

T.C.
ONDOKUZ MAYIS ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI (VETERİNER) ANA BİLİM DALI



**SAMSUN BÖLGESİNDE TÜKETİME SUNULAN
BALIKLARDA BETA-LAKTAMAZ DİRENÇLİ
ESCHERICHIA COLI'NİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK
YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ**

Yüksek Lisans Tezi

Mehmet Furkan ÖZTÜRK

Danışman

Prof. Dr. Belgin SIRIKEN

Bu çalışma Ondokuz Mayıs çalışma Ondokuz BAP04-A-2024-5235 proje numarası ile desteklenmiştir.

SAMSUN

2025

TEZ KABUL VE ONAYI

Mehmet Furkan ÖZTÜRK tarafından, Prof. Dr. Belgin SIRIKEN danışmanlığında hazırlanan “SAMSUN BÖLGESİNDE TÜKETİME SUNULAN BALIKLARDA BETA-LAKTAMAZ DİRENÇLİ *ESCHERICHIA COLI*’NİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ” başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 18.8.2025 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Unvanı Adı Soyadı Üniversitesi		
Ana Bilim/Ana Sanat Dalı		Sonuç
Başkan	Prof. Dr. Belgin SIRIKEN	
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	☒ Kabul
	Su Ürünleri Hastalıkları Ana Bilim Dalı	☐ Ret
Üye	Prof. Dr. Banu YARDIMCI	
	Ondokuz Mayıs Üniversitesi	☒ Kabul
	Su Ürünleri Hastalıkları Ana Bilim Dalı	☐ Ret
Üye	Doç. Dr. Ceren Yavuz BAŞKAN	
	Sabuncuoğlu Şerefeddin Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu,	☒ Kabul
	Terapi ve Rehabilitasyon Bölümü/Fizyoterapi Programı	☐ Ret

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen ve yukarıda adları yazılı jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI

Hazırladığım Yüksek Lisans tezinin bütün aşamalarında bilimsel etiğe ve akademik kurallara riayet ettiğimi, çalışmada doğrudan veya dolaylı olarak kullandığım her alıntıya kaynak gösterdiğimi ve yararlandığım eserlerin Kaynaklar'da gösterilenlerden oluştuğunu, her unsurun enstitü yazım kılavuzuna uygun yazıldığını ve TÜBİTAK Araştırma ve Yayın Etiği Kurulu Yönetmeliği'nin 3. bölüm 9. maddesinde belirtilen durumlara aykırı davranılmadığını taahhüt ve beyan ederim.

Etik Kurul Gerekli mi ?

Evet ☐ (Gerekli ise ekler kısmına ekleyiniz)

Hayır ☒

13/06/ 2025

Mehmet Furkan ÖZTÜRK

TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI

Tez Başlığı : SAMSUN BÖLGESİNDE TÜKETİME SUNULAN BALIKLARDA BETA-LAKTAMAZ DİRENÇLİ *ESCHERICHIA COLI*'NİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Yukarıda başlığı belirtilen tez çalışması için şahsım tarafından 13.06.2025 tarihinde intihal tespit programından alınmış olan özgünlük raporu sonucunda;

Benzerlik oranı : % 24

Tek kaynak oranı : % 2 çıkmıştır.

13/06/ 2025

Prof. Dr. Belgin SIRIKEN

ÖZET

SAMSUN BÖLGESİNDE TÜKETİME SUNULAN BALIKLARDA BETA-LAKTAMAZ DİRENÇLİ *ESCHERICHIA COLI* NİN FENOTİPİK VE GENOTİPİK YÖNTEMLERLE BELİRLENMESİ

