

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI



**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN CTX-M-15 ÜRETEN
ESCHERİCHIA COLI İZOLATLARININ PLAZMİD REPLİKON
TİPLERİ VARLIĞI YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağla AZİZOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Cemil KÜREKÇİ

Dr. Özlem ÜNALDI

HATAY-2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN CTX-M-15 ÜRETEN
ESCHERİCHIA COLI İZOLATLARININ PLAZMİD REPLİKON
TİPLERİ VARLIĞI YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çağla AZİZOĞLU

Danışman

Doç. Dr. Cemil KÜREKÇİ

Dr. Özlem ÜNALDI

Bu tez, Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü Birimi tarafından 19.YL.018 nolu proje olarak desteklenmiştir.

HATAY-2020

T.C.
HATAY MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

**FARKLI KAYNAKLARDAN İZOLE EDİLEN CTX-M-15 ÜRETEEN
ESCHERİCHİA COLİ İZOLATLARININ PLAZMİD REPLİKON
TİPLERİ VARLIĞI YÖNÜNDEN İNCELENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Çağla AZİZOĞLU

Bu tez aşağıda isimleri yazılı tez jürisi tarafından 24/01/2020 günü sözlü olarak yapılan tez savunma sınavında oybirliği ile kabul edilmiştir.

Tez Jürisi: Jüri Başkanı: Doç. Dr. Cemil KÜREKCI

Üye: Prof. Dr. Burçin ÖZER

Üye: Doç. Dr. Aycan GÜNDOĞDU

Üye: Doç. Dr. Sevda PEHLİVANLAR ÖNEN

Üye: Dr. Özlem ÜNALDI

Bu tez, Enstitümüz Mikrobiyoloji (Tıp) Anabilim Dalı'nda hazırlanmıştır.

Prof. Dr. İbrahim Halil ÇERÇİ
Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Lisansüstü eğitimim süresince bilgisi ve tecrübesini benimle paylaşan, hayata olan pozitif tutumu ile başaracağıma inandıran ve araştırmamın her aşamasında yanımda olarak desteğini esirgemeyen değerli bilim danışmanım Sayın Doç. Dr. Cemil KÜREKÇİ'ye tüm içtenliğimle çok teşekkür ediyorum. Tez araştırmamda Pulsed Field Jel Elektroforezi analizlerinde ve sonuçların yorumlamasında yardımlarını esirgemeyen ikinci danışmanım Sayın Dr. Özlem ÜNALDI'ya çok teşekkür ediyorum. Tez çalışmam süresince ihtiyaç duyduğum zamanlarda laboratuvarlarının olanaklarından faydalanmamı sağlayan Sayın Prof. Dr. Burçin ÖZER'e çok teşekkür ediyorum.

Laboratuvar çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen öğretim görevlisi Gülsüm Pektanç Şengül'e teşekkür ediyorum. Çalışmamın çeşitli aşamalarında bana destek olan tekniker Fatma Altun Kalkan'a ve aynı sıcak ortamı paylaştığım tüm arkadaşlarıma teşekkür ediyorum.

Umudumu yitirdiğim anlarda varlıklarıyla bana güç veren, beni cesaretlendiren, her sevincime her derdime ortak olan, canıma can katan öğretmen arkadaşlarım Selda İCİL'e, Özlem ALTUNDAĞ'a, Güler KEREMOĞLU ALIR'a ve Simge Eda DOKUYUCU'ya sonsuz sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

Son olarak, her zaman bana karşı sonsuz sevgilerini ve desteklerini hissettiren sevgili annem Hülya AZİZOĞLU, sevgili babam Ali AZİZOĞLU, sevgili kardeşim Vecihe AZİZOĞLU, sevgili kardeşim Deniz AZİZOĞLU, sevgili kardeşim Mithat AZİZOĞLU'na ve canım ailemin tüm bireyelerine yanımda oldukları için sevgi ve saygılarımı sunuyorum, tüm benliğimle teşekkür ediyorum.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	II
TEŞEKKÜR	III
İÇİNDEKİLER	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	VI
ÇİZELGELER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
ÖZET	IX
ABSTRACT	X
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Escherichia coli</i>	1
1.2. β -Laktam Antibiyotikler	2
1.3. β -Laktam Antibiyotik Direnci	2
1.4. GSBL Plazmidleri	4
2. GENEL BİLGİLER	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM	10
3.1. Gereç	10
3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanışları	10
3.2.1. Kanlı Agar	10
3.2.2. Mueller Hinton Agar	10
3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler	10
3.4. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler	11
3.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	12
3.6. Yöntem	12
3.6.1. Bakteri İzolatları	12
3.6.2. İzolatların Hazırlanması	13
3.6.3. Bakteri İzolatlarının Total Genomik DNA'sının İzolasyonu	14
3.6.4. PZR ile <i>E. coli</i> Teyidi	14
3.6.5. Fenotipik Testler ile GSBL Aktivasyonunun Saptanması	15
3.6.6. <i>bla</i> _{CTX-M} Gen Varlığının PZR ile Belirlenmesi	16
3.6.7. Antibiyotik Direnç Profilleri	17
3.6.8. PFGE	17
3.6.9. Filogenetik Alt Tiplerin PZR ile Belirlenmesi	18
3.6.10. <i>fosA3</i> Geninin Varlığının Belirlenmesi	19
3.6.11. PZR Tabanlı Replikon Tipleme	19
3.6.12. İstatistik	21
4. BULGULAR	22
4.1. <i>uspA</i> Geni ile <i>E. coli</i> Tür Düzeyinde Doğrulaması	22
4.2. Fenotipik GSBL Aktivitesi	22
4.3. <i>bla</i> _{CTX-M} Geninin PZR Metodu ile Belirlenmesi	23
4.4. Clermont PZR Alt Tip Belirleme Sonuçları	24
4.5. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları	24
4.6. PFGE Analizi Sonucu	25
4.7. Fosfomisin Varlığının Araştırılması	27
4.8. Plazmid Replikon Tipleri Sonuçları	27
5. TARTIŞMA	32

6. SONUÇ	37
7. KAYNAKLAR	38
ÖZGEÇMİŞ	44

37
38
44



ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 3.1. <i>E. coli</i> 'nin kanlı agardaki görünümü	13
Şekil 4.1. <i>UspA</i> genin PZR jel elektroforez görüntüsü.....	22
Şekil 4.2. Antibiyotik diskleri etrafında oluşmuş zon çaplarının MH besiyerinde görünümü	23
Şekil 4.3. <i>bla</i> _{CTX-M} geninin PZR jel elektroforez görüntüsü.....	23
Şekil 4.4. Clermont PZR jel elektroforez görüntüsü	24
Şekil 4.5. Klinik örneklerden soyutlanan <i>bla</i> _{CTX-M-15} pozitif <i>E. coli</i> izolatlarının antimikrobiyal direnç profilleri, PFGE bant profilleri ve filogenetik ağaçta gösterimi.....	26
Şekil 4.6. <i>fosA3</i> geninin PZR jel elektroforez görüntüsü	27
Şekil 4.7. Plazmid replikon tipleri PZR jel elektroforez görüntüsü.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan GSBL üreten <i>E. coli</i> izolatları	13
Çizelge 3.2. <i>uspA</i> geni için hazırlanan PZR karışımı	14
Çizelge 3.3. <i>uspA</i> geni için PZR ısıl döngü koşulları	15
Çizelge 3.4. <i>bla_{CTX-M}</i> geni için hazırlanan PZR karışımı.....	16
Çizelge 3.5. <i>bla_{CTX-M}</i> geni için PZR ısıl döngü koşulları	17
Çizelge 3.6. Filogenetik alt tipleri için kullanılan primer sekansları.....	18
Çizelge 3.7. Filogenetik analiz için hazırlanan multipleks PZR karışımı	18
Çizelge 3.8. Filogenetik analiz için PZR ısıl döngü koşulları	18
Çizelge 3.9. <i>fosA3</i> geni için hazırlanan PZR karışımı	19
Çizelge 3.10. <i>fosA3</i> geni için PZR ısıl döngü koşulları	19
Çizelge 3.11. PBRT kiti kullanılarak belirlenebilen replikon tipleri, amplicon boyutları ve Inc grup dağılımları.....	20
Çizelge 3.12. PZR ısıl döngüsü replikon tiplemesi amplifikasyon parametreleri	20
Çizelge 4.1. GSBL üreten <i>E. coli</i> izolatlarının plazmid replikon tip profilleri.....	28
Çizelge 4.2. Çalışmada PZR ile saptanan plazmid replikon tiplerinin dağılımı	31

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

bç	:	Baz çifti
CLSI	:	Clinical Laboratory Standarts Institute
DNA	:	Deoksiribonükleik asit
°C	:	Derece Santigrat
gr	:	Gram
HMKÜ	:	Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi
GSBL	:	Genişlemiş Spektrumlu β -Laktamaz
kb	:	Kilo baz
μ g	:	Mikrogram
μ l	:	Mikrolitre
ml	:	Mililitre
PFGE	:	Pulsed Field Jel Elektroforezi
pMol	:	Pikomol
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	:	Ribonükleik asit

ÖZET

Farklı Kaynaklardan İzole Edilen CTX-M-15 Üreten *Escherichia coli* İzolatlarının Plazmid Replikon Tipleri Varlığı Yönünden İncelenmesi

Genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli*'ler son yıllarda klinik örneklerden artan oranda izole edilmektedir. Hayvansal kaynaklı gıdaların ve su kaynaklarının GSBL üreten *E. coli* ile kontamine olmasından dolayı bu kaynakların insan enfeksiyonları için bir rezervuar olabileceği bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında, 41 adet CTX-M-15 pozitif ve epidemiyolojik yönden ilişkisiz *E. coli* izolatının barındırdıkları plazmid replikon tiplerinin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile araştırılmıştır. Buna ilaveten, tüm izolatların fenotipik fosfomisin direnç varlığı ve fosfomisin direncinden sorumlu plazmid aracılı *fosA3* geninin varlığı araştırılmıştır. İzolatlar Türkiye'de daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda farklı kaynaklardan [tavuk eti ve çiğ süt, sürk peyniri, atık su (arıtma ve Asi Irmağı)] izole ve karakterize edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen insan klinik (n=8) izolatları ise; *bla*_{CTX-M-15} varlığı, klonal ilişkileri ve antimikrobiyal direnç profilleri yönünden bu çalışmada karakterize edilmişlerdir. Çalışmanın sonucunda, hiçbir izolatta fenotipik fosfomisin direncine ve *fosA3* geninin varlığına rastlanılmamıştır. İncelenen 30 adet replikon tipi içerisinde toplamda 12 replikon tipinin (FIA, FIB, FIBKN, FII, X1, A/C, U, N, HI2, I2, I1 α ve I1 γ) varlığına rastlanılmıştır. Bulunan replikon tipleri arasında FIA, FIB, FIB KN ve FII'nin varlığı kaynaklar arasında istatistiksel olarak anlamlı oranda farklılık göstermiştir. FII replikon tipi toplamda 22 izolatta rastlanılmış olup, su ve tavuk eti izolatlarında diğer izolatlara göre istatistiksel olarak anlamlı oranda ($P<0,05$) daha yaygın olduğu tespit edilmiştir. FIB replikon tipine tavuk eti, su ve klinik örneklerden soyutlanan izolatların %36.6'sında rastlanılmış olup çiğ süt ve peynir örneklerinden elde edilen izolatlarda rastlanılmamıştır. Benzer olarak, FIA replikon tipine su ve klinik örneklere ait izolatların %29.2'sinde rastlanılmış olup, diğer izolatlarda varlığına rastlanılmamıştır. Ancak, bu sonuçlardan farklı olarak, FIB KN replikon tipine sadece çiğ süt (n=6) ve Sürk peynirine ait izolatlarda (n=4) rastlanılmıştır ($P=0,001$). Sonuç olarak, incelenen izolatların çoğunda birden fazla replikon tipinin var olduğu ve kaynaklar arasında replikon tiplerinin istatistiksel olarak farklı olduğu ortaya koyulmuştur.

Anahtar Kelimeler: *E. coli*, CTX-M-15, Plazmid, GSBL

ABSTRACT

Investigation of the Presence of Plasmid Replicone Types Among CTX-M-15 Producing *Escherichia coli* Isolates from different Sources

Recently, extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* has been frequently reported from human clinical samples. Foods of animal origin and water sources are found to be contaminated with this bacteria and is therefore recognised as possible reservoir. In this thesis, a total of 41 CTX-M-15 positive and epidemiologically unrelated *E. coli* isolates were examined for the presence of plasmid replicon types by polymerase chain reaction (PCR). In addition, all the isolates were screened for the presence of phenotypic fosfomycin resistance and the plasmid-mediated *fosA3* gene. The isolates included in the current study were obtained from various sources [chicken meat and raw milk, Sürk cheese, waste water (wwtp and Asi River)] and were already characterized. Human clinical isolates (n=8) were characterized for the presence of *bla*_{CTX-M-15} gene, clonal relationships and antimicrobial resistance profiles in this study. As a result, none of the isolate were found to be resistant to fosfomycin and *FosA3* gene was not found in any isolate. Among the 30 replicon types examined, a total of 12 replicon types (FIA, FIB, FIBKN, FII, X1, A / C, U, N, HI2, I2, I1 α and I1 γ) were found. The presence of FIA, FIB, FIB KN and FII among the replicon types found showed a statistically significant difference between the sources. FII replicon type was found in 22 isolates in total, and it was found that water and chicken meat isolates were statistically significantly more common ($P < 0.05$) than other isolates. FIB replicon type was found in %36.6 of the isolates from chicken meat, water and clinical samples, but not in isolates from raw milk and cheese samples. Similarly, the FIA replicon type was found in %29.2 of the isolates of water and clinical samples, and its presence was not found in any other isolates. However, unlike these results, FIB KN replicon type was found only in raw milk (n = 6) and Surk cheese isolates (n=4) ($P = 0.001$). To sum up, the majority of isolates harbored more than one replicon types and replicon types differed statistically amongst the source of isolates.

Key words: *E. coli*, CTX-M-15, Plasmid, ESBL

1. GİRİŞ

1.1. *Escherichia coli*

Theodor Escherich tarafından 1885 yılında çocuk dışkılarından izole edilen bakteri önce *Bacterium coli commune* olarak isimlendirilmiş (Lehmann 1893), daha sonra Castellani ve Chalmers tarafından 1919 yılında *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır (Castellani ve Chalmers 1919).

E. coli'lerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri yapılan çalışmalar ile aydınlatılmış (Wilson ve Miles 1964) ve ilk kapsamlı hali Orskov tarafından 1984 yılında açıklanmıştır (Orskov 1984). Buna göre; *E. coli*'lerin Gram negatif, sporsuz, hareketli veya hareketsiz, peritrik flagellaya sahip, aerobik ve anaerobik atmosferde üreme özelliğine sahip oldukları belirtilmiştir (Orskov 1984). Bu temel özelliklerinden dolayı *E. coli*'ler taksonomik olarak Enterobacteriaceae ailesi içerisinde sınıflandırılmışlardır (Wilson ve Miles 1964).

E. coli'ler insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsaklarında normal flora elemanı olarak kolonize olurlar ve suşlarının çoğunun patojenik olmadığı bildirilmiştir. Bunun yanında, *E. coli*'lerin K2 vitamini sentezleyerek ve bağırsakların patojenik bakterilerle kolonizasyonunu önleyerek konakçılara yarar sağladığı bildirilmiştir (Reid ve ark. 2001, Bentley ve Meganathan 1982). Fakat patojenik özelliklere sahip *E. coli*'lerin insanlarda yara enfeksiyonlarından daha ciddi sistemik enfeksiyonlara kadar farklı hastalık tablolarının ortaya çıkmasından sorumlu olduğu belirtilmektedir (Gür ve ark. 2008, Kaper ve ark. 2004). *E. coli*'lerin sebep olduğu ciddi sistemik enfeksiyonlar arasında insanlarda üriner sistem enfeksiyonları, septisemi ve menenjit gibi ekstraintestinal hastalıklar sayılmaktadır (Müller ve ark. 2016).

