X’lik TAE tamponu kullanıldı.

Yükleme Tamponu:

Yükleme tamponu hazırlamak için; 250 mg bromfenol mavisi, 250 mg ksilen siyanol, 30 mL gliserol bir miktar distile su içinde karıştırıldıktan sonra karışım 1.5 mL’lik santrifüj tüplerine 1 mL olacak şekilde dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Etidyum Bromür:

Etidyum bromür 50 mg tartılarak 10 mL distile su ile manyetik çalkalayıcı üzerinde homojenize edildi. Son konsantrasyonu 5 mg/mL olan karışım koyu renkli cam şişeye koyulup oda sıcaklığında muhafaza edildi.

5.1.5.3. Plazmit DNA İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Solüsyon I: 50 mM glukoz

25 mM Tris-HCl (pH 8.0)

10 mM EDTA (pH 8.0)

Bütün malzemeler deiyonize su ile hazırlandı. 121°C’de 1 atm basınçta 20 dk otoklavlandıktan sonra filtre ile steril edilen glukoz eklendi ve 4°C’de saklandı.

Solüsyon II: 0.2 N NaOH

% 1 SDS

Her deney aşamasında steril deiyonize su ile taze olarak hazırlandı.

Solüsyon III: 5 M potasyum asetat (30 mL)

Glacial asetik asit (5.75 mL)

Steril distile su (14.25 mL)

Hazırlanan solüsyon 121°C’de 1 atm basınçta 20 dk otoklavlandıktan sonra oda sıcaklığında muhafaza edildi.

DNA Binding Resin ve Guanidin Çözeltisi

23.64 g Guanidin

2.5 mL 1 M Tris.HCl (pH 7.0)

2 mL 0.5 M EDTA

Malzemeler karıştırıldı ve hacim distile su ile 50 mL’ye tamamlanarak guanidin solüsyonu hazırlandı. Diatomaceous earth (diatom toprağı) 3 saat boyunca distile su ile yıkanarak konsantrasyonu 250 mg/mL olacak şekilde DNA binding matriksi hazırlandı. Bu karışımdan 1 mL alınıp 50 mL guanidin solüsyonuna eklendi ve 4°C’de saklandı.

0.5 M EDTA

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda 73.05 g etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, MW: 292.2 g./mol) tartılıp distile su ile 500 mL’ye hazırlandı. Solüsyonun berraklaşması için manyetik çalkalayıcı üstündeki solüsyona NaOH peleti ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Solüsyonun pH’sı 8.0’a ayarlanarak 121°C’de 1 atm’de 30 dk otoklavda steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

1 M Tris-HCl

Ticari Tris-HCl’den (MW:157.60 g./mol) 78.8 g tartılıp distile su ile 500 mL’ye hazırlandı. Solüsyonun pH’sı HCl ile 7.5’e ayarlandı. Daha sonra 121°C’de 1 atm’de 30 dk otoklavda steril edildi. Sterilizasyon işleminden sonra solüsyon oda sıcaklığında saklandı.

TE (Tris/EDTA) Tamponu

1 M Tris-HCl solüsyonundan son konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl olacak şekilde (5 mL) alındı. 0.5 M EDTA solüsyonundan son konsantrasyonu 1 mM EDTA olacak şekilde (1 mL) alındı. Ardından distile su ile (494 mL) hacim 500 mL'ye tamamlandı. Solüsyon çalışmalarda kullanılıncaya kadar oda sıcaklığında saklandı.

5.2. Yöntem

5.2.1. İzolatların İdentifikasyonu ve Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Çalışmaya dahil edilen tüm örnekler %5 koyun kanlı agar (Salubris, Türkiye) ve EMB agara (Oxoid, England) inoküle edilerek $35 \pm 2^\circ\text{C}$ 'de bir gece inkübe edildi. EMB agarda pembe-kırmızı, metalik röfle yapan, kanlı agarda düzgün 2-3 mm çapında laktoz pozitif *E. coli* olduğu düşünülen şüpheli kolonilerden gram boyama yapıldı. Gram negatif basil olduğu belirlenen kolonilere oksidaz testi yapıldı. *Enterobacteriaceae* ailesine ait olduğundan şüphelenilen oksidaz negatif, gram negatif basillere ait koloniler konvansiyonel yöntemlere ek olarak MALDI-TOF MS cihazında tür düzeyinde tanımlandı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda Phoenix identification/antimicrobial susceptibility testing (ID/AST) (Becton Dickinson Diagnostic Instrument Systems, Sparks, Md, USA) otomatize mikrobiyoloji sisteminde antimikrobiyal duyarlılık testleri çalışıldı. *E. coli* olarak tiplendirilen izolatlar DNA izolasyonu yapılıncaya kadar %15 gliserol içeren LB broth besiyerinde -80°C 'de saklandı.

5.2.2. Moleküler Yöntemler

5.2.2.1. DNA İzolasyonu

Hücre duvar ve membran parçalama prensibine dayanan kaynatma metodu yöntemi ile DNA izolasyon işlemi gerçekleştirildi (79). Tür düzeyinde tanımlama yapıldıktan sonra -80°C 'de saklanmış olan *E. coli* izolatları çıkartılıp EMB besiyerine ekilerek aerobik koşullarda 37°C 'de 20-24 saat inkübe edildi. Saflığından emin olunan kolonilerden tek koloni alınıp 3 mL LB broth besiyerine ekim yapıldı ve 37°C 'ye ayarlanmış çalkalayıcı su banyosunda 200 rpm'de bir gece inkübe edildi. Üreyen kültürün 1.5 mL'si steril ependorf (1.5 mL) tüplere transfer edilerek mikrosantrifüjde 10000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı döküldü ve peletin üzerine 1 mL steril distile su eklenip vortekslendi. 5000 rpm'de 5 dk çöktürme işlemi gerçekleştirildi.

Süpernatant döküldü ve peletin üzerine 1 mL steril distile su eklenip vortekslendi. Süpernatant döküldükten sonra peletin üzerine 1mL steril distile su eklendi ve bakteri süspansiyonu 95°C’de 15 dk kaynatıldı. Kaynatma işleminin ardından bakteri süspansiyonu 13000 rpm’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmından 200 µL alınıp PZR tüplerine eklendi. İzole edilen DNA’lar çalışılncaya kadar -20°C’de muhafaza edildi.

5.2.2.2. Master Mix Hazırlanması

Master mix aşamasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 1’de belirtildi.

Tablo 1. PZR reaksiyonunda kullanılan master mix bileşenleri ve miktarları

Reaksiyon bileşenleri	Stok konsantrasyon	Miktar (µL) 1X
Buffer	5X	10
dNTP mix	2.5 mM	1
MgCl ₂	25 mM	3
Primer 1	10 pmol/µL	1
Primer 2	10 pmol/µL	1
<i>Taq</i> polimeraz	5 U/µL	0.2
Steril deiyonize su		31.8
Template (Kalıp DNA)		2
Toplam hacim		50

Master mix hazırlama aşamasında bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Tablo 1’de belirtilen bileşenler -20°C’den çıkartılıp buz üzerinde çözünmeleri sağlandı. Çözündükten sonra tüpler kısa bir süre vortekslenerek master mix bileşenleri 1.5 mL’lik ependorf tüpe transfer edildi. Hazırlanan master mix karışımı 30 sn vortekslendikten sonra santrifüj işlemi yapıldı. Her bir PZR tüpüne (0.2 mL’lik) 48 µL master mix karışımı ve 2’şer µL DNA eklendi. Negatif kontrol olarak su, pozitif kontrol olarak ise daha önceden her gen için pozitif olan bakteri DNA’sı kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi ve uygun programda çalıştırıldı.

5.2.2.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR reaksiyonunda *E. coli* izolatlarının kaynatma metodu ile elde edilen DNA'ları kullanıldı. Antibiyotik direncinin yayılımında rol oynayan integronların varlığı araştırıldı. Pozitif kontrol olarak daha önceden integron varlığı belirlenmiş *E. coli* KD39 (sınıf 1 integron pozitif) ve *E. coli* hec15 (sınıf 2 integron pozitif) suşları kullanıldı.

İntegraz ve İntegron Gen Varlığının Belirlenmesi

E. coli izolatlarındaki sınıf 1 ve sınıf 2 integron varlığının araştırılması için kullanılan primerler Tablo 2'de gösterildi. Çalışmada uygulanan PZR reaksiyon koşulları literatür önerileri doğrultusunda gerçekleştirildi (80, 81).

Tablo 2. PZR deneylerinde kullanılan oligonükleotid primerler

Primer	Nükleotid dizisi (5'→ 3')	Hedef Gen Bölgesi	Referans
IntI-1F	GGTCAAGGATCTGGATTGG	Sınıf 1 integron integraz geni (<i>intI1</i>)	80
IntI-1R	ACATGCGTGTAATCATCGTC		
IntI-2F	CACGGATATGCGACAAAAAGGT	Sınıf 2 integron integraz geni (<i>intI2</i>)	80
IntI-2R	GTAGCAAACGAGTGACGAAATG		
5'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG	Sınıf 1 integron değişken bölge	80
3'-CS	AAGCAGACTTGACCTGA		
hep51	GATGCCATCGCAAGTACGAG	Sınıf 2 integron değişken bölge	81
hep74	CGGGATCCCGGACGGATGCACGATTTGTA		

5.2.3. İzolatlardaki İntegronlarda Bulunan Gen Kasetlerinin Analizleri

İzolatlardaki integras gen varlığının belirlenmesinde 500 bp uzunluğundaki sınıf 1 integras gen bölgesi için *intI*-1F ve *intI*-1R; 740 bp uzunluğundaki sınıf 2 integras gen bölgesi için ise *intI*-2F ve *intI*-2R primerleri kullanıldı. İntegraz gen pozitif çıkan örneklerde integron taraması yapıldı. Bu amaçla integronların değişken bölgelerinin çoğaltılmasında sınıf 1 integron için 5'CS ve 3'CS, sınıf 2 integron için ise *hep51* ve *hep74* primerleri kullanıldı (Tablo 2). PZR reaksiyonu için termal döngü cihazında kullanılan koşullar Tablo 3'de belirtildi.

Tablo 3. PZR reaksiyon koşulları

Aşama	Sıcaklık (°C)	Süre (dk)	Döngü sayısı
İlk denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	30
Bağlanma	55	1	
Uzama	72	1	
Son uzama	72	10	1

5.2.4. Agaroz Jel Elektroforez Aşaması ve Jelin Görüntülenmesi

Jelin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan %2'lik agaroz jelin hazırlanması için; 1 g agaroz tartıldı ve 50 mL TAE tamponu eklenerek mikrodalga fırında agaroz eriyene kadar çözüldü. Su banyosunda bekletilerek sıcaklığı 55°C'ye ayarlanan jele son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklendi. Jel tablası düz bir zemin üzerine yerleştirildi ve içersine jel tarağı koyuldu. Jel düzeneğe döküldü ve katılaşması için oda sıcaklığında bekletildi.

Örneklerin Agaroz Jele Yüklenmesi

Tarak katılaştıran agaroz jelden dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve jel içinde TAE tamponu bulunan yatay elektroforez tankına yerleştirildi. DNA'nın kuyucuktan çıkmaması ve örneğin jel üzerinde izlenebilmesi için yükleme tamponu kullanıldı. 10 µL PZR ürünü ve 3 µL yükleme tamponu karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklendi. Örneklerin jelde dağılmaması için ilk etapta jel düşük voltta yürütüldükten sonra elektroforez tankının hızı 80-100 volt aralığına çıkartıldı. Oluştan bantlar UV transilluminatörde gözlemlendi ve jelin fotoğrafı jel görüntüleme cihazında çekildi.

5.2.5. İzolatlardaki İntegronların Klonlanması

5.2.5.1. PZR Ürünlerinin Temizlenmesi

PZR ürünlerinin temizlenmesi için High Pure PCR Clean up Micro Kit (Roche, Almanya) kullanıldı. Kit protokolüne göre;

- PZR işlemi sonucunda PZR ürün hacmi ddW ile 100 µL'ye tamamlandı. Üzerine 400 µL bağlama solüsyonu eklenip vortekslendikten sonra tüp santrifüj edildi.

- Filtreli tüp toplama tüpü içine yerleştirildi. Pipet yardımıyla hazırlanan karışım filtreli tüp içine transfer edilip 8000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
- Filtreli tüp çıkartılıp toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve filtreli tüp tekrar yerine yerleştirildi. Aynı tüp içine 400 µL yıkama solüsyonu eklendi ve 8000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
- Filtreli tüp çıkartılıp toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve filtreli tüp tekrar yerine yerleştirildi. 300 µL yıkama solüsyonu eklendi ve 8000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
- Filtreli tüp çıkartılıp toplama tüpündeki sıvı boşaltıldı ve filtreli tüp tekrar yerine yerleştirildi. Maksimum hızda 1 dk santrifüj edildi.
- Filtreli tüp çıkartıldı ve temiz bir 1.5 mL’lik ependorf tüpe yerleştirildi. Tüpler alkolün tamamen uzaklaşması için ağzı açık bir şekilde 50°C’de 15-20 dk bekletildi.
- Filtreli tüpün tam ortasına gelecek şekilde tüplere 20 µL elüsyon tamponu eklendi ve tüpler 8000 g’de 1 dk santrifüj edildi.

Temizlenmiş ürünler %0.8’lik agaroz jelde 3 µL olacak şekilde yürütüldü ve fotoğrafları çekildi.

5.2.5.2. pGEM-T Easy Vektör Sistemine Ligasyon Aşaması

Kit protokolüne göre ligasyon karışımı Tablo 4’de verilen oranlarda hazırlandı.

Tablo 4. Ligasyon aşamasında kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Standart Reaksiyon (µL)	Pozitif Kontrol (µL)
2X Rapid Ligation Buffer,T4 DNA Ligase	5	5
pGEM-T or pGEM-T Easy Vector (50 ng)	1	1
PZR ürünü	3	-
Kontrol Insert DNA	-	2
T4 DNA Ligase (3 Weiss units/ µL)	1	1
Final hacim için steril deiyonize su	10	10

Hazırlanan karışım 1 saat oda sıcaklığında bekletildi.

5.2.5.3. Kompetan Hücre Hazırlanması ve Transformasyonu

Kompetan Hücre Hazırlanması

- *E. coli* JM 109 suşundan 5 mL bir gecelik kültür hazırlandı.
- % 0.2 glukoz içeren LB broth içine bir gecelik kültürden 1/100 oranında eklendi ve çalkalamalı su banyosunda inkübe edildi. OD 600'da ilk ölçüm yapıldı. Ardından yarım saat veya birer saat aralıklarla OD ölçümü yapıldı.
- Bakteri yoğunluğu OD 600'de 0.3-0.5 olana kadar bakteri üremesi devam ettirildi.
- Uygun yoğunluğa ulaşan kültür steril oak ridge tüplerine ya da steril falkon tüplerine aktarıldı ve 4°C'de 10000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi.
- Oak ridge tüpler buz üzerine yerleştirildi. Süpernatant dikkatli bir şekilde atılıp pelet 0.5-1 mL TSS Buffer ile süspanse edildi.
- Kompetan hücre hazırlandıktan sonra ependorf tüplere 100 µL hacimlerde olacak şekilde bölündü ve -80°C'de saklandı.

Transformasyon İşlemi

- Ligasyon aşamasından sonra 100 µL kompetan hücre üzerine 5 µL ligasyon karışımından eklendi. Ependorflar el ile hafifçe tüplerin dış çeperlerine vurularak karıştırıldı ve buz üzerinde ortalama 40 dk bekletildi.
- Ardından tüpler 42°C'de 2 dk bekletildi. Süre sonunda tüp kıpırdatılmadan tek hamlede buz üzerine alındı.
- Tüpler 2.5-3 dk buzda bekletildi.
- Transformasyon işlemi sonrası hücreler 0.9 mL 20 mM glukozlu LB broth içerisine ilave edildi. Tüpler 37°C'de 110 rpm'de 1 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon işleminin ardından hücreler 1.5 mL ependorf tüplere aktarıldı ve tüpler 14000 rpm'de 1 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı. Peletler tüpün dibinde kalan sıvı ile pipet yardımı ile resüspanse edildi.

LB agar (100 µg/mL ampisinli) plakları üzerine 40 µL izopropil-β-D-tiyogalaktopiranozit (IPTG) (100 mM) ve 40 µL X-gal (20 µg/mL) plağın 4-5 noktasına damlatıldı ve baget ile tüm plak yüzeyine yayıldı. Plakların kuruması için 10 dk bekletildi.

