



T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ



YÜKSEK LİSANS  
TEZİ

TAVUK DIŞKILARINDAN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI*'LERDE  
PLAZMİT ARACILI KOLİSTİN DİRENCİ SAĞLAYAN *MCR-1* GENİNİN  
ARAŞTIRILMASI

NİLÜFER ERZAIM

DANIŞMAN  
PROF.DR.SERKAN İKİZ

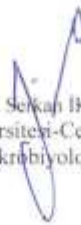
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI  
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI

İSTANBUL-2019

## TEZ ONAYI

Bu çalışma 25.02.2019 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Tezli Yüksek Lisans Programı Yüksek Lisans  
Tezi olarak kabul edilmiştir.

### TEZ JÜRİSİ

  
Prof. Dr. Selcan İKİZ  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

  
Prof. Dr. Seyyal AK  
İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa  
Veteriner Fakültesi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

  
Doç. Dr. Ayşe Seher BİRTEKSÖZ TAN  
İstanbul Üniversitesi  
Eczacılık Fakülte  
Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

.....  
Üniversite  
Fakülte

.....  
Üniversite  
Fakülte

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazıma kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Nilüfer İlyazım

## İTHAF

Bu çalışmamı, bana karşılıksız sevginin olağanüstü gücünü gösteren sevgili aileme ithaf ediyorum.

## TEŞEKKÜR

Bilgisi, tecrübesi, açık fikirliliği ve hayata karşı sergilediği pozitif tutumu ile desteğini her daim hissettiren Anabilim Dalı başkanımız çok değerli hocam Sayın Prof. Dr. Seyyal AK'a,

Yüksek lisans eğitimim süresince engin bilgi ve deneyimi, anlayışı ve sabrı ile her türlü sorunumla içtenlikle ilgilenen, tez çalışmalarına sonsuz katkıda bulunan ve bu tezi bitirmem için gerekli tüm desteği büyük bir olgunlukla sağlayan değerli danışman hocam Sn. Prof. Dr. Serkan İKİZ'e,

Tez çalışmam ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübeleriyle bana ışık olan Sn. Prof. Dr. A. Funda BAĞCIGİL'e, çalışma disiplini ve sonsuz deneyimi ile her zaman yardıma hazır olan Sn. Doç. Dr. Kemal METİNER'e, beni her zaman cesaretlendiren, her türlü sorunumda deneyim ve bilgisiyle yanımda olan Sn. Doç. Dr. Beren BAŞARAN KAHRAMAN'a, olumlu tavrı ile motivasyonumu kaybetmememi sağlayan Sn. Dr. Belgi DİREN SİĞİRCİ'ya, pratikliği, problem çözme yeteneği ve bilime olan tutkusu ile örnek olan Sn. Dr. Baran ÇELİK'e, laboratuvar çalışmalarında her zaman destek olan Sn. Araş. Gör. Barış HALAÇ'a, çalışkanlığı ve özverisi ile desteğini eksik etmeyen Vet. Hek.A. İlgin KEKEÇ'e, Vet. Hek. Canan KENAR'a, deneyler ve tez yazım sürecimde birçok konuda desteğini aldığım Sn. Dr. Nisa Sipahi'ye ve güler yüzlü teknisyenimiz Sn. Gülten KARAKUZ'a tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Çalışma örneklerinin temini konusunda yardımcı olan Sn. Doç. Dr. Hüseyin ESECELİ'ye ve çalışmamda kullandığım pozitif suşları sağlayan Dr.Henrik HASMAN ve Dr.Agnes PERRIN-GUYOMARD'a çok teşekkür ederim.

Her zaman bana karşı sevgi dolu ve destekleyici olan sevgili annem ÜFTADE ERZAIM'e, sevgili babam Orhan ERZAIM'e, desteklerini hep hissettiğim sevgili kardeşlerim Can Ahmet ERZAIM ve Uğur ERZAIM'e tüm benliğimle teşekkür ederim.

Eğitim hayatıma sağladığı ölçülemeyecek destek ve özverisi ile bugünlere gelmemi sağlayan çok değerli sevgili teyzem Sacide ÖZSÖZ'e çok teşekkür ederim.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22837

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	ii
BEYAN.....	iii
İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	vi
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	x
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	xi
ÖZET .....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	3
2.1.1. <i>E.coli</i> Patotipleri ve Patojeniteleri .....	3
2.2. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları .....	5
2.3. Polimiksin Sınıfı Antibiyotikleri.....	6
2.3.1. Kolistin (Polimiksin E) .....	6
2.3.2. Kolistin Direnç Mekanizmaları.....	7
2.3.2.1. İntrensek Direnç .....	7
2.3.2.2. Lipopolisakkarit (LPS) Modifikasyonu .....	7
2.3.2.3. Plazmit Aracılı Kolistin Direnci.....	7
2.3.2.4. Dünyada Plazmit Aracılı Kolistin Diren .....	8
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	13
3.1. Gereç .....	13
3.1.1. Örnekler .....	13
3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Biyokimyasal Testler ve Ayrıçlar .....	13
3.1.2.1. Mac Conkey Agar .....	13
3.1.2.2. Üre Agar.....	13
3.1.2.3. Tyriptic Soy Broth (TSB).....	13
3.1.2.4. Triple Sugar Iron Agar (TSIA) .....	14
3.1.2.5. Sitrat Agar (Simmons-Citrat Agar).....	14

3.1.2.6. Metil Red-Voges Proskauer Broth (MR-VP Broth).....	14
3.1.2.7. Oksidasyon/Fermentasyon Besiyeri.....	14
3.1.2.8. Jelatin Hidrolizasyon Besiyeri .....	15
3.1.2.9. Fenilalanin Deaminaz Besiyeri .....	15
3.1.2.10. Karbonhidrat Fermentasyon Test Besiyerleri .....	16
3.1.2.11. Katyon-Ayarlı Mueller-Hinton Broth (MHB) .....	16
3.1.2.12. Diğer Biyokimyasal Testler ve Ayraçlar.....	16
3.1.3. Kolistin Sülfat .....	16
3.1.4. Çalışmada kullanılan <i>mcr-1</i> Pozitif Plazmit Örnekleri .....	17
3.1.5. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Gereçler .....	17
3.1.5.1. Plazmit DNA Ekstraksiyon Kiti.....	17
3.1.5.2. Plazmit DNA Ekstraksiyonu Sırasında Kullanılan Diğer Gereçler.....	17
3.1.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Kiti .....	18
3.1.5.4. Primerler.....	18
3.1.5.5. Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Diğer Gereçler .....	18
3.1.5.6. Agaroz Jel Elektroforezi .....	19
3.1.5.7. Diğer Gereçler.....	19
3.2. Yöntem.....	20
3.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon .....	20
3.2.2. Bakterilerin Kolistin (Polimiksin E) Duyarlılığının Fenotipik Yöntemle Belirlenmesi .....	21
3.2.2.1. MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu) .....	21
3.2.3. İzolatların Kolistin (Polimiksin E) Duyarlılığının Genotipik Yöntemle Belirlenmesi. ....	22
3.2.3.1. Plazmit DNA'nın Ekstraksiyonu.....	22
3.2.3.2. Amplifikasyon.....	24
3.2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi .....	25
4. BULGULAR.....	26
4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları .....	26
4.2. Fenotipik Kolistin (Polimiksin E) Direnci Bulguları.....	27
4.3. Genotipik Kolistin (Polimiksin E) Direnci Bulguları .....	28
5. TARTIŞMA.....	29
KAYNAKLAR .....	33

HAM VERİLER .....	44
FORMLAR .....	45
ETİK KURUL KARARI .....	46
PATENT HAKKI İZİNİ .....	47
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	48
ÖZGEÇMİŞ .....	49





## TABLULAR LİSTESİ

Tablo 3-1 : *E.coli* için bazı biyokimyasal testler

Tablo 3-2: Örnek PCR çalışması

Tablo 4-1: Tesislere göre elde edilen toplam izolat sayısı

Tablo 4-2: Tesislere göre elde edilen toplam ve dirençli izolat sayısı



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 4-1: *E.coli* izolatlarının MacConkey Agardaki Görüntüsü

Şekil 4-2: *Mcr-1* geni için PCR sonuçları



## SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

4-amino-4-deoksi-L-arabinoz	L-ara-4-N
Avian Fekal <i>Escherichia coli</i>	AFEC
Avian Patojenik <i>Escherichia coli</i>	APEC
Base-pare	bp
Clinical & Laboratory Standards Institute	CLSI
Çoklu Antibiyotik Direnci	MDR
Deoksinükleotid Trifosfat	dNTP
Deoksiribonükleik asit	DNA
Diffüz Aderan <i>Escherichia coli</i>	DAEC
Diyarejenik <i>Escherichia coli</i>	DEC
Deoksiribo nükleaz	DNAz
Ekstraintestinal <i>Escherichia coli</i>	ExPEC
Endometriyal Patojenik <i>Escherichia coli</i>	EnPEC
Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>	EAEC
Enteroinvazif <i>Escherichia coli</i>	EIEC
Enteropatojenik <i>Escherichia coli</i>	EPEC
Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>	ETEC
Entrohemorajik <i>Escherichia coli</i>	EHEC
EPEC Adhezyon Faktörü	EAF
European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	EUCAST
Fosfoetanolamin	PEtN
Gram	g
Horizontal Gene Transfer	HGT
Human Epitelyal Tip 2	Hep-2
Karbapenem Dirençli Enterobacteriaceae	CRE

Lipopolisakkarit	LPS
Litre	L
Locus of Enterocyte Effacement	LEE
Meme Patojenik <i>Escherichia coli</i>	MPEC
Mikrolitre	$\mu$ l
Mikromolar	$\mu$ M
Mililitre	ml
Miligram	mg
Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu	MİK
Neonatal Menenjit <i>Escherichia coli</i>	NMEC
Patojenite Adası	PAI
Polimeraz Zincir Reaksiyonu	PCR
Revolutions per Minute	rpm
Ribonükleaz	RNAz
Santigrat Derece	C°
Septisemik Patojenik <i>Escherichia coli</i>	SEPEC
Tek Nükleotit Polimorfizmi	SNP
Triple Sugar Iron Agar	TSIA
Tris Acetate EDTA	TEA
Tris EDTA	TE
Tryptic Soy Broth	TSB
Ultraviolet	UV
Unit	U
İdrar yolu İnfeksiyonu-Urinary Tract Infection	UTI
Üropatojenik <i>Escherichia coli</i>	UPEC

## ÖZET

Erzaim, N. (2019). Tavuk Dışkılarından İzole Edilen *Escherichia coli*'lerde Plazmit Aracılı Kolistin Direnci Sağlayan *mcr-1* Geninin Araştırılması, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Veterinerlik Mikrobiyolojisi ABD. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul.

Bu çalışmada, Türkiye'de kesime sevk edilen tavuklardan elde edilen dışkı örneklerinden izole edilen *Escherichia coli*'lerde, kolistin direnci ve yakın dönemde keşfedilen, plazmit aracılı kolistin direnci sağlayan *mcr-1* geni varlığının araştırılması amaçlandı.

Bu amaçla çalışmaya alınan broyler piliçlere ait bağırsak örneklerinden elde edilen dışkılarından 200 adet *E.coli* izole ve tanımlanarak edildi. Söz konusu izolatlar, fenotipik kolistin direnç profilinin ortaya çıkarılması açısından katyon-ayarlı Broth Mikrodülsiyon yöntemi kullanılarak her bir izolat için kolistine ait Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) belirlendi. 7 farklı kesimhaneden elde edilen ve çalışılan toplam 200 adet *E.coli* den 15 tanesinde (%7,5) fenotipik kolistin direnci gözlemlendi.

İzolatlardan elde edilen plazmit DNA'lar kullanılarak, genotipik kolistin direncinin saptanması amacıyla Polimeraz Zincir Reaksiyonu yöntemiyle plazmit aracılı kolistin direnci sağlayan *mcr-1* geni varlığı araştırıldı. Fenotipik kolistin direnci gösteren izolatlar dahil olmak üzere çalışılan örneklerin hiçbirinde *mcr-1* genine rastlanmadı. Kolistin direnci saptanmasına rağmen plazmit aracılı *mcr-1* geninin bulunmaması ve direncin kromozom kaynaklı olması nispeten ümit verici olarak değerlendirilebilir. Ancak, yeni ortaya çıkan plazmit aracılı genlerinin de araştırılacağı gelecek bir çalışma yapılmasının gerekli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Kolistin, broyler, *E.coli*, *mcr-1*, antibiyotik direnci

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 22837

## ABSTRACT

Erzaim, N. (2018). Investigation of the Plasmid Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Escherichia coli* Isolates from Chicken Feces. İstanbul University-Cerrahpasa, Institute of Graduate Studies, Department of Veterinary Microbiology. Master of Science Thesis. İstanbul.

In this study, it was aimed to investigate colistin resistance and recently discovered plasmid-mediated colistin resistance gene, *mcr-1*, in *Escherichia coli* isolated from fecal samples obtained from broiler chickens in Turkey.

For this purpose, 200 *E.coli* was isolated and identified from feces obtained from intestine samples of broiler chickens. In order to reveal the phenotypic colistin resistance profile of the isolates, the minimum inhibition concentration (MIC) of colistin for each isolate was determined using the cation-adjusted Broth Microdilution method. Phenotypic colistin resistance was observed in 15 out of 200 *E.coli* (7,5%) obtained from seven different slaughterhouses.

The presence of *mcr-1* gene that provides plasmid mediated colistin resistance was investigated by Polymerase Chain Reaction (PCR) method for the detection of genotypic colistin resistance by using plasmid DNAs obtained from isolates. *Mcr-1* gene was not found in any of the studied samples including isolates showing phenotypic colistin resistance. Despite the detection of colistin resistance, the absence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene and the fact that the resistance is chromosome originated might be evaluated as relatively auspicious. However, it is considered that a future study to investigate the newly emerged plasmid mediated genes would be necessary.