E. coli'ye bağlı toplum ve hastane kökenli enfeksiyonların tedavi için β -laktam, florokinolon, aminoglikozit ve trimetoprim-sulfametoksazol grubu antibiyotikler sıklıkla kullanılırlar (Pitout 2012). Fakat *E. coli* β -laktamlar dahil pek çok antibiyotiğe karşı direnç kazanmaları nedeniyle bu enfeksiyonların tedavisi ciddi bir problem haline geldiği son yıllarda artan oranda bildirilmektedir (Livermore 2008, Pitout 2010). Çoğul antibiyotik direncinin gelişmesi nedeniyle; enfeksiyonların tedavi süreleri uzamakta ve buna bağlı

olarak; hastane kalış sürelerinde, morbidite ve mortalite oranlarında da artışlar gözlenmektedir (Perez ve ark. 2007, Pitout 2010, Rupp ve Paul 2003).

1.2. β -Laktam Antibiyotikler

β -laktam antibiyotikler, bir β -laktam halkasının çekirdeği ile tanımlanır (Page 1984) ve beş grup içerisinde sınıflandırılırlar: penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar ve β -laktamaz inhibitörleri (klavulanat, sulbaktam ve tazobaktam)'dir (Essack 2001). β -laktam antibiyotikleri, penisilin bağlayıcı proteinler (PBP'ler) olarak adlandırılan enzimleri etkisiz hale getirir ve peptidoglikan biyogenezini bozar (Tipper ve Strominger 1965). Bu PBP'ler; bakteri hücre membranında bulunur ve penisilinlere kovalent bağlanmak yolu ile transpeptidazlar, karboksipeptidazlar olarak işlev görmektedir (Georgopapadakou 1993, Kelly ve ark. 1986, Massova ve Mobashery 1998).

β -laktam grubu antibiyotiklerin kullanımının tüm antibiyotikler içinde %60'lık bir paya sahip olduğu bildirilmiştir (Livermore ve Woodford 2006). Ayrıca, β -laktam antibiyotik sınıfında bulunan antibiyotik ajanlar, veteriner hekimliğinde de sıklıkla tercih edilen ve kullanılan antibiyotiklerdir. Örneğin; Almanya'nın tüketiciyi koruma ve gıda güvenliği ofisinden (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) alınan verilere göre; Almanya'da veteriner hekimliğinde en fazla β -laktam grubu antibiyotiklerin kullanıldığı ve yıllık kullanımın 450 ton civarında olduğu bildirilmiştir (Michael ve ark. 2017).

1.3. β -Laktam Antibiyotik Direnci

Bakteriler genel olarak üç yolla β -laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedirler; i) Hücre içinde β -laktamların konsantrasyonunun azaltılması: Porin kaybı (antibiyotiklerin hücreye girişinin engellenmesi) veya efflux mekanizması (antibiyotiklerin dışarı atılması) ile meydana gelmektedir, ii) PBP'lerde meydana gelen mutasyonlardan kaynaklı değişimler, iii) β -laktamaz enzimlerinin üretilmesidir (Livermore 1995, Poole 2004).

Gram negatif bakteriler arasında β -laktamaz enzimlerinin üretimi β -laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminin en önemli ve en yaygın mekanizmasıdır (Harris 2015). β -laktamazlar, β -laktam halkasını parçalayarak etki gösterirler (Yu ve ark. 2006). Farklı alternatifler sunulmuş olmasına rağmen (Hall ve Barlow 2005) β -laktamazlar geleneksel olarak kabul görmüş 2 şekilde sınıflandırılmaktadırlar: bunlar i) Ambler sınıflandırması ve ii) Bush-Jacoby-Mederios fonksiyonel sınıflandırmasıdır.

Ambler moleküler seviyeye dayalı sınıflamanın ilk temelini 1980 senesinde atmıştır (Ambler 1980). Ambler sınıflandırmasında enzimin moleküler homolojisi esas alınıp A, C ve D serin β -laktamazlar ve sınıf B metallo- β -laktamazlar olarak 4'e ayrılır (Bush ve ark. 1995, Ambler 1980). A sınıfı serinler penisilinazları, B sınıfı metallo enzimleri, C sınıfı serinler sefalosporinazları ve D sınıfı oksasilini hidrolize edebilen serin β -laktamazları kapsar (Rice ve ark. 2003). Bush-Jacoby sınıflandırmasına göre ise β -laktamazlar: 2be (TEM- ve SHV- türevleri) ve 2d (OXA- türevleri) olmak üzere iki alt grupta yer almaktadır (Bush ve Jacoby 2010).

β -laktamazlar içinde genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL), ilk defa 1983 yılında keşfedilmiş ve oksimino-sefalosporinleri hidrolize etme kabiliyetine sahip bir enzim grubudur (Knothe ve ark. 1983, Paterson ve Bonomo 2005). GSBL'ler genellikle β -laktamaz inhibitörlerine (örneğin, klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam) karşı duyarlıdır fakat 3. jenerasyon sefalosporinler (sefotaksim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim ve sefepime) ve monobaktamlara (örneğin aztreonam) karşı dirençlidirler (Paterson ve Bonomo 2005, Shaikh ve ark. 2015). GSBL'ler ile ilişkili pek çok hastane kaynaklı salgınlar ve toplumla ilişkili hastalıklar dünya genelinde artan oranda rapor edilmiştir. Yapılan çalışmalarda, hayvan ve insan klinik numunelerinden soyutlanan sefalosporin dirençli Enterobacteriaceae izolatlarında GSBL'nin varlığı en yaygın dirence aracılık eden mekanizma olarak bildirilmiştir (Day ve ark. 2019, van Hoek ve ark. 2015, Zhang ve ark. 2018).

Bugüne kadar 300'den fazla alt tipten oluşan GSBL enzimleri belirlenmiştir (Bonnet 2004). Bunlar arasında, aminoasit dizilimi karşılaştırmalarına dayanarak TEM (Hasta ismi: Temoneira), SHV (Sulfhydryl Variable), CTX-M (Cefotaximase—Munich), PER (Pseudomonas Extended Resistance), VEB (Vietnam ESBL), GES (Guyana ESBL), TLA (Tlahuicas isimli Hindistan kabilesi), BES (Brezilya ESBL), SFO-1 (Serratia

fonticola) ve OXA (Oxacillin) sıklıkla çalışılan ve üzerinde durulan GSBL enzimleridir (Paterson ve Bonomo 2005, Naas ve ark. 2008).

GSBL varyantları temel olarak *bla* genleri tarafından kodlanan β -laktamazlardaki mutasyonlar nedeniyle ortaya çıkmaktadır (Cornista ve ark. 2019). Çalışmalar, en yaygın dört tür β -laktamaz geninin *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{OXA} olduğu ve bu enzimlerden elde edilen varyantların yeni baskın GSBL'leri oluşturduğu sonucuna varmıştır (Barguigua ve ark. 2011).

CTX-M enzimleri 1989'da keşfedilmiş (Bauernfeind ve ark. 1992) ve ilk olarak Alman ve İtalyan hastalardan izole edilen *E. coli* suşlarında karakterize edilmişlerdir (Barthélémy ve ark. 1992, Bauernfeind ve ark. 1996). CTX-M enzimlerine sahip *E. coli*'ler çoğunlukla üriner sistem enfeksiyonları ve bakteriyemi olmak üzere, hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarla ilişkilendirilmiştir (Woodford ve ark. 2009, Pitout ve ark. 2005, Lewis ve ark. 2007, Canton ve ark. 2008).

Genetik ilişkilerine dayanarak, CTX-M enzimleri altı gruba (CTX-M-1, -2, -8, -9 ve -25 ve KLUC grubu) ayrılır (Bonnet 2004, D'Andrea ve ark. 2013). Genel olarak, KLUC grubu, *Kluyvera georgiana* gibi bakteri türlerinde kromozomal genler tarafından doğal olarak kodlanan CTX-M enzimlerini içerir (Po ve ark. 2017). Bu varyantlar arasında özellikle CTX-M-15 enzimi CTX-M-1 grubu içerisindeki CTX-M-3'ten köken aldığı bildirilmiştir (Chong ve ark. 2011). Bu varyantı kodlayan gen ilk olarak 2001 yılında Hindistan'da rapor edilmiştir (Chong ve ark. 2011) ve bugünden sonra özellikle toplum kaynaklı enfeksiyonlarda baskın varyant olarak karşımıza çıkmıştır (Pitout ve Laupland 2008, Coque ve ark. 2008, Arpin ve ark. 2009). Ayrıca ülkemizde görülen üç ayrı coğrafi bölgeden toplanan üriner sistem enfeksiyonundan izole edilmiş GSBL üreten *E. coli*'lerin %90.2'sini CTX-M-15 enzimi meydana getirmektedir (Azap ve ark. 2010).

1.4. GSBL Plazmidleri

Plazmidler, konakçı genomdan bağımsız olarak kopyalanan bakterilerde bulunan deoksiribonükleik asit (DNA)'lerin ekstrakromozomal elementleridir. Direnç genleri içeren plazmidlerin yatay transferi, antimikrobiyal direncin dağılması için önemli bir mekanizmadır (Carattoli 2013). GSBL genlerinin bakteriler arasında yayılımında hareketli

elementlerin, özellikle plazmidler, önemli olduğu yapılan çalışmalarda ortaya koyulmuştur (Michael ve ark. 2015).

Klinik olarak önemli GSBL genlerini taşıyan plazmidler genellikle 50 ile 200 kilobaz (kb) arasındadır. GenBank'ta *bla*_{CTX-M} genlerini barındıran tam sekansı yapılmış *E. coli* plazmitleri arasında IncF, N, N2, I1, HI2, L / M, A / C, K, X4, U ve RCR plazmit aileleri bulunmaktadır (Carattoli 2011, Carattoli 2013). GSBL-üreten *E. coli*'nin IncF plazmidlerini büyük ölçüde barındırdığı bilinmektedir (Carattoli 2009, Coque ve ark. 2008). IncF plazmidleri, birçok direnç ve virülans belirleyicisinin yayılmasıyla ilişkili önemli bir plazmid ailesidir (Villa ve ark. 2010). Bunlar genellikle >100 kb boyutunda düşük kopya sayılı plazmitlerdir ve çoğalmanın başlatılmasını teşvik eden birden fazla replikon (FII, FIA ve FIB) taşırlar (Villa ve ark. 2010). Dünya çapında insan kaynaklı Enterobacteriaceae arasında en yaygın *bla*_{CTX-M} varyantı olarak kabul edilen *bla*_{CTX-M-15}'in yaygınlaşması, özellikle IncFII plazmidleri ile ilişkilendirilmiştir (Nicolas-Chanoine ve ark. 2012, Novais ve ark. 2007).

Bu çalışma için; Türkiye'de daha önce yapılan çalışmalarda tavuk eti ve çiğ süt (Kürekci ve ark. 2019), sürk peyniri (Kürekci ve ark. 2016), atık su ve Asi Irmağı (Kürekci ve ark. 2017) gibi farklı kaynaklardan izole edilen CTX-M-15 enzimine sahip klonal olarak ilişkili olmayan *E. coli*'ler seçilmiştir. Buna ilaveten; iki farklı üniversite hastanesinden elde edilen GSBL pozitif *E. coli*'ler de çalışmaya dahil edilmiştir. Klinik izolatlardan soyutlanan GSBL pozitif *E. coli*'lerin karakterizasyonu daha önce yapılmadığı için, ilk olarak bu izolatlar klonal ilişkileri, fenotipik antimikrobiyal direnç profilleri, GSBL enzim varlığı yönünden incelenmişlerdir.

Çalışmanın ana amacı; yukarıda bahsi geçen kaynaklardan soyutlanan ve CTX-M-15 pozitif bulunan 41 adet *E. coli* izolatının barındırdıkları plazmid replikon tiplerinin tespit edilmesidir. Ayrıca; tüm izolatlarda fosfomisin antibiyotikine karşı fenotipik direnç varlığı ve fosfomisin direncinden sorumlu plazmid aracılı *fosA3* geninin varlığı araştırılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

Hindistan'da yapılan bir çalışmada, üç hastanedeki klinik örneklerden toplanan üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli 98 *E. coli* izolatın 72 tanesinin (%73) *bla*_{CTX-M-15} genini taşıdığı ve bu genleri taşıyan izolatların %31'inin insersiyon sekansı (*IS*) yirmi altı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Ensor ve ark. 2006).

Oteo ve ark. (2009) İspanya Madrid'te 2004-2008 yılları arasında üriner sistem enfeksiyonlarında fosfomisin tüketiminin %50 arttığını, bunun sonucunda; GSBL pozitif bulunan izolatlarda fosfomisin direncinin %2,2'den %21,7'ye yükseldiğini bildirmişlerdir. Buna ilaveten, araştırmacılar, incelenen 26 izolattan 24'ünün *bla*_{CTX-M-15} genini taşıdığını ve O25b-ST131-filogrup B2 klonal kökenine ait olduğunu belirlemişlerdir.

Çin'in Guangdong Eyaletinde, 2006 ve 2010 yılları arasında farklı evcil hayvan hastanesine getirilen kedi ve köpeklerden soyutlanan 323 *E. coli* izolatın 29'unun (%9.0) *fosA3* genini taşıdığı bulunmuştur. Buna ilaveten, *fosA3* pozitif olan tüm izolatların aynı zamanda *bla*_{CTX-M} genini de taşıdığı bulunmuştur (Hou ve ark. 2012).

Fransa'da Aralık 2006'dan Nisan 2010'a kadar kedi ve köpeklerden elde edilen 518 *E. coli* izolatından 19'unun (%3.7) GSBL genine sahip olduğu bildirilmiştir. İncelemeye tabii tutulan 14 adet *bla*_{CTX-M} geninin IncF incompatibility grup üzerinde lokalize olduğu bulunmuştur (Dahmen ve ark. 2013).

Damborg ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada Danimarka'nın Kopenhag kentinde halka açık parklardan toplanan 209 adet köpek dışkı örneğinden 5 adet sefotaksime dirençli *E. coli* izole etmişlerdir. İzolatların bir tanesi dışında hepsi laktoz pozitif olup iki farklı CTX-M enzimi (CTX-M-1; n=3 ve CTX-M-15; n=2) barındırmaktadır. Ayrıca araştırmacılar, aynı örnekten alınan genetik olarak farklı iki *E. coli* izolatında IncFIB / Y ve tiplenemeyen plazmidler üzerinde *bla*_{CTX-M-15} genlerini bulmuşlardır.

Upadhyay ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada Kuzeydoğu Hindistan'da 252 klinik izolatta GSBL prevalansını %40.8 (103/252) oranında bulmuşlardır. 88 ısıtılmış işlem görmüş (kek, tatlı ve dondurma) ve çiğ (sebze ve et) gıda izolatlarında ise; GSBL prevalansını %31.8 (28/88) oranında bulmuşlardır. Klinik ve gıda izolatlarında sırasıyla %56.3 (58/103) ve %53.5 (15/28) oranında *bla*_{CTX-M-15} geninin varlığı tespit edilmiştir. *bla*_{CTX-M-15} genlerinin klinik ve gıda izolatlarında IncI1 ve FII replikon tiplerinde taşındığı

saptanmıştır. Bunun yanında *ISEcpI* elementleri hem klinik (n=37) hem de gıda izolatlarında (n=8) *bla_{CTX-M-15}* ile ilişkilendirilmiştir.

Zurfluh ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada İsviçre’de bir gölden toplanan ve *bla_{CTX-M-15}* genini bulunduran Enterobacteriaceae izolatlarının (n=81), bu geni konjugasyon yoluyla transfer edilebildiğini rapor etmişlerdir. İzolatların 32'sinde (% 39.5) sadece *bla_{CTX-M-15}* bulunduran plazmidin transferi gözlenmiştir. Bu plazmidler arasında en sık rastlanan replikon tiplerinin IncF tipi plazmitler olduğu (n=12), bunu I1 (n=8), K (n=3) ve R (n=1) plazmitlerinin takip ettiğini bildirmişlerdir.

