



**T.C.
SIVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**İNSANLARIN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASINDA BULUNAN
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEK
ESCHERICHIA COLI İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZ ENZİM
VE KLON TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

MURAT ARSLAN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

SİVAS-2022

İÇ KAPAK

T.C.

SİVAS CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**İNSANLARIN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASINDA BULUNAN
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEEN
ESCHERICHIA COLI İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZ ENZİM
VE KLON TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

MURAT ARSLAN

DOKTORA TEZİ

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

PROF. DR. A. YASEMİN ÖZTOP

SİVAS-2022

ONAY

“İnsanların bağırsak mikrobiyotasında bulunan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* izolatlarında beta-laktamaz enzim ve klon tiplerinin araştırılması” adlı **Doktora** Tezi, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna uygun olarak hazırlanmış ve jürimiz tarafından Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Mikrobiyoloji** Ana Bilim Dalında **Doktora** tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan

Prof. Dr. Ömer POYRAZ

Üye

Prof. Dr. Serpil DEĞERLİ

Üye

Prof. Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN

Üye

Prof. Dr. Mehmet PARLAK

Üye (Danışman)

Prof. Dr. A. Yasemin ÖZTOP

ONAY

Bu tez çalışması, Tarihinde Enstitü Yönetim Kurulu tarafından belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özlem Pelin CAN
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MÜDÜRÜ

YÖNERGE

Bu tez, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Senatosu'nun 18.02.2015 tarihli ve 4/4 sayılı kararı ile kabul edilen Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Yazım Kılavuzuna göre hazırlanmıştır.

Bu alışma, Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından T-851 no’lu proje olarak desteklenmiştir.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim sürecinde ve çalışmanın her anında bilgi ve desteğini esirgemeyen, şu an bulunduğum seviyeye gelmemde büyük emekleri bulunan kıymetli hocam ve danışmanım Prof.Dr. A. Yasemin ÖZTOP'a,

Tez izleme komitemde yer alan ve tez çalışmam süresince desteklerini her zaman hissettiren hocalarım Prof.Dr. Ömer POYRAZ ve Prof.Dr. Serpil DEĞERLİ'ye,

Çalışmamın deneysel kısımlarında bana laboratuvarlarını açan, bilgi ve tecrübeleriyle hep destek olan hocalarım Doç.Dr. Ertan Mahir KORKMAZ ve Doç.Dr. Mahir BUDAK'a,

Laboratuvar sürecini ve biyoinformatik analizleri öğrenerek ve eğlenerek tamamlamamı sağlayan EBRG laboratuvar ekibine,

Laboratuvar çalışmalarım boyunca ilgi ve destek gösteren Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı çalışanlarına,

Tezimi T-851 nolu doktora tez projesi olarak destekleyen Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (CÜBAP)'ne,

Her anımda olduğu gibi bu çalışmayı yaparken de yanımda yürüyen ve hep destek olan hayat arkadaşım Burçin ARSLAN'a ve hayatımıza anlam katan oğullarımız Alperen ve Alptuğ'a,

ve beni yetiştiren ve bugünlere gelmemde büyük emekleri olan kıymetli annem Sultan ARSLAN ve babam Medet ARSLAN'a,

En içten teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

İNSANLARIN BAĞIRSAK MİKROBİYOTASINDA BULUNAN GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEK ESCHERICHIA COLI İZOLATLARINDA BETA-LAKTAMAZ ENZİM VE KLON TİPLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Murat ARSLAN

Doktora Tezi

Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Yasemin ÖZTOP

2022, 105 sayfa

Bu çalışmada, insanların bağırsak mikrobiyotasındaki genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* suşlarının izole edilmesi, izolatların antibiyotiklere duyarlılıkları, GSBL gen tipleri, klonal ilişkilerinin araştırılması ve *E.coli* ST131 klonunun belirlenmesi amaçlandı.

Toplam 50 gönüllü katılımcının dışkı örneklerinden üretilen GSBL pozitif izolatlar çalışmaya alındı. İzolatlar konvansiyonel yöntemler ve MALDI-TOFF MS (matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) ile tanımlandı. GSBL üretimi kombine disk yöntemiyle doğrulandı. Antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemiyle yapıldı ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) kriterlerine göre değerlendirildi. İzolatların klonal ilişkileri enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC PCR) ile belirlendi. Bazı beta laktamaz genleri (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB}, *bla*_{GES}) ve *E.coli* ST131 klonu PCR yöntemiyle araştırıldı. Ayrıca, 10 izolat multilocus sequence typing (MLST) ile tiplendirildi.

Bu çalışmada GSBL üreten *E.coli* fekal taşıyıcılık oranı %31,05 (161'de 50) olarak bulundu. GSBL üreten izolatların ampiciline, seftazidime, sefotaksime, seftriaksona, amoksisilin-klavulanik asite, aztreonama, sefepime, trimetoprim/sulfametoksazole, piperasilin tazobaktama, sefoksitine, siprofloksasine, gentamisine, amikasin, ertapeneme direnç oranları sırasıyla, %100, %94, %92, %82, %78, %76, %68, %58, %42, %40, %38, %14, %6, %4'dü. İzolatların tümü imipeneme ve meropeneme duyarlı bulundu. PCR sonuçlarına göre TEM %82 ile en yaygın beta-laktamaz enzimi olurken, bunu %68 ile CTX-M ve %10 ile OXA enzimi izledi. ERIC PCR profillerine göre 50 izolat 30 kümeye ayrıldı. Toplam 50 izolatın 5'inin PCR ile ST131 klonundan olduğu bulundu ve bu izolatlar MLST analiziyle de ST131 olarak saptandı. Ayrıca MLST analizi yapılan diğer 5 suşun sekans tipleri ST10, ST34, ST349, ST6834 ve ST8712 olarak belirlendi.

Bu alışmada GSBL reten *E.coli* taşıyıcılık oranının yüksek olduğu, izolatların klonal çeşitliliğe sahip olduğu ve ST131 pandemik klonunun bulunduğu gösterildi.

Anahtar Kelimeler: bağırsak mikrobiyotası, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) reten *E.coli*, *E.coli* ST131, MLST, ERIC PCR.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF BETA-LACTAMASE ENZYME AND CLONE TYPES AMONG THE EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE PRODUCING ESCHERICHIA COLI ISOLATES FOUND IN HUMAN GUT MICROBIOTA

Murat ARSLAN

Ph.D. Thesis

Department of Medical Microbiology

Supervisor: Prof. Dr. A. Yasemin ÖZTOP,

2022, 105 pages

In this study, it was aimed to isolate extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E.coli* strains in the human gut microbiota and to investigate their antimicrobial resistance pattern, some ESBL gene types, clonal relatedness and the presence of *E.coli* ST131.

ESBL positive isolates produced from fecal samples of 50 volunteer participants were included in the study. Isolates were identified by conventional methods and matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOFF MS). ESBL production was confirmed by the combined disk method. Antibiotic susceptibility tests were performed using the disc diffusion method and interpreted using European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) criteria. The clonal relationships of the isolates were determined by enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC PCR). Some beta-lactamase genes (*bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*, *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{GES}*) and ST131 *E.coli* clone were investigated by PCR method. In addition, 10 isolates were typed with multilocus sequence typing (MLST).

The prevalence of fecal carriage was found as 31.05 % (50 of 161) in this study. The resistance rates of ESBL-producing *E.coli* isolates to ampicillin, ceftazidime, cefotaxime, ceftriaxone, amoxicillin-clavulanic acid, aztreonam, cefepime, trimethoprim/sulfamethoxazole, piperacillin tazobactam, ceftazidime, ciprofloxacin, gentamicin, amikacin were 100%, 94%, 92%, 82%, 78%, 76%, 68%, 58%, 42%, 40%, 38%, 14%, 6%, and 4%, respectively. All isolates were found to be susceptible to imipenem and meropenem. According to PCR results, while TEM was the most prevalent beta-lactamase enzyme 82%, followed by CTX-M 68% and OXA 10%. The 50 isolates were divided into 30 clusters according to ERIC PCR patterns. It was determined that 5 of the isolates (10 %) belonged to ST131 clone by PCR method. These five isolates were identified as ST131 clone by MLST analyzes, too. In addition, the sequence types

of the other 5 strains analyzed by MLST were determined as ST10, ST34, ST349, ST6834 and ST8712.

In this study, it was shown that ESBL-producing *E.coli* carriage rates were high, that the isolates had clonal diversity and that ST131 pandemic clone was found.

Keywords: intestinal microbiota, extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E.coli*, *E.coli* ST131, MLST, ERIC-PCR

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	i
ONAY.....	ii
YÖNERGE	iii
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	viii
TABLolar DİZİNİ.....	xiii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xv
KISALTMALAR DİZİNİ	xvii
1.GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. <i>Escherichia coli</i> Tarihçe ve Taksonomi	4
2.2. <i>E. coli</i> 'nin Morfolojik Özellikleri	4
2.3. <i>E. coli</i> 'nin Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri.....	4
2.4. <i>E.coli</i> 'nin Antijenik ve Filogenetik Özellikleri	5
2.5. <i>E.coli</i> 'nin Epidemiyolojik Özellikleri	5
2.6. <i>E.coli</i> 'nin Yaptığı Hastalıklar	6
2.6.1. ETEC	7
2.6.2. EPEC	7
2.6.3. EAEC.....	7
2.6.4. EHEC.....	7
2.6.5. EIEC	8
2.7. Korunma, Tedavi ve Kontrol.....	8
2.8. Beta Laktamazlar	8
2.9. Beta Laktamazların Sınıflandırılması.....	9
2.10. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar	10
2.10.1. TEM Tipi Beta Laktamazlar	11
2.10.2. SHV Tipi Beta Laktamazlar	11
2.10.3. CTX-M Tipi Beta Laktamazlar	11
2.10.4. OXA Tipi Beta Laktamazlar	12
2.10.5. PER Tipi Beta Laktamazlar.....	12
2.10.6. VEB Tipi Beta Laktamazlar	13
2.10.7. GES Tipi Beta Laktamazlar	13
2.11. <i>E.coli</i> ST131	13
2.12. ERIC PCR.....	14

2.13. MLST	15
3. GEREÇ ve YÖNTEM	16
3.1. Araç, Gereç ve Malzemeler	16
3.2. Kullanılan besiyerleri	17
3.3. Kullanılan çözeltiler	18
3.4. Yöntem	18
3.4.1. Çalışmaya Alınan Bireyler	18
3.4.2. GSBL Pozitif <i>E.coli</i> İzolasyonu ve Tanımlanması	18
3.4.3. İzolatların GSBL Üretiminin Fenotipik Yöntemle Doğrulanması	19
3.4.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	19
3.4.5. DNA İzolasyonu	20
3.4.6. İzolatların Moleküler Yöntemle <i>E.coli</i> Olarak Tanımlanması	20
3.4.7. GSBL Direnç Genlerinin Belirlenmesi	22
3.4.8. İzolatların Klonal İlişkilerinin ERIC PCR Yöntemiyle Araştırılması	24
3.4.9. İzolatlarda ST131 Klonunun PCR ile Araştırılması	25
3.4.10. Agaroz Jel Elektroforezi	27
3.4.11. MLST Yöntemi	27
3.4.12. Verilerin Değerlendirilmesi	30
4. BULGULAR	31
4.1. GSBL pozitif <i>E.coli</i> İzolatlarının Tanımlanması	31
4.2. Kombinasyon Disk Testi Sonucu	32
4.3. GSBL Pozitif <i>E.coli</i> Taşıyan Bireylerin Özellikleri	32
4.4. GSBL Pozitif <i>E.coli</i> İzolatlarının Antibiyotiklere Direnç Durumları	33
4.5. İzolatlarda Beta Laktamaz Genlerine Yönelik Multipleks PCR Sonuçları	36
4.6. GSBL Pozitif <i>E.coli</i> İzolatlarının ERIC PCR ile Klonal İlişkilerinin Araştırılması	38
4.7. <i>E.coli</i> ST131 PCR Sonuçları	43
4.7.1. <i>pabBspe</i> Genine Yönelik ST131 PCR Sonuçları	43
4.7.2. 19. Bölgeyi Hedef Alan ST131 PCR Sonuçları	43
4.8. MLST Sonuçları	45
4.9. İzolatlara Ait ST131 PCR ve MLST Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi	48
4.10. İzolatların Antibiyotiklere Dirençleri, Enzim Tipleri, ERIC Kümeleri ve MLST Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi	57
5. TARTIŞMA	59
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	69
7. KAYNAKLAR	70
8. EKLER	84

9. İZİNLER.....	85
10. ÖZGEÇMİŞ.....	87

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo no	Tablo adı	Sayfa
Tablo 1	<i>uidA</i> gen bölgesine yönelik PCR primer dizileri	21
Tablo 2	<i>uidA</i> geni için hazırlanan PCR karışımının içeriği	21
Tablo 3	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> ve <i>bla_{OXA}</i> genlerine yönelik PCR primer dizileri	22
Tablo 4	<i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> ve <i>bla_{OXA}</i> genleri için hazırlanan multipleks PCR karışımının içeriği	22
Tablo 5	<i>bla_{PER}</i> , <i>bla_{VEB}</i> , <i>bla_{GES}</i> genlerine yönelik PCR primer dizileri	23
Tablo 6	<i>bla_{PER}</i> , <i>bla_{VEB}</i> , <i>bla_{GES}</i> genlerine yönelik multipleks PCR karışımının içeriği	23
Tablo 7	ERIC1 ve ERIC2 primer dizileri	24
Tablo 8	ERIC PCR karışımının içeriği	24
Tablo 9	<i>pabBspe</i> genine yönelik yapılan PCR primer dizileri	25
Tablo 10	<i>pabBspe</i> genlerine yönelik PCR karışımının içeriği	26
Tablo 11	19. bölgeyi hedef alan ST131 PCR primer dizileri	26
Tablo 12	19. bölgeye yönelik ST131 PCR karışımının içeriği	27
Tablo 13	MLST analizinde yer alan 7 genin PCR primer dizileri	28
Tablo 14	MLST analizinde yer alan 7 gene yönelik PCR karışımının içeriği	29
Tablo 15	Dışkı örneklerinden GSBL pozitif ve negatif <i>E.coli</i> üretilen bireylerin özellikleri	33
Tablo 16	GSBL üreten <i>E.coli</i> izolatlarının antibiyogram sonuçları	34
Tablo 17	GSBL üreten <i>E.coli</i> izolatlarının antibiyotiklere direnç oranları	36

Tablo 18	GSBL üreten <i>E.coli</i> izolatlarının GSBL direnç genlerinin oranları	38
Tablo 19	İzolatların ERIC PCR kümeleri, GSBL enzim grupları, antibiyotiklere direnç profilleri	42
Tablo 20	İzolatların 7 gen bölgesine ait allel numaraları ve sekans tipleri	57
Tablo 21	MLST analizi yapılan izolatların direnç profilleri, ERIC kümeleri, GSBL enzim grupları	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil no	Şekil adı	Sayfa
Şekil 1	GSBL pozitif <i>E.coli</i> izolatlarına ait (50 izolat) <i>uidA</i> PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri	31
Şekil 2	1-50. izolatların <i>uidA</i> primeri ile yapılan PCR deneyinin agaroz jel elektroforezi fotoğrafları	32
Şekil 3	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA} , <i>bla</i> _{SHV} GSBL genlerine yönelik multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü	37
Şekil 4	İzolatların ERIC PCR bant profilleri	39
Şekil 5	ERIC PCR bant patternlerinden elde edilen dendogram	40
Şekil 6	ERIC PCR bant patternlerine göre belirlenen izolatlar arasındaki benzerlik oranlarını gösteren dendogram	41
Şekil 7	İzolatların <i>pabBspe</i> genine yönelik ST131 PCR jel görüntüleri	44
Şekil 8	İzolatların 19. bölgeye yönelik yapılan ST131 PCR deneyinin agaroz jel elektroforezi görüntüsü	45
Şekil 9	<i>adk</i> (765 bç) genine yönelik yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	45
Şekil 10	<i>fumC</i> (805 bç) genine yönelik yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	46
Şekil 11	<i>gyrB</i> (919 bç) genine yönelik yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	46
Şekil 12	<i>icd</i> (877 bç) genine yönelik yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	46
Şekil 13	<i>mdh</i> (853 bç) genine yönelik yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	47
Şekil 14	<i>purA</i> (844 bç) genine yönelik yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	47
Şekil 15	<i>recA</i> (733 bç) genine yönelik yapılan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez görüntüsü	47
Şekil 16	İzolatların <i>adk</i> geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen <i>adk</i> allel numaralarına ait ekran görüntüsü	49
Şekil 17	İzolatların <i>fumC</i> geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen <i>adk</i> allel numaralarına ait ekran görüntüsü	50

Şekil 18	İzolatların <i>gyrB</i> geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen <i>adk</i> allel numaralarına ait ekran görüntüsü	51
Şekil 19	İzolatların <i>icd</i> geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen <i>adk</i> allel numaralarına ait ekran görüntüsü	52
Şekil 20	İzolatların <i>mdh</i> geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen <i>adk</i> allel numaralarına ait ekran görüntüsü	53
Şekil 21	İzolatların <i>purA</i> geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen <i>adk</i> allel numaralarına ait ekran görüntüsü	54
Şekil 22	İzolatların <i>recA</i> geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen <i>adk</i> allel numaralarına ait ekran görüntüsü	55
Şekil 23	İzolatların allel numaraları ile belirlenen sekans tiplerini gösteren ekran görüntüsü	56

KISALTMALAR DİZİNİ

GSBL:	Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
ST	Sekans tipi
MALDI-TOFF MS	Matriks destekli lazer dezorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanlı
kütle spektrometrisi	
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi
MLST	Çoklu lokus sekans tipleme
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
ERIC	Enterobakteriyel Tekrarlayan İntergenik Konsensus
PFGE	Darbeleri alan jel elektroforezi
ExPEC	Ekstraintestinal patojen <i>Escherichia coli</i>
DNA	Deoksiribonükleik asit
TAE	Tris asetik asit EDTA
dNTP	Dideoksi nükleotid trifosfat
MgCl₂	Magnezyum klorür
Primer F	İleri yönlü primer
Primer R	Geri yönlü primer
AM	Ampisilin
FOX	Sefoksitin
CRO	Seftriakson
CAZ	Seftazidim
CTX	Sefotaksim
FEP	Sefepim
ATM	Aztreonam
ETP	Ertapenem
IMP	İmipenem
MEM	Meropenem
AMC	Amoksisilin-klavulanik asit
TPZ	Piperasilin-tazobaktam
AM	Amikasin
CN	Gentamisin
CIP	Siprofloksasin
SXT	Trimetoprim-sülfametoksazol

1.GİRİŞ

GSBL enzimleri, aktif bölgelerinde serin bulunan, seftriakson, sefpirom ve sefepim gibi oksiminosefalosporinleri hidrolize edebilen, ve genellikle klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri ile inhibe olan beta-laktamazlardır. GSBL üreten suşlar sefamisin ve karbapenemlere duyarlıdırlar (Dağlar & Öngüt, 2012). *Enterobacteriaceae* ailesindeki bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı dirençli olmalarına neden olan direnç mekanizmalarından birisi GSBL enzimleri üretmeleridir. (Peirano & Pitout, 2019).

İlk GSBL enzimi 1980'li yılların başlarında Atina'da bulunmuş olan TEM enzimidir. TEM-1 ve SHV-1 enzimlerinin aminoasit dizilimini kodlayan genlerdeki değişimlerle oksimino sefalosporinlere dirençli enzim türevleri ortaya çıkmıştır. Günümüzde 450'nin üzerinde farklı yapıda GSBL varyantı beta-laktamaz enzimi saptanmıştır. Geniş spektrumlu beta laktamaz üreten Gram-negatif bakterilerin yayılması küresel bir tehdit olarak kabul edilmektedir (Aires-de-Sousa et al., 2019). GSBL üreten izolatlar ilk başlarda hastane kaynaklı enfeksiyonlardan izole edilmekteyken, son yıllarda toplum kaynaklı enfeksiyon etkenleri olarak da görülmeye başlamışlardır. GSBL'ler bazı bakterilerin kromozomlarında bulunan genler tarafından eksprese edilmekle birlikte, genellikle sonradan kazanılan plazmidler üzerindeki genler tarafından oluşturulurlar (Görgeç et al., 2015). GSBL enzimlerinin en yaygın olarak saptananları; SHV, TEM, CTX-M, PER, VEB, GES ve OXA tipi beta laktamazlardır (Castanheira et al., 2021).

Bağırsak mikrobiyotası, insanlar, hayvanlar ve böceklerin sindirim kanallarında yaşayan karmaşık bir mikroorganizma topluluğudur. İnsanlardaki bağırsak mikrobiyotası doğumdan hemen sonra sindirim sistemde kolonize olan bakteri, virüs ve bazı ökaryotlar dahil çok fazla sayıda ve türde mikroorganizmadan oluşur. Bağırsak mikrobiyotasında, yaklaşık 50'den fazla filum, 1500 tür vardır (Gomaa, 2020). *E. coli*, bağırsak florasının önemli bir üyesidir ve gram negatif, fakültatif anaerop bir basildir. İnsanlarda kendini sınırlayan hafif seyirli gastroenteritten, böbrek yetmezliği, septik şoka neden olabilen ağır seyirli bağırsak enfeksiyonları ve üriner system, kan dolaşımı enfeksiyonları gibi bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olabilir. Bakterinin adezinleri, ekzotoksinleri, demir yakalama sistemleri, beta laktamaz enzimleri gibi çeşitli virülans faktörleri, konak savunmasından kaçmasına ve antibiyotiklere karşı dirençli olmalarına katkıda bulunur. GSBL enzimleri *E.coli* izolatlarının önemli virülans faktörlerinden biridir (Vila et al., 2016).

Son yıllarda çoklu ilaca dirençli ve özellikle GSBL üreten *E.coli* izolatlarının neden olduğu enfeksiyonların sayısı artmıştır. Çeşitli çalışmalarda epidemik plazmidler tarafından

kodlanan GSBL enzim tiplerinden en sık, TEM-4, TEM-24, TEM-52, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-3, CTX-M-15 ve CTX-M-32 enzimleri saptanmıştır (Coque et al., 2008). Özellikle CTX-M taşıyan bakterilerin prevalansındaki artış, pandemi tehlikesi olarak ifade edilmektedir. Bu enzim tipine sahip izolatlardaki insersiyon dizileri, integronlar transpozonlar gibi hareketli genetik elemanlarla, GSBL genleri bakteriler arasında yayılabilmektedir. Özellikle CTX-M-15 geni taşıyan bakterilerle dünya çapında hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda görülen artış endişe verici bir durum olarak nitelendirilmiştir. Bakteriler arasında plazmid ve integron aracılı yayılım özelliği gösteren GSBL genleri, nozokomiyal patojenlerin direnç oranlarını tehlikeli boyutlara varacak düzeyde artırmıştır. Tüm dünya, bu konu ile ilgili gerekli epidemiyolojik araştırmaların yapılması ve uygun kontrol önlemlerinin alınması konusunda uyarılmış durumdadır (Görgeç et al., 2015).

Gastrointestinal sistemin GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyeleri ile kolonizasyonu, bu bakterilerle enfeksiyonların epidemiyolojisinde ve klinik öneminde anahtar rol oynar. Bağırsakta GSBL üreten bakteri kolonizasyonu horizontal bulaş ve endojen enfeksiyonlar için kaynak oluşturur. Bu bakterilerle enfekte olmuş birçok insanda bağırsak kolonizasyonu olduğu gösterilmiştir. Örneğin yapılan birçok çalışmada, üriner sistem enfeksiyonlarından izole edilen GSBL pozitif izolatların kaynağının sıklıkla hastanın gastrointestinal sistemi olduğu bildirilmiştir. Dünyada sağlıklı kişilerdeki çoklu dirençli GSBL *E.coli* bağırsak taşıyıcılığının prevalansı yüksektir ve yükselmeye devam etmektedir. Çoklu antibiyotik dirençli GSBL üreten *E.coli* bağırsak taşıyıcılığının, çok önemli klinik ve halk sağlığı etkileri bulunmaktadır. Sağlıklı taşıyıcılarda, yaşamlarının herhangi bir döneminde ciddi üriner, intraabdominal veya kan dolaşımı enfeksiyonları gelişebilir. Enfeksiyonların mortalite oranı genellikle yüksektir (Çakır Erdoğan et al., 2017).

E.coli'lerde kazanılmış direnç genlerinin potansiyel kaynaklarını izlemek, farklı kaynaklar arasında dolaşan antimikrobiyal dirençli bakterilerin ortak klonlarını tanımlamak için moleküler yöntemler kullanılır. Bu yöntemlerden bakterilerin biri olan tüm genomunu dizileme yöntemi tercih edilen yöntem olsa da, her zaman kullanılamamaktadır. MLST yöntemiyle bakteri toplulukları arasında filogenetik akrabalık araştırılabilir ve klon tipleri belirlenebilir. MLST yöntemi bağırsak dışı enfeksiyon etkeni olan *E.coli* izolatlarını tiplendirmek için de kullanılır. ST131 olarak tanımlanan *E.coli*'lerin ve *E.coli* izolatlarının klon tiplerini belirlemek için moleküler tiplendirme araçlarından, PFGE ve MLST yaygın olarak kullanılmaktadır. PFGE'nin yüksek ayırım gücüne sahip olduğu bilinmekte ve *E.coli* alt tiplemesinde altın standart olarak kabul edilmekteyken, MLST ile, hem ulusal hem de uluslararası düzeyde yayılım gösteren klonlar izlenebilmektedir (Ramadan et al., 2020). Son yıllarda MLST yöntemi kullanılarak

yapılan tiplendirme çalışmalarında, yüksek riskli pandemik bir klon olarak tanımlanan *E.coli* ST131 klonunun GSBL ürettiği, başta florokinolonlar olmak üzere çeşitli antibiyotiklere karşı dirençli oldukları bildirilmiştir. ST131 *E.coli* klonundaki izolatların, çoğunlukla CTX-M tipi beta-laktamaz enzimi ürettikleri, çoklu ilaç direncine sahip oldukları saptanmış ve enfeksiyonlarında tedaviye yanıtızlık görülmüştür (Grge et al., 2015, izmecici et al., 2018).

İnsan ve hayvanların bağırsaklarındaki *E.coli*'ler ilaç direncinin ortaya çıkması ve yayılması hakkında ipuçları veren gösterge olarak kabul edilir. Bir toplumdaki antibiyotiklere dirençli kommensal *E.coli*'lerin oranı, antibiyotik kullanımına bağlı oluşan seçici etki ve patojenlerdeki gelişebilecek direnci öngörmek için yararlı bir gstrege olarak kabul edilir. Daha nce Sivas yöresinde GSBL üreten toplum kaynaklı *E.coli* izolatlarının oranı, beta-laktamaz enzim ve klon tipini araştıran bir çalışma olmadığı gibi, yurdumuzda da bu konuda yapılan araştırma sayısı azdır. Çalışmamızda bağırsak florasında GSBL reten *E.coli* bulunduran bireylerin oranı, izolatların GSBL enzim tipleri, klonal ilişkileri ve *E.coli* ST131 klonunun varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Escherichia coli* Tarihçe ve Taksonomi

Alman mikrobiyolog ve çocuk doktoru Theodor Escherich 1884'te bebek bağırsağında bulunan mikroorganizmaların sindirim üzerine etkileri ve hastalıkları konularında çalışmaya başladı. Bu çalışma sırasında, *Bacterium coli commune* adını verdiği, günümüzde *Escherichia coli* olarak adlandırılan bir bakteriyi tanımladı. 1940'lara gelindiğinde, *E.coli* birçok temel çalışmada model mikroorganizma olarak kullanılmaya başlandı ve 1950'lerde moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte en çok çalışılan mikroorganizma haline geldi. Genetik kod, transkripsiyon, translasyon ve replikasyon dahil olmak üzere yaşamın en temel yönlerinin araştırıldığı çalışmalarda kullanıldı (Blount, 2015). Bakteri, kolay bulunabilir ve çalışılabilir özellikleri nedeniyle biyoloji alanındaki çalışmaların vazgeçilmezi haline geldi. Mikrobiyoloji eğitim laboratuvarlarında ve mikrobiyologlar için model organizma olarak çeşitli çalışmaların konusu oldu (Blount, 2015, Bronfenbrenner & Korb, 1925, Werkman, 1927, Daegelen et al., 2009). *E.coli* suşlarının başlangıçta patojenik olmadığı, kommensal bir mikroorganizma olduğu düşünüldü. Fakat 1940'larda ishal salgınlarından izole edildi. Benzer salgınlar başka ülkelerde de görüldü ve izole edilen *E.coli*'ler enteropatojenik *E.coli* olarak adlandırıldı.

E.coli'nin taksonomisi şu şekildedir;

Domain: *Bacteria*

Phylum: *Proteobacteria*

Class: *Gammaproteobacteria*

Order: *Enterobacteriales*

Family: *Enterobacteriaceae*

Genus: *Escherichia*

Species: *Escherichia coli* (Church et al., 2017)

2.2. *E. coli*'nin Morfolojik Özellikleri

E.coli, yaklaşık 2-6 µm boyunda, 1-1,5 µm eninde spor oluşturmeyen, hareketli Gram negatif bir basildir. Bazı suşlarında kapsül yapısı vardır. Birçok *E.coli* suşunda tip 1 pili, bazı suşlarda P pili ve demet oluşturan pili bulunur. Tip 1 piliyle bakteri epitel hücrelerine, P piliyle böbrek hücreleri ve P kan grubu hücrelerine bağlanır (US Dürdal A. & Başustaoğlu A., 2019).

2.3. *E. coli*'nin Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri

E.coli rutin besiyerlerinde kolaylıkla üreyen fakültatif anaerop bir bakteridir. Üreme sıcaklığı 10-40°C, optimum 37°C, optimum pH'sı 7'dir. Koyun kanlı agarda 1-3 mm çapında grimsi beyaz koloniler oluşturur. EMB agarda 2-3 mm çapında yeşilimsi metalik renkli koloniler oluşturarak ürer. Mac Conkey agarda kolonileri 2-3 mm çapında pembe renklidir. *E.coli* suşları laktozu, glukozu, trehalozu, ksilozu, fermente eder. Oksidaz negatif, katalaz pozitifdir. Metil

kırmızısı testi pozitif, Voges-Proskauer testi negatiftir. Triptofandan indol üretir, sitratı kullanmaz, H₂S oluşturmaz, DNaz, üreaz, fenilalanil deaminaz üretmez. Karbonhidratları fermente etme yeteneklerinin saptanmasında üç şekerli demirli agar (TSI) veya kligler demirli agar (KIA) besi yerleri kullanılır (Murray et al., 2016, Church et al., 2017).

2.4. *E.coli*'nin Antijenik ve Filogenetik Özellikleri

E.coli'lerin O, H ve bazı suşların K antijenleri vardır. O antijeni bakterinin dış membranındaki lipopolisakkarit yapısının polisakkarit bölümüdür. H, kirpik antijeni ve K, kapsül antijenidir. Kirpik antijeni protein yapısında, K antijeni polisakkarit yapısındadır. *E.coli* bulundurduğu O, H veya K antijenlerini gösteren harflerin yanında antijen tiplerini gösteren sayıların yazılmasıyla oluşan formülle adlandırılır. Kommensal ve patojenik *E.coli* suşları, çeşitli fenotipik ve genotipik varyantlar sergiler. O ve H antijenlerinin kombinasyonuna dayalı olarak 700'den fazla *E.coli* serotipi tanımlanmıştır (Jang et al., 2017). *E.coli*'nin meydana getirdiği bağırsak enfeksiyonuna beş alt tipten biri neden olur ve bu alt tipler O ve H antijenlerine göre tanımlanırlar (Mueller & Taitner, 2022).

Filogenetik analizler, *E.coli* suşlarının dört ana filogenetik gruba (A, B1, B2 ve D) ayrıldığını ve virülan ekstraintestinal suşların esas olarak grup B2'ye ve daha az oranda, D grubuna ait olduğunu göstermiştir. Kommensal suşların çoğu, A grubunda bulunur (Clermont et al., 2000). Son zamanlarda, *E. coli* filogenetik gruplaması, MLST ve genom sekans verilerine dayanarak, büyük filogenetik gruplara göre nispeten nadir olan yeni C, E, F ve *Escherichia* grup I gruplarını içerecek şekilde sekiz filogrup olarak revize edilmiştir (Clermont et al., 2013).

2.5. *E.coli*'nin Epidemiyolojik Özellikleri

E.coli genetik mühendisliği ve endüstriyel mikrobiyolojideki farklı çalışmalar için model organizma olarak kabul edilmiştir. Üretral ve intravasküler kateterler, protez eklem ve şant, protez greftler gibi çeşitli tıbbi cihazlarla ilişkili enfeksiyonlardan sorumlu olan belirli *E.coli* suşları vardır (Sharma et al., 2016). Çoğu *E.coli* suşunun kolonda zararsız bir şekilde yaşamasına ve sağlıklı bireylerde nadiren hastalığa neden olmasına rağmen, bir dizi patojenik *E.coli* suşu, hem sağlıklı hem de immün sistemi bozulmuş bireylerde bağırsak ve bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Gomes et al., 2016).