Key Words: Colistin, broiler, *E.coli*, *mcr-1*, antibiotic resistance

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 22837

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kolistin (Polimiksin E), hem insan sağlığında hem veteriner hekimliğinde 50 yıldan fazladır yer alan, toksisitesi nedeniyle insanlarda kullanımını sınırlandırılmış fakat domuz ve tavuk yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan bir antibiyotiktir. İnsanlarda uzun süreli kullanımı, böbrekler ve sinir sistemi üzerindeki etkilerinden dolayı sakıncalı bulunsa da çoklu antibiyotik direnci (MDR) gösteren türlerin sayısının artmasıyla, Gram negatif bakterilerden kaynaklı hastalıkların tedavisinde son çare olarak kolistin kullanımı tekrar gündeme gelmiştir. Kolistin, sığır, koyun, domuz ve kanatlılarda *Escherichia coli* kaynaklı gastrointestinal enfeksiyonların sağaltımında kullanılmış ve kullanılmaya devam edilmektedir.

Polimiksin direnci, genellikle bakterilerin hücre duvarında bulunan bir lipopolisakkarit olan Lipid A'nın modifiye olması ile ilgilidir. Böylece hücrenin polimiksine afinitesi azaltılır. Yakın geçmişe kadar polimiksin direnci kromozomal SNP'ler (tek nükleotid polimorfizimleri) ya da mutasyonlarla ilişkilendirilmiştir. Ancak son araştırmalar, kolistin direncinden sorumlu plazmit aracılı *mcr-1* geni varlığını ortaya koymuştur.

Skov ve arkadaşlarının (2016) belirttiğine göre “*mcr-1* geni, (i) birçok ülkeye yayılmış, (ii) çeşitli hayvan yemlerinde, nehir suları dahil birçok çevresel materyalde, çeşitli et ve sebze ürünlerinde, infekte olmuş ya da belirti göstermeyen, uluslararası yolcuları kapsayan insan taşıyıcılarından elde edilen bakteriyel izolatlarda bulunmuş, (iii) *Escherichia coli* başta olmak üzere birçok bakteri türünde ve (iv) farklı plazmitlerden elde edilen, in vitro transfer seviyesi yüksek bir genidir”. *Mcr-1* geninin transfer seviyesi alıcının türüne ve suşa göre değişmektedir.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), 2012 yılında kolistini, tıp hekimliği için kritik önem taşıyan bir ilaç olarak tekrar sınıflandırmıştır. Kolistin, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* gibi çoklu antibiyotik direnci gösteren bakterilerde son çare tedavi olarak kullanılmaktadır. Bakteriler, kolistin direnci sağlayan ve plazmit aracılığıyla aktarılabilen *mcr-1* geni ile çoklu ya da genişletilmiş antibiyotik direnci kazanırsa, hastaları tedavi etmek için kullanılacak tedavi seçeneği kalmayacaktır. *Mcr-1* taşıyan plazmitin yayılma mekanizmasının aydınlatılması, hayvanlardan insanlara ve insanlar arası bulaşmaları sınırlamak ve uygulanacak dozların optimizasyonu açısından önemlidir.

Çoğunlukla içme suları ve yemlere katılmak suretiyle kanatlı hayvan üreticileri tarafından üreme desteği, profilaksi ve hastalık durumunu kontrol altına almak amaçlı, sağaltım ve verim odaklı kullanılan antibiyotikler arasında kolistin önemli bir yer tutmaktadır. Kolistin ve diğer antibiyotiklerin yüksek oranda kullanımı hem hayvan hem de insan sağlığını etkileyecek dirençli bakterilerin yayılmasına zemin hazırlamaktadır.

Bu çalışmada amaç, Türkiye’de kesime sevk edilen broylerlerden elde edilen dışkı örneklerinden izole edilen *E.coli*’lerin, kolistin direnci ve plazmit aracılı kolistin direnci sağlayan *mcr-1* geni taşıması yönünden araştırılmasıdır. Türkiye’de kolistin direnci üzerine yapılan çalışmalar oldukça sınırlıdır. Ülkemiz tavuk yetiştiriciliğinde, gerek kromozomal gerekse transfer seviyesi hayli yüksek ve türler arası aktarımı kolay olması dolayısıyla yüksek tehlike arz eden plazmit aracılı kolistin direnç geni varlığının araştırılması, gelecek döneme dair alınması muhtemel önlemler ve mevcut tablonun gözler önüne serilmesi açısından önem arz etmektedir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E.coli*), normalde zararsız bir kommensal olup, edindiği yer değiştirebilen genetik elementler sayesinde gastroenterit, idrar yolu infeksiyonu, merkezi sinir sistemi ve kan dolaşımı infeksiyonları gibi geniş bir yelpazede patojenite göstererek her yıl dünya çapında yüzlerce milyon insanı ve hayvanı etkileyen yüksek derecede adaptif bir bakteridir (Croxen ve Finlay, 2010; Omerovic ve ark., 2017).

Patojenik suşlar, temel olarak, ishale sebep olan intestinal diyarejenik (DEC) ve ekstraintestinal (ExPEC) olarak ikiye ayrılır. Diyarejenik suşlara ait Enteropatojenik *E.coli* (EPEC), Enterohemorajik *E.coli* (EHEC), Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), Enteroinvazif *E.coli* (EIEC), Enteroagregatif *E.coli* (EAEC) ve difüz aderan *E.coli* (DAEC) olmak üzere altı farklı patotip vardır. En çok rastlanılan ekstraintestinal (ExPEC) patojenik suşlar ise üropatojenik (UPEC), neonatal meninjit *E.coli* (NMEC), septisemik patojenik *E.coli* (SEPEC), avian patojenik *E.coli* (APEC) olup, yakın zamanda meme patojenik *E.coli* (MPEC) ve endometriyal patojenik *E.coli* (EnPEC) olmak üzere hayvanlarda hastalık yapıcı iki farklı suş daha tanımlanmıştır (Omerovic ve ark., 2017).

Birtakım özel yer değiştirebilen genetik elementlerin kaybı ya da kazanımı halinde bakteriler patojenite kazanabilirler. Bu süreçteki en önemli mekanizma organizmalar arası dikey gen aktarımıdır (HGT) ve yeni karakterlerin hızla yayılmasında etkili role sahiptir (Shames ve ark., 2009).

Patojen bakterileri patojen olmayanlardan ayıran virulans faktörlerin büyük bir bölümü patojenite adaları (PAI) olarak adlandırılır ve plazmit üzerinde ya da kromozomal olarak taşınır. Patojenite adaları çoğunlukla bakteriyofajlar, insersiyon sekansları ya da transpozonlar aracılığıyla tRNA genlerinin yakınına yerleşirler (Croxen ve Finlay, 2010).

#### 2.1.1. *E.coli* Patotipleri ve Patojeniteleri

Özellikle çocuklarda ölümle sonuçlanan ishal vakalarının çoğundan sorumlu olan Enteropatojenik *E.coli* (EPEC), temel olarak konakçı hücrenin mikrovilluslarına bağlanmak suretiyle epitelyal hücre iskeletindeki aktin proteinlerinin yapısını bozar ve polimerleşerek birikmesine yol açar. Bu özellik, LEE (locus of enterocyte effacement) diye adlandırılan 35 kb büyüklüğündeki patojenite adasının (PAI) varlığıyla edinilir (McDaniel ve ark., 1995). Plazmitle taşınan EPEC adezyon faktörü (EAF), adhezyon

sürecinden ve oluşan yapısal bozukluklardan sorumlu olan temel faktördür (Omerovic ve ark., 2017).

Gelişmiş ülkelerde görülen geniş çaplı gastroenterit salgınlarından sorumlu olan Enterohemorajik *E.coli* (EHEC), insanlarda distal ileum ve kalınbağırsakta kolonize olur ve oldukça bulaşıcı bir profil gösterir. Sığırlar, bu suş için temel rezervuar organizmalar olup insanlara bulaşma kontamine yiyecek ve su yoluyla gerçekleşir (Croxen ve Finlay, 2010).

Enterotoksijenik *E.coli* (ETEC), gelişmekte olan ülkelerde çocukluk çağı ishallerinin temel etkenlerinden biridir. Hastalığın seyri vakaya göre hafif, orta ve ağır olmak üzere farklılık gösterir. Bu ülkelere yolculuk eden turistlerde rastlanan sulu ishal vakalarının büyük bir çoğunluğu bu etkenin varlığından kaynaklanır. Evcil hayvanlarda görülen ishal olgularında başlıca etken olan ETEC, enterotoksin salgısı, sahip oldukları fimbrialar ve afimbrial adhezinler ile patojenite gösterir (Kaper ve ark., 2004; Omerovic ve ark., 2017).

Enteroagregatif *E.coli* (EAEC), gelişmiş ve gelişmemiş ülkelerde, yetişkinlik ve çocukluk dönemi persistan ishal salgınlarına yol açar. Human epitelyal tip 2 (HEp-2) hücrelerine, oto-agregatif diye adlandırılan bir patern ile birbirlerinin üzerine yapışarak kolonize olurlar. Yapılan çalışmalar, HEp-2 hücrelerine difüz (gerçek) yapışma gösteren Diffüz aderan *E.coli* (DAEC)'lerin de, ishal vakalarıyla ilişkili olduğunu ortaya çıkarmıştır (Gomes ve ark., 2016; Kaper ve ark., 2004; Omerovic ve ark., 2017).

Enteroinvazif *E.coli* (EIEC), gerek biyokimyasal gerekse genetik özellikler ve sergiledikleri patojenite açısından *Shigella* türleriyle birçok benzerlik gösterir ve taksonomik açıdan neredeyse ayırt edilemeyen üyeleri vardır. Çoğunlukla sulu ishale yol açmakla beraber, invazif inflamatuvar kolit ve nadiren dizanteri vakalarında da görülür. *Shigella* türlerinden bazı biyokimyasal testler aracılığıyla ayırt edilebilse de bu patotipler benzer temel virulans faktörlerine sahiptir (Kaper ve ark., 2004; Omerovic ve ark., 2017).

Üropatojenik *E.coli* (UPEC), idrar yolu infeksiyonlarına (UTI) yol açar. Köpek, kedi ve insanlardaki sistit vakalarında bu etkene rastlanmakta olup hastalık durumundan sorumludur (Moulin-Schouleur ve ark., 2007).

Kanatlılarda yüksek morbidite ve mortalite ile ekonomik açıdan önemli zararlara yol açabilen ekstraintestinal infeksiyonlardan sorumlu olan Avian patojenik *E.coli*

(APEC), koliseptisemise yol açan önemli bir suştur. Yapılan bazı çalışmalar, APEC ve ExPEC suşlarının ilişkili olduğunu ortaya koyarak yenidoğan meningitis vakalarında APEC'in zoonotik etken olabileceğini ifade etmiştir (Moulin-Schouleur ve ark., 2007).

## 2.2. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları

Antibiyotikler, mikroorganizmalar tarafından diğer mikroorganizmaların üremelerini durdurmak ya da yavaşlatmak için salgıladıkları ve düşük miktarlarda bile ciddi etkileri olan kimyasal ajanlardır (Schlegel, 2003).

Antibiyotiklerin uygunsuz kullanımı sonucunda, ilk keşiflerinden ve insan sağaltımında kullanımından 50 yıl sonra, bilinen antibiyotiklere karşı direnç profili sergileyen bakteri suşları ortaya çıkmaya başlamıştır (Akt: Etebu ve Ukpong, 2016). Bakteriler doğal olarak kendi ürettikleri antibiyotiklere karşı dirençlidir. Kazanılmış antibiyotik direnci ise, bakterilerin daha önceden duyarlı oldukları bir antibiyotiğe karşı sonradan gösterdikleri direnç olarak tanımlanır (Etebu ve Ukpong, 2016).

Antibakteriyel direnç mekanizmaları aşağıdaki gibi sıranalabilir:

- Eflux
- Hücresel hedef bölgenin modifikasyonu
- Antibiyotiğin yapısını bozacak enzimlerin üretimi
- Antibiyotiği etkisiz hale getirmek için alternatif metabolik yolların etkinleştirilmesi
- Antibiyotik ajanın içeri girmesini engellemek için transmembran proteinlerinin üretiminin durdurulması
- Hedef enzimin yüksek miktarlarda üretilmesi (Etebu ve Ukpong, 2016)

Kazanılmış antibiyotik direnci, direnç mekanizmalarından birini harekete geçirecek kromozomal mutasyonlar sonucu oluşabildiği gibi, sözkonusu direnci sergileyen başka bir organizmadan gen ya da gen grupları aktarımı ile de ortaya çıkabilir (Baquero ve Martínez, 2000; Tenover, 2006)

### 2.3. Polimiksin Sınıfı Antibiyotikleri

Polimiksin sınıfı antibiyotikleri ilk olarak 1960'larda keşfedilmesine rağmen, bu gruba ait birçok antibiyotik, yüksek nefrotoksisite gösterdiği için insanlarda kullanımı oftalmik ve topikal olarak sınırlandırılmış fakat veteriner hekimliği uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaya devam edilmiştir. Bununla beraber, Polimiksin ailesi içinde, kısmen güvenli kabul edilen Polimiksin B ve Polimiksin E (Kolistin), çoklu direnç profili sergileyen Gram negatif bakteri infeksiyonları karşısında insanlarda sistemik olarak tekrar kullanılmaya başlanmıştır. Polimiksin kullanımının tekrar yaygınlaşması ve uygunsuz kullanımıyla polimiksin direncinde de artış gözlemlenmiştir (Baron ve ark., 2016; Levin ve ark. 1999; Srinivas ve Rivard, 2017).

#### 2.3.1. Kolistin (Polimiksin E)

Polimiksin sınıfı antibiyotiklerden biri olan Kolistin (Polimiksin E), *Paenibacillus polymyxa* tarafından üretilen, hidrofilik ve hidrofobik kısımlara sahip bir polikasyonik lipopeptittir. Bakterilerin hücre duvarında bulunan Lipopolisakkaritlere (LPS) katyonik kısımlarıyla bağlanır. Moleküler düzeyde, halkasal polipeptit A ve B'den oluşur. Temel etki mekanizması, sıvı ortamda bakterilerin hücre duvarlarının çözülmesine yol açmaktır (Caniaux ve ark., 2016).

Kolistin katyonik bir peptittir ve gram negatif bakterilerin dış zarındaki anyonik lipopolisakkaritlere (LPS) bağlanarak etkisini gösterir. Kolistin, seçici olarak bağlandığı Lipopolisakkarit A molekülleri arasındaki elektrostatik etkileşim sonucu, lipopolisakkaritleri stabilize eden magnezyum ve kalsiyum iyonlarının yerlerini değiştirerek hücre duvarı üzerindeki etki bölgesinde düzensiz iyon dağılıma yol açar. Bunun sonucunda hücre duvarının geçirgenliği ve stabilitesi değişerek hücre içeriğinin dışarı çıkması ile bakterinin ölümüne neden olur (Karaiskos ve ark., 2016).