Jackson ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada ABD’de sağlıklı evcil hayvanlardan (155 köpek ve 121 kedi) köken alan çoğul ilaç dirençli 36 adet *E. coli* izolatının %94’ünde (34/36) en az bir plazmid replikon tipi varlığı rapor edilmiştir. Dört adet *E. coli* izolatın 5 farklı replikon tipi varlığı saptanırken ve izolatların çoğunluğunun (n=14) 3 farklı replikon tipi içerdiğini saptamışlardır. Araştırmacılar, dokuz replikon tipi (FIA, FIB, FII, I2, A / C, U, P, I1 ve HI2) arasında FIB, FII, I2’nin en yaygın replikon tipleri olduğunu belirtmişlerdir.

Xie ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada Çin’in Shenzhen eyaletinde et ürünlerinden elde ettikleri 55 sefotaksime dirençli *E. coli* izolatı arasında 37’sinin *bla_{CTX-M}* genini bulundurduğunu, *bla_{CTX-M-1}* grubunun ise en yaygın tip olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca fosfomisin direncini kodlayan *fosA3* genini, 12 izolatta belirlemişlerdir. Araştırmacılar, 15 izolattan *bla_{CTX-M}* genlerinin aktarılabildiğini, IncI1 ve FII’nin en yaygın replikonlar olduğunu göstermişlerdir.

Kürekci ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada; Türkiye’de 87 Sürk peynir örneğinden toplam 12 adet (%13.5) sefotaksime dirençli *E. coli* izole etmişlerdir. Bu izolatların Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) sonuçlarına göre; 8 farklı klonal kökene ait oldukları bulunmuştur. GSBL pozitif *E. coli* izolatlarının 11 adetinde *bla_{CTX-M-15}* geninin varlığı saptanmıştır.

Day ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada Birleşik Krallık, Hollanda ve Almanya’dan 353 GSBL pozitif *E. coli* izolatını araştırmış ve bu izolatlar arasında 158 farklı sekans tipi (ST) tanımlamışlardır. Araştırmacılar, *bla_{CTX-M-1}*’in en yaygın GSBL geni (132/353, %37.4) olduğu ve insan izolatlarında *bla_{CTX-M-15}*’in (87/353, %24.6) en yaygın GSBL geni olduğunu belirtmişlerdir.

Lyimo ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada Kuzey Tanzanya'da içme suyu kaynaklarından izole edilen çoğul antibiyotik dirençli 31 *E. coli* izolatında Inc plazmid replikon grubuna ait 11 farklı replikon tipi (II, FIC, P, FIIA, A / C, FIB, FIA, H12, K / B, B / O ve N) tespit etmişlerdir. N, H12, FIB ve FIA replikon tiplerinin, *bla*_{CTX-M-15} genleri ile bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, izolatların %49'unda en sık rastlanan IncF (FIA, FIB, FIC ve FIIA) plazmid replikon tiplerini saptamışlardır.

Kürekci ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada; Hatay'da Asi (Orontes) Nehri ve atık su arıtma tesisinden izole edilen 54 adet sefotaksime dirençli GSBL üreten *E. coli* izolatını karakterize etmişlerdir. Bu izolatlardan 14'ünün (%25.9) dört yaygın klonal tipe; 40 izolatın ise tekli tipe ait olduğunu saptamışlardır. Ayrıca araştırmacılar, *bla*_{CTX-M-15} genini (n=36) baskın olarak tespit etmişlerdir.

Cao ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada Çin'de idrar örneklerinden elde edilen 465 GSBL pozitif *E. coli* izolatının 57'sinin fosfomisine karşı fenotipik dirençli olduğunu tanımlamışlardır. Fosfomisin dirençli izolatların 51'i (%89.5) *fosA3* genini ve bir izolatın da *fosA1* genini taşıdığını tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, 50 izolattan *fosA3* genlerinin transfer edilebileceğini, FII ve I1'in en yaygın plazmit tipleri olduğunu göstermiştir.

Giedraitienė ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada Litvanya'da toplam 158 GSBL pozitif *E. coli* klinik izolatu arasında 117 adetinin (%74.1) çoğul antibiyotik dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. *bla*_{CTX-M-15}'in bu izolatlar (n=31, %50.8) arasında en yaygın gen olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca araştırmacılar, dört izolatta (%23.5) birden fazla replikon tipi tespit etmiş ve CTX-M-15 üreten ST131 *E. coli* izolatlarında FII ve HII replikon tiplerini tanımlamışlardır.

Kanamori ve ark. (2017) yaptıkları çalışmada; ABD'de yedi Kuzey Karolina Halk Hastanesi'nden 63 çoğul antibiyotik dirençli *E. coli* izolatını araştırmışlardır. H30RX alt klonuna sahip izolatların (n=27; %69) CTX-M-15 enzimini ürettiğini ve sıklıkla FIA ve FIB plazmid replikon tiplerini içerdiğini saptamışlardır.

Ben Yahia ve ark. (2018) yaptıkları çalışmada; Tunus'ta yabani kuşlardan elde edilen 111 dışkı örneğinin 12'sinde (%10.81) GSBL pozitif *E. coli* saptamışlardır. İzolatlar arasında 7 farklı plazmid profili tespit etmişlerdir. Araştırmacılar, *bla*_{CTX-M-15} genini üreten 11 izolatta IncFII, FIA, FIB ve W replikonlarını bulmuşlardır. Ayrıca H12, A / C, P, I1 ve X plazmid replikon tiplerinin varlığını da bildirmişlerdir.

Kürekci ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada Hatay'da; 60 adet çiğ tavuk eti örneğinin 52'sinde (%86.6) ve 62 tank süt örneğinin 14'ünde (%22.6) GSBL pozitif *E. coli* tespit etmişlerdir. PFGE analizi %85 benzerliğe göre, 66 izolatta 49 ayrı restriksiyon profili ortaya koymuş ve izolatların %62.3'ünün, *bla*_{CTX-M} genini taşıdığını göstermişlerdir. Bunlar arasında CTX-M-1'in çiğ tavuk eti izolatlarında %28.3 (n=15) oranında bulunduğunu; CTX-M-15'in ise tank sütü izolatlarında (n=9) baskın GSBL tipleri olduğunu rapor etmişlerdir.

Abbas ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada Pakistan Faisalabad'ta evcil hayvan ve hayvan sahiplerinden 105 dışkı örneği toplanmış ve 73 izolatta (%69.5) GSBL pozitif *E. coli* varlığını tespit etmişlerdir. Çoğul ilaç direncini %31.5 (23/73) oranında saptamış, *bla*_{CTX-M} geninin en yaygın GSBL üreten genotip (19/23; %82.6) olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca araştırmacılar; 23 GSBL üreten *E. coli*'de, baskın olarak IncFII (n=14) ve FIA (n=8) plazmit replikon tiplerinin varlığını göstermiş ve bu izolatlardan 21'inde farklı klonal grup tanımlamışlardır.

Adenipekun ve ark. (2019) yaptıkları çalışmada Güneybatı Nijerya Lagos'ta çoğul ilaç dirençli insan (n=243) ve hayvansal gıda kökenli izolatlarda (n=211) β-laktamaz direncini kodlayan genleri ve plazmid replikonlarını karakterize etmişlerdir. Araştırmacılar, dört β-laktamaz kodlayan gen (*bla*_{CMY}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} ve *bla*_{TEM}) tespit etmişlerdir, çoğul ilaç dirençli *E. coli*'de sırasıyla insanlardan (n = 48) ve hayvanlardan (n = 96) elde edilen 13 ve 17 farklı replikon tanımlamışlardır. FIB ve X2 replikon tipleri insan izolatlarından eşit sayılarda (2/48; her biri %4.2) tespit edilmiş ve Y replikon tipinin hayvanlarda (16/96; %16.7) yaygın olarak bulunduğunu saptamışlardır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi (HMKÜ), Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü (BAP) 19.YL.018 numaralı proje ile desteklenmiştir.

3.1. Gereç

3.2. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanışları

3.2.1. Kanlı Agar

Hazır besi yerinden (MERCK, Almanya) 40 gram (gr) tartılarak, 1000 mililitre (ml) distile suda homojen bir biçimde çözünmesi sağlanmıştır. Otoklavda 121 derece santigrat (°C) 15 dakika (dk) süresinde sterilize edilmiştir. Hazırlanan besi yeri yaklaşık 45°C'ye kadar soğutulmuştur. Daha sonra içerisine %5 oranında koyun kanı ilave edilmiştir ve steril petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır. Kullanıma hazır hale getirilen besi yerleri, +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.2.2. Mueller Hinton Agar

Hazır toz besi yerinden (MERCK, Almanya) 34 gr tartılarak, 1000 ml distile suda homojen bir biçimde çözünmesi sağlanmıştır. Otoklavda 121°C'de 15 dk süresinde sterilize edilmiştir. Hazırlanan besi yeri yaklaşık 45°C'ye kadar soğutulmuştur. Daha sonra steril petri kaplarına dökülerek katılaşmaya bırakılmıştır. Kullanıma hazır hale getirilen besi yerleri, +4°C'de buzdolabında saklanmıştır.

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal ve Sarf Malzemeler

GeneJet Genomic DNA Purification Kit (Thermo Scientific, Litvanya)

PBRT 2.0 Kit (Diatheva, İtalya)

6X DNA Loading Buffer (Thermo Scientific, Litvanya)

Red Safe Nükleik Asit Boyama Solüsyonu (Intron Biotechnology, Kore)

10X TBE Electrophoresis Buffer (Thermo Scientific, Litvanya)

GeneRuler 100 baz çifti (bç) Ladder (Thermo Scientific, Litvanya)

Agarose (SIGMA, Almanya)
Ependorf Tüpleri (Isolab, Almanya)
Öze (Looplast, İtalya)
Steril tampon Swab (Cultiplast, İtalya)
Strip tüpler (Axygen, Amerika Birleşik Devletleri)
Petri kapları (Isolab, Almanya)
Güvenlik kabini class II (Metisafe, Türkiye)
Elektroforez cihazı (Cleaver Scientific, Birleşik Krallık)
Isıtıcı blok (Benchmark, ABD)
Vitek 2 Otomatize Sistemi (bioMerieux, Fransa)
AST-326 kartları (bioMerieux, Fransa)
Nuclease içermeyen su (Thermo Fisher Scientific, ABD)
Dream Taq PZR Master mix (Thermo Fisher Scientific, ABD)
DNA belirteçleri (100 bç ve 1 kb) (Thermo Fisher Scientific, ABD)

3.4. Çalışmada Kullanılan Antibiyotikler

Amoksisilin/klavulanik asit (30 mikrogram (μg) (Bioanalyse, Türkiye)
Aztreonam (30 μg) (Bioanalyse, Türkiye)
Fosfomisin (200 μg) (Bioanalyse, Türkiye)
Seftazidim (30 μg) (Bioanalyse, Türkiye)
Sefotaksim (30 μg) (Bioanalyse, Türkiye)
Seftazidim/klavulanik asit (40 μg) (Bioanalyse, Türkiye)
Sefotaksim/klavulanik asit (40 μg) (Bioanalyse, Türkiye)

3.5. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazı (A&D Super Hybrid Sensor FZ-500i, Japonya)

Otoklav (ALP MCY-40 LDP, Japonya)

İnkübatör (Lab Companion, ABD)

Vorteks (Scilogex, ABD)

Mikropipetler (Thermo Scientific, Litvanya)

-80 derin dondurucu (Wisd UniFreez U700, Kore)

+4 buzdolabı (Criyo UST 800, Çin)

Santrifüj Cihazı (Benchmark, MyFuge Mini, ABD)

PZR termal ısıtıcı (Applied Biosystems Veriti 96 Well Thermal Cycler, ABD)

Jel görüntüleme cihazı (Quantum Vılber Lourmat, Fransa)

Distile su cihazı (ELGA Purelab Option-Q, Almanya)

McFarland yoğunluk ölçer (Biosan, Letonya)

Multiscan GO µDrop Plate (Thermo Scientific, Finlandiya)

3.6. Yöntem

3.6.1. Bakteri İzolatları

Farklı gıda kaynaklarından (çiğ süt, tavuk eti ve peynir), su kaynaklarından (şehir atık suyu ve Asi ırmağı suyu) ve insan klinik örneklerinden toplam 43 adet GSBL üreten *E. coli* bu çalışmaya dahil edilmiştir. Örneklerin kaynaklarına göre dağılımı Çizelge 3.1’de verilmiştir. HMKÜ Hastanesinden ve Kayseri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinden sağlanan klinik numunelerden soyutlanmış GSBL pozitif *E. coli* izolatlarının karakterizasyonları HMKÜ, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu’nun 08/08/2019 tarih ve 26 nolu kararı ile yapılmıştır.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan GSBL üreten *E. coli* izolatları

Çiğ Süt (n=9)	Sürk Peyniri (n=8)	Tavuk Eti (n=8)	Su* (n=8)	Klinik# (n=10)
ME-5	P-5	TE-5	H-2	MKÜ19/01
ME-13	P-14	TE-6	H-5	MKÜ19/02
ME-15	P-24	TE-15	H-19	MKÜ19/03
ME-20	P-33	TE-22	H-68	MKÜ19/04
ME-28	P-46	TE-37	H-85	MKÜ19/05
ME-40	P-81	TE-40	H-110	MKÜ19/06
ME-51	P-85	TE-52	H-139	MKÜ19/07
ME-53	P-86	TE-54	H-141	MKÜ19/08
ME-59	-	-	-	MKÜ19/09
-	-	-	-	MKÜ19/10

*H-2, H-5, H-68 ve H-141 numaralı izolatlar Asi Irmağı'ndan elde edilmiştir. H-19, H-85, H-110 ve H-139 numaralı izolatlar Hatay Şehir Arıtma Merkezi'ne gelen atık sulardan elde edilmiştir.

MKÜ19/01-MKÜ19/05 numaralı izolatlar Kayseri Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanelerinden bu çalışma için verilmiştir. MKÜ19/06-MKÜ19/10 numaralı izolatlar HMKÜ Hastanesinden bu çalışma için verilmiştir.

3.6.2. İzolatların Hazırlanması

Gliserol içeren sıvı ortamında -80°C'de saklanan saf kültürler kanlı agara ekimleri yapılmıştır ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılmıştır.



Şekil 3.1. *E. coli*'nin kanlı agardaki görünümü

3.6.3. Bakteri İzolatlarının Total Genomik DNA'sının İzolasyonu

Çalışmada kullanılan bakterilerin total genom DNA'sı ticari DNA izolasyon kiti kullanılarak izole edilmiştir. İzolasyonun ardından örneklerin DNA konsantrasyonları spektrofotometrik yöntemle Multiscan GO μ Drop Plate cihazında 260 ve 280 nanometredeki absorbansları hesaplanarak ölçülmüştür. A260/A280 oranının 1,8-2.0 arasında olan DNA'lar ideal saflıkta kaliteli DNA olarak değerlendirilip polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) aşamalarında kullanılmıştır.