E.coli, insanlarda ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olabildiğinden mikrobiyolojik dünyada özel yeri olan bir bakteridir (Poirel et al., 2018). İshalli hastalıklar ciddi bir halk sağlığı problemidir ve bebeklerde ile küçük çocuklarda önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. Afrika, Asya ve Latin Amerika'daki düşük ve orta gelirli ülkeler, çoğunlukla yetersiz temiz su kaynakları, yetersiz çevresel hijyen ve sanitasyon ile yetersiz

eğitim gibi kötü yaşam koşulları nedeniyle ölümcül sonuçlarla daha sık ortaya çıkan ishalli hastalıklardan en çok etkilenen bölgelerdir. *E.coli* suşları, ishalin etiyolojik etkenleri arasında en önemlilerinden biridir. (Gomes et al., 2016). Ayrıca *E.coli*, kadınların genital yolunda sık bulunur, vajinal ve/veya endoservikal kolonizasyona neden olduğu gibi, gebe kadınlarda intraamniyotik ve lohusalık enfeksiyonu, erken ve geç neonatal sepsis de neden olur (Vila et al., 2016).

E.coli'nin içme ve kullanma sularının mikrobiyolojik analizinde izole edilmesi sulara dışkı bulaştığını gösterir. Bu nedenle analizler için indikatör bir bakteri olarak kullanılır. Ek olarak, bazı *E.coli* serotiplerinin insanlarda hastalıklarına yol açması nedeniyle, bu bakterinin ekolojisinin anlaşılması, bu patojenin gıdaya, toprağa ve suya yayılmasının önlenmesi için önemlidir (Jang et al., 2017). Genetik özellikleri ve klinik özellikleri açısından *E.coli* suşları kommensal *E.coli*'ler (bağırsak florası üyeleri), bağırsak patojeni *E.coli*'ler (enterik suşlar) ve ekstraintestinal patojenik *E.coli*'ler (ExPEC) olarak kategorize edilebilirler. İdrar yolu, kan dolaşımı, merkezi sinir sistemi, solunum yolu ve periton enfeksiyonlarından izole edilen izolatların çoğunun, benzer virülans profilleri ve filogenetik özellikleriyle, kommensal ve intestinal patojenik *E.coli*'lerden oldukça farklı oldukları gösterilmiştir. Son zamanlarda, bu *E.coli* suşlarının üropatojenik *E.coli*, sepsisle ilişkili *E.coli*, neonatal menenjit ile ilişkili *E.coli*, olarak adlandırılmaktansa, konak savunmasını yenerek insanlarda ve hayvanlarda birçok anatomik bölgede hastalığa neden olabilmeleri nedeniyle ExPEC olarak adlandırılmaları önerilmiştir. Moleküler epidemiyolojik analizlerle, ExPEC'in diğer *E.coli*'lerden farklı patojenik özellikleri olduğu saptanmış, bu ekstraintestinal patojen grubunun ekolojisi, evrimi, rezervuarları, bulaşma yolları, konak-patojen etkileşimleri, ve virülans mekanizmaları hakkında öngörü elde edilmiştir (Johnson & Russo, 2005). ExPEC suşları dünyanın her yerinde yaygınlaşmakta ve enfeksiyonlara yol açmaktadır. Antibiyotiklere çoklu dirençlidirler. ExPEC enfeksiyonlarının çoğu çok genç ve yaşlılarda, kanserli veya HIV gibi immun sistemi baskılanmış kişilerde görülmektedir. Ayrıca, hastane ve toplum kaynaklı enfeksiyonlarda önde gelen etkenlerdir. (Dvora Biran and Elora Z. Ron, 2018).

2.6. *E.coli*'nin Yaptığı Hastalıklar

E.coli klinik örneklerden en sık izole edilen bir bakteridir (Church et al., 2017). *E. coli* suşları başlıca idrar yolu enfeksiyonu, menenjit, kan dolaşımı ve bağırsak enfeksiyonlarına neden olurlar. Sepsisli hastalardan en sık izole edilen gram negatif basil olduğu görülmektedir. Bununla birlikte toplum kaynaklı idrar yolu enfeksiyonlarının % 80'den fazlasından ve hastane kaynaklı enfeksiyonların da çoğundan sorumlu oldukları bilinmektedir. Gastrointestinal kanalda bulunan *E.coli*'ler bağırsak perforasyonu sonucu periton boşluğuna geçerek

enfeksiyona da neden olabilirler. Gastroenterite neden olan beş *E.coli* suşu; enterotoksijenik (ETEC), enteropatojenik (EPEC), enteroagregatif (EAEC), enterohemorajik (EHEC) ve enteroinvazif (EIEC) *E.coli* olarak adlandırılmaktadır (Murray et al., 2016).

2.6.1. ETEC

Enterotoksijenik *E.coli*, gelişmekte olan ülkelerde, yeterli sanitasyonun olmadığı alanlarda, 2 yaşın altındaki çocuklarda ve bu ülkelere seyahat edenlerde turist ishaline neden olur. Kontamine yiyecek ve suların tüketilmesiyle bulaşır. Sağlıklı bir insanda hastalığa neden olmak için yaklaşık 10^8 CFU/mL organizmanın yutulması gerekir. (Mueller & Taitner, 2022). ETEC suşları ince bağırsakların proksimal bölgesindeki epitel hücrelerinin mikrovillusundaki özel reseptörlere fimbriaları ile bağlanarak yerleşirler. LT ve ST enterotoksinleri salarak, bağırsak boşluğuna bol miktarda sıvı-elektrolit geçmesine ve sulu ishale neden olurlar (US Dürdal A. & Başustaoğlu A., 2019).

2.6.2. EPEC

Enteropatojenik *E.coli* suşları genellikle gelişmekte olan ülkelerde bir yaşımdan küçük bebeklerde ateş, kusma, mukuslu kansız sulu diyareye neden olur ve salgınlara yol açabilirler. Bakteriler ince bağırsak enterositlerine demet oluşturan piliyle bağlanır ve mikrokoloniler oluşturur. Hücrelerde mikrovillus kaybı, morfolojide değişimler ve lezyonlara meydan gelir (US Dürdal A. & Başustaoğlu A., 2019).

2.6.3. EAEC

Enteroagregatif *E.coli*, önceleri gelişmekte olan ülkelerde ve buralara seyahat eden kişilerde akut ve kronik sulu ishal etkeniyken, çeşitli ülkelerde daha fazla etken olarak saptanmaktadır. Bakteri agregatif aderans piliyle bağırsak mukozasına yapışır, kalın bir mukus bakteri biyofilmi oluşur. Shiga toksini kazanmış suşların kanlı ishal ve hemolitik üremik sendroma (HÜS) neden olduğu saptanmıştır (US Dürdal A. & Başustaoğlu A., 2019).

2.6.4. EHEC

Enterohemorajik *E.coli* O157:H7 serotipi kolon hücrelerinde lezyonlara ve shiga toksiniyle kanlı ishale yol açar. Ayrıca HÜS'e neden olur. Kontamine ürünlerin (örneğin ıspanak, marul, meyve) ve az pişmiş sığır etinin, çiğ süt tüketilmesinden sonra büyük ishal salgınlara neden olmuştur. Gelişmiş ülkelerde daha çok rastlanır. EHEC, işleme sırasında kontamine olabilen kıymada yaygın olarak bulunur. Mahsuller EHEC içeren gübre ile gübrelendiğinde sebzeler kirlenir ve bu mahsullerden su kaynaklarına geçerek kontamine edebilir. Enfekte eden bakteri dozu (10^2 CFU/mL). düşüktür. Çevreden insana ve insandan insana bulaşabilir. EHEC enfeksiyonları tüm yaş gruplarında yaygındır (US Dürdal A. & Başustaoğlu A., 2019).

2.6.5. EIEC

Enteroinvazif *E.coli*, shigelloz tablosuna benzeyen hafif seyirli bir enfeksiyona neden olur. Bakteri bağırsak hücrelerine invaze olur ve ülserler oluşur. Daha çok 5 yaşın altındaki çocuklarda hastalık görülür. Ateş, karın ağrısı, kanlı ve mukuslu ishal oluşturur. (Mueller Matthew, 2022).

2.7. Korunma, Tedavi ve Kontrol

Gastroenterite neden olan *E.coli* suşlarının hepsini tanımlayacak testlerin mevcut olmasına rağmen, çoğu olguda spesifik *E.coli* suşlarının tanımlanmasına gerek duyulmamaktadır. *E.coli* gastroenteriti olan çoğu hasta ishali tedavi olmaksızın atlatabilir ya da diğer bakteri türlerinin neden olduğu ishallerin tedavisi için kullanılan ampirik antibiyotiklerle tedavi edilebilir. Bu nedenle enterohemorajik *E.coli* (EHEC) dışında, diyarejenik *E.coli* tanısında serotipik ve fenotipik testler rutin olarak laboratuvarlarda kullanılmamaktadır. Yaygın enfeksiyon gelişmediği sürece, semptomatik olarak tedavi edilir. Antibiyotik tedavisinin gerekli olduğu durumlarda tedavi invitro duyarlılık testlerine göre yapılmalıdır (Church et al., 2017).

Kısıtlı antibiyotik kullanımından kaçınma, gereksiz üriner kateterizasyon yapılmaması gibi uygun enfeksiyon kontrol önlemleri alınarak hastane kaynaklı enfeksiyon riski azaltılabilir. Yüksek standartta hijyen koşullarının sağlanması gastroenterite neden olan suşların enfeksiyon riskini düşürür. Özellikle EHEC enfeksiyonu gibi gıdalarla bulaşan suşların kontrolünde et ürünlerinin iyi pişirilmesi gereklidir (Murray et al., 2016).

2.8. Beta Laktamazlar

Antibiyotik kullanımı, Paul Ehrlich'in sifilize neden olan bakteri *Treponema pallidum* (*T.pallidum*)'a karşı etkili olan arsfenamin adlı bir kimyasalı keşfettiği 20. yüzyılın başlarına kadar uzanmaktadır. Yirmi yıl sonra, 1928'de Alexander Fleming, *Penicillium notatum* (*P.notatum*) mantarından bir β -laktam antibiyotik olan penisilini izole etmiş ve antibiyotik çağı başlamıştır. Penisilinler, karbapenemler, monobaktamlar ve sefalosporinler gibi β -laktamlar, dünya çapında kullanılan tüm antibiyotiklerin %60'ını oluşturmaktadır ve insan enfeksiyonlarında en yaygın reçete edilen antibiyotik sınıflarından biridir (Bergšpica et al., 2020). Öbakterilerin dış zar tabakasında oluşan hücre duvarının ana bileşeni, peptit ve şekerden oluşan makromoleküler bir yapı olan peptidoglikandır. Bu peptidoglikan yapı, ozmotik basınca direnç sağlar ve hücre morfolojisini ve gücünü korur. Aynı zamanda β -laktam ilaçların hedefidir. β -laktamlar, bu yapının oluşumunu engelleyerek bakteri hücre bölünmesini (bakteriostatik etki) bastırır veya ozmotik basınca karşı bakteri yırtılmasını (bakterisidal aktivite) indükler. Peptidoglikan, N-asetilglukozamin (NAG) ve N-asetilmuramik asit

(NAM)'nin iki amino şekerinin değiştiği ve NAM'a bağlı uzunlamasına bir peptit zincirinin bir sütun oluşturduğu temel bir yapısal birime sahiptir. Bu peptit zinciri, L-alanin, γ -D-glutamik asit, L-lizin, D-alanin ve D-alanin kalıntılarının değişen D- ve L-formlarından oluşan bir pentapeptittir. Çapraz bağlanma sırasında, pentapeptitin karboksil terminalindeki D-alanin ilk önce hidroliz ile elimine edilir. Daha sonra, dördüncü D-alanin karboksil grubu ve komşu molekül ile aynı sütunlu yapıdaki lizinin bir ϵ -karboksil türevi olan üçüncü diaminopimelik asit, zincirin yatay takviyesi için bir triglisin peptid yapısı ile birleştirilir. Bu reaksiyonlara penisilin bağlayıcı protein (PBP) olarak bilinen bakteriyel enzim aracılık eder (Sawa et al., 2020). β -Laktam antibiyotikler bakterisidal etkilerini hücre duvarı sentezinde yer alan enzimleri (PBP) inhibe ederek gösterirler. Bakteri hücre duvarının bütünlüğü, serum, idrar, akciğer veya gastrointestinal sistemin mukus salgısı gibi hipertonic bir ortamda hücre şeklini korumak için esastır. Ozmotik stabilite, ardarda sıralanan NAM ve NAG birimlerinden oluşan sert bir hücre duvarı tarafından korunur. Bu glikozidik birimler, bir transglikosidaz ile bağlanır. Her NAM birimine bir pentapeptit eklenir; PBP'ler, iki D-alanin-D-alanin ile NAM pentapeptitinin çapraz bağlanmasını katalize etmek için transpeptidazlar olarak hareket eder. Bu bağlanma hücre duvarının sertliğini sağlar. Sonuç olarak, PBP'ler yanlışlıkla, hücre duvarı sentezi sırasında β -laktamı bir substrat yapı taşı olarak kullanırlar. Bu hata, enzimi daha fazla transpeptidasyon reaksiyonlarını katalize edemez hale getiren PBP'nin asilasyonu ile sonuçlanır. Hücre duvarı sentezi yavaşladıkça, amidazlar ve bakteriyel otolitik enzimlerin bir sonucu olarak yapıcı peptidoglikan otolizi devam eder. Bakteriyi çevreleyen peptidoglikan ağı olan murein keseciklerinin parçalanması, hücre duvarının bozulmasına ve geçirgenliğin artmasına yol açar. Bu şekilde, transpeptidasyonun β -laktam aracılı inhibisyonu hücre lizisine neden olur (Bonomo, 2017). Beta-laktamaz (β -laktamaz)'lar, çeşitli bakteride bulunan sınırlı bir moleküler yapı aralığına sahip çok yönlü enzimlerdir. Ortak yönleri, bir β -laktam halkası içeren kimyasal bileşikleri hidrolize etme kabiliyetidir. β -laktamazlar, Gram negatif bakterilerdeki β -laktam antibiyotikler için başlıca direnç belirleyicisi olan ve kökenleri milyonlarca yıl önceye uzanan eski enzimlerdir. β -laktamazlar en çok çalışılan enzim gruplarından biridir. En belirgin rolü β -laktam antibiyotikleri etkisiz hale getirmek olan bu enzimler, 1940'ların başından beri akademik laboratuvarlarda araştırmalara yn vermişlerdir. Etkili antibiyotikleri yok olmaktan kurtarmanın yollarını bulmaya çalışan çok sayıda farmasötik araştırma programına konu olmuşlardır (Bush, 2018).

2.9. Beta Laktamazların Sınıflandırılması

β -laktamaz enzimlerini sınıflandırmak için Ambler ve Bush-Jacoby-Medeiros sistemleri olmak üzere iki ana sınıflandırma şeması mevcuttur. Ambler A'dan D'ye kadar dört sınıfa ayırdığı β -

laktamazları kategorize etmek için amino asit dizi homolojisini kullanır. Bush–Jacoby-Medeiros sistem grupları ise 1-4 substrat hidroliz profillerine (penisilin, sefalosporin, geniş spektrumlu sefalosporin, karbapenem) ve inhibitör profiline (β -laktamaz inhibitörleri klavulanat ve tazobaktam tarafından inhibisyon) dayanır (Bonomo, 2017). β -laktamazlar arasındaki fonksiyonel benzerliklere (yani substrat ve inhibitör profili) dayanan Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırması, β -laktamazları 11 grupta sınıflandırır. Ambler sınıflandırmasında sınıf A, C ve D β -laktamazların aktif bölgelerinde serin amino asiti bulunur. Serin, esterlerin hidrolizini üstlenirken, B sınıfı β -laktamazların aktif bölgelerinde çinko iyonu/iyonları bulunur ve monobaktamlar hariç hemen hemen tüm β -laktam antibiyotiklerin hidrolizini katalize eder (Bergšpica et al., 2020).

2.10. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar

Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar (GSBL) oksimino- β -laktamlar (sefuroksim, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonam) da dahil olmak üzere penisilinler ve sefalosporinlerin çoğunu hidrolize eden, ancak sefamisinler ve karbapenemleri etkilemeyen aynı zamanda klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilen enzimlerdir (Chong et al., 2011, Kawamura et al., 2017). GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyeleri son zamanlarda büyük bir halk sağlığı tehdidi olarak ortaya çıkmıştır. Başlangıçta klinik örneklerden izole edilmişlerdir, ancak toplum kaynaklı enfeksiyonlarda da izole edilmektedirler. GSBL üreten bakteriler yüksek ölüm oranına, uzun süreli hastanede yatışa ve yüksek maliyetli tedavi gerektiren enfeksiyonlarla ilişkilidir. Tedavi seçenekleri sınırlıdır ve genellikle karbapenemler tedavide kullanılır (Karanika et al., 2016, H. Wilson & Török, 2018). Çoklu ilaca dirençli gram negatif basillerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisi için etkili ilaçların geliştirilmesi en önemli önceliktir (Yahav et al., 2021). Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), önemli dirençli patojenlere dikkat çekmek için yakın zamanda küresel öncelikli patojenler listesi yayınlamıştır. GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin 21. yüzyılda dünyanın en ciddi ve kritik tehditleri arasında olduğunu belirtmiştir (Bergšpica et al., 2020). GSBL enzimleri genellikle gram negatif bakteri türlerinde aktarılabilir plazmidlere bağlı olarak üretildiğinden, GSBL genleri bu plazmidler aracılığı ile yatay olarak diğer bakteri türlerine aktarılabilir (Kawamura et al., 2017).

Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi (EUCAST) tarafından *Enterobacteriaceae* üyelerinde GSBL saptanması açısından önerilen strateji, öncelikle oksimino- sefalosporinlere “duyarlı olmama” özelliğinin saptanması ile başlamakta, bunu takiben fenotipik (bazen genotipik) doğrulama testleri uygulanmasıdır (Eucast 2022, 2022a). GSBL enzimleri amino asit dizilimlerine göre TEM, SHV, CTX-M, OXA, PER, VEB, GES,

TLA, BES ve SFO olmak üzere on aileye ayrılırlar. *Enterobacteriaceae* familyasının üyeleri arasında en yaygın olan GSBL'ler TEM, CTX-M ve SHV'dir (Bergšpica et al., 2020).

2.10.1. TEM Tipi Beta Laktamazlar

TEM tipi GSBL'ler, TEM-1 ve TEM-2'nin türevleridir. TEM-1 ilk olarak 1965 yılında Atina, Yunanistan'da Temoneira adlı bir hastadan alınan bir *Escherichia coli* izolatından rapor edilmiş ve dolayısıyla bu şekilde adlandırılmıştır. (Castanheira et al., 2021). TEM-1 aynı zamanda gram negatif bakterilerde en sık rastlanan GSBL tipidir. TEM-1 ampisilini karbenisilin, oksasilin veya sefalotinden daha yüksek oranda hidrolize edebilir ve geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı ihmal edilebilir aktiviteye sahiptir. Klavulanik asit tarafından inhibe edilir. TEM-2, TEM-1 ile aynı hidrolitik profile sahiptir, ancak daha aktif bir doğal promotora sahip olması ve izoelektrik noktasındaki fark ile TEM-1'den farklıdır. TEM-13 ayrıca TEM-1 ve TEM-2'ye benzer bir hidrolitik profile sahiptir (David L. Peterson & Bonomo, 2005). Tümü GSBL olmamasına rağmen yaklaşık 243 farklı TEM varyantı tanımlanmıştır. TEM tipi GSBL'lerin yaygın olduğu dönemlerde, bazı bölgelerde bazı varyantların prevalansı yüksek bulunmuştur. Örneğin, TEM-3 Fransa'da yaygınken, ancak ABD'de nadiren görülmüştür. Buna karşılık, TEM-10 ABD'de en yaygın enzim tipi olmuştur. TEM-26, dünyanın her yerinde tespit edilmiştir. Günümüzde TEM tipi GSBL enzimlerinin prevalansı CTX-M tipi β -laktamazlardan daha düşük hale gelmiştir (Castanheira et al., 2021, Bal, 2003).

2.10.2. SHV Tipi Beta Laktamazlar

SHV-1 *Klebsiella pneumoniae*'da kromozomal, *E.coli*'de ise genellikle plazmitlerde bulunan genlerle kodlanan ve "sulphydryl variable (sülhidril değişken) kısaltması amacıyla SHV olarak adlandırılan enzimlerdir. Bugüne kadar SHV'nin 228 sekans varyantı tespit edilmiştir, ancak bunların tümü GSBL fenotipine sahip olup olmadıklarını belirlemek için işlevsel olarak karakterize edilmemiştir (David L. Peterson & Bonomo, 2005). Dünya çapında SHV-5 ve SHV-12, *Enterobacteriales*'te bulunan en yaygın GSBL varyantları olmuştur (Castanheira et al., 2021). SHV üretimi ile ampisilin, tikarsilin ve piperasiline karşı direnç geliştirmekte olup oksimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi bulunmamaktadır. TEM grubu GSBL'lerle kıyaslandığında SHV-1'den köken alan enzim sayısı ve aminoasit değişikliği olan pozisyonlar daha azdır (Bal, 2003). Bunlarda karakteristik değişiklik 238. pozisyonda glisin yerine serin, 240. pozisyonda glutamin yerine lizin aminoasitinin girmesidir (Dağlar & Öngüt, 2012).

2.10.3. CTX-M Tipi Beta Laktamazlar

CTX-M-tipi β -laktamaz enzimleri ilk olarak 1980'lerin sonlarında rapor edilmiş ve aynı anda birkaç yerde ortaya çıkmıştır. CTX adı, bu β -laktamazların sefotaksime karşı güçlü hidrolitik

aktivitesini yansıtır. CTX-M tipi β -laktamaz üreten organizmalar tipik olarak dirençli aralıkta (64 $\mu\text{g/mL}$) sefotaksim MİK'lerine sahipken, seftazidim MİK'leri genellikle görünürde duyarlı aralıktadır (2 - 8 $\mu\text{g/mL}$) (David L. Peterson & Bonomo, 2005). 2000'li yılların başından beri, CTX-M tipi enzimler en yaygın GSBL grubu olarak kabul edilmekte ve baskın GSBL tipi olarak TEM ve SHV'nin yerini almaktadır (Castanheira et al., 2021). CTX-M tipi beta-laktamaz ilk defa 1989 yılında Almanya'da bir *E.coli* suşunda saptanmıştır. CTX-M enzimlerinin ortaya çıkışında Sefotaksim ve seftriaksonun toplumda yaygın kullanımının rol oynadığı düşünülmektedir. Günümüzde 80'den fazla CTX-M enzimi bildirilmiştir. CTX-M enziminin kaynağı TEM ve SHV enzimlerine göre farklıdır. TEM ve SHV tipi GSBL'ler öncül enzimlerden aminoasit değişiklikleriyle oluşmaktadır, ancak CTX-M tipi GSBL'ler transpozon ya da konjugatif plazmid aracılığı ile başka bir bakteriden horizontal gen transferiyle oluşmaktadır (Dağlar & Öngüt, 2012).

2.10.4. OXA Tipi Beta Laktamazlar

OXA tipi beta laktamazlar oksasilini hidrolize eder ve Ambler sınıf D ve Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel grup 2d enzimleri olarak gruplandırılır (Castanheira et al., 2021). OXA tipi beta laktamazlar, oksasilin hidrolize etme yeteneklerinden dolayı bu şekilde adlandırılmıştır. Ağırlıklı olarak *Pseudomonas aeruginosa*'da bulunurlar, ancak diğer birçok gram negatif bakteride de tespit edilmiştir (Bal, 2003). Aslında, en yaygın OXA tipi β -laktamaz olan OXA-1, *E.coli* izolatlarının %1 ile %10'unda bulunur. Çoğu OXA tipi β -laktamaz, genişletilmiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etmez ve GSBL olarak kabul edilmez. Bununla birlikte, OXA-10 sefotaksim, seftriakson ve aztreonamı zayıf bir biçimde hidrolize ederek çoğu organizmanın bu antibiyotiklere duyarlılığını azaltır. Diğer OXA tipi GSBL enzimleri OXA-11, 14, 16, 17, 19, 15, 18, 28, 31, 32, 35 ve 45'i içerir. Bunlar, sefotaksime ve bazen seftazidime ve aztreonam'a açık bir direnç kazandırır. Bir karbapenem hidrolize edici metalloenzim ile aztreonam hidrolize edici OXA enziminin eşzamanlı üretimi, tüm beta laktam antibiyotiklere karşı kolayca direnç kazanımına yol açabilir. (David L. Peterson & Bonomo, 2005).

2.10.5. PER Tipi Beta Laktamazlar

PER tipi GSBL'ler, bilinen TEM ve SHV tipi GSBL'ler ile sadece %25 ile 27 homolojiyi paylaşır. PER-1 beta laktamaz, penisilinleri ve sefalosporinleri etkin bir şekilde hidrolize eder ve klavulanik asit inhibisyonuna duyarlıdır. PER-1 ilk olarak *Pseudomonas aeruginosa* (*P.aeruginosa*)'da, daha sonra *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* (*S.enterica* serovar *typhimurium*) ve *Acinetobacter* izolatlarında da saptanmıştır (David L. Peterson & Bonomo,

2005). Bu enzim çoğu penisilini ve sefalotin, sefoperazon, sefuroksim, seftriakson ve seftazidim dahil sefalosporinleri iyi hidrolize etmesinin yanında oksasilin, sefamisin veya imipenemi hidrolize etmemektedir. PER-1 ve PER-2, PER ailesinin en yaygın üyeleridir. Bu enzimlerin, diğer beta laktamlarla birlikte test edildiğinde avibaktam ve relebaktam için MİK değerlerinde önemli farklılıklar görülmektedir. Diğer A sınıfı beta laktamazlardan daha az ölçüde avibaktam tarafından inhibe edildiği rapor edilmiştir. PER enzimleri en çok Türkiye ve Akdeniz ülkelerinden gelen izolatlarda bulunur (Castanheira et al., 2021).

2.10.6. VEB Tipi Beta Laktamazlar

VEB-1 ilk olarak Vietnamlı bir bebekten elde edilen bir *E.coli* izolatından tespit edilmiştir. VEB-1 enzimi; PER-1 ve PER-2 enzimleriyle %38 homoloji göstermektedir. Seftazidim, sefotaksim ve aztreonam yüksek düzeyde direnç gösterirler ve klavulanik asit ile inhibe olurlar. (Poirel et al., 1999, Bal, 2003).

2.10.7. GES Tipi Beta Laktamazlar

GES (Guiana genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz) ailesi, daha az yaygın olan GSBL'lerin en yaygın grubudur. GES-1'i kodlayan gen, diğer herhangi bir plazmit aracılı beta laktamaz ile yakından ilişkili değildir, ancak *Proteus mirabilis*'te bulunan karbenisilin hidrolize edici bir enzime %36 homoloji gösterir (Castanheira et al., 2021). GES-1 ilk olarak Fransa'da *K.pneumoniae* suşunda saptanmıştır. GES tipi beta laktamazlar başlangıçta *Enterobacterales* türlerinde bildirilmesine *P.aeruginosa* ve *A.baumannii* izolatları arasında daha yaygındır. (Poirel et al., 2000).

2.11. *E.coli* ST131

Son on yılda antimikrobiyal kullanımının artan seçici baskısı nedeniyle *E.coli* ST131 suşu gibi çoklu ilaca dirençli yüksek riskli birkaç suş ortaya çıkmıştır. Bu suşların en önemli özellikleri kolay bulaşabilmeleri, kolonize olma yetenekleri, küresel yayılım göstermeleri ve çeşitli antimikrobiyallere dirençli olmalarıdır (Patian Yossi, 2018).

E.coli ST131, dünya çapında pandemik bir klondur ve genellikle toplum kaynaklı enfeksiyonlara neden olur. Bu klonun üç kıtadan toplanan CTX-M-15 üreten *E.coli* izolatlarının MLST analizi ile pandemik olduğu 2008 yılında tanımlanmıştır. Sonraki araştırmalar, aktarılabılır bir plazmit üzerinde çok çeşitli virülans ve direnç genleri barındıran ST131'in dünya çapında yaygınlığını doğrulamıştır. Florokinolon dirençli *E.coli* 'lerin %30 ile %60 arasında ST131 klonundan oldukları tespit edilmiştir. ST131 klonundaki izolatlar çeşitli beta laktamaz genlerini taşırlar; bu enzimler çoğunlukla CTX-M ailesindeki beta laktamazlar ve daha az oranda TEM, SHV ve CMY beta laktamazlardır. *E.coli* ST131 klonunun neden olduğu

enfeksiyonların başında idrar yolu enfeksiyonları gelmektedir. Bu enfeksiyonlar, sistitten hayatı tehdit eden sepsise kadar değişebilmektedir ve her yaştaki insanlarda görülebilmektedir. Enfeksiyonların tedavisinin, etkenin antimikrobiyal direnç fenotipine ve enfeksiyon bölgesine göre ayarlanması gerekmektedir. ST131 klonunun fenotipik tespiti mümkün değildir ancak MLST ve PCR gibi yöntemlerle tespit edilebilmektedir (Rogers et al., 2011).

E. coli ST131, esas olarak memelilerin sindirim sisteminde bulunmaktadır. Bunun yanı sıra farklı vücut bölgelerinden patojen olarak izole edilmektedir. Bu nedenle bağırsak dışı patojenik *E.coli* (ExPEC) olarak sınıflandırılmaktadır. *E.coli* ST131, filogrup B2'ye aittir ve O16: H5 veya O25b: H4 olmak üzere iki serotipi bulunmaktadır. *E. coli* sekans tipleri, yedi temel genin dahili fragmanlarının analiz edildiği ve her lokustaki alellerin sekans tipini belirlendiği MLST analizine göre kategorize edilir. (Pitout & Finn, 2020).

Antimikrobiyal direncindeki artışın, 2008'den beri belirli bir *E.coli* klonu olan *E. coli* ST131'in dünya çapında yayılmasıyla bağlantılı olduğunu gösteren kanıtlar bulunmaktadır (Marie-Hélène et al., 2014). *E.coli* ST131 ilk olarak tanımlanmasından sonra çok hızlı bir biçimde küresel yayılım göstermiştir. *E.coli* ST131, Avrupa (özellikle İngiltere), Kuzey Amerika, Kanada, Japonya ve Kore'deki enfeksiyonlardan izole edilen antimikrobiyal dirençli *E.coli* suşları arasında geniş bir yayılım göstermektedir. Asya, Orta Doğu ve Afrika 'dan yüksek oranlar bildirilmektedir (Rogers et al., 2011). Hindistan, ABD ve Yeni Zelanda'da klinik çalışmalardan elde edilen GSBL üreten izolatların %70'ini, florokinolona dirençli izolatların %78'ini ve toplam *E.coli* izolatlarının %38'ini oluşturduğu bildirilmiştir. ST131 kolonizasyonu, İrlanda, Birleşik Krallık ve ABD'deki bakım evlerinde sırasıyla %55, %36 ve %25 gibi yüksek oranlarda bulunmuştur. ST131 farkındalığı arttıkça, izole edildiği kaynakların çeşitliliği de artmıştır (Marie-Hélène et al., 2014). Bunlar arasında kuş, primat, amfibi gibi yaban hayvanları ve ayrıca toprak, deniz suyu ve atık su gibi çevresel kaynaklardan da izole edilmiştir (Kürekci et al., 2017).

2.12. ERIC PCR

Enterobakteriyel Tekrarlayan İntergenik Konsensus (ERIC), bakteri suşlarının genotiplendirilmesi hastane kaynaklı patojenlerin çapraz bulaşmasını tespit etmek ve enfeksiyon kaynağını belirlemek için yapılır. *E.coli*'nin genotiplendirme yöntemleri içinde PFGE, plazmid profil analizi ve ERIC PCR bulunur. (Jena et al., 2017). Enterik bakterilerin genomunda ERIC primerlerine komplementer olan tekrarlayan diziler vardır. Bu tekrarlayan diziler ERIC PCR yönteminde kullanılan primerler için hibridizasyon bölgeleridir. ERIC PCR primerleri kullanılarak tekrarlayan diziler arasında kalan DNA parçalarının amplifikasyonu yapılmaktadır. ERIC PCR ürünlerine agaroz jel elektroforezi yapıldığında jelde değişik

boyutlarda DNA parçaları saptanabilir. Bu DNA profilleri, kromozomda tekrar eden dizilerin sayısı ve lokalizasyon farkı nedeniyle her izolat için farklı olabilecektir. İzolatlar arasında saptanan bant profiller görüntüleme yöntemleriyle değerlendirilir. Suşlar arasındaki bant profillerinin benzerlik oranları farklı bilgisayar yazılımları ile karşılaştırılır. Bu bant profillerinin kıyaslanmasıyla bakteri izolatları arasındaki genetik ilişki düzeyi açığa çıkarılabilmektedir. (Afkhami Ardakani & Ranjbar, 2016, Versalovic et al., 1991).

Bu PCR yöntemi kolay uygulanabilir, çok sayıda izolat ile çalışılabilir ve bakteriyel popülasyonların filogenetik yapılarının belirlenmesinde kullanılabilmektedir (Li vd., 2009, Ranjbar et al., 2017, L. A. Wilson & Sharp, 2006).