Kolistinin moleküler ağırlığı 1750 dalton olup, yağ asidi zincirine bağlı katyonik halkasal dekapeptit içermektedir. Molekülün amino asit içeriği D-lösin, L-treonin ve L- $\alpha$ - $\gamma$ -diaminobütirik asittir. Son amino asit, 6-metil-oktanoik asite bağlanırsa Kolistin A, 6-metil-eptanoik aside bağlanırsa Kolistin B elde edilir. İlaç olarak kullanılan formları farklı miktarlarda Kolistin A ve B bileşenleri içerebilir. Ticari olarak kolistin sülfat ve kolistimetat sodyum (pentasodyum kolistimetansülfat, kolistin sülfonil metat ve kolistin metan sülfat) olarak piyasada bulunur. Kolistin sülfat, kolistin bileşikleri arasında toksisitesi en yüksek olanıdır (Falagas ve Kasiakou, 2005).

Kolistin birçok ülkede hayvancılıkta hastalıkların kontrolünde kullanılmasına rağmen, yüksek toksisitesi, böbrek ve sinir sistemi üzerine etkileri sebebiyle insanların sağaltımında kısıtlı olarak kullanılmıştır. Buna rağmen, son yıllarda rastlanan çoklu direnç profili sergileyen *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *E.coli* gibi zorlu bakteri infeksiyonlarının sıklığı artınca yeniden kullanımı gündeme gelmiştir (Caniaux ve ark., 2016).

### **2.3.2. Kolistin Direnç Mekanizmaları**

#### **2.3.2.1. İntrensek Direnç**

Gram pozitif ve anaerob bakteriler, lipopolisakkarit içeren hücre duvarına sahip olmadığından polimiksinlere karşı doğal direnç gösterirler. Gram negatif bakterilerden ise *Brucella* spp., *Burkholderia cepacia*, *Edwardsiella* spp., *Morganella morganii*., *Proteus* spp., *Providencia* spp. ve *Serratia* spp., hücre duvarlarındaki lipopolisakkaritlere katyonik bileşikler ekleyerek polimiksin bağlanma bölgesine olan afiniteyi düşüren genlere sahiptir ve bu şekilde polimiksin direnci sergilerler (Baron ve ark., 2016).

#### **2.3.2.2. Lipopolisakkarit (LPS) Modifikasyonu**

Polimiksin direncinin en yaygın mekanizması bakteri dış zarındaki lipopolisakkaritlerin modifikasyonudur. Kromozomal mutasyonlar sonucunda sergilenen direnç, çoğunlukla kolistinin temel bağlanma bölgesi olan hücre duvarındaki Lipid A molekülünün yapısal değişikliği sonucu ortaya çıkar. Bu değişikliklerden en sık görüleni, Lipid A molekülüne bağlanan 4-amino-4-deoksi-L-arabinoz (L-Ara-4-N) ve fosfoetanolamin (PEtN) katyonik bileşiklerinin eklenmesidir (Srinivas ve Rivard, 2017).

#### **2.3.2.3. Plazmit Aracılı Kolistin Direnci**

Plazmit aracılı kolistin direnci ilk kez Liu ve arkadaşları (2016) tarafından *E. coli* ve *Klebsiella* 'da rapor edilmiştir. Yeni bulunan ve kolistin direncine yol açan *mcr-1* geni, PEtN transferaz enziminin üretilmesi mekanizmasıyla Lipid A molekülüne fosfoetanolamin (PEtN) eklenmesine yol açar ve IncI2 tip plazmit aracılığıyla taşınır (Baron ve ark., 2016).

Yakın zamanda yapılan araştırmalar, plazmit aracılı kolistin direncinden sorumlu *mcr-1* geni varlığını ortaya çıkarmıştır. Plazmit aracılı dirençten çoğunlukla *mcr-1* sorumlu tutulmakla birlikte son iki yıl içinde varyantları olan *mcr-1.1*, *mcr-1.2*, *mcr-1.3* genleri dışında, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-7.1* ve *mcr-8*

genlerinin de *Enterobacteriaceae*'da kolistin direnci kazandırdığını ortaya çıkarmıştır (Carattoli ve ark., 2018; Di Pilato ve ark., 2016; Garcia-Graells ve ark., 2018; Principe ve ark., 2018; Xavier ve ark., 2016; Yang ve ark., 2018; Wang ve ark., 2018). Bu genler, temel olarak fosfoetanolamin transferaz enziminin kodlanmasından sorumludur (Borowiak ve ark., 2017; Carattoli ve ark., 2017; Liu ve ark., 2016; Xavier ve ark., 2016; Yin ve ark., 2017).

Fenotipik plazmit aracılı kolistin direnci EUCAST'ın referans metot olarak kabul ettiği broth mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenirken, kolistin direncinin genotipik olarak belirlenmesinde çoğunlukla PCR ve tüm genom sekanslama yöntemleri verimli olarak kullanılmıştır. Spektroflorometri, MALDI-TOF MS, mikroarray ve multipleks real-time PCR yöntemleri ise gelecekte kullanımı yaygınlaşması beklenen tespit yöntemleridir (Osei Sekyere ve ark., 2016). Buna rağmen, Jayol ve arkadaşları (2016), *Enterobacteriaceae*'da kolistin direnci saptanması için kullanılabilir yeni geliştirilen Rapid Polymyxin NP test, BD Phoenix Otomasyon sistemi ve referans yöntem olan broth mikrodilüsyon metodunu karşılaştırdıkları çalışmalarında, BD Phoenix otomasyon sisteminin yüksek oranda yanlış duyarlılık sonucu verdiğini ve sonuçların Broth mikrodilüsyon metodu ile kontrol edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Rapid Polymyxin NP test, büyük oranda Broth mikrodilüsyon yöntemiyle tutarlılık gösterse de, MİK değerlerinin belirlenmesi gerektiğinde Broth mikrodilüsyon yöntemine başvurulmasını tavsiye etmişlerdir (Jayol ve ark., 2017).

#### **2.3.2.4. Dünyada Plazmit Aracılı Kolistin Diren**

Liu ve arkadaşları, *mcr-1* geni varlığıyla, *E.coli* ve *Klebsiella*'da ilk kez plazmit aracılı kolistin direncini rapor etmiştir (Liu ve ark., 2016). Söz konusu çalışmalarında, domuzlardan elde ettikleri *E.coli* izolatlarının %20,6'sında, perakende satılan domuz eti ve tavuk ürünlerinin %14,9'unda ve Çin'deki hastalardan elde ettikleri izolatların %1,4'ünde *mcr-1* genine rastlanmıştır. Çin'den gelen ilk rapordan sonra Kamboçya (Stoesser ve ark., 2016), Japonya (Suzuki ve ark., 2016), Laos (Olaitan ve ark., 2016), Malezya (Petrillo ve ark., 2016; Yu ve ark., 2016), Tayvan (Kuo ve ark., 2016), Tayland (Akt:Schwarz ve Johnson, 2016), Vietnam (Malhotra-Kumar ve ark., 2016; Thanh ve ark., 2016), Belçika (Xavier ve ark., 2016; Malhotra-Kumar ve ark., 2016), Danimarka (Hasman ve ark., 2015), Fransa (Haenni ve ark., 2016; Perrin-Guyomard ve ark., 2016), Almanya (Falgenhauer ve ark., 2016), İngiltere (Anjum ve ark., 2016; Doumith ve ark.,

2016), İtalya (Cannatelli ve ark., 2016; Giufrè ve ark., 2016), Litvanya (Ruzauskas ve Vaskeviciute, 2016), Polonya (Akt:Schwarz ve Johnson, 2016) , Portekiz (Figueiredo ve ark., 2016), İspanya (Prim ve ark., 2016), İsviçre (Zurfuh ve ark., 2016), Hollanda (Kluytmans-van den Bergh ve ark., 2016; Veldman ve ark., 2016), Tunus (Grami ve ark., 2016), Cezayir ve Nijerya (Olaitan AO ve ark., 2016) , Güney Afrika (Akt:Schwarz ve Johnson, 2016), Mısır (Elnahriry ve ark., 2016), Arjantin (Liakopoulos ve ark., 2016; Rapoport ve ark., 2016), Venezuela, Brezilya (Fernandes ve ark.,2016) , Kanada (Akt:Schwarz ve Johnson, 2016) ve Amerika Birleşik Devletleri'nde (McGann ve ark., 2016) insan, domuz, kanatlı ve yiyeceklerden elde edilen izolatlardaki enterik bakterilerde *mcr-1* genine rastlanmıştır. Bu da genin tüm dünyaya yayıldığıнын bir göstergesidir. Bugüne kadar *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella*, *Vibrio* ve *Enterobacter*'de *mcr-1* varlığı rapor edilse de *E.coli*'de diğer türlere göre *mcr-1* görülme sıklığı daha fazladır (Irrgang ve ark., 2016; Zeng ve ark., 2016).

Amerika Birleşik Devletleri'nin Pensilvanya eyaletinde 49 yaşında, idrar yolu infeksiyonu olan bir hastadan elde edilen *E.coli*'lerde *mcr-1* genine rastlanmıştır. İzole ettikleri MRSN 388634 suşu, ilk kez İngiltere'de idrar kültüründe rastlanmış, ST457 sekans tipine ait ender bir suştur (McGann ve ark., 2016).

Karbapenem Dirençli Enterobacteriaceae (CRE) çok az antibiyotik türüne karşı duyarlıdır ve kolistin (Polimiksin E), bu bakterilerin yol açtığı infeksiyonları sağaltmada başvurulacak antibiyotiklerden biridir. Karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae*'lerde *mcr-1* genine rastlanması, tedavi seçeneklerini oldukça kısıtlayacaktır. Delgado ve arkadaşları (2016) , Venezuela'da yaptıkları ve 2015 yılına ait 16'sı insan ve 8'i köpek olmak üzere 24 dışkı örneği, 17 domuz, 16 kanatlı ve 36 çevresel materyalden (lağım çamuru) elde ettikleri toplam 93 izolattan iki tanesinde *mcr-1* ile karbapenem direnci sağlayan *blaNDM-1* genine birlikte rastlamışlardır. Çalışmada, insandan izole edilen örneğin, beta laktam antibiyotiklerine direnç sağlayan birçok gen ile birlikte çeşitli direnç genlerini taşımasıyla oldukça dirençli bir profil sergilemekte olduğu belirtilmektedir (Delgado ve ark., 2016).

Antibiyotikler, sadece hasta hayvanları tedavi etmek için değil, hayvan yetiştiriciliğinde hastalıkları önlemek için de kullanılır. Bununla beraber uzun yıllar büyümeye yardımcı olmak amacıyla da kullanılmıştır (Watkins, 2016). Avrupa Birliği ülkelerinde kolistin kullanım miktarı değişmekte olup Almanya tarım ve hayvancılıkta

yüksek miktarda kolistin kullanılmaktadır. Bununla beraber, Danimarka'da kolistin kullanımını düşük seviyede Fransa'daki kullanım orta seviye olarak değerlendirilebilir (Watkins ve ark., 2016).

Irrgang ve arkadaşları (2016), gerçekleştirdikleri araştırmada, 10,609 *E.coli* izolatını inceledikleri kapsamlı çalışmalarında, fenotipik olarak kolistine dirençli 505 örnekte *mcr-I* geni aramışlardır. *Mcr-I* geninin toplam prevalansını %3,8 olarak belirledikleri çalışmada, hayvanlara göre dağılıma bakıldığında %11,8 prevalansla hindilerde bu gene rastlanma sıklığının en yüksek olduğu görülmüştür. Toplam 1,809 tavuğun incelendiği aynı çalışmada, en yüksek ikinci prevalansı %6,7 ile broyler piliçler ve %4,3 ile tavuk etleri göstermiştir. Etçi sığırlarda ve bunlardan elde edilen süt ve peynir gibi ürünlerde plazmit aracılı direnç genine rastlanmayıp, domuzlarda %1,5 gibi düşük bir oranda *mcr-I* geni görülmüştür. *Mcr-I* genine kanatlılarda rastlanma yüzdesi, sığır ve domuzlardan fazladır ve bu durum Asya ülkelerinde tam tersidir. Asya ülkelerinde, *mcr-I* genine en çok domuzlardan elde edilen izolatlarda rastlanmıştır. Kusumoto ve diğerleri (2016), 1991-2014 yılları arasında elde edilmiş, domuzlarda hastalık etkeni olan ve hasta domuzlardan izole ettikleri 684 *E.coli* suşunu (serogrup O139, O149, O116 ve OSB9) *mcr-I* varlığı açısından incelemişlerdir. Bunlar arasından fenotipik olarak kolistin direnci saptadıkları 309 (%45) örneğin 90 (%13) tanesini *mcr-I* pozitif olarak belirtmiştir. Çalışmaya göre, domuzlarda hastalık etkeni olan *E.coli* suşlarının neredeyse yarısının kolistin direncine sahip olduğu görülmektedir. Avrupa ülkelerine bakıldığında, Almanya gibi Fransa'da hindi ve tavuklarda *mcr-I* varlığı yüksek olsa da Almanya'da rastlanma oranı Avrupa genel ortalamasından yüksektir. Bu durum, Almanya'da polimiksin grubu antibiyotiklerin tarım ve hayvancılıkta kullanımının diğer Avrupa ülkelerine göre yüksek olmasına bağlanmıştır (Irrgang ve ark., 2016).

Çin'de tarım ve hayvancılıkta yoğun kolistin kullanımının bir sonucu olarak *mcr-I* taşıyan *E.coli*'lerde artış olduğu belirtilmektedir. Ayrıca, çoklu antibiyotik direnci sağlayan genlerin de aynı plazmit aracılığıyla aktarılabilmesi ihtimali, kullanılan diğer antibiyotiklerin de kolistin direncine yol açabileceği öngörülmektedir (Watkins ve ark., 2016).