- Resüspanse edilmiş bakterilerden tüpte kalan hacmin hepsi LB agar (100 µg/mL ampisinli) yüzeyine baget ile yayma ekim yapıldı ve plaklar 37°C’de bir gece inkübe edildi.

5.2.5.4. Klonların Seçilmesi ve Plazmit DNA İzolasyonu

İnkübasyon sonrası mavi-beyaz koloni seçimi yapıldı. Beyaz koloniler sarı pipet ucu ile alındı ve 3 mL LB broth (ampisilinli) içeren tüplere aktarıldı. Tüpler 37°C’de 150 rpm’de bir gece inkübe edildi.

Plazmit DNA İzolasyonu

- Transforme edilmiş hücre plaklarından (beyaz kolonilerden) bir koloni alınıp 3 mL LB broth (100 µg/mL ampisilinli) besiyerinde bir gece inkübe edildi.
- Üreyen kültür 1.5 mL’lik steril ependorf tüplere aktarıldı ve tüpler 12000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
- Süpernatant atıldı ve pelet üzerine 100 µL Solüsyon I eklendi. Tüpler pelet iyice çözülene kadar vortekslendi ve vorteks işleminin ardından 5 dk oda sıcaklığında bekletildi.
- Tüplerin üzerine taze hazırlanmış 200 µL Solüsyon II eklendi. Tüpler el ile yavaşça alt-üst ederek (8-10 kez) karıştırıldı ve buzda 5 dk bekletildi.
- Tüplere 150 µL Solüsyon III eklendi (Solüsyon III buzda bekletilmiş olmalıdır). Tüpler el ile yavaşça alt-üst ederek karıştırıldı ve 3-5 dk buzda bekletildi.
- Tüpler 4°C’de 12000 g’de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan kısmından 500 µL alınıp steril başka bir ependorf tüpe aktarıldı.
- Tüplerin üzerine 500 µL DNA bağlama rezini eklenip tüpler hafifçe alt-üst edildi.

- Karışımdan 600 µL alınıp kolon içeren tüplere aktarıldı. Kolon içeren toplama tüpleri 4°C’de 12000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
- Toplama tüpleri içindeki sıvı boşaltıldı ve kolon üzerine 500 µL yıkama solüsyonu eklenip tüpler 12.000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
- İşlem sonrası quick spin yapılarak alkol artığı uzaklaştırıldı.
- Kolonlar steril ependorf tüpler içine aktarıldı. Alkolün tamamen uzaklaşması için ependorflar ağzı açık şekilde 50°C’de 15-20 dk bekletildi.
- 50°C’de bekletilmiş elüsyon solüsyonundan 50 µL eklenip 2-3 dk bekletildi.
- Tüpler 12000 g’de 1 dk santrifüj edildi.
- İzole edilen plazmitler kullanılıncaya kadar -20°C’de saklandı.

Plazmitler % 0.8’lik agaroz jelde yürütüldü. Her kuyucuğa 2 µL yükleme tamponu ve 2 µL plazmit yüklendi. Jel 50 V’da 40 dk yürütüldükten sonra UV ışık kaynağında görüntülendi ve fotoğrafı çekildi (82).

5.2.6. Plazmit DNA’ların Sekans Analizleri

Sekans analiz işlemleri KTÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalında Genetik Analizör 3130 DNA dizi analizi cihazında (Applied Biosystems, ABD) gerçekleştirildi.

Sekans Reaksiyon Aşaması

Örnekler ABI Prism Big Dye™ Terminatör Reaksiyon Kiti ile döngü sekansı için hazırlandı. Bu amaçla Tablo 5’de verilen bileşenler örnek sayısına göre belirlendikten sonra uygun hacimlerde karıştırıldı ve PZR tüplerine bölündü. Plazmit DNA’lar jelde marker ile yürütüldükten sonra reaksiyona koyulacak plazmit DNA miktarı sekans işlemlerinde kullanılan markırdaki bant yoğunluğuna göre belirlendi. Karışım Tablo 5’de belirtilen miktarlar doğrultusunda toplam hacim 10 µL olacak şekilde hazırlandı. Örnek sayısına göre herbir tüpte 2.82 µL karışım olacak şekilde bölündü. DNA miktarı değişken olduğu için, reaksiyon başına düşen DNA ve su miktarı toplam hacim 10 µL olacak şekilde hesaplanıp reaksiyona ilave edildi. Pozitif kontrol olarak daha önceden sekansı yapılmış örnek kullanıldı.

Tablo 5. DNA sekans reaksiyonunda kullanılan bileşenler ve miktarları

Bileşenler	Stok Konsantrasyonu	1X Miktar (µL)
Big dye reaksiyon karışımı	2.5X	1
Sekanslama tamponu	5X	1.5
Primer F	10 pmol/ µL	0.5
Steril deiyonize su		Değişken
Kalıp DNA		Değişken
Toplam reaksiyon hacmi		10

Reaksiyonda 96°C’de 2 dk ilk denatürasyondan sonra 96°C’de 15 sn denatürasyon, 50°C’de 15 sn primer birleşmesi, 60°C’de 2 dk uzama ve 4°C’de 20 dk son uzama işlemlerinden oluşan 25 döngü uygulandı.

Sefadeks Kolon Hazırlanması ve Örneklerin Kolondan Geçirilmesi

50 mL’lik falkon tüp içine 1 g sefadex-G50 ve 15 mL enjeksiyonluk su eklendi. Sefadeks iyice çözünene kadar tüp yavaş bir şekilde karıştırıldı. Kullanmadan önce tüp en az 30 dk +4°C’de bekletildi. Filtreli kolonların her birine 600 µL sefadeks eklendi ve tüpler 850 g’de 2 dk santrifüj edildi. Kolonlar dikkatli bir şekilde alınıp temiz bir ependorf tüpe yerleştirildi. Sekans reaksiyonundan çıkan örnekler sefadeks kolonun tam orta kısmına kolonu zedelemekten bırakıldı. Tüpler 850 g’de 5 dk santrifüj edildikten sonra kolondan geçirilen örnekler sekans cihazına yerleştirildi.

Sekans işlemi sonucunda ChromasPro programı yardımıyla örneklerle ait kromotogram dosyaları alındı ve örneklerle ait DNA dizileri çıkartıldı. Bu DNA dizileri BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ve CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) programları kullanılarak analiz edildi (83).

5.2.7. İntegron İçeren İzolatlarda Konjugasyon Deneyi ile Plazmit DNA Transferi

Plazmit DNA’nın transfer deneyleri broth mating (sıvıda çiftleşme) prensibine dayanılarak gerçekleştirildi (84, 85). Deneylerde verici hücre olarak integron içeren *E. coli* izolatları, alıcı hücre olarak *E. coli* J53-2 (met pro Rif^R) izolatı kullanıldı.

Alıcı ve verici hücrelerden tek koloni alınıp 3 mL LB broth besiyerine ekildi ve çalkalayıcı inkübatörde 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda alıcı ve

verici hücre süspansiyonundan eşit hacimde (1:1) alınıp temiz bir tüpte dikkatli bir şekilde birleştirildikten sonra 37°C’de 20 saat çalkalamadan inkübe edildi. İnkübasyon sonunda transkonjugant karışımları vortekslendi ve uygun besiyerlere ekimleri yapıldı.

Bu amaçla alıcı hücrenin dirençli olduğu rifampisin (300 µg/mL) ve verici hücrenin dirençli olduğu (içerdiği integron direnç kasedine göre) trimetoprim (25 µg/mL) veya streptomisin (100 µg/mL) antibiyotikleri içeren LB agar besiyerleri kullanıldı. Transkonjugant karışımı vortekslendikten sonra 10⁻¹ dilüsyondan 100 µL, direk transkonjugant karışımdan 100 µL alınıp primer seleksiyon için 300 µg/mL rifampisin ve 25 µg/mL trimetoprim içeren LB agar plağına yayma ekim yapıldı. Plaklar 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. Primer seleksiyon plaklarında üreyen koloniler alınıp aşağıda belirtilen plaklara replika ekimleri gerçekleştirildi:

Plak 1: 300 µg/mL rifampisin ve 25 µg/mL trimetoprim içeren LB agar

Plak 2: 300 µg/mL rifampisin içeren LB agar

Plak 3: 25 µg/mL trimetoprim içeren LB agar

Primer seleksiyon plağı, Plak 1, 2 ve 3’de üreyen kolonilerin transkonjugant oldukları kabul edildi ve plaklar parafilm ile kapatıldıktan sonra çalışılınca kadar 4°C’de bekletildi.

5.2.7.1. Verici İzolatların Canlı Bakteri Sayısının Hesaplanması

Verici hücrelerin LB agara ekimleri yapıldıktan sonra agardan tek koloni alınıp 3 mL LB broth içeren tüplere ekimleri yapıldı ve 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler vortekslendikten sonra kültürlerin 10⁻¹’den 10⁻⁷’ye kadar dilüsyonları yapıldı ve 10⁻⁶ ve 10⁻⁷ dilüsyonlardan 100 µL alınıp LB agara yayma ekimler yapıldı. Plaklar 37°C’de 18-24 saat inkübe edildi ve koloni sayımı yapıldı. Canlı bakteri sayısının hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

Canlı Bakteri Sayısı (mL’de) = Agardaki Koloni Sayısı / Ekilen Miktar (mL) X Sulandırma Katsayısı

5.2.7.2. Konjugasyon Etkinliğinin Hesaplanması

İzolatlardaki konjugasyon etkinliğinin belirlenmesi için primer seleksiyon plağında üreyen transkonjugant kolonileri sayılıp mL’deki miktarı hesaplandı ve aşığıdaki formül kullanılarak konjugasyon etkinliği hesaplandı.

Konjugasyon Etkinliği = Transkonjugant Sayısı (mL’de) / Verici Hücre Sayısı (mL’de)

5.2.8. Transkonjugantlardan Plazmit DNA İzolasyonu

Transkonjugantlardan plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirmek için transkonjugant plaklardan 2 koloni seçilip antibiyotik içeren 3mL LB broth besiyerine ekim yapıldı. Kültürler 37°C’de 200 rpm’de çalkalamalı inkübatörde 18-24 saat inkübe edildi. Daha önceden belirtilen alkali lizis yöntemi ile plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi.

5.2.9. Transkonjugantlarda İntegron Varlığının PZR ile Doğrulanması

Transkonjugantlarda integron varlığının doğrulanması için transkonjugantlardan izole edilen plazmit DNA’lar 1/10 dilüe edilerek PZR reaksiyonu için kalıp olarak kullanıldı. Daha önceden *intI1* ve *intI2* genleri için kullanılan master mix reaksiyon bileşenleri ve koşulları kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi.

5.2.10. Konjugatif Plazmitlerin Incompatibility (Uyumsuzluk) Gruplarının Belirlenmesi

Direnç genlerinin yayılmasında önemli rolleri olan incompatibility (uyumsuzluk) (Inc) gruplarının belirlenmesi için “replicon typing” yöntemiyle Inc gruplarına özgü primerler kullanılarak PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Inc gruplarına ait primerler ve annealing sıcaklıkları Tablo 6’da verildi. *intI1* ve *intI2* genleri için kullanılan master mix reaksiyon bileşenleri kullanıldı.

Tablo 6. Inc gruplarının belirlenmesinde kullanılan primerler (86)

Inc grup	Bölge	Nükleotid dizisi (5'→ 3')	Ürün Uzunluğu (bp)	Bağlanma Sıcaklığı (°C)
IncN	<i>rep</i> 1	AGTTCACCACCTACTCGCTCC	164	55
	<i>rep</i> 2	CAAGTTCTTCTGTTGGGATTC		
IncP	<i>ori</i> T 1	CAGCCTCGCAGAGCAGGAT	110	57
	<i>ori</i> T 2	CAGCCGGGCAGGATAGGTGAAGT		
IncQ	<i>ori</i> T 1	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC	191	57
	<i>ori</i> T 2	GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG		
IncW	<i>ori</i> T 1	TCTGCATCATTGTAGCACC	317	51
	<i>ori</i> T 2	CCGTAGTGTTACTGTAGTGG		

6. BULGULAR

6.1. İzolatların Antibiyotik Duyarlılıkları

Klinik kan örneklerinden izole edilen 112 *E. coli* izolatının antibiyotik duyarlılıkları Phoenix™ 100 cihazı ile belirlendi. Çalışmaya dahil edilen izolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 7’de gösterilmiştir.



Tablo 7. Çalışmada kullanılan *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Antibiyotikler															TZP	SXT
		AK	SAM	ATM	CZ	FEP	CES	FOX	CAZ	CRO	CIP	ERT	CN	IPM	LEV	MEM		
1	TEC001	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	TEC002	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	TEC003	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	TEC004	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
5	TEC005	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
6	TEC006	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R
7	TEC007	S	I	R	R	S	S	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R
8	TEC008	S	R	R	R	R	R	S	S	R	I	S	R	S	S	S	R	R
9	TEC009	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
10	TEC010	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
11	TEC011	S	R	I	R	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S
12	TEC012	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
13	TEC013	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	S	I	S
14	TEC014	S	I	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R
15	TEC015	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	R	S	R	S	I	R
16	TEC016	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
17	TEC017	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	S
18	TEC018	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
19	TEC019	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
20	TEC020	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R
21	TEC021	S	R	R	R	I	S	S	I	R	S	S	R	S	S	S	S	R
22	TEC022	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
23	TEC023	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
24	TEC024	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I	S
25	TEC025	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R

Tablo 7 (devamı) Çalışmada kullanılan *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Antibiyotikler															TZP	SXT
		AK	SAM	ATM	CZ	FEP	CES	FOX	CAZ	CRO	CIP	ERT	CN	IPM	LEV	MEM		
26	TEC026	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
27	TEC027	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
28	TEC028	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
29	TEC029	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
30	TEC030	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
31	TEC031	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
32	TEC032	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33	TEC033	S	R	S	R	S	S	S	I	S	R	S	S	S	R	S	S	R
34	TEC034	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	S	R	S	R	S	I	R
35	TEC035	S	R	I	R	S	R	I	R	R	S	S	S	S	S	S	I	S
36	TEC036	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
37	TEC037	S	R	R	R	R	S	S	I	R	S	S	R	S	S	S	S	R
38	TEC038	S	R	S	R	I	I	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
39	TEC039	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
40	TEC040	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S
41	TEC041	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
42	TEC042	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
43	TEC043	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	R
44	TEC044	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
45	TEC045	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R
46	TEC046	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
47	TEC047	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
48	TEC048	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
49	TEC049	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
50	TEC050	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tablo 7 (devamı) Çalışmada kullanılan *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Antibiyotikler															TZP	SXT
		AK	SAM	ATM	CZ	FEP	CES	FOX	CAZ	CRO	CIP	ERT	CN	IPM	LEV	MEM		
51	TEC052	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
52	TEC053	S	R	R	R	R	I	I	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
53	TEC054	S	R	I	R	S	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R
54	TEC055	S	R	S	R	S	S	I	S	S	R	S	R	S	R	S	S	R
55	TEC056	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
56	TEC057	S	R	S	R	S	S	I	S	S	R	S	S	S	R	S	S	R
57	TEC058	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
58	TEC059	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
59	TEC060	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R
60	TEC061	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
61	TEC062	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
62	TEC063	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
63	TEC064	S	R	R	R	I	S	S	R	R	S	S	R	S	S	S	S	R
64	TEC065	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
65	TEC066	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
66	TEC067	S	R	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R
67	TEC068	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
68	TEC069	S	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	S	R	S	S	R
69	TEC070	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S
70	TEC071	S	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
71	TEC072	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
72	TEC074	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
73	TEC075	S	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	I	R
74	TEC076	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	I	R
75	TEC077	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tablo 7 (devamı) Çalışmada kullanılan *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Antibiyotikler															TZP	SXT
		AK	SAM	ATM	CZ	FEP	CES	FOX	CAZ	CRO	CIP	ERT	CN	IPM	LEV	MEM		
76	TEC078	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	S	I	R
77	TEC080	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
78	TEC081	S	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R
79	TEC082	S	R	R	R	S	I	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R	R
80	TEC083	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
81	TEC084	S	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
82	TEC085	S	R	R	R	R	S	S	I	R	R	S	S	S	R	S	S	R
83	TEC086	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
84	TEC087	S	R	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	S	R	S	R	R
85	TEC088	S	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R
86	TEC089	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
87	TEC090	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R
88	TEC091	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	R
89	TEC092	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
90	TEC093	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
91	TEC094	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
92	TEC095	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
93	TEC096	S	R	R	R	R	S	S	I	R	R	S	R	S	R	S	S	S
94	TEC097	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
95	TEC098	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S
96	TEC099	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	S	S
97	TEC100	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
98	TEC101	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
99	TEC102	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
100	TEC103	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Tablo 7 (devamı) Çalışmada kullanılan *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Antibiyotikler																
		AK	SAM	ATM	CZ	FEP	CES	FOX	CAZ	CRO	CIP	ERT	CN	IPM	LEV	MEM	TZP	SXT
101	TEC104	S	R	R	R	I	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R
102	TEC105	S	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R
103	TEC106	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	R	R	S	S	R
104	TEC107	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
105	TEC108	S	R	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
106	TEC109	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
107	TEC110	S	R	R	R	R	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S	R
108	TEC111	S	R	R	R	I	R	S	S	R	R	S	R	R	S	S	S	R
109	TEC112	S	R	R	R	I	S	S	I	R	S	S	S	S	S	S	S	R
110	TEC113	S	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R
111	TEC114	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R
112	TEC115	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	S	R	S	R	S

TEC: Trabzon *E. coli*, AK: Amikasin, SAM: Ampisilin/sulbaktam, ATM: Aztreonam, CZ: Sefazolin, FEP: Sefepim, CES: Sefoperazon/sulbaktam, FOX: Sefoksitin, CAZ: Sefotazidim, CRO: Seftriakson, CIP: Siprofloksasin, ERT: Ertapenem, CN: Gentamisin, IPM: İmipenem, LEV: Levofloksasin, MEM: Meropenem, TZP: Piperasilin/tazobaktam, SXT: Trimetoprim/sülfametoksazol.