3.6.4. PZR ile *E. coli* Teyidi

Çalışmada toplam on adet klinik kaynaklardan soyutlanan *E. coli* izolatından elde edilen DNA örneği bu türe özgü “*universal stres protein (uspA)*” geni varlığı yönünden konvensiyonel PZR ile incelenmiştir (Chen ve Griffiths 1998). Bunun için *uspA* gen bölgesine spesifik primerler (F-5' CCGATACGCTGCCAATCAGT ve R-5' ACGCAGACCGTAGGCCAGAT) kullanılmıştır. PZR reaksiyonu için hazırlanan karışım ve miktarları Çizelge 3.2'de belirtilmiştir. Buna ilaveten, amplifikasyon ısı döngüsü bilgileri de Çizelge 3.3'te verilmiştir. Çalışmaya negatif kontrol için DNA ve ribonükleik asit (RNA) içermeyen su dahil edilmiştir. Pozitif DNA örneği olarak *E. coli* ATCC 25922 suşundan elde edilen DNA çalışmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 3.2. *uspA* geni için hazırlanan PZR karışımı

PZR reaksiyon karışımı (Konsantrasyon)	Hacim (μl)
Master Mix	12,5
Primer F (20 pikomol (pMol))	0,3
Primer R (20 pMol)	0,3
DNA	1
DNA/RNA içermeyen su	10,9
Toplam Hacim	25

Çizelge 3.3. *uspA* geni için PZR ısıl döngü koşulları

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre (dakika)	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	2	
Bağlanma	70	1	30
Uzama	72	1	
Son Uzama	72	10	1

PZR ürünleri %1.5'lik agaroz jelde elektroforez ile analiz edilmiştir. Amplifikasyon ürünlerinin jel üzerinde oluşturdukları bantların ultraviyole (UV) ışık altında görüntülenmesini sağlamak için agaroz jel içerisine redsafe solüsyonu %1,5 oranında eklenmiştir. Amplifikasyon büyüklüklerinin belirlenebilmesi için, moleküler DNA belirteçleri (100 bç ve 1 kb) kullanılmıştır. Amplifikasyon ürünlerinin jel üzerinde hareketleri yatay elektroforez cihazında 40 dk süresince 120 volt elektrik akımı uygulanarak gerçekleştirilmiştir. Elektroforez süresinin bitiminde DNA bantlarının varlığı UV ışık altında jel görüntüleme cihazı ile görüntülenmiştir.

3.6.5. Fenotipik Testler ile GSBL Aktivasyonunun Saptanması

Klinik numunelerden soyutlanan *E. coli* izolatlarının (n=10) GSBL aktivitesi fenotipik testler (kombine disk ve çift disk sinerji) kullanılarak “*Clinical Laboratory Standards Institute*” (CLSI 2015) kriterlerine göre belirlenmiştir. Kanlı agar üzerinde saf kültürleri hazırlanan bakterilerin süspansiyonları McFarland 0,5 bulanıklığına göre ayarlanmıştır. Bakteri süspansiyonları Mueller Hinton (MH) agar yüzeyine steril swap yardımı ile ekilmiştir. Antibiyotik diskleri (sefotaksim, seftazidim, aztreonam, amoksisilin/klavulanik asit, sefotaksim/klavulanik asit ve seftazidim/klavulanik asit) 2 santimetre aralıklar ile agar üzerine yerleştirilmiştir. 37 °C’de 24 saat inkübasyondan sonra, diskler etrafında oluşan zon çapları bir cetvel yardımı ile ölçüldü ve sonuçlar CLSI kriterlerine göre değerlendirildi. Kombine disk yöntemine göre; seftazidim/klavulanik asit ve sefotaksim/klavulanik asit disklerinin etraflarındaki zon, klavulanik asit içermeyenler ile kıyaslandığında 5 milimetreden büyük ise GSBL aktivitesi bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çift disk sinerji yöntemine göre; amoksisilin/klavulanik asit ile

sefotaksim, seftazidim ve aztreonam diskleri etrafındaki zonlarda birbirlerine doğru genişleme veya hilal şeklinde bir inhibisyon alanının oluşması GSBL aktivitesi bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir.

3.6.6. *bla*_{CTX-M} Gen Varlığının PZR ile Belirlenmesi

GSBL pozitif olarak bulunan klinik *E. coli* izolatlarında, *bla*_{CTX-M} gen varlığının tespiti için PZR yöntemi kullanılmıştır. *bla*_{CTX-M} gen bölgesine özgü primerler (F: 5'-CCAGAATAAGGAATCCCATG-3' ve R: 5'-GCCGTCTAAGGCGATAAAC-3') kullanılmıştır ve toplam reaksiyon solüsyonunun hacmi 50 mikrolitre (µl) olacak şekilde hazırlanmıştır. Karışımının içeriği Çizelge 3.4'te bildirilmiştir. Amplifikasyon işlemi ısı döngü cihazında önceki çalışmalarda bildirilen sıcaklıklarda yapılmıştır ve döngüler Çizelge 3.5'te verilmiştir (Ahmed ve ark. 2007). Çalışmaya negatif kontrol için DNA ve RNA içermeyen su dahil edilmiştir. Pozitif DNA örneği olarak daha önceki çalışmada izole edilen ve *bla*_{CTX-M} varlığı bilinen *E. coli* suşundan elde edilen DNA çalışmaya dahil edilmiştir. Amplifikasyon sonrası elde edilen ürünlerin görüntülenmesi 3.6.4.'te anlatıldığı gibi yapılmıştır.

PZR sonucunda 945 bç boyutunda ürün elde edilen örnekler CTX-M alt varyantını belirlemek için sanger sekanslama işlemi yapılmıştır. Sanger sekanslama için gerekli sekanslama ekipmanları HMKÜ bünyesinde olmadığından bu işlem hizmet alım yöntemi ile yapılmıştır. DNA dizi sekanslaması (çift yön) sonucunda elde edilen nükleotid dizileri online BLAST programı (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) kullanılarak Gen bankasında kayıtlı dizilerle karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.4. *bla*_{CTX-M} geni için hazırlanan PZR karışımı

PZR reaksiyon karışımı (Konsantrasyon)	Hacim (µl)
Master Mix	25
Primer F (20 pMol)	0,6
Primer R (20 pMol)	0,6
DNA	1
DNA/RNA içermeyen su	22,8
Toplam Hacim	50

Çizelge 3.5. *bla*_{CTX-M} geni için PZR ısı döngü koşulları

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	13 dk	1
Denatürasyon	95	30 saniye (sn)	
Bağlanma	56	30 sn	35
Uzama	72	30 sn	
Son Uzama	72	10 dk	1

3.6.7. Antibiyotik Direnç Profilleri

CTX-M-15 enzim varyantı yönünden pozitif olduğu belirlenen *E. coli* izolatlarının (n=8) antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için VITEK 2 otomatize sistemi ve AST-326 kartı kullanılmıştır. AST-326 kartları piperasilin/tazobaktam, seftazidim, sefepim, aztreonam, amikasin, gentamisin, netilmisin, tobramisin, siprofloksasin, levofloksasin, tigesiklin, meropenem, imipenem, kolistin ve trimetoprim/sulfametaksazol antibiyotiklerini içermektedir. Sonuçlar “*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*” (EUCAST) standartları temel alınarak değerlendirilmiştir ve sistem tarafından direnç profili “intermediate” olarak tanımlanan antibiyotiklerin aktivitesi bu çalışma için duyarlı olarak kabul edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen tüm CTX-M-15 pozitif *E. coli* izolatların (n=41) fosfomisin antibiyotiğine karşı direnç profilleri disk difüzyon metodu ile belirlenmiştir. Çalışmada kullanılan diskler 200 µg fosfomisin ve 50 µg glikoz-6-fosfat içermektedir. Deney 3.6.5’de anlatıldığı şekliyle yapılmıştır ve diskler etrafından oluşan zonların çapları bir cetvel yardımı ile ölçülmüştür. Elde edilen değerler CLSI (2018) kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

3.6.8. PFGE

Klinik kaynaklardan soyutlanan ve CTX-M-15 varyantı yönünden pozitif bulunan 8 adet *E. coli* suşunun klonal yakınlıkları PFGE yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. HMKÜ bünyesinde PFGE için gerekli ekipman olmadığından işlem Türkiye Halk Sağlığı Kurumu’ndan hizmet alımı ile gerçekleştirilmiştir. Analiz için Durmaz ve ark. (2009) tarafından belirtilen yöntemin kullanıldığı bildirilmiştir.

3.6.9. Filogenetik Alt Tiplerin PZR ile Belirlenmesi

GSBL üreten ve *bla*_{CTX-M-15} genini barındıran *E. coli* izolatlarının (n=8) filogenetik tipleri (A, B1, B2 ve D) Clermont ve ark. (2000) tarafından bildirilen protokol kullanılarak multipleks PZR ile belirlenmiştir. Çalışmada Clermont ve ark. (2000) tarafından bildirilen primerler (*chuA*, *yjaA* ve *TspE4C*) kullanılmış ve amplifikasyon koşulları ile birlikte Çizelge 3.6, 3.7, 3.8’de belirtilmiştir. Sonuçlar Clermont ve ark. (2000) tarafından belirtildiği gibi analiz edilmiş ve değerlendirilmiştir.

Çizelge 3.6. Filogenetik alt tipleri için kullanılan primer sekansları

Primerin İsmi	Primer Sekansı (5’-3’)	Amplikon Boyutu (bç)
<i>chuA</i> - F	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279
<i>chuA</i> - R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	
<i>yjaA</i> - F	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211
<i>yjaA</i> - R	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	
<i>TspE4C</i> -F	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152
<i>TspE4C</i> - R	CGCGCCAACAAAGTATTACG	

Çizelge 3.7. Filogenetik analiz için hazırlanan multipleks PZR karışımı

PZR reaksiyon karışımı (Konsantrasyon)	Hacim (µl)
Master Mix	12,5
Primer <i>chuA</i> -F (20 pMol)	0,3
Primer <i>chuA</i> R (20 pMol)	0,3
Primer <i>yjaA</i> -F (20 pMol)	0,3
Primer <i>yjaA</i> -R (20 pMol)	0,3
Primer <i>TspE4C</i> -F (20 pMol)	0,3
Primer <i>TspE4C</i> -R (20 pMol)	0,3
DNA	1
DNA/RNA içermeyen su	9,7
Toplam Hacim	25

Çizelge 3.8. Filogenetik analiz için PZR ısı döngü koşulları

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	94	4 dk	1
Denatürasyon	94	5 sn	
Bağlanma	57	20 sn	30
Son Uzama	72	5 dk	1

3.6.10. *fosA3* Geninin Varlığının Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilen tüm izolatlarda (n=41) *fosA3* geninin varlığı PZR ile araştırılmıştır. PZR çalışması için Hou ve ark. (2012) tarafından bildirilen primerler (F-5' GCGTCAAGCCTGGCATT ve R-5'RGCCGTCAGGGTCGAGAAA) kullanılmıştır. PZR karışımları ve amplifikasyon ısıl döngüleri sırasıyla Çizelge 3.9 ve 3.10'da verilmiştir.

Çizelge 3.9. *fosA3* geni için hazırlanan PZR karışımı

PZR reaksiyon karışımı (Konsantrasyon)	Hacim (µl)
Master Mix	12.5
Primer F (20 pMol)	0,25
Primer R (20 pMol)	0,25
DNA	1
DNA/RNA içermeyen su	11
Toplam Hacim	25

Çizelge 3.10. *fosA3* geni için PZR ısıl döngü koşulları

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	95	30 sn	
Bağlanma	57,5	30 sn	35
Uzama	72	30 sn	
Son Uzama	72	10	1

3.6.11. PZR Tabanlı Replikon Tipleme

Plazmid replikon tiplerinin belirlenmesi daha önceki çalışmalarda bildirilen multipleks PZR yöntemi kullanılarak araştırılmıştır (Carattoli ve ark. 2005, Carattoli 2009, Couturier ve ark. 1988, Garcia-Fernandez ve ark. 2008, Garcia-Fernandez ve ark. 2012, Villa ve ark. 2010, Villa ve ark. 2012). Bu çalışma için ticari olarak hazır PBRT 2.0 kit kullanılmıştır. Kit içerisinde 8 ayrı multipleks PZR karışımı (M1-M8) bulunmaktadır, bu

multipleks PZR karışımları içerdikleri replikon tipleri ve amplifikasyon parametreleri sırasıyla Çizelge 3.11 ve 3.12’de verilmiştir.

Çizelge 3.11. PBRT kiti kullanılarak belirlenebilen replikon tipleri, amplikon boyutları ve Inc grup dağılımları

Replikon Tipi	Amplikon boyutu (bç)	Inc Grup
H11	534	IncH11
H12	298-308	IncH12
H1B-M	570	Not assigned
F1B-M	440	Not assigned
I1 α	159	IncI1 α
I1 γ	161	IncI1 γ
I2	316	IncI2
M	741	IncM
L	854	IncL
K	190	IncK
B/O	159	IncB/O
A/C	418	IncA/C
N	514	IncN
N2	177	IncN2
W	242	IncW
P1	345	IncP1-alpha
T	750	IncT
U	843	IncU
R	248	Not assigned
X1	370	IncX1
X2	376	IncX2
X3	284	IncX3
X4	172	IncX4
F1A	462	IncF
F1B	683	IncF
F1I	288-292	IncF1I
F1IS	259-260	IncF1IS
F1Ik	142-148	IncF1Ik
F1B KN	631	IncF1IK
F1B KQ	258	IncF1IK

Çizelge 3.12. PZR ısı döngüsü replikon tiplemesi amplifikasyon parametreleri

Adım	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü Sayısı
Ön Denatürasyon	95	10	1
Denatürasyon	95	1 dk	
Bağlanma	60	30 sn	30
Uzama	72	1 dk	
Son Uzama	72	5 dk	1

3.6.12. İstatistik

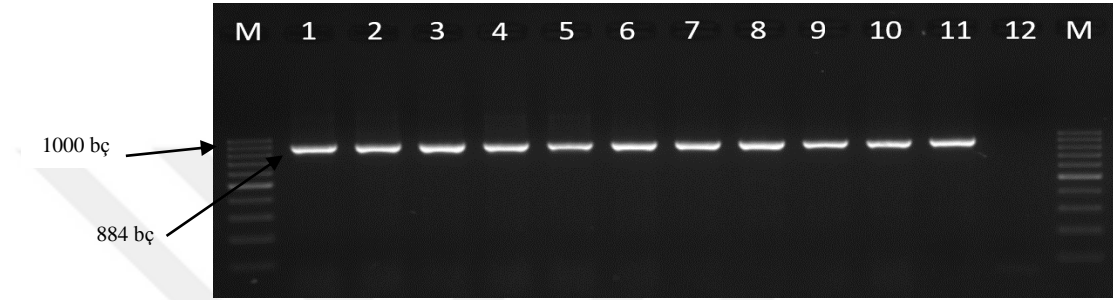
Çalışma sonucunda elde edilen değerler % olarak verilmiştir. Çalışmada gruplar arasındaki veri farklılıkları ki-kare testi ile değerlendirilmiştir. Verilerin istatistiksel analizi SPSS 18.0 paket programı (PASW Inc., Chicago. IL. USA) kullanılarak yapılmış ve $p < 0.05$ değerleri anlamlı kabul edilmiştir.