Kolistin direncine yol açan ve plazmit aracılı taşınan *mcr-I* geni, sadece çiftlik hayvanları ve çevresel örneklerde tespit edilmemiş olup, vahşi hayvanlarda da gözlemlenmiştir. Bu durum, *mcr-I* taşıyıcı organizmaların sayısının artması açısından



endişe vericidir (Sellera ve ark., 2016). Ruzauskas ve arkadaşları (2017), yaptıkları çalışmada, gümüş martılarda (*Larus argentatus*) *mcr-1* geni taşıyan *E.coli*'ye rastlamışlardır. Benzer şekilde, bir başka martı türü olan *Larus dominicanus*'ta da *mcr-1* pozitif *E.coli*'lere rastlanmıştır (Liakopoulos ve ark., 2016). Sözkonusu deniz kuşlarının yanısıra, Macellan penguenlerinde (*Spheniscus magellanicus*) de aynı durum gözlemlenmiştir (Sellera ve ark., 2016).

Yeni Kaledonya'da, bir yeni doğan hastanın mide sıvısından ve 42 yaşındaki bir başka hastanın karın boşluğundan elde edilen ödem sıvısından *mcr-1* pozitif *E.coli*'lere rastlanmıştır. Okyanusya'ya ait bildirilen ilk olguların birbiriyle ilişkisinin ve hayvanlarla doğrudan temaslarının olmadığı belirtilmiştir (Robin ve ark., 2016).

Barcelona'da lağım sularını inceleyen bir çalışmada, iki ayrı atık su artıma tesisinde toplam 29 adet *mcr-1* geni taşıyan *E.coli*'ye rastlanmıştır. Aynı bölgede, nehir sularında söz konusu dirençli bakterilere rastlanmamakla birlikte, atık su tesislerinde *mcr-1* taşıyan bakterilerin bulunması, bölgede yaşayan insan ve hayvanlar arasında da böyle bir direnç profili sergileyen bakterilerin yaygın olabileceği şeklinde yorumlanmıştır (Ovejero ve Muniesa, 2017). Çin'de yapılan bir çalışmada, kırsal kesime ait şebeke sularında da *mcr-1* taşıyan ve bununla birlikte çoklu antibiyotik direnç profiline sahip *E.coli*'ler tespit edilmiştir (Sun ve ark., 2017).

Brezilya'da, marketlerde satılan tavuk etlerinde, insan ve hayvanlardan izole edilen *E.coli*'lerde gözlemlenen ve *IncX4* plazmiti ile taşınan *mcr-1* genine rastlanmıştır. Bu durum, tüketimde olan etlerin de söz konusu gen açısından rezervuar olarak değerlendirilebileceği anlamına gelmektedir (Monte ve ark., 2017).

Çin'de, 1136 *E.coli*'nin incelendiği bir çalışmada, %5.11 oranında *mcr-1* genine rastlanmış olup, bunlardan elde edilen izolatlardan ST155 suşunda, *mcr-1.3* olarak isimlendirilen yeni bir plazmit aracılı direnç geni varyantı tanımlanmıştır (Yang ve ark., 2017). Bu varyanta, bir başka çalışmada sağlıklı bir bireyden izole edilen ve kolistin direnci gösteren *Salmonella enterica* serovar Typhimurium'da da rastlanmıştır (Lu ve ark., 2017).

980 adet Avian Patojenik *E.coli* (APEC)'nin dahil edildiği bir araştırmada, izolatlar *mcr-1* geni varlığı açısından incelenmiştir. Kolibasiloz teşhisi olan hasta hayvanlardan elde edilen söz konusu bakterilerin yanı sıra, kontrol grubu olarak 220 adet Avian Fekal *E.coli* (AFEC) kullanılmış olup, hasta hayvanların 12 tanesinde ilgili gene rastlanmıştır.

Sağlıklı fekal örneklerdence *mcr-1* pozitif *E.coli* izole edilememiştir. Çalışma, hayvancılık faaliyetlerindeki yanlış uygulamaların kolistin direncinin artmasına sebep olduğunu destekler niteliktedir (Barbieri ve ark., 2017).

Tek Sağlık yaklaşımı kapsamında, toplumda görülen *mcr-1* taşıyıcı bakterilerle, kolistin hayvancılıkta kullanımını arasında sistemli bir epidemiyolojik analizin yapılması gerektiğini savunan Trung ve arkadaşları (2017), Vietnam’da yürüttükleri ve çiftlik başına bir çiftçi düşecek şekilde 204 adet çiftlik ve 204 adet çiftçiyi dahil ettikleri çalışmalarında, çiftliklerden ve çiftçilerden fekal örnekler toplamışlardır. Kontrol grubu olarak, yaş ve cinsiyeti eşleşen, tavukçulukla ilgisi olmayan ve çiftlik hayvanlarıyla doğrudan teması olmayan, kırsalda ve şehirde yaşayan 204’er kişiden de örnekler almışlar ve bulguları karşılaştırmışlardır. Çalışma göstermiştir ki, *mcr-1* pozitif tavuklara maruz kalan çiftçilerde, *mcr-1* pozitif *E.coli*’lere rastlanma sıklığı daha yüksektir (Trung ve ark., 2017).

Kolistin dâhil olmak üzere “son çare” olarak değerlendirilen antibiyotiklerin tarım ve hayvancılıkta kullanımının yasaklanması tavsiye edilmektedir (*The Review on Antimicrobial Resistance*, 2016).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Gereç

##### 3.1.1. Örnekler

İstanbul, Tekirdağ, Balıkesir, Sakarya ve İzmir illerinde yer alan yedi farklı kesimhanede Ocak 2017 - Haziran 2017 tarihleri arasında kesime sevk edilen sağlıklı broyler piliçlere ait bağırsak örnekleri belirli aralıklarla İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarına getirildi. Çalışmaya alınan her hayvandan bir adet olmak üzere toplanan bağırsak örneklerinden dışkı numuneleri alınarak 200 adet *E.coli* izolatu elde edilinceye kadar örnek toplanmasına devam edildi. Tesisler ve alınan örnek sayıları Tablo 3. 1’de belirtildi.

##### 3.1.2. Kullanılan Besiyerleri, Biyokimyasal Testler ve Ayraçlar

###### 3.1.2.1. Mac Conkey Agar

1.5465.05, Merck

25 g besiyerine 500 ml distile su eklenerek hazırlandı. 15 dakika süre ile 121 °C’de otoklavda sterilize edilerek 25 ml hacimde petri kutularına dağıtıldı. Hazırlanan besiyerleri 4 °C’de muhafaza edildi.

###### 3.1.2.2. Üre Agar

CM0053, Oxoid

12,5 g besiyerine 95 ml distile su eklenilerek hazırlanıp, 15 dakika süre ile 121 °C’de otoklavda sterilize edilerek soğumaya bırakıldı. Bu sırada 5 ml %40’lık üre solüsyonu steril ortamda filtre edildi. Yaklaşık 50 °C’ye kadar soğuyan 95 ml hazırlanmış üre besiyerine, son konsantrasyonu %2 olacak şekilde eklendi. Hazırlanan karışım 5 ml hacminde steril cam tüplere dağıtıldı ve yatık halde katılaştırılarak 4 °C’de saklandı.

###### 3.1.2.3. Tyriptic Soy Broth (TSB)

1.05459.05, Merck

3 g besiyerine 100 ml distile su eklenerek hazırlandı. 15 dakika süre ile otoklavda 121 °C’de sterilize edilerek 4 ml hacimde steril cam tüplerde yatık olarak katılaştırıldı. Kullanılana kadar 4 °C’de muhafaza edildi.

### 3.1.2.4. Triple Sugar Iron Agar (TSIA)

CM0277, Oxoid

6,5 g besiyerine 100 ml distile su eklenerek hazırlandı. 7 ml hacimde steril cam tüplere dağıtılıp otoklavda 121 °C’de 15 dakika boyunca steril edildi. Yatık olarak katılaştırıldıktan sonra 4 °C’de saklandı.

### 3.1.2.5. Sitrat Agar (Simmons-Citrat Agar)

1.02501.05, Merck

2,25 g besiyerine 100 ml distile su eklenerek hazırlandı. Steril cam tüplere 7 ml hacimde dağıtılıp 121 °C’de 15 dakika süreyle otoklavda steril edildi. Yatık olarak katılaştırılıp 4 °C’de saklandı.

### 3.1.2.6. Metil Red-Voges Proskauer Broth (MR-VP Broth)

1.05712 Merck

1,7 g besiyerine 100 ml distile su eklenerek hazırlandı. 4 ml hacimde tüplere dağıtılarak otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi ve 4 °C’de muhafaza edildi.

### 3.1.2.7. Oksidasyon/Fermentasyon Besiyeri

Aşağıdaki oranlara göre hazırlanıp otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi ve soğumaya bırakıldı. Steril koşullarda içerisine 1,5 ml serum eklenerek 4 ml hacimde steril cam tüplere dağıtıldı. Kullanılana kadar 4 °C’de muhafaza edildi.

İçerik	Miktar
Pepton	0,2 g
Yeast	0,1 g
Glikoz	1 g
NaCl	0,5g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,03 g
Agar	0,3 g
Bromthymol blue	0,03 g
Distile su	100 ml

### 3.1.2.8. Jelatin Hidrolizasyon Besiyeri

Aşağıdaki oranlara göre hazırlanıp 4 ml hacimde cam tüplere dağıtılarak otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edilmiş ve 4 °C’de muhafaza edildi.

İçerik	Miktar
Jelatin	12 g
Pepton	0,5 g
Beef Extract	0,3 g
Distile su	100 ml

### 3.1.2.9. Fenilalanin Deaminaz Besiyeri

Aşağıdaki oranlara göre hazırlanıp 7 ml hacimde cam tüplere dağıtılarak otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi ve 4 °C’de muhafaza edildi.

İçerik	Miktar
DL Phenyl	0,2 g
Agar	1,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,1 g
NaCl	0,5 g
Yeast Extract	0,3 g
Distile su	100 ml

### 3.1.2.10. Karbonhidrat Fermentasyon Test Besiyerleri

Aşağıda belirtilen içeriğe sahip besiyerleri 2 ml hacimde cam tüplere dağıtılarak otoklavda 121 °C’de 15 dakika steril edildi. Tüplerdeki besiyerlerine 500 µl %1’lik ilgili steril karbonhidrat solüsyonları eklenerek 4 °C’de muhafaza edildi. Bu çalışma için inositol, laktoz, mannoz, ksiloz, mannitol, maltoz ve sorbitol solüsyonları kullanıldı.

İçerik	Miktar/Konsantrasyon
Bakteriyolojik pepton	5 g
NaCl	2,5 g
Bromkresol moru	%0,0025
Distile su	100 ml

### 3.1.2.11. Katyon-Ayarlı Mueller-Hinton Broth (MHB)

90922, Fluka

22 g besiyerine 1000 ml distile su eklenerek hazırlandı. 121 °C’de 15 dakika steril edilerek +4 °C’de saklandı.

### 3.1.2.12. Diğer Biyokimyasal Testler ve Ayraçlar

İdentifikasyon sırasında kullanılan diğer biyokimyasal testler ve ayraçlar şunlardır:

Gram Boyama Seti (GBL 5026/01,02,03,04), MR ayracı olarak metil red, Indol testi için Kovaks ayracı, Katalaz testi için Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Oksidaz stikleri (BR64A, Oxoid), Voges-Proskauer Ayracı A ve B (Barrit’s Reagent A, Sigma, 29333 ve Barrit’s Reagent B, Sigma, 39442).

### 3.1.3. Kolistin Sülfat

Çalışmada kullanılan antibiyotik olan Kolistin (Polimiksin E), EUCAST’ın çalışmalarında kullanılması yönündeki tavsiyesine göre Kolistin Sülfat Tuzu (CAS

numarası 1264-72-8) formunda, toz halinde ambalajlanmış olarak SIGMA-ALDRICH firmasından temin edildi (Potens  $\geq$  15000 UN/mg).

### 3.1.4. Çalışmada kullanılan *mcr-1* Pozitif Plazmit Örnekleri

Çalışmada pozitif kontrol olarak kullanılmak üzere *mcr-1* genini taşıyan *E.coli*'lerden ekstrakte edilmiş plazmit DNA'lar, Fransa'dan *L'Agence Nationale de Sécurité Sanitaire de l'alimentation, l'environnement et du travail (ANSES)* ve Danimarka'dan *Statens Serum Institut* olmak üzere iki farklı kurumdan temin edildi.

### 3.1.5. Moleküler Çalışmalarda Kullanılan Gereçler

#### 3.1.5.1. Plazmit DNA Ekstraksiyon Kiti

Plazmit DNA ekstraksiyonunda Qiagen firmasına ait ticari kit kullanıldı (QIAmp DNA Mini).

Kit içeriği aşağıdaki gibidir:

- QIAmp Mini Spin kolonları
- Toplama tüpleri (2ml)
- ATL tamponu
- Proteinaz K
- AL tamponu
- AW 1 tamponu
- AW 2 tamponu
- AE tamponu

#### 3.1.5.2. Plazmit DNA Ekstraksiyonu Sırasında Kullanılan Diğer Gereçler

Ekstraksiyon sırasında kit üretici firma tarafından sağlanmayan gereçler:

- Etanol (96-100 %)
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri (Axygen)
- Aerosol bariyerli mikropipet uçları (Axygen, 1000  $\mu$ l)
- Mikrosantrifüj (Hettich, 2 ml tüplere uygun rotor ile birlikte)

- Vorteks (Biosan)
- Isıtıcı blok (56 °C) (Labnet)
- Su banyosu (70 °C) (Biosan)

### 3.1.5.3. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Kiti

İlgili genin amplifikasyonu için QIAGEN® Multiplex PCR ticari kiti kullanıldı (206143).

Kit içeriği aşağıdaki gibidir:

- QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix\*
- Q - solution
- Distile su (DNAz ve RNAz'dan arındırılmış)

\*15 mM MgCl<sub>2</sub> içerir ve reaksiyon konsantrasyonu 1,5 mM olacak şekilde ayarlandı.

### 3.1.5.4. Primerler

Amplifikasyonda kullanılan primerler aşağıda gösterilmiştir.