Çalışmada kullanılan 112 *E. coli* izolatından sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif bulunan 45 izolatın çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi ile belirlendi. İzolatların antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Antibiyotikler				
		AMP	STR	TET	NAL	CHL
1	TEC002	S	S	S	S	S
2	TEC004	S	S	S	S	S
3	TEC005	S	S	S	S	S
4	TEC006	S	S	S	S	S
5	TEC007	S	S	S	S	S
6	TEC008	S	R	R	R	I
7	TEC010	S	R	S	R	S
8	TEC012	S	R	S	S	S
9	TEC014	S	S	S	S	S
10	TEC015	S	R	S	I	S
11	TEC020	S	S	S	S	S
12	TEC021	S	R	R	R	R
13	TEC023	S	R	R	R	I
14	TEC025	S	R	R	R	I
15	TEC026	R	R	R	R	S
16	TEC027	R	R	R	S	S
17	TEC033	R	I	S	R	S
18	TEC034	R	I	R	R	S
19	TEC037	R	S	R	R	S
20	TEC043	R	S	S	R	S
21	TEC045	R	S	S	I	S
22	TEC055	R	R	R	R	R
23	TEC057	R	R	R	R	S
24	TEC060	R	S	R	R	S
25	TEC064	R	S	R	S	S
26	TEC067	R	R	S	S	S
27	TEC071	R	S	R	R	S
28	TEC072	R	R	R	S	R
29	TEC075	R	S	R	R	S
30	TEC076	R	R	R	R	S
31	TEC078	R	R	R	R	R
32	TEC081	R	R	R	S	R
33	TEC082	R	R	R	R	S
34	TEC083	S	R	R	R	S
35	TEC085	R	R	R	R	S

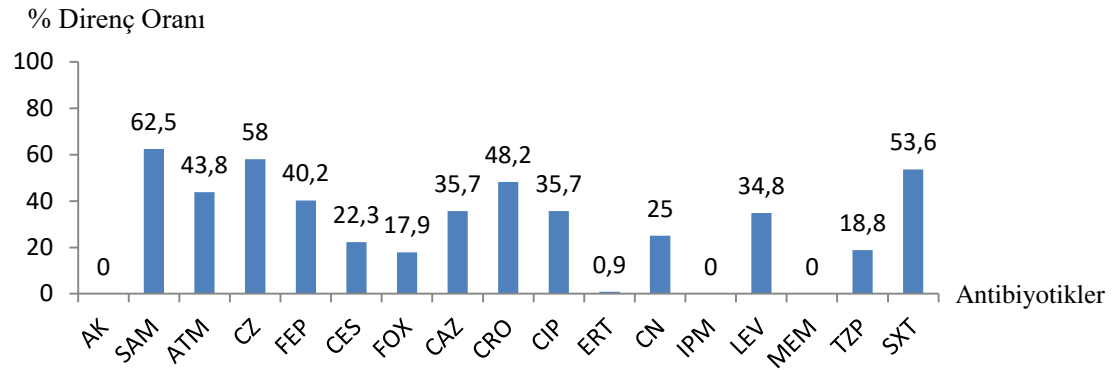
Tablo 8 (devamı) Sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	Antibiyotikler				
		AMP	STR	TET	NAL	CHL
36	TEC088	R	R	R	S	R
37	TEC090	R	R	R	R	S
38	TEC091	R	R	S	R	R
39	TEC095	R	I	R	R	S
40	TEC104	R	R	R	R	S
41	TEC105	R	R	R	R	S
42	TEC106	R	R	R	R	S
43	TEC108	R	R	R	S	R
44	TEC113	R	S	R	R	S
45	TEC114	R	R	R	S	R

AMP: Ampisilin, STR: Streptomisin, TET: Tetrasiklin, NAL: Nalidiksik asit, CHL: Kloramfenikol.

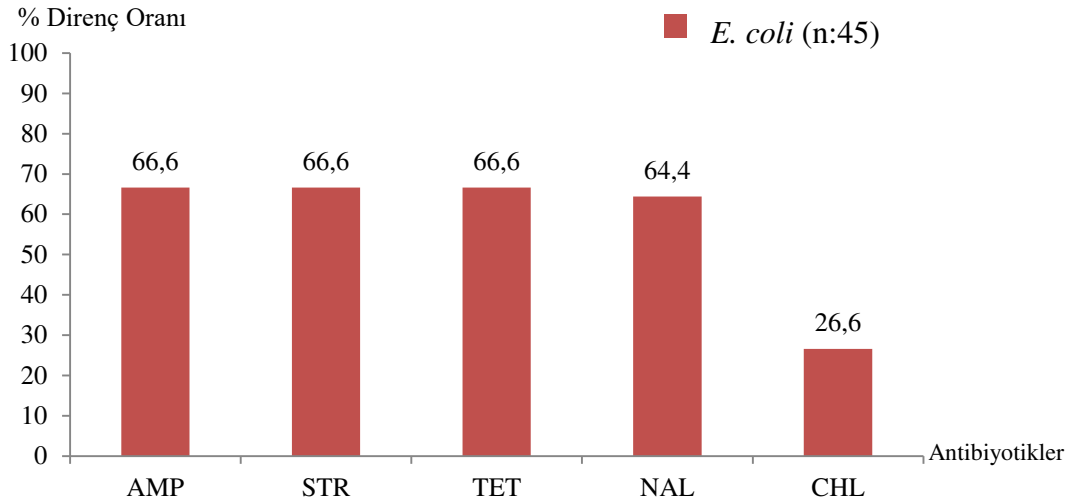
6.1.1. İzolatların Antibiyotiklere Direnç Oranları

Çalışmaya dahil edilen 112 *E. coli* izolatının çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranları Şekil 3’de gösterilmiştir (Orta duyarlı izolatlar dirençli olarak kabul edildi).



Şekil 3. Çalışmaya dahil edilen *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç oranları (Kısaltmalar Tablo 7’de gösterilmiştir).

Sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif bulunan 45 izolatın çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranları Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren *E. coli* izolatların antibiyotik direnç oranları. AMP: Ampisilin, STR: Streptomisin, TET: Tetrasiklin, NAL: Nalidiksik asit, CHL: Kloramfenikol.

6.2. PZR Yöntemiyle İntegraz Genlerinin ve İntegron Varlığının Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen 112 *E. coli* izolatından kaynatma metodu ile DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Sınıf 1 ve sınıf 2 integronun integraz gen bölgelerine ait spesifik primerler kullanılarak integraz gen varlığı araştırıldı. İntegraz gen pozitif çıkan örneklerde sınıf 1 ve sınıf 2 integron değişken bölgelerine ait spesifik primerler kullanılarak integron varlığı belirlendi.

6.2.1. *intI*-1 Gen Amplifikasyonu

Sınıf 1 integrona ait integraz gen bölgesinin belirlenmesi için *intI*-1 genine özgü primerler kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Buna göre 112 *E. coli* izolatının 51'si (%46) *intI*-1 geni pozitif olarak saptandı.

6.2.2. *intI*-2 Gen Amplifikasyonu

Sınıf 2 integrona ait integraz gen bölgesinin belirlenmesi için *intI*-2 genine özgü primerler kullanılarak amplifikasyon işlemi gerçekleştirildi. Buna göre 112 *E. coli* izolatının 7'si (%6) *intI*-2 geni pozitif olarak saptandı.

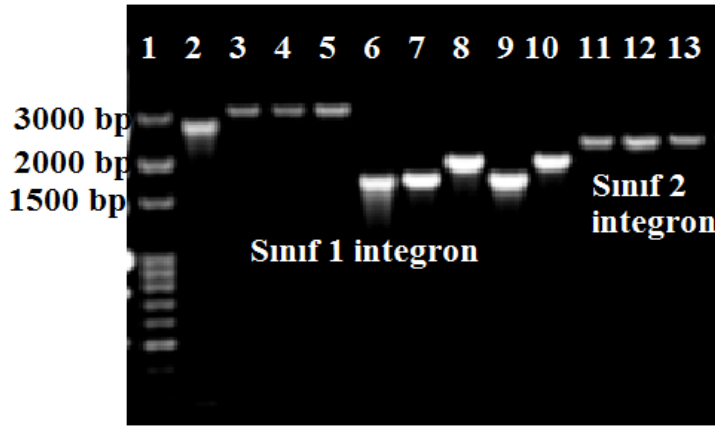
6.2.3. Sınıf 1 İntegron Amplifikasyonu

Sınıf 1 integron varlığının belirlenmesi için 5'CS ve 3'CS primerleri kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucu toplam 112 *E. coli* izolatının 38'inde (%33.9) sınıf 1 integron varlığı saptandı. Kalan 13 (%11.6) izolatın boş integron içerdikleri belirlendi.

6.2.4. Sınıf 2 İntegron Amplifikasyonu

Sınıf 2 integron varlığının belirlenmesi için hep51 ve hep74 primerleri kullanılarak yapılan amplifikasyon sonucunda 112 *E. coli* izolatının 7'sinde (%6.3) sınıf 2 integron varlığı saptandı.

İzolatlarda tespit edilen sınıf 1 ve sınıf 2 integronların agaroz jeldeki amplikonları Resim 1'de görülmektedir.



Resim 1. Bazı izolatlardaki sınıf 1 ve sınıf 2 integron amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1: 100 bp DNA marker (Invitrogen, ABD), 2: Sınıf 1 integron TEC002, 3: Sınıf 1 integron TEC064, 4: Sınıf 1 integron TEC078, 5: Sınıf 1 integron TEC091, 6: Sınıf 1 integron TEC005, 7: Sınıf 1 integron TEC015, 8: Sınıf 1 integron TEC057, 9: Sınıf 1 integron TEC064, 10: Sınıf 1 integron TEC064, 11: Sınıf 2 integron TEC004, 12: Sınıf 2 integron TEC012, 13: Sınıf 2 integron TEC026.

Toplam 112 *E. coli* izolatına ait integrona spesifik PZR sonuçları Tablo 9'da gösterilmiştir.

Tablo 9. İntegrone spesifik PZR sonuçları

Sıra No	İzolant Kodu	<i>intI</i> -1 geni	<i>intI</i> -2 geni	Sınıf 1 integron	Sınıf 2 integron
1	TEC001	-	-	-	-
2	TEC002	+	-	+	-
3	TEC003	-	-	-	-
4	TEC004	-	+	-	+
5	TEC005	+	-	+	-
6	TEC006	+	-	+	-
7	TEC007	+	-	+	-
8	TEC008	+	-	+	-
9	TEC009	-	-	-	-
10	TEC010	+	-	+	-
11	TEC011	-	-	-	-
12	TEC012	-	+	-	+
13	TEC013	-	-	-	-
14	TEC014	+	-	+	-
15	TEC015	+	-	+	-
16	TEC016	-	-	-	-
17	TEC017	-	-	-	-
18	TEC018	-	-	-	-
19	TEC019	-	-	-	-
20	TEC020	+	-	+	-
21	TEC021	+	-	+	-
22	TEC022	-	-	-	-
23	TEC023	+	-	+	-
24	TEC024	-	-	-	-
25	TEC025	+	-	+	-
26	TEC026	-	+	-	+
27	TEC027	-	+	-	+
28	TEC028	-	-	-	-
29	TEC029	+	-	-	-
30	TEC030	-	-	-	-
31	TEC031	+	-	-	-
32	TEC032	-	-	-	-
33	TEC033	-	+	-	+
34	TEC034	+	-	+	-
35	TEC035	-	-	-	-
36	TEC036	-	-	-	-
37	TEC037	+	-	+	-
38	TEC038	+	-	-	-
39	TEC039	-	-	-	-
40	TEC040	-	-	-	-
41	TEC041	-	-	-	-
42	TEC042	-	-	-	-
43	TEC043	+	-	+	-
44	TEC044	-	-	-	-

Tablo 9 (devamı) İntegrone spesifik PZR sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	<i>intI</i> -1 geni	<i>intI</i> -2 geni	Sınıf 1 integron	Sınıf 2 integron
45	TEC045	+	-	+	-
46	TEC046	+	-	-	-
47	TEC047	-	-	-	-
48	TEC048	-	-	-	-
49	TEC049	-	-	-	-
50	TEC050	-	-	-	-
51	TEC052	-	-	-	-
52	TEC053	-	-	-	-
53	TEC054	+	-	-	-
54	TEC055	+	-	+	-
55	TEC056	-	-	-	-
56	TEC057	+	-	+	-
57	TEC058	+	-	-	-
58	TEC059	+	-	-	-
59	TEC060	+	-	+	-
60	TEC061	-	-	-	-
61	TEC062	+	-	-	-
62	TEC063	-	-	-	-
63	TEC064	+	-	+	-
64	TEC065	-	-	-	-
65	TEC066	+	-	-	-
66	TEC067	+	-	+	-
67	TEC068	-	-	-	-
68	TEC069	-	-	-	-
69	TEC070	-	-	-	-
70	TEC071	+	-	+	-
71	TEC072	+	-	+	-
72	TEC074	-	-	-	-
73	TEC075	+	-	+	-
74	TEC076	+	-	+	-
75	TEC077	-	-	-	-
76	TEC078	+	-	+	-
77	TEC080	-	-	-	-
78	TEC081	-	+	-	+
79	TEC082	+	-	+	-
80	TEC083	+	-	+	-
81	TEC084	-	-	-	-
82	TEC085	+	-	+	-
83	TEC086	-	-	-	-
84	TEC087	+	-	-	-
85	TEC088	-	+	-	+
86	TEC089	-	-	-	-
87	TEC090	+	-	+	-
88	TEC091	+	-	+	-

Tablo 9 (devamı) İntegrone spesifik PZR sonuçları

Sıra No	İzolat Kodu	<i>intI</i> -1 geni	<i>intI</i> -2 geni	Sınıf 1 integron	Sınıf 2 integron
89	TEC092	+	-	+	-
90	TEC093	-	-	-	-
91	TEC094	-	-	-	-
92	TEC095	+	-	-	-
93	TEC096	-	-	-	-
94	TEC097	-	-	-	-
95	TEC098	-	-	-	-
96	TEC099	-	-	-	-
97	TEC100	-	-	-	-
98	TEC101	+	-	+	-
99	TEC102	+	-	+	-
100	TEC103	+	-	+	-
101	TEC104	-	-	-	-
102	TEC105	+	-	+	-
103	TEC106	-	-	-	-
104	TEC107	+	-	-	-
105	TEC108	-	-	-	-
106	TEC109	+	-	-	-
107	TEC110	+	-	+	-
108	TEC111	+	-	+	-
109	TEC112	-	-	-	-
110	TEC113	-	-	-	-
111	TEC114	+	-	+	-
112	TEC115	-	-	-	-

+: PZR sonucu pozitif, -: PZR sonucu negatif

6.3. İntegron İçeren İzolatlarda İntegron Gen Kasetlerinin Analizi

Çalışmaya dahil edilen 112 *E. coli* izolatında sınıf 1 ve sınıf 2 integron varlığı saptanan 45 izolattaki gen kaset içerikleri sekans analiz yöntemiyle belirlendi.