4. BULGULAR

4.1. *uspA* Geni ile *E. coli* Tür Düzeyinde Doğrulaması

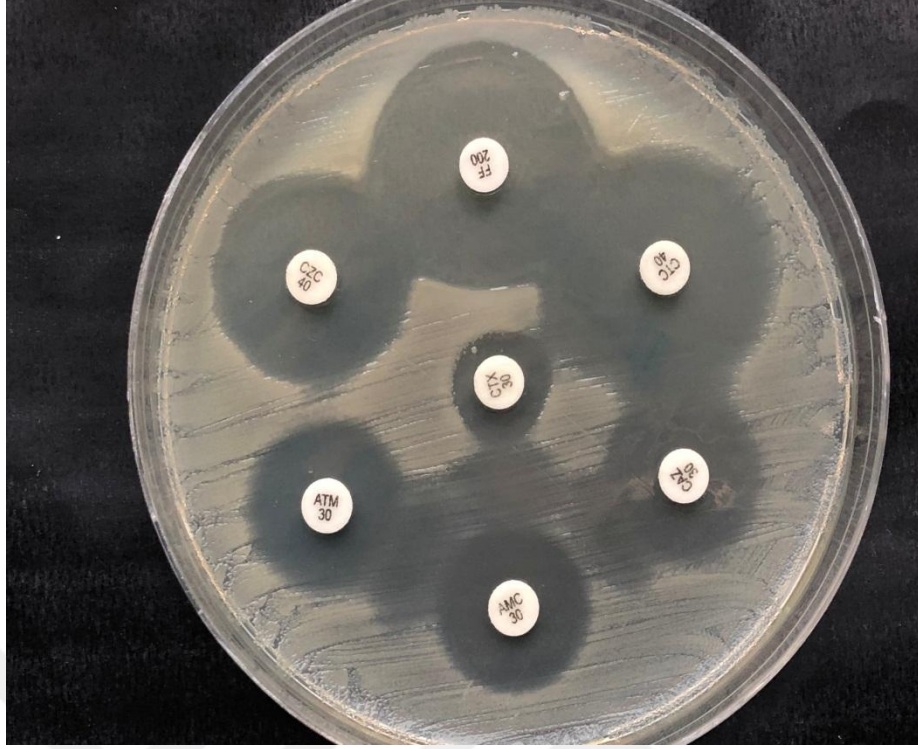
Klinik örneklerden soyutlanan *E. coli*'lerin tür spesifik *uspA* gen profilleri PZR yöntemi ile çalışılmıştır. PZR sonuçları incelendiğinde tüm izolatlarda beklenen boyutta (884 bç) bir ampikon elde edilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *UspA* genin PZR jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker, 1-10 pozitif örnekler, 11: pozitif kontrol, 12: negatif kontrol)

4.2. Fenotipik GSBL Aktivitesi

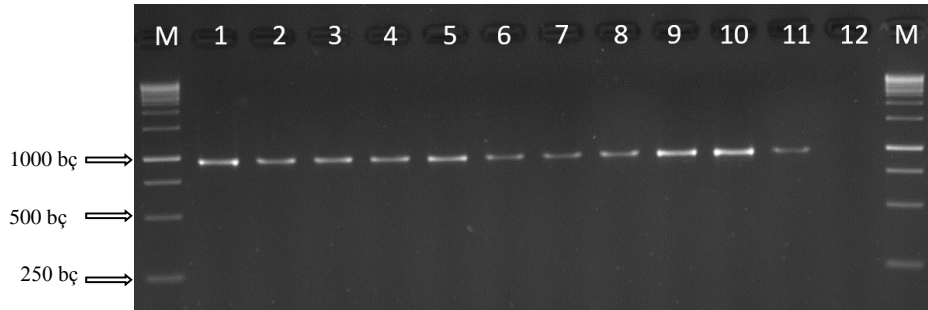
Klinik *E. coli* izolatının (n=10) adet GSBL aktivitesi hastanelerde Vitek2 otomatize bakteri tanımlama sistemi ile belirlenmiştir. Ancak, bu izolatların çalışmaya dahil edilebilmesi için GSBL aktiviteleri uluslararası standartlar tarafından önerildiği şekilde tekrardan belirlenmiştir. Fenotipik testlerin (çift disk sinerji ve disk kombinasyon) sonucuna göre tüm izolatların GSBL pozitif olduğu doğrulanmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. Antibiyotik diskleri etrafında oluşmuş zon çaplarının MH besiyerinde görünümü

4.3. *bla*_{CTX-M} Geninin PZR Metodu ile Belirlenmesi

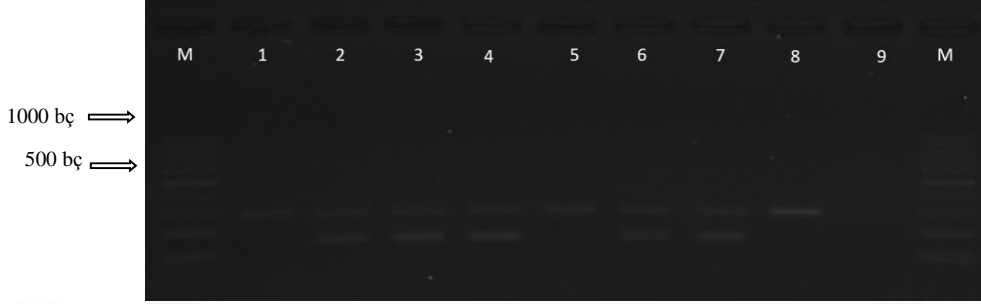
Fenotipik analiz sonuçlarına göre GSBL pozitif bulunan klinik izolatların tümünde, PZR çalışmasında *bla*_{CTX-M} geni ile uyumlu 945 bç büyüklüğünde bant belirlenmiştir. DNA sekans analizi sonucunda; 10 adet izolattan 8 tanesinin CTX-M-15 varyantını taşıdığı, buna ilaveten 2 tanesinin CTX-M-3 varyantını taşıdığı bulunmuştur. *bla*_{CTX-M-15} geni taşıyan izolatlar çalışmanın devamında kullanılmıştır.



Şekil 4.3. *bla*_{CTX-M} geninin PZR jel elektroforez görüntüsü (M: Marker, 1-10: Örnekler, 11: Pozitif Kontrol, 12: Negatif Kontrol)

4.4. Clermont PZR Alt Tip Belirleme Sonuçları

Klinik örneklerden soyutlanan izolatların 6 tanesi filogenetik grup B1 olarak belirlenirken, iki tanesinin D grubunda olduğu bulunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Clermont PZR jel elektroforez görüntüsü (M: Marker, 1-8: örnekler, 9: Negatif Kontrol)

4.5. Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

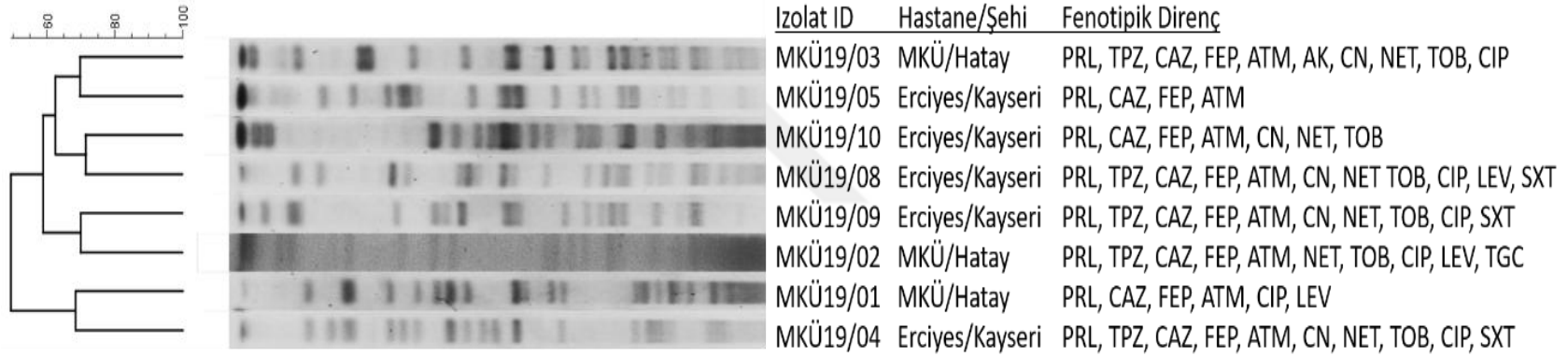
Klinik örneklerden soyutlanan ve sekans analizi sonucunda *bla*_{CTX-M-15} genini taşıdığı belirlenen izolatların (n=8) antibiyotik duyarlılık test sonuçları değerlendirildiğinde; izolatların tümünün beklenildiği üzere piperasilin, seftazidim, sefepim ve aztreonam antibiyotiklerine karşı dirençli oldukları saptanmıştır (Şekil 4.5). Buna ilaveten, piperasilin/tazobaktam'a karşı beş adet izolatta direnç tespit edilmiştir. Aminoglikozid grubu antibiyotiklerden netilmisine, tobramisine gentamisine ve amikasine karşı sırasıyla altı (%75), altı (%75), beş (%62,5) ve bir izolatta (%12,5) direnç tespit edilmiştir. Kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasine %75 ve levofloksasine %37,5 oranlarında dirençli olduğu görülmüştür. İncelenen izolatların %37,5'i trimetoprim/sülfametaksazol'e karşı dirençli bulunurken tigesikline karşı yalnızca bir adet izolatta direnç tespit edilmiştir. Ancak hiçbir izolatta imipenem, meropenem ve kolistin direnci saptanmamıştır.

CTX-M-15 pozitif izolatların %75'inde çoğul antibiyotik direnci (üç veya daha fazla farklı sınıftan antibiyotiğe karşı direnç) saptanmıştır. Ayrıca çalışmaya dahil edilen (n=41) hiçbir izolatta disk difüzyon testi sonucuna göre; fosfomisine karşı direnç tespit edilmemiştir.

4.6. PFGE Analiz Sonucu

Klinik örneklerden soyutlanan 8 adet *bla*_{CTX-M-15} pozitif *E. coli*'nin *xbal* enzimi kullanılarak PFGE yöntemi ile klonal yakınlıkları incelenmiştir. %80 benzerlik oranına göre tüm izolatlar birbiri ile klonal olarak ilişkisiz (tekli tip) olduğu bulunmuştur (Şekil 4.5).

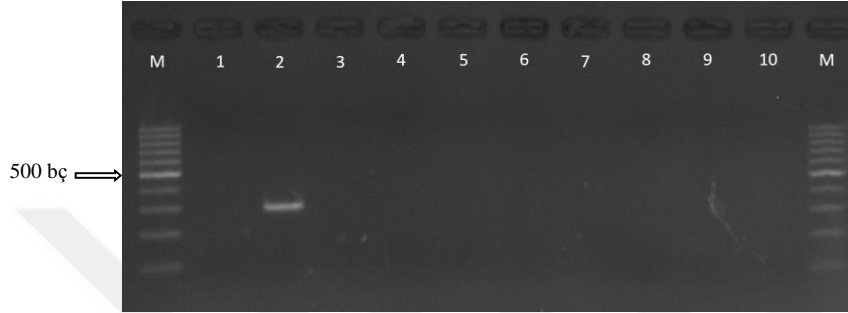




Şekil 4.5. Klinik örneklerden soyutlanan *bla*_{CTX-M-15} pozitif *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal direnç profilleri, PFGE bant profilleri ve filogenetik ağaçta gösterimi. Antibiyotiklerin kısaltması; PRL: Piperasilin; TPZ: Piperasilin/Tazobaktam; CAZ: Seftazidim; FEP: Sefepim; ATM: Aztreonam; AK: Amikasin; CN: Gentamisin; NET: Netilmisin; TOB: Tobramisin; CIP: Siprofloksasin; LEV: Levofloksasin; TGC: Tigesiklin; SXT: Trimetoprim/Sülfametaksazol.

4.7. Fosfomisin Varlığının Araştırılması

PZR deneyinde pozitif kontrol örneğinde beklenen boyutta (282 bç) *fosA3* genine ait bant elde edilmiştir, fakat *bla*_{CTX-M-15} pozitif *E. coli* izolatlarının hiçbirinde (n=41) *fosA3* genine rastlanılmamıştır (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. *fosA3* geninin PZR jel elektroforez görüntüsü (M: 100 bç'lik marker, 1: negatif kontrol, 2: pozitif kontrol, 3-10 klinik örnekler)

4.8. Plazmid Replikon Tipleri Sonuçları

Araştırma kapsamına dahil edilen 41 adet CTX-M-15 pozitif *E. coli* izolatının PZR sonucunda 36 adet izolat incelenen replikon tiplerinin bazıları yönünden pozitif bulundu. Beş adet izolatta (çiğ süt; n=2, sürk peyniri; n=2 ve tavuk eti; n=1) herhangi bir PZR bantına rastlanılmadı. İzolatların barındırdıkları replikon tipleri Çizelge 4.1'de verilmiştir. PZR metodunda pozitif kontrolden elde edilmiş bant profilleri ve bir örnekten elde edilmiş bantlar Şekil 4.7'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. GSBL üreten *E. coli* izolatlarının plazmid replikon tip profilleri

Kaynak	Izolat ID	Replikon Tipi
Çiğ Süt (n=9)	ME-5	nd*
	ME-13	FIB KN
	ME-15	nd*
	ME-20	I1 α
	ME-28	FIB KN, U
	ME-40	FIB KN
	ME-51	FIB KN, HI2, I2, U
	ME-53	FIB KN, FIB, FII
	ME-59	FIB KN
Sürük Peyniri (n=8)	P-5	FIB KN
	P-14	FIB KN, FII
	P-24	nd*
	P-33	I1 α , U
	P-46	FIB KN
	P-81	nd*
	P-85	FII, I1 α , HI2, I2, U
	P-86	I1 α , FIB KN
Tavuk Eti (n=8)	TE-5	FII
	TE-6	FII
	TE-15	FII, A/C, I1 α
	TE-22	FII
	TE-37	FII, I1 α , I2, U
	TE-40	FII, FIB, N
	TE-52	nd*
	TE-54	FII, I1 α
Su (n=8)	H-2	FII, FIA, FIB, I1 γ
	H-5	FII, FIA, FIB, I1 γ
	H-19	FIA, FIB, X1
	H-68	FII, FIA, FIB
	H-85	FII, FIA, FIB, I1 α
	H-110	FII, FIA, FIB
	H-139	FII, FIA, FIB
	H-141	FII, FIA, FIB
Klimik (n=8)	MKÜ19/01	FIA, FIB
	MKÜ19/02	I1 γ
	MKÜ19/03	FII, FIB
	MKÜ19/04	FII, FIA, X1
	MKÜ19/05	FII, FIB
	MKÜ19/08	FIA, FIB, I1 α
	MKÜ19/10	FII, FIB
	MKÜ19/09	FII, FIA, FIB

* Tanımlanmış replikon tipi bulunamamıştır.

PZR sonucuna göre; toplamda 12 farklı plazmit replikon tipi (FIA, FIB, FIB KN, FII, X1, A/C, U, N, HI2, I2, I1 α ve I1 γ) bulunmuştur (Çizelge 4.1). Plazmit replikon tiplerinin dağılımı sırasıyla; FII 22 (%53,6), FIB 15 (%36,6), FIA 12 (%29,2), FIB KN 10 (%24,4), I1 α 9 (%21,9), U 5 (%12,2), I2 3 (%7,3), I1 γ 3 (%7,3) , X1 2 (%4,9), HI2 2 (%4,9), N bir (%2,4), ve A/C bir (%2,4) olduğu görülmüştür. Tespit edilen plazmit replikon tiplerinin izolatların elde edildiği kaynaklara göre dağılımı Çizelge 4.2’de özetlenmiştir.

Plazmid replikon tiplerinin dağılımını içeren Çizelge 4.2 incelendiğinde FIA, FIB, FIB KN ve FII bulundurma bakımından kaynaklar arasında istatistiksel açıdan önemli farklılıkların ortaya çıktığını ($P<0,05$), ancak X1, A/C, U, N, HI2, I2, I1 α ve I1 γ replikon tipleri arasında herhangi bir istatistiki farkın gözlenmediği görülmektedir. FII replikon tipi tüm kaynaklardan elde edilen toplam 22 izolatta tespit edilmiştir. En fazla tavuk eti (7/8) ve su (7/8) örneklerinde bulunurken, en az çiğ süt (1/9) ve sürk peyniri (2/8) örneklerinde rastlanılmıştır ($P=0,001$). Klinik izolatların ise %62,5’inde bu replikon tipine rastlanılmıştır ve bu değer diğer kaynaklardan istatistiksel olarak önemli bulunmamıştır.

Çalışmada izolatların %36,6 ve %29,2’sinin sırasıyla FIB ve FIA’ya ait bant oluşturdukları bulunmuştur. FIB replikon tipi su (n=8), klinik (n=6) ve tavuk eti (n=1) izolatlarında rastlanırken, çiğ süt ve sürk peyniri izolatlarında rastlanılmamıştır ($P<0,001$). FIA replikon tipine ise su izolatlarının tümünde rastlanırken, klinik izolatların sadece dört tanesinde rastlanılmıştır ($P<0,001$). Diğer izolatlarda FIA replikon tipi bulunmamıştır.