Hedef Gen	Primer Dizisi	Kaynak
mcr-1	CLR F 5'CGGTCAGTCCGTTTGTTC'3 CLP R 5'CTTGGTCGGTCTGTAGGG'3	Liu ve ark., 2015

### 3.1.5.5. Amplifikasyon Sırasında Kullanılan Diğer Gereçler

- Thermal cyclers (Axygen Maxygen)
- 0,2 ml PCR tüpleri (Axygen, ince cidarlı, DNAz ve RNAz'dan arındırılmış)
- 0,5 ml PCR tüpleri (Axygen, ince cidarlı, DNAz ve RNAz'dan arındırılmış)



### 3.1.5.6. Agaroz Jel Elektrofözezi

Agaroz jel elektrofözezi için kullanılan gereçler:

- 6X yükleme boyası (R0611, Thermo Scientific)
- Agaroz (A9539, Sigma)
- Agaroz jel elektrofözezi sistemi (Agagel Mini-Wide)
- Etidyum Bromür (E1510, Sigma)
- Güç kaynağı (Biometra-Power pack P25)
- Mikrodalga ısıtıcı (Vestel)
- O'GeneRuler 100 bp marker (SM1153, Thermo Scientific)
- TAE tamponu (AM9869, Thermo Scientific)
- UV Jel görüntüleme sistemi (Infinity, Vilber Lourmat)

### 3.1.5.7. Diğer Gereçler

- 10 µl Pipet uçları (Axygen, steril, filtreli, DNaz ve RNaz' dan arındırılmış)
- 100 µl Pipet uçları (Axygen, steril, filtreli, DNaz ve RNaz' dan arındırılmış)
- 1000 µl Pipet uçları (Axygen, steril, filtreli, DNaz ve RNaz' dan arındırılmış)
- 96 kuyucuklu plakalar (Sigma)
- Etüv (Nüve, Aerob)
- Hassas terazi (BEL)
- Otoklav (Atık ve kirli malzeme için, ALP)
- Otoklav (Temiz malzeme için, Nüve)
- Otomatik pipetler (0.5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl, Thermo Scientific)
- Öze (halka ve iğne uçlu)
- Petri kutuları (Lamtek, steril, 9cm)
- Steril kabin (Heal Force)

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

Broyler piliçlere ait bağırsak örneklerinin dış yüzeyi dağlandıktan sonra steril öze ile alınan bağırsak içeriği izolasyon amacıyla MacConkey agar besiyerine inoküle edilerek aerob koşullar altında 37°C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucu MacConkey agar üzerinde laktoz pozitif özellik gösterdiği düşünölen pembe renkli koloniler *E.coli* şüpheli olarak seçilerek saf kültür eldesi için kanlı ve MacConkey agara pasajlandı. Pasajlanan kültürler yine 37°C’de 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonrasında identifikasyon için gram boyanma özelliği, katalaz, oksidaz enzimi varlığı ve O/F test besiyerinde üreme özellikleri saptandı ve *E.coli*’ye uygun özellik gösteren izolatların identifikasyonunun tamamlanması için Metil Red-Voges Proskauer testi, indol testi, sitrat testi, TSIA’da H<sub>2</sub>S oluşumu, üreaz aktivitesi gibi biyokimyasal testlerden ve karbonhidrat fermantasyon testlerinden faydalanıldı. İzolatların *E.coli* olarak tanımlanması için kullanılan Quinn ve ark. (1994)’da belirtilen biyokimyasal testlere ait sonuçlar Tablo 3-1’de gösterilmiştir.

**Tablo 3-1 : *E.coli* için bazı biyokimyasal testler (Quinn ve ark. 1994)**

Test	Sonuç	Test	Sonuç
Katalaz	+	Fenialanin deaminaz	-
Oksidaz	-	İnositol	-
İndol	+	Mannoz	+
Voges Proskauer	-	Ksiloz	+
Metil Red	+	Laktoz	+
Sitrat	-	Mannitol	+
Üre	-	Maltoz	+
H <sub>2</sub> S	-	Sorbitol	+
Jelatin	-	O/F	Fermentatif
Gram boyanma özelliği: Gram(-) çomak			

- : Negatif sonuç + : Pozitif sonuç

Yukarıda verilen biyokimyasal özellikleri gösteren izolatlar *E.coli* olarak tanımlandı ve çalışmanın daha sonraki bölümlerinde kullanılmak üzere üzere -20°C'de saklandı. Bunun için bir gece önce TSB besiyerlerine ekimleri yapılarak inkübasyona bırakıldı. 0,5 ml %50lik gliserol ve 1 ml taze kültürden ihtiva eden stok, steril tüplere konuldu (Quinn ve ark.,1994).

### 3.2.2. Bakterilerin Kolistin (Polimiksin E) Duyarlılığının Fenotipik Yöntemle Belirlenmesi

#### 3.2.2.1. MİK (Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu)

*E.coli* izolatlarının kolistine karşı Minimum İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK), CLSI-EUCAST Polimiksin Direnci Çalışma Grubu'nun, 22 Mart 2016 tarihinde yayınladığı bildiriye istinaden, Enterobacteriaceae için geçerlilik ve güvenilirliği yönünden referans metod olarak kabul ettiği Broth Mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiştir (ISO-standart Broth Mikrodilüsyon Yöntemi 20776-1). Mikrodilüsyonda EUCAST tavsiyesine göre katyon-ayarlı Mueller Hinton Broth (MHB) kullanıldı.

İzolatların Broth Mikrodilüsyon yöntemiyle Kolistin MİK değerlerinin belirlenmesi için aşağıdaki adımlar izlendi:

- Katyon ayarlı MHB içerisinde Kolistin Sülfat tuzu aktif maddesi ISO standardı 20776-1'e göre konsantrasyonu 128-0,125 mg/l olacak sulandırıldı.
- Antibiyotikli besiyeri U tabanlı polistiren 96 kuyucuklu mikropalakaya, her bir kuyucukta 50 µl olacak şekilde dağıtıldı.
- 24 saat önceden TSB'de inkübe edilmiş bakterilerden 0,5 McFarland ( $1 \times 10^8$  cfu/ml) derişiminde süspansiyon hazırlandı.
- İçerisinde 9,9 ml TSB bulunan tüpe, hazırlanan bakteri solüsyonundan 100 µl eklenerek bakteri yoğunluğu  $1 \times 10^6$  cfu/ml olacak şekilde ayarlandı.
- İçerisine önceden 50 µl antibiyotikli besiyeri eklenmiş kuyucuklara, her bir kuyucuğa 50 µl olmak üzere konsantrasyonu  $1 \times 10^6$  cfu/ml olan bakteri süspansiyonu eklenerek her kuyucukta son bakteri konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  cfu/ml olarak elde edildi.
- Mikropalakanın sondan bir önceki kuyucuk sırasına canlılık kontrolü için MHB ve inokulum konuldu. Son kuyucuk sırasınada da yalnızca besiyeri konularak kontaminasyon kontrolü sağlandı.
- Kapağı kapatılmış mikropalakalar 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve üremenin görülmediği en düşük antibiyotik konsantrasyonu MİK değeri olarak kaydedildi.

EUCAST kriterlerine göre Kolistin için MİK eşik değeri 2 mg/L olarak belirlenmiştir (Anonim, 2016)

### **3.2.3. İzolatların Kolistin (Polimiksin E) Duyarlılığının Genotipik Yöntemle Belirlenmesi.**

#### **3.2.3.1. Plazmit DNA'nın Ekstraksiyonu**

*E.coli* izolatlarına ait plazmit DNA, ticari kit kullanılarak üretici firmanın tavsiyesine göre gerçekleştirildi. Buna göre:

- Ekstraksiyonda kullanılacak bakteriler bir gece önceden MacConkey agara ekildi.

- 24 saatlik kolonilerden 1 öze dolusu alınıp 1,5 ml mikrosantrifüj tüpü içerisine konulmuş 180 µl ATL tamponu içerisinde dağıtıldı.
- 20 µl Proteinaz K eklenerek vortekslendi ve 56 °C'de 2 saat inkübe edildi. Saat başı tüpler vortekslendi.
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri inkubasyon sonrası kapakta oluşabilecek damlacıkları toplamak için kısa süre santrifüj edildi.
- İçerisine 200 µl AL tamponu eklenerek 15 saniye vortekslendi. 10 dk süre ile 70 °C su banyosunda inkübe edildi.
- 1,5 ml mikrosantrifüj tüpleri inkubasyon sonrası kapakta oluşabilecek damlacıkları toplamak için kısa süre santrifüj edildi.
- İnkübasyon sonrası elde edilen lizat üzerine 200 µl etanol eklendi ve 15 saniye vortekslendi. Vorteks sonrası kapak üzerinde oluşan damlacıkları toplamak için kısa süre santrifüj edildi.
- Tüp içeriği kit ile verilen 2ml toplama tüpünün içine yerleştirilniş kolona aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon, kit ile verilen temiz bir 2 ml toplama tüpüne alınarak üzerine 500 µl AW 1 tamponu eklendi ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edildi.
- Kolon, kit ile verilen temiz bir 2 ml toplama tüpüne alınarak üzerine 500 µl AW 2 tamponu eklendi ve 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi.
- Kolon, kit ile verilmeyen temiz bir 2 ml eppendorfa alınarak 14000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edildi.
- Kolon, kit ile verilmeyen 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 200 µl AE tamponu eklendi ve 1 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edildi.
- Kolon, kit ile verilmeyen 1,5 ml mikrosantrifüj tüpüne alınarak üzerine 200 µl AE tamponu eklendi ve 5 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edildi.
- Kolon atıldı, ekstrakte edilen DNA içeriği -20 °C'de muhafaza edildi.

### 3.2.3.2. Amplifikasyon

İzole edilen plazmitler üzerindeki 309 bp uzunluğundaki *mcr-1* geni varlığını araştırmak için, Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile ilgili gen çoğaltıldı. Bu işlem için QIAGEN® Multiplex PCR ticari kiti kullanıldı (Katolog no : 206143).

Primerler, üretici firmanın tavsiyesine göre TE tamponu kullanılarak 100 µM stok konsantrasyonda olacak şekilde hazırlandı ve -20 °C’de muhafaza edildi. Daha sonra 2 µl stok alınarak üzerine 98 µl TE tamponu eklenmiş ve 2 µM konsantrasyonda çalışma stoğu elde edildi. Her bir PCR reaksiyonunda son konsantrasyon 0,2 µM olacak şekilde ayarlandı.

**Tablo 3-2: Örnek PCR çalışması**

İçerik	1x	10x
Mastermix	12,5 µl	125 µl
Q solution	2,5 µl	25 µl
CLR F Primer	2,5 µl	25 µl
CLR R Primer	2,5 µl	25 µl

309 bp uzunluğundaki *mcr-1* genini çoğaltmak için, Avrupa Birliği Referans Laboratuvarı olan *Statens Serum Institute* (Kopenhag, Danimarka) tarafından optimize edilen PCR protokolü kullanıldı (Cavaco ve Hendriksen, 2015).

Bu amaçla, 94 °C’de 15 dk ön denatürasyon yapıldı. Bunu takiben 35 siklus olacak şekilde, 30 saniye 94 °C’de denatürasyon , 58°C’de 90 saniye primer bağlanması ve 72 °C’de 60 saniye sentez aşaması gerçekleştirildi. Son aşamada sentezin tamamlanması için örnekler 72 °C’de 10 dakika bekletildi ve işlem tamamlandıktan sonra +4 °C’de muhafaza edildi.

### 3.2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

Amplifikasyon sonucu elde edilen DNA ürünlerini görüntülemek için agaroz jel elektroforezinden yararlanıldı. Agaroz jel, 1g agaroz ve 100 ml TAE tamponu kullanılarak %1'lik olacak şekilde kaynatılarak hazırlandı. Jel karışımı soğumaya bırakıldıktan sonra içerisine DNA boyası olarak 10 µl etidyum bromür eklendi.

Jel üzerindeki ilk kuyucuğa DNA marker, ikinci kuyucuktan itibaren ise pozitif ve negatif kontrolleri takiben çalışma örneklerine ait PCR ürünleri yüklendi. Yükleme aşamasında 1 µl 6X yükleme boyası ve 5 µl PCR ürünü karıştırılarak çalışıldı. Jel yürütme sistemi 100 Volt'a ayarlanarak amplikonların jel üzerinde 45 dakika boyunca ilerlemesi sağlandı. Bunu takiben, UV transluminatör sistemi kullanılarak jel üzerindeki amplikonlar görüntüldü. 309 bp uzunluğundaki bantlar pozitif olarak değerlendirildi.

## 4. BULGULAR

### 4.1. İzolasyon ve İdentifikasyon Bulguları

Yedi farklı kesimhaneden toplanan broyler piliçlere ait bağırsak örnekleri kullanılarak çalışma için belirlenen sayı olan 200 adet *E.coli* izolatu elde edilene kadar örnelemeye devam edildi. İzolasyon ve identifikasyon için MacConkey besiyerinde inkübasyon sonrası oluşan bakteri kültürü görüntüsü Şekil 4-1’de verildi.



**Şekil 4-1: *E.coli* izolatlarının MacConkey agardaki görüntüsü**

İzole edilen bakteriler daha önce belirtildiği gibi Quinn ve ark. (1994)’na göre belirtilen konvansiyonel yöntemlerle *E.coli* olarak identifiye edildi. Bu şekilde 200 adet izolat *E.coli* olarak tanımlandı ve daha sonra fenotipik ve genotipik testler için -20 °C’ de saklandı. Tesislerin bulunduğu il ve ilçelere göre elde edilen izolat sayısı Tablo 4-1’de verilmiştir.