2.13. MLST

Çoklu lokus sekans tipleme (MLST), bakteri popülasyonlarının üyelerini karakterize etmek, alt tiplere ayırmak ve sınıflandırmak amacıyla korunmuş genlerdeki alelik varyantları ortaya çıkarmak için dizileme teknolojisini kullanır. MLST, genellikle adenilat kinaz (*adk*), fumarat hidrataz (*fumC*), izositrat/izopropimalat dehidrogenaz (*icd*), DNA giraz (*gyrB*), malat dehidrogenaz (*mdh*), adenilosüksinat dehidrogenaz (*purA*), ATP/GTP bağlanma motifi (*recA*) olmak üzere yedi esansiyel genin dizilerini karakterize etmeye yarar. Bu diziler, *E.coli*'nin popülasyon yapısını tahmin etmek ve bu tür içinde rekombinasyonun yaygın olduğunu göstermek için kullanılır (Wirth et al., 2006). Her bir genin yaklaşık 450-500 bp uzunluğundaki dizisi hedef alınır. Bu dizilere yönelik bir PCR amplifikasyonu sonrasında sekans analizi yapılır. Bu sekans analizi sonucunda elde edilen dizilere karşılık gelen allel numaraları belirlenir. Böylece yedi gen bölgesine yönelik izolatların allelik profilleri belirlenir. Her bir allelik profil dizi tipi (ST) olarak adlandırılır. Bir türe ait izolatlar yedi gen lokusundaki alellere karşılık gelen yedi adet tamsayı ile karakterize edilir (Maiden et al., 1998). Örneğin 53, 40, 47, 13, 36, 28, 29 allelik profil ST131 izolatlarına aittir. MLST'nin diğer moleküler tipleme yöntemlerine göre avantajlarından biri, dizi verilerinin laboratuvarlar arasında tekrarlanabilir olması ve internet üzerinden moleküler tipleme verilerinin yayınlanmasıyla küresel veri tabanlarının oluşturulmasıdır (Urwin & Maiden, 2003). Ayrıca mikrobiyal popülasyonların evrimsel gelişim de izlenebilir. Ayırım gücü yüksektir. Dünyadaki farklı bölgelerden elde edilen izolatların karşılaştırılmasını mümkün kılar. Bu yöntemin dezavantajları ise pahalı olması, yoğun laboratuvar çalışması gerektirmesidir (Pérez-Losada et al., 2017).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada, insanların bağırsak mikrobiyotasından izole edilen GSBL pozitif *E.coli* suşlarının antibiyotiklere direnç durumları, bazı GSBL enzim gen tipleri, izolatların klonal ilişkileri ve ST131 klonunun varlığı araştırıldı. Çalışmanın etik kurul onayı Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığından (28.06.2018 tarih ve 2018-06/27 sayılı karar) alındı ve çalışma, T-851 nolu “İnsanların Bağırsak Mikrobiyotasında Bulunan Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* İzolatlarında Beta-Laktamaz Enzim ve Klon Tiplerinin Araştırılması” adlı doktora tez projesi olarak Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (CÜBAP) tarafından desteklendi.

3.1. Araç, Gereç ve Malzemeler

Otoklav (Dedeoğlu, Türkiye)

Etüv (Dedeoğlu, Türkiye)

MALDI-TOFF MS (BrukerDaltonics, Almanya)

Mikrosantrifüj cihazı (Ser-Lab, Türkiye)

Kuru ısı bloğu (Merck, Almanya)

Thermal cycler cihazı (Biorad T100™ Thermal Cyclers)

Agaroz Jel Elektroforez Sistemi (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Mikropipetler: (Gilson, ABD) 100–1000 µL’lik, 20–200 µL’lik, 2–20 µL’lik, 0,1–2 µL’lik

Steril petri kapları (İsolab, Türkiye)

Özeler (İsolab, Türkiye)

Mikrosantrifüj Tüpleri (İsolab, Türkiye)

PCR Tüpleri 0.2 µL’lik (Thermo Fisher Scientific, ABD)

Filtreli pipet uçları: 20 µL’lik, 100 µL’lik, 200 µL’lik, (Neptune, ABD), 1000 µL’lik (İsolab, Türkiye)

Antibiyotik Diskleri (Bioanalyse, Türkiye): ampisilin (10 µg), sefepim (30 µg), seftazidim (10 µg), seftriakson (30 µg), sefotaksim (5 µg), sefoksitin (30 µg), aztreonam (30 µg), amoksisilin-klavulanik asit (20 - 10 µg), piperasilin-tazobaktam (30 - 6 µg), ertapenem (10 µg), imipenem (10 µg), meropenem (10 µg), siprofloksasin (5 µg), amikasin (30µg), gentamisin (10 µg), trimetoprim-sülfametaksazol (1,25 - 23,75 µg), sefotaksim klavulanik asit (30 µg, 10 µg), seftazidim klavulanik asit (30 µg, 10 µg)

TAE 10X (Multicell, Kanada)

DNA İzolasyon Kiti (Eco-tech Biotechnology, Türkiye)

Multiplex PCR Kiti (Qiagen, ABD)

Primerler: *uidA*, *ERIC1* ve *ERIC2*, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{OXA}*, *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{GES}*, *pabB*, *trpA*, *adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA* (100 pmol/ µL MOPC saflıkta, Macrogen) liyofilize primer setleri.

Taq DNA Polimeraz: (5 units/µL, Genedirex, Tayvan)

dNTP set: 100mM dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, Genedirex, Tayvan)

6X Yükleme Boyası: (Merck, Almanya)

DNA Ladder 100 bp (Genedirex, Tayvan)

DNA ladder 3000bp (Hibrogen, Türkiye)

Agaroz: Moleküler grade (Prona, Polonya)

DNAaz, RNAaz içermeyen su: (BBI Life Sciences, ABD)

Standart suşlar: GSBL pozitif *E.coli* (SHV, TEM, CTX-M, OXA, PER, VEB, GES üreten suşlar), *E.coli* ATCC 25922

3.2. Kullanılan besiyerleri

Antibiyotikli EMB Agar (Lab, İngiltere): Seftazidimli EMB ve seftotaksimli EMB besiyerlerini (Oxoid, İngiltere) hazırlamak için önce EMB besiyerinden litrede 37,5 gram olacak miktarda alındı. İki ayrı balon joje içinde distile su ile çözülerek otoklavda steril edildi. Besiyerlerinin sıcaklığı 55°C'ye düştüğünde etken maddeleri seftotaksim ya da seftazidim olan flakonlardan uygun miktarlarda alınarak besiyerlerindeki son konsantrasyonları 2 µg/mL olacak şekilde besiyerlerine eklendi. Daha sonra besiyerleri steril petri kaplarına döküldü ve katılaştıktan sonra deneylerde kullanılmak üzere +4°C'ye kaldırıldı.

Kanlı Agar (Lab, İngiltere): Besiyeri 49 g/L olacak şekilde tartıldı ve distile su ile karıştırıldıktan sonra otoklavda steril edildi. Besiyerinin sıcaklığı 50°C'ye düştükten sonra toplam hacim içinde %5 olacak şekilde defibrine kan eklendi ve steril petri kaplarına döküldü. Petrilerdeki besiyeri katılaştıktan sonra +4°C'ye kaldırıldı.

TSI Besiyeri (Acumedia Lab M, İngiltere): Besiyeri 60 g/L olarak tartıldı ve distile su ile karıştırıldıktan sonra otoklavlandı. Otoklavdan çıkan besiyerleri sıvı haldeyken tüplere dağıtıldı ve tüplerde dik ve yatık besiyeri bölümleri olacak şekilde besiyerleri katılaşmaya bırakıldı.

İndol Besiyeri (Difco, ABD): Triton 2,5 g, 1,25 g NaCl tartıldı 250 ml distile su içerisinde çözüldü. pH 7,2'ye ayarlandı. Cam tüplere 1,5 mL dağıtıldı. Otoklavda steril edildi.

Simon Sitrat Agar (Difco, ABD): Besiyerinden 24,2 g/L tartıldı ve distile su ile karıştırıldıktan sonra basınçsız buhar ile steril edildi. Sıvı haldeyken tüplere dağıtıldı ve tüplerde dik ve yatık besiyeri bölümleri olacak şekilde besiyerleri katılaşmaya bırakıldı

Mueller-Hinton Agar (Merck, Almanya): Besiyeri 34 g/L olacak şekilde tartıldı ve distile su ile karıştırıldıktan sonra otoklavda steril edildi. Steril petri kaplarına döküldü ve katılaştıktan sonra +4°C'ye kaldırıldı.

3.3. Kullanılan çözeltiler

dNTP karışımı: Konsantrasyonları 100 mM olan dATP, dGTP, dCTP, dTTP tüplerinin her birinden 10 µL alındı ve steril mikrosantrifüj tüpü içinde 60 µL steril distile su ile karıştırıldı. Böylece her dNTP'den 10 mM içeren 100 µL'lik stok dNTP karışımı hazırlandı.

1X TAE

Konsantrasyonu 10X olan stok TAE'den 1L 1X TAE hazırlamak için 10X'lik stoktan 100 mL 1L'lik steril mezür içerisine eklendi ve üzeri 900 mL distile su ile tamamlandı.

3.4. Yöntem

3.4.1. Çalışmaya Alınan Bireyler

Çalışmaya alınan GSBL pozitif *E.coli* izolatları gönüllü katılımcıların dışkı örneklerinden üretildi. Katılımcılar, herhangi bir hastalık şikayeti olmayan sağlıklı görünen bireyler ve Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli nedenlerle dışkı örneklerini getiren bireylerdi. Dışkı örnekleri temiz tek kullanımlık dışkı kaplarında toplandı ve örnekler teslim alındıktan hemen sonra işleme alındı. Aynı zamanda katılımcıların yaş, cinsiyet, hastanede yatış öyküsü, kronik hastalık, evcil hayvan besleme, antibiyotik kullanımı, operasyon geçirme ile ilgili bilgileri bir anket formuna işlendi. Toplam 161 bireyin 50'sinden üretilen GSBL pozitif *E.coli* izolatı çalışmaya alındı.

3.4.2. GSBL Pozitif *E.coli* İzolasyonu ve Tanımlanması

Bireylere ait her bir dışkı örneği biri 2 µg/mL sefotaksim ve diğeri 2 µg/mL seftazidim içeren EMB besiyerlerine ekildi ve 35°C'de 24 saat inkübe edildi (Niumsup et al., 2018). (Çakır Erdoğan et al., 2017). İnkübasyon sonunda laktoz pozitif ve yeşil metalik parlaklık veren koloniler seçildi. Her bir plaktaki bu özellikteki kolonilerden tek koloni alınarak kanlı agara ekildi ve 35°C'de 24 saat inkübe edildi. Üreyen koloniler, yağsız süt bulunan mikrosantrifüj tüpleri içinde süspanse edildi ve deneylerde kullanılmak üzere -20°C'de saklandı. İzolatlar %5 kanlı agara pasajlanarak canlandırıldı. Her bir plaktan tek koloni alınarak EMB besiyerine ekildi ve 35°C'de 24 saat inkübe edildi. EMB besiyerinde laktoz pozitif kolonilerden tek koloni alınarak TSI, indol, sitrat besiyerlerine ekildi ve 37°C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyondan sonra besiyerleri incelenerek *E.coli* üreme görünümündeki (TSI besiyerinde; glukoz, laktoz pozitif, indol pozitif, sitrat negatif izolatlar) koloniler MALDI-TOF MS cihazı ile tür düzeyinde tanımlanmak üzere ayrıldı. MALDI-TOF MS cihazı ile tanımlama işlemleri üretici firmanın

önerileri doğrultusunda Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında yapıldı. Moleküler deneylere başlarken izolatların *E.coli* oldukları *uidA* (beta glukuronidaz) genine yönelik primer seti kullanılarak yapılan PCR testiyle doğrulandı.

Toplam 50 bireyden üretilen 50 GSBL pozitif *E.coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları, beta-laktamaz gen tipleri, klonal ilişkileri, bu izolatlarda ST131 *E.coli* varlığı araştırıldı.

3.4.3. İzolatların GSBL Üretiminin Fenotipik Yöntemle Doğrulanması

İzole edilen *E.coli*'lerin GSBL üretimi fenotipik doğrulama testlerinden biri olan kombinasyon disk testiyle (KDT) araştırıldı. *E.coli* olarak tanımlanan izolatların 35°C'de, 24 saatlik inkübasyondan sonunda kanlı agarda üremiş kolonileri 5 mL steril serum fizyolojik içinde süspanse edildi. Süspansiyonun bulanıklığı MacFarland 0,5'e göre ayarlandı ve Mueller-Hinton agar besiyerinin yüzeyine yayma ekimi yapıldı. Ekim yapılmış plaklara sefotaksim (30 µg) +/- klavulanik asit (10 µg), seftazidim (30 µg) +/- klavulanik asit (10 µg) diskleri yerleştirildi ve 35°C'de 24 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda kombinasyonlu disklerin zon çapları tek başına antibiyotik içeren disklerin zon çapından 5 mm veya daha genişse, izolat GSBL pozitif olarak değerlendirildi (Eucast, 2022).

3.4.4. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

GSBL pozitif *E.coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testleri disk difüzyon yöntemiyle yapıldı ve sonuçlar EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi. İzolatların ampisilin, sefoksitin, seftriakson, seftazidim, sefotaksim, sefepim, aztreonam, ertapenem, imipenem, meropenem, amoksisilin-klavulanik asit, piperasilin-tazobaktam, amikasin, gentamisin, siprofloksasin, trimetoprim-sülfametoksazole karşı duyarlılıkları araştırıldı. Her bir suşun kanlı agarda bir gecelik inkübasyondan sonra üretilmiş saf kolonilerinden steril serum fizyolojik bulunan tüplerde MacFarland 0,5 bulanıklığına ayarlanmış süspansiyonları hazırlandı ve Mueller-Hinton agara yayma ekimleri yapıldı. Daha sonra besiyerleri üzerine antibiyotik diskleri yerleştirildi ve plaklar 35°C'de bir gece boyunca inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra antibiyotik diskleri etrafındaki inhibisyon zon çapları ölçülerek suşların antibiyotik direnç durumları belirlendi (Eucast, 2022).

3.4.5. DNA İzolasyonu

GSBL pozitif *E.coli* izolatlarının DNA'ları, DNA izolasyon kiti (Ecopure, Türkiye) kullanılarak, kit yönergesine göre şu şekilde elde edildi;

1. Kanlı agara pasajlanarak canlandırılan bakteri kolonileri (3-5 adet) mikrosantrifüj içindeki 1 mL saf suda süspanse edildi. Süspansiyon 6000 rpm'de 3 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi ve işlem sonunda süpernatant uzaklaştırıldı.
2. Bakteri pelletleri üzerine 200 µL EcoPURE resuspension buffer eklenerek vortekslendi ve yeniden süspanse edildi. Süspansiyon üzerine 200 µL EcoPURE lysis buffer eklendi ve iyice karıştırıldı.
3. Her örnek tüpü içerisine 20 µL EcoPURE Proteinase K eklendi iyice karıştırıldı ve 30 dakika 55°C'de kuru ısı bloğunda inkübe edildi.
4. Tüplerin içerisine 400 µL EcoPURE Binding buffer eklendi ve iyice karıştırıldı.
5. Süspansiyon pipetle EcoPURE spin kolonu içine alındı ve kolonlar koleksiyon tüplerine yerleştirilerek 13000 rpm'de oda ısısında 1 dakika santrifüj edildi.
6. Santrifüj işleminden sonra koleksiyon tüpünde toplanan süpernatant uzaklaştırıldı.
7. Kolonlara 500 µL EcoPURE Wash buffer 2 eklendi ve 13000 rpm'de 30 saniye oda sıcaklığında santrifüj edildi. Koleksiyon tüpündeki süpernatant uzaklaştırıldı.
8. Kolonlara 200 µL olmak üzere EcoPURE wash buffer 2 eklendi ve kolonlarda hiç sıvı kalmayacak şekilde 13000 rpm'de 3 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi.
9. Süpernatant koleksiyon tüpüyle birlikte atıldı ve spin kolonlar 1,5 mL'lik steril mikrosantrifüj tüpleri içerisine yerleştirildi.
10. Kolon membranlarının tam merkezine 30 µL EcoPURE Elution buffer eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 13000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi ve mikrosantrifüj tüplerinde toplanan DNA'lar deneylerde kullanılmak üzere -20°C'ye kaldırıldı.

DNA örnekleri deneylerde kullanılmadan önce nanodrop cihazında 260/280 ve 260/230 dalga boylarında ölçüldü ve değerler kaydedildi. DNA konsantrasyonları PCR deneylerinde kullanılmak üzere 100 ng/µL olacak şekilde ayarlandı.

3.4.6. İzolatların Moleküler Yöntemle *E.coli* Olarak Tanımlanması

Fenotipik yöntemlerle *E.coli* olarak tanımlanan izolatların *uidA* gen bölgesine yönelik PCR yöntemiyle de *E.coli* oldukları doğrulandı (El-Badawy et al., 2017). Pozitif kontrol olarak *E.coli* ATCC 25912 suşu, negatif kontrol olarak ise Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında izole edilerek MALDI-TOFF MS ile tanımlanan *Klebsiella*

pneumonia izolatı kullanıldı. *uidA* gen bölgesine yönelik PCR deneyinde kullanılan primer dizileri Tablo 1’de PCR karışımının içeriği Tablo 2’de verildi.

Tablo 1. *uidA* gen bölgesine yönelik PCR primer dizileri

Primer	Baz dizisi	Amplikon (bp)
<i>uidA</i>	F-5’-ATC ACC GTG GTG ACG CAT GTC GC-3’	
<i>uidA</i>	R-5’-CAC CAC GAT GCC ATG TTC ATC TGC-3’	486

Tablo 2. *uidA* genine yönelik PCR karışımının içeriği

Maddeler	Hacim
Tampon (1X)	2,5 µL
dNTP (10 mM)	2,5 µL
MgCl ₂ (3 mM)	3 µL
Primer F (5pmol)	1 µL
Primer R (5pmol)	1 µL
Taq DNA polimeraz (500 U)	0,125 µL
Su (ddH ₂ O)	14 µL
DNA (100 ng)	1 µL
Toplam	25 µL

PCR karışımı 1,5 mL’lik bir mikrosantrifüj tüpü içerisine su, tampon, dNTP’ler, MgCl₂, primerler ve taq DNA polimeraz eklenerek hazırlandı. PCR karışımından her bir örnek için 200µL’lik tüplere 24 µL dağıtıldı. Daha sonra her tüpe DNA’lar eklendi ve tüpler PCR cihazına yüklendi. Amplifikasyon programı; ilk denatürasyon 95°C’de 5 dakika ardından 95°C’de 30 saniye denatürasyon, 53,8°C’de 30 saniye bağlanma, 72°C’de 30 saniye uzama ve 72°C’de 5 dakika son uzama olmak üzere 35 döngü olarak yapıldı. Daha sonra PCR ürünlerine agoroz jel elektroforezi uygulandı. Hazırlanan % 1’lik agaroz jelde PCR ürünleri 2,5 saat yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.4.7. GSBL Direnç Genlerinin Belirlenmesi

Toplam 50 GSBL pozitif *E.coli* suşlarının ürettiği beta-laktamaz enzim genlerinin belirlenmesi için iki grup multipleks PCR deneyi tasarlandı. Birinci grup multipleks PCR testinde; izolatlarda *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* ve *bla_{OXa}* genleri araştırıldı (Hijazi et al., 2016), (Fang et al., 2008). İkinci grup PCR deneyiyle izolatlarda *bla_{PER}*, *bla_{VEB}* ve *bla_{GES}* genlerinin varlığı araştırıldı (Dallenne et al., 2010).

İzolatlarda *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* ve *bla_{OXa}* Genlerinin PCR ile Araştırılması

bla_{SHV}, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* ve *bla_{OXa}* genleri multipleks PCR yöntemiyle araştırıldı. GSBL genlerine yönelik PCR deneyinde kullanılan primer dizileri Tablo 3'te PCR karışımının içeriği Tablo 4'te verildi.

Tablo 3. *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* ve *bla_{OXa}* genlerine yönelik PCR primer dizileri

Primer	Baz dizisi	Amplikon (bp)
<i>bla_{SHV}</i>	F-5'-CTT TAT CGG CCC TCA CTC AA-3'	237
<i>bla_{SHV}</i>	R-5'-AGG TGC TCA TCA TGG GAA AG-3'	
<i>bla_{TEM}</i>	F-5'-CGC CGC ATA CAC TAT TCT CAG AAT GA-3'	445
<i>bla_{TEM}</i>	R-5'-ACG CTC ACC GGC TCC AGA TTT AT-3'	
<i>bla_{CTX-M}</i>	F-5'-ATG TGC AGYACC AGT AAR GTK ATG GC-3'	593
<i>bla_{CTX-M}</i>	R-5'-TGG GTR AAR TAR GTS ACC AGA AYC AGC GG-3'	
<i>bla_{OXa}</i>	F-5'-ACA CAA TAC ATA TCA ACT TCG C-3'	813
<i>bla_{OXa}</i>	R-5'-AGT GTG TTT AGA ATG GTG ATC-3'	

Tablo 4: *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* ve *bla_{OXa}* genlerine yönelik multipleks PCR karışımının içeriği

Reaktanlar	Miktar
PCR Mastermiks (2X)	12,5 µL
Primer F (5 pmol)	4 µL (1 µL x 4)
Primer R (5 pmol)	4 µL (1 µL x 4)
Su (ddH ₂ O)	3,5 µL
DNA (100 ng)	1 µL
Toplam	25 µL

Multipleks PCR kiti içindeki PCR mastermixi; HotStartTaq DNA polimeraz, yeni sentetik faktör MP, 3 mM MgCl₂ den oluşmaktaydı. PCR karışımı 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü içinde uygun miktarda mastermix tampon, primerler, ve su eklenerek hazırlandı.

PCR karışımından her bir örnek için 200 µL'lik tüplere 24 µL dağıtıldı. Daha sonra her tüpe DNA'lar eklendi ve tüpler PCR cihazına yüklendi. Amplifikasyon programı; 95°C'de 5 dakikalık ilk denatürasyonun ardından, 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 58,5°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama olmak üzere 30 döngü olarak ayarlandı (Hijazi et al., 2016). Hazırlanan % 1'lik agaroz jelde PCR ürünleri 2,5 saat yürütüldükten sonra jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

İzolatlarda *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{GES}* Genlerinin PCR ile Araştırılması

İzolatlarda *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{GES}* genlerinin varlığı multipleks PCR yöntemiyle araştırıldı. Deneylerde kullanılan primerler dizileri Tablo 5'te PCR karışımı içeriği Tablo 6'da verildi.

Tablo 5. *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{GES}* genlerine yönelik PCR primer dizileri

Primer	Baz dizisi	Amplikon (bç)
<i>bla_{PER}</i>	F-5'-GCT CCG ATA ATG AAA GCG T-3'	520
<i>bla_{PER}</i>	R-5'-TTC GGC TTG ACT CGG CTG A-3'	
<i>bla_{VEB}</i>	F-5'-CAT TTC CCG ATG CAA AGC GT-3'	648
<i>bla_{VEB}</i>	R-5'-CGA AGT TTC TTT GGA CTC TG-3'	
<i>bla_{GES}</i>	F-5'-AGT CGG CTA GAC CGG AAA G-3'	399
<i>bla_{GES}</i>	R-5'-TTT GTC CGT GCT CAG GAT-3'	

Tablo 6. *bla_{PER}*, *bla_{VEB}*, *bla_{GES}* genlerine yönelik multipleks PCR karışımının içeriği

Reaktanlar	Miktar
PCR Mastermix (2X)	12,5 µL
Primer F (5 pmol)	3 µL (1 µL x 3)
Primer R (5 pmol)	3 µL (1 µL x 3)
Su	5,5 µL
DNA (100 ng)	1 µL
Toplam	25 µL

Multipleks PCR kiti içindeki PCR mastermixi; HotStartTaq DNA polimeraz, yeni sentetik faktör MP, 3 mM MgCl₂ den oluşmaktaydı. PCR karışımı 1,5 mL'lik mikrosantrifüj tüpü içinde uygun miktarda mastermix tampon, primerler, ve su eklenerek hazırlandı.

PCR karışımı 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpü içerisine hazırlandı. PCR karışımından her bir örnek için 200 µL'lik tüplere 24 µL dağıtıldı. Daha sonra her tüpe DNA'lar eklendi ve tüpler PCR cihazına yüklendi. Amplifikasyon programı; 95°C'de 10 dakika ilk denatürasyonun ardından 94°C'de 45 saniye erime, 58,8°C'de 40 saniye bağlanma, 72°C'de 1 dakika uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama olmak üzere 30 döngü olarak yapıldı. PCR sonrası ürünler %1'lik agaroz jelde 2 saat yürütüldü ve jel görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.4.8. İzolatların Klonal İlişkilerinin ERIC PCR Yöntemiyle Araştırılması

Çalışmaya alınan 50 GSBL *E.coli* izolatları arasındaki klonal ilişkinin belirlenmesi için ERIC PCR yöntemi kullanıldı. Kullanılan primer dizisi ve PCR koşulları aşağıda belirtildi (Versalovic et al., 1991). Deneylerde kullanılan primer dizileri Tablo 7'de PCR karışımının içeriği Tablo 8'de verildi.

Tablo 7. ERIC1 ve ERIC2 PCR primer dizileri

Primer	Baz dizisi
ERIC1	5'-ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C-3'
ERIC2	5'-AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGC G-3'

Tablo 8: ERIC PCR karışımının içeriği

Reaktanlar	Miktar
Tampon (1X)	5 µL
dNTP (10mM)	5 µL
MgCl ₂ (3 mM)	6,5 µL
Primer F (5 pmol)	2 µL
Primer R (5 pmol)	2 µL
TaqDNApol (500 U)	0,4 µL
Su (ddH ₂ O)	28,5 µL
DNA (100 ng)	1 µL
Toplam	25 µL

PCR karışımı 1,5 ml'lik bir mikrosantrifüj tüpü içerisine su, tampon, dNTP'ler, MgCl₂, primerler ve taq DNA polimeraz eklenerek hazırlandı. PCR karışımından her bir örnek için 200µL'lik tüplere 24 µL dağıtıldı. Daha sonra her örneğin DNA'sından 1 µL eklendi ve termal döngü cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon programı 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyonun ardından 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 43,1°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 5 dakika uzama ve 72°C'de 10 dakika son uzama olmak üzere 30 döngü olarak yapıldı. PCR ürünleri %1,5'lik agaroz jelde 80 voltta 3 saat yürütüldü. Elektroforez sonucunda agaroz jel görüntüleme cihazında incelendi ve jel görüntüleri kaydedildi. İzolatlara ait bant patternlerine göre

dendogram analizleri yapıldı. ERIC PCR yöntemiyle elde edilen bant kalıpları BioNumerics programında analiz edildi.

Analizler için BioNumerics V7.5 (Applied Maths) programı kullanıldı. Programa yüklenen fotoğraf dosyaları üzerinde marker ve PCR ürünlerinin bant profilleri otomatik olarak belirlendi ve bantlar kontrol edilerek düzenlendi. Jel nedeniyle konumlarda oluşan hatalar marker konumu ile normalize edildi. Tüm örneklerle ait bant paterni verileri birleştirilerek analiz edildi. Optimizasyon yüzdeleri program içerisinde yeralan “Optimization of similarity coefficient parameters” seçeneği ile hesaplandı. Daha sonra bant profillerinin karşılaştırılması benzerlik katsayısı (Similarity coefficient) olarak Dice, optimizasyon %1, tolerans %1 ve diğer parametreler değiştirilmeden kullanılarak UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) dendogramları oluşturuldu (Sokal, 1958). Oluşturulan dendogramlar içerisinde % 85 benzerlik gösteren izolatlar bir kümede toplandı (A – Z ve α , β , γ , δ harfleri ile adlandırıldı) (Hung et al., 2014, (Moreira da Silva et al., 2017).

3.4.9. İzolatlarda ST131 Klonunun PCR ile Araştırılması

İzole edilen 50 adet GSBL pozitif *E.coli* suşunda ST131 klonundan olanları belirlemek için iki ayrı gen bölgesine yönelik primer setleri kullanılarak iki PCR deneyi yapıldı. Bu deneylerden birinde Clermont ve arkadaşlarının önerdiği *pabBspe* genini hedef alan yöntem (Clermont et al., 2009), diğerinde Doumith ve arkadaşları tarafından önerilen yöntem uygulandı (Doumith et al., 2015).

***pabBspe* Genini Hedef Alan ST131 PCR Protokolü:**

İzole edilen 50 adet *E.coli* suşunda *pabBspe* genine yönelik primerler kullanılarak ST131 klonu araştırıldı (Clermont et al., 2009). Deneylerde kullanılan primer dizileri Tablo 9’da PCR karışımının içeriği Tablo 10’da verildi.

Tablo 9. *pabBspe* genine yönelik PCR primer dizileri

Primer	Baz dizisi	Amplikon (bp)
<i>pabBspe</i>	F5’-TCC AGC AGG TGC TGG ATC GT-3’	
<i>pabBspe</i>	R5’-GCG AAA TTT TTC GCC GTA CTG T-3’	347
<i>trpA</i>	F5’-GCT ACG AAT CTC TGT TTG CC-3’	
<i>trpA</i>	R5’-GCA ACG CGG CCT GGC GGA AG-3’	427

Tablo 10. *pabBspe* genine yönelik PCR karışımının içeriği

Reaktanlar	Miktar
Tampon (1X)	2,5 µL
dNTP (10mM)	2,5 µL
MgCl ₂ (3 mM)	3 µL
Primer F (<i>pabB</i> , <i>trpA</i>)	2 µL (1 µLx2)
Primer R (<i>pabB</i> <i>trpA</i>)	2 µL (1 µLx2)
Taq DNA Polimeraz (500 U)	0,2 µL
Su (ddH ₂ O)	12 µL
DNA (100 ng)	1 µL
Toplam	25 µL

Primerler her gen için 1 µL olmak üzere toplam 2 gen için 2 µL forward primer ve 2 µL reverse primer olacak şekilde eklendi. PCR karışımı 1,5 mL’lik bir mikrosantrifüj tüpü içerisine su, tampon, dNTP’ler, MgCl₂, primerler ve taq DNA polimeraz eklenerek hazırlandı. PCR karışımından her bir örnek için 200 µL’lik tüplere 24 µL dağıtıldı. Daha sonra her örneğin DNA’sından 1 µL eklendi ve termal döngü cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon programı 94°C’de 5 dakika ilk denatürasyonun ardından 94°C’de 30 saniye denatürasyon, 58°C’de 30 saniye bağlanma, 72°C’de 40 saniye uzama ve 72°C’de 5 dakika son uzama olmak üzere 30 döngü olarak yapıldı. PCR sonrası ürünler % 1’lik agaroz jelde 2 saat yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

19. Bölgeyi Hedef Alan ST131 PCR Protokolü

Doumith ve arkadaşlarının önerdiği 19. bölgeyi hedef alan PCR deneyi izole edilen 50 adet *E.coli* suşunda ST131 klonunu saptamak amacıyla 19. Bölgeye özgü primerler kullanılarak PCR deneyi yapıldı (Doumith et al., 2015). Deneylerde kullanılan primer dizileri Tablo 11’de PCR karışımının içeriği Tablo 12’de verildi.

Tablo 11. 19. bölgeyi hedef alan ST131 PCR primer dizileri

Primer adı	Baz dizisi	Amplikon (bp)
ST131 F	F 5’-GACTGCATTTCGTCGCCATA-3’	310
ST131 R	R 5’-CCGGCGGCATCATAATGAAA-3’	

Tablo 12. 19. Bölgeye yönelik ST131 PCR karışımının içeriği

Reaktanlar	Miktar
Tampon (1X)	2,5 µL
dNTP (10mM)	1 µL
Primer F	1 µL
Primer R	1 µL
Taq DNA Polimeraz (500 U)	0,125 µL
Su (ddH ₂ O)	17,5 µL
DNA (100 ng)	2 µL
Toplam	25 µL

PCR karışımı 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpü içerisine su, tampon, dNTP'ler, MgCl₂, primerler ve taq DNA polimeraz eklenerek hazırlandı. PZR karışımından her bir örnek için 200µL'lik tüplere 24 µL dağıtıldı. Daha sonra her örneğin DNA'sından 2 µL eklendi ve termal döngü cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon programı 94°C'de 3 dakika ilk denatürasyonun ardından 94°C'de 30 saniye erime, 60°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 30 saniye uzama ve 72°C'de 5 dakika son uzama olmak üzere 30 döngü olarak yapıldı. PCR sonrası ürünler % 1'lik agaroz jelde 2 saat yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

3.4.10. Agaroz Jel Elektroforezi

Çalışmada yapılan PCR deneylerinden sonra elde edilen PCR ürünlerine agaroz jel elektroforezi uygulandı. ERIC PCR ürünleri için % 1,5'lik, diğer PCR ürünleri için % 1'lik agaroz jeller hazırlandı. %1'lik agaroz jel hazırlamak için 1 gr, %1,5'lik agaroz jel hazırlamak için 1,5 g agaroz 100 mL 1X TAE içerisinde çözülür. Mikrodalga fırında 5 dk boyunca kaynatıldı. Agaroz 60°C'ye kadar soğutuldu. İçerisine 10mg/µL etidyum bromür'den 8 µL eklendi ve jel kasetine dökülerek katılaşması beklenildi. PCR ürünleri, 2 µL yükleme tamponuyla karıştırılarak agaroz jeldeki kuyucuklara yüklendi. Yükleme işlemi tamamlandıktan sonra 2 saat boyunca 100 voltta yürütüldü. ERIC PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi 80 voltta 3 saat boyunca 1X TAE tamponunda yapıldı. Diğer PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi 100 voltta 2 saat 1X TAE tamponunda yapıldı. Elektroforez sonrası agaroz jeller jel görüntüleme cihazında incelendi ve görüntüler kaydedildi.