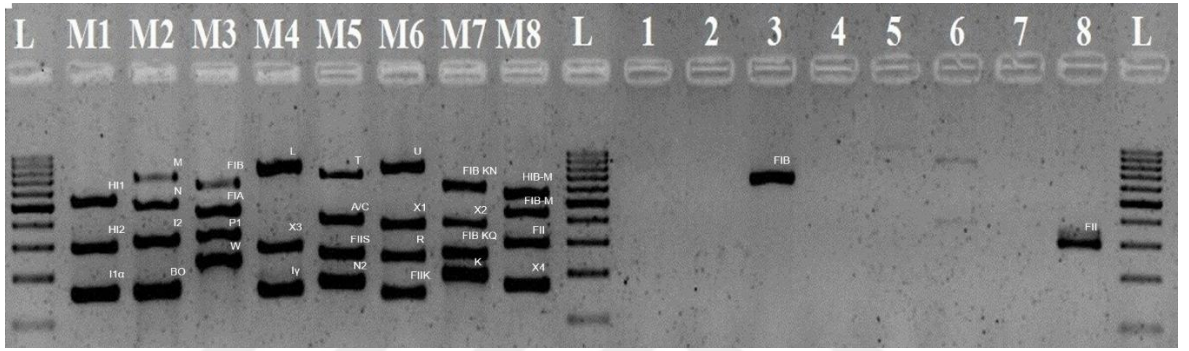
FIB KN replikon tipine sadece çiğ süt (n=6) ve sürk peyniri (n=4) izolatlarında rastlanılmış olup, diğer kaynaklardan elde edilen izolatlarda bu replikon tipine rastlanılmamıştır ($P=0,001$).

I1 α replikon tipi tüm kaynaklardaki toplamda 9 adet izolatta bulunmuştur. En fazla tavuk eti (n=3) ve sürk peyniri (n=3) örneklerinde bulunurken, çiğ süt, su ve klinik örneklerde birer adet izolatta mevcut olduğu gözlenmiştir ($P>0,5$).

Diğer replikon tipleri çok az sayıda izolatta var oldukları bulunmuştur. Bunlardan U ve I2 replikon tiplerine çiğ süt, sürk peyniri ve tavuk eti izolatlarında rastlanırken, su ve klinik izolatlarda rastlanılmamıştır ($P>0,5$).

İncelenen izolatlar arasında I1 γ (n=3) ve X1 (n=2) yalnızca su ve klinik izolatlarda bulunmuştur, diğer kaynaklardaki izolatlarda bu replikon tiplerine rastlanılmamıştır ($P>0,5$).

HI2 replikon tipine (n=2) sadece çiğ süt ve sürk peynirinden elde edilen birer adet izolatta rastlanılmış olup, diğer kaynaklardan elde edilen izolatlarda rastlanılmamıştır ($P>0,5$). Son olarak, N ve A/C replikon tipleri sadece tavuk etinden elde edilen bir adet izolatta bulunmuştur.



Şekil 4.7. Plazmid replikon tipleri PZR jel elektroforez görüntüsü (L:Marker; M1-M8 pozitif kontrol ve bantların karşılığı genler şekilde belirtilmiştir; 1-8: M-1 izolatına ait PZR amplicon sonuçları, pozitif bulunan bantlar belirtilmiştir.)

Çizelge 4.2. Çalışmada PZR ile saptanan plazmid replikon tiplerinin dağılımı

Kaynak	Plazmid Replikon Tipleri n (%)											
	I1a	HI2	I2	N	FIA	FIB	I1γ	A/C	U	X1	FIB KN	FII
Çiğ Süt (n=9)	1 (%11,1)	1 (%11,1)	1 (%11,1)	-	- ^a	- ^a	-	-	2 (%22,2)	-	6 (%66,6) ^a	1 (%11,1) ^a
Sürk Peyniri (n=8)	3 (%37,5)	1 (%12,5)	1 (%12,5)	-	- ^a	- ^a	-	-	2 (%25)	-	4 (%50) ^a	2 (%25) ^a
Tavuk Eti (n=8)	3 (%37,5)	-	1 (%12,5)	1 (%12,5)	- ^a	1 (%12,5) ^a	-	1 (%12,5)	1 (%12,5)	-	- ^b	7 (%87,5) ^b
Su (n=8)	1 (%12,5)	-	-	-	8 (%100) ^c	8 (%100) ^b	2 (%25)	-	-	1 (%12,5)	- ^b	7 (%87,5) ^b
Klinik (n=8)	1 (%12,5)	-	-	-	4 (%50) ^b	6 (%75) ^b	1 (%12,5)	-	-	1 (%12,5)	- ^b	5 (%62,5) ^{ab}
Toplam (n=41)	9 (%21,9)	2 (%4,9)	3 (%7,3)	1 (%2,4)	12 (%29,2)	15 (%36,6)	3 (%7,3)	1 (%2,4)	5 (%12,2)	2 (%4,9)	10 (%24,4)	22 (%53,6)

^{a, b, c} Aynı sütunda bulunan veriler için farklı harfler istatistiksel olarak farkın olduğunu göstermektedir .

5. TARTIŞMA

Çalışmaya 8 adet tavuk eti, 9 adet çiğ süt, 8 adet sürk peyniri, 8 adet su (arıtma ve Asi Irmağı) ve 8 adet insan klinik izolatu olmak üzere toplamda 41 GSBL pozitif CTX-M-15 üreten *E. coli* izolatu dahil edilmiş ve izolatlarının barındırdıkları plazmid replikon tiplerinin varlığı araştırılmıştır. Çalışmada klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarından alınan ve CTX-M-3 pozitif bulunan iki adet izolat çalışma dışı bırakılmıştır.

Plazmid replikon tiplerinin belirlenmesinden önce, klinik örneklerden soyutlanan GSBL pozitif ve *E. coli* olarak tanımlanan izolatların karakterizasyonları yapılmıştır. Otomatize sistemlerin (örneğin; VİTEK ve Phoenix) bakterileri tür düzeyinde tanımlamalarındaki başarıları klinik mikrobiyologlar tarafından sorgulanmış ve bazen “false” identifikasyona neden oldukları rapor edilmiştir (Bahçe ve ark. 2019, Gupta ve ark. 2019). Bu nedenle *E. coli*'yi tür düzeyinde tanımlamadaki spesifitesi daha önceki çalışmalarda ispat edilmiş “*universal stress proteini*” kodlayan gen bölgesine özgü primerler (*uspA*) kullanılarak PZR metodu ile doğrulama yapılmıştır (Chen ve Griffiths 1999).

Her ne kadar otomatize sistemler klinik izolatlarda GSBL'nin varlığını tanımlamak için sıklıkla kullanılıyor olsalarda, bu sistemlerin doğruluğu sorgulanmaktadır. Örneğin; Leverstein-van Hall ve ark. (2002) yaptıkları bir çalışmada çoğul ilaç direncine sahip 74 adet *E. coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarında E-test, VITEK2 ve Phoenix otomatize sistemlerinin GSBL'yi tanımlamadaki doğruluğunu incelemişlerdir. Yapılan çalışmada, E-testin doğruluğu %94 oranında bulunurken, VITEK2'nin doğruluğu %78, ve phoenix %89 olarak belirlenmiştir (Leverstein-van Hall ve ark. 2002). Bu nedenle çalışmaya dahil edeceğimiz klinik izolatların GSBL olduklarından kesin emin olmak için uluslararası kabul görmüş fenotipik testler (double disk ve disk sinerji) kullanılmıştır ve tüm *E. coli* izolatları bu test sonuçlarına göre GSBL pozitif oldukları belirlenmiştir (CLSI 2018).

PZR sonrası sekanslama sonuçlarına göre 10 adet izolattan 8 (%80) tanesinin CTX-M-15 taşıdığı, buna ilaveten 2 tanesinin (MKÜ suşları) CTX-M-3 (%20) taşıdığı bulunmuştur. Her ne kadar bu çalışmaya dahil edilen suş sayısı sınırlı olsa da, daha önceki yıllarda yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Örneğin; 130 adet dublike

olmayan üçüncü nesil sefalosporinlere dirençli *E. coli* ve *K. pneumonia* suşunun 115 tanesinin GSBL olduğu disk kombinasyon metodu ile konfirme edilmiş, ve *E. coli*'lerin %73'nün *bla*_{CTX-M} taşıdığı PZR ile saptanmıştır, sonraki detaylı incelemelerde PZR pozitif bulunan tiplerinin CTX-M-15 olduğu bulunmuştur (Ensor ve ark. 2006). Bundan sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda da buna benzer sonuçlar rapor edilmiştir. Gür ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada üriner sistemden izole edilen GSBL pozitif *E. coli* suşlarının genetik mekanizmalarını incelemişlerdir. Bu suşların %80.8'inin CTX-M-15 ürettiği, %15.4'ünün CTX-M-3 ürettiği ve bir adet izolatında CTX-M-1 yönünden pozitif olduğu belirlenmiştir. Buna ilaveten, son yıllarda yapılan bir çalışmada 120 adet klinik örneklerden soyutlanmış *E. coli* izolatınının 108 tanesinde *bla*_{CTX-M} geninin varlığına rastlanmış ve bu pozitif bulunan örneklerin 90 tanesinde CTX-M-15 bulunmuş olduğu 6 tanesinde CTX-M-16, 6 tanesinde CTX-M-9, ve 6 tanesinde CTX-M-1 bulunduğu bildirilmiştir (Tutun ve ark. 2019). Klinik örneklerde olduğu kadar, hayvansal örneklerde de CTX-M-15 pozitif *E. coli*'lerin izolasyonu sıklıkla bildirilmeye başlanmıştır. Son yıllarda yapılan bir çalışmada; hayvansal örneklerden (tavuk eti ve çiğ inek sütü) izole edilen 66 adet GSBL üreten *E. coli* izolatınının %62.3'ünün *bla*_{CTX-M} genini taşıdığı gösterilmiştir. Bunlar arasında CTX-M-1'in tavuk etinden soyutlanan izolatlarda %28.3 (n=15) baskın GSBL varyantı olduğu bulunurken, CTX-M-15'in ise tank sütü örnekleri arasında en yaygın varyant olduğunu saptanmıştır (Kürekci ve ark. 2019).

PFGE; bakterilerin tür içinde klonal yakınlıklarını belirlemede altın standart olarak kabul edilen bir metottur (Durmaz ve ark. 2007, WHO 2005, Türe ve Altınok 2013). CTX-M-15 pozitif bulunan *E. coli* izolatlarınının klonal yakınlığının belirlenmesi için PFGE yapılmıştır. PFGE sonuçlarımız incelenen 8 adet *E. coli* izolatınının %80 benzerlik oranına göre birbiri ile klonal olarak ilişkisiz olduğunu göstermiştir. Reuland ve ark. (2013) yaptıkları bir çalışmada CTX-M-15-üreten *E. coli*'lerin farklı klonal komplekslere ait olduğunu ortaya koymuştur.

Çalışmada incelenen 8 adet GSBL üreten *E. coli* izolatınının çoğul dirençli olduğu belirlendi. Çalışmamızda incelenen suşların aminoglikozid grubu antibiyotiklere ve kinolon grubu antibiyotiklere yüksek oranda dirençli oldukları bulunmuştur. Çalışılan izolatların hepsinin CTX-M-15 pozitif olması ve sayısının az olması yapılan diğer çalışmaların sonuçları ile birebir kıyaslama olanağına imkan vermemektedir. Fakat, elde

edilen sonuçlar ülkemizde klinik örneklerden soyutlanan GSBL pozitif *E. coli*'ler üzerinde yapılan diğer çalışmalar ile kıyaslandığında uyumlu olduğu bulunmuştur. Örneğin; Gür ve ark. (2008) klinik örneklerden soyutlanan 457 adet *E. coli*'nin %26'sının GSBL ürettiğini ve kan izolatlarında CTX-M-15 enzimlerinin varlığını %69.4 oranında bulmuşlardır. Bu izolatlar arasında imipenem direnci saptamamışlardır. Ancak, Hazirolan ve ark. (2018) insan fekal örneklerinden soyutladıkları 461 adet GSBL üreten *E. coli* izolatında amikasin ve gentamisine karşı direnç saptamazken, izolatların siprofloksasin direnci %31,2 ve trimetoprim/sülfametaksazol direncide %33,3 olarak rapor etmişlerdir. Çalışmamızda trimetoprim/sülfametaksazole GSBL üreten *E. coli* suşlarında %37,5 oranında direnç saptanırken; tigesikline karşı sadece bir adet izolatın dirençli olduğu gözlenmiştir. Bu sonuçlar ülkemizde son yıllarda yapılan çalışmaların sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Örneğin; Mengeloğlu ve ark. (2013) çeşitli klinik örneklerden soyutlanan 100 adet GSBL üreten *E. coli*'ler üzerinde yaptıkları çalışmada, izolatların tigesikline duyarlılık oranı %97 olarak bulunmuştur. Çalışmada hiçbir izolatta imipenem, meropenem ve kolistin direnci bulunmamıştır. Ülkemizde yapılan diğer çalışmalarda da karbapenem antibiyotiklerine karşı klinik örneklerden soyutlanmış GSBL üreten *E. coli* izolatlarında direnç tespit edilmemiştir (Hazirolan ve ark. 2018, Gür ve ark. 2008).

Bizim çalışmamızda disk difüzyon test sonucuna göre hiçbir izolat fosfomisine karşı dirençli bulunmamıştır. Buna ilaveten, tüm izolatlarda PZR metodu ile *fosA3* geninin varlığı araştırılmış fakat bu gene hiçbir izolatta rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında ülkemizde farklı kaynaklardan izole edilmiş CTX-M-15 pozitif *E. coli* izolatlarında *fosA3* geninin varlığının araştırıldığı ilk çalışma olma özelliğini barındırmaktadır. Daha önceki yıllarda yapılan çalışmalarda; *bla_{CTX-M-15}* genini taşıyan *E. coli* izolatlarının *fosA3* genini de taşıdıkları bulunmuştur. Örneğin; Xie ve ark. (2016) Çin'de satılan et örneklerinden izole edilen ve sefotaksime karşı dirençli 55 adet *E. coli* izolatının 12 tanesinde *fosA3* geninin pozitif olduğunu rapor etmişlerdir. Son yıllarda yapılan bir diğer çalışma ise; insan idrar örneklerinden izole edilen 465 adet GSBL pozitif *E. coli* izolatının %87,7'sinin fosfomisin antibiyotiğine karşı duyarlı bulmuşlardır (Cao ve ark. 2017). Aynı çalışmada, fosfomisine karşı dirençli bulunan 57 adet izolatın %89,5'inde *fosA3* geninin varlığı saptanırken, 55 izolatın da *bla_{CTX-M}* pozitif (*bla_{CTX-M-15}*; n=26, *bla_{CTX-M-14}*; n=22, *bla_{CTX-M-3}*; n=4 ve 3'ünde *bla_{CTX-M-123}*) olduğu saptanmıştır. Yapılan konjugasyon deneyleri sonucunda *bla_{CTX-M}* ve

fosA3 genlerinin birlikte taşındığı rapor edilmiştir ve sonuç olarak bu genlerin aynı konjugatif plazmitler üzerinde taşındığı sonucuna ulaşılmıştır (Cao ve ark. 2017).