6.3.1. Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegronlara Ait Gen Kasetlerinin Belirlenmesi

38 izolatın içerdiği sınıf 1 integronlara yapılan sekans analizi sonucu trimetoprim ve streptomisin-spektinomisin dirençlerinden biri veya ikisinden sorumlu *dfrA7*, *dfr17-aadA5*, *dfrV*, *dfrA1-aadA1* ve *dfrA12-aadA2* olarak adlandırılan 5 tip gen kaseti belirlendi. 38 izolatın 7'sinin yaklaşık 800 bp uzunluğunda sınıf 1 integron içerdiği belirlendi. Bu 7 izolattaki 5 integronun *dfrA7*, 2 integronun *dfrV* gen kaseti içerdikleri saptandı. 20 izolatın 18 izolatın yaklaşık 1800 bp uzunluğunda *dfr17-aadA5*, 1 integronun *dfrA1-aadA1* ve 1 integronun da *dfrA12-aadA2* gen kasetini içerdikleri

belirlendi. Sınıf 1 integron içeren 11 izolattın (TEC002, TEC005, TEC010, TEC015, TEC020, TEC043, TEC055, TEC057, TEC072, TEC078 ve TEC091) sekans verileri elde edilemedi.

Sınıf 2 integron pozitif 7 izolattaki integronların sekans analizi sonucu *dfrA1-sat2-aadA1* ve *dfrA1-sat2-aadA30* olarak belirtilen 2 tip gen kaseti bulundu. Sınıf 2 integron içeren izolatlardaki integronları yaklaşık 2500 bp uzunluğunda oldukları belirlendi. Toplam 7 izolattan 2 izolattın *dfrA1-sat2-aadA1*, 2 izolattında *dfrA1-sat2-aadA30* gen kasetlerini içerdikleri gösterildi. Sekans analizleri sonucu sınıf 2 integron içeren 3 izolattın (TEC012, TEC033 ve TEC081) sekans verileri elde edilemedi.

Sınıf 1 ve sınıf 2 integronlara ait gen kaset içerikleri Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 10. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif izolatlardan ve içerdikleri integronların özellikleri

Sıra No	İzolat Kodu	Plazmit Adı	İntegron sınıfı	İntegron büyüklüğü (yaklaşık olarak) bp	Gen kaseti
1	TEC004	pAR38	Sınıf 2	2500	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>
2	TEC006	pAR2	Sınıf 1	850	<i>dfrA7</i>
3	TEC007	pAR3	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
4	TEC008	pAR4	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
5	TEC014	pAR6	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
6	TEC021	pAR9	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
7	TEC023	pAR10	Sınıf 1	800	<i>dfrA7</i>
8	TEC025	pAR11	Sınıf 1	1800	<i>dfrA1-aadA1</i>
9	TEC026	pAR40	Sınıf 2	2500	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>
10	TEC027	pAR41	Sınıf 2	2500	<i>dfrA1-sat2-aadA30</i>
11	TEC034	pAR12	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
12	TEC037	pAR13	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
13	TEC045	pAR15	Sınıf 1	800	<i>dfrV</i>
14	TEC060	pAR18	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
15	TEC064	pAR19	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
16	TEC067	pAR20	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
17	TEC071	pAR21	Sınıf 1	800	<i>dfrA7</i>
18	TEC075	pAR23	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
19	TEC076	pAR24	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
20	TEC082	pAR26	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
21	TEC083	pAR27	Sınıf 1	2000	<i>dfrA12-aadA2</i>
22	TEC085	pAR28	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
23	TEC088	pAR44	Sınıf 2	2500	<i>dfrA1-sat2-aadA30</i>
24	TEC090	pAR29	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
25	TEC095	pAR31	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
26	TEC104	pAR32	Sınıf 1	800	<i>dfrV</i>
27	TEC105	pAR33	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>

Tablo 10 (devamı) Sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif izolatların ve içerdikleri integronların özellikleri

Sıra No	İzolat Kodu	Plazmit Adı	İntegron sınıfı	İntegron büyüklüğü (yaklaşık olarak) bp	Gen kaseti
28	TEC106	pAR34	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
29	TEC108	pAR35	Sınıf 1	800	<i>dfrA7</i>
30	TEC113	pAR36	Sınıf 1	1800	<i>dfr17-aadA5</i>
31	TEC114	pAR37	Sınıf 1	800	<i>dfrA7</i>

6.4. Konjugasyon Deneyleri

Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren izolatlarda konjugasyon deneyleri sıvıda çiftleşme yöntemiyle gerçekleştirildi. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren 45 izolatın donör olarak kullanıldığı konjugasyon deneylerinde 35 adet *E. coli* J53-2 transkonjugantı elde edildi. Konjugasyon etkinliklerinin 10^{-6} ve 10^{-10} arasında oldukları belirlendi. Konjugasyon etkinliği sonuçları Tablo 11’de gösterilmiştir.

Transkonjugantlardan izole edilen plazmitlerin agaroz jelde görüntülenene zayıf sinyalli bant yoğunlukları büyüklük hesaplanmasına izin vermedi. Fakat jeldeki lokalizasyonları plazmitlerin >100 kb olabileceğini düşündürmektedir.

Tablo 11. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren izolatların konjugatif plazmit içerikleri ve transkonjugantların konjugasyon etkinlikleri

Sıra No	Verici İzolatlar	Transkonjugantlar	Konjugasyon Etkinliği
1	<i>E. coli</i> TEC004	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC004)	$> 4 \times 10^{-10}$
2	<i>E. coli</i> TEC006	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC006)	$> 5 \times 10^{-10}$
3	<i>E. coli</i> TEC008	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC008)	1.7×10^{-8}
4	<i>E. coli</i> TEC010	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC010)	6.4×10^{-8}
5	<i>E. coli</i> TEC012	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC012)	0.24×10^{-8}
6	<i>E. coli</i> TEC014	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC014)	1.4×10^{-9}
7	<i>E. coli</i> TEC015	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC015)	5.4×10^{-8}
8	<i>E. coli</i> TEC020	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC020)	1.8×10^{-8}
9	<i>E. coli</i> TEC021	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC021)	7.9×10^{-9}
10	<i>E. coli</i> TEC023	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC023)	4.2×10^{-9}
11	<i>E. coli</i> TEC025	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC025)	1.3×10^{-7}
12	<i>E. coli</i> TEC026	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC026)	0.3×10^{-7}
13	<i>E. coli</i> TEC027	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC027)	1.8×10^{-9}
14	<i>E. coli</i> TEC034	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC034)	1.5×10^{-8}
15	<i>E. coli</i> TEC037	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC037)	4.7×10^{-7}
16	<i>E. coli</i> TEC045	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC045)	1.3×10^{-9}
17	<i>E. coli</i> TEC060	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC060)	9.2×10^{-9}
18	<i>E. coli</i> TEC064	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC064)	2.9×10^{-8}

Tablo 11 (devamı) Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren izolatların konjugatif plazmit içerikleri ve transkonjugantların konjugasyon etkinlikleri

Sıra No	Verici İzolatlar	Transkonjugantlar	Konjugasyon Etkinliği
19	<i>E. coli</i> TEC067	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC067)	2×10^{-9}
20	<i>E. coli</i> TEC075	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC075)	0.6×10^{-7}
21	<i>E. coli</i> TEC076	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC076)	1.8×10^{-8}
22	<i>E. coli</i> TEC081	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC081)	4.6×10^{-8}
23	<i>E. coli</i> TEC082	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC082)	3×10^{-8}
24	<i>E. coli</i> TEC083	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC083)	1×10^{-7}
25	<i>E. coli</i> TEC085	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC085)	7.5×10^{-6}
26	<i>E. coli</i> TEC088	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC088)	0.4×10^{-7}
27	<i>E. coli</i> TEC090	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC090)	0.4×10^{-7}
28	<i>E. coli</i> TEC091	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC091)	1.1×10^{-8}
29	<i>E. coli</i> TEC095	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC095)	0.8×10^{-6}
30	<i>E. coli</i> TEC104	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC104)	1.9×10^{-8}
31	<i>E. coli</i> TEC105	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC105)	0.9×10^{-8}
32	<i>E. coli</i> TEC106	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC106)	1.3×10^{-8}
33	<i>E. coli</i> TEC108	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC108)	1.6×10^{-7}
34	<i>E. coli</i> TEC113	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC113)	2.9×10^{-7}
35	<i>E. coli</i> TEC114	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC114)	10^{-7}

6.5. Transkonjugantlarda İntegron Varlığının Belirlenmesi

35 transkonjuganttan elde edilen plazmid DNA'larının kalıp olarak kullanıldığı integrona spesifik PZR reaksiyonu sonucu tüm transkonjugantların *intI*-1 ve *intI*-2 genlerini içerdikleri gösterildi. Böylece bu integronların konjugatif plazmid üzerinde taşındıkları gösterildi.

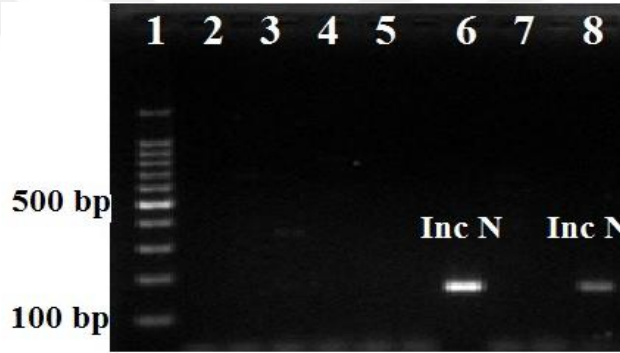
6.6. Konjugatif Plazmitlerin Uyumsuzluk Gruplarının Belirlenmesi

35 transkonjuganttaki plazmidlerin Inc gruplarının belirlenmesi amacıyla yapılan PZR reaksiyon sonucuna göre 6 plazmidin (%17) IncN, 1 plazmidin de (%3) IncQ pozitif olduğu belirlendi. Hiçbir transkonjugantta IncP ve IncW gruplarına ait plazmide rastlanmadı. Konjugatif plazmitlerin Inc gruplarına ait bilgiler Tablo 12'de gösterilmiştir.

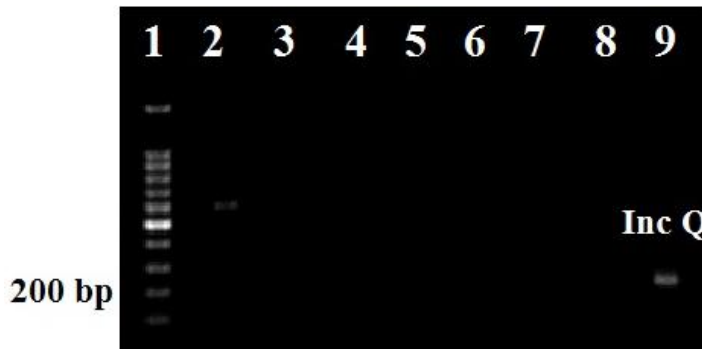
Tablo 12. Konjugatif plazmidlerin Inc grupları

Sıra No	Transkonjugant Adı	İntegron/Gen kaseti	Inc grup
1	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC004)	Sınıf 2 / <i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	IncN
2	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC010)	Sınıf 1 / Sekans verileri elde edilemedi	IncN
3	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC015)	Sınıf 1 / Sekans verileri elde edilemedi	IncN
4	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC034)	Sınıf 1 / <i>dfr17- aadA5</i>	IncN
5	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC060)	Sınıf 1 / <i>dfr17- aadA5</i>	IncN
6	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC075)	Sınıf 1 / <i>dfr17- aadA5</i>	IncN
7	<i>E. coli</i> J53-2 (pTEC026)	Sınıf 2 / <i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	IncQ

Resim 2 ve Resim 3’de Inc-spesifik PZR amplikonları görülmektedir.



Resim 2. IncN spesifik PZR amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1: 100 bp DNA marker, 2: Negatif kontrol, 3: *E. coli* J53-2 (pTEC004), 4: *E. coli* J53-2 (pTEC034), 5: *E. coli* J53-2 (pTEC075), 6: *E. coli* J53-2 (pTEC010), 7: *E. coli* J53-2 (pTEC060), 8: *E. coli* J53-2 (pTEC015).



Resim 3. IncQ spesifik PZR amplikonlarının agaroz jel elektroforez görüntüsü. 1: 100 bp DNA marker, 2: Negatif kontrol, 3: *E. coli* J53-2 (pTEC006), 4: *E. coli* J53-2 (pTEC008), 5: *E. coli* J53-2 (pTEC091), 6: *E. coli* J53-2 (pTEC106), 7: *E. coli* J53-2 (pTEC113), 8: *E. coli* J53-2 (pTEC114), 9: *E. coli* J53-2 (pTEC026).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Septisemi gibi gram negatif bakterilerden kaynaklanan enfeksiyonlar önemli mortalite ve morbidite nedenlerinden biridir (87). Özellikle kan kültürlerinden bakterilerin izolasyon aşaması genellikle acil antimikrobiyal tedavi gerektiren ciddi bir invaziv enfeksiyon göstergesidir. Kan kültürlerinden en sık izole edilen bakterilerin başında *E. coli* gelmektedir (88). Antibiyotik direnci insan sağlığını ciddi olarak etkileyen bir durumdur. Özellikle klinik laboratuvarlarda dirençli bakterinin doğru bir şekilde saptanması ve antimikrobiyallere karşı direncin belirlenmesi, klinisyenin vereceği antibiyotik tedavisi açısından önem arz etmektedir (89).

Bu çalışmaya Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Eğitim ve Hizmet Laboratuvarı'na Ocak - Aralık 2014 tarihleri arasında gönderilen kan kültüründen izole edilen 112 *E. coli* izolatu dahil edilmiştir. Bu isolatların ampisilin/sulbaktam direnci %62.5, aztreonam %43.8, sefazolin %58.0, sefepim %40.2, sefoperazon/sulbaktam %22.3, sefoksitin %17.9, seftazidim %35.7, seftriakson %48.2, siprofloksasin %35.7, ertapenem %0.9, gentamisin %25, levofloksasin %34.8, piperasilin/tazobaktam %18.8 ve trimetoprim/sülfametoksazol %53.6 olarak bulunmuştur. Amikasin, imipenem ve meropeneme karşı direnç bulunmamıştır. İngiltere'de Abernethy ve ark.'nın (90) yaptıkları çalışmada kan kültürlerinden izole edilen *E. coli* isolatlarında çeşitli antibiyotiklere duyarlılık oranları siprofloksasine %80.0, trimetoprim %60.0, gentamisine %90.0 ve piperasilin/tazobaktama %80.0 olarak saptamışlardır. Yılmaz ve ark.'nın (91) kan kültürlerinden izole ettikleri *E. coli* isolatları ile yaptıkları çalışmada ampisilin direncini %84.3, amikasin direncini %4.5, aztreonam direncini %48.3, seftazidim direncini %58.5, sefoksitin direncini %21.5, seftazidim direncini %45.1, trimetoprim/sülfametoksazol direncini %62.0 piperasilin/tazobaktam direncini %39.8 olarak belirlerken, imipenem ve meropeneme karşı direnç saptamamışlardır. Gündoğdu ve ark.'nın (92) yaptıkları çalışmada ampisilin sulbaktama %95.0, siprofloksasine %67.8, gentamisine %48.0, trimetoprim/sülfametoksazole %78.0, piperasilin/tazobaktam'a %40.7 ve amikasin, imipenem ve ertapeneme düşük oranlarda direnç belirlemişlerdir (%3.4, %5.1 ve %3.4). Çalışmamızda yüksek oranlarda bulunan ampisilin ve trimetoprim/sülfametoksazol direncinin Yılmaz ve Gündoğdu'nun çalışmaları ile uyumlu olarak yüksek oranlarda saptanırken imipenem ve meropeneme

karşı Gündoğdu ve ark.'nın çalışmasında olduğu gibi direnç belirlenmemiştir. Gündoğdu ve ark. düşük oranlarda olsada amikasin ve imipeneme direnç belirlemişlerdir. Çalışma verilerimiz aksine Öksüz ve ark. (93) çalışmalarında en dirençli antibiyotikleri trimetoprim/sülfametaksazol ve amoksisilin klavulonik asit (%34.2 ve %26.9) olarak belirlemişlerdir. En duyarlı antibiyotikleri %4.9'luk oranla imipenem ve amikasin olarak saptamışlardır. Kim ve ark.'nın (94) 1456 izolat ile yaptıkları çalışmada çalışmamız ile uyumlu olarak imipenem direncini %0.2 olarak saptarken, ampisilini %63.4'lik oranla en dirençli antibiyotik olarak belirlemişlerdir. Barati ve ark. (95) çalışmalarında imipenem ve amikasin %2.5'lik oranla en duyarlı, ampisilini ise %87.5'lik oranla en dirençli antibiyotik olarak bildirmişlerdir. Çalışmamızda aminopenisilinlere ve trimetoprim/sülfametoksazole yüksek oranda direnç tespit edilmiştir. Bunun nedeni olarak yüksek oranda direnç saptanan antibiyotiklerin oral formlarının bulunması ve özellikle toplum kaynaklı enfeksiyonlarda kullanılmasının olabileceği düşünülmektedir (91). Ayrıca hastaneler antibiyotik kullanımının yoğun olduğu birimlerdir. Antibiyotik baskısı altında dirençli organizmaların ortaya çıkışı ve yayılışı daha hızlı olmaktadır (96). Ülkemizde ve farklı coğrafik bölgelerde yapılan çalışmalarda *E. coli* izolatlarında farklı antibiyotik gruplarına karşı değişen oranlarda direnç gelişiminin olduğu gözlenmektedir. Antibiyotik direnç profilleri hastaneden hastaneye farklılık gösterebileceği gibi aynı hastanede klinikler arasında bile farklı direnç profilleri görülebilmektedir. Antimikrobiyallere direnç gelişim sıklığı, hastanenin yapısı, hastaların özellikleri, hastanedeki invaziv girişim sıklığına göre değişmektedir. Bu nedenle her hastanenin kendi direnç profilini bilmesi ve kendi antibiyotik kullanım politikasını geliştirmesi önemlidir (97).