3.4.11. MLST Yöntemi

GSBL pozitif *E.coli* izolatlarının 10'unun MLST analizi yapıldı. Bu izolatların 5'i PCR yöntemi ile ST131 klonu olarak saptanan diğer 5'i PCR yöntemi ile ST131 klonu olarak saptanmayanlardı. MLST analizi için Atchman protokolünde önerilen 7 gen bölgesine yönelik PCR deneyleri yapıldı ve PCR ürünleri agaroz jel elektroforezi yöntemiyle kontrol edildi. PCR ürünlerinin sekans analizleri Sanger sekanslama yöntemiyle MacroGen firmasında yapıldı.

Sekans sonuçları MLST web sayfasındaki programa işlenerek izolatların ST'leri elde edildi (https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_ecoli_achtman_seqdef&set_id=4&page=batchSequanceQuery).

MLST Analizi İçin Yapılan PCR Deneyleri

E.coli suşlarının adenilat kinaz (*adk*), fumarat hidrataz (*fumC*), izositrat/izopropimalat dehidrogenaz (*icd*), DNA giraz (*gyrB*), malat dehidrogenaz (*mdh*), adenilosüksinat dehidrogenaz (*purA*), ATP/GTP bağlanma motifi (*recA*) gen bölgelerine yönelik PCR deneyleri, protokolde önerilen primer setleri (Tablo 13) ve koşulları (Tablo 14) kullanılarak yapıldı

(<https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/mlst/mlst-legacy-info-ecoli.html>).

Tablo 13. MLST analizinde yer alan 7 genin PCR primer dizileri

Primer	Baz dizisi	Amplikon (bp)
<i>adk</i>	F 5'- ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3'	
<i>adk</i>	R 5'-CCAGATCAGCGCGAACTTCA-3'	765
<i>fumC</i>	F 5'-ATT TAG TYC AGT ACC CAC MGC TGT A-3'	
<i>fumC</i>	R 5'-TGA AGA GAA AGC GAG CGC ATT-3'	805
<i>icd</i>	F 5'-AGC CMT GCT GAA AGT GGT-3'	
<i>icd</i>	R 5'-ACC AGR GTC ACA GAG TCA C-3'	877
<i>gyrB</i>	F 5'-GGA ATG TTG TTG GTA AAG CAG T-3'	
<i>gyrB</i>	R 5'-TCT GCA CGG CGT TGG TGT TT-3'	919
<i>mdh</i>	F 5'-AAC GCC TTG TTC GCC CTG CAG T-3'	
<i>mdh</i>	R 5'-TTA TCT CTG CAG GYG TAG CGC GTA-3'	911
<i>purA</i>	F 5'-TCGGTAACGGTGTGCTG-3'	
<i>purA</i>	R 5'-AGT AAG CTT TGA GGA TAC CCA GAA-3'	844
<i>recA</i>	F 5'-AAC ACG CGC TGG ACC CAA TCT A-3'	
<i>recA</i>	R 5'-AAC CAG YTC GCC RTA GAA GTT GAT A-3'	733

Tablo 14. MLST analizinde yer alan 7 gene yönelik PCR karışımının içeriği

Reaktanlar	Miktar
Tampon (1X)	5 µL
dNTP (10 mM)	4 µL
Primer F (5 pmol)	2 µL
Primer R (5 pmol)	2 µL
Taq DNA Polimeraz (500 U)	0,25 µL
Su (ddH ₂ O)	35 µL
DNA (100 ng)	2 µL
Toplam	50 µL

PCR karışımı 1,5 mL'lik bir mikrosantrifüj tüpü içerisine su, tampon, dNTP'ler, MgCl₂, primerler ve Taq DNA polimeraz eklenerek hazırlandı. PCR karışımından her bir örnek için 200 µL'lik tüplere 48 µL dağıtıldı. Daha sonra her örneğin DNA'sından 2 µL eklendi ve termal döngü cihazına yerleştirildi. Amplifikasyon programı 7 gen için ayrı olmak üzere 94°C'de 5 dakika ilk denatürasyonun ardından 94°C'de 30 saniye erime, *adk*, *fumC*, *icd* ve *purA* için 54°C'de, *gyrB* ve *mdh* için 60°C'de, *recA* için 58°C'de 30 saniye bağlanma, 72°C'de 30 saniye uzama ve 72°C'de 3 dakika son uzama olmak üzere 30 döngü olarak yapıldı. Yedi gen için ayrı yapılan PCR deneylerinden elde edilen ürünler %1'lik agaroz jelde 2 saat yürütüldü ve jel görüntüleme sisteminde görüntülendi.

İzolatların Sekans Tiplerinin Belirlenmesi

İzolatlara ait PCR ürünlerinin Sanger dizileme sonuçları AB1 formatındaki diziler (forward ve reverse) geneious 9.1.8 programına AB1 formatında yüklendi. Yüklenen her bir örneğe ait forward ve reverse dizileri MAFFT algoritması kullanılarak hizalandı. Hizalanan dizilerin pikleri kontrol edildi. Kontrol edilen dizilerin konsensus dizisi elde edildi. Her bir örnek için yapılan bu işlem sonucunda gen bazında elde edilen konsensus diziler FASTA formatında dosyalandı. Diziler https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_ecoli_achtman_seqdef&set_id=4&page=batchSequenceQuery internet adresindeki veri tabanına yüklendi ve böylece yedi gen için izolatlara atanan allel numaraları belirlendi. Allel numaraları https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=profiles veri tabanındaki lokus kombinasyonu ile arama kısmına yüklendi ve böylece izolatların sekans tipi belirlendi.

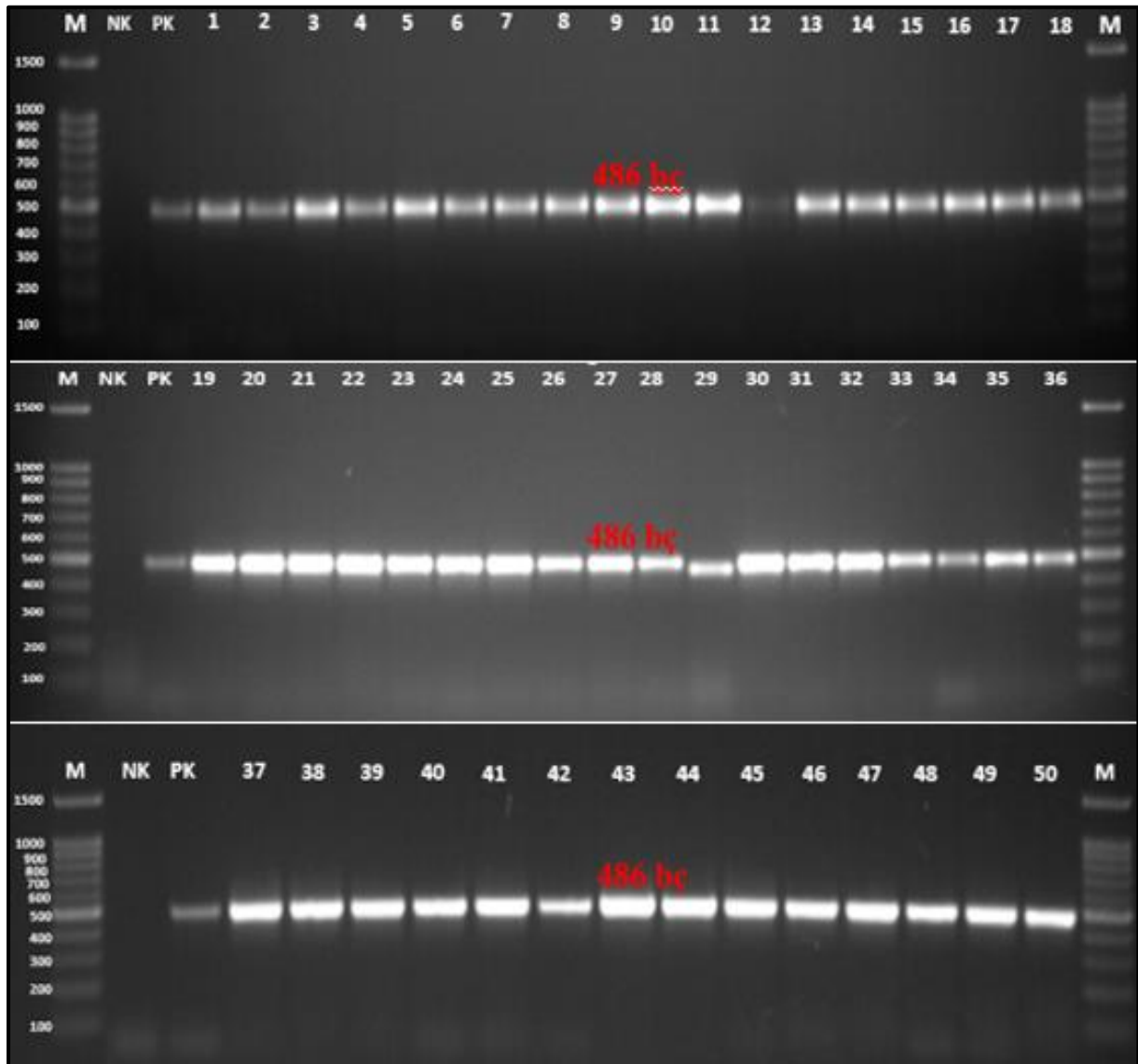
3.4.12. Verilerin Değerlendirilmesi

Toplam 161 kişiye ait bilgiler (yaş, cinsiyet, son altı ay içerisinde hastaneye yatış öyküsü, kronik bir hastalığa sahip olma, evcil hayvan besleme, son üç ay içerisinde antibiyotik kullanma, son bir yıl içerisinde operasyon geçirme) ve GSBL pozitif *E.coli* taşıyıcılık oranları istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirmede ki-kare testi kullanıldı. Tüm istatistiksel analizler IBM SPSS 23 programında gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

4.1. GSBL pozitif *E.coli* İzolatlarının Tanımlanması

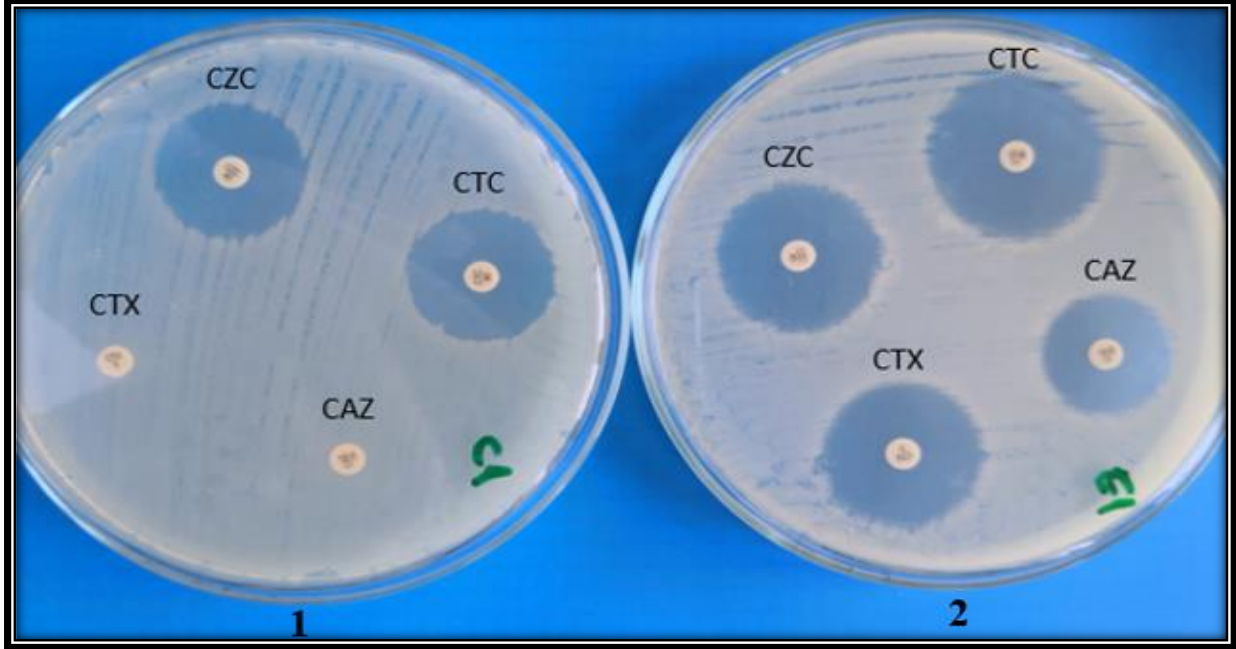
Toplam 161 bireye ait dışkı örneğinin 50'sinde (%31,05) GSBL pozitif *E.coli* izolatu saptandı. İzolatların hem konvansiyonel yöntemler hem de MALDI-TOF MS analiziyle *E.coli* oldukları belirlendi. Ayrıca *uidA* genine yönelik yapılan PCR testi sonucunda, 50 suşun hepsinde *E.coli*'ler için spesifik olduğu belirtilen 486 bp uzunluğunda PCR ürünü saptandı (Şekil 1). Böylece izolatların PCR yöntemiyle de *E.coli* oldukları doğrulandı.



Şekil 1. GSBL pozitif *E.coli* izolatlarına ait (50 izolat) *uidA* PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüleri. M: moleküler ağırlık belirteci 100 bp, NK: negatif kontrol (DNA içermeyen PCR karışımı), PK: pozitif sonuç (*E.coli* ATCC 25922), PCR ürünü: 486 bp., 1 – 50 örnek numaraları.

4.2. Kombinasyon Disk Testi Sonucu

İzole edilen 50 suşun GSBL üretimi kombinasyon disk difüzyon testiyle EUCAST önerilerine göre doğrulandı. Sonuçlara ait görsel Şekil 2’de gösterildi.



Şekil 2: Kombinasyon disk difüzyon testi (KDT). 1: GSBL pozitif *E.coli* izolatına ait plak, 2: GSBL negatif *E.coli* izolatına ait plak. CTX: sefotaksim, CTC: sefotaksim / klavulanik asit, CAZ: seftazidim, CZC: seftazidim / klavulanik asit.

4.3. GSBL Pozitif *E.coli* Taşıyan Bireylerin Özellikleri

Çalışmada 161 kişiden dışkı örneği toplandı. Örneklerin 116’sı herhangi bir hastalık şikayeti olmayan sağlıklı görünen bireyler ve 45’i Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına çeşitli nedenlerle dışkı örnekleri getiren bireylerdi. Çalışmaya alınan 161 kişinin 50’sinin (%31,05) dışkı örneğinden GSBL pozitif *E.coli* suşu üretildi. Her bireyden üretilen bir koloni GSBL pozitif *E.coli* izolatının mikrobiyolojik ve moleküler incelemeleri yapıldı. Çalışmaya alınan katılımcıların bazı özellikleri Tablo 15’te verildi. Buna göre, 84 kadının 23’ünden (%27,38), 77 erkeğin 27’sinden (%35,06) GSBL üreten *E.coli* suşu izole edildi. Çalışmaya alınan bireyler 1-84 yaşları arasındaydı. GSBL pozitif *E.coli* taşıyan bireyler 17-71 yaşlarında ve yaş ortalaması $29,2 \pm 14,4$, GSBL negatif *E.coli* bulunan bireyler 1-84 yaşlarında ve yaş ortalaması $27,6 \pm 14,8$ (1 - 84) olarak bulundu. Çalışmaya alınan bireylerin yaş, cinsiyet, son 6 ay içinde hastaneye yatış öyküsü, kronik hastalığa sahip olma, evcil hayvan besleme, son üç ay içinde antibiyotik kullanma ve son bir yıl içinde operasyon geçirme durumları ile GSBL pozitif *E.coli* fekal taşıyıcılığı arasında istatistiksel anlamlı bir farkın olmadığı bulundu ($p > 0,05$).

Tablo 15. Dışkı örneklerinden GSBL pozitif ve negatif *E.coli* üretilen bireylerin özellikleri

Özellikler		S	GSBL + S (%)	GSBL – S (%)	p
Yaş	1-19	30	6 (20)	24 (80)	0,201**
	20-39	98	35 (35,71)	63 (64,29)	
	40-59	24	5 (20,83)	19 (79,17)	
	≥ 60	9	4	5	
Cinsiyet	Erkek	77	27 (35,06)	50 (64,94)	0,293**
	Kadın	84	23 (27,38)	61 (72,62)	
Son 6 ay içinde hastaneye yatış	Var	6	4 (66,66)	2 (33,34)	0,075*
	Yok	155	46 (29,67)	109 (70,33)	
Kronik hastalığa sahip olma	Var	13	5 (38,46)	8 (61,54)	0,544*
	Yok	148	45 (30,40)	103 (69,6)	
Evcil hayvan besleme	Var	19	5 (26,31)	14 (73,69)	0,634**
	Yok	142	45 (31,69)	97 (68,31)	
Son 3 ay içinde antibiyotik kullanımı	Var	51	15 (29,41)	36 (70,59)	0,759**
	Yok	110	35 (31,81)	75 (68,19)	
Son 1 yıl içinde operasyon geçirme	Var	9	5 (55,55)	4 (44,45)	0,138*
	Yok	152	45 (29,60)	107 (70,40)	
Toplam		161	50 (31,05)	111 (68,95)	

S: sayı

(*): p değeri olarak Fisher's exact test sonucu alınmıştır.

(**): p değeri olarak Pearson ki-kare sonucu alınmıştır.

4.4. GSBL Pozitif *E.coli* İzolatlarının Antibiyotiklere Direnç Durumları

İzolatların antibiyotiklere direnç durumları disk difüzyon testiyle araştırıldı ve antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 16'da verildi. İzolatların 50'sinin (% 100) ampisiline, 20'sinin (% 40) sefoksitine, 41'inin (% 82) seftriaksona, 47'sinin (% 94) seftazidime, 46'sının (% 92) sefotaksime, 34'ünün (% 68) sefepime, 38'inin (% 76) aztreonama, 2'sinin (% 4) ertapeneme, 39'unun (% 78) amoksisilin-klavulanik asite, 21'inin(%42) piperasilin-tazobaktama, 3'ünün (% 6) amikasinine, 7'sinin (% 14) gentamisine, 19'unun (% 38) siprofloksasine, 29'unun (% 58) trimetoprim-sülfametoksazole,dirençli olduğu bulundu. Tüm izolatların karbapenem grubu antibiyotiklerden imipenem ve meropeneme duyarlı olduğu görüldü (Tablo 17).

Tablo 16. GSBL üreten *E.coli* izolatlarının antibiyogram sonuçları

İzolat no	AM	FOX	CRO	CAZ	CTX	FEP	ATM	ETP	IMP	MEM	AMC	TPZ	AK	CN	CIP	SXT
1	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	R	R
2	R	R	-	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	-	R
3	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	-	-
4	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	R	R	R	R
5	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	-	-
6	R	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	-	-	-
7	R	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	R	R	-	R	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	R	R
9	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-
10	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R
11	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R
12	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	R	R
13	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	-	-
14	R	R	-	R	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R
15	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	-	-
16	R	R	R	R	-	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-	-
17	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	R	R	R
18	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R
20	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	-	R
21	R	R	-	R	R	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-	R
22	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R
23	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	-	R
24	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	-	R
25	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-	R

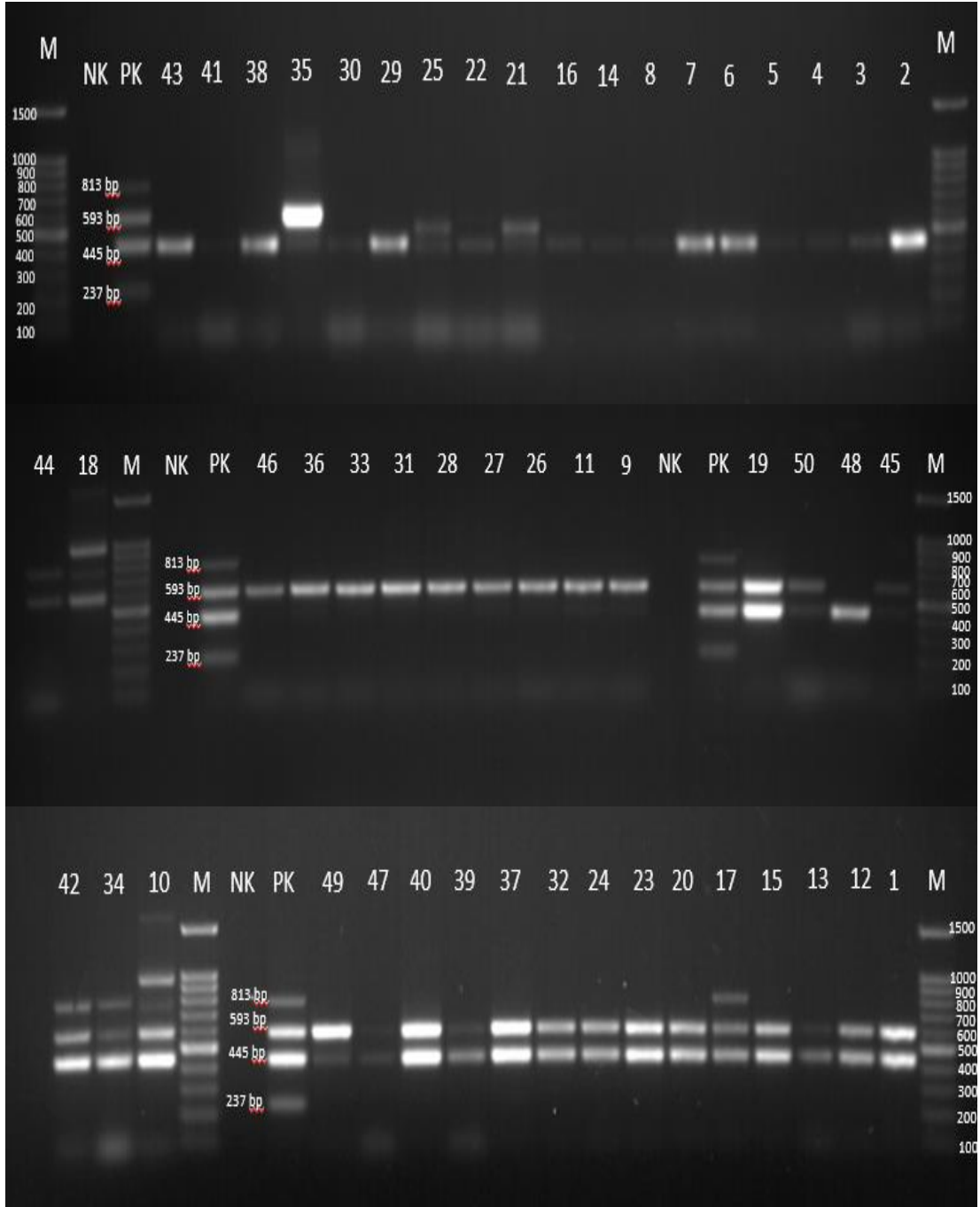
	AM	FOX	CRO	CAZ	CTX	FEP	ATM	ETP	IMP	MEM	AMC	TPZ	AK	CN	CIP	SXT
26	R	-	R	R	R	R	-	-	-	-	R	-	-	-	R	R
27	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	R	R	R
28	R	-	R	R	R	R	R	R	-	-	R	R	-	-	R	-
29	R	R	R	R	R	-	-	R	-	-	R	R	-	-	-	R
30	R	R	-	R	R	-	R	-	-	-	R	-	R	-	R	-
31	R	-	R	-	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	R	R
32	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	-	-
33	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	R	-
34	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	-	R	-	R	R	R
35	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	R	R
36	R	-	R	-	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	R	-
37	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	R	-
38	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	R	-
39	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	-	-	-	-	-
40	R	-	R	R	-	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R
41	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	-	-	-	-	-	R
42	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	R	R	-
43	R	R	-	R	R	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R
44	R	-	R	-	R	R	-	-	-	-	R	R	R	-	R	R
45	R	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	-	-	-
46	R	-	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	-	R
47	R	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	R	-	-	-	-
48	R	R	R	R	R	-	R	-	-	-	R	-	-	R	R	R
49	R	R	R	R	R	R	R	-	-	-	R	R	-	-	-	-
50	R	R	-	R	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	-	R
R:	Dirençli		AM:	Ampisilin		FOX:	Sefoksitin			CRO:	Seftriakson		CAZ:	Seftazidim		
-:	Duyarlı		CTX:	Sefotaksim		FEP:	Sefepim			ATM:	Aztreonam		ETP:	Ertapenem		
			IMP:	İmipenem		MEM:	Meropenem			AMC:	Amoksisilin-klavulanat		TPZ:	Piperasilin-tazobaktam		
			AK:	Amikasin		CN:	Gentamisin			CIP:	Siprofloksasin		SXT:	Trimetoprim-sulfametoksazol		

Tablo 17. GSBL üreten *E.coli* izolatlarının antibiyotiklere direnç oranları

Antibiyotik	Dirençli Sayı	(%)	Duyarlı Sayı	(%)
Ampisilin	50	(100)	-	(0)
Sefoksitin	20	(40)	30	(60)
Seftriakson	41	(82)	9	(18)
Seftazidim	47	(94)	3	(6)
Sefotaksim	46	(92)	4	(8)
Sefepim	34	(68)	16	(32)
Aztreonam	38	(76)	12	(24)
Ertapenem	2	(4)	48	(96)
İmipenem	-	(0)	50	(100)
Meropenem	-	(0)	50	(100)
Amoksisilin-klavulanik asit	39	(78)	11	(22)
Piperasilin-tazobaktam	21	(42)	29	(58)
Amikasin	3	(6)	47	(94)
Gentamisin	7	(14)	43	(93)
Siprofloksasin	19	(38)	31	(62)
Trimetoprim-sülfametoksazol	29	(58)	21	(42)

4.5. İzolatlarda Beta Laktamaz Genlerine Yönelik Multipleks PCR Sonuçları

İzolatlarının GSBL enzim genlerinin araştırıldığı multipleks PCR testleri sonucunda, izolatların 41'inde (% 82) *bla*_{TEM}, 34'ünde (% 68) *bla*_{CTX-M}, 5'inde (% 10) *bla*_{OXA} geni saptanırken, hiçbirinde *bla*_{SHV}, *bla*_{PER}, *bla*_{VEB} ve *bla*_{GES} genleri saptanmadı. İzolatların 16'sının yalnızca *bla*_{TEM}, 9'unun *bla*_{CTX-M} grubu GSBL geni içerdiği belirlenirken, 20'sinde *bla*_{TEM} ve *bla*_{CTX-M} genleri, 5'inde *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} genleri birlikte bulundu. İzolatlardaki direnç genlerinin dağılımı Tablo 18'de ve multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi fotoğrafları Şekil 3'de verildi.



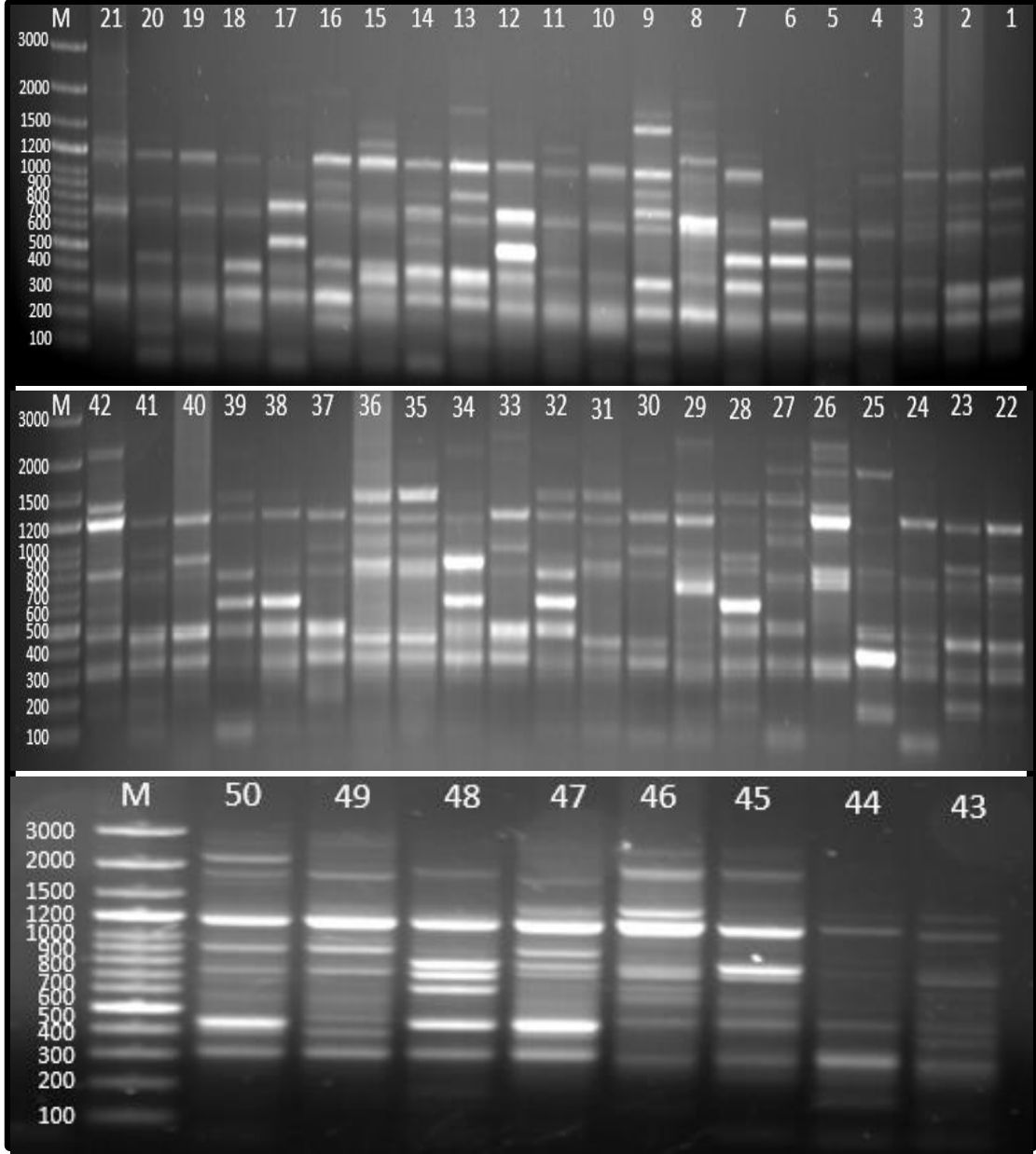
Şekil 3: *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA}, *bla*_{SHV} GSBL genlerine yönelik multipleks PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü. M: ağırlık belirteci 100 bp, NK: negatif kontrol (DNA içermeyen PCR karışımı), PK: pozitif kontroller (*bla*_{SHV} 237 bç, *bla*_{TEM} 445 bç, *bla*_{CTX-M} 593 bç ve *bla*_{OXA} 813 bç). İzolatlara ait örnek numaraları (1-50).