**Tablo 4-1: Tesislere göre elde edilen toplam izolat sayısı**

Tesis Numarası	İlçe	İl	Toplam izolat sayısı
1	Adapazarı	Sakarya	68
2	Merkez	İzmir	56
3	Çatalca	İstanbul	10
4	Çerkezköy	Tekirdağ	5
5	Merkez	Balıkesir	21
6	Merkez	Balıkesir	20
7	Merkez	Balıkesir	20

#### 4.2. Fenotipik Kolistin (Polimiksin E) Direnci Bulguları

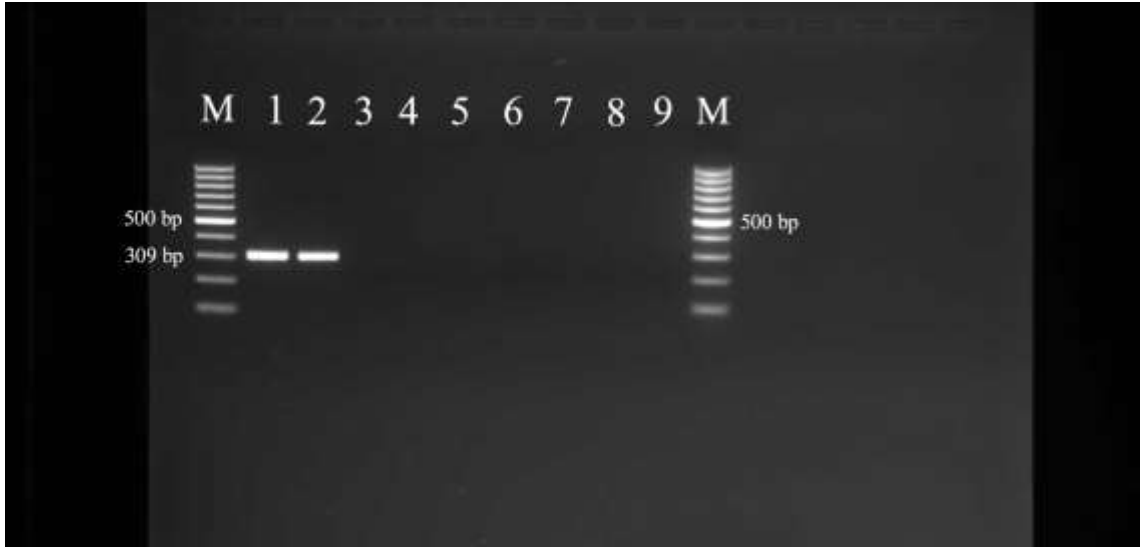
Çalışmada yedi farklı tesisten elde edilen 200 *E.coli* izolatında kolistine karşı direnç fenotipik olarak araştırıldı ve yapılan Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) çalışmasında 15 izolatta fenotipik kolistin direnci gözlemlendi. Çalışmanın doğruluğunun teyit edilmesi amacıyla aynı işlem iki kez yapıldı ve buna göre 200 izolattan 15 tanesinde (%7,5 oranında) fenotipik direnç olduğu saptandı.

**Tablo 4-2: Tesislere göre elde edilen toplam ve dirençli izolat sayısı**

Tesis Numarası	İlçe	İl	Toplam izolat sayısı	Dirençli izolat sayısı
1	Adapazarı	Sakarya	68	3
2	Merkez	İzmir	56	9
3	Çatalca	İstanbul	10	1
4	Çerkezköy	Tekirdağ	5	0
5	Merkez	Balıkesir	21	1
6	Merkez	Balıkesir	20	1
7	Merkez	Balıkesir	20	0

### 4.3. Genotipik Kolistin (Polimiksin E) Direnci Bulguları

Genotipik direncin belirlenmesi için her izolattan, daha önce belirtilen yöntemlerle plazmit ekstraksiyonu yapıldı. Çalışmada yedi farklı tesisten elde edilen 200 *E.coli* izolatından ekstrakte edilen plazmit DNA'larda kolistin direncinden sorumlu *mcr-1* geni varlığı PCR yöntemiyle araştırıldı. PCR amplifikasyonu sonucunda örneklerin hiçbirinde *mcr-1* geni tespit edilemedi. *Mcr-1* geni için PCR bulguları Şekil 4.2'de verilmiştir.



**Şekil 4-2: *Mcr-1* geni için PCR sonuçları**

M: Marker 1 ve 2: pozitif kontrol 3: negatif kontrol 4-9: çalışılan izolatlar

## 5. TARTIŞMA

Çoklu direnç gösteren bakterilerde son çare olarak başvuru olan kolistin, polimiksin sınıfı antibiyotiklerden biridir. Süregelen zamanda insan sağlığı üzerinde olumsuz etkilere sahip olması sebebiyle birçok ülkede kullanımına ilişkin sınırlamalar getirilmiştir. Ancak günümüzde domuz ve tavuk yetiştiriciliğinde kolistin antibiyotiği yaygın olarak kullanılmakta ve pazarlanmaktadır. Diğer yandan çağımızın en önemli problemlerinden biri olan antibiyotik dirençli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonlar için kurtarıcı olarak da nitelendirilmektedir (Caniaux ve ark., 2016).

Çeşitli antibiyotiklere karşı dirençlilik, bakteriler arasında hızla yayılmaktadır ve endişe verici şekilde kolistin de bu antibiyotikler arasında son yıllarda yer almaya başlamıştır. Henüz Türkiye’de çok fazla kolistin direnciyle karşılaşılma olmasa da gelecek için bir tehlike olabileceği düşünülmektedir. Bakteriler kendilerine özgü sistemler ile geliştirdikleri direnç mekanizmaları sayesinde kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanmakta ve bunları yaymaktadır. Dolayısıyla kolistin direncinin belirlenmesi ve bu hususta ulusal ve uluslararası bir gen havuzu oluşturulması ve ilgili genin prevalansının belirlenmesini amaçlayan çalışmalar oldukça önem arz etmektedir. (Etebu ve Ukpong, 2016).

Skov ve ark (2016) *mcr-1* geninin birçok ülkeye yayıldığını ifade etmiş ve çeşitli çevresel kaynaklardan izole edilen bakteriyel izolatlarda *mcr-1* geni varlığını tespit etmişlerdir. Bununla birlikte söz konusu genin *E. coli*’lerde plazmitler aracılığıyla transfer edildiği ve türler arası çeşitli antibiyotiklere ait direncin yayılmasında mikrobiyotanın oldukça önemli olduğu bilinmektedir (Martinez ve Baquero, 2000; Tenover, 2006; Skov ve ark., 2016). Bakteriler arası gen aktarımının yanı sıra son yıllarda rastlanan çoklu direnç profili sergileyen bazı zorlu bakteri enfeksiyonlarının sıklığının artmasıyla tıp alanında da yeniden kullanımı direnç gelişimi için bir başka unsur olarak kabul edilmektedir (Caniaux, 2016).

Bu tez çalışmasında kesime sevk edilen broyler piliç dışkılarından izole edilen *E.coli*’lerde kolistin direncinin belirlenmesi ve plazmit aracılı kolistin direnci sağlayan *mcr-1* geninin varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

Kolistin direncinin fenotipik tespitinde MİK değerlerinin belirlenmesi için Broth mikrodilüsyon, Agar dilüsyon, Disk difüzyon, Gradient difüzyon ve Etest gibi yöntemlere başvurulmaktadır. EUCAST 2016 tarihinde yayınladığı bildiri ile, Enterobacteriaceae

için referans olarak Broth Mikrodilüsyon metodu ile MİK değeri saptanmasını önermektedir. Agar dilüsyon, disk difüzyon ve gradient difüzyon gibi diğer testler, geçerliliği ve güvenilirliği üzerine yeterince çalışma yapılmadığından EUCAST tarafından tavsiye edilmemektedir (Anonim, 2016).

Jayol ve arkadaşları (2017), Enterocabteriaceae’da kolistin direnci saptanması için kullanılabilir yeni geliştirilen Rapid Polymyxin NP test, BD Phoenix Otomasyon sistemi ve referans yöntem olan broth mikrodilüsyon metodunu karşılaştırdıkları çalışmalarında, BD Phoenix otomasyon sisteminin yüksek oranda yanlış duyarlılık sonucu verdiğini ve sonuçların Broth mikrodilüsyon metodu ile kontrol edilmesi gerektiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, Rapid Polymyxin NP test, büyük oranda Broth mikrodilüsyon yöntemiyle tutarlılık gösterse de, MİK değerlerinin belirlenmesi gerektiğinde Broth mikrodilüsyon yöntemine başvurulmasını tavsiye etmişlerdir.

Bu tez çalışmasında da, EUCAST tarafından tavsiye edilen ISO-standart Broth Mikrodilüsyon Yöntemi (20776-1) kullanılmıştır

Kolistin direncinin genotipik olarak belirlenmesinde çoğunlukla PCR ve tüm genom sekanslama yöntemleri kullanılmaktadır. Spektroflorometri, MALDI-TOF MS, mikroarray ve multipleks real-time PCR yöntemleri ise gelecekte kullanımı öngörülen tespit yöntemleridir (Sekyere ve ark., 2016). Bununla birlikte, Irrgang ve arkadaşları (2016), yeni geliştirdikleri TaqMan altyapılı real-time PCR ile *mcr-1* geninin etkili ve hızlı bir şekilde tespit edilebileceğini öne sürmüşlerdir (Irrgang ve ark., 2016).

Liu ve ark (2016), *E.coli* ve *Klebsiella*’da ilk kez *mcr-1* geni varlığıyla plazmit aracılı kolistin direnci gerçekleştirdiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada domuzlardan elde ettikleri *E.coli* izolatlarının %20,6’sında, perakende satılan domuz eti ve tavuk ürünlerinin %14,9’unda ve Çin’deki hastalardan elde ettikleri izolatların %1,4’ünde *mcr-1* genini tespit etmişlerdir (Liu ve ark., 2016). Daha sonra farklı ülkelerde yapılan çalışmalar *mcr-1* geninin tüm dünyaya yayılım gösterdiğini ortaya koymaktadır (Stoesser ve ark., 2016; Suzuki ve ark., 2016; Kuo ve ark., 2016; Xavier ve ark., 2016; Hasman ve ark., 2015; Haenni ve ark., 2016; Falgenhauer ve ark., 2016; Anjum ve ark., 2016; Zurfuh vd., 2016; Grami ve ark., 2016; McGann ve ark., 2016).

Kusumoto ve ark (2016), uzun zaman aralığında gerçekleştirdiği çalışmalarında domuzlardan izole ettikleri 684 *E.coli* suşunun %45’ini fenotipik dirençli, %13’ünü de genotipik olarak *mcr-1* varlığı açısından pozitif olarak tespit etmişlerdir. 1136 *E.coli*’nin

incelendiği bir çalışmada, %5.11 oranında *mcr-1* genine rastlanılmıştır (Yang et al., 2017). Ovejero ve Muniesa (2017), lağım sularından toplam 29 adet *mcr-1* geni ihtiva eden *E.coli* izolatu elde ettiklerini rapor etmişlerdir. Irrgang ve ark. (2016), 10,609 *E.coli* izolatını incelemiş ve fenotipik olarak kolistine dirençli 505 (% 4,76) örnekte *mcr-1* geni aramışlar ve *mcr-1* geninin prevalansını broyler kökenli izolatlarda %5,6; toplam tüm örneklerde ise %3,8 olarak belirlemişlerdir.

Türkiye’de ilk defa gerçekleştirilen bu çalışmada 200 izolatın 15’inde (%7,5) fenotipik olarak direnç gözlemlenmiştir. Saptanan oran litertürler ile uyumlu olmakla birlikte önemli bir oran olarak değerlendirilebilir. Avrupa Birliği’de kolistin 5. en sık kullanılan veteriner antibiyotiği olarak bildirilmiştir (Catry ve ark., 2015). Ülkemizde de kolistin yaygın olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda saptanan oranın bu durumun bir sonucu olduğu düşünülebilir.

Buna karşın ilgili gen ihtivasına (*mcr-1*) rastlanılmaması direncin kromozomal olduğunu ya da dirençten sorumlu başka genler olabileceğini düşündürmektedir. Benzer bir şekilde, İran’da yapılan bir çalışmada, araştırmacılar kolistin direncinden sorumlu olan *mcr-1*, *mcr-2* ve kromozomal olarak taşınan *ctrB* genlerini araştırmışlardır. Dokuz yüz klinik izolat söz konusu çalışmaya dâhil edilmiş ve %3.33’ünde fenotipik kolistin direnci görülmüştür. Buna rağmen, çalışılan hiçbir örnekte plazmit aracılı direnç sağlayan *mcr-1* ve *mcr-2* genlerine rastlanmamıştır. Araştırmacılar, kuzeybatı İran’da görülen kolistin direncinden kromozomal *phoP* ve *phoQ* genlerinin sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Aghapour ve ark., 2019).

Yakın zamanda yapılan çalışmalar fosfoetanolin transferaz enzimini kodlayan *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4*, *mcr-5*, *mcr-6*, *mcr-7*, *mcr-7.1* ve *mcr-8* genlerinin de plazmit aracılı kolistin direncinden sorumlu olduğunu göstermiştir (Borowiak ve ark.,2017; Carattoli ve ark., 2018; Di Pilato ve ark., 2016; Garcia-Graello ve ark., 2018; Principe ve ark., 2018; Wang ve ark.,2018; Yin ve ark., 2017; Yang ve ark., 2018).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında 200 izolatın 15’inde (%7,5) fenotipik olarak direnç gözlemlenmiş ancak hiçbirinde *mcr-1* geni tespit edilmemiştir. Plazmit aracılı aktarım dan sıklıkla sorumlu olan *mcr-1* geninin saptanmaması ülkemiz için ümit vaat edici olarak düşünülmektedir. Bununla birlikte çalışmamız ilk pilot çalışma olarak düşünüldüğünde, kolistin direncinden sorumlu olan yeni bildirilen genlerin araştırılacağı çok sayıda örneklememin yapılacağı çalışmaların yapılması önemlidir. Kolistin, son çare olarak

gerek tıp alanında gerekse veteriner hekimlikte oldukça önem arz eden bir antibiyotiktir. Dolayısıyla küresel problem olan antibiyotik direnci konusunda kolistinin kullanımının sınırlanması ve nerede yer aldığı belirlenmesine yönelik veteriner hekimlik alanında yapılacak çalışmaların oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.