Çalışmada integron içeren izolatlarda çeşitli antibiyotiklere karşı direnç oranları ampisiline, streptomisine ve tetrasikline karşı %66.6, gentamisine %40.0, trimetoprim/sülfametoksazole %97.8, nalidiksik asite %64.4 ve kloramfenikola %26.6 olarak belirlenmiştir. Kargar ve ark.'nın (98) integron içeren izolatlar ile yaptıkları çalışmada çalışma verilerimiz ile uyumlu olarak yüksek oranlarda trimetoprim/sülfametoksazol (%79.7), streptomisin (%76.8), nalidiksik asit (%66.6) ve tetrasiklin (%59.4) direnci saptarken düşük oranda kloramfenikol direnci (%14.4) belirlemişlerdir. Murshed ve ark. (99) çalışma verilerimiz ile uyumlu olarak sefaleksn,

ko-trimetoksazol, gentamisin, kloramfenikol, tetrasiklin, nalidiksik asit ve ampicilin direnç oranlarını sırasıyla %79.0, %75.0, %54.0, %50.0, %77.0, %83.0 ve %96.0 olarak belirlemişlerdir. Jones ve ark. (100) integronlar ile yaptıkları çalışmada çalışma verilerimiz aksine çok yüksek oranlarda ampicilin (%100), sefaleksim ve streptomisin (%89.0), kanamisin ve kloramfenikol (%84.0), gentamisin ve tetrasiklin (%79), nalidiksik asit ve amikasin (%68.0) dirençlerini saptamışlardır. İspanya’da 2010 yılında yapılan bir çalışmada (101) direnç oranları ampiciline %54.8, nalidiksik asite %40.1, gentamisine %14.9, streptomisine %47.4, tetrasikline %35.5, trimethoprim/sulfametoksazole %35.5 ve kloramfenikole direnç bizim çalışmamızda olduğu gibi düşük oranlarda bulunmuştur (%11.1). Ampicilin, nalidiksik asit, trimethoprim/sulfametoksazol ve tetrasiklinler hem klinik hem de veterinerlikte sıklıkla kullanılan antimikrobiyal ajanlardır (102). Çalışmadaki sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren izolatların direnç fenotipleri incelendiğinde klinikte sıklıkla kullanılan bu antibiyotiklere karşı yüksek oranlarda direnç olduğu görülmektedir. Sınıf 1 ve sınıf 2 integronların trimetoprim (*dfr*) ve streptomisin (*aad*) direncinden sorumlu gen bölgelerini içerdikleri bilinmektedir. Ayrıca sınıf 1 integronların yapıları incelendiğinde 3’korunmuş bölgelerinde sulfonamid direncinden sorumlu *sul1* gen bölgesi bulunmaktadır (103). Literatürde integronların antimikrobiyal direnç ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (104). Karşılaşılan yüksek trimetoprim ve streptomisin direnç oranlarının integronların yapısında bulunan bu gen bölgelerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

Enterobacteriaceae’lardaki çoklu ilaç direncinin integronlarda taşınan farklı antimikrobiyal direnç genleriyle ilişkili olduğu bilinmektedir (105). Özellikle sınıf 1 ve sınıf 2 integronların farklı gram negatif izolatlar arasında yaygın olarak bulunmaları ve farklı direnç paternlerini içeren farklı gen kasetlerini ekleme, çıkarma ve yer değiştirme özellikleri hastanede çoklu ilaç direncinin yayılmasına yol açmaktadır (106, 107). Çalışmada *intI*-1 ve *intI*-2 genleri sırasıyla %46 ve %6 olarak belirlenirken sınıf 1 ve sınıf 2 integron oranları %33.9 ve %6.3 olarak saptandı. Sınıf 1 ve sınıf 2 integronlarda saptanan prevalansın diğer çalışmalarla nispeten uyumlu oldukları tespit edildi. Çin’de 6 yıllık bir sürede 111 klinik *E. coli* izolatında multipleks PZR ile sınıf 1 ve sınıf 2 integronun integras genlerinin bakıldığı çalışmada *IntI1* ve *intI2* oranlarını %85.5 ve %3.6 (108) olarak bulmuşlardır. Benzer olarak Essen Zandbergen ve ark. (109) *E.*

coli'lerde sınıf 1 integronları %76, sınıf 2 integronları ise %43 oranında saptamışlardır. Ülkemizde klinik izolatlarda integron varlığı ve antibiyotik direnç paternlerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar mevcuttur. Özellikle hastane kaynaklı salgınlara neden olan izolatlarda direncin belirlenmesi önem arz etmektedir (110, 111). Çalışma verilerimizle uyumlu olarak Çiçek ve ark. (112) 2014 yılında sınıf 1 ve sınıf 2 integron varlığını araştırdıkları çalışmada *intI1* varlığını %26.1, *intI2* gen varlığını ise %4.1, Sandallı ve ark. (113) *E. coli*'nin içinde bulunduğu gram negatif klinik izolatlarda yaptıkları çalışmada toplam 111 izolatın 32'sinin sınıf 1 integron (%28.8) ve 2 izolatın sınıf 2 integron (%0.9) içerdiklerini belirlemişlerdir. Klinik izolatlarda integron varlığına bakıldığında sınıf 1 integronların sınıf 2'den daha yüksek oranlarda bulunduğu belirlenmiştir. Gram negatif bakteriler arasında yaygın olarak bulunan sınıf 1 integronların çoklu ilaç direnci ile ilişkili olduğu bilinmektedir. Klinikte çoklu ilaç direnç genlerinin primer kaynağı olarak tespit edilmişlerdir ve mikrobiyal popülasyonda antimikrobiyal direnç genlerinin rezervuarı olarak bilinmektedirler. Hastanelerde çoklu ilaç dirençli izolatlardaki direncin yüksek oranlarda bulunan integronlarla horizontal olarak benzer veya farklı izolatlara yayılması enfeksiyon tedavisinde kullanılacak antibiyotiklere karşı hızlı bir şekilde direnç gelişmesine, bununla beraber tedavide başarısızlıklara yol açacağını düşünmekteyiz.

Antibiyotik direnci yalnızca klinikte değil veterinerlikte de küresel bir sorun haline gelmiştir. Özellikle antibiyotik direncinin yayılmasında rol oynayan hareketli genetik elemanlardan olan integronlar dikkat çekmektedir. Vahşi kuş türleri içme sularında ve çevrede fekal kirlenmede önemli rol oynamaktadır. Sacristan ve ark.'nın (104) bu konuda yaptıkları çalışmada sınıf 1 integron varlığını %31.2 olarak bulmuşlardır. Cocchi ve ark.'nın (114) insan ve çiftlik hayvanlarından izole ettikleri 120 *E. coli* izolatında sınıf 1 ve 2 integron varlığını inceledikleri çalışmada çalışma verilerimize uyumlu olarak sınıf 1 ve sınıf 2 integron varlığını %36.6 ve %3.3 olarak belirlemişlerdir. Torre ve ark.'nın (115) domuzlardan izole edilen kommensal *E. coli* izolatlarıyla yaptıkları çalışmada, çalışmamız ve literatür verilerinin aksine sınıf 2 integron varlığını (%47.5) sınıf 1 integronlardan (%33.8) daha yüksek oranlarda bulmuşlardır. Bu araştırmacılar çalışmalarında izolatların antibiyotiklere duyarlılık profillerini vermedikleri için integronlarla direnç fenotipleri arasında ilişki kuramadık. Çalışmamızda sınıf 1 integron varlığını yüksek oranlarda bulmamız, izolatların direnç

fenotipinde yüksek oranlarda görülen trimetoprim/sülfametoksazol direncinin sınıf 1 integronların yapısında bulunan *sul* genlerine bağlı olarak geliştiğini düşündürmektedir. Antibiyotik direncinin yayılımında önemli rol oynayan integronlar ile farklı kaynaklardan izole edilmiş *E. coli* izolatlarıyla ilgili birçok çalışma mevcuttur. Bu çalışmalarda, insan kaynaklı (116, 117) hayvan kaynaklı (118, 119), akarsular (120, 121) sağlıklı insanlar (122, 123) ve besin kaynaklı (124) örnekler kullanılmıştır. Hayvan kaynaklı *E. coli*'ler ile ilgili yapılan çalışmada (119) çalışmamız verileriyle uyumlu olarak sınıf 1 integron ve sınıf 2 integron oranlarını %54.5 ve %9 olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar akarsulardan (121) izole edilen *E. coli*'lerde sınıf 1 integron oranını %69.1 olarak saptamışlar ve sınıf 1 integronların yapısında bulunan *sul* genlerine bağlı olarak çalışmamızda olduğu gibi yüksek oranda SXT direnci bulmuşlardır. Çalışma verilerimizin aksine hayvan kaynaklı *E. coli*'ler (118) ile yapılan çalışmada sınıf 2 integron oranı (%47.5) sınıf 1'den (%33.8) daha yüksek bulunmuştur. Bu çalışmada sınıf 1 integronların düşük oranlarda bulunmasının coğrafik bölgedeki farklılık, örneklem sayısı veya direnç genlerinin farklı transpoze olabilen elemanlar ile taşınabileceğinden kaynaklandığı düşünülebilir. Ayrıca çevre, direnç genleri için önemli bir kaynaktır. Çevrede antibiyotik üreten organizmaların klinik patojen izolatlarda bulunan direnç genlerinin kaynağı olduklarına dair teoriler mevcuttur. Bu nedenle antibiyotik direnç genleri taşıyan çevresel bakterilerin integronlar gibi hareketli genetik yapılarla kliniğe taşınması halk sağlığında önemli bir sorun oluşturacağı düşünülmektedir (125).

Çalışmamızda *intI* gen pozitif bulunan izolatlarda integronların değişken bölgesini amplifiye etmek için 5'CS ve 3'CS primerleri kullanılarak yapılan PZR reaksiyonları sonucu 13 izolatın boş integron içerdikleri belirlenmiştir. Literatürde boş integron içeren izolatlarda muhtemelen çok büyük bir gen kasetinin olmasının ve bu gen kasetlerinin amplifiye edilememesinden kaynaklandığını belirten çalışmalar mevcuttur (63, 126, 127). Ayrıca boş integron içeren izolatlarda sınıf 1 integronların 3'korunmuş bölgelerinin eksik olması veya erken stop kodon varlığının bu integronların amplifiye edilememelerine sebep olabileceğide düşünülmektedir (128). Çalışmada 13 izolatla hiçbir gen kaseti bulunmadığı için bu integronlar boş integron olarak adlandırılmaktadır.

İntegronların içerdikleri gen kasetleri ile ilgili İspanya'da 2008 yılında yapılan bir çalışmada 100 sağlıklı insan dışkılarından izole edilen *E. coli* izolatının 29'unda sınıf 1 ve

2 integron varlığını saptamışlar ve bu integronların içerdikleri gen kasetlerini belirlemişlerdir. Gen kaset analizleri sonucu sınıf 1 integronlarda *dfrA1* + *aadA1*, *aadA*, *dfrA17* + *aadA5*, *dfrA7*, *dfrA5*, *dfrA1* ve *dfrA12* + *orfF* + *aadA2* olmak üzere 7 farklı tipte gen kaseti belirlemişlerdir (129). Trimetoprim direncinden sorumlu *dfrA* genlerinin hem klinik hem de kommensal *E. coli*'deki varlıkları literatürde verilmiştir (130, 131). Ayrıca bazı araştırmacılar trimetoprim direncinden sorumlu *dfrA1* gen kasetlerini yaygın olarak hayvan ve insanlardan izole edilmiş *E. coli*'lerde saptamışlardır (132, 133, 134). Hastane kaynaklı izolatlar ile yapılan ve çalışma verilerimize benzer olarak Çiçek ve ark. (112) çalışmalarında yaygın olarak *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7*, *dfrA17*, *aadA1*, *aadA5* ve *sat2* gibi gen kasetlerini bulmuşlardır. Gram negatif bakterilerde yapılan çalışmada Sandallı ve ark.'nın yaptıkları sekans analizleri sonucunda çalışmamızla uyumlu olarak *aadA1*, *aadA2*, *aadA5*, *dfrA1*, *dfrA5*, *dfrA7* ve *dfrA17* gibi gen kaset tiplerini belirlemişlerdir. Ayrıca *dfrA17* benzeri yeni bir gen kaseti bulmuşlardır (113). Çalışmamız verileri aksine Mengeloğlu ve ark.'nın (135) 2014 yılında *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında integron varlığını araştırdıkları çalışmada bu izolatların (*aacC1-aadA1* ve *aac* (3)-1) ve (*blaOXA-30-aadA1* ve *blaOXA-11-cmlA7*) olarak adlandırılan farklı gen kasetlerini içerdiklerini belirlemişlerdir. İlk kez *P. aeruginosa* izolatında tanımlanan *blaOXA-11-cmlA7* kaseti literatüre kazandırılmıştır. Mengeloğlu ve ark.'nın bu çalışmalarında grup 1 okzasilinaz enzimlerini kodlayan *blaOXA-11* ve *blaOXA-30* geninin bulunması fenotipik olarak beta laktamlara direnç sağlarken, *cmlA7* geni kloramfenikol direncinden sorumludur. Benzer şekilde Türkiye'de *P. aeruginosa* izolatlarıyla yapılan çok merkezli bir çalışmada yaygın olarak sınıf 1 integron varlığı saptanmış ve integron sekans analizi sonucu *aadA1*, *aac*(3)-*Id-orf-aac*(3'')-*Ia*, *aac*(3)-*Ie-blaOXA10-aadA1*, *aadA6*, *aac*(6')-*I-orf-aadA2* tipte çalışma verilerimizden farklı gen kasetleri bulunmuştur (79). Çalışmalarda görüldüğü gibi farklı türlerdeki bakterilerde farklı antibiyotiklere fenotipik olarak direnç olması içerdiği gen kaset türlerinde farklı olmasını sağlamaktadır. Bu dirençlerin integronlar üzerinde taşınması bu farklı direnç kasetlerinin diğer türlere de yayılabileceğini düşündürmektedir. *E. coli*'ler çevre izolatlarında fekal kirlenmenin bir göstergesi olarak karşımıza çıkmaktadır. Özellikle çevresel kaynaklı *E. coli*'lerde direnç genlerinin yayılmasında rol oynayan integronlarla ilgili bölgemizde çalışmalar mevcuttur. Özgümüş ve ark.'nın su kaynaklı *E. coli*'ler ile

yaptıkları çalışmada çalışmamızla uyumlu olarak *dfr1-aadA1* ve *dhfrA17-aadA5* gen kasetlerini içeren sınıf 1 integron varlığını belirlemişlerdir (110). Aynı çalışma grubunun sulardan izole ettikleri gram negatif bakterilerle yaptıkları çalışmada sınıf 1 ve sınıf 2 integronlarda çalışmamızla uyumlu olarak *dfrA1*, *dfrA7*, *dfrA17*, *aadA1*, *aadA5* gen kasetlerinin yanında farklı olarak *dfrA16*, *dfr2d* ve *blaOXA-30*, *sat1* olarak adlandırılan gen kasetlerini belirlemişlerdir. Ayrıca *Citrobacter koseri* izolatında ilk kez *dfrA16* olarak adlandırılan gen kasetini göstermişlerdir (85). Nehirler çoklu ilaç dirençli *Enterobacteriaceae* için bir alan oluşturmaktadırlar ve bu alanlar çevredeki antibiyotik direnç belirleyicileri için rezervuar olabilir. Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren *Enterobacteriaceae*'ların sularda yaygın olarak bulunması ve taşıdıkları direnci önce çevreye ardından insan patojenlerine bulaştırmalarının insan sağlığında tehdit oluşturabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda izolatlara ait gen kasetlerinin boyutları PZR reaksiyonu sonucu jel elektroforez sisteminde marker kullanılarak belirlenmiş ve boyutları hakkında yaklaşık bir sonuç verilmiştir. Sekans reaksiyon sonucunda çıkan DNA dizileri BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) ve CLUSTALW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) programları kullanılarak analiz edilmiştir. Analiz sırasında gen kasetlerinin boyutlarını bu programda tam olarak hesaplamak mümkündür. Fakat çalışmamızda kullanılan Genetik Analizör 3130 DNA dizi analizi cihazında (Applied Biosystems, ABD) tek yönlü (tek primer) sekans işleminde iyi bir okuma olursa yaklaşık 800 bp'lik bir bölge sekans edilebiliyordu. Örneğin 1800 bp'lik bir gen kaseti için çift yönlü sekans (hem forward hem revers primer kullanılarak) yapıldığı düşünülürse yaklaşık 1600 bp'lik bir bölgenin sekansı gerçekleştirilmiş olacaktı. Arada kalan 200 bp'lik bölge için yeniden o bölgeye spesifik primer dizayn edilip tekrar sekans işleminin yapılması gerekmektedir. Yeni primerler temin edilemediğinden dolayı elimizdeki olanaklarla gen kasetlerinin boyutları yaklaşık bir değer olarak verilmiştir.

Sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren izolatların sekans analizleri gerçekleştirilmeden önce bu integronlara ait PZR ürünleri pGEM-T Easy Vektör sistemlerine klonlandıktan sonra transformasyon aşaması gerçekleştirilmiştir. Transformasyondan sonra seçilen klonlardan plazmit DNA'lar izole edilmiştir. İzole edilen plazmit DNA'ların sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. Ancak sınıf 1 integron içeren 11 izolatın ve sınıf 2

integron içeren 3 izolatın sekans analizleri gerçekleştirilememiştir. Sekansı yapılamayan örneklerin bant uzunluklarına bakıldığında yaklaşık 1800-3100 bp arasında değiştiği gözlenmiştir. Örneklerin klonlanması esnasında pGEM-T Easy Vektör sistemine ilave olarak pMini klonlama sistemi de kullanılmıştır. Bu örneklerin sekans analiz verilerinin elde edilememişinde birçok faktörün etkili olabileceğini düşünmekteyiz. Bunlardan biri klonlamanın gerçekleşmemiş olabileceğidir. Nitekim yaptığımız çalışmada plazmit izolasyonunda aynı klona ait 3 farklı koloniden yapılan plazmit izolasyonunda farklı plazmit bant profilleri gözlenmiştir. Gözlenen plazmitlerinde tam olarak boyutları hesaplanamamıştır. Genetik Analizör 3130 DNA dizi analiz cihazının kapillerinin eski olmasının da sekans sonuçlarını etkileyebileceğini düşünmekteyiz.

Bakteriyal konjugasyon mekanizmaları yatay gen transfer mekanizmalarından biri olmakla birlikte özellikle konjugatif plazmitler aracılığıyla antibiyotik direnç paternlerinin aktarılmasında önemli rolleri vardır (136). İntegron içeren izolatlarda direncin konjugatif bir plazmid ile aktarılıp aktarılmadığının belirlenmesi için konjugasyon deneyleri yapıldı. Bu amaçla F⁻ özellikte olan, metiyonin ve prolin aminoasitlerini sentez edemeyen bir *E. coli* K-12 suşu olan J53-2 kullanıldı. Bu suş kromozomal olarak rifampisine dirençlidir. Konjugasyon deneylerine başlamadan önce bu suşun direnç profili antibiyogram testleri yapılarak doğrulandı. Literatürde yapılan çalışmalarda konjugasyon deneylerinde *E. coli* J53-2'ye aktarılmış transkonjugantların seçilmesinde kullanılan antibiyotik miktarları farklı oranlarda verilmiştir (84, 85). Çalışmamızda 35 adet *E. coli* J53-2 transkonjugantı elde edildi ve bu izolatların konjugasyon etkinliklerinin düşük oldukları (10^{-6} ve 10^{-10}) belirlendi. Çalışma verilerimizin aksine Çiçek ve ark.'nın (112) yaptıkları çok merkezli bir çalışmada sınıf 1 integron içeren 49 *E. coli* izolatının 2'sinde konjugasyon etkinliği 10^{-6} ve 10^{-2} arasında olan konjugatif plazmid belirlemişlerdir. Gönüllü ve ark. (137) *E. coli*'ler ile yaptıkları çok merkezli bir çalışmada yine çalışma verilerimiz aksine yüksek konjugasyon etkinliğine sahip (10^{-3} - 10^{-4}) konjugatif plazmid belirlemişlerdir. Çalışmamıza göre çoklu ilaç direncinin yayılmasında rol oynayan integronların düşük konjugasyon etkinliğine sahip plazmidler üzerinde taşınmasının, hastanemizde direncin yayılmasında bu plazmidlerin çok büyük bir tehdit oluşturmayacağını düşündürmektedir.

Plazmidlerin direnç genlerinin yayılmasında önemli rol oynadıkları bilinmektedir. Bu yüzden plazmidlerin identifikasyonu ve sınıflandırılması özellikle konjugatif

plazmidlerin yayılmasında rol oynayan Inc grup plazmidlerin karakterizasyonu bu açıdan dikkat çekmektedir. Yapılan çalışmada elde edilen transkonjugantların 6'sının IncN ve 1 transkonjugantında IncQ plazmid grubuna ait olduğu belirlendi. Çalışmamız verileri aksine Almanya'da Tennstedt ve ark.'nın (57) yaptıkları çalışmada atık su arıtma tesislerinden antibiyotik direnci taşıyan plazmidler izole edilmiş ve bu plazmidlerden 6 tanesinde sınıf 1 integron ile ilişkili gen kasetlerinin kendi kendine tranfer olabilen IncP grubuna ait oldukları saptanmıştır. Wu ve ark. (138) toplam 501 *E. coli* izolatında sulfonamid direnç geni taşıyan plazmidlerin prevalansını ve karakterizasyonunu belirledikleri çalışmada 109 izolatın direnç geni taşıdıklarını belirlemişler ve konjugasyon deneyi ile de 57 izolatın 42'sinde direnç geninin konjugatif plazmid ile aktarıldığını göstermişlerdir. Bu konjugatif plazmitlerin Inc gruplarına baktıklarında FII, FIB, II, FIA, B/O, FIC, N, HI1 ve XI olarak adlandırılan 9 farklı Inc grup belirlemişlerdir. Ülkemizde bu alanda yapılan çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Gönüllü ve ark.'nın *E. coli*'de yaptıkları çalışmada genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimini kodlayan genleri belirlemişler ve bu genlerin aktarılmasında 18 konjugatif plazmitin rol oynadığını bulmuşlardır. Bu plazmitlerden 1 tanesinin yaklaşık 65 kb uzunluğunda ve IncF1 grubuna ait olduğu, diğer 17 plazmitin yaklaşık 140 kb uzunluğunda büyük plazmitler olduklarını ve IncFII grubuna ait olduklarını belirlemişlerdir (137). IncP ve IncN grup plazmidler, geniş bir konak aralığı sunan ve etkili konjugatif plazmidlerin bulunduğu gruplar olarak bilinmektedirler (139). Çalışmamızda sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren izolatların bu plazmit gruplarında bulunması klinikte çoklu ilaç direncinin çok çeşitli bakteri türlerine yayılmasında önem arz etmektedir. Ayrıca Inc gruplarının belirlenmesi amacıyla yapılan deneylerde elimizde Inc gruplarına ait pozitif kontroller bulunmadığı için bant uzunluklarımızı 100 bp'lık markıra göre değerlendirdik ve literatür verileri ile karşılaştırdık. Normalde plazmitlerin Inc gruplarının belirlenmesi için 5 multipleks 3 basit PZR işleminin gerçekleştirilmesi için 18 çift primer dizayn edilmiştir. Buna göre FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, II-Ig, L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F ve FIIA olmak üzere Inc grup tiplendirilmesi yapılmaktadır. Bizim elimizde klinikte de yaygın olarak bulunan Inc gruplarına ait (IncP, IncN, IncQ ve IncW) primerler bulunduğu için çalışmamızı bu primerler ile gerçekleştirdik. Çalışma sonuçlarımıza göre bu verilerin ilerleyen çalışmalarımız için ön bilgi oluşturacağını düşünmekteyiz.

Sonuç olarak bu çalışmada antibiyotik direncinin yayılmasında rol oynayan hareketli genetik elemanlardan olan integronların içerdikleri gen kasetleri belirlenmiş oldu. Hastaneler antibiyotik kullanımının yoğun olduğu birimlerdir. Çalışmada oklu ilaç dirençli izolatlarda bulunan gen kasetlerinin evre orjinli izolatlarda da görülmesi bu direncin horizontal olarak yayıldığını göstermektedir. Ayrıca direncin aktarılmasında rol oynayan integronların bazılarının konjugatif plazmitler üzerinde yerleşmeleri direnç genlerinin aktarılmasında önem arz etmektedir. Ülkemizde konjugatif plazmitlerin gruplandırılmasında rol oynayan Inc grup tiplere ile ilgili veriler kısıtlıdır. Çalışmamız bütün bu ynlerin aydınlatılmasına olanak sağlamış olup literatüre bu yönüyle yeni veriler kazandıracağını düşünmekteyiz.



8. SONUÇ ve ÖNERİLER

Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Eğitim ve Hizmet Laboratuvarı'na Ocak-Aralık 2014 tarihleri arasında gönderilen 107 hastaya ait kan kültüründen izole edilen 112 *E. coli* izolatında integron gen kaset varlığı, dirence neden olan gen kasetlerinin direnç paternlerinin belirlenmesi ve integronların yayılımında rol oynayan konjugatif plazmitlerin tiplendirilmesi amacıyla yapılan bu çalışma sonucunda aşağıdaki veriler elde edilmiştir.

1. Kan örneklerinden izole edilen 112 *E. coli* izolatının ampisilin/sulbaktam direnci %62.5, aztreonam %43.8, sefazolin %58, sefepim %40.2, sefoperazon/sulbaktam %22.3, sefoksitin %17.9, seftazidim %35.7, seftriakson %48.2, siprofloksasin %35.7, ertapenem %0.9, gentamisin %25, levofloksasin %34.8, piperasilin/tazobaktam %18.8 ve trimetoprim/sülfametaksazol %53.6 olarak bulundu. Amikasin, imipenem ve meropenem karşı direnç bulunmadı.
2. Sınıf 1 integron varlığı için 112 *E. coli* izolatının 51' i (%46) *intI*-1 pozitif olarak belirlendi ve 38'inde (%33.9) sınıf 1 integron varlığı saptandı. Kalan 13 (%11.6) izolatın boş integron içerdikleri belirlendi.
3. Sınıf 2 integron varlığı için 112 *E. coli* izolatının 7' si (%6) *intI*-2 pozitif olarak saptandı ve 7'sinde (%6.3) sınıf 2 integron varlığı saptandı.
4. Otuzsekiz izolatın taşıdığı sınıf 1 integronların sekans analizleri sonucu trimetoprim ve streptomisin-spektinomisin direncinden sorumlu *dfrA7*, *dfr17-aadA5*, *dfrV*, *dfrA1-aadA1* ve *dfrA12-aadA2* olarak adlandırılan 5 tip gen kaseti belirlendi. 11 izolatın taşıdığı sınıf 1 integronların sekans verileri elde edilemedi.
5. Sınıf 2 integron amplifikasyonu sonucunda pozitif bulunan 7 izolatın integronlarının sekans analizi sonucu *dfrA1-sat2-aadA1* ve *dfrA1-sat2-aadA30* olarak belirtilen 2 tip gen kaseti bulundu. Sınıf 2 integron içeren 3 izolatın taşıdığı integronların sekans analiz verileri elde edilemedi.
6. Yapılan konjugasyon deneylerinde sınıf 1 ve sınıf 2 integron içeren 45 izolatın donör olarak kullanıldığı konjugasyon deneylerinde 35 adet *E. coli*

J53-2 transkonjugantı elde edildi. Transkonjugantların konjugasyon etkinliklerinin 10^{-6} ve 10^{-10} arasında oldukları gösterildi.

7. Otuzbeş transkonjuganttaki plazmitlerin Inc gruplarının belirlenmesi amacıyla yapılan PZR reaksiyon sonucuna göre 6 plazmitin (%17) IncN, 1 plazmitin de (%3) IncQ pozitif olduğu belirlendi. Hiçbir transkonjugantta IncP ve IncW gruplarına ait plazmite rastlanmadı.

Hastanemiz kan örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarında direncin yayılmasında önemli rol oynayan integronların *E. coli* izolatlarında integron gen kaset varlıkları ve içerdikleri direnç paternleri belirlendi. Ayrıca integronların aktarılmalarında rol oynayan konjugatif plazmitlerin varlıkları belirlendi ve bu plazmitlerin Incompatibility (Inc) grupları replikon tiplendirme yöntemiyle gruplandırıldı. Direncin yayılması, enfeksiyon tedavisinde sorunlara yol açmakta ve doğru antimikrobiyal tedavi seçilmesini etkilemektedir. Dirence neden olan genetik elemanların belirlenmesi klinisyenlerin enfeksiyon tedavisinde doğru antimikrobiyal tedavi vermesinde yönlendirici olacak yaklaşımlara katkı sağlayacaktır.

9. KAYNAKLAR

1. Martens E, Demain AL (2017). The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of Antibiotics* 70: 520–526.
2. H.A.M. van Hoek A, Mevius D, Guerra B, Mullany P, Roberts AP, J.M Aarts H (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Frontiers in microbiology* 2: 203-230.
3. Blair JM, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ (2015). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 13(1): 42-51.
4. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A (2015). Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health.* 109(7): 309-317.
5. Cheng G, Dai M, Ahmed S, Hao H, Wang X, Yuan Z (2016). Antimicrobial Drugs in Fighting against Antimicrobial Resistance. *Frontiers in microbiology* 7: 470.
6. Getino M, Sanabria-Ríos DJ, Fernández-López R, Campos-Gómez J, Sánchez-López JM, Fernández A, Carballeira NM, Cruza F (2015). Synthetic Fatty Acids Prevent Plasmid-Mediated Horizontal Gene Transfer. *mBio* 6(5).
7. Gyles C, Boerlin P (2014). Horizontally Transferred Genetic Elements and Their Role in Pathogenesis of Bacterial Disease. *Veterinary Pathology* 51(2): 328-340.
8. Orlek A, Stoesser N, Anjum MF, Doumith M, Ellington MJ, Peto T, Crook D, Woodford N, Walker S, Phan H, Sheppard A (2017). Plasmid Classification in an Era of Whole-Genome Sequencing: Application in Studies of Antibiotic Resistance Epidemiology. *Frontiers in Microbiology* 8: 182.
9. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM (1994). *Enterobacteriaceae*. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 362-387.
10. Bilgehan H (1992). *Enterobacteriaceae*. Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Fakülteler Kitabevi, Ankara, 387-411.
11. Ryan KJ (1994). *Enterobacteriaceae*. Sherris medical Microbiology (an Introduction to Infectious Diseases). Prentice-Hall International, Montreal, 323-29.
12. Bilgehan H (2000). *Enterobacteriaceae* Familyası. Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları Kitabı, İzmir, 1-103.