Tablo 18. İzolatlarda bulunan GSBL direnç genlerinin oranları

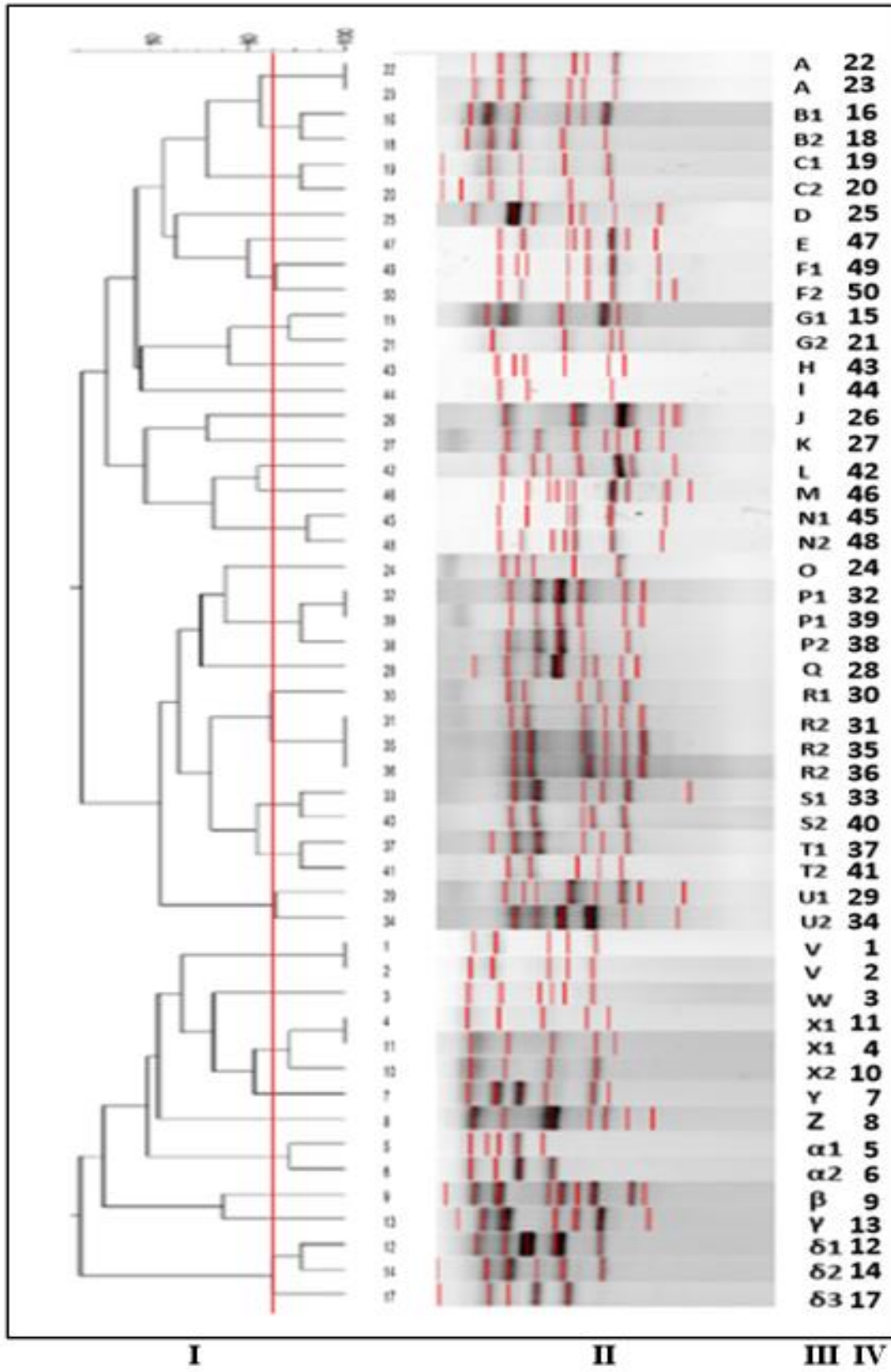
GSBL Tipi	Sayı	(%)
Yalnız <i>bla</i> _{TEM}	16	(32)
Yalnız <i>bla</i> _{CTX-M}	9	(18)
<i>bla</i> _{TEM} ve <i>bla</i> _{CTX-M}	20	(40)
<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{OXA}	5	(10)
Toplam <i>bla</i>_{TEM}	41	(82)
Toplam <i>bla</i>_{CTX-M}	34	(68)

4.6. GSBL Pozitif *E.coli* İzolatlarının ERIC PCR ile Klonal İlişkilerinin Araştırılması

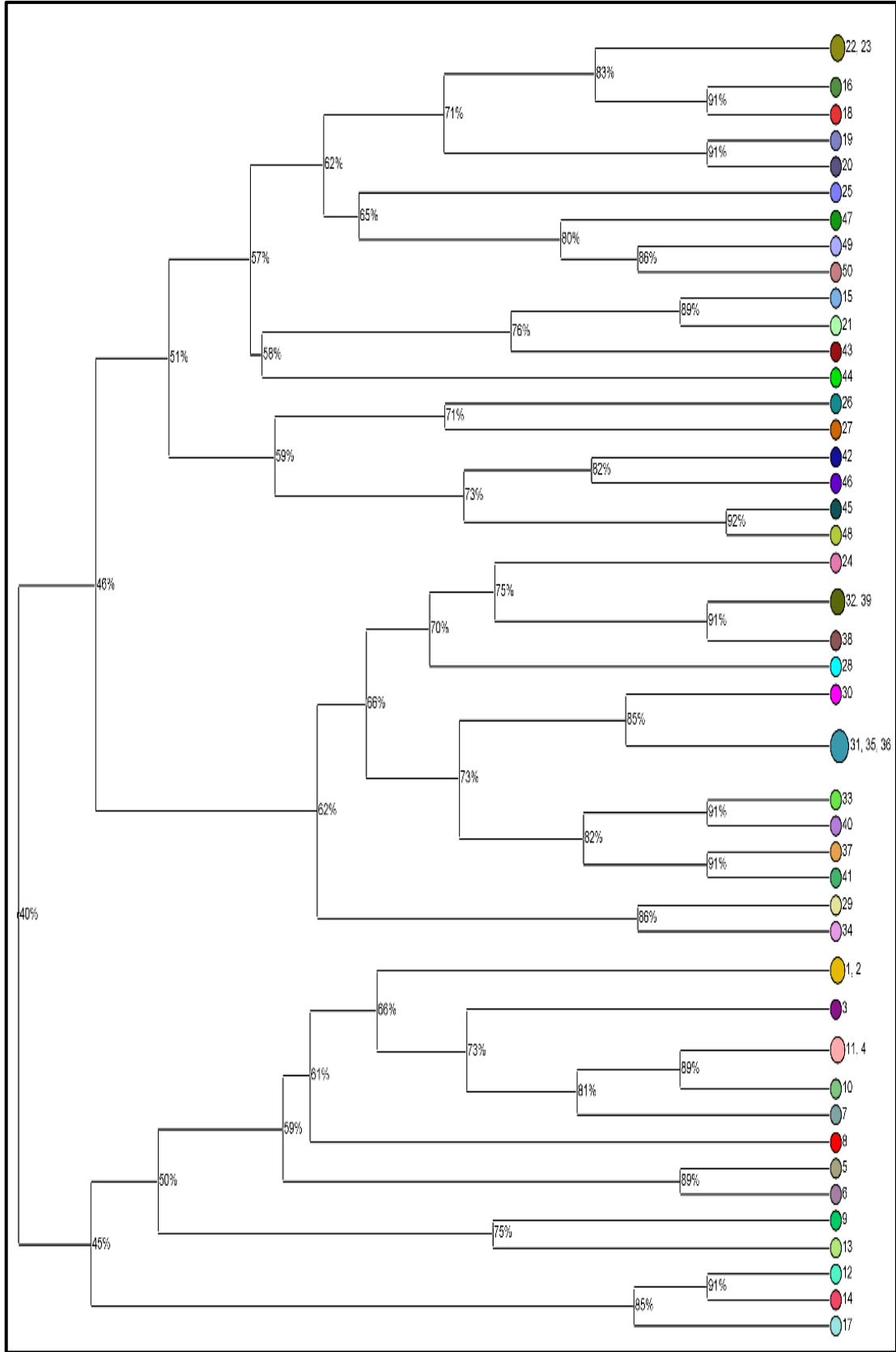
İzolatların ERIC PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi sonunda elde edilen bant profilleri Şekil 4’te verildi. Bant profilleri BioNumerics V7.5 (Applied Maths) programı kullanılarak analiz edildi. ERIC PCR bant patternlerinin değerlendirilmesi sonucunda 5 GSBL pozitif *E.coli* izolatı %85 benzerlik oranı baz alınarak 30 kümeye ayrıldı. Kümeler harf (A-Z) ve simgelerle (α , β , γ , δ) adlandırıldı. Tüm izolatlar arasındaki benzerlik oranları % 40 ile % 100 arasında değişmekteydi. Kümeler içinde izolatlar arasındaki benzerlik oranı % 95 ve üzerinde olanlar aynı harflerle, %95 - %85 benzer olanlar aynı harfin veya simgenin yanına bir rakam eklenerek gösterildi. Şekil 5’te ERIC PCR bant patternlerinden elde edilen dendogram, bant profilleri ile izolatların kümeleri ve Şekil 6’da ise izolatlar arasındaki benzerlik oranlarını gösteren dendogram verildi. Buna göre bir kümede (R) 4 izolat, üç kümede (P, X, δ) 3 izolat, onbir kümede (A, B, C, F, G, N, S, T, U, V, α) 2 izolat diğer onbeş kümede ise birer izolat bulundu. Kümeler içindeki izolatların kendi aralarındaki benzerlik oranları değerlendirildiğinde, A kümesindeki 2 izolat (22, 23), P kümesindeki 2 izolat (32, 39), R kümesindeki 3 izolat (31, 35, 36), V kümesindeki 2 izolat (1, 2) ve X kümesindeki 2 izolatın (11, 4) birbirlerine benzerlik oranları $\geq$ % 95’di. Bu nedenle bu kümelerdeki izolatların aynı klondan oldukları sonucuna varıldı. ERIC PCR analiziyle izolatların klonal olarak heterojen oldukları sonucuna varıldı. Tablo 19’da izolatların ait olduğu ERIC kümeleri, GSBL enzimleri ve antibiyotik direnç profilleri verildi. Buna göre aynı küme içindeki izolatların çoğunun GSBL enzim tipleri ve antibiyotik direnç profillerinin birbirlerinden farklı olduğu görüldü.



Şekil 4: İzolatların ERIC PCR bant profilleri. M: ağırlık belirteci 100 bç, 1-21, 22-42, 43-50 (örnek no): bant profilleri.



Şekil 5: ERIC PCR bant patternlerinden elde edilen dendrogram. I: dendrogram, II: ERIC bant profilleri, III: ERIC kümeleri, IV: izolat numaraları.



Şekil 6: ERIC PCR bant profillerine göre izolatlar arasındaki benzerlik oranlarını gösteren dendrogram. Renkli noktaların yanındaki sayılar: izolat numaraları. Yüzdelik oranlar: İzolatlar arasındaki benzerlik oranları.

Tablo 19. İzolatların ERIC PCR kümeleri, GSBL enzim grupları, antibiyotiklere direnç profilleri

ERIC tipi	ÖrnekNo	GSBL enzimi	Antibiyotik direnç profili
A	22	TEM	AM,FOX,CAZ,AMC,SXT
A	23	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,SXT
B1	16	TEM	AM,FOX,CRO,CAZ,ATM,AMC,TPZ
B2	18	TEM, CTX-M, OXA	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM
C1	19	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,SXT
C2	20	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,SXT
D	25	TEM, CTX-M	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,AMC,TPZ,SXT
E	47	TEM, CTX-M	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,ATM,AMC,TPZ,
F1	49	TEM, CTX-M	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ
F2	50	TEM, CTX-M	AM,FOX,CAZ,AMC,TPZ,SXT
G1	15	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ
G2	21	TEM, CTX-M	AM,FOX,CAZ,CTX,AMC,TPZ,SXT
H	43	TEM	AM,FOX,CAZ,CTX,AMC,SXT
I	44	TEM, CTX-M	AM,CRO,CTX,FEP,AMC,TPZ,AK,CIP,SXT
J	26	CTX-M	AM,CRO,CTX,CAZ,FEP,AMC,,CIP,SXT
K	27	CTX-M	CRO,CAZ,CTX,FEP,AMC,CN,AM,CIP,SXT
L	42	TEM, CTX-M, OXA	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,CN,CIP
M	46	CTX-M	AM,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,SXT
N1	45	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,ATM,AMC,
N2	48	TEM	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,ATM,AMC,CN,CIP,SXT
O	24	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,SXT
P1	32	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC
P1	39	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC
P2	38	TEM	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,AMC,CIP
Q	28	CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,ETP,AMC,TPZ,CIP
R1	30	TEM	FOX,CAZ,CTX,ATM,AMC,AK,CIP
R2	31	CTX-M	AM,CRO,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,CIP,SXT
R2	35	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,CIP,SXT
R2	36	CTX-M	AM,CRO,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,CIP
S1	33	CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,CIP,
S2	40	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,FEP,ATM,SXT
T1	37	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,CIP
T2	41	TEM	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,SXT
U1	29	TEM	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX, ETP,AMC,TPZ,SXT
U2	34	TEM, CTX-M, OXA	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,TPZ,CN,CIP,SXT
V	1	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX, FEP,ATM,CIP, SXT
V	2	TEM	AM,FOX,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,SXT
W	3	TEM	AM,CTX,CAZ,CRO,FEP,ATM,AMC
X1	11	CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,SXT
X1	4	TEM	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,AK,CN,CIP,SXT
X2	10	TEM, CTX-M, OXA	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,SXT
Y	7	TEM	AM,FOX,CAZ,CTX
Z	8	TEM	AM,FOX,CAZ,CTX,AMC,CIP,SXT
α1	5	TEM	AM,FOX,,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC
α2	6	TEM	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,ATM,AMC
β	9	CTX-M	AM,CTX,CAZ,CRO,FEP,ATM,CN
γ	13	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ
δ1	12	TEM, CTX-M	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,AMC,CIP,SXT
δ2	14	TEM	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,AMC,SXT
δ3	17	TEM, CTX-M, OXA	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,CN,CIP,SXT

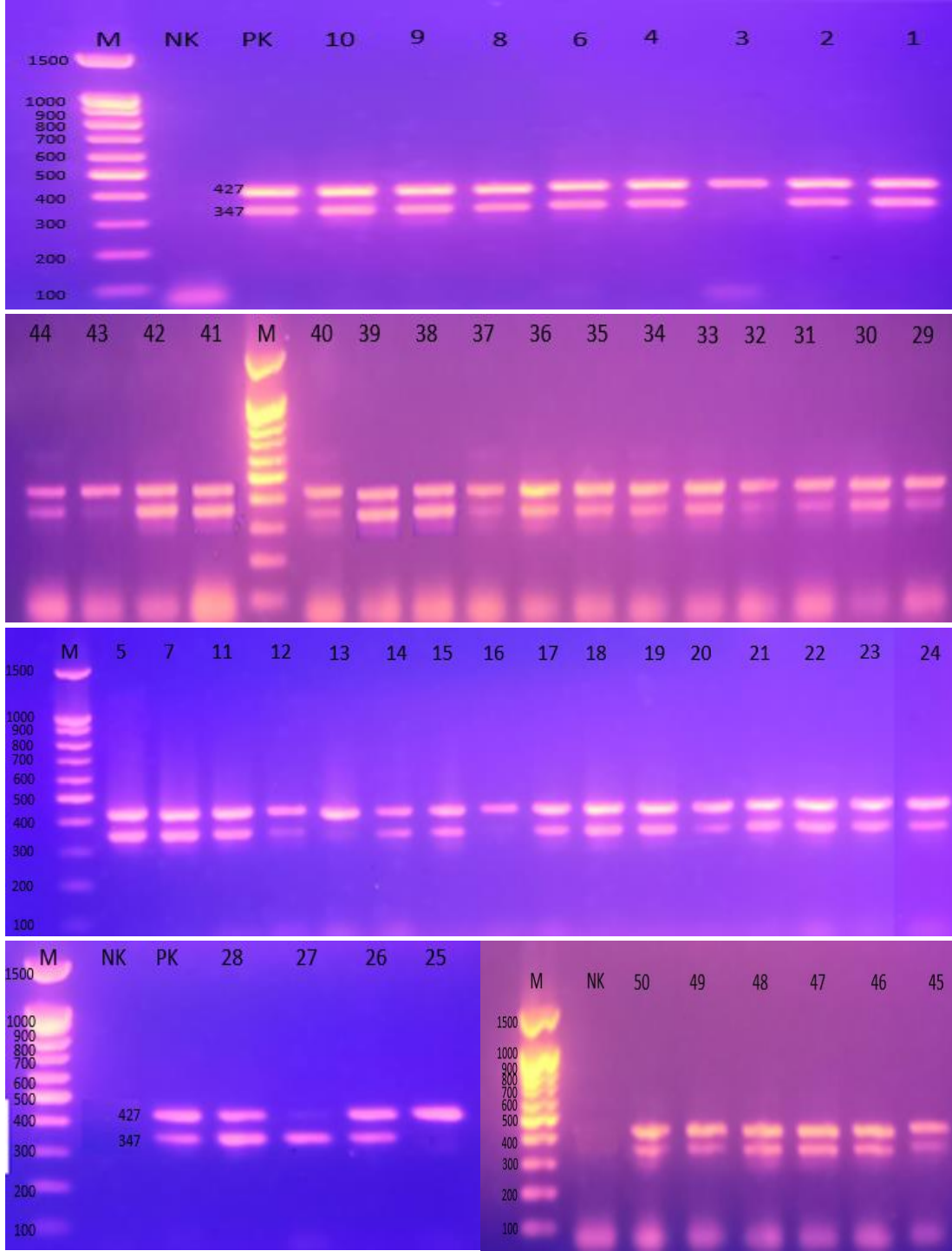
4.7. *E.coli* ST131 PCR Sonuçları

4.7.1. *pabBspe* Genine Yönelik ST131 PCR Sonuçları

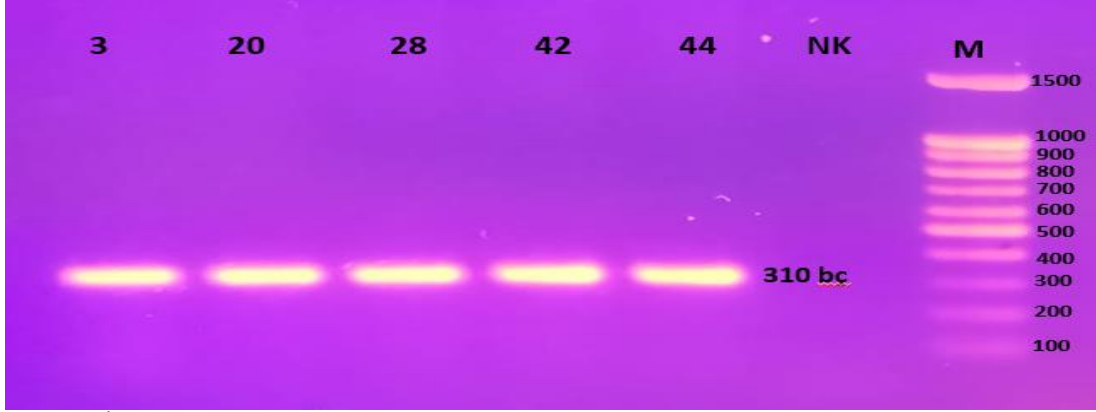
İzolatlarda ST131 klonunu araştırmak için *pabBspe* ve *trpA* primerleri kullanarak yapılan PCR testinde, 50 izolatın 47'sinin ST131 *E.coli* olduğu saptandı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforez fotoğrafları Şekil 7'de gösterildi. Tüm izolatların *trpA* gen ürünü (427 bp) pozitif bulundu. 50 izolatın 47'sinin *pabBspe* gen ürünü (347 bp) pozitif bulunurken 3'ünün (3, 16, 25 nolu izolatlar) negatif bulundu.

4.7.2. 19. Bölgeyi Hedef Alan ST131 PCR Sonuçları

İzolatlarda ST131 klonunu araştırmak için bölge 19'a özgü primer setleri kullanılarak yapılan PCR deneyi sonucunda 50 izolatın 5'inin (% 10) ST131 klonu olduğu bulundu (Tablo 20). PCR ürünlerinin agaroz jel görüntüsü Şekil 8'de verildi. Buna göre 3, 20, 28, 42 ve 44 nolu izolatların PCR ürünleri (310 bp) pozitif bulundu.



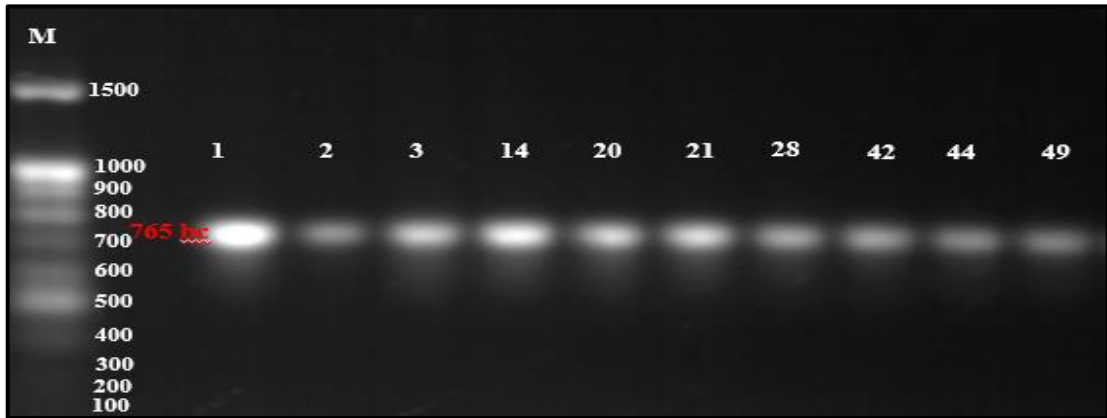
Şekil 7: İzolatların *pabBspe* genine yönelik ST131 PCR jel görüntüleri. M: ağırlık belirteci 100 bç, NK: negatif kontrol (DNA içermeyen PCR karışımı), 3, 16, 25 nolu izolatlar *pabBspe* (347 bç) negatif, *trpA* (427 bç) pozitif. Diğer izolatlar *pabBspe* ve *trpA* pozitif.



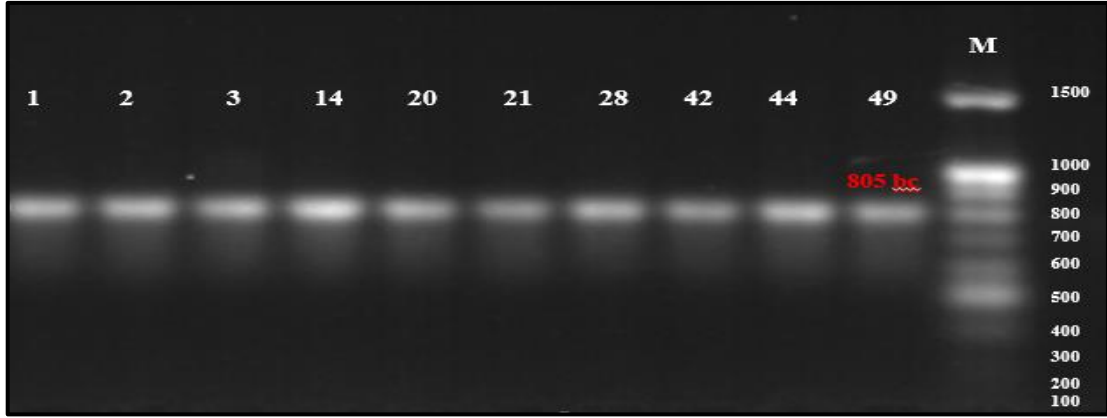
Şekil 8: İzolatların 19. bölgeye yönelik ST131 PCR jel görüntüsü. M: ağırlık belirteci 100 bç, NK: negatif kontrol (DNA içermeyen PCR karışımı), 3, 20, 28, 42, 44 (izolat numaraları): ST131 R19 pozitif (310 bç).

4.8. MLST Sonuçları

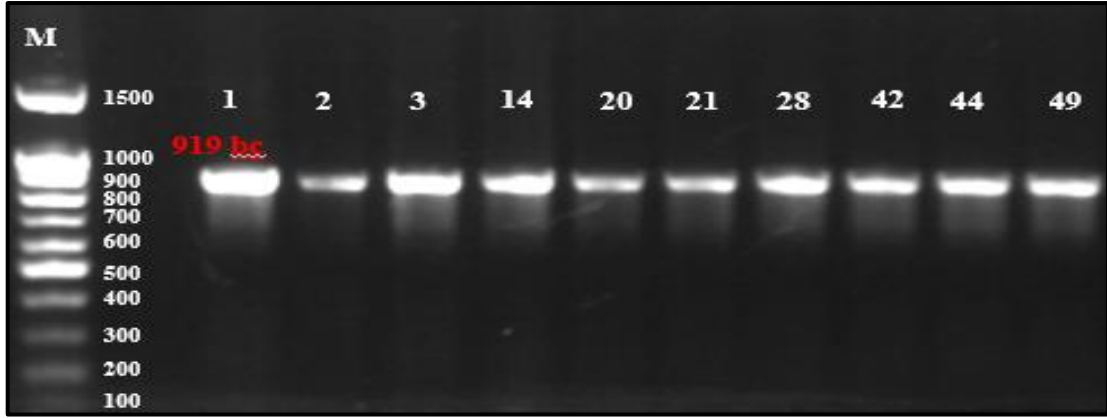
ST131 klonunun varlığını araştırmak üzere 19. bölgeye yönelik yapılan PCR deneyleri ile ST131 olarak saptanan 5 suş (3, 20, 28, 42, 44) ve ST131 olarak saptanmayan 5 suş (*pabBspe* genine yönelik PCR testiyle ST131 olarak saptanan suşlar) MLST analiziyle tiplendirildi. MLST analizi Atchman MLST protokolüne göre uygulandı. Toplam 10 izolatin bu protokolde önerilen 7 gen bölgesine (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) yönelik PCR deneyleri yapıldı. PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezinden sonraki jel görüntüleri Şekil 9-15'te verildi. Böylece PCR ürünlerinin kontrolü yapılarak sekans analizi için uygun oldukları saptandı.



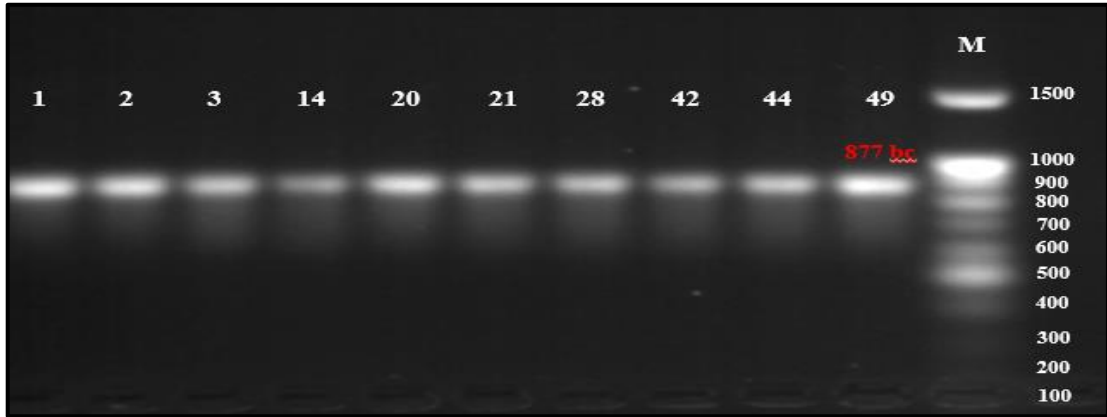
Şekil 9: *adk* (765 bç) genine yönelik PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: ağırlık belirteci (100 bç), 1, 2, 3, 14, 20, 21, 28, 42, 44, 49 (örnek numaraları): pozitif sonuç.



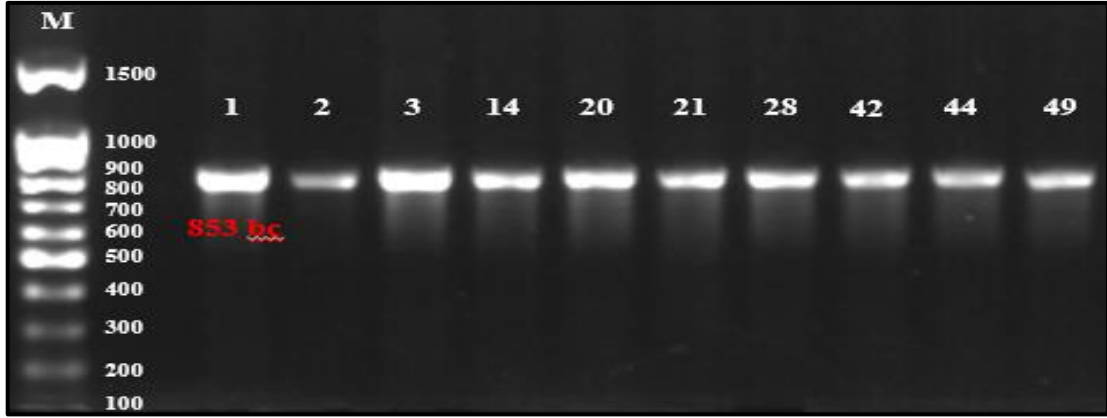
Şekil 10: *fumC* (805 bp) genine yönelik PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: ağırlık belirteci (100) bp, 1, 2, 3, 14, 20, 21, 28, 42, 44, 49 (örnek numaraları): pozitif sonuç.



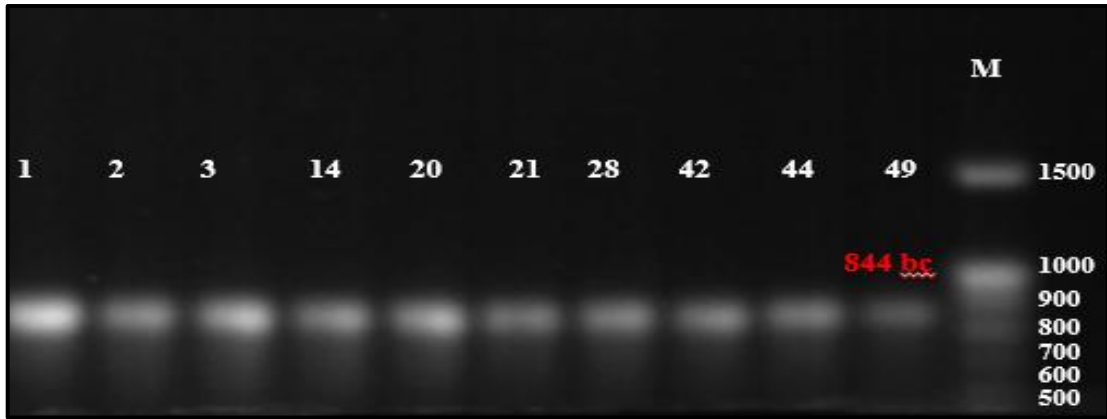
Şekil 11: *gyrB* (919 bp) genine yönelik PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: ağırlık belirteci (100) bp, 1, 2, 3, 14, 20, 21, 28, 42, 44, 49 (örnek numaraları): pozitif sonuç.



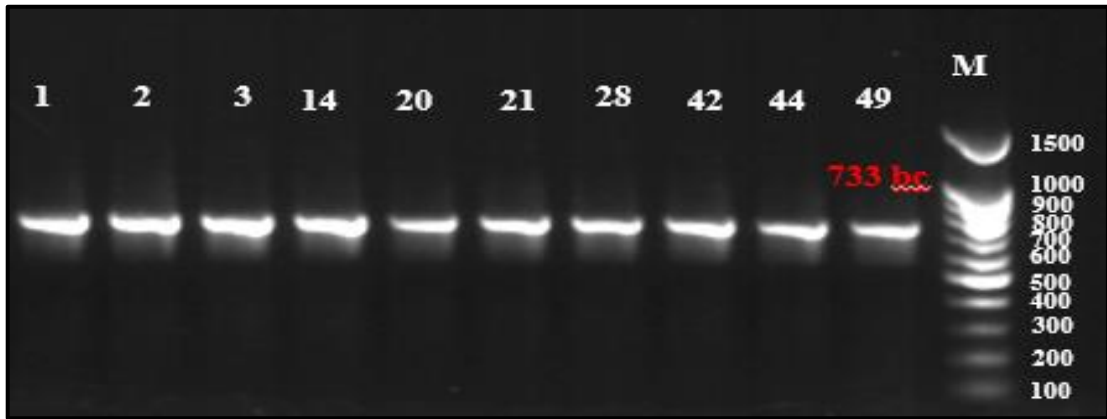
Şekil 12: *icd* (877 bp) genine yönelik PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: ağırlık belirteci (100) bp, 1, 2, 3, 14, 20, 21, 28, 42, 44, 49 (örnek numaraları): pozitif sonuç.



Şekil 13: *mdh* (853 bp) genine yönelik PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: ağırlık belirteci (100 bp), 1, 2, 3, 14, 20, 21, 28, 42, 44, 49 (örnek numaraları): pozitif sonuç.



Şekil 14: *purA* (844 bp) genine yönelik PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: ağırlık belirteci (100 bp), 1, 2, 3, 14, 20, 21, 28, 42, 44, 49 (örnek numaraları): pozitif sonuç.



Şekil 15: *recA* (733 bp) genine yönelik PCR ürünlerinin jel görüntüsü. M: ağırlık belirteci (100 bp), 1, 2, 3, 14, 20, 21, 28, 42, 44, 49 (örnek numaraları): pozitif sonuç.

Amplikonların Sanger sekanslama işlemi Macrogen Europe laboratuvarında yapıldı. Sekans sonuçları elde edildiğinde, önce dizilerin hizalaması ve konsensus dizilerinin elde edilme işlemleri tamamlandı. FASTA formatında dosyalanan diziler https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_ecoli_achtman_seqdef&set_id=4&page=batchSequenceQuery internet adresindeki veri tabanına yüklendi ve 7 gen bölgesi için örneklerle atanan allel numaraları belirlendi (Şekil 16-22). Her bir örneğin 7 allel numarası https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=profiles adresindeki veri tabanındaki lokus kombinasyonu ile arama kısmına yüklendi ve böylece her bir örneğin sekans tipi belirlendi (Şekil 23). MLST analizi yapılan 10 suşun 5'i ST131, diğer 5 izolatın klon tipleri, ST8712, ST10, ST6834, ST349 ve ST34 olarak belirlendi (Tablo 20).