Mehmet Furkan ÖZTÜRK

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

SU ÜRÜNLERİ HASTALIKLARI (VETERİNER) ANA BİLİM DALI

Yüksek Lisans, Haziran/2025

Danışman: Unvanı Prof. Dr. Belgin SIRIKEN

Samsun bölgesinde 2024-2025 yıllarında tüketime sunulan 64 adet kültür balıklardan Harlequin® *E. coli*/Coliform Agar selektif besiyerinde izole edilen ve MALDI-TOF MS ile doğrulanan toplam 34 adet *E. coli* izolatu materyal olarak kullanıldı. İzolatlar 11 antibiyotik grubundan 22 adet antibiyotiğe karşı analiz edildi. Yedi farklı gruptan 11 antibiyotiğe karşı %5,88- %50,00 oranında direnç saptandı. En yüksek dirençliliğin penisilin grubu antibiyotiklere [SAM (%50,00), AM (%47,05), AMC'ye (%32,35)], bu grubu karbapenem [ETP (%11,76)], tetrasiklin [(%11,76)], kinolon [%5,88], florokinolon [CIP (%5,88), LEV'e (%5,88)] grubu ile sefalosporin [2'si FEP'e (%5,88)], amfenikol [2'si C'ye (%5,88)] ve fosfomisin [2'si FF (%5,88)] grupları takip etti. İzolatlar Çoklu antibiyotik dirençliliği (ÇAD) yönünden değerlendirildiğinde; 34 izolattan 4 (%11,76)'ünün ÇAD olduğu ve 3-8 farklı antibiyotiğe ve penisilin, sefalosporin, tetrasiklin, kinolon, florokinolon, amfenikol grubuna karşı dirençli olduğu saptandı. İzolatlar GSBL-*E. coli* yönünden çift disk difüzyon testi ile fenotipik olarak saptanamazken, 3 *bla* genlerinden *bla*_{TEM} %91,18, *bla*_{SHV} %58,82 ve *bla*_{CTX-M} ise %23,53 oranlarında saptandı. Karbapenem dirençliliği fenotipik ve genotipik olarak saptandı. Bu çerçevede, *bla*_{NDM}, *VIM*, *KPC*, *IMP* ve *OXA-48* olmak üzere toplam 5 gen varlığı araştırıldı: *bla*_{NDM} ve *bla*_{KPC} gen varlıkları saptanamazken, *bla*_{IMP} 5 (%14,71), *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM} genleri 4'er (%11,76) izolatta saptandı. Toplamda ise 5 karbapenemaz üretiminden sorumlu genlerden en az biri 13 (%38,23) *E. coli* izolatında saptandı. Antibiyogramda izolatların *IMP* ve *ETP*'ye karşı duyarlı olduğu, 4 (%11,76) izolatın ise *MEM*'e karşı dirençli bulunurken MİK testinde bir (%2,94), MHT testinde 4 (%11,8) izolat karbapenem dirençli idi. İzolatların *AmpC* β-laktamaz genlerinden toplam 6 farklı gen grubu da araştırıldı ve sadece iki izolatta hem *LAT-1*'den *LAT-4*'e kadar, *CMY-2*'den *CMY-7*'ye kadar (n=2, %5,88), *BIL-1* ile *DHA-1* ve *DHA-2* (n=2, %5,88) genleri saptandı. Her iki izolat aynı zamanda *bla*_{TEM} genini de taşıması nedeniyle GSBL ve *AmpC-E. coli* oluşları tehlikenin boyutunu artırmaktadır. Ayrıca, filogenetik gruplandırmada B23, A1, Ao ve D2 filogrupları sırasıyla 25 (%73,53), 5 (%14,71), 2 (%5,88) ve 1(1, %2,94) izolatta belirlendi. İzolatlar Sanger dizi analiz sonuçları ile de doğrulandı.