## KAYNAKLAR

- Anjum, M. F., Duggett, N. A., AbuOun, M., Randall, L., Nunez-Garcia, J., Ellis, R. J., ... Teale, C. (2016). Colistin resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates from a pig farm in Great Britain. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, *dkw149*–. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw149>
- Anonim, EUCAST Reccomendations for MIC determination of colistin (Polymyxin E) As reccomended by joint CLSI-EUCAST Polymyxin Breakpoints Working Group. [www.eucast.org](http://www.eucast.org). (Erişim: 22 Mart 2016)
- Aghapour, Z., Hasani, A., Aghazadeh, M., & Ahangarzadeh, M. (2019). Genes involved in colistin resistance of gram-negative isolates in the northwest of Iran. *Gene Reports*, *14* (December 2018), 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2018.12.001>
- Baquero, F., & Martínez, J. L. (2000). MINIREVIEW Mutation Frequencies and Antibiotic Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *44*(7), 1771–1777. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.7.1771-1777.2000>. Updated
- Barbieri, N. L., Nielsen, D. W., Wannemuehler, Y., Cavender, T., Hussein, A., Yan, S. G., ... Logue, C. M. (2017). Mcr-1 identified in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *PLoS ONE*, *12*(3), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172997>
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J.-M., & Olaitan, A. O. (2016). Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *International Journal of Antimicrobial Agents*. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023>
- B. B. Xavier, C. Lammens, P. Butaye, H. G. and S. M.-K. (2016). Complete sequence of an IncFII plasmid harbouring the colistin resistance gene *mcr-1* isolated from Belgian pig farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 10–12. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw191>
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J. A., Hendriksen, R. S., Szabo, I., & Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *72*(12), 3317–3324. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx327>

- Cannatelli, A., Giani, T., Antonelli, A., Principe, L., Luzzaro, F., & Rossolini, G. M. (2016). First detection of the *mcr-1* colistin resistance gene in *Escherichia coli*, Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), AAC.00246–16. <http://doi.org/10.1128/AAC.00246-16>
- Caniaux, I., Belkum, A. Van, Zambardi, G., Poirel, L., & Gros, M. F. (2016). MCR : modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1007/s10096-016-2846-y>
- Carattoli, A. et al. (2017) Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Euro. Surveill.* 22, pii: 30589.
- . Catry B, Cavaleri M, Baptiste K, Grave K, Grein K, Holm A, Jukes H, Liebana E, Navas AL, Mackay D, Magiorakos AP, Romo MA, Moulin G, Madero CM, Pomba MC, Powell M, Pyorala S, Rantala M, Ruzauskas M, Sanders P, Teale C, Threlfall EJ, Torneke K, van Duijkeren E, Edo JT. (2015). Use of colistin-containing products within the European Union and European Economic Area (EU/EEA): development of resistance in animals and possible impact on human and animal health. *Int J Antimicrob Agents* 46:297–306. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2015.06.005>
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26–38. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
- Delgado-Blas, J. F., Ovejero, C. M., Abadia Patiño, L., & Gonzalez-Zorn, B. (2016). Coexistence of *mcr-1* and *bla*<sub>NDM-1</sub> in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (July), AAC.01319-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01319-16>
- Di Pilato, V., Arena, F., Tascini, C., Cannatelli, A., Henrici De Angelis, L., Fortunato, S., ... Rossolini, G. M. (2016). MCR-1.2: a new MCR variant encoded by a transferable plasmid from a colistin-resistant KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 512. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (July), AAC.01075-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01075-16>



- Doumith, M., Godbole, G., Ashton, P., Larkin, L., Dallman, T., Day, M., ... Woodford, N. (2016). Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene conferring colistin resistance in human and food isolates of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* in England and Wales. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, dkw093–. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw093>
- Elnahriry, S. S., Khalifa, H. O., Soliman, A. M., Ahmed, A. M., Moustafa, A. H., Shimamoto, T., & Shimamoto, T. (2016). Emergence of Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene, *mcr-1*, in a Clinical *Escherichia coli* Isolate from Egypt. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(5), AAC.00269–16. <http://doi.org/10.1128/AAC.00269-16>
- Etebu, E., & Ukpong, M. (2016). Bacterial resistance to antibiotics : Update on molecular perspectives, 4(October), 40–49.
- Falagas, M. E., & Kasiakou, S. K. (2005). Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 24(10), 945. <https://doi.org/10.1097/01.inf.0000174577.97635.7b>
- Falgenhauer, L., Waezsada, S. E., Yao, Y., Imirzalioglu, C., Käsbohrer, A., Roesler, U., ... Chakraborty, T. (2016). Colistin resistance gene *mcr-1* in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Germany. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 282–283. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00009-8](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00009-8)
- MR Fernandes, Q Moura, L Sartori, KC Silva, MP Cunha, F Esposito, R Lopes, LK Otutumi, DD Gonçalves, M Dropa, MH Matté, DF Monte, M Landgraf, GR Francisco, MF Bueno, D de Oliveira Garcia, T Knöbl, AM Moreno, N. L. (2016). Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Eurosurveillance*, 21(17), 1–6. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214>
- Figueiredo, R., Card, R. M., Nunez, J., Pomba, C., Mendonça, N., Anjum, M. F., & Da Silva, G. J. (2016). Detection of an *mcr-1*-encoding plasmid mediating colistin resistance in *Salmonella enterica* from retail meat in Portugal. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2338–2340. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw240>

- Garcia-Graells, C. et al. (2018) Detection of plasmid-mediated colistin resistance, *mcr-1* and *mcr-2* genes, in *Salmonella* spp. isolated from food at retail in Belgium from 2012 to 2015. *Foodborne Pathog. Dis.* 15,114–117.
- Grami, R., Mansour, W., Mehri, W., Bouallègue, O., Boujaâfar, N., Madec, J., & Haenni, M. (2016). Impact of food animal trade on the spread of *mcr-1*-mediated colistin resistance, tunisia, july 2015. *Eurosurveillance*, 21(8), 1–5. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.8.30144>
- Giufrè, M., Monaco, M., Accogli, M., Pantosti, A., Cerquetti, M., PAMURSA Study Group, on behalf of the P. S., ... Sarti, M. (2016). Emergence of the colistin resistance *mcr-1* determinant in commensal *Escherichia coli* from residents of long-term-care facilities in Italy. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, dkw195. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw195>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., ... Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(1), 3–30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Haenni, M., Poirel, L., Kieffer, N., Châtre, P., Saras, E., Métayer, V., ... Madec, J. Y. (2016). Co-occurrence of extended spectrum  $\beta$  lactamase and MCR-1 encoding genes on plasmids. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 281–282. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00007-4](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00007-4)
- Hasman, H., Hammerum, A. M., Hansen, F., Hendriksen, R. S., Olesen, B., Agersø, Y., ... Skov, R. L. (2015). Detection of *mcr-1* encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, denmark 2015. *Eurosurveillance*, 20(49), 1–5. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2015.20.49.30085>
- Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B.-A., Grobbel, M., Skladnikiewicz-Ziemer, T., Thomas, K., ... Käsbohrer, A. (2016). Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from Livestock and Food in Germany, 2010–2015. *Plos One*, 11(7), e0159863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159863>

- International Organization for Standardization (ISO). Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems. Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices. ISO 20776-1.2006; 1-19.
- Jayol, A., Nordmann, P., Lehours, P., Poirel, L., Dubois, V.(2017). Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally encoded colistin resistance in Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology and Infection*. Volume 24, Issue 2, February 2018, Pages 175-179.
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. T. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 2, 123–140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Karaikos, I., Souli, M., Galani, I., & Giamarellou, H. (2016). Colistin: Still a lifesaver for the 21st century? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 5255(August 2016). <https://doi.org/10.1080/17425255.2017.1230200>
- Kluytmans-van den Bergh, M., Huizinga, P., Bonten, M. J., Bos, M., De Bruyne, K., Friedrich, A. W., ... Kluytmans, J. A. (2016). Presence of mcr-1-positive Enterobacteriaceae in retail chicken meat but not in humans in the Netherlands since 2009. *Eurosurveillance*, 21(9), 1–7. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30149>
- Kuo, S.-C., Huang, W.-C., Wang, H.-Y., Shiau, Y.-R., Cheng, M.-F., & Lauderdale, T.-L. (2016). Colistin resistance gene mcr -1 in Escherichia coli isolates from humans and retail meats, Taiwan. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (April), dkw122. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw122>
- Kusumoto, M., Ogura, Y., Gotoh, Y., Iwata, T., Hayashi, T., & Akiba, M. (2016). Colistin-Resistant mcr-1 – Positive Pathogenic Escherichia coli in Swine ., *Emerg Infect Dis*, 22(7), 2014–2016.
- Levin, A. S., Barone, A. A., Penço, J., Santos, M. V., Marinho, I. S., Arruda, E. A. G., ... Costa, S. F. (1999). Intravenous Colistin as Therapy for Nosocomial Infections Caused by Multidrug-Resistant Pseudomonas aeruginosa and Acinetobacter baumannii. *Clinical Infectious Diseases*, 28(5), 1008–1011. <https://doi.org/10.1086/514732>

- Liakopoulos, A., Mevius, D. J., Olsen, B., & Bonnedahl, J. (2016). The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2335–2336. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw262>
- Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., ... Shen, J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(2), 161–168. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00424-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00424-7)
- Lu, X., Hu, Y., Luo, M., Zhou, H., Wang, X., Du, Y., ... Kan, B. (2017). MCR-1.3: a new MCR variant carried by an IncP plasmid in a colistin-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from a healthy individual. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (March), AAC.02632-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02632-16>
- Malhotra-Kumar, S., Xavier, B. B., Das, A. J., Lammens, C., Butaye, P., & Goossens, H. (2016). Colistin resistance gene *mcr-1* harboured on a multidrug resistant plasmid. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 283–284. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00012-8](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00012-8)
- Malhotra-Kumar, S., Xavier, B. B., Das, A. J., Lammens, C., Hoang, H. T. T., Pham, N. T., & Goossens, H. (2016). Colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* isolated from food animals in Hanoi, Vietnam. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 286–287. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00014-1](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00014-1)
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G., Donnenberg, M. S., & Kaper, J. B. (1995). A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(5), 1664–1668. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.5.1664>
- McGann, P., Snesrud, E., Maybank, R., Corey, B., Ong, A. C., Clifford, R., ... Schaecher, K. E. (2016). *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*CTX-M on a Novel IncF Plasmid: First report of *mcr-1* in the USA. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 60(7), AAC.01103-16-. <https://doi.org/10.1128/AAC.01103-16>

- Monte, D. F., Mem, A., Fernandes, M. R., Cerdeira, L., Esposito, F., Galvão, J. A., ... Landgraf, M. (2017). Chicken Meat as a Reservoir of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Strains Carrying *mcr-1* Genes in South America. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *61*(5), e02718-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.02718-16>
- Moulin-Schouleur, M., Réperant, M., Laurent, S., Brée, A., Mignon-Grasteau, S., Germon, P., ... Schouler, C. (2007). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: Link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *Journal of Clinical Microbiology*, *45*(10), 3366–3376. <https://doi.org/10.1128/JCM.00037-07>
- Olaitan AO, Chabou S, Okdah L, Morand S, Rolain J-M. (2016). Dissemination of the *mcr-1* colistin resistance gene. *Lancet Infect Dis* 16:147.
- Omerovic, M., Müştak, H. K., & Kaya, I. B. (2017). *Escherichia coli* patotiplerinin virülens faktörleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, *28*(1), 1–6. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/318653300>
- Osei Sekyere, J., Govinden, U., Bester, L. A., & Essack, S. Y. (2016). Colistin and Tigecycline Resistance In Carbapenemase-Producing Gram Negative Bacteria: Emerging Resistance Mechanisms And Detection Methods. *Journal of Applied Microbiology*, (Carattoli 2009), 1–17. <https://doi.org/10.1111/jam.13169>
- Ovejero, C. M., & Muniesa, M. (2017). Spread of *mcr-1* -carrying Enterobacteriaceae in sewage water from Spain, 1–4. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw533>
- Perrin-Guyomard, A., Bruneau, M., Houée, P., Deleurme, K., Legrandois, P., Poirier, C., ... Sanders, P. (2016). Prevalence of *mcr-1* in commensal *Escherichia coli* from French livestock, 2007 to 2014. *Eurosurveillance*, *21*(6), 2014–2016. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.6.30135>
- Petrillo, M., Angers-Loustau, A., & Kreysa, J. (2016). Possible genetic events producing colistin resistance gene *mcr-1*. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(3), 280. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00005-0](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00005-0)

- Prim, N., Rivera, A., Rodriguez-Navarro, J., Español, M., Turbau, M., Coll, P., & Mirelis, B. (2016). Detection of mcr-1 colistin resistance gene in polyclonal escherichia coli isolates in Barcelona, Spain, 2012 to 2015. *Eurosurveillance*, 21(13), 11–13. <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.13.30183>
- Principe, L. et al. Multicenter prospective study on the prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli*:relevance of mcr-1-positive clinical isolates in Lombardy, Northern Italy. *Infect. Drug. Resist.* 11, 377–385 (2018).
- Quinn, P.J., Carter, M.E., Markey, B.K., Carter, G.R. (1994). *Clinical Veterinary Microbiology*. London: Mosby-Year Book Europe, 221.
- Rapoport, M., Faccione, D., Pasteran, F., Ceriana, P., Albornoz, E., Petroni, A., & Corso, A. (2016). mcr-1-mediated colistin resistance in human infections caused by *Escherichia coli*: First description in Latin America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 563(April). <http://doi.org/10.1128/AAC.00573-16>
- Robin, F., Beyrouthy, R., Colot, J., Saint-sardos, P., Berger-carbonne, A., Dalmasso, G., ... Bonnet, R. (2016). MCR-1 in ESBL-producing *Escherichia coli* responsible for human infections in New Caledonia, 1–2. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw508>
- Ruzauskas, M., Vaskeviciute, L., 2016. Detection of the mcr-1 gene in *Escherichia coli* prevalent in the migratory bird species *Larus argentatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 71, 2333-2334.
- Sellera, P., Fernandes, M. R., Sartori, L., Carvalho, M. P. N., Esposito, F., Nascimento, C. L., ... Pe, P. J. (2016). *Escherichia coli* carrying IncX4 genes in infected migratory Magellanic penguins ( *Spheniscus magellanicus* ), 10–11. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw543>
- Shames, S. R., Auweter, S. D. & Finlay, B. B. (2009) Co-evolution and exploitation of host cell signaling pathways by bacterial pathogens. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 380–389.
- Schlegel HG, 2003. *General Microbiology*. 7th Ed. Cambridge University Press, Cambridge.