4.9. İzolatlara Ait ST131 PCR ve MLST Analizi Sonuçlarının Değerlendirilmesi

pabBspe genine yönelik ST131 PCR protokolü ile 47 suşun pozitif olduğu 3, 16, 25 nolu izolatların negatif olduğu bulundu. 19. Bölgeye yönelik ST131 PCR protokolü ile 3, 20, 28, 42, 44 nolu örnekler pozitif yani ST131 klonundan oldukları diğer 45 izolatın negatif oldukları bulundu. MLST analiziyle 3, 20, 28, 42, 44 nolu izolatlar da ST131 olarak saptandı. Ayrıca 1, 2, 14, 21, 49 nolu izolatların ST8712, ST10, ST6834, ST349, ST34 oldukları bulundu. Böylece MLST analizinin tiplendirmede en geçerli yöntem olması, 19. bölgeye yönelik PCR protokolüyle elde edilen ST131 pozitif sonuçlarında ST131 pozitif bulunan 1, 2, 14, 21, 49 nolu izolatların MLST analizi ile sırasıyla ST8712, ST10, ST6834, ST349, ST34 klonundan olduklarının saptanması nedeniyle 19. Bölgeye yönelik PCR protokolü sonuçları dikkate alındı. *pabBspe* genine yönelik PCR protokolü ile 47 suşa ait sonucun yanlış pozitif olduğuna karar verildi. Bu değerlendirme sonucunu tartışma bölümünde kullandığımız referans literatür bilgisi de destekledi.

1 Please select locus/scheme — Order results by —

adk — locus —

Enter query sequences (FASTA format)

```
AATTACCAGGGTAAAAAAGAAAAACCCCTCTAACAAACCTA
TCTCGGTAAAGGAAAAACCCGGGCGGATAAAAAACCCGGGTGTAA
AAGCCCAATCCATCAGAATAAACGGCCTCCGCGCTCAAGGTGCGTGATA
GCTGAATGTCACCGAAATAGAATCGTGTAAAGCGGGGTGTACACACC
CAAGATATCCCGCTGAAAGTTGTGTAGCGGGCGCTCCAAGACCCGG
GTAGGCCCTGGAAGTTCT
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	adk	53	

2 Please select locus/scheme — Order results by —

adk — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
AGTTTAGGATATGGGAACCTGAGATGACGGAGAAAGGAGGTGAGAGCGC
CGGAATGGATACAGAGACGTGATTGTTGCGGTTGGAGTGATGTGAACAGG
GGAGTGCGTTACGGCGTGATGGCTGCGGTGCGGTGGGAGCTGAAGGTTT
GCGACAGGATGTGAGGTCGACTTGTGGATCTTTACCTAGTACACGCTGA
TAATCTACATGATGGTTGTGCGGATATGTCGCGTATTAATAGAGACCAGT
CAATGCTTGCGGAGCGGTGAAATGGAGGTGTG
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	adk	10	

3 Please select locus/scheme — Order results by —

adk — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
TAGGGGGGCGCAGTGGGTGGTCTGGCGGGTGAGGCGGGTTATGCGAA
GGAGCGGAGATTAATGGGATATAGCGCACTTGGCAGTGACGTGTGCG
AGCGTTATGCTATTGTTATTATAATTAGGATAGTGATCAGCGACGTGTG
TCCTGTTGGAGTCGGCTGACTGCAGTATGCGGGACGGTGTGAGCGCTGG
GATGGATGGATAACAATACGTATGAATGTTAGGGAGATATGTGGACGCG
TAGAGGGAGTACGGGGCCGCGACTGAGGGGCGAGGGGAATGAATA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	adk	10	

4 Please select locus/scheme — Order results by —

adk — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
CTGATCGTTGACCGTATCGTCGGTCGCGCGTTCTATGCGCGTCTGGTCG
TGTTTATCACGTTAAATTCAATCCGCCGAAAGTAGAAGGCAAGACGACG
TTACCGGTGAAGAACTGACTACCGTAAAGATGATCAGGAAGAGACCGTA
CGTAAACGTCTGTTGAATACCATCAGATGACAGCACCGCTGATCGGCTA
CTACTCAAAGAAGCAGAAGCGGGTAATACCAATACGCGAAAGTTGACG
GCACCAAGCCGGTTGCTGAAGTTCGCGCTGATTCTTGGAAG
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	adk	10	

5 Please select locus/scheme — Order results by —

adk — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
GTAGTAGCGGAGCATGACGGAATCGCACTCAAAAGAGCATGTGGTGGG
TTCTGGAGCCGAGTGGGTGTTTATAGGTATCGCGTGATGAATGAGTT
GGTGTGTTGGCGCGCTCGTAAGCGGTGGCTATGGGTTTGGCGATGGGTA
GCTTCTGCTTGTGGGAGCAGGCACTGTGTGGTTGGGGTGTATCTTCTG
TTAATTGATAGTACGATGCTATGTGTGTATACAAACGATGCTCCGCG
ATGTGCGGAGCGGCCGCCGATTGGGTG
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	partial	adk	34	

6 Please select locus/scheme — Order results by —

adk — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
AATAAGAGGGGTGTGTTCTGTTGGTAAGTGTGCGTTGCGGGGTACCATGG
GGGTGCTAATAGCGAGGAGGGTATGCCATGCTGTAGAGAGAATCCGGC
TGTGTTGATGGGTTTTAGTGGAATTTCTTTAGTGGATGCTTGTACATG
GGTAGTGGAGCGAGTCTGCTGTTGGATAGGGGTAAAGATGCTTGTATG
GGGTGGGCGCGAGGTGTTGATAGCGAAGGGCTCGGGTGCCGGGCTAAT
GATAG
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	adk	10	

Şekil 16: İzolatların *adk* geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen *adk* allel numaralarına ait ekran görüntüsü. 1: 3,20,28,42,44 nolu izolatların allel numarası:53, 2: 1 nolu izolatın allel numarası: 10, 3: 2 nolu izolatın allel numarası: 10, 4: 14 nolu izolatın allel numarası: 10, 5: 21 nolu izolatın allel numarası: 34, 6: 49 nolu izolatın allel numarası: 10 olarak belirlendi.

1 Please select locus/scheme — Order results by —
 fumC — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 CGGTCTGCCAGATAGCCAGCGGAATTCGTCGTCATGCTGTCCTGCCAGT
 ACTTCATCCGCGCCTGCCGAATGGCGCTCGCTTTCTCTTCAGACAACAA
 GCCTAAATCTTCATTAACCTTTGCCGCTGCGCGCTTGGTTAGCGCCAGCG
 CATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCC
 AGCGAGCGCTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAAT
 CGCTCCCATGAATCTTCTCCCGCCGTAAAAAAA

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	fumC	40	

2 Please select locus/scheme — Order results by —
 fumC — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 ACTTCATCCGCGCCTGACGAATGGCGCTCGCTTTCTCTTCAGACAACAA
 GCCTAAATCTTCATTAACCTTTGCCGCTGACGCTTGGTTAGCGCCAGCG
 CATGAATCAGTGAGGTGGGCATTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCC
 AGCGAGCGTTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAAT
 CGCCCCCATGAATCTTCTCCCGCGCGGTAAAAAAGGACATGTTGCAC
 GTGCGCCGCGCGCGCGCGCGC

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	fumC	11	

3 Please select locus/scheme — Order results by —
 fumC — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 CTAATCTTCATTAACCTTTGCCGCTGACGCTTGGTTAGCGCCAGCGCA
 TGAATCAGTGAGGTGGGCATTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCCAG
 CGAGCGTTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCG
 CCCCCATCGAATCTCCCTCCCGCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCAAG
 GTGATCCTCTTGGCTTGTGCAGGACAAATGCAGCATGCCAGAAACACAAA
 GGGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAAAAGAAATGGAGG

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	fumC	11	

4 Please select locus/scheme — Order results by —
 fumC — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 AGGCTAAACGGCGCAGGGCAGGTGACGAGGTACGTGGTGCCTTATTAGGA
 TACTGAATGAGATGTGAGCATGACAATGGCATAAACGATGGCTTTGGTAT
 GAGATGTGCCGGTTCTTTGTAGTGCGTTAATGGTTGGTAGGACATGAT
 AGCCGGTTGACGCTTGAGAGCGTGGACATATTGACGATGGTTTGTGCGA
 TGACAGTACGTCTGAATGCGCGAATGCGAACGGTGAATACTGTGACGC
 ACTGACATTATAACGTGCATGGACGGTAGTCGACCAGAGTGA

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	partial	fumC	918	

5 Please select locus/scheme — Order results by —
 fumC — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 TCTGCCAGATTGCCAGCGGAATTCGTCGTCATGCTGCTGCCAGTACT
 TCATCCGCGCCTGCCGAATGGCGCTCGCTTTCTCTTCAGACAACAAGCC
 TAAATCTTCATTAACCTTTGCCGCTGCGCGCTTGGTTAGCGCCAGCGCAT
 GAATCAGTGAGGTGGGCATTTCTCCGTCGAAATGCGGAAATGCTCCAGC
 GAGCGTTGAGTTTGTGCGCCCCACAGCTTATCTGCCGGGACATCAATCGC
 CCCCATCGAATCTTCTCTTGGCGTAAAAAATAACACAGTGGTGG

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	fumC	36	

6 Please select locus/scheme — Order results by —
 fumC — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 TTTGACGGTTACTAGTGTGGACGAATGTCACGGCCGCTATTATGGTAAG
 GTGGCGTGTGTTGATCGGGATGGATGTGGACGATTGTAGCACTACG
 TGCTAACGGTATCGTTATAGTTACAGACATACAAATTTAGCGGGCGGTT
 TAACAGATGTGTGGACGTGAGGAGCGCGCTTAATCTGCTAGTATAACTGG
 CACACACAACGAGCACTATCTGGAGCACTCGTATGACGCTCAGACAA
 T

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	fumC	11	

Şekil 17: İzolatların *fumC* geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen *fumC* allel numaralarına ait ekran görüntüsü. 1: 3,20,28,42,44 nolu izolatların allel numarası:40, 2: 1 nolu izolatın allel numarası: 11, 3: 2 nolu izolatın allel numarası: 11, 4: 14 nolu izolatın allel numarası: 918, 5: 21 nolu izolatın allel numarası: 36, 6: 49 nolu izolatın allel numarası: 11 olarak belirlendi.

1 Please select locus/scheme — Order results by —
 gyrB best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 GATCCACCCGAATATCTTCTACTTTTCCACCGAAAAAGACGGTATTGGCG
 TCGAAGTGGCGTTGCAGTGGAAACGATGGCTTCCAGGAAACATCTACTGC
 TTTACCAACAACATTCCGCAGCGTGACGGCGGTACTCACCTGGCAGGTTT
 CCGTGCGGCGATGACCCGTAATCTGAACGCCTACATGGACAAGAAGGCT
 ACAGCAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCGGTGACGATCCGCTGAAAGAC
 GCCAAAAAAAAAAAAAA|

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	gyrB	47	

2 Please select locus/scheme — Order results by —
 gyrB best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 ACTTTATCCGAATTTTTCTACTTTTCCCCCAGCATGACGGAATTGGCG
 TCTAATTTTCCGCTGCCAGACAACCTCTGCTTCGAGGAAAAACAGCTAC
 GGCCTTACCCCCCTCTTCCGCTCTGTGACGAAAGTTCTCACTGGGAG
 GGGGTCCGAGTTGCTTTTACCCGTACCCGAACGGCTATCTGTAGAAA
 GAACGCCACCTCCAAAAAGCCGAGGTGAGGCCGCCCGTCACTTCGCC
 TGAAGACAGAATAAAAAAC|

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	partial	gyrB	737	

3 Please select locus/scheme — Order results by —
 gyrB best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 CGAAGGGGTGTTGTTGGTGGCGAAGGTGCGTGCTGAGAGGGGATGGCCG
 GTCCGGGGGTTAAAGTTAGTAGATTGGAGTTGGGCCGTCGAGGTTTGGG
 GGGCGAGCGGGACGGCGGGTGGCGGGTGGCGGTGGGTGGGGGGGGCA
 CGTGCAGCTACGCGTGGAGCTGGGTATAATTTATGTGGGGGTGCGTGG
 TTGGGGCGGTGAGGCGAGTCGATGGTAGGTTTTATCGTTCGGATTGG
 GGGTGGGAAGAACGAGCGGTGAGGCTGGGGCA|

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	gyrB	4	

4 Please select locus/scheme — Order results by —
 gyrB best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 CGGTGAATACGCGGAAGACTGCGGGAAGCAATGTTTGAGACGAGAGCG
 TTTAGGAGCGGGCACGTAACCGGACGCTGGGGGATTTGGCGTAGCG
 AGAGTGGAGCGGGGCTGCGGACTGAAAAATGATTACCGAGGCTGTCGG
 TATGATATATAATACTTGTGCGGGGGTAGAACCGTAGGCGGCGCGCGCA
 GCGCTGTAGTAGTGTGTCGTCAGGGTGATAAATATTTAGGAGTAATGGC
 G|

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	partial	gyrB	4	

5 Please select locus/scheme — Order results by —
 gyrB best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 ACCGCGGACACTTTATAGGAGTTATCGTCAAATTTACCGCCTGCGTGCA
 GAACGGTCATGATCACTTCCGCCCGCATACGCCCTTTCGGGTGAATA
 CCGGTCGGAATGCCGCGCCGTCGTCTGTACAGAGACAGATTATCGGC
 GTGAATGGTGACGATAATTTCTTACAGTGACCGCGAGCGCTTCGTCGA
 TAGCGTTATCTACCACTCGAAAAACATGTGGTGACAGCCGTCGCTCTT
 TTTTTCTAAAAA|

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	gyrB	39	

6 Please select locus/scheme — Order results by —
 gyrB best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 ATCCACCCGAATATCTTCTACTTCTCCACTGAAAAAGACGGTATTGGCGT
 CGAAGTGGCGTTGCATTGGATGGAACGATGGCTTCCAGGAAAAACATCTAC
 TGCTTTACCAACAACATTCGAACGTGACGGCCGTAATCACCTGGCAGGC
 TTCCGTGCGCGATGACCCGTACCCTGAACGCCATGAGACAAGAAGG
 CTACAGCAAAAAGCCAAAGTCAGCGCCACCGGTGACAATCCGTGAAGGC
 GCGCCAATAAAAAA|

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	partial	gyrB	4	

Şekil 18: İzolatların *gyrB* geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen *gyrB* allel numaralarına ait ekran görüntüsü. 1: 3,20,28,42,44 nolu izolatların allel numarası:47, 2: 1 nolu izolatın allel numarası: 737, 3: 2 nolu izolatın allel numarası: 4, 4: 14 nolu izolatın allel numarası: 4, 5: 21 nolu izolatın allel numarası: 39, 6: 49 nolu izolatın allel numarası: 4 olarak belirlendi.

1 Please select locus/scheme — Order results by —
 icd — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 AACGTCGTGTTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTGTGACCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGTTTAAAGACTGGGGCTACCAACTGGCGCGTGAAGAATTTGGCGGTGAAC TGATCGACGGCGGCCGTGGCTGAGAGTTAAAAACCCGAATACCGGCAAA GAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCACAGAGCCTT TCGTCAAAACAAAAAAAAAAAAA

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	icd	13	

2 Please select locus/scheme — Order results by —
 icd — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 CGTGATATATTGACTCCGCGTCAGGTGTACATATAGTAAGCGAGACTTG GTGCGCTGGCGCACAGCTTCGTGGTGTGAGTCGTGAGTGGACAGAGTGAA CGTGACCGTTATGAACGTAATACAGAGAAGACAACGGATGACAATCATCA TATGTGGAGATACATGCCTGCACGGTCGCTGACTAGTGTGGATCGAGCTT GGCGACGTGACGGGGATCGTGTACGCGGTGCTGCTTTGTGTTGATTATA TATTGAACG

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	icd	8	

3 Please select locus/scheme — Order results by —
 icd — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 GGGCAGTAAGGATAAATGCTTCTTTAATGTGGGTAGCATATATCTGCTA TGTAGTGAGATTTGGCGAAGAGCTGTGCTCTAGTGGTGGCGGTAGTGGGA ATTTTACGGGTGATGATGTGTAGATGTGTGAGGAGCTGAGAGGCGGAATT TAGTGATAGCTCAGTTTTTACATACACGGAACGTGACGCGAGTAATCAC TTAACAGACAGAATCATTGAGCCTGCTCTTGC AAAATGTATACAATTAG

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	icd	8	

4 Please select locus/scheme — Order results by —
 icd — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 CGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTC TGTGACTCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGGAAGTTCACCGAAGGAGCG TTTAAAGACTGGGGCTACCAAGCTGGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAAC TGATCGACGGTGGCCGTGGCTGAGAGTTAAAAACCCGAACACTGGCAAA GAGATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCAACAATCGTC TGTCGGCTGTAAAAAAAAAAAAA

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	partial	icd	8	

5 Please select locus/scheme — Order results by —
 icd — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 CGTCTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTC TGTGACCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGCGCGT TTTAAAGACTGGGGCTACCAAGCTGGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAAC TGATCGACGGCGGCCGTGGCTGAGAGTTAAAAATCCGAATACCGGCAAGA GATCGTCATTAAGACGTGATTGCTGATGCATTCTGCACAACGCTGTC GCGCCAAAAAAAAAAAAA

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	icd	87	

6 Please select locus/scheme — Order results by —
 icd — best match —
 Enter query sequences (FASTA format)
 CTGGTTCGTGCAGCGATCGAATACGCAATTGCTAACGATCGTGACTCTGT GACTCTGGTGCACAAAGGCAACATCATGAAGTTCACCGAAGGAGCGTTTA AAGACTGGGGCTACCAAGCTGGCGCGTGAAGAGTTTGGCGGTGAAC TGATC GACGGTGGCCCGTGGCTGAAAGTTAAAAACCCGAACACTGGCAAGAGAT CGTCATTAAGACGTGATCGCTGATGCATTCTGCAACAGATCGTGTCT TGTCCTCAAAAAAAAAACATACGGGAGAGGGGCTCTGGACAAAATAAAAAA

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	icd	1	

Şekil 19: İzolatların *icd* geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen *icd* allel numaralarına ait ekran görüntüsü. 1: 3,20,28,42,44 nolu izolatların allel numarası:13, 2: 1 nolu izolatın allel numarası: 8, 3: 2 nolu izolatın allel numarası: 8, 4: 14 nolu izolatın allel numarası: 8, 5: 21 nolu izolatın allel numarası: 87, 6: 49 nolu izolatın allel numarası: 1 olarak belirlendi.

1 Please select locus/scheme — Order results by —

mdh — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
GAGTCGAGTATACGGGATAATGCTATGTGTCTACAGTGAAGAACGAGCTG
CGTGAACGCGATCTGCTGTGGTGTAGCCTGAATCACAGCGGTGATCGAGT
CGAGGTGGGGTCCGGGACGGCAGCGCAGCAGGAATGAGTGGAGATGTG
CGAACGAGCTAAGTATTGTGCTGCGGCCCTGGAATATGCGACGCGACC
TGTTGTATATTAAACATCAAGCTGATACGGATGTTATGTGAAGACGCCGA
CAGTAACCGCCGACCTGATT
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	mdh	36	

2 Please select locus/scheme — Order results by —

mdh — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
GATTTTAAATCGTAAAAGGGGTACCATGAATGATTTTCGCGGGCTCGAGGC
ACTACGAGATGCGATCCTTAGCTCTGCGCGTGACGCTTTGAGGATGGCC
ACGCGTGGAGACTCCGCGGATTGATACGTGAGGGGGCGCGTTGTCTAAG
TAATATATTTTTCGGGAGAAGAGTAGCGTATGTGACTCGGCTCTGGACG
GGTAACCAATTGAGGGCGTTAATAGTTATTCACCGTTATTGCCGTTGA
TTATTGACGCTGCTCGCAATTGGACGGGTA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	mdh	8	

3 Please select locus/scheme — Order results by —

mdh — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
CCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGTGCACTGCAGGGCG
AACAAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACGGTCAGTACGCC
CGTTTCTTCTCTCAACCGCTGCTGCTGGTAAAAACGGCGTGAAGAGCG
TAAATCTATCGGTACCCTGAGCGCATTGAACAGAACGCGCTGGAAGGTA
TGCTGGATACGCTGAAGAAAGATATCGCTCTGGGAGAGGTTGTGTTAAA
AAAAAAAAAAAAA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	mdh	8	

4 Please select locus/scheme — Order results by —

mdh — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
CCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGTGCACTGCAGGGCG
AACAAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACGGTCAGTACGCC
CGTTTCTTCTCTCAACCGCTGCTGCTGGTAAAAACGGCGTGAAGAGCG
TAAATCTATCGGTACCCTGAGCGCATTGAACAGAACGCGCTGGAAGGTA
TGCTGGATACGCTGAAGAAAGATATCGCTCTGGGAGAGGTTGTGTTAAA
AAAAAAAAAAAAA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	mdh	8	

5 Please select locus/scheme — Order results by —

mdh — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
CTGTCTATGGGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGCGC
ACTGCAGGGCGAACAAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACG
GTCAGTACGCACGTTTTCTCTCAACCGCTGCTGCTGGTAAAAACGGC
GTGGAAGAGCGTAAATTATCGGCACCTGAGCGCATTGAACAGAACGC
GCTGGAAGGTATGCTGGATACGCTGAAGAAAGATTCTGGGGGGTGGTTA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	mdh	67	

6 Please select locus/scheme — Order results by —

mdh — best match —

Enter query sequences (FASTA format)

```
GGCCAGGCAGCTGCACGTTTTGGTCTGTCTCTGGTTCGTGCACTGCAGGG
CGAACAAGGCGTTGTCGAATGTGCCTACGTTGAAGGCGACGGTCAGTACG
CCCGTTTCTTCTCTCAACCGCTGCTGCTGGTAAAAACGGCGTGAAGAG
CGTAAATCTATCGGTACCCTGAGCGCATTGAACAGAACGCGCTGGAAGG
TATGCTGGATACGCTGAAGAAAGATATCGCTCTGGGAGAGGTTGTGTTAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	mdh	8	

Şekil 20: İzolatların *mdh* geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen *mdh* allel numaralarına ait ekran görüntüsü. 1: 3,20,28,42,44 nolu izolatların allel numarası:36, 2: 1 nolu izolatın allel numarası: 8, 3: 2 nolu izolatın allel numarası: 8, 4: 14 nolu izolatın allel numarası: 8, 5: 21 nolu izolatın allel numarası: 67, 6: 49 nolu izolatın allel numarası: 8 olarak belirlendi.

1 Please select locus/scheme — Order results by —

purA ▼ best match ▼

Enter query sequences (FASTA format)

```
TGGCCAAGCGTGCAGATTAGCTCAGGGTAGGGGATCAGTAGCGTGCAGG
ATACAAGATGGTAGACATCCAATAGAGGGCTGTACGTGACAACATTTCAA
TTCTTACTTTATAGGATGGGAGTGATCCGCCGATGAAACGGGAGTTGTG
ACAGCTTGAGCGTTGGGTAAGTCGGTATGTGCAATAGGGGACCTATTGA
CGAGTAGCGGCTGACGACAAGAGGTGGTATGGCGGGGGTGATGAGGGCGC
GGGTGT
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	purA	28	

2 Please select locus/scheme — Order results by —

purA ▼ best match ▼

Enter query sequences (FASTA format)

```
TGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAG
GTCCGTTCCCGACCGAACTGTTTGATGAAACTGGCGAGTTCTCTGCAAG
CAGGGTAACGAATTCGGCGCAACTACGGGGCGTCGTGTCGTACCGGCTG
GCTGGACACCGTTGCCGTTCTGTCGTGCGGTACAGCTGAACTCCCTGTCTG
GCTTCTGCCTGACTAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAAA
CTCTGCTGTGTGTCAA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	purA	8	

3 Please select locus/scheme — Order results by —

purA ▼ best match ▼

Enter query sequences (FASTA format)

```
TGATTACGTTCTGGGTATCCTCAAAGCTTACTCCACTCGTGTAGGTGCAG
GTCCGTTCCCGACCGAACTGTTTGATGAAACTGGCGAGTTCTCTGCAAG
CAGGGTAACGAATTCGGCGCAACTACGGGGCGTCGTGTCGTACCGGCTG
GCTGGACACCGTTGCCGTTCTGTCGTGCGGTACAGCTGAACTCCCTGTCTG
GCTTCTGCCTGACTAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAAA
CTCTGTGTGTGTCCCGAAGGGGGGGAGAA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	purA	8	

4 Please select locus/scheme — Order results by —

purA ▼ best match ▼

Enter query sequences (FASTA format)

```
TTCCCGACCGAACTGTTTGATGAAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGG
TAACGAATTCGGCGCAACTACGGGGCGTCGTGTCGTACCGGCTGGCTGG
ACACCGTTGCCGTTCTGTCGTGCGGTACAGCTGAACTCCCTGTCTGGCTTC
TGCTTGACTAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAAACTCTG
CGTGCTTTTCCCTAAGGGAGACCTGTGAACCATCTATTACTAACCTAT
CCTCTCTTCACTTCTCAGAAAA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	purA	8	

5 Please select locus/scheme — Order results by —

purA ▼ best match ▼

Enter query sequences (FASTA format)

```
CCCGACTGAACTGTTTGATGAAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAGGGTA
ACGAATTCGGCGCAACTACGGGTCGTGTCGTACCGGCTGGCTGGAC
ACCGTTGCCGTTCTGTCGTGCGGTACAGCTGAACTCCCTGTCTGGCTTCG
CCTGACCAAGCTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTGAACTCTGCG
TGCTGTTCCGCTAAGGAAAGACCTCTACTGCTTCTACCTTACGCCAA
AACCTTATAAA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	purA	16	

6 Please select locus/scheme — Order results by —

purA ▼ best match ▼

Enter query sequences (FASTA format)

```
CGTTCCCGACCGAACTGTTTGATGAAACTGGCGAGTTCCTCTGCAAGCAG
GGTAACGAATTCGGCGCAACTACGGGGCGTCGTGTCGTACCGGCTGGCT
GGACACCGTTGCCGTTCTGTCGTGCGGTACAGCTGAACTCCCTGTCTGGCT
TCTGCCTGACTAACTGGACGTTCTGGATGGCCTGAAAGAGGTTAAACTC
TGCGTGCTTTTCCCTAAGGAAACCCCTGACATCGCTACTCTCTTAACA
AAAAAAA
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	purA	8	

Şekil 21: İzolatların *purA* geni PCR ürünlerinin sekanslarına karşılık gelen *purA* allel numaralarına ait ekran görüntüsü. 1: 3,20,28,42,44 nolu izolatların allel numarası:28, 2: 1 nolu izolatın allel numarası: 8, 3: 2 nolu izolatın allel numarası: 8, 4: 14 nolu izolatın allel numarası: 8, 5: 21 nolu izolatın allel numarası: 16, 6: 49 nolu izolatın allel numarası: 8 olarak belirlendi.

4 Please select locus/scheme — Order results by —

recA ▼ best match ▼

Enter query sequences (FASTA format)

```
CACTCTATCTCACAACAATAACAAAAACTACAACACTCAACACACACCT
ATAACAACAACAATAAACACACCTCAACACTCTATTTAACTACAACACA
ACAACCCCCCACTTCTCAATCTCCCCATACTACATAATCCACCCCATTATA
CACTCTCATCTATCTACATCCATTACTATTCTTTCCACCAATAACAAT
CAACCTATCTACATCATACCATCCATCAACTCCATCAACTAACATAAATA
TCTCTCCTTCATACTACCTACCATT
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	partial	recA	2	

5 Please select locus/scheme ——— Order results by —

recA ▾ best match ▾

Enter query sequences (FASTA format)

```
GGTGTGTCTGTCTCTTGGTCCGTGCGCGGGCCCTGCTGCTCTCGTGTCTC
CTCGTGGCGCTTCCCTCTCTTGTGCTTCTCGTCCGGTGGCGGGCTGTTGTGGG
TGGGTGTGTTGTGGCTGCGCGGGTCTGCTCTCTCCGTCTGTGCGCGTTG
TGGCGGTGGCGGTGTGCGGGGTGCGGGCTGGTGTGTCGCCGCGCGCTGG
CGTGTCTGCGCTGGGGGTGTGCGCCGGTGTGCGCTCGGGTTTGGCGGGCT
GTGGGGTCTGCTGTGGGCTGTTGCGTGGG
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query	exact	recA	4	

6 Please select locus/scheme — Order results by —

recA ▾ best match ▾

Enter query sequences (FASTA format)

```
CACCTGCAGCGTCAGCGTGGTTTTACCGGAAGATTCGGTCCGAATATTT
TTTTAGAAAAAAAAAAAAAATACCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCCCTCTCTT
CTCCCTCTCTCTCTCCCTTCCCTTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTT
CTTCTCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
TCCCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
CCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT
```

Contig	Match	Locus	Allele	Differences
Query partial	recA	2		

55

1 .ST (Achtman) [Select](#)

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored.

adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA
53	40	47	13	36	28	29

Options Search: [Exact or nearest match](#) Order by: [ST](#) ascending Display: [25](#) records per page [?](#)

Exact matches found (7 loci).

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	clonal complex
131	53	40	47	13	36	28	29	ST131 Cplx

4 LST (Achtman) [Select](#)

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored.

adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA
10	918	4	8	12	8	2

Options Search: [Exact or nearest match](#) Order by: [ST](#) ascending Display: [25](#) records per page [?](#)

Exact matches found (7 loci).

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	clonal complex
6834	10	918	4	8	12	8	2	

2 ST (Achtman) [Select](#)

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored.

adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA
10	11	737	8	8	8	2

Options Search: [Exact or nearest match](#) Order by: [ST](#) ascending Display: [25](#) records per page [?](#)

Exact matches found (7 loci).

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	clonal complex
8712	10	11	737	8	8	8	2	

5 ST (Achtman) [Select](#)

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored.

adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA
34	36	39	87	67	16	4

Options Search: [Exact or nearest match](#) Order by: [ST](#) ascending Display: [25](#) records per page [?](#)

Exact matches found (7 loci).

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	clonal complex
349	34	36	39	87	67	16	4	ST349 Cplx

3 LST (Achtman) [Select](#)

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored.

adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA
10	11	4	8	8	8	2

Options Search: [Exact or nearest match](#) Order by: [ST](#) ascending Display: [25](#) records per page [?](#)

Exact matches found (7 loci).

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	clonal complex
10	10	11	4	8	8	8	2	ST10 Cplx

6 ST (Achtman) [Select](#)

Please enter your allelic profile below. Blank loci will be ignored.

adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA
10	11	4	1	8	8	2

Options Search: [Exact or nearest match](#) Order by: [ST](#) ascending Display: [25](#) records per page [?](#)

Exact matches found (7 loci).

1 record returned. Click the hyperlink for detailed information.

ST	adk	fumC	gyrB	icd	mdh	purA	recA	clonal complex
34	10	11	4	1	8	8	2	ST10 Cplx

Şekil 23: İzolatların allel numaraları ile belirlenen sekans tiplerini gösteren ekran görüntüsü. 1: 3,20,28,42,44 nolu izolatların sekans tipi:ST131, 2: 1 nolu izolatın sekans tipi: ST8712, 3: 2 nolu izolatın sekans tipi: ST10, 4: 14 nolu izolatın sekans tipi: ST6834, 5: 21 nolu izolatın sekans tipi: ST349, 6: 49 nolu izolatın sekans tipi: ST34.olarak belirlendi.

Tablo 20. İzolatların 7 gen bölgesine ait allel numaraları ve sekans tipleri

Örnek no	Allel Numaraları							ST
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>gyrB</i>	<i>icd</i>	<i>mdh</i>	<i>purA</i>	<i>recA</i>	
3	53	40	47	13	36	28	29	ST131
20	53	40	47	13	36	28	29	ST131
28	53	40	47	13	36	28	29	ST131
42	53	40	47	13	36	28	29	ST131
44	53	40	47	13	36	28	29	ST131
1	10	11	737	8	8	8	2	ST8712
2	10	11	4	8	8	8	2	ST10
14	10	918	4	8	12	8	2	ST6834
21	34	36	39	87	67	16	4	ST349
49	10	11	4	1	8	8	2	ST34

4.10. İzolatların Antibiyotiklere Dirençleri, Enzim Tipleri, ERIC Kümeleri ve MLST Analiz Sonuçlarının Değerlendirilmesi

ST131 olarak belirlenen izolatların 3'ünde (28, 42, 44) kinolon grubu antibiyotiklerden siprofloksasine, 1'inde (28) ise karbapenem grubu antibiyotiklerden ertapeneme direnç bulundu. İzolatların ERIC tipi incelendiğinde ST131 olan izolatların hiç birisinin aynı küme içinde yer almadığı belirlendi. ERIC PCR deneylerinden elde edilen veriler ile yapılan değerlendirmelerde ST131 olarak belirlenen izolatların % benzerlik oranları incelendiğinde 3, 20, 28, 42 ve 44 nolu izolatların arasındaki benzerlik oranının %40 olduğu, 20, 28, 42 ve 44 nolu izolatlar arasındaki benzerlik oranının %46 olduğu, 20, 42 ve 44 nolu izolatlar arasındaki benzerlik oranının %51 olduğu bulundu (Şekil 6). ST131 olarak belirlenen 5 izolattan 4'ünde (20, 28, 42, 44) *bla*_{CTX-M} tipi GSBL enziminin bulunduğu sadece 1'inde (3) *bla*_{CTX-M} enzimin bulunmadığı tespit edildi. Ayrıca 1 ve 2 nolu izolatların aynı ERIC kümesi içerisinde yer aldıkları, farklı direnç profili ve farklı sekans tiplerine sahip oldukları bulundu. Diğer (14, 21, 49) izolatların sekans tipleri ve ERIC kümelerinin de farklı olduğu bulundu (Tablo 21).