Anahtar Sözcükler: Balık, *Escherichia coli*, Antibiyotik dirençlilik, Beta-laktamaz-GSBL, Karbapenemaz- *AmpC*- Beta-laktamaz, Sanger Dizi analizi, Filogenetik

ABSTRACT

IDENTIFICATION OF BETA-LACTAMASE RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* IN FISH CONSUMED IN SAMSUN REGION BY PHENOTYPIC AND GENOTYPIC METHODS

Mehmet Furkan ÖZTÜRK

Ondokuz Mayıs University

Institute of Graduate Studies

Department of AQUATIC ANIMAL DISEASES Programme

Master, June/2025

Supervisor: Prof. Dr. Belgin SIRIKEN

A total 34 *E. coli* isolates isolated on Harlequin® *E. coli*/Coliform Agar and confirmed by MALDI-TOF MS from 64 cultured fish, Samsun region in 2024-2025 were used as material. The isolates were analyzed against 22 antibiotics from 11 antibiotic groups. Resistance rates of 5.88%-50.00% were found against 11 antibiotics from seven different groups. The highest resistance was penicillin [SAM (50.00%), AM (47.05%), AMC (32.35%)], followed by carbapenem [ETP (11.76%)], tetracycline [11.76%], quinolone [5.88%, fluoroquinolone [CIP (5.88%), LEV (5.88%)], cephalosporin [FEP (5.88%)], amphenicol [2(5.88%)] and fosfomycin [5.88%]] groups followed. When the isolates were evaluated in terms of MDR, 11.76% of 34 isolates were found MDR and resistant to 3-8 different antibiotics and penicillin, cephalosporin, tetracycline, quinolone, fluoroquinolone, and amphenicol group. While the isolates could not be phenotypically detected by DDDT as ESBL-*E. coli*, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} were detected at 91.18%, 58.82% and 23.53% rates, respectively. Carbapenem resistance was detected phenotypically and genotypically. In this framework, a total of 5 genes, namely *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} and *bla*_{OXA-48}, were investigated: in contrast to *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} was detected in 5 (14.71%), *bla*_{OXA-48} and *bla*_{VIM} genes were detected in 4 (11.76%) isolates. In total, at least one of the 5 carbapenemase production genes was detected in 13 (38.23%) isolates. In the antibiogram, the isolates were susceptible to IMP and ETP, 4 (11.76%) isolates were resistant to MEM, 2.94% of the isolates were carbapenem resistant in MIC and 11.8% of the isolates were carbapenem resistant in MHT test. A total of 6 different genes were also investigated as AmpC β-lactamase; only two isolates had both *LAT-1* to *LAT-4*, *CMY-2* to *CMY-7* (n=2, 5.88%), *BIL-1* and *DHA-1* and *DHA-2* (n=2, 5.88%) genes. Since both isolates also carried the *bla*_{TEM} gene, their ESBL and AmpC-*E. coli* status increases the extent of the danger. In the phylogenetic classification, the isolates were distributed as follows: B2₃ (n=25, 73.53%), A1 (n=5; 14.71%), Ao (n=2; 5.88%) isolates), and D2 (n=1; %2.94) isolates. The classification of the isolates was further confirmed by Sanger sequencing analysis.

Keywords: Fish, *Escherichia coli*, Antibiotic resistance, Beta-lactamase-ESBL, Carbapenemase- AmpC-Beta-lactamase, Sanger Sequence analysis, Phylogenetics

ÖN SÖZ VE TEŞEKKÜR

Eğiti-Öğretim sürecinde bana her türlü yardımı ve desteği veren, bilimsel deneyimlerinden yararlandığım danışmam hocam Prof. Dr. Belgin SIRIKEN başta olmak üzere tüm Anabilim Dalında görevli hocalarıma, bu süreçte yanımda olan aileme çok teşekkür ederim.