Literatürde farklı kaynaklardan (gıda, hayvansal, klinik ve su) elde edilen GSBL pozitif *E. coli* izolatlarının plazmit replikon tiplerini ve bu genlerin mobilizasyonlarına ilişkin pek çok çalışma olmasına rağmen, ülkemizde bu yönde yapılmış çalışmalar çok sınırlıdır. Bu bağlamda, farklı kaynaklardan elde edilen *bla*_{CTX-M-15} genine sahip *E. coli* izolatlarının replikon tipleri ülkemizde ilk defa çalışılmıştır. Çalışmamızda incelediğimiz suşlarda Inc plazmid replikon grubuna ait 12 replikon türü (FIA, FIB, FIBKN, FII, X1, A/C, U, N, HI2, I2, I1 α ve I1 γ) bulunmuştur. Çalışmada beş adet izolatın ise hiçbir plazmid replikon tipini içermediği görülmüştür. Tez çalışmasındaki sonuçlara benzer olarak, Lyimo ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada da su kaynaklarından izole edilen 31 adet *E. coli* izolatlarında bulunan Inc plazmid replikon grubuna ait N, HI2, FIB ve FIA replikon tiplerinin *bla*_{CTX-M-15} genleri ile bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalarda *bla*_{CTX-M-15} geninin genel olarak konjugative plazmitler aracılığı ile taşındığı ortaya konmuş olsa da, az oranda bu genin kromozomal olduğu rapor edilmiştir (Gönüllü ve ark. 2008, Carattoli 2009, Carattoli 2011, Zhao ve Hu 2013). Dolayısı ile bu plazmid rastlanmayan izolatlarda da dirence aracılık eden genin kromozomal olması ihtimali bulunmaktadır. Bu çalışmada maddi imkanlar dahilinde plazmit replikon tipleri sadece PZR ile belirlenebilmiş, fakat *bla*_{CTX-M-15} geninin konjugasyon yolu ile aktarılıp aktarılamadığı ve aktarılıyor ise bunda rol oynayan plazmitlerin genetik yapılarının aydınlatılması yapılamamıştır. Ancak elde edilen PZR sonuçlarının detaylı incelemesinde suşların elde edildiği kaynağa bağlı olarak replikon tiplerinin varlığı açısından bazı anlamlı farklılıkların olduğu bulunmuştur.

Yurtdışında yapılan çalışmalarda GSBL genlerinin taşınmasında 50 kb ve 200 kb aralığındaki büyüklükte pek çok plazmitin sorumlu olduğu bildirilmiştir. Bunlar arasında IncF, N, N2, I1, HI2, L/M, A/C, K, X4 ve U bulunmaktadır (Carattoli 2013, Carattoli 2011). GSBL türüne göre değişmekle birlikte Enterobacteriacealar içerisinde en fazla IncF plazmidlerinin varlığı rapor edilmiştir. Örneğin; Coque ve ark. (2008) ve Partridge ve ark. (2011) yaptıkları çalışmalarda CTX-M-15'in yayılımında IncFII plazmidinin büyük rol oynadığını rapor etmişlerdir. Baraniak ve ark. (2002) yaptıkları çalışmada CTX-M-3'ün Polonya ve Doğu Avrupa ülkelerinde daha çok IncN plazmidleri tarafından yayıldığını

göstermişlerdir. CTX-M-65'in Çin'de yayılımında ise F33:a-b- tip plazmidin rol oynadığı rapor edilmiştir (Deng ve ark. 2011). İspanya ve İngiltere'de yapılan çalışmalarda CTX-M-14'ün yayılımında ise IncK plazmidinin rol oynadığı bulunmuştur (Valverde ve ark. 2009, Cottell ve ark. 2011, Dhanji ve ark. 2012, Stokes ve ark. 2012). Agyekum ve ark. (2016) klinik örneklerden izole ettikleri GSBL üreten *E. coli* izolatlarında *bla*_{CTX-M-15} geninin çoğunlukla (n=18) IncFII/FIA/FIB çoklu replikon plazmidi üzerinde, iki adet izolatta FIA/FIB plazmidi üzerinde ve bir adet izolatta da FIA plazmidi üzerinde lokalize olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada FII/FIA/FIB replikon tipleri su ve klinikten soyutlanan izolatlarda diğer örneklere oranla daha fazla bulunmuştur. FII replikon tipine tüm kaynaklardaki izolatlarda rastlanılmasına rağmen çiğ süt ve sürk peyniri örneklerinde istatistiksel olarak daha az gözlenmiştir. Zurfluh ve ark. (2015) yaptıkları bir çalışmada; bir gölden toplanan ve *bla*_{CTX-M-15} genini barındıran 81 *E. coli* izolatının 32 tanesinin bu geni konjugasyon yoluyla transfer edilebildiğini rapor etmişlerdir. Aynı çalışmada; genin transferinde rol oynayan plazmidler arasında en sık rastlanan replikon tiplerinin IncF tipi plazmitler olduğu (n=12), bunu I1 (n=8), K (n=3) ve R (n=1) plazmitlerinin takip ettiğini bildirmişlerdir. Lyimo ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada ise; su kaynaklarından izole edilen 31 adet *E. coli* izolatında Inc plazmid replikon grubuna ait 11 tip (I1, FIC, P, FIIA, A / C, FIB, FIA, HI2, K / B, B / O ve N) tanımlanmış N, HI2, FIB ve FIA replikon tiplerinin *bla*_{CTX-M-15} genleri ile bağlantılı olduğunu belirtmişlerdir. Aynı çalışma içerisinde, izolatların %49'unda en sık rastlanan IncF tipi (FIA, FIB, FIC ve FIIA) plazmid replikonlarını saptamışlardır. Su ve klinik örneklere ilaveten, Kuzey Kenya'da yapılan bir çalışmada; köpeklerden izole edilen ve *bla*_{CTX-M-15} genini barındıran izolatlarda IncFII plazmidi baskın olarak bulunmuştur (Albrechtova ve ark. 2012). Ancak, Almanya'da sığırlardan elde edilen ve GSBL üreten *E. coli* izolatlarında *bla*_{CTX-M-15} geninin IncI1 ile ilişkili olduğu rapor edilmiştir (Rodriguez ve ark. 2014). Bu tez çalışmasında IncI1, HI1, X1 plazmid replikon tipine az sayıda izolatta rastlanılmış olsa da, K, P, Y, FIC ve R replikon tiplerine rastlanılmamıştır. Son olarak, çiğ süt ve sürk peynirinden elde edilen izolatlarda ise FIB KN replikon tipinin varlığı gözlenmiştir, bu replikon tipine diğer kaynaklarda rastlanılmamıştır.

6. SONUÇ

CTX-M-15 üreten *E. coli*'lerin son yıllarda farklı kaynaklardan, özellikle de klinik örneklerden, sıklıkla rapor ediliyor olması ile, bu GSBL tipini kodlayan genlerin bulunduğu konjugatif plazmidler arasında bir ilişki olduğu bulunmuştur. Sonuç olarak; toplam 41 adet GSBL üreten *bla*_{CTX-M-15} pozitif *E. coli* izolatının barındırdıkları plazmid replikon tipleri belirlenmiştir. Plazmid replikon tipleri incelendiğinde izolatların çoğunluğunda birden fazla plazmid replikon tipinin var olduğu görülmüştür. Kaynaklarına göre plazmit replikon tiplerinin varlığı ayrıca değerlendirildiğinde plazmid replikon tipleri ve kaynaklar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların bulunduğu görülmüş olup, ülkemizde insan klinik vakalarına hayvansal gıda örneklerinden bulaşın önemli derecede olmadığı spekülasyonu çalışma sonucuna göre yapılabilir.

7. KAYNAKLAR

1. **Abbas G.**, Khan I., Mohsin M., ur-Rahman S., Younas T. ve ark. High rates of CTX-M group-1 extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* from pets and their owners in Faisalabad, Pakistan. *Infection and Drug Resistance*, **2019**, s. 12:571.
2. **Adenipekun EO.**, Jackson CR., Ramadan H., Iwalokun BA., Frye JG. ve ark. Plasmid replicons and β -Lactamase-encoding genes of multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from humans and food animals in Lagos, Southwest Nigeria. *Microbial Drug Resistance*, **2019**, s. 25(10):1410-1423.
3. **Agyekum A.**, Fajardo-Lubián A., Ansong D., Partridge SR., Agbenyega T., ve ark. *bla*_{CTX-M-15} carried by IncF-type plasmids is the dominant ESBL gene in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a hospital in Ghana. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **2016**, s. 84(4):328-333.
4. **Ahmed AM.**, Motoi Y., Sato M., Maruyama A., Watanabe H., ve ark. Zoo animals as a reservoir of gram negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. *Applied and Environmental Microbiology*, **2007**, s. 73:6686–6690.
5. **Albrechtova K.**, Dolejska M., Cizek A., Tausova D., Klimes J. ve ark. Dogs of nomadic pastoralists in northern Kenya are reservoirs of plasmid-mediated cephalosporin- and quinolone-resistant *Escherichia coli*, including pandemic clone B2-O25-ST131. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **2012**, s. 56(7):4013–7.
6. **Ambler RP.** The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B Biological Sciences*, **1980**, s. 289:321–31.
7. **Arpin C.**, Quentin C., Grobost F., Cambau E., Robert J. ve ark. Nationwide survey of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2009**, s. 63(6):1205–1214.
8. **Azap OK.**, Arslan H. ve Şerefhanoglu K. Risk factors for extended-spectrum β -lactamase positivity in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from community-acquired urinary tract infections. *Clinical Microbiology and Infection*, **2010**, s.16(2):147-51.
9. **Bauernfeind A.**, Casellas JM., Goldberg M., Holley M., Jungwirth R. ve ark. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella* Typhimurium. *Infection*, **1992**, s. 20(3):158–63.
10. **Barthélémy M.**, Péduzzi J., Bernard H., Tancrede C. ve Labia R. Close amino acid sequence relationship between the new plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase MEN-1 and chromosomally encoded enzymes of *Klebsiella oxytoca*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1992**, s. 1122(1):15-22.
11. **Bauernfeind A.**, Stemplinger I., Jungwirth R., Ernst S. ve Casellas JM. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1996**, s. 40(2):509-513.
12. **Bahçe GY.**, Toyran A. ve Aksoy A. Gram negatif basillerin PhoenixTM FX sistemi ile pozitif sinyal veren kan kültürü şişelerinden direkt tanımlanması ve antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **2019**, s. 53(2):119-133.
13. **Baraniak A.**, Fiett J., Sulikowska A., Hryniewicz W., ve Gniadkowski M. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family Enterobacteriaceae in Poland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2002**, s. 46(1), 151-159.
14. **Barguigua A.**, El Otmani F., Talmi M., Bourjilat F., Haouzane F. ve ark. Characterization of extended- spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the community in Morocco. *Journal of Medical Microbiology*, **2011**, s. 60:1344–1352.
15. **Bentley R.** ve Meganathan R. Biosynthesis of vitamin K (Menaquinone) in bacteria. *Microbiological Reviews*, **1982**, s. 46(3):241.
16. **Ben Yahia H.**, Ben Sallem R., Tayh G., Klibi N., Ben Amor I. ve ark. Detection of CTX-M-15 harboring *Escherichia coli* isolated from wild birds in Tunisia. *BMC Microbiology*, **2018**, s. 18(1):26.
17. **Bonnet R.** Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2004**, s. 48(1):1–14.
18. **Bush K.** ve Jacoby JA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2010**, s. 54(3):969-976.

19. **Bush K.**, Jacoby GA. ve Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1995**, s. 39(6):1211-33.
20. **Castellani A.** ve Chalmers AJ. *Manuel of Tropical Medicine*. 3rd Ed., Williams Wood and Co., New York, **1919**.
21. **Carattoli A.**, Bertini A., Villa L., Falbo V., Hopkins KL. ve ark. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, **2005**, s. 63(3):219-228.
22. **Carattoli A.** Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2009**, s. 53(6): 2227-2238.
23. **Carattoli A.** Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *International Journal of Medical Microbiology*, **2011**, s. 301(8):654-658.
24. **Carattoli A.** Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, **2013**, s. 303(6-7):298–304.
25. **Cao XL.**, Shen H., Xu YY., Xu XJ., Zhang ZF. ve ark. High prevalence of fosfomycin resistance gene *fosA3* in *bla*_{CTX-M}-harbouring *Escherichia coli* from urine in a Chinese tertiary hospital during 2010–2014. *Epidemiology & Infection*, **2017**, s. 145(4):818–824.
26. **Cantón R.**, Novais A., Valverde A., Machado E., Peixe L. ve ark. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, **2008**, s. 14:144-153.
27. **Chen J.** ve Griffiths MW. PCR differentiation of *Escherichia coli* from other Gram-negative bacteria using primers derived from the nucleotide sequences flanking the gene encoding the universal stress protein. *Letters in Applied Microbiology*, **1998**, s. 27(6):369-371.
28. **Chong Y.**, Ito Y. ve Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*, **2011**, s. 11(7):1499-1504.
29. **Chen J.**, ve Griffiths MW. Cloning and sequencing of the gene encoding universal stress protein from *Escherichia coli* O157: H7 isolated from Jack-in-a-Box outbreak. *Letters in Applied Microbiology*, **1999**, s. 29(2):103-107.
30. **Clermont O.**, Stephane B. ve Edouard B. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, **2000**, s. 66(10):4555-4558.
31. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Eighteenth informational supplement, Wayne, PA, **2015**, Document M100-S18.
32. **Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th Ed. CLSI, Wayne, PA, **2018**, CLSI supplement M100.
33. **Cornista JC.**, Cuna AMD., Sanchez HJA. ve Balolong MP. Detection of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Four Provincial Hospitals in Luzon and genotyping of β -Lactamase (*bla* CTX-M, *bla* TEM, *bla* SHV, and *bla* OXA-1) genes. *Philippine Journal of Science*, **2019**, s. 148(2):277-287.
34. **Coque TM.**, Novais A., Carattoli A., Poirel L., Pitout J. ve ark. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. *Emerging Infectious Diseases*, **2008**, s. 14(2):195–200.
35. **Couturier M.**, Bex F., Bergquist PL. ve Maas WK. Identification and classification of bacterial plasmids. *Microbiological Reviews*, **1988**, s. 52(3):375.
36. **Cottell JL.**, Webber MA., Coldham NG., Taylor DL., Cerdeño-Tárraga AM., ve ark. Complete sequence and molecular epidemiology of IncK epidemic plasmid encoding *bla*CTX-M-14. *Emerging Infectious Diseases*, **2011**, s. 17(4):645.
37. **D'Andrea MM.**, Arena F., Pallecchi L. ve Rossolini GM. CTX-M-type beta-lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, **2013**, s. 303(6-7):305–317.
38. **Dahmen S.**, Haenni M., Chátre P. ve Madec JY. Characterization of *bla*_{CTX-M} IncFII plasmids and clones of *Escherichia coli* from pets in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2013**, s. 68(12):2797–2801.
39. **Damborg P.**, Morsing MK., Petersen T., Bortolaia V. ve Guardabassi L. CTX-M-1 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* in dog faeces from public gardens. *Acta Veterinaria Scandinavica*, **2015**, s. 57(1):83.