Tablo 21. MLST analizi yapılan izolatların direnç profilleri, ERIC kümeleri, GSBL enzim grupları

Örnek no	Antibiyotik direnç profili	ERIC kümesi	GSBL tipi	ST
3	AM,CTX,CAZ,CRO,FEP,ATM,AMC	W	<i>bla_{TEM}</i>	131
20	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,SXT	C2	<i>bla_{TEM},bla_{CTX-M}</i>	131
28	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,ETP,AMC,TPZ,CIP	Q	<i>bla_{CTX-M}</i>	131
42	AM,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ,CN,CIP	L	<i>bla_{TEM},bla_{CTX-M},bla_{OXA}</i>	131
44	AM,CRO,CTX,FEP,AMC,TPZ,AK,CIP,SXT	I	<i>bla_{TEM},bla_{CTX-M}</i>	131
1	AM,CRO,CAZ,CTX, FEP,ATM,CIP, SXT	V	<i>bla_{TEM},bla_{CTX-M}</i>	8712
2	AM,FOX,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,SXT	V	<i>bla_{TEM}</i>	10
14	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,AMC,SXT	δ2	<i>bla_{TEM}</i>	6834
21	AM,FOX,CAZ,CTX,AMC,TPZ,SXT	G2	<i>bla_{TEM},bla_{CTX-M}</i>	349
49	AM,FOX,CRO,CAZ,CTX,FEP,ATM,AMC,TPZ	F1	<i>bla_{TEM},bla_{CTX-M}</i>	34

5. TARTIŞMA

Dünyadaki sağlıklı kişilerin bağırsak mikrobiyotasındaki GSBL üreten *E.coli* prevalansı gittikçe artmaktadır. Antibiyotiklere dirençli kommensal *E.coli*'lerin oranı, antibiyotik kullanımına bağlı oluşan seçici etki ve patojenlerdeki gelişebilecek direnç öngörmek için bir gösterege olarak kabul edilir. *E.coli*'ler bakteri toplulukları içinde direnç genlerinin vericisi ve alıcısı olarak davranır ve diğer bakterilerden direnç genleri alabilir, aynı zamanda direnç genlerini diğer bakterilere de aktarabilir *E.coli*'deki antimikrobiyal direnç, hem insanlar hem de hayvanlar için dünya çapında önemli bir halk sağlığı sorunu olarak kabul edilir. Dünyanın çeşitli bölgelerinde GSBL üreten *E.coli* taşıyıcılığı, bakterinin bulaş yollarını ve kolonizasyonu önlemek, etkili kontrol yöntemlerini geliştirmek amacıyla araştırılmaktadır. (Poirel et al., 2018).

Çalışmamızda 161 gönüllü katılımcının, 50'sinin (%31, 05) GSBL üreten *E.coli* taşıdığı bulundu. Bakterilerin tanımlanması rutin yöntemler ve MALDI-TOF MS ile yapıldı. İzolatlar *uidA* gen bölgesine yönelik tasarlanmış bir PCR yöntemiyle de tanımlandı.

E.coli'lerin moleküler yöntemlerle tanımlanmalarına yönelik bir çok çalışma yapılmıştır. El-Badawy ve arkadaşları tarafından 16S rRNA analizlerine göre *E.coli* olarak belirlenen 61 izolatın 52'si *uidA* gen bölgesine yönelik PCR testiyle de *E.coli* olarak saptanmıştır(El-Badawy et al., 2017). Choi ve arkadaşları çeşitli gıda maddelerinden izole edilen bakteriler arasındaki *E.coli* izolatlarını *Shigella* izolatlarından ayırmak için *uidA* genine yönelik PCR deneyini uygulamışlardır (Choi et al., 2018). Tchesnokova ve arkadaşları *E.coli* ST131 klonunu araştırdıkları multipleks real-time PCR çalışmalarında, *E.coli* tanımlaması için *uidA* genine yönelik primerleri kullanarak izolatların hepsini *E.coli* olarak tanımlamışlardır. (Tchesnokova et al., 2015). Molina ve arkadaşları çalışmalarında *E.coli* izolatlarının moleküler olarak tespit edilmesinde *uidA* gen bölgesine yönelik PCR deneyi tasarlamışlardır ve bu yöntemle *E.coli* izolatlarının %87,5 oranında tanımlanabildiğini bildirmişlerdir (Molina et al., 2015). Çalışmamızda *uidA* gen bölgesine yönelik PCR deneyleri ile 50 izolatın tümünün PCR testi pozitif bulundu. Böylece izolatların tanımlanmaları PCR yöntemiyle doğrulandı.

Farklı ülkelerde yapılan çalışmalarda, GSBL pozitif *E.coli* oranlarının %10,5-%35,4 arasında değiştiği görülmektedir. (Martischang et al., 2021, Gallegos-Miranda et al., 2021, Kazemian et al., 2019). Tayvan'da sağlıklı bireylerde yapılan bir çalışmada, GSBL *E.coli* taşıyıcılığı %2 bulunmuş, diyabet, kronik böbrek hastalığı veya kolonda polip olması gibi faktörlerin taşıyıcılık için risk faktörü olduğu, daha önce antibiyotik kullanımının, kaynamamış su kullanımının, hayvanlarla ilişkili yaşamın, taşıyıcılık riskini arttırmadığı bildirilmiştir (Wu et al., 2019). Altmış iki makalenin değerlendirildiği 29872 sağlıklı kişinin verilerinin incelendiği bir araştırmada, GSBL taşıyıcılığının Güney Asya'da %27, Batı Pasifik'te %24.5, Afrika'da %21.4, Doğu Akdeniz'de %20.6, Avrupa ülkelerinde %4-7.5 oranlarında olduğu bildirilmiştir. Ülke bazında ise, taşıyıcılık oranları Tanzanya'da %76.3, Vietnam'da %75.1, Laos'da %70.2, Tayland'da %56.1, Mısır'da %45.1, Lübnan'da %38.5, Avustralya'da %1.9, ABD'de %3.5 olarak rapor edilmiştir (Bezabih et al., 2021).

Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda GSBL üreten *E.coli* fekal taşıyıcılığıyla ilişkili olabilecek faktörler değerlendirildiğinde, uzun süre hastanede yatış (Friedmann et al., 2009) kadın cinsiyet (Pitout et al., 2007, Friedmann et al., 2009), mesane kateterizasyonu, 65 yaş üstünde olmak, (Ben-Ami et al., 2009) diyabet, tekrarlayan idrar yolu enfeksiyonu geçirmek ve daha önce çeşitli antibiyotikleri kullanmak gibi özelliklerin risk faktörleri olduğu gösterilmiştir (Kurt Azap et al., 2007). Son 20 yılda ülkemizde yapılan çalışmalarda GSBL üreten *E.coli* oranları %3-%35 arasında bulunmuştur (Altan AKSOY et al., 2005, Gür et al., 2008, Bayraktar, 2018). Ülkemizde ve dünyada yapılan çalışmaların büyük bir kısmının hastanede yatan ve ayaktan tedavi alan kişileri kapsadığı görülmektedir (Kaya et al., 2013, Ndir et al., 2016). Alpay ve arkadaşları üriner sistem enfeksiyonlu hastalardan izole edilen *E.coli* suşlarında GSBL pozitiflik oranını %27 olarak saptamışlardır (Alpay et al., 2017). Hazirolan ve arkadaşları hastaneye başvuran hastalarda yaptıkları GSBL üreten *Enterobacteriaceae* taşıyıcılığını %34,3 olarak belirlemişlerdir. İzole edilen bakterilerin %94,1'ini *E.coli* olarak tanımlamışlardır (Hazirolan et al., 2018). Başka bir çalışmada hastanede kan kültürlerinden izole edilen *E.coli* suşlarındaki GSBL pozitiflik oranı %35 olarak bulunmuştur (Bayraktar, 2018). Ülkemizde yapılan çalışmalarda GSBL üreten *E.coli* fekal taşıyıcılığının risk faktörleri olarak; 60

yaşından büyük olmak, diyabet, tekrarlayan üriner system enfeksiyonu (Çakir Erdoğan et al., 2017) kronik karaciğer yetmezliği, kronik böbrek yetmezliği, diyabet, malignite, yakın zamanda hastaneye yatış ve yakın zamanda antibiyotik kullanımı bildirilmiştir (Kurt Azap et al., 2007, Çakir Erdoğan et al., 2017). Bunun yanısıra bazı çalışmalarda erkek cinsiyetin (Küçükbasmacı, 2009), bazı çalışmalarda ise kadın cinsiyetin GSBL üreten *E.coli* fekal taşıyıcılıkta risk faktörü olduğu bildirilmiştir (Çakir Erdoğan et al., 2017, Friedmann et al., 2009, Pitout et al., 2007).

Çalışmamızda bulduğumuz %31,05 GSBL pozitif *E.coli* oranı ülkemizden bildirilen oranlara yakındır, bu oranın klinik örneklerden izole edilen GSBL pozitif *E.coli* oranlarına yaklaşması dirençli suşların toplum içinde yaygınlaştığını gösterir. Ayrıca çalışmamızda cinsiyet, hastaneye yatış öyküsü, kronik hastalığa sahip olma, evcil hayvan besleme, yakın zamanda antibiyotik kullanım gibi özelliklerin GSBL üreten *E.coli* taşıyıcılığına etkisi istatistiksel olarak değerlendirilmiş, bu özelliklerin risk faktörü olmadığı bulunmuştur.

GSBL üreten bakterilerdeki çoklu antibiyotik direnci, bu bakterilerin hızla yayılmasına ve oluşturdıkları enfeksiyonların tedavisinin zorlaşmasına neden olmaktadır. Bu durum hem insan sağlığı için hem de ekonomik olarak oldukça önemli ve üzerinde çalışılması gereken bir konudur. *E.coli* suşları insandan insana doğrudan temas, hayvan salgılarıyla temas veya besin zincirine bulaşarak, hayvanlar ve insanlar arasında yayılabilmektedir. Ayrıca *E.coli*'ler hem tıp hem de veterinerlik alanında tedavi başarısızlıklarına yol açan direnç genlerinin büyük bir kısmına sahip olabilirler. Son yıllarda *E.coli* izolatlarında artan sayıda direnç geni tanımlanmıştır ve bu direnç genlerinin çoğunun horizontal yolla kazanıldığı bildirilmiştir. (Poirel et al., 2018). GSBL enzimleri penisilinler, 1-4. kuşak sefalosporinler, monobaktamları hidrolize eder, (sefamisinler ve karbapenemler etkilenmez) beta-laktamaz inhibitörleri ile inaktive olurlar. Ayrıca bu enzimleri taşıyan bakteriler diğer antibiyotik gruplarına (aminoglikozidlere, trimetoprim-sülfametoksazole ve kinolonlar gibi) dirençli olabilirler. Yurtiçi ve yurtdışında GSBL üreten *E.coli* suşlarının antibiyotiklere direnç profillerinin araştırıldığı çalışmalarda, izolatların genellikle karbapenem ve aminoglikozid gruplarına duyarlı oldukları bildirilmiştir. Meksika'da yapılan bir çalışmada, GSBL üreten *E.coli* suşlarının meropeneme %98, siprofloksasine %88, trimetoprim-sulfametoksazole %72, gentamisine %58 ve amikasinine %14 oranında

duyarlı olduğu bildirilmiştir (Gallegos-Miranda et al., 2021). Yine son yıllarda yapılan bir çalışmada GSBL üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin en duyarlı oldukları antibiyotiklerin sırasıyla ertapenem, amikasin ve siprofloksasin olduğu bildirilmiştir (Subramanya et al., 2021).

Ülkemizde yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde, Kurt Azap ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, GSBL üreten *E.coli* izolatlarının tümü imipenem, meropenem %86'sı amikaseine, %67'si piperasilin-tazobaktama, %43'ü gentamisine, %39'u siprofloksasine duyarlı bulunmuştur (Kurt Azap et al., 2007). Son yıllarda ülkemizde yapılan çalışmalara bakıldığında GSBL üreten *E.coli* suşlarının en duyarlı oldukları antibiyotik gruplarının karbapenemler, aminoglikozidler olduğu görülmektedir. Bununla birlikte florokinolonlar, aminoglikozidler, trimetoprim-sülfametoksazol, piperasilin-tazobaktam ve karbapenem grubu antibiyotiklere karşı direnç gelişiminde bir artış olduğu gözlenmektedir. (Görgeç et al., 2015, Kürekci et al., 2017, Hazirolan et al., 2018).

DSÖ-Orta Asya ve Avrupa Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Ağı (CAESAR) 2021 raporuna göre Türkiye'deki invaziv enfeksiyonlardan üretilen *E.coli* izolatlarının aminopenisiline %74.8, üçüncü kuşak sefalosporinlere %50.2, florokinolonlara %50.9, karbapenemlere %4.8, aminoglikozidlere %24, kombine direnç (3.kuşak sefalosporin+ florokinolon+ aminoglikozid) %15.9 oranında dirençli olduğu yayınlanmıştır (WHO, 2021)

Çalışmamızda GSBL üreten 50 *E.coli* izolatının tümü ampisiline, %82-94, 3.kuşak sefalosporinlere, %68'i sefepime, %76'sı aztreonama, %4'ü ertapeneme, %78'i amoksisilin-klavulanik asite, %42'si piperasilin-tazobaktama, %6'sı amikaseine, %14'ü gentamisine, %38'i siprofloksasine dirençli, tümü meropenem ve imipeneme duyarlı bulundu. Aminoglikozid ve kinolon direnç oranlarının Ulusal *E.coli* direnç raporundaki oranlardan düşük olduğu görüldü.

GSBL direnç genlerinin en sık saptanan tipleri TEM, CTX-M, OXA, SHV tipi enzimlerdir (Castanheira et al., 2021). Ülkemizde Çiçek ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden izole edilen 404 GSBL pozitif *E.coli* suşundaki en yaygın enzim türünün CTX-M olduğu, bunu sırasıyla TEM ve SHV enzimlerinin izlediği bulunmuştur. CTX-M üreten *E.coli*'lerin büyük bir kısmının idrar örneklerinden izole edilen suşlar olduğu bildirilmiştir (Copur Cicek et al., 2013).

Kürekçi ve arkadaşları Asi nehrinden ürettikleri GSBL pozitif *E.coli*’lerde %68 oranında CTX-M tipi beta laktamaz enzimi saptamışlar ve izolatların hiçbirinde SHV ve OXA direnç genlerinin bulunmadığını bildirmişleridir (Kürekci et al., 2017). Görgeç ve arkadaşları hastane kökenli GSBL üreten *E.coli* izolatlarında en yüksek oranda CTX-M tipi enziminin olduğunu ve bunu sırasıyla TEM, OXA, PER ve SHV tipi enzim oranlarının izlediğini, 76 izolatın 25’inde TEM ve CTX-M enzimlerinin birlikte bulunduğunu bildirmişlerdir (Görgeç et al., 2015). Başka bir çalışmada 203 adet GSBL pozitif *E.coli* izolatının %83,5’inde CTX-M enzimi bulunmuştur (Aktaş et al., 2017). Hazırolan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada *E.coli* izolatlarında en yaygın GSBL direnç geninin CTX-M (%98) olduğunu bulunmuşlardır. Başka bir çalışmada, 100 GSBL pozitif *E.coli* izolatında %92 CTX-M, %70 TEM, %21 SHV ve %3 oranında OXA enzimleri bulunmuştur. Bu çalışmada *E.coli*’lerin %83’ü idrar kültüründen izole edilmiştir (Bektaş et al., 2018). Gür ve arkadaşlarının hastanede yatan hastalara ait klinik örneklerden üretilen bakterilerdeki en yaygın direnç geninin CTX-M türevleri olduğunu ve bunu TEM direnç geninin izlediğini rapor etmişlerdir (Gür et al., 2008). Bektaş ve arkadaşlarının çeşitli klinik örneklerden izole edilen GSBL pozitif 100 *E.coli* izolatıyla yaptıkları çalışmada izolatların %92’sinde CTX-M, %70’inde TEM, %21’inde SHV ve %3’ünde OXA-2 enzimi saptamışlar, PER, VEB ve GES enzimlerine hiçbir suşta rastlamamışlardır (Bektaş et al., 2018).

Dünya genelinde yapılan çalışmalara bakıldığında ülkemizde olduğu gibi en yaygın GSBL direnç enziminin CTX-M olduğu görülmektedir. Çalışmalarda genellikle hastanede yatan ya da ayakta tedavi için hastanelere başvuran ve diğer sağlık kuruluşlarındaki hastalardan izole edilen *E.coli* suşları kullanılmıştır (Fang et al., 2008, Dallenne et al., 2010, Gallegos-Miranda et al., 2021).

Çalışmamızda GSBL üreten *E.coli* suşlarının %82’sinde TEM, %68’inde CTX-M ve %10’unda OXA genleri, %40’ında TEM ve CTX-M, %10’unda TEM, CTX-M ve OXA genleri birlikte bulundu. Sonuçlarımız TEM tipi gen oranının yüksek olması bakımından ülkemizde yapılan çalışma sonuçlarından farklılık gösterdi. Bu sonucun çalışmaya aldığımız izolatların klinik izolatlar değil, toplum kaynaklı izolatlar olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Örneklerimizde SHV geninin bulunmaması ülkemizde yapılan bazı çalışma sonuçlarıyla (Copur Cicek et al., 2013),

PER, GES, VEB genlerinin saptanamama sonucu ise Bektaş ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma sonucuyla uyumlu bulundu (Bektaş et al., 2018).

PCR tabanlı yöntemler arasında, ERIC PCR, farklı suşları ayırt etmek için basit, kesin ve uygun maliyetli bir genotipleme teknolojisidir. ERIC dizileri, *E.coli* dahil *Enterobacteriaceae* familyası üyelerindeki çok sayıda bakteri genomunda bulunur. ERIC PCR yöntemi kullanılarak *E.coli* izolatları arasındaki genetik ilişki araştırılabilir. Yapılan bir çalışmada çeşitli klinik örneklerden elde edilen 351 *E.coli* izolatı içerisinde kolistine dirençli olan 38 izolata ERIC PCR yöntemi uygulanmış ve izolatların 36 kümeye ayrıldığı bildirilmiştir. İzolatlar'ın 4'ünün aynı paterne sahip olduğu, diğer izolatların genetik çeşitlilik gösterdiği bulunmuştur (Moosavian & Emam, 2019). Mozambik'te üniversite öğrencilerinin fekal kolonizasyonunun araştırıldığı bir çalışmada, 35 *E.coli* izolatının ERIC PCR ile tiplendirilmesi sonunda izolatlar 15 kümede toplanmış ve izolatların benzerliklerinin az olduğu belirtilmiştir (Chirindze et al., 2018). İran'da sağlıklı kişilerde GSBL üreten *Enterobacterales* üyeleriyle olan fekal taşıyıcılık araştırılmış, izole edilen *E.coli*'lerin ERIC PCR ile genetik ilişkisinin bulunmadığı bildirilmiştir (Habibzadeh et al., 2022).

Çeşitli klinik örneklerden izole edilen çoklu ilaç dirençli 41 *E.coli* izolatı, ERIC-PCR ile benzerlik oranı % 60 olarak seçilerek 14 kümeye ayrılmış, bu izolatların 22'sinin GSBL ürettiği bildirilmiştir, MDR *E.coli* izolatlarının önemli ölçüde klonal heterojenite sergilediği rapor edilmiştir. Klonal olarak benzer izolatların antibiyotik duyarlılık profilleri veya β -laktamaz enzim üretimlerinin farklı olduğu bildirilmiştir (Jena et al., 2017) Mwanza ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada çiftçilik, hayvancılık ve sebze üretimi yapılan bölgelerden topladıkları gübre, sebze ve balık numunelerinden izole edilen 48 *E.coli* izolatı % 90 benzerlik oranı baz alınarak 9 farklı kümeye ayrılmıştır. Bu çalışma, suşların kontaminasyon yoluyla insanlara geçebileceğini ve bu durumun mikrobiyal sağlık riski potansiyelini göstermiştir (Mwanza et al., 2021). ERIC-PCR ile yakınlık ilişkilerinin araştırıldığı çalışmalarda farklı klinik örneklerden izole edilen *E.coli*'lerin büyük heterojenlik gösterdiği rapor edilmiştir (Mun'im et al., 2014, Ramazanzadeh et al., 2012, El-Badawy et al., 2017). Yapılan bir çalışmada, yeni doğan yoğun bakım ünitesinden toplanan örneklerden izole edilen *E.coli*'lerin genetik olarak benzer oldukları ve ortaya çıkan bir salgından sorumlu oldukları ERIC-PCR ile belirlenmiştir (Shakil et al., 2010). Bir üniversite

hastanesinde yatan kanser hastalarının idrar örneklerinden izole edilen *E.coli* suşları arasındaki benzerliğin ERIC-PCR ile araştırıldığı diğer bir çalışmada izolatlar arasında yüksek düzeyde genetik yakınlık bulunmuştur. İzolatlar bu çalışmada üç ana kümeye ayrılmışlardır (Mahmoud et al., 2020). Bu sonuçlara göre yoğun bakım üniteleri ya da hastaneler gibi belirli bölgelerden izole edilen suşların genetik olarak benzer bulunmaları aynı suşun yayılarak enfeksiyona yol açtığını düşündürmektedir.

Çalışmamızda, 50 izolatın ERIC PCR ile elde edilen bant profilleri %85 benzerlik oranına göre değerlendirildiğinde, izolatlar 30 kümede toplanmışlardır. Kümeler içindeki izolatlar arasında benzerlik oranları $\geq$ %95 ve üzeri olanlar aynı suş olarak kabul edildi. Buna göre A kümesindeki iki izolat (22, 23), P kümesindeki iki izolat (32, 39), R kümesindeki üç izolat (31, 35, 36), V kümesindeki iki izolat (1, 2) ve X kümesindeki iki izolatın (11, 4) birbirlerine benzerlik oranları $\geq$ %95'di. Böylece bu kümelerdeki izolatların aynı klondan oldukları sonucuna varıldı. P kümesindeki iki izolatın aynı enzim tiplerini (TEM+CTX-M), aynı direnç profilini sergilediği görüldü. ERIC PCR sonucuna göre izolatlar arasında genetik heterojenlik olduğu, benzer izolatların az sayıda bulunduğu saptandı. Bu sonuç, GSBL üreten *E.coli* lerin farklı kaynaklardan kazanıldığını düşündürdü. Bulduğumuz enzim gruplarının alt tipleri olanaklar dahilinde belirlenemedi. Bu durum yurdumuzda yapılan çalışmalarda elde edilen enzim alt tipleri oranlarıyla karşılaştırma yapmamızı engelledi.

Bağırsak dışı patojenik *E.coli* suşları, bağırsak dışındaki vücut bölgelerinde idrar yolu, kan dolaşımı, prostat ve diğer enfeksiyonlara neden olabilen çok yönlü bakterilerdir. İnsanların ve hayvanların bağırsak mikrobiyotasında yer edinirler ve bu rezervuardan ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olmak için ortaya çıkarlar. ExPEC suşları, hem hastane hem de toplum kaynaklı çok sayıda insan enfeksiyonundan sorumludur. ExPEC suşları ayrıca, yeni antibiyotik direnç genlerinin yayılmasında da etkilidirler.

E.coli ST131, ekstraintestinal patojenik özellikte, dünya genelinde yaygın olarak saptanan çoklu ilaç direncine sahip bir klondur. Tanımlandığı yıldan sonraki üç yıl içinde, hızla küresel yayılım göstermiştir. ST131 klonu MLST analiziyle belirlenmektedir. MLST analizi zaman alan, yoğun emek gerektiren ve pahalı bir testtir. Bu nedenle ST131 klonunu saptayabilen PCR yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde farklı gen bölgelerini hedefleyen primerlerle PCR protokolleri

oluşturulmuştur (Clermont et al., 2009, Dhanji et al., 2010). Çalışmamızda ST131 klonunun varlığı iki farklı primer setinin kullanıldığı iki PCR protokolü ile araştırıldı. *pabBspe* primerlerinin kullanıldığı birinci PCR testinde, 50 izolatın 47'sinin *E.coli* ST131 olduğu saptanırken, 19. Bölgeye özgü ST131 primeri kullanılarak yapılan ikinci PCR sonucunda 50 izolatın 5'inin (%10) *E.coli* ST131 olduğu bulundu. Birinci PCR ile çok yüksek oranda ST131 *E.coli* bulunması nedeniyle bu deneyler iki kez (bakterilerden tekrar DNA izole edildi) tekrarlandı ve sonucun değişmediği görüldü. *pabBspe* primerinin kullanıldığı birinci PCR deneyleriyle ST131 olarak saptanan ve ikinci PCR deneyiyle (19. Bölge primeri kullanılarak yapılan PCR) ST131 olarak saptanmayan 5 izolatın MLST analiziyle 5 farklı klona (ST10, ST6834, ST349, ST8712, ST34) ait oldukları bulundu. 19. Bölge primeri kullanılarak yapılan PCR ile ST131 bulunan diğer 5 izolatın hepsi MLST analiziyle de ST131 olarak saptandı. Clermont ve arkadaşları kendilerinin tasarladığı *pabBspe* primerlerinin 3' bazında oluşan degradasyon nedeniyle PCR deneylerinin yanlış pozitif sonuçlanabileceği ve bu durumun allele özgü her PCR yöntemlerinde olabileceğini bildirmişlerdir. Hem yazarların bildirdiği çalışmamızda uyguladığımız birinci PCR protokolüne yönelik yanlış pozitif sonuç alınabileceği bilgisi, hem de çalışmamızda elde ettiğimiz MLST analiz sonuçlarına göre, ikinci PCR protokolüyle elde ettiğimiz ST131 oranı dikkate alındı. Buna göre, GSBL pozitif 50 suşun 5'inin ST131 klonu olduğu sonucuna varıldı. Bu nedenle sözü edilen bu primer setiyle ST131 olarak elde edilen sonuçların, MLST yöntemiyle de doğrulanmasını önermekteyiz.

Çeşitli ülkelerde ekstraintestinal enfeksiyonlardan ve bağırsak florası üyesi olan *E.coli* izolatlarında ST131 klon varlığını araştıran bir çok çalışma yapılmıştır. Klonunun görülme sıklığının dünyadaki çeşitli bölgelerde değiştiği görülmektedir. *E.coli* ST131 izolatlarının, idrar yolu enfeksiyonu olan hastalardan en sık izole edilen etken olduğu, klinik örneklerden izole edilen GSBL pozitif izolatların %70'ini, florokinolona dirençli izolatların %78'ini ve toplam *E.coli* izolatlarının %38'ini oluşturduğu bildirilmiştir (Pitout & Finn, 2020). Martischang ve arkadaşları uzun süreli bakım merkezindeki kişilerden 10 yıl boyunca izole edilen 236 GSBL üreten *E.coli* suşunun %58'inin ST131 klonuna ait olduğunu bildirmişlerdir (Martischang et al., 2021). Güney Tayvan'daki bir tıp merkezinde sağlık muayenelerine katılan sağlıklı yetişkinlerden, fekal GSBL üreten *E.coli* veya *E.coli* ST131 taşıyıcılığına ilişkin risk

faktörlerini analiz etmek için 724 dışkı örneği toplanmış ve incelenmiştir. Yetişkinlerdeki asemptomatik GSBL pozitif *E.coli* taşıyıcılığı %1,9 (14/724), *E.coli* ST131 taşıyıcılığı ise %3 (22/724) olarak saptanmıştır. 14 GSBL üreten *E.coli* izolatının 2'sinin (14,3) ST131 klonuna ait olduğu belirlenmiştir. Çalışmada bulunan GSBL pozitif *E.coli* taşıyıcılık oranının Asya kıtasının diğer bölgelerinde rapor edilen oranlardan daha düşük olduğunu bildirmişlerdir. (Wu et al., 2019). Başka bir çalışmada GSBL üreten 52 *E.coli* izolatının 22'sinin (%42) ST131 klonuna ait olduğu ve GSBL üreten 52 *E.coli* izolatının 16'sının (%30) CTX-M-15 tip beta laktamaz ürettiği bildirilmiştir (El-Badawy et al., 2017).

Çalışmamızda da ST131 klonuna ait olduğu belirlenen 5 izolatın 4'ünde CTX-M tipi beta laktamaz enzime rastlanması ve yine 5 izolattan 3'ünün siprofloksasin direncine sahip olduğu sonucu dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmaların sonuçlarıyla örtüşmektedir. Dünyada ve Türkiye'de yapılan çalışmaların sonuçları incelendiğinde ST131 klonu olarak tespit edilen *E.coli*'lerin çoğunlukla CTX-M-15 tipi beta laktamaz ürettikleri ve florokinolon grubu antibiyotiklere direnç gösterdikleri raporlanmıştır (Castanheira et al., 2021, Copur Cicek et al., 2013). Aktaş ve arkadaşlarının Şişli Hamidiye Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesine gönderilen idrar örneklerinden izole ettikleri 203 GSBL pozitif *E.coli* suşunda PCR yöntemi ile ST131 klonunu araştırdıkları çalışmada 81 (%39,9) suşun ST131 klonuna ait olduğunu bulmuşlardır (Aktaş et al., 2017). Ülkemizde yapılan başka bir çalışmada Hacettepe Üniversitesi Hastanesinde pediatrik hastalar hariç tutularak idrar örneklerinden izole edilen 104 siprofloksasin dirençli *E.coli* suşu Clermont ve arkadaşlarının önerdiği primer setleri kullanılarak PCR yöntemi ile araştırılmış ve izolatların %31,7'si O25b ST131 klonuna ait olduğu belirlenmiştir (Demirci-Duarte et al., 2020). Çizmeci ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 251'i idrar örneklerinden 50'si idrar dışı örneklerden izole edilen toplam 301 GSBL üreten *E.coli* izolatının 110'u (%36,6) real-time PCR yöntemi ile ST131 klonu olarak tespit edilmiştir. (Çizmeci et al., 2018). Ülkemizde yapılan diğer bir çalışmada hastanede yatan ve ayaktan tedavi alan İYE'li hastalardan izole edilen 101 adet *E.coli* izolatının %22,27'sinin real-time PCR ile ST131 klonuna ait olduğu saptanmıştır (Demirci et al., 2019).

Çalışmamızda 50 adet GSBL pozitif *E.coli* izolatının %10'unun ST131 klonuna ait olduğunu belirlendi. Çalışmamızda bulunan ST131 *E.coli* oranının

Ülkemizde saptanan oranlardan daha düşük olduğu görüldü. Bunun nedeninin, ülkemizdeki çalışmalarda saptanan *E.coli* ST131 izolatlarının enfeksiyon etkeni olan suşlar arasından belirlendiği, buna karşın çalışmamızda bulunan ST131 izolatlarının toplum kökenli ve herhangi bir hastalık belirtisi göstermeyen kişilerden üretilmesine bağlı olabileceği düşünüldü.

Bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olan *E.coli* ST'leri arasında en sık rastlanılanların ST131, ST69, ST10, ST405, ST38, ST95, ST648 olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızda MLST yöntemiyle incelenen 10 izolatın 5'i ST131, diğerleri ST10, ST34, ST349, ST683 ve ST8712 olarak belirlendi. *E.coli* ile ilgili başlıca sağlık sorunlarından birinin antimikrobiyal direncin yayılmasında ST10, ST69, ST131, ST405 klonlarının rolü olduğu bildirilmiştir (García-Meniño et al., 2018). Çalışmamızda da dünya genelinde riskli klonlar olarak ifade edilen bu ST'lerden ST131 ve ST10 klonlarına ait izolatlar bulunması önemlidir.

Çalışmamız Sivas yöresinde bağırsak mikrobiyotasından izole edilen GSBL pozitif *E.coli* izolatlarının oranı, antibiyotik duyarlılıkları, GSBL enzim tipleri, klonal ilişkileri ve *E.coli* ST131 klonunun varlığının gösterildiği ilk çalışmadır ve ilimiz için veri sağlamaktadır.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. Toplam 161 bireyin 50'sinin (%31,05) GSBL pozitif *E.coli* taşıdığı bulundu.
2. Bireylerin GSBL pozitif *E.coli* taşıma oranlarıyla, yaş, cinsiyet, son altı ay içinde hastaneye yatış öyküsü, kronik hastalığa sahip olma, evcil hayvan besleme, son üç ay içinde antibiyotik kullanma ve son bir yıl içinde operasyon geçirme durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı bulundu ($p>0,05$).
3. GSBL üreten izolatların ampicilin, seftazidim, sefotaksim, seftriakson, amoksisilin-klavulanik asit, aztreonam, sefepim, trimetoprim/sülfametoksazol, piperasilin tazobaktam, sefoksitin, siprofloksasin, gentamisin, amikasin ve ertapeneme direnç oranları sırasıyla, %100, %94, %92, %82, %78, %76, %68, %58, %42, %40, %38, %14, %6, %4'tü. Bütün izolatlar imipenem ve meropeneme duyarlı bulundu.
4. İzolatların 41'inde (%82) *bla*_{TEM}, 34'ünde (%68) *bla*_{CTX-M} ve 5'inde (%10) *bla*_{OXA} geni bulundu. İzolatların 20'sinde (%40) *bla*_{TEM} + *bla*_{CTX-M}, 5'inde (%10) *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA} genleri birlikte saptandı.
5. GSBL pozitif *E.coli* izolatlarının ERIC PCR ile klonal ilişkilerinin değerlendirilmesi sonunda izolatlar %85 benzerlik oranı baz alınarak 30 kümeye ayrıldı. İzolatlarda klonal heterojenite görüldü.
6. Toplam 50 bireyin 5'inin (%10) *E.coli* ST131 klonu taşıdığı bulundu.
7. GSBL pozitif *E.coli* izolatlarının 5'inin MLST analiziyle ST131 klonundan olduğu, 5 izolatın ise ST8712, ST10, ST6834, ST349, ST34 klonundan oldukları bulundu.