Mehmet Furkan ÖZTÜRK

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK BEYANI	ii
TEZ ÇALIŞMASI ÖZGÜNLÜK RAPORU BEYANI	ii
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLOLAR DİZİNİ	ix
1.GİRİŞ.....	1
2.MATERYAL VE METOD	11
2.1. Materyal.....	11
2.2. Yöntem	11
2.3. İzolatlarda antibiyotik dirençlilik özelliklerinin belirlenmesi.....	12
2.4. İzolatlarda Beta-Laktamaz Aktivitesinin Belirlenmesi.....	13
2.4.1. GSBL- Çift Disk Sinerji Testi (Double Disc Synergy Test (DDST)).....	13
2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile GSBL gen bölgelerinin belirlenmesi.....	14
2.4.3. Fenotipik Yöntemlerle karbapenamaz üretiminin belirlenmesi.....	16
2.4.3.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK).....	16
2.4.3.2. Modifiye Hodge Testi.....	17
2.4.3.3. Modifiye karbapenem inaktivasyon (mCIM) ve EDTA-CIM (eCIM) metotları.....	18
2.4.3.4. PZR ile karbapenem dirençli gen bölgelerinin saptanması.....	19
2.5.1. Ambler class C β-laktamaz (AmpC- β-laktamaz) Saptanması.....	20
2.5.1.1. Fenotipik olarak Boronik asit disk testi ile Ambler Sınıf C β-laktamaz (AmpC- β-laktamaz) Saptanması	20
2.5.1.2. PZR Yöntemi ile AmpC- β-laktamaz aktivitesinin belirlenmesi.....	20
2.6. β-laktamaz <i>E. coli</i> izolatlarının filogenetik gruplarının belirlenmesi.....	22
2.7. <i>E. coli</i> izolatlarının Sanger Dizi Analizi.....	23
2.8. <i>E. coli</i> izolatlarının Maksimum Olabilirlik Yöntemi ve Tamura-Nei Modeli ile Filogenetik Analizi.....	24
3. BULGULAR	25
4. TARTIŞMA.....	46
KAYNAKÇA.....	58
ÖZGEÇMİŞ.....	66

SİMGELER VE KISALTMALAR

BPW	: Buffered Peptone Water
MHA	: Müller Hinton Agar
TSB	: Tryptone Soy Agar
BHI	: Brain Heart Broth
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
PMQR	: Plasmid Mediated Quinolone Resistance
dNTP	: DeoksiNükleotit Üç Fosfat
Taq	: Thermus aquaticus
MgCl ₂	: Magnezyum Klorür