13. Echeverria P, Sethabutr O, Pitarangsi C (1991). Microbiology and Diagnosis of Infections with Shigella and Enteroinvasive *Escherichia coli*. Infect Dis 13: 220-225.
14. Vial PA, Browne R, Lior H (1998). Characterization of Enteroadherent Aggregative *Escherichia coli*, a Putative Agent of Diarrheal Disease. J. Infect. Dis 158: 70-79.
15. Ravi A, Avershina E, Ludvigsen J, L'Abée-Lund TM, Rudi K (2014). Integrons in the Intestinal Microbiota as Reservoirs for Transmission of Antibiotic Resistance Genes. *Pathogens* 3: 238-248.
16. Martinez JL (2014). General principles of antibiotic resistance in bacteria. Drug Discovery Today 11: 33-39.
17. Marti E, Variatza E, Balcazar JL (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. Trends Microbiol. 22(1): 36-41.
18. Brown ED, Wright GD (2016). Antibacterial drug discovery in the resistance era. Nature 529: 336-343.
19. Aminov RI, Mackie RI (2007). Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. FEMS Microbiol Lett 271: 147-161.
20. Alekshun MN, Levy SB (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. Cell. 128(6): 1037-50.
21. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA (2015). Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. Saudi J Biol Sci. 22(1): 90-101.
22. Öztürk R (2002). Antimikrobik ilaçlara Karşı Direnç Gelişim Mekanizmaları ve Günümüzde Direnç Durumu. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi. 83-100.
23. Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM (2012). Integrons. Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. Mobile Genetic Elements 2(5): 211-223.
24. Bennett PM (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. British Journal of Pharmacology 153: 347-357.

25. Munita JM, Arias CA (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.* 4(2).
26. Von Wintersdorff Christian JH, Penders J, vanNiekerk JM, D.Mills N, Majumder S, Van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolffs PFG (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology* 7(173): 1-10.
27. Carattoli A (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res* 32: 243-259.
28. Thomas CM, Nielsen KM (2005). Mechanism of and barriers to horizontal gene transfer between bacteria. *Nature* 3: 711-721.
29. Dominguez W, O'Sullivan DJ (2013). Developing an efficient and reproducible conjugation-based gene transfer system for bifidobacteria. *Microbiology.* 159(Pt 2): 328-38.
30. Griffiths Anthony JF, Gelbart WM, Miller JH, Lewontin RC (1999). *Modern Genetic Analysis*, W. H. Freeman, New York. 0-7167-3118-5.
31. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F (2010). Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 74(3): 434-52.
32. Kidane D, Ayora S, Sweasy JB, Graumann PL, Alonso JC (2012). The cell pole: the site of cross talk between the DNA uptake and genetic recombination machinery. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 47(6): 531-55.
33. Sridhar Rao P.N © www.microrao.com.
34. Domingues S, Nielsen KM, da Silva GJ (2012). Various pathways leading to the acquisition of antibiotic resistance by natural transformation. *Mob Genet Elements.* 2(6): 257-260.
35. Brussow H, Canchaya C, Hardt WD (2004). Phages and the Evolution of Bacterial Pathogens: from Genomic Rearrangements to Lysogenic Conversion. *Microbiology and molecular biology reviews* 68(3): 560-602.
36. Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG (2006). Genetics of antimicrobial resistance. *Animal Biotechnology* 17: 111-124.
37. Balcazar JL (2014). Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. *PLoS Pathog.* 10(7): e1004219.

38. Feiner R, Argov T, Rabinovich L, Sigal N, Borovok I, Herskovits AA (2015). A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 13(10): 641-50.
39. Clewell DB (2014). Antibiotic Resistance Plasmids in Bacteria. In: eLS. John Wiley & Sons. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001491.pub3.
40. Garcillán-Barcia MP, Alvarado A, de la Cruz F (2011). Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. *FEMS Microbiol Rev* 35(5): 936-56.
41. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K (2015). Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol* 6:242.
42. Khan SA (2005). Plasmid rolling-circle replication: highlights of two decades of research. *Plasmid* 53(2): 126-36.
43. Guglielmetti S, Mora D, Parini C (2007). Small rolling circle plasmids in *Bacillus subtilis* and related species: organization, distribution, and their possible role in host physiology. *Plasmid* 57(3): 245-64.
44. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, Chandra G, Fitzgerald GF, Chater KF, van Sinderen D (2007). Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev* 71(3): 495-548.
45. Rychlik I, Gregorova D, Hradecka H (2006). Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Vet Microbiol* 112(1): 1-10.
46. Thomas CM (2014). Living Reference Work Entry Molecular Life Sciences. Plasmid Incompatibility. pp 1-3.
47. Carattoli A, Miriagou V, Bertini A, Loli A, Colinon C, Villa L, Whichard JM, Rossoloni GM (2006). Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer beta-lactams. *Emerg Infect Dis* 12(7): 1145-1148.
48. Liebana E, Carattoli A, Coque TM, Hasman H, Magiorakos AP, Mevius D, Peixe L, Poirel L, Schuepbach-Regula G, Torneke K, Torren-Edo J, Torres C, Threlfall J (2013). Public health risks of enterobacterial isolates producing extended-spectrum β -lactamases or AmpC β lactamases in food and food-producing animals: an EU perspective of epidemiology, analytical methods, risk factors, and control options. *Clinical Infection Disease* 56(7): 1030-7.

49. Pitout JD, Nordmann P, Poirel L (2015). Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key Pathogen Set for Global Nosocomial Dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(10): 5873-5884.
50. Özgümüş OB (2001). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen enterik bakterilerde plazmidle kodlanan tem ve shv-tipi beta-laktamaz genlerinin moleküler epidemiyolojisi. Doktora tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Trabzon.
51. Waters, V. L.: Conjugative transfer in the dissemination of beta-lactam and aminoglycoside resistance. *Frontiers in Bioscience.*, 4: d416-439, 1999.
52. Carattoli A (2009). Resistance Plasmid Families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial agent and chemotherapy*. 53(6): 2227-2238.
53. Broaders E, Gahan CGM, Marchesi JR (2013). Mobile genetic elements of the human gastrointestinal tract. Potential for spread of antibiotic resistance genes. *Gut Microbes* 4(4): 271-280.
54. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A (2011). Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas)* 47(3): 137-46.
55. Dakic I, Lilakos D, Svabic-Vlahovic M, Christofilopoulou S, Poggas N, Charvalos E (2007). Integron-associated antimicrobial resistance in isolates of members of Enterobacteriaceae causing community-acquired urinary infections. *Microbial Ecology in Health and Disease* 19: 201-206.
56. Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, Chen D, Bian H, Li Y, Yu G (2015). Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 14: 45.
57. Tennstedt T, Szczepanowski R, Braun S, Pühler A, Schlüter A (2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol*. 45(3): 239-52.
58. Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52: 489-492.

59. Çolakoğlu F, Özgümüş OB, Sandallı C, Sevim Çelik E, Karaoğlu Alpay Ş (2010). Deniz Suyu Kökenli Koliformlarda Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegron Gen Kasetleri ve Antibiyotik Direncinin Karakterizasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 40(2): 97-108.
60. Laroche E, Pawlak B, Berthe T, Skurnik D, Petit F (2009). Occurrence of antibiotic resistance and class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli* isolated from a densely populated estuary (Seine, France). *FEMS Microbiol Ecol* 68(1): 118-30.
61. Gillings MR (2017). Class 1 integrons as invasive species. *Current Opinion in Microbiology* 38: 10-15.
62. Barlow RS, Gobius KS (2006). Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58: 1133-1138.
63. Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR (2009). Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev* 33: 757-784.
64. Hall RM (2012). Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. *Ann. NY. Acad. Sci* 1267: 71-78.
65. Alekshun MN, Levy SB (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell* 128(6): 1037-50.
66. Abella J, Bielen A, Huang L, Delmont TO, Vujaklija D, Duran R, Cagnon C (2015). Integron diversity in marine environments. *Environ Sci Pollut Res Int* 20: 15360-9.
67. Kang HY, Jeong YS, Oh JY, Tae SH, Choi CH, Moon DC, Lee WK, Lee YC, Seol SY, Cho DT, Lee JC (2005). Characterization of antimicrobial resistance and class 1 integrons found in *Escherichia coli* isolates from humans and animals in Korea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55: 639-644.
68. Liebert CA, Hall RM, Summers AO (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol Mol Biol Rev* 63(3): 507-22.
69. Partridge SR, Brown HJ, Stokes HW, Hall RM (2001). Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. *Antimicrob Agents Chemother* 45(4): 1263-70.
70. Kargar M, Mohammadalipour Z, Doosti A, Lorzadeh S, Japoni-Nejad A (2014). High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant

- Diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health Res Perspect* 5(4): 193-198.
71. Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH (2002). IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol* 184(6): 1712-21.
 72. Finn JA, Parks AR, Peters JE (2007). Transposon Tn7 directs transposition into the genome of filamentous bacteriophage M13 using the element encoded TnsE protein. *J Bacteriol* 189(24): 9122-5.
 73. Peters JE, Craig NL (2001). Tn7: smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(11): 806-14.
 74. Kaushik M, Kumar S, Kapoor RJ, Virdi JS, Gulati P (2017). Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents* doi.org/doi:10.1016/j.ijantimicag.
 75. Mohammadalipour Z, Kargar M, Doosti A (2017). High Frequency of Class 2 and 3 Integrons Related to Drug-Resistance in Clinical Isolates of Diarrheagenic *E. coli* in Iran. *Novel Biomed* 5(1): 30-6.
 76. Sunde M, Simonsen GS, Slettemeås JS, Böckerman 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*|DOI: 10.1371/journal.pone.
 77. Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D (2015). The Integron: Adaptation On Demand. *Microbiol Spectr* 3(2).
 78. Levesque C, Piche L, Larose C, Roy PH (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 185-91.
 79. Cicek AC, Saral A, Duzgun AO, Cizmeci Z, Kayman T, Balci PO, Dal T, Firat M, Yazici Y, Sancaktar M, Ozgumus OB, Sandalli C (2013). Screening of Class 1 and Class 2 Integrons in Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa* Collected from Seven Hospitals in Turkey: A Multicenter Study. *Open Journal of Medical Microbiology* 3: 227-233.
 80. Machado E, Canto'n R, Baquero F, Gala'n JC, Rolla'n A, Peixe L, Coque TM (2005). Integron Content of Extended-Spectrum-Lactamase-Producing

- Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 49(5): 1823-1829.
81. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD (2001). Integrons and gene cassettes in the enterobacteriaceae. Antimicrob Agents Chemother 45: 2658-61.
 82. Kado CI, Liu ST (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 145: 1365-73.
 83. Rohlf FJ (1993). NSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Exeter Software.
 84. Mokracka J, Koczura R, Pawłowski K, Kaznowski A (2011). Resistance patterns and integron cassette arrays of *Enterobacter cloacae* complex strains of human origin. Journal of Medical Microbiology 60: 737-743.
 85. Ozgumus OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N (2009). Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. J Microbiol 47: 19-27.
 86. Götz A, Pukall R, Smit E, Tietze E, Prager R, Tschäpe H, van Elsas JD, Smalla K (1996). Detection and characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. Appl Environ Microbiol 62(7): 2621-8.
 87. Borg MA, Sande-Bruinsma ES, Kraker M, Tiemersma E, Grundmann MH (2008). Antimicrobial resistance in invasive strains of *Escherichia coli* from southern and eastern Mediterranean laboratories. Clinical Microbiology and Infection 14(8): 789-796.
 88. Güzelant A, Kaya M, Güvenç H, Akkaya O, Yüksekaya Ş, Opuş A, Övet H, Kurtoğlu M (2015). Bir Eğitim Araştırma Hastanesinde Beş Yıl İçinde Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Klebsiella* Suşlarının Antimikrobiyal Duyarlılıkları. Türk Mikrobiyol Cem Derg 45(4): 175-180.
 89. Pitout JD, Laupland KB (2008). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. Lancet Infect Dis 8: 159-66.
 90. Abernethy J, Guy R, Sheridan EA, Hopkins S, Kiernan M, Wilcox MH, Johnson AP, Hope R (2017). Epidemiology of *Escherichia coli* bacteraemia in England:

- results of an enhanced sentinel surveillance programme. *Journal of Hospital Infection* 95: 365-375.
91. Yılmaz S, Gümral R, Güney M, Bedir O, Güçlü A, Duyan S, Basustaoglu AC (2013). İki yıllık dönemde kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotik duyarlılıklarının değerlendirilmesi. *Gülhane Tıp Derg* 55: 247-252.
 92. Gundogdu A, Bolkvadze D, Kilic H (2016). In vitro Effectiveness of Commercial Bacteriophage Cocktails on Diverse Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Escherichia coli* Strains. *Front Microbiol* 7: 1761
 93. Öksüz S, Yavuz T, Sahin I (2008). Kan kültürlerinden izole edilen mikroorganizmalar ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Türk Mikrobiyol Cem Derg* 38(3-4): 117-121.
 94. Kim HJ, Lee NM, Kim S, Shin JH, Kim MN, Kim EC, Koo SH, Ryoo NH, Kim JS, Cho JH (2011). Characteristics of Microorganisms Isolated from Blood Cultures at Nine University Hospitals in Korea during 2009. *Korean J Clin Microbiol* 14(2): 48-54.
 95. Barati M, Taher MT, Abasi R, Zadeh MM, Barati M, Shamshiri AR (2009). Bacteriological profile and antimicrobial resistance of blood culture isolates. *Iranian Journal of Clinical Infectious Diseases* 4(2): 87-95.
 96. Akhtar N (2010). Hospital acquired infections in a medical intensive care unit. *J Coll Physicians Surg Pak* 20(6): 386-90.
 97. Temiz H, Temiz S, Kaya S, Çelen MK (2014). Kan Kültürlerinden İzole Edilen Gram-Negatif Bakterilerde Çeşitli Antibiyotiklere Direnç. *Klimik Dergisi* 27(2): 62-8.
 98. Kargar M, Mohammadalipour Z, Doosti A, Lorzadeh S, Japoni-Nejad A (2014). High Prevalence of Class 1 to 3 Integrations Among Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health Res Perspect* 5(4): 193-8.
 99. Murshed M, Shahnaz S, Malek MA (2010). Detection of resistance gene marker *int1* and antimicrobial resistance pattern of *E. coli* isolated from surgical site wound infection in Holy Family Red Crescent Medical College Hospital. *Bangladesh J Med Microbiol* 04(02): 19-23.

100. Jones LA, McIver CJ, Rawlinson WD, White PA (2003). Polymerase chain reaction screening for integrons can be used to complement resistance surveillance programs. *Commun Dis Intell Q Rep* 27: 103-10.
101. Vinuéa L, Sáenzb Y, Rojo-Bezaresb B, Olartec I, Undabeitiac E, Somaloa S, Zarazagaa M, Torresa C (2010). Genetic environment of *sul* genes and characterisation of integrons in *Escherichia coli* isolates of blood origin in a Spanish hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents* 35: 492-496.
102. Navajas-Benito EV, Alonso CA, Sanz S, Olarte C, Martínez-Olarte R, Hidalgo-Sanz S, Somalo S, Torres C (2017). Molecular characterization of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains from a dairy cattle farm and its surroundings. *J Sci Food Agric* 97(1): 362-365.
103. Hu LF, Chang X, Ye Y, Wang ZX, Shao YB, Shi W, Li X, Li JB (2011). *Stenotrophomonas maltophilia* resistance to trimethoprim/sulfamethoxazole mediated by acquisition of *sul* and *dfrA* genes in a plasmid-mediated class 1 integron. *Int J Antimicrob Agents* 37(3): 230-4.
104. Sacristán C, Esperón F, Herrera-León S, Iglesias I, Neves E, Nogal V, Muñoz MJ, de la Torre A (2014). Virulence genes, antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* strains isolated from synanthropic birds from Spain. *Avian Pathol* 43(2): 172-5.
105. Nijssen S, Florijn A, Top J, Willems R, Fluit A, Bonten M (2005). Unnoticed Spread of Integron-Carrying *Enterobacteriaceae* in Intensive Care Units. *Clinical Infectious Diseases* 41: 1-9.
106. Collis CM, Kim MJ, Stokes HW, Hall RM (2002). Integron-encoded *IntI* integrases preferentially recognize the adjacent cognate *attI* site in recombination with a 59-be site. *Molecular Microbiology* 46(5): 1415-1427.
107. Sokkary MM, Abdelmegeed ES (2015). Characterisation of Class 1 Integron among *Escherichia coli* Isolated from Mansoura University Hospitals in Egypt. *Advances in Microbiology* 5: 269-277.
108. Su J, Shi L, Yang L, Xiao Z, Li X, Yamasaki S (2006). Analysis of integrons in clinical isolates of *Escherichia coli* in China during the last six years. *FEMS Microbiol Lett* 254(1): 75-80.