Bu çalışma ile Sivas ilindeki bireylerin GSBL üreten *E.coli* bağırsak taşıyıcılık oranının yüksek olduğu ve ST131 pandemik klonunun bulunduğu ile ilgili veriler elde edildi. Hem toplumdan izole edilen hem de klinik örneklerden izole edilen daha fazla sayıda örnek içeren çalışmaların yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

7. KAYNAKLAR

- Afkhami Ardakani, M., & Ranjbar, R. (2016). Molecular typing of uropathogenic *E. coli* strains by the ERIC-PCR method. *Electronic Physician*, 8(4), 2291–2295. <https://doi.org/10.19082/2291>
- Aires-de-Sousa, M., Lopes, E., Gonçalves, M. L., Pereira, A. L., Machado e Costa, A., de Lencastre, H., & Poirel, L. (2019). Intestinal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae at admission in a Portuguese hospital. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 39(4), 783–790. <https://doi.org/10.1007/s10096-019-03798-3>
- Aktaş, E., Otlu, B., Erdemir, D., Ekici, H., & Bulut, E. (2017). A First Insight into *Escherichia coli* ST131 High-Risk Clone among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Urine Isolates in Istanbul with the Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass-Spectrometry and Real-Time PCR. *Microbial Drug Resistance*, 00(00), 1–5. <https://doi.org/10.1089/mdr.2017.0021>
- Alpay, Y., YAVUZ, M. T., ASLAN, T., & BÜYÜKZENGİN, B. (2017). Can Oral Antibiotics Be an Alternative to Carbapenems in The Treatment of Non-Complicated Urinary Tract Infections Caused by Extended Spectrum Beta-lactamase Positive *Escherichia coli*? *ANKEMDergisi*, 31(3), 85–91. <https://doi.org/10.5222/ankem.2017.085>
- Altan AKSOY, J. Sedef GÖÇMEN, Birgül KAÇMAZ, S. C. (2005). İnsan ve Sigirlardan İzole Edilen Fekal *Escherichia Coli* Suslarında Antibiyotik Direnci ve Genislemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üretimi. *Ankem Dergisi*, 19(3), 130–134.
- Bal, Ç. (2003). Beta-Laktamazlar : Güncel Durum. *Flora*, 8(2), 111–123.
- Bayraktar, B. (2018). Antibiotic Resistance Trends Of Extended Spectrum Beta Lactamase Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections Over the Years. *Sisli Etfal Hastanesi Tip Bulteni / The Medical Bulletin of Sisli Hospital*, 53(1), 70–75. <https://doi.org/10.14744/semb.2018.60352>
- Bektaş, A., Güdücüoğlu, H., Gürsoy, N. C., Berktaş, M., Gültepe, B. S., Parlak, M., Otlu, B., & Tekerekoğlu, M. S. (2018). Investigation of Extended Spectrum

- Beta-Lactamase (ESBL) Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Flora the Journal of Infectious Diseases and Clinical Microbiology*, 23(3), 116–123. <https://doi.org/10.5578/flora.67296>
- Ben-Ami, R., Rodríguez-Baño, J., Arslan, H., Pitout, J. D. D., Quentin, C., Caibo, E. S., Azap, Ö. K., Arpin, C., Pascual, A., Livermore, D. M., Garau, J., & Carmeli, Y. (2009). A multinational survey of risk factors for infection with extended-spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae in nonhospitalized patients. *Clinical Infectious Diseases*, 49(5), 682–690. <https://doi.org/10.1086/604713>
- Bergšpica, I., Kaprou, G., Alexa, E. A., Prieto, M., & Alvarez-Ordóñez, A. (2020). Extended spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* in pigs and pork meat in the European Union. *Antibiotics*, 9(10), 1–23. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9100678>
- Bezabih, Y. M., Sabiiti, W., Alamneh, E., Bezabih, A., Peterson, G. M., Bezabhe, W. M., & Roujeinikova, A. (2021). The global prevalence and trend of human intestinal carriage of ESBL-producing *Escherichia coli* in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 76(1), 22–29. <https://doi.org/10.1093/JAC/DKAA399>
- Blount, Z. D. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife*, 4, 1–12. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- Bonomo, R. A. (2017). β -Lactamases: A focus on current challenges. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(1), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a025239>
- Bronfenbrenner, B. Y. J. J., & Korb, C. (1925). Effect of Alcohol on The Bacteriophage of D'Herelle. *Studies on the Bacteriophage of d ' Herelle.*, 419–429.
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on Beta-Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(10), 1–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01076-18>.
- Çakir Erdoğan, D., Cömert, F., Aktaş, E., Köktürk, F., & Külah, C. (2017). Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *klebsiella* spp. In a Turkish community. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 47(1), 172–179. <https://doi.org/10.3906/sag-1512-9>

- Castanheira, M., Simner, P. J., & Bradford, P. A. (2021). Extended-spectrum β - lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC-Antimicrobial Resistance*, 3(3), 1–21. <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>
- Chirindze, L. M., Zimba, T. F., Sekyere, J. O., Govinden, U., Chenia, H. Y., Sundsfjord, A., Essack, S. Y., & Simonsen, G. S. (2018). Faecal colonization of *E. coli* and *Klebsiella* spp. producing extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC in Mozambican university students. *BMC Infectious Diseases*, 18(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3154-1>
- Choi, Y., Lee, S., Lee, H., Lee, S., Kim, S., Lee, J., Ha, J., Oh, H., Lee, Y., Kim, Y., & Yoon, Y. (2018). Rapid detection of *Escherichia coli* in fresh foods using a combination of enrichment and PCR analysis. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 38(4), 829–834. <https://doi.org/10.5851/kosfa.2018.e19>
- Chong, Y., Ito, Y., & Kamimura, T. (2011). Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1499–1504. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.06.001>
- Church, D. L., Elmer W. Koneman, Gail L. Woods, Gary W. Procop, Geraldine S. Hall, Paul C. Schreckenberger, & William M. Janda (Eds.). (2017). *Konemans color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology* (7th ed.). Wolters Kluwer.
- Çizmecci, Z., Otlı, B., Aktaş, E., Ördəkçi, S., Açıkğöz, Ö., & Güleç, N. (2018). İdrar ve İdrar Dışı Klinik Örneklerden İzole Edilen GSBL Üreten *Escherichia coli* İzolatlarında Yüksek Riskli ST131 Klonunun MALDI-TOF MS ve Gerçek Zamanlı PCR ile Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 52(1), 13–22. <https://doi.org/10.5578/mb.66475>
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., & Bonacorsi, P. (2000). Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group Downloaded from <http://aem.asm.org/> on January 18 , 2013 by University of Pretoria : Academic Information S. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4555–4558. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000>.Updated
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E., & Gordon, D. M. (2013). The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: Improvement of

- specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*, 5(1), 58–65. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12019>
- Clermont, O., Dhanji, H., Upton, M., Gibreel, T., Fox, A., Boyd, D., Mulvey, M. R., Nordmann, P., Ruppé, E., Sarthou, J. L., Frank, T., Vimont, S., Arlet, G., Branger, C., Woodford, N., & Denamur, E. (2009). Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2), 274–277. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp194>
- Copur Cicek, A., Saral, A., Ozad Duzgun, A., Yasar, E., Cizmeci, Z., Ozlem Balci, P., Sari, F., Firat, M., Altintop, Y. A., Ak, S., Caliskan, A., Yildiz, N., Sancaktar, M., Esra Budak, E., Erturk, A., Birol Ozgumus, O., & Sandalli, C. (2013a). Nationwide study of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. *Journal of Antibiotics*, 66(11), 647–650. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.72>
- Copur Cicek, A., Saral, A., Ozad Duzgun, A., Yasar, E., Cizmeci, Z., Ozlem Balci, P., Sari, F., Firat, M., Altintop, Y. A., Ak, S., Caliskan, A., Yildiz, N., Sancaktar, M., Esra Budak, E., Erturk, A., Birol Ozgumus, O., & Sandalli, C. (2013b). Nationwide study of *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases TEM, SHV and CTX-M in Turkey. *Journal of Antibiotics*, 66(11), 647–650. <https://doi.org/10.1038/ja.2013.72>
- Coque, T. M., Baquero, F., & Canton, R. (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance*, 13(47), 1–11. <https://doi.org/10.2807/ese.13.47.19044-en>
- Daegelen, P., Studier, F. W., Lenski, R. E., Cure, S., & Kim, J. F. (2009). Tracing Ancestors and Relatives of *Escherichia coli* B, and the Derivation of B Strains REL606 and BL21(DE3). *Journal of Molecular Biology*, 394(4), 634–643. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.09.022>
- Dağlar, D., & Öngüt, G. (2012). Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve Tanı Yöntemleri Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) and Identification Methods. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 1(2), 1–9.
- Dallenne, C., da Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -

- lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 490–495. <https://doi.org/10.1093/jac/dkp498>
- David L. Peterson, & Bonomo, R. A. (2005). Extended spectrum beta lactamases: A critical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. <https://doi.org/10.2174/978160805292911201010115>
- Demirci-Duarte, S., Unalan-Altintop, T., Koseoglu Eser, O., Cakar, A., Altun, B., Sancak, B., & Gur, D. (2020). Prevalence of O25b-ST131 clone and fosfomycin resistance in urinary Escherichia coli isolates and their relation to CTX-M determinant. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 98(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2020.115098>
- Demirci, M., Ünlü, Ö., & İstanbullu Tosun, A. (2019). Detection of O25b-ST131 clone, CTX-M-1 and CTX-M-15 genes via real-time PCR in Escherichia coli strains in patients with UTIs obtained from a university hospital in Istanbul. *Journal of Infection and Public Health*, 12(5), 640–644. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2019.02.017>
- Dhanji, H., Doumith, M., Clermont, O., Denamur, E., Hope, R., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2010). Real-time PCR for detection of the O25b-ST131 clone of Escherichia coli and its CTX-M-15-like extended-spectrum β -lactamases. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36(4), 355–358. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2010.06.007>
- Doumith, M., Day, M., Ciesielczuk, H., Hope, R., Underwood, A., Reynolds, R., Wain, J., Livermore, D. M., & Woodford, N. (2015). Rapid identification of major Escherichia coli sequence types causing urinary tract and bloodstream infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(1), 160–166. <https://doi.org/10.1128/JCM.02562-14>
- Dvora Biran and Eliora Z. Ron. (2018). Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli. *Springer International Publishing AG, Part of Springer Nature 2018*. https://doi.org/DOI 10.1007/82_2018_108
- El-Badawy, M. F., Tawakol, W. M., Maghrabi, I. A., Mansy, M. S., Shohayeb, M. M., & Ashour, M. S. (2017). Iodometric and Molecular Detection of ESBL Production among Clinical Isolates of E. coli Fingerprinted by ERIC-PCR: The First Egyptian Report Declares the Emergence of E. coli O25b-ST131 clone

- Harboring blaGES. *Microbial Drug Resistance*, 23(6), 1–15.
<https://doi.org/10.1089/mdr.2016.0181>
- Eucast 2022. (2022a). <https://www.tmc-online.org/userfiles/file/EUCAST-ceviri-2017.pdf>
- Eucast 2022. (2022b). <https://www.eucast.org/>
- Fang, H., Ataker, F., Hedin, G., & Dornbusch, K. (2008). Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases among *Escherichia coli* isolates collected in a Swedish hospital and its associated health care facilities from 2001 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 707–712.
<https://doi.org/10.1128/JCM.01943-07>
- Friedmann, R., Raveh, D., Zartzer, E., Rudensky, B., Broide, E., Attias, D., & Yinnon, A. M. (2009). Prospective Evaluation of Colonization with Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)–Producing Enterobacteriaceae Among Patients at Hospital Admission and of Subsequent Colonization with ESBL-Producing Enterobacteriaceae Among Patients During Hospitalization. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 30(6), 534–542. <https://doi.org/10.1086/597505>
- Gallegos-Miranda, V., Garza-Ramos, U., Bolado-Martínez, E., Navarro-Navarro, M., Félix-Murray, K. R., Candia-Plata, M. del C., Sanchez-Martinez, G., Dúran-Bedolla, J., & Silva-Sánchez, J. (2021). ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from health-care institutions in Mexico. *Journal of Chemotherapy*, 33(2), 122–127.
<https://doi.org/10.1080/1120009X.2020.1861815>
- García-Meniño, García, I., Mora, V., Díaz-Jiménez, A., Flament-Simon, Dafne C., S., Alonso, M. P., Blanco, J. E., Blanco, M., & Blanco, J. (2018). Swine enteric colibacillosis in Spain: Pathogenic potential of mcr-1 ST10 and ST131 *E. Coli* Isolates. *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), 1–15.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02659>
- Gomaa, E. Z. (2020). Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 113(12), 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F.,

- Piazza, R. M. F., Ferreira, C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 3–30.
<https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Görgeç, S., Kuzucu, Ç., Otlu, B., Yetkin, F., & Ersoy, Y. (2015). Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten Nozokomiyal *Escherichia coli* İzolatlarında Beta-Laktamaz Gen Oranları ve Klonal İlişkinin Araştırılması * Investigation of Beta-Lactamase Genes and Clonal Relationship Among the Extended-Spectrum Beta-Lactamase P. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 49(1), 15–25.
- Gür, D., Gülay, Z., Arian Akan, Ö., Aktaş, Z., Bal Kayacan, Ç., Çakici, Ö., Eraç, B., Gültekin, M., Ögünç, D., Söyletir, G., Ünal, N., & Uysal, S. (2008). Resistance to newer beta-lactams and related ESBL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: Results of the multicentre HITIT study. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 42(4), 537–544.
- Habibzadeh, N., Doghaheh, H. P., Far, M. M., Asl, H. A., Iranpour, S., & Arzanlou, M. (2022). Fecal Carriage of Extended-Spectrum b-Lactamases and pAmpC Producing Enterobacterales in an Iranian Community: Prevalence, Risk Factors, Molecular Epidemiology, and Antibiotic Resistance. *Microbial Drug Resistance*, 28(9), 921–934. <https://doi.org/10.1089/mdr.2021.0029>
- Hazirolan, G., Mumcuoglu, I., Altan, G., Özmen, B. B., Aksu, N., & Karahan, Z. C. (2018). Fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and ampc beta-lactamase-producing enterobacteriaceae in a Turkish community. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, 21(1), 81–86.
https://doi.org/10.4103/njcp.njcp_79_17
- Hijazi, S. M., Fawzi, M. A., Ali, F. M., & Abd El Galil, K. H. (2016). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases producing Enterobacteriaceae in healthy children and associated risk factors. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1186/s12941-016-0121-9>
<https://pubmlst.org/batchSequenceQuery>. (n.d.).
https://pubmlst.org/bigdb?db=pubmlst_ecoli_achtman_seqdef&set_id=4&page=batchSequenceQuery
- Hung, C., Marschall, J., Burnham, C. A. D., Byun, A. S., & Henderson, J. P. (2014).

- The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. *PLoS ONE*, 9(1), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086009>
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, 123(3), 570–581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- Jena, J., Debata, N. K., Sahoo, R. K., & Subudhi, M. G. & E. (2017). Genetic diversity study of various β -lactamase-producing multidrug-resistant *Escherichia coli* isolates from a tertiary care hospital using ERIC-PCR. *Indian J Med Res*, 146, 23–29. https://doi.org/10.4103/ijmr.IJMR_575_16
- Johnson, J. R., & Russo, T. A. (2005). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6–7), 383–404. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2005.07.005>
- Karanika, S., Karantanos, T., Arvanitis, M., Grigoras, C., & Mylonakis, E. (2016). Fecal Colonization with Extended-spectrum Beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Risk Factors among Healthy Individuals: A Systematic Review and Metaanalysis. *Clinical Infectious Diseases*, 63(3), 310–318. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw283>
- Kawamura, K., Nagano, N., Suzuki, M., Wachino, J., Kimura, K., & Arakawa, Y. (2017). ESBL-producing *Escherichia coli* and Its Rapid Rise among Healthy People. *Food Safety*, 5(4), 122–150. <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2017011>
- Kaya, O., Akcam, F. Z., Gonen, I., Unal, O., & Ceylan, T. (2013). Risk factors for bacteremia due to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a turkish hospital. *Journal of Infection in Developing Countries*, 7(7), 507–512. <https://doi.org/10.3855/jidc.2788>
- Kazemian, H., Heidari, H., Ghanavati, R., Ghafourian, S., Yazdani, F., Sadeghifard, N., Valadbeigi, H., Maleki, A., & Pakzad, I. (2019). Phenotypic and Genotypic Characterization of ESBL-, AmpC-, and Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Isolates. *Medical Principles and Practice*, 28(6), 547–551. <https://doi.org/10.1159/000500311>
- Küçükbasmacı, Ö. (2009). Dişkida Gen İş Lem İş Spektrumlu Beta-Laktamaz

- Prevalansinin Ara Ş Tirilmesi Evaluation Of Prevalance Extended Spectrum Beta-Lactamase. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti*, 39(3–4), 85–88.
- Kürekci, C., Aydın, M., Yipel, M., Katouli, M., & Gündoğdu, A. (2017). Characterization of extended spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* in Asi (Orontes) River in Turkey. *Journal of Water and Health*, 15(5), 788–798. <https://doi.org/10.2166/wh.2017.257>
- Kurt Azap, Ö., Arslan, H., Karaman, S. Ö., & Togan, T. (2007). Risk factors for fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in the community. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 37(1), 31–38.
- Mahmoud, A. T., Ibrahim, R. A., Salim, M. T., Gabr, A., & Halby, H. M. (2020). Prevalence of some virulence factors and genotyping of hospital-acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates recovered from cancer patients. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 23, 211–216. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.003>
- Maiden, M. C. J., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M., & Spratt, B. G. (1998). Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(6), 3140–3145. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.3140>
- Marie-Hélène, Nicolas-Chanoine, Bertrand, X., & Madecf, J.-Y. (2014). *Escherichia coli* ST131, an Intriguing Clonal Group. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 543–574. <https://doi.org/10.1128/CMR.00125-13>
- Martischang, R., François, P., Cherkaoui, A., Gaïa, N., Renzi, G., Agostinho, A., Perez, M., Graf, C. E., & Harbarth, S. (2021). Epidemiology of ESBL-producing *Escherichia coli* from repeated prevalence studies over 11 years in a long-term-care facility. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 10(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13756-021-01013-7>
- MLST Protocols for *E.coli*.. <https://enterobase.readthedocs.io/en/latest/mlst/mlst-legacy-info-ecoli.html>
- Molina, F., López-Acedo, E., Tabla, R., Roa, I., Gómez, A., & Rebollo, J. E. (2015).

- Improved detection of *Escherichia coli* and coliform bacteria by multiplex PCR. *BMC Biotechnology*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12896-015-0168-2>
- Moosavian, M., & Emam, N. (2019). The first report of emerging mobilized colistin-resistance (Mcr) genes and ERIC-PCR typing in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in southwest Iran. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1001–1010. <https://doi.org/10.2147/IDR.S192597>
- Moreira da Silva, R. C. R., de Oliveira Martins Júnior, P., Gonçalves, L. F., de Paulo Martins, V., de Melo, A. B. F., Pitondo-Silva, A., & de Campos, T. A. (2017). Ciprofloxacin resistance in uropathogenic *Escherichia coli* isolates causing community-acquired urinary infections in Brasília, Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 9, 61–67. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2017.01.009>
- Mueller, M., & Taitner, C. (2022). *Escherichia Coli - StatPearls - NCBI Bookshelf*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK564298/>
- Mueller Matthew, T. C. R. (2022). *Escherichia Coli*.
- Mun'im, A. R., Al-Alak Khudhr, S., Hassan, A. S., & Istabraq, M. A. (2014). Antibigram typing and ERIC-PCR genotyping of *Escherichia coli* isolated from different clinical samples. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(7), 27–37. <http://www.wjpps.com/download/article/1404130581.pdf>
- Murray, P. R., Rosenthal, K. S., & Pfaller, M. A. (2016). *Tıbbi Mikrobiyoloji* (D. A. Us & A. Başustaoglu (Eds.); 7th ed.). Pelikan Kitabevi.
- Mwanza, F., Komba, E. V. G., & Kambarage, D. M. (2021). Occurrence and Determination of Antimicrobial Resistant *Escherichia coli* Isolates in Fish and Vegetables as Indicator Organism of Faecal Contamination in Dar es Salaam, Tanzania. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/6633488>
- Ndir, A., Diop, A., Faye, P. M., Cissé, M. F., Ndoeye, B., & Astagneau, P. (2016). Epidemiology and burden of bloodstream infections caused by extended-spectrum beta-lactamase producing enterobacteriaceae in a Pediatric Hospital in Senegal. *PLoS ONE*, 11(2), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143729>
- Niumsup, P. R., Tansawai, U., Na-udom, A., Jantapalaboon, D., Assawatheptawee, K., Kiddee, A., Romgaew, T., Lamlerthon, S., & Walsh, T. R. (2018).

- Prevalence and risk factors for intestinal carriage of CTX-M-type ESBLs in Enterobacteriaceae from a Thai community. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 37(1), 69–75.
<https://doi.org/10.1007/s10096-017-3102-9>
- Patian Yossi. (2018). Current Trends in Antimicrobial Resistance of Escherichia coli. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 416, 181–211.
<https://doi.org/10.1007/82>
- Peirano, G., & Pitout, J. D. D. (2019). Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs*, 79(14), 1529–1541. <https://doi.org/10.1007/s40265-019-01180-3>
- Pérez-Losada, M., Arenas, M., & Castro-Nallar, E. (2017). Microbial sequence typing in the genomic era. *Infection, Genetics and Evolution*, 63(September), 346–359. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.022>
- Pitout, J. D. D., & Finn, T. J. (2020). The evolutionary puzzle of Escherichia coli ST131. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 81, Issue February, pp. 1–10). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104265>
- Pitout, J. D. D., Gregson, D. B., Church, D. L., & Laupland, K. B. (2007). Population-based laboratory surveillance for AmpC β -lactamase- producing Escherichia coli, Calgary. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 443–448.
<https://doi.org/10.3201/eid1303.060447>
- Poirel, L., Le Thomas, I., Naas, T., Karim, A., & Nordmann, P. (2000). Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended- spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(3), 622–632. <https://doi.org/10.1128/AAC.44.3.622-632.2000>
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial Resistance in Escherichia coli. *Microbiology Spectrum*, 6(4), 1–27. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.arba-0026-2017>
- Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E. B., Labia, R., & Nordmann, P. (1999). Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an Escherichia coli integron gene.

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(3), 573–581.
<https://doi.org/10.1128/aac.43.3.573>
- Pubmlst. https://pubmlst.org/bigsdb?db=pubmlst_escherichia_seqdef&page=profiles
- Ramadan, H., Jackson, C. R., Frye, J. G., Hiott, L. M., Samir, M., Awad, A., & Woodley, T. A. (2020). Antimicrobial resistance, genetic diversity and multilocus sequence typing of *Escherichia coli* from humans, retail chicken and ground beef in Egypt. *Pathogens*, 9(5), 1–14.
<https://doi.org/10.3390/pathogens9050357>
- Ramazanzadeh, R., Zamani, S., & Zamani, S. (2012). Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR technique in Sanandaj hospitals. *Iranian Journal of Microbiology*, 5(2), 126–131.
- Ranjbar, R., Tabatabaee, A., Behzadi, P., & Kheiri, R. (2017). Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from different animal stool specimens. *Iranian Journal of Pathology*, 12(1), 25–34.
<https://doi.org/10.30699/ijp.2017.21506>
- Rogers, B. A., Sidjabat, H. E., & Paterson, D. L. (2011). *Escherichia coli* O25b-ST131: A pandemic, multiresistant, community-associated strain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(1), 1–14. <https://doi.org/10.1093/jac/dkq415>
- Sawa, T., Kooguchi, K., & Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*, 8(13), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s40560-020-0429-6>
- Shakil, S., Akram, M., Ali, S. M., & Khan, A. U. (2010). Acquisition of extended-spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* strains in male and female infants admitted to a neonatal intensive care unit: Molecular epidemiology and analysis of risk factors. *Journal of Medical Microbiology*, 59(8), 948–954.
<https://doi.org/10.1099/jmm.0.020214-0>
- Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. (2016). *Escherichia coli* biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of Applied Microbiology*, 121(2), 1–11.

- <https://doi.org/10.1111/jam.13078>
- Sokal, R. R. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kans Sci Bull*, 38(22), 1409–1438.
- Subramanya, S. H., Bairy, I., Metok, Y., Baral, B. P., Gautam, D., & Nayak, N. (2021). Detection and characterization of ESBL-producing Enterobacteriaceae from the gut of subsistence farmers, their livestock, and the surrounding environment in rural Nepal. *Scientific Reports*, 11(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81315-3>
- Tchesnokova, V. L., Ottley, L. L., Sakamoto, K., Fierer, J., Sokurenko, E., & Liss, M. A. (2015). Rapid Identification of Rectal Multidrug-resistant *Escherichia coli* before Transrectal Prostate Biopsy. *Urology*, 86(6), 1200–1205. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2015.07.008>
- Urwin, R., & Maiden, M. C. J. (2003). Multi-locus sequence typing: A tool for global epidemiology. *Trends in Microbiology*, 11(10), 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2003.08.006>
- US Dürdal A., & Başustaoğlu A. (Eds.). (2019). *Sherris Tıbbi Mikrobiyoloji* (7th ed.). Hipokrat Yayınevi.
- Versalovic, J., Koeuth, T., & Lupski, R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), 6823–6831. <https://doi.org/10.1093/nar/19.24.6823>
- Vila, J., Sáez-López, E., Johnson, J. R., Römling, U., Dobrindt, U., Cantón, R., Giske, C. G., Naas, T., Carattoli, A., Martínez-Medina, M., Bosch, J., Retamar, P., Rodríguez-Banõ, J., Baquero, F., & Soto, S. M. (2016). *Escherichia coli*: An old friend with new tidings. *FEMS Microbiology Reviews*, 40(4), 437–463. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw005>
- Werkman, C. H. (1927). Vitamin Effects In The Physiology Of Micro- Organisms. *From the Laboratories in Bacteriology, Iowa Agricultural Experiment Station*, 1921, 335–347.
- WHO. (2021). DSo. 2021. https://worldhealthorg.shinyapps.io/WHO-AMR-Dashboard/?_ga=2.172166563.1827800992.1668654440-1324205868.1668654440

- Wilson, H., & Török, M. E. (2018). Extended-spectrum β -lactamase-producing and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microbial Genomics*, 4(7), 1–14. <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000197>
- Wilson, L. A., & Sharp, P. M. (2006). Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences in Escherichia coli: Evolution and implications for ERIC-PCR. *Molecular Biology and Evolution*, 23(6), 1156–1168. <https://doi.org/10.1093/molbev/msj125>
- Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C. J., Ochman, H., & Achtman, M. (2006). Sex and virulence in Escherichia coli: An evolutionary perspective. *Molecular Microbiology*, 60(5), 1136–1151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05172.x>
- Wu, P. C., Wang, J. L., Hsueh, P. R., Lin, P. H., Cheng, M. F., Huang, I. F., Chen, Y. S., Lee, S. S. J., Guang-Yuan, M., Yu, H. C., Hsu, C. L., Wang, F. W., Chen, C. S., Hung, C. H., & Ko, W. C. (2019). Prevalence and risk factors for colonization by extended-spectrum β -lactamase-producing or ST 131 escherichia coli among asymptomatic adults in community settings in Southern Taiwan. *Infection and Drug Resistance*, 12, 1063–1071. <https://doi.org/10.2147/IDR.S201086>
- Yahav, D., Giske, C. G., Alise, G., Abodakpi, H., Tam, V. H., & Leibovici, L. (2021). New Beta-Lactam–Beta-Lactamase Inhibitor Combinations Dafna. *Clinical Microbiology Reviews*, 34(1), 1–61.

8. EKLER

Ek 1: Dışkı örneği veren gönüllülere uygulanan anket formu

**CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK
KURULU ONAYLI 2018-06/27 NO'LU DOKTORA TEZİ ÇALIŞMASINA
GÖNÜLLÜ KATILIM NUMUNE TESLİM FORMU**

Numune numarası:.....(Lütfen numune kabının üzerindeki etikette yazan kodu boşluğa yazınız)

Yaşınız:

Cinsiyetiniz: ☐ERKEK

☐KADIN

Soru 1. Son 6 ay içinde hastaneye yatış öykünüz var mı?

☐ Evet

☐ Hayır

Varsa ne kadar zaman önce hastaneye yattınız?

☐ 2-6 ay önce

☐ 1 ay önce

☐ 1 aydan daha kısa süre önce

Soru 2. Kronik bir hastalığınız var mı? (Diyabet veya bağırsak hastalığı)

☐ Evet

☐ Hayır

Varsa hastalığınızın adı nedir?

.....

Soru 3. Evcil hayvanınız var mı?

☐ Evet

☐ Hayır

Hangi hayvanı besliyorsunuz?

.....

Soru 4. Son 3 ay içinde herhangi bir hastalık sebebiyle antibiyotik ilaç kullandınız mı?

☐ Evet

☐ Hayır

Ne kadar zaman önce kullandınız?

☐ 3 ay önce

☐ 2 ay önce

☐ 1 ay veya daha kısa zaman önce

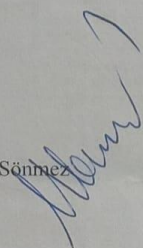
Soru 5. Son 1 yıl içerisinde herhangi bir operasyon geçirdiniz mi?

☐ Evet

☐ Hayır

9. İZİNLER

Ek 2: Sivas Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı

		CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU			
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		İnsanların bağırsak mikrobiyotasında bulunan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten <i>Escherichia coli</i> izolatlarında beta-laktamaz enzim ve klon tiplerinin araştırılması			
ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu			
	AÇIK ADRESİ:	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı TR-58140 Merkez/Sivas			
	TELEFON	0 346 219 10 10 / Dahili: 2092			
	FAKS	-			
	E-POSTA	gokaek2014@gmail.com			
BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. A. Yasemin Öztop			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Mikrobiyoloji			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı			
	DESTEKLEYİCİ	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ	-			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Doktora tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☐	ULUSLARARASI ☐
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez İmza: 					



CUMHURİYET ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI İnsanların bağırsak mikrobiyotasında bulunan genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* izolatlarında beta-laktamaz enzim ve klon tiplerinin araştırılması

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama
	SİGORTA	☐
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐
	İLAN	☐
	YILLIK BİLDİRİM	☐
	SONUÇ RAPORU	☐
	DİĞER:	☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 2018-06/27	Tarih: 28.06.2018
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerden gerekli izin alınarak gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplanmaya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Helsinki Bildirgesi, Cumhuriyet Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi

BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI: Prof. Dr. Muhittin Sönmez

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişki	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Muhittin Sönmez	Anatomi	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Prof. Dr. Yalçın Karagöz	Biyostatistik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Hatice Özer	Patoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Ercan Özdemir	Fizyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Doç. Dr. Gülay Yıldırım	Tıp Tarihi ve Etik	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İzinli
Dr. Öğret. Üyesi Mehmet Ataş	Farmasötik Mikrobiyoloji	Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğret. Üyesi Binnur Bağcı	Beslenme ve Diyetetik	Cumhuriyet Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi	E ☐ K ☒	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	
Dr. Öğret. Üyesi Engin Altunkaya	İç hastalıkları	Cumhuriyet Üniversitesi, Tıp Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☐ H ☒	İzinli
Dr. Öğret. Üyesi Melih Ülgey	Protetik Diş Tedavisi	Cumhuriyet Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi	E ☒ K ☐	E ☐ H ☒	E ☒ H ☐	

*: Toplantıda bulunma

Etik Kurul Başkanının

Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Muhittin Sönmez

İmza:

10. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel bilgiler

Adı Soyadı	Murat ARSLAN
Doğum Yeri ve Tarihi	Sivas-1982
Medeni Hali	Evli
Yabancı Dil	İngilizce
İletişim Adresi	Cumhuriyet Üniversitesi, Suşehri Sağlık Yüksekokulu, Sivas/Suşehri
E-posta Adresi	muratarslan@cumhuriyet.edu.tr

Eğitim ve Akademik Durumu

Lise	Divriği Lisesi, 1999
Lisans	Ege Üniversitesi, 2008
Yüksek Lisans	Sivas Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2012
Ünvan	Öğretim Görevlisi

İş Tecrübesi

T. Garanti BBVA	Satış Temsilcisi, 2009-2013
Cumhuriyet Üniversitesi Suşehri Sağlık Yüksekokulu	Öğretim Görevlisi, 2013-