- Schwarz, S., & Johnson, A. P. (2016). Transferable resistance to colistin: a new but old threat: Table 1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, (June), dkw274. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw274>
- Srinivas, P., & Rivard, K. (2017). Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens. *Current Infectious Disease Reports*, 19(11), 7–9. <https://doi.org/10.1007/s11908-017-0596-3>
- Skov, R. L., & Monnet, D. L. (2016). Plasmid-mediated colistin resistance (*mcr-1* gene): Three months later, the story unfolds. *Eurosurveillance*, 21(9). <http://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.9.30155>
- Stoesser, N., Mathers, A. J., Moore, C. E., Day, N. P. J., & Crook, D. W. (2016). Colistin resistance gene *mcr-1* and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 285–286. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00010-4](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00010-4)
- Sun, P., Bi, Z., Nilsson, M., Zheng, B., Berglund, B., Lundborg, C. S., ... Nilsson, L. E. (2017). Occurrence of *blaKPC-2*, *blaCTX-M*, and *mcr-1* in Enterobacteriaceae from Well Water in Rural China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(4). <https://doi.org/10.1128/AAC.02569-16>
- Suzuki, S., Ohnishi, M., Kawanishi, M., Akiba, M., & Kuroda, M. (2016). Investigation of a plasmid genome database for colistin-resistance gene *mcr-1*. *The Lancet Infectious Diseases*, 16(3), 284–285. [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00008-6](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00008-6)
- Tenover, F. C. (2006). Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*, 34(5 SUPPL.). <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2006.05.219>
- Thanh, D. P., Tuyen, H. T., Nguyen Thi Nguyen, T., The, H. C., Wick, R. R., Thwaites, G., ... Holt, K. E. (2016). Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate. *bioRxiv*, 45, 039925. <http://doi.org/10.1101/039925>

- The Review on Antimicrobial Resistance. Final Report.<http://amr-review.org/Publications> (Erişim: Haziran,12,2016)
- Trung, N. V., Matamoros, S., Carrique-Mas, J. J., Campbell, J., Wagenaar, J. A., Hardon, A., ... Hoa, N. T. (2017). Zoonotic Transmission of mcr-1 Colistin Resistance Gene from Small-Scale Poultry Farms, Vietnam. *Emerging Infectious Diseases*, 23(3), 529–532.
- Veldman, K., van Essen-Zandbergen, A., Rapallini, M., Wit, B., Heymans, R., van Pelt, W., & Mevius, D. (2016). Location of colistin resistance gene mcr-1 in Enterobacteriaceae from livestock and meat: Table 1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, dkw181. <http://doi.org/10.1093/jac/dkw181>
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S., ... Wang, Y. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* article. *Emerging Microbes and Infections*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0124-z>
- Wang, Y., Tian, G.-B., Zhang, R., Shen, Y., Tyrrell, J. M., Huang, X., ... Shen, J. (2017). Prevalence, risk factors, outcomes, and molecular epidemiology of mcr-1-positive Enterobacteriaceae in patients and healthy adults from China: an epidemiological and clinical study. *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(16), 1–10. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30527-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30527-8)
- Watkins, R. R. (2016). Overview:Global and Local Impact of Antibiotic Resistance Antibiotic resistance Infections Agriculture Public health. *Infectious Disease Clinics of North America*, 30(2), 313–322.
- Watkins, R. R., Smith, T. C., & Bonomo, R. A. (2016). On the path to untreatable infections: colistin use in agriculture and the end of “last resort” antibiotics. <Http://Dx.Doi.Org/10.1080/14787210.2016.1216314,7210>(July). <https://doi.org/10.1080/14787210.2016.1216314>
- Xavier, B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance*, 21(27),611.<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2807/15607917.ES.2016.21.27.3028>



- Yang, Y.-Q., Li, Y.-X., Song, T., Yang, Y.-X., Jiang, W., Zhang, A.-Y., ... Wang, H.-N. (2017). Colistin resistance gene *mcr-1* and its variant in *Escherichia coli* isolates from chickens in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, (February), AAC.01204-16. <https://doi.org/10.1128/AAC.01204-16>
- Yang, Y. et al.(2018) Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-7.1* in *Klebsiella pneumoniae*. *J. Antimicrob. Chemother.* <https://doi.org/10.1093/jac/dky111>.
- Yin, W., LI, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z., ... Wang, Y. (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *American Society For Microbiology*, 8(3).
- Zeng, K.-J., Doi, Y., Patil, S., Huang, X., & Tian, G.-B. (2016). Emergence of plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(6), 15–18. <http://doi.org/10.1128/AAC.00345-16>
- Zurfuh, K., Poirel, L., Nordmann, P., Nüesch-Inderbilen, M., Hächler, H., & Stephan, R. (2016). Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(4), 2594–2595. <http://doi.org/10.1128/AAC.00066-16>

**HAM VERİLER**

**FORMLAR**



## ETİK KURUL KARARI



T.C  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU



Sayı: 2016/46

11 / 10 / 2016

Sayın Prof Dr. Serkan İKİZ  
İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi  
Mikrobiyoloji ABD

Sorumluluğunu üstlendiğiniz **Yüksek Lisans Öğrencisi Nilüfer ERZAIM'e** ait "**Tavuk Dışkılarından İzole Edilen *Escherichia Coli'* Lerde Plazmid Aracılı Kolistin Direnci Sağlayan *Mcr-1* Geninin Araştırılması**" başlıklı projeniz; incelenmiş olup, Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15.02.2014 tarih ve 28914 sayılı Resmi Gazete'de yayınlanarak yürürlüğe giren "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliği"nin 8.Maddesi (k-2 ve 4) bendi hükümlerince, araştırmanızda kullanılacak materyal dikkate alındığında, çalışmanızın Etik Kurul Onayı almayı gerektirmediğine karar verilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. Alev AKDOĞAN KAYMAZ  
İÜ HADYEK Başkanı

## PATENT HAKKI İZİNİ



## İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

### TAVUK DIŞKILARINDAN İZOLE EDİLEN ESCHERICHIA COLİ'LERDE PLAZMİT ARACILI KOLİSTİN DİRENCİ SAĞLAYAN MCR-1 GENİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLIK RAPORU

**%3**

BENZERLİK ENDEKSİ

**%2**

İNTERNET  
KAYNAKLARI

**%2**

YAYINLAR

**%2**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

**1**

Submitted to Istanbul University  
Öğrenci Ödevi

**%1**

**2**

AĞAY, Zaven and KİMİRAN, Ayten. "Farklı Kaynaklardan İzole Edilen Salmonella Suşlarının Bazı Virülans Faktörlerinin Belirlenmesi", Süleyman Demirel Üniversitesi, 2017.  
Yayın

**<%1**

**3**

www.rivm.nl  
İnternet Kaynağı

**<%1**

**4**

assiajati.com  
İnternet Kaynağı

**<%1**

**5**

Pavithra Srinivas, Kaitlyn Rivard. "Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens", Current Infectious Disease Reports, 2017  
Yayın

**<%1**

**6**

Submitted to Selçuk Üniversitesi

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Nilüfer	<b>Soyadı</b>	Erzaim
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	05.10.1989
<b>Uyruğu</b>	T.C	<b>TC Kim No</b>	53689098592
<b>Email</b>	nilufer.erzaim@gmail.com	<b>Tel</b>	0535 273 07 87

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurumun Adı</b>	<b>Mez. Yılı</b>
<b>Lisans</b>	Marmara Üniversitesi	2013
<b>Lise</b>	Vefa Lisesi	2007

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
<b>1.</b>	Biyoloji Öğretmeni	Istanbul International Community School	2016-
<b>2.</b>	Sorumlu Laboratuvar Asistanı	Marmara Üni. Tıp Fak. Tıbbi Genetik ABD Deneysel Uygulama Laboratuvarı	2012-2013
<b>3.</b>	Laboratuvar Asistanı	Marmara Üni. Mühendislik Fak. Moleküler Genetik ve Hücre Kültürü Laboratuvarı	2010-2012
<b>4.</b>	Laboratuvar Asistanı	Marmara Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Zooloji Araştırma Laboratuvarı	2009-2010

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	KPDS/ÜD S Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok iyi	Çok iyi	Çok iyi	86	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
LES Puanı	73,12666	73,71796	68,15999
(Diğer) Puanı			

#### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi
SPSS	Orta

#### Yayınları/Tebliğleri Sertifikaları/Ödülleri

##### Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. Arman A, Erzaim N, Isik N, Saridal M, Hoscan AY, List EO (2018) *Association between NFKB1 (-94 ins/del ATTG) gene polymorphism and Multiple Sclerosis in the Turkish Population (Advance Research Journal of Multi-Disciplinary Discoveries)*
2. Arman A, Dundar B, Cetinkaya E, Erzaim N, Buyukgebiz A (2014): *Identification of novel mutations in human Growth Hormone-Releasing Hormone Receptor gene in children with isolated Growth Hormone Deficiency in Turkish Population (Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology)*



**3. Isik N, Arman A, Canturk IA, Gurkan AC, Candan F, Aktan S, Erzaim N, Duz OA, Aydin T, Turkes M, List EO. (2013): Multiple sclerosis: association with the interleukin-1 gene family polymorphisms in the Turkish population. (The International Journal of Neuroscience. 2013/ 7)**

#### **Ulusal Yayınlar**

**1. Yalçın B, Akdemir D, Aydemir A, Sönmez B, Üstün F, Ulunehir G, Serter U, Küçük Ö, Kasap H, Baki C, Erzaim N, Bulut FM, Özdemir F. (2012): Marmara Denizi'nin Değişen Oşinografik Şartlarının İzlenmesi Projesi (MAREM) 2010 senesi çalışma verileri. (Ed.: Artüz L. Ed. Yar.: Aydın A, Gülen D, Torcu-Koç H) Marmara Üniversitesi Yayını No: 800, Çevre Sorunları Uygulama ve Araştırma Merkezi Yayını No: 4, ISBN 978-975-400-347-5, İSTANBUL.**

#### **Tebliğler**

2017 **Ikiz,S., Erzaim N., Irez O.S., Dogan, O.K., Fejzic N., Herulaj-Musli, Z. (2017) Academicians' Views About Nature of Science in Veterinary Medicine Faculties (Poster Sunumu), 4th International VETIstanbul Group Congress, 11-13 Mayıs, Almatı, Kazakistan**

2016 **Erzaim N., Ikiz S., Irez O.S, Dogan O.K., Basaran Kahraman B., Yilmaz O., Abay S., Kirkan S., Yesilmen Alp S., Durmusoglu H., Ak S. (2016) Turkish Postgraduate Veterinary Science Students' Views About Nature of Science (Sözlü Sunum), 3<sup>rd</sup> International VETIstanbul Group Congress, 17-20 Mayıs, Saraybosna, Bosna Hersek**

- 2012 **Kiraz A, Arman A, Erzaim N, Isik N. (2012) *Tumor Nekroz Faktor Alfa (TNF Alfa) Gen Polimorfizminin (-376) Turk Populasyonunda Multipl Skleroz ile Iliskisi* (Poster bildirisi), 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 19-23 Aralık, Bursa**
- 2012 **Erzaim N, Arman A, Işık N. (2012) Türk Populasyonunda Multipl Skleroz Alt Tiplerinin NFκB1 (-94 ins/del ATTG) Gen Polimorfizmi ile İlişkisi (Poster Bildirisi), 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 19-23 Aralık, Bursa**
- 2012 **Delil K, Arman A, Erzaim N, Kiraz A, Şimşek H, Işık N. (2012) *Association between The IL-1 alfa – 889 Polymorphism and Multiple Sclerosis* (Poster Bildirisi), 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 19-23 Aralık, Bursa**
- 2012 **Arman A, Erzaim N, Mutlu Yeşiltepe R.G. (2012) *Laron Sendromlu Çocukların Genetik Karakterizasyonu* (Poster Bildirisi), 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 19-23 Aralık, Bursa**
- 2012 **Şimşek H, Arman A, Erzaim N, Kiraz A, Delil K, Işık N. (2012) *Determination of Relationship Between IL-1 VNTR Polymorphism and Multiple Sclerosis* (Poster Bildirisi), 10. Ulusal Tıbbi Genetik Kongresi, 19-23 Aralık, Bursa**
- 2011 **Erzaim N, Arman A, Aktan Ş, Çoker A, Işık N, (2011) *NFκB1 (-94 ins/del ATTG) gen polimorfizminin Turk populasyonunda Multipl Skleroz ile iliskisi* (Poster bildirisi), 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim, Antalya**

- 2011 **Aktan Ş., Arman A, Erzaim N., Çoker A, Işık N. (2011) *Türk Toplumunda IL-8 -251A/T gen polimorfizminin Multipl Skleroz(MS) hastalığı ile ilişkisi* (Poster bildirisi), 12. Ulusal Tıbbi Biyoloji ve Genetik Kongresi, 27-30 Ekim, Antalya**

### **Projeler**

- 2013 İzole Büyüme Hormonu Eksikliği Sendromlu Çocuklarda Büyüme Hormonu Serbest Bırakma Hormonu Reseptörü Geni Mutasyon Taraması
- 2013 İnterlökin-10 promotor polimorfizmleri ile Türk populasyonunda Multipl Skleroz Hastalığı arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde incelenmesi
- 2013 Büyüme Hormonuna Bağlanan Oligonun Hücre Kültüründe Biyolojik Aktivitesinin Belirlenmesi
- 2012 Multiple Skleroz Hastalığı ile TNF Alfa gen polimorfizmlerinin arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde incelenmesi
- 2011 NFκB1 (-94 ins/del ATTG) gen polimorfizminin Türk populasyonunda Multipl Skleroz ile ilişkisi
- 2011 Türk Toplumunda IL-8 -251A/T gen polimorfizminin Multipl Skleroz (MS) hastalığı ile ilişkisi

2010 Marmara Denizi'nin Değişen Oşinografik Şartlarının İzlenmesi Projesi (MAREM)

### **Sertifikalar**

2013 **Istanbul Üniversitesi, Deneysel Tıp Arastirma Enstitusu**

Methylome Workshop 2013

2013 **İstanbul Kültür Üniversitesi**

Oksidatif Stres, DNA Hasarı, DNA Onarımı ve Hastalıklarla İlişkiler

2013 **Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

Araştırma Tekniklerine Giriş ve Biyoistatistik Kursu

2012 **Elips Sağlık Ürünleri LTD. ŞTİ**

Real-Time PCR Uygulamaları Eğitimi

2012 **UGLA(Uluslar arası Genç Liderler Akademisi)**

Uyuşmazlık Çözümünde Müzakere ve Arabuluculuk Eğitimi

2011 **Berlitz Dil Merkezi**

Almanca Dil Kursu (4 Kur)

2010 **İngiliz Kültür Derneği Dil Okulları**

İngilizce Dil Kursu (9 Ay)

2010 **TEGV (Türkiye Eğitim Gönüllüleri Vakfı)**

Etkili İletişim Eğitimi

### **Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Motor sporları