109. Essen-Zandbergen AV, Smith H, Veldman K, Mevius D (2007). Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and *Campylobacter* spp. in the Netherlands. J. Antimicrob. Chemother 59: 746-750.
110. Ozgumus OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksall I (2007). Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying the IMP-1 metallo- β -lactamase gene in a university hospital in Turkey. Microb Drug Resist 13: 191-8.
111. Ozgumus OB, Celik-Sevim E, Alpay Karaoglu S, Sandalli C, Sevim A (2007). Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. J Microbiol 45: 379-87.
112. Copur Cicek A, Ozgumus OB, Saral A, Sandalli C (2014). Antimicrobial Resistance Patterns and Integron Carriage of *Escherichia coli* Isolates Causing Community-Acquired Infections in Turkey. Ann Lab Med 34: 139-144.
113. Sandalli C, Buruk CK, Sancaktar M, Ozgumus OB (2010). Prevalence of integrons and a new *dfrA17* variant in Gram-negative bacilli which cause community-acquired infections. Microbiol Immunol 54: 164-169.
114. Cocchi S, Grasselli E, Gutacker M, Benagli C, Convert M, Piffaretti JC (2007). Distribution and characterization of integrons in *Escherichia coli* strains of animal and human origin. FEMS Immunol Med Microbiol 50(1): 126-32.
115. de la Torre E, Colello R, Padola NL, Etcheverría A, Rodríguez E, Amanto F, Tapia MO, Soraci AL (2014). Detection of Integrase Gene in *E. coli* Isolated from Pigs at Different Stages of Production System. Int J Microbiol <http://dx.doi.org/10.1155/2014/489569>.
116. Rao AN, Barlow M, Clark LA, Boring JR, Tenover FC, McGowan JE Jr (2006). Class 1 integrons in resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., US hospitals. Emerg Infect Dis 12(6): 1011-4.
117. Márquez C, Labbate M, Ingold AJ, Roy Chowdhury P, Ramírez MS, Centrón D, Borthagaray G, Stokes HW (2008). Recovery of a functional class 2 integron from an *Escherichia coli* strain mediating a urinary tract infection. Antimicrob Agents Chemother 52(11): 4153-4.
118. Sáenz Y, Briñas L, Domínguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C (2004). Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains

- of human, animal, and food origins. *Antimicrob Agents Chemother* 48(10): 3996-4001.
119. Soufi L, Abbassi MS, Sáenz Y, Vinué L, Somalo S, Zarazaga M, Abbas A, Dbaya R, Khanfir L, Ben Hassen A, Hammami S, Torres C (2009). Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathog Dis* 6(9): 1067-73.
 120. Koczura R, Mokracka J, Barczak A, Krysiak N, Kaznowski A (2013). Association between the presence of class 1 integrons, virulence genes, and phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolates from river water. *Microb Ecol* 65(1): 84-90.
 121. Su HC, Ying GG, Tao R, Zhang RQ, Zhao JL, Liu YS (2012). Class 1 and 2 integrons, *sul* resistance genes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolated from Dongjiang River, South China. *Environ Pollut* 169: 42-9.
 122. Li B, Zhao ZC, Wang MH, Huang XH, Pan YH, Cao YP (2014). Antimicrobial resistance and integrons of commensal *Escherichia coli* strains from healthy humans in China. *J Chemother* 26(3): 190-2.
 123. Wu RB, Alexander TW, Li JQ, Munns K, Sharma R, McAllister TA (2011). Prevalence and diversity of class 1 integrons and resistance genes in antimicrobial-resistant *Escherichia coli* originating from beef cattle administered subtherapeutic antimicrobials. *J Appl Microbiol* 111(2): 511-23.
 124. Sunde M (2005). Prevalence and characterization of class 1 and class 2 integrons in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products of Norwegian origin. *J Antimicrob Chemother* 56(6): 1019-24.
 125. Ramírez-Castillo FY, Harel J, Moreno-Flores AC, Loera-Muro A, Guerrero-Barrera AL, Avelar-González FJ (2014). Antimicrobial resistance: the role of aquatic environments. *International Journal Curr. Res. Aca. Rev* 2(7): 231-246.
 126. Ndi OL, Barton MD (2011). Incidence of class 1 integron and other antibiotic resistance determinants in *Aeromonas* spp. from rainbow trout farms in Australia. *J Fish Dis* 34(8): 589-99.
 127. Yu HS, Lee JC, Kang HY, Ro DW, Chung JY, Jeong YS, Tae SH, Choi CH, Lee EY, Seol SY, Lee YC, Cho DT (2003). Changes in gene cassettes of class 1 integrons among *Escherichia coli* isolates from urine specimens collected in Korea during the last two decades. *J Clin Microbiol* 41(12): 5429-33.

128. Laroche-Ajzenberg, Flores Ribeiro A, Bodilis J, Riah W, Buquet S, Chaftar N, Pawlak B (2015). Conjugative multiple antibiotic resistance plasmids in *Escherichia coli* isolated from environmental waters contaminated by human faecal wastes. J Appl Microbiol 118(2): 399-411.
129. Vinue L, Sa'enz Y, Somalo S, Escudero E, Moreno M, Ruiz-Larrea F, Torres C (2008). Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 62: 934-937.
130. Brolund A, Sundqvist M, Kahlmeter G, Grape M (2010). Molecular characterisation of trimethoprim resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* during a two year intervention on trimethoprim use. PLoS One 5(2): e9233.
131. Szmolka A, Nagy B (2013). Multi drug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. Frontier in microbiology 4: 258.
132. Mazurek J, Bok E, Stosik M, Baldy Chudzik K (2015). Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* from pigs during metaphylactic trimethoprim and sulfamethoxazole treatment and in the post-exposure period. Int J Environ Res Public Health 12(2): 2150-63.
133. Ho PL, Wong RC, Chow KH, Que TL (2009). Distribution of integron-associated trimethoprim-sulfamethoxazole resistance determinants among *Escherichia coli* from humans and food-producing animals. Lett Appl Microbiol 49(5): 627-34.
134. Blahna MT, Zalewski CA, Reuer J, Kahlmeter G, Foxman B, Marrs CF (2006). The role of horizontal gene transfer in the spread of trimethoprim-sulfamethoxazole resistance among uropathogenic *Escherichia coli* in Europe and Canada. J Antimicrob Chemother 57(4): 666-72.
135. Mengeloğlu FZ, Copur Çiçek A, Koçoğlu E, Sandallı C, Budak EE, Özgümüş OB (2014). Klinik Örneklerden İzole Edilen *Acinetobacter baumannii* ve *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarının Sınıf 1 ve 2 İntegron Taşıyıcılığı ve Yeni Bir Gen Kaseti Birlikteliği: blaOXA-11-cmlA7. Mikrobiyol Bul 48(1): 48-58.
136. Kamruzzaman M, Shoma S, Thomas CM, Partridge SR, Iredell JR (2017). Plasmid interference for curing antibiotic resistance plasmids in vivo. PLOS ONE DOI: 10.1371/0172913.

137. Gonullu N, Aktas Z, Kayacan CB, Salcioglu M, Carattoli A, Yong DE, Walsh TR (2008). Dissemination of CTX-M-15 beta-lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. J Clin Microbiol 46(3): 1110-2.
138. Wu S, Dalsgaard A, Hammerum AM, Porsbo LJ, Jensen LB (2010). Prevalence and characterization of plasmids carrying sulfonamide resistance genes among *Escherichia coli* from pigs, pig carcasses and human. Acta Vet Scand 52: 47.
139. Schlüter A, Szczepanowski R, Pühler A, Top EM (2007). Genomics of IncP-1 antibiotic resistance plasmids isolated from wastewater treatment plants provides evidence for a widely accessible drug resistance gene pool. FEMS Microbiol Rev 31: 449-477.

10. ETİK KURUL ONAYI

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 3	Tarih: 12/10/2015
	Prof.Dr.Ali Osman KILIÇ'ın sorumluluğunda yürütülen Arş.Gör.Ahu REİS'e ait "Kan Kültürlerinden İzole Edilen <i>Escherichia coli</i> Suşlarında İntegron Gen Kasetlerinin Moleküler Karakterizasyonu" başlıklı 2015/117 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.	

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	İlişki *	Katılım **	İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLİ
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İZİNLİ
Doç.Dr. Evrim ÖZKORUMAK Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

11. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı : REİS, Ahu
Uyruğu : T.C
Doğum tarihi ve yeri : 06/02/1984- Trabzon
Medeni hali : Evli
E-posta : ahu_kamburoglu@hotmail.com
Tlf : 0462 3777786

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurum Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji	2017
Yüksek Lisans	KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji	2011
Lisans	KTÜ, Rize Fen Edebiyat Fak./Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Trabzon Lisesi	2002

AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİM

Görevi	Kurum	Süre
1. Araştırma Görevlisi	KTÜ SABE Tıbbi Mikrobiyoloji	2008-2017

YABANCI DİL

İngilizce

YAYINLAR

1. Beldüz Kara N., **Reis A.**, Yılmaz Y., Tosun İ., Beldüz M., Kara C., "Evaluation of Candida albicans Biofilm Formation on Various Dental Restorative Material Surfaces", Nigerian Journal of Clinical Practice, pp.355-360, 2017.
2. Ulusoy A.T., Kalyoncuoğlu E., **Reis A.**, Çehreli Z., "Antibacterial effect of N-acetylcysteine and taurolidine on planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis*", Dental Traumatology, pp.1-7, 2015.
3. Bayramoğlu G., Özgümüş O.B., Kolaylı F., **Reis A.**, Beşli Y., Dinç U., et al., "Molecular Epidemiology, Antimicrobial Resistance and Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases of Salmonella enterica Serotype Paratyphi B Clinical Isolates", Mikrobiyoloji Bülteni, cilt.48, ss.191-200, 2014.
4. Buruk C.K., Bayramoğlu G., **Reis A.**, Kaklıkkaya N., Tosun İ., Aydın F., "Determination of Hepatitis C Virus Genotypes Among Hepatitis C Patients In Eastern Black Sea Region, Turkey", Mikrobiyoloji Bülteni, vol.47, pp.650-657, 2013.
5. Sevim E., Sevim A., **Reis A.**, Kalyoncu Z., Alpay Karaoğlu Ş. , "İşlenme Aşamalarındaki Çay Yapraklarından izole Edilen Koliform Grubu Bakterilerde Antibiyotik Direnç Profilinin Araştırılması", Marmara Fen Bilimleri Dergisi, ss.150-157, 2016.
6. Beldüz Kara N., **Reis A.**, Yılmaz Y., Tosun İ., "Restoratif Materyallerin Yüzeylerinde Candida Albicans Adezyonu Ve Biyofilm Oluşumunun Invitro Değerlendirilmesi: Bir Ön Çalışma", Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi, cilt.30, ss.123-127, 2013.

BİLDİRİLER

1. Reis A., Durukan İ., Özgümüş O.B., Kılıç A.O., "Characterisation of integron gene cassettes in *Escherichia coli* strains isolated from blood cultures by sequence analysis", 10th Balkan Congress of Microbiology-Microbiologia balkanica 2017, Sofia, Bulgaria, November 16th-18th 2017 , pp.50.
2. Reis A., Cora M., Özgümüş O.B., Kılıç A.O., "Conjugal transfer of antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains involving class 1 and class 2 integrons", 10th

Balkan Congress of Microbiology-Microbiologia balkanica 2017,Sofia, Bulgaria, November 16th-18th 2017 , pp.187.

3. Tüfekci E.F., Sağlam Ertunga N., Aydın E., Özen C., Biber A., Altay B., et al.,“Mağaralardan İzole Edilen Gram Negatif Bakterilerde Beta Laktamaz Gen Varlığının PZR Yöntemi İle Araştırılması”, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 16-20 Kasım 2016, ss.268-268
4. Reis A., Tüfekci E.F., Özgümüş O.B., Kiliç A.O., “Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Antibiyotik Direnç Gen Kasetlerinin Moleküler Karakterizasyonu”, 37. Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 16-20 Kasım 2016, ss.277-277.
5. Tüfekci E.F., Sağlam Ertunga N., Aydın E., Biber A., Altay B., Tekkiliç İ., et al.,“Antibacterial Screening of Bacteria Isolated from Three Caves In Turkey”, 3rd Congress of Baltic Microbiologists 2016, Vilnius, Litvanya, 18-21 Ekim 2016, pp.107-107.
6. Reis A., Özgümüş O.B., Bayramoğlu G., Kiliç A.O., “Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında İntegron Gen Kaset Varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemi ile Araştırılması”, 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul, Türkiye, 1-3 Nisan 2016, ss.212-212.
7. Renda G., Sevgi S., Yaylı B., Yazıcı Bektaş N., Yildirim S., Reis A., et al., “Determination of Phenolic Compounds in Five *Scrophularia* L. Species by HPLC-Dad and Their Antimicrobial Activity”, ISOPS 11th International Symposium on Pharmaceutical Science, Ankara, Türkiye, 9-12 Haziran 2015, pp.378-379.
8. Tabbouche S., Tüfekci E.F., Samançe J., Abdurrahman M., Reis A., Kiliç A.O., “*Callosobruchus maculatus* (Fasülye Böceği) Bağırsak Florasından İzole Edilen Bakterilerin Morfolojik ve Genetik Karakterizasyonu ve Antimikrobiyal Duyarlılıklarının Saptanması”, XXXVI.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 12-16 Kasım 2014, ss.243-244.
9. Beldüz Kara N., Reis A., Yılmaz Y., Tosun İ., “Çeşitli Restoratif Dental Materyal Yüzeylerinde *Candida albicans* Adezyonu ve Biyofilm Oluşumunun İnvitro Değerlendirilmesi: Bir Ön Çalışma”, 19.Türk Pedodonti Derneği Kongresi, Antalya, Türkiye, 4-7 Ekim 2014, ss.40-40.

10. Buruk C.K., Tosun İ., Tüfekci E.F., Kaklıkkaya N., Bayramoğlu G., Reis A., et al., “*Pneumocystis jirovecii* Tanısında Yeni Bir In-House Gerçek Zamanlı Pcr Uygulaması”, 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 4-7 Haziran 2014, ss.125-126.
11. Bayramoğlu G., Özgümüş O.B., Kolaylı F., Reis A., Beşli Y., Dinç U., et al., “*Salmonella enterica* Serotip Paratyphi B Klinik İzolatlarının Moleküler Epidemiyolojisi, Antimikrobiyal Direnci ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlarının Karakterizasyonu”, 28. Ankem Antibiyotik Ve Kemoterapi Kongresi, Antalya, Türkiye, 22-26 Mayıs 2013, ss.75-75.
12. Reis A., Buruk C.K., Bayramoğlu G., Beşli Y., Aydın F., “İdrar Örneklerinden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. İzolatlarında Genişlemiş-Spektrumlu Beta Laktamaz Direncinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile Araştırılması”, I. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 12-16 Kasım 2011, ss.1-2.
13. Alpay Karaoğlu Ş., Taşkiran H., Öztürk S., Reis A., Kalyoncu Z., “Yaş Çaydan İzole Edilen Koliform Grubu Bakterilerde Antibiyotik Direnç Profilinin Araştırılması”, 20. Ulusal Biyoloji Kongresi, Denizli, Türkiye, 21-25 Haziran 2010, ss.931-932.
14. Reis A., Buruk C.K., Bayramoğlu G., Aydın F., “Doğu Karadeniz Bölgesinde HCV Genotip Dağılımı”, 6. Ulusal Tanısal ve Moleküler Mikrobiyoloji Kongresi, Ankara, Türkiye, 15-19 Haziran 2010, ss.187-187.
15. Dilek S., Reis A., Cebeci Güler N., Calp T., Kaklıkkaya N., Aydın F., et al., “Gastroduedonal Yakınması Olan Hastalarda Gaitada *Helicobacter pylori* Antijen Varlığı”, XXXIII.Türk Mikrobiyoloji Kongresi, Muğla, Türkiye, 21-25 Ekim 2008, ss.750-750.

PROJELER

1. Kan Kültürlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında İntegron Gen Kasetlerinin Moleküler Karakterizasyonu BAP Doktora, TDK-2015-5335, Araştırmacı.