40. **Day MJ.**, Rodríguez I., van Essen-Zandbergen A., Dierikx C., Kadlec K. ve ark. Diversity of STs, plasmids and ESBL genes among *Escherichia coli* from humans, animals and food in Germany, the Netherlands and the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2016**, s. 71(5):1178–1182.
41. **Day MJ.**, Hopkins KL., Wareham DW., Toleman MA., Elviss N. ve ark. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and foodchain-derived samples from England, Wales, and Scotland: an epidemiological surveillance and typing study. *The Lancet Infectious Diseases*, **2019**, s. 19(12):1325-1335.
42. **Deng Y.**, He L., Chen S., Zheng H., Zeng Z., ve ark. F33: A–: B– and F2: A–: B– plasmids mediate dissemination of rmtB-*bla*_{CTX-M-9} group genes and rmtB-qepA in Enterobacteriaceae isolates from pets in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2011**, s. 55(10):4926-4929.
43. **Dhanji H.**, Khan P., Cottell JL., Piddock LJ., Zhang J., ve ark. Dissemination of pCT-like IncK plasmids harbouring CTX-M-14 ESBL among clinical *Escherichia coli* in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2012**, s. 56(6): 3376–3377.
44. **Durmaz R.**, Otlu A., Çalışkan A. ve Gürsoy N.: *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella* türlerinin moleküler tiplendirilmesinde kullanılabilir kısa süreli "pulsed field gel" elektroforez (PFGE) protokolü. *ANKEM Dergisi*, **2007**, s. 21(2):113-117.
45. **Durmaz R.**, Otlu B., Koksall F., Hosoglu S., Ozturk R. ve ark. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Japanese Journal of Infectious Disease*, **2009**, s. 62(5):372-7.
46. **Ensor VM.**, Shahid M., Evans JT. ve Hawkey PM. Occurrence, prevalence and genetic environment of CTX-M β -lactamases in Enterobacteriaceae from Indian hospitals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2006**, s. 58(6):1260–3.
47. **Essack SY.** The development of β -lactam antibiotics in response to the evolution of β -lactamases. *Pharmaceutical Research*, **2001**, s. 18(10):1391-1399.
48. **Garcia-Fernandez A.**, Fortini D., Veldman K., Mevius D. ve Carattoli A. Characterization of plasmids harbouring qnrS1, qnrB2 and qnrB19 genes in *Salmonella*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2008**, s. 63(2):274-81.
49. **Garcia-Fernandez A.**, Villa L., Carta C., Venditti C., Giordano A. ve ark. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/ OmpK35 porin variants. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, **2012**, s. 56(4):2143-2145.
50. **Georgopapadakou NH.** Penicillin-binding proteins and bacterial resistance to beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1993**, s. 37(10):2045–53.
51. **Giedraitienė A.**, Vitkauskienė A., Pavilionis A., Patamsytė V., Genel N. ve ark. Prevalence of O25b-ST131 clone among *Escherichia coli* strains producing CTX-M-15, CTX-M-14 and CTX-M-92 β -lactamases. *Infectious Diseases*, **2017**, s. 49(2):106–112.
52. **Gönüllü N.**, Aktaş Z., Bal Kayacan Ç., Salcioğlu M., Carattoli A. ve ark. Dissemination of CTX-M-15 β -lactamase genes carried on Inc FI and FII plasmids among clinical isolates of *Escherichia coli* in a university hospital in Istanbul, Turkey. *Journal of Clinical Microbiology*, **2008**, s. 46(3):1110-1112.
53. **Gupta S.**, Abhishek, Shrivastava S. ve Verma AK. Isolation, identification, molecular characterization and antibiogram of *E. coli* isolates from neonatal calves. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, **2019**, s. 8(6):1996-2007.
54. **Gür D.**, Gülay Z., Akan ÖA., Aktaş Z., Kayacan ÇB. ve ark. Türkiye’de hastane izolatu Gram negatif bakterilerde yeni beta laktam antibiyotiklere direnç ve GSBL tipleri: Çok merkezli Hitit sürveyansının sonuçları. *Mikrobiyoloji Bülteni*, **2008**, s. 42:537-544.
55. **Hall BG. ve Barlow M.** Revised Ambler classification of β -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2005**, s. 55(6):1050-1051.
56. **Harris PNA.** Clinical management of infections caused by Enterobacteriaceae that express extended-spectrum β -lactamase and AmpC enzymes. *Seminars Respiratory and Critical Care Medicine*, **2015**, s. 36:56–73.
57. **Hazirolan G.**, Mumcuoglu I., Altan G., Özmen BB., Aksu N. ve ark. Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in a Turkish Community. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, **2018**, s. 21(1):81-86.
58. **Hou J.**, Huang X., Deng Y., He L., Yang T. ve ark. Dissemination of the fosfomycin resistance gene *fosA3* with CTX-M β -Lactamase genes and rmtB carried on IncFII plasmids among *Escherichia coli* isolates from pets in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2012**, s. 56(4):2135–2138.

59. **Jackson CR.**, Davis JA., Frye JG., Barrett JB. ve Hiott LM. Diversity of plasmids and antimicrobial resistance genes in multidrug-resistant *Escherichia coli* isolated from healthy companion animals. *Zoonoses and Public Health*, **2015**, s. 62(6):479–488.
60. **Kaper JB.**, Nataro JP. ve Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, **2004**, s. 2(2):123–140.
61. **Kanamori H.**, Parobek CM., Juliano J., Johnson JR., Johnston BD. ve ark. Genomic analysis of multidrug-resistant *Escherichia coli* from North Carolina community hospitals: ongoing circulation of CTX-M-producing ST131-H30Rx and ST131-H30R1 strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2017**, s. 61(8):e00912-17.
62. **Kelly J.**, Dideberg O., Charlier P., Wery J., Libert M. ve ark. On the origin of bacterial resistance to penicillin: comparison of a beta-lactamase and a penicillin target. *Science*, **1986**, s. 231(4744):1429–1431.
63. **Knothe H.**, Shah P., Krcmery V., Antal M. and Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftaxime, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, **1983**, s. 11:315–317.
64. **Kürekcı C.**, Arkadaş M. ve Avşar YK. Occurrence, genetic characterization and antimicrobial resistance of extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* isolated from Sürk samples, a traditional turkish cheese. *Journal of Food Measurement and Characterization*, **2016**, s. 10(3):709–714.
65. **Kürekcı C.**, Aydın M., Yipel M., Katouli M. ve Gündoğdu A. Characterization of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Asi (Orontes) River in Turkey. *Journal of Water and Health*, **2017**, s. 15(5):788-798.
66. **Kürekcı C.**, Osek J., Aydın M., Tekeli İO., Kurpas M. ve ark. Evaluation of bulk tank raw milk and raw chicken meat samples as source of ESBL producing *Escherichia coli* in Turkey: Recent insights. *Journal of Food Safety*, **2019**, s. 39(2):e12605.
67. **Lehmann KB.** *Methods of Practical Hygiene*, vol. 1. Kegan Paul, Trench, Trübner & Co. Ltd., London, **1893**, s. 131.
68. **Leverstein-van Hall MA.**, Fluit AC., Paauw A., Box AT., Brisse S. ve ark. Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* *Journal of Clinical Microbiology*, **2002**, s. 40(10):3703-3711.
69. **Lewis JS.**, Herrera M., Wickes B., Patterson JE. ve Jorgensen JH. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a US health care system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, s. 51(11):4015-4021.
70. **Livermore DM.** Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Review*, **1995**, s. 8(4):557-584.
71. **Livermore DM.** ve Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends in Microbiology*, **2006**, s. 14(9):413–20.
72. **Livermore DM.** Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clinical Microbiology and Infection*, **2008**, s. 14:3–10.
73. **Lyimo B.**, Buza J., Subbiah M., Temba S., Kipasika H. ve ark. IncF plasmids are commonly carried by antibiotic resistant *Escherichia coli* isolated from drinking water sources in northern Tanzania. *International Journal of Microbiology*, **2016**, s. 2016:3103672.
74. **Massova I.** ve Mobashery S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1998**, s. 42(1):1–17.
75. **Mengelöglü FZ.**, Taş T., Koçoğlu E., ve Bucak Ö. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* izolatlarında tigesiklin duyarlılığının belirlenmesi. *Abant Tıp Dergisi*, **2013**, s. 2(2):87-90.
76. **Michael GB.**, Freitag C., Wendlandt S., Eidam C., Feßler AT. ve ark. Emerging issues in antimicrobial resistance of bacteria from food-producing animals. *Future Microbiology*, **2015**, s. 10(3): 427-443.
77. **Michael GB.**, Kapar H., Siqueira AK., de Freitas Costa E., Corbellini LG. ve ark. Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolates collected from diseased food-producing animals in the GERM-Vet monitoring program 2008–2014. *Veterinary Microbiology*, **2017**, s. 200:142–150.
78. **Müller A.**, Stephan R., ve Nüesch-Inderbilen M. Distribution of virulence factors in ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from the environment, livestock, food and humans. *Science of the Total Environment*, **2016**, s. 541:667–672.

79. Naas T., Poirel L. ve Nordmann P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, **2008**, s. 14(1):42–52.
80. Nicolas-Chanoine MH., Jarlier V., Robert J., Arlet G., Drieux L. ve ark. Patient's origin and lifestyle associated with CTX-M-producing *Escherichia coli*: a case-control-control study. *PLoS One*, **2012**, s. 7(1):e30498.
81. Novais A., Canton R., Moreira R., Peixe L., Baquero F. ve ark. Emergence and dissemination of Enterobacteriaceae isolates producing CTX-M-1-like enzymes in Spain are associated with IncFII (CTX-M-15) and broad-host-range (CTX-M-1, -3, and -32) plasmids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2007**, s. 51(2):796-9.
82. Orskov F., Genus 1. *Escherichia* Castellani and Chalmers 1919, 941^{AL}, in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1 (eds N. R. Krieg and J.G. Holt). Williams & Wilkins, Baltimore, **1984**, s. 420-423.
83. Oteo J., Orden B., Bautista V., Cuevas O., Arroyo M. ve ark. CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2009**, s. 64(4):712–717.
84. Page MI. The mechanisms of reactions of beta-lactam antibiotics. *Accounts of Chemical Research*, **1984**, s. 17(4):144–151.
85. Paterson DL. ve Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, **2005**, s. 18(4):657–686.
86. Partridge SR., Zong Z., ve Iredell JR. Recombination in IS26 and Tn2 in the evolution of multiresistance regions carrying blaCTX-M-15 on conjugative IncF plasmids from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2011**, s. 55(11):4971-4978.
87. Perez F., Endimiani A., Hujer KM. ve Bonomo RA. The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol*, **2007**, s. 7:459–69.
88. Pitout JD., Nordmann P., Laupland KB., ve Poirel L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2005**, s. 56(1):52-59.
89. Pitout JD. ve Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, **2008**, s. 8(3):159–166.
90. Pitout JD. Infections with extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: Changing epidemiology and drug treatment choices. *Drugs*, **2010**, s. 70(3):313–33.
91. Pitout JD. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: an update on antimicrobial resistance, laboratory diagnosis and treatment. *Expert Review Anti Infective Therapy*, **2012**, s. 10(10): 1165-76.
92. Po KHL., Chan EWC. ve Chen S. Functional characterization of CTX-M-14 and CTX-M-15 β -lactamases by in vitro DNA shuffling. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2017**, s. 61(12):e00891-17.
93. Poole K. Efflux-mediated multiresistance in Gram negative bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, **2004**, s. 10(1):12-26.
94. Reid G., Howard J., ve Gan BS. Can bacterial interference prevent infection. *Trends in Microbiology*, **2001**, s. 9(9):424-428.
95. Reuland EA., Overdeest ITMA., Al Naiemi N., Kalpoe JS., Rijnsburger MC. ve ark. High prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae carriage in Dutch community patients with gastrointestinal complaints. *Clinical Microbiology and Infection*, **2013**, s. 19(6): 542-549.
96. Rice LB., Sahm D. ve Bonomo RA. *Mechanism of resistance to antibacterial agents*. In: Murray PR., Baron EJ., Jorgensen JH., Tenover FC., Tenover FC. (Eds.). *Manual of Clinical Microbiology*. 8th Ed. Washington: ASM Press, **2003**, s.1074-1104.
97. Rodríguez I., Thomas K., Van Essen A., Schink A. K., Day M., ve ark. Chromosomal location of blaCTX-M genes in clinical isolates of *Escherichia coli* from Germany, The Netherlands and the UK. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2014**, s. 43(6):553-557.
98. Rupp ME. ve Paul D. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae. *Drugs*, **2003**, s. 63(4):353–56.
99. Shaikh S., Fatima J., Shakil S., Rizvi SMD. ve Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta lactamases: types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*, **2015**, s. 22(1):90-101.
100. Stokes MO., Cottell JL., Piddock LJV., Wu G., Wootton M., ve ark. Detection and characterization of pCT-like plasmid vectors for bla CTX-M-14 in *Escherichia coli* isolates from humans, turkeys and cattle in England and Wales. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2012**, s. 67(7):1639-1644.

- 101. Tipper DJ.** ve Strominger JL. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **1965**, s. 54(4):1133–1141.
- 102. Tutun H.**, Karagöz A., Altıntaş L. ve Koçak N. Determination of antibiotic susceptibility, ESBL genes and pulsed-field gel electrophoresis profiles of extended-spectrum β -lactamase-containing *Escherichia coli* isolates. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **2019**, s. 66(4):407-416.
- 103. Türe M.** ve Altınok İ. Pulsed-Field Jel Elektroferez (PFGE) metodu ve akuatik organizmalarda kullanımı. *Eğirdir Su Ürünleri Fakültesi Dergisi*, **2013**, s. 9(1):44-54.
- 104. Upadhyay S.**, Hussain A., Mishra S., Maurya AP., Bhattacharjee A. ve ark. Genetic environment of plasmid mediated CTX-M-15 extended spectrum beta lactamases from clinical and food borne bacteria in North-Eastern India. *PLoS One*, **2015**, s. 10(9):e0138056.
- 105. van Hoek AHAM.**, Schouls L., van Santen MG., Florijn A., de Greeff SC. ve ark. Molecular characteristics of extended-spectrum cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae from humans in the community. *PloS One*, **2015**, s. 10(6):e0129085.
- 106. Valverde A.**, Cantón R., Garcillán-Barcia MP., Novais Â., Galán JC., ve ark. Spread of blaCTX-M-14 is driven mainly by IncK plasmids disseminated among *Escherichia coli* phylogroups A, B1, and D in Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2009**, s. 53(12):5204-5212.
- 107. Villa L.**, García-Fernández A., Fortini D. ve Carattoli A. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2010**, s. 65(12):2518–2529.
- 108. Villa L.**, Poirel L., Nordmann P., Carta C. ve Carattoli A. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the bla_{NDM-1}, bla_{CTX-M-15} and qnrB1 genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2012**, s. 67(7):1645-1650.
- 109. WHO:** Global Salm- Surv, Laboratory protocols, Level 5 training course, pulsed field gel electrophoresis for *Salmonella*. **2005**.
- 110. Wilson GS.** ve Miles AA. *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, vol. 1, 5th edn. Edward Arnold, London, **1964**, s. 806-826.
- 111. Woodford N.**, Carattoli A., Karisik E., Underwood A., Ellington MJ. ve ark. Complete nucleotide sequences of plasmids pEK204, pEK499, and pEK516, encoding CTX-M enzymes in three major *Escherichia coli* lineages from the United Kingdom, all belonging to the international O25:H4-ST131 clone. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2009**, s. 53(10):4472-4482.
- 112. Xie M.**, Lin D., Chen K., Chen EWC., Yao W. ve ark. Molecular characterization of *Escherichia coli* strains isolated from retail meat that harbor bla_{CTX-M} and fosA3 genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2016**, s. 60(4):2450-2455.
- 113. Yu WL.**, Chuang YC. ve Rasmussen JW. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **2006**, s. 39(4):264-77.
- 114. Zhao WH.**, ve Hu ZQ. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, **2013**, s. 39(1):79-101.
- 115. Zhang PLC.**, Shen X., Chalmers G., Reid-Smith RJ., Slavic D. ve ark. Prevalence and mechanisms of extended-spectrum cephalosporin resistance in clinical and fecal Enterobacteriaceae isolates from dogs in Ontario, Canada. *Veterinary Microbiology*, **2018**, s. 213:82-88.
- 116. Zurfluh K.**, Glier M., Hächler H. ve Stephan R. Replicon typing of plasmids carrying bla_{CTX-M-15} among Enterobacteriaceae isolated at the environment, livestock and human interface. *Science of the Total Environment*, **2015**, s. 521:75–78.

ÖZGEÇMİŞ

1 Kasım 1990 tarihinde Hatay'ın Antakya ilçesinde doğdu. İlk, orta ve lise eğitimini Hatay'da tamamladıktan sonra 2009 yılında Malatya İnönü Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünü kazandı ve 2014 yılında mezun oldu. 2017 yılında Hatay Mustafa Kemal Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji (Tıp) Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı.