ŞEKİLLER DİZİNİ

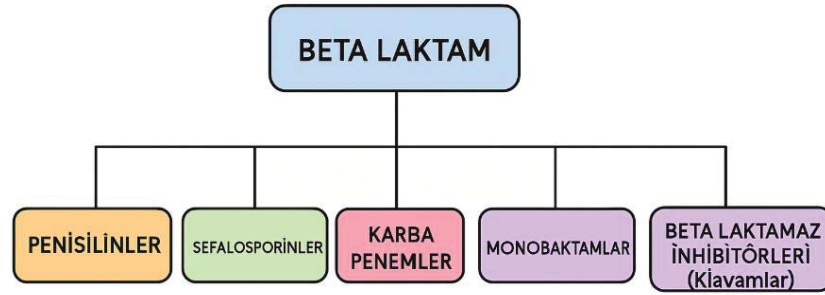
Şekil 1.1. β - laktam antibiyotiklerin sınıflandırılması (Yao and Moellering, 2007).....	1
Şekil 1.2. β -laktamazların Ambler Sınıfına göre gruplandırılması (Bush, 2018).....	2
Şekil 1.3. Karbapenemazların Ambler Sınıfına göre gruplandırılması.....	3
Şekil 2.1. Harlequin® <i>E.coli</i> /Coliform Agar.....	11
Şekil 2.2. Harlequin® <i>E.coli</i> /Coliform Kromojenik Agar’da üreyen <i>E. coli</i> izolatları.....	12
Şekil 2.3. İzolatların McFarland cihazında 0,5 bulanıklık derecesine ayarlanması.....	13
Şekil 2.4. PZR çalışmasında kullanılan aletler.....	15
Şekil 2.5. Meropenem için MİK değerinin belirlenmesinde kullanılan mikropalaklar ve mikropalak kuyucuklardaki meropenem konsantrasyonları ($\mu\text{g/mL}$)... ..	18
Şekil 3.1. Kromojenik agarda üreyen <i>E. coli</i> kolonileri.....	22
Şekil 3.2. <i>E. coli</i> izolatının MHA’da antibiyogram sonucu görüntüsü.....	23
Şekil 3.3. GSBL-negatif izolat.....	27
Şekil 3.4. <i>E. coli</i> izolatlarının PZR ile GSBL genlerinden <i>bla</i> _{TEM} geninin elektroforez görüntüsü. M:Marker (100 bp), 1-5; 7,8, 11-13 ve 15,16 sütunlar pozitif izolatlar. 6,9,10 ve 14 nolu sütunlar negatif.....	29
Şekil 3.5. <i>E. coli</i> izolatlarının PZR ile GSBL genlerinden <i>bla</i> _{SHV} elektroforez görüntüsü. M: Marker (100 bp); 1-10. Ve 12-14. sütunlar pozitif, 11. sütun negatif.....	29
Şekil 3.6. <i>E. coli</i> izolatlarının PZR ile GSBL genlerinden <i>bla</i> _{CTX-M} genlerinin elektroforez görüntüsü. M: Marker (100 bp); 2 ve 5. Sütunlar pozitif; diğer sütunlar negatif....	29
Şekil 3.7. İzolatların MİK sonuçları	30
Şekil 3.8. MHT pozitif izolat P: <i>Klebsiella pneumoniae</i> (Schroeter) Trevisan BAA 1705: MHT testi için pozitif kontrol.....	31
Şekil 3.9. A: 27 nolu <i>E.coli</i> izolatının MHT testi (MHT pozitif). B: 18 nolu balık kökenli <i>E. coli</i> izolatı ile yapılan MHT testi (MHT negatif).... ..	31
Şekil 3.10. M: Marker, 1. Sütun: S2- <i>bla</i> _{KPC} pozitif ATTCC suşu; 2. Sütun: S3: <i>Klebsiella pneumonia</i> ATTCC BAA-2146: <i>bla</i> _{NDM} ve <i>bla</i> _{OXA-48} pozitif ATCC suşu; 3. Sütun: <i>bla</i> _{KPC} ve <i>bla</i> _{OXA-48}	32
Şekil 3.11. M:Marker; 1-4 sütun <i>bla</i> _{VIM} pozitif <i>E.coli</i> izolatları; sütun 6: pozitif balık izolatı	32
Şekil 3.12. IMP pozitif <i>E. coli</i> izolatları: 1,2,3,4 nolu sütunlar sırasıyla 11,12,13,14 nolu <i>E. coli</i> izolatları; 5 nolu sütun: 22 nolu <i>E. coli</i> izolatı.....	36
Şekil 3.13. <i>E. coli</i> izolatlarına uygulanan mCIM ve eCIM sonuçları.....	36
Şekil 3.14. CITM ve DHA pozitif klinik zolatlar	36
Şekil 3.15. CITM ve FOX pozitif izolatlar	
Şekil 3.16. 12-13. Sütun: Single PZR sonucu CITM pozitif.....	39
Şekil 3.17. <i>E. coli</i> izolatlarına yapılan Boronik asit disk test sonuçları: IMP (10 μg); IMP (10 μg) ile APB (3-Aminophenylboronic acid- 300 μg); ME (10 μg); ME (10 μg) ile APB (300 μg); ceftazidime (30 μg); ceftazidime (30 μg) ile APB (300 μg), IMP (10 μg), IMP (10 μg) ile APB (600 μg), meropenem (10 μg), meropenem(10 μg) ile APB (600 μg), ceftazidime (30 μg), ve ceftazidime (30 μg) ile APB (600 μg).....	39
Şekil 3.18. <i>E. coli</i> izolatlarının filogenetik analiz sonuçları M: 100 bp Marker; Sütun 1 ve 2: sırasıyla 9 ve 10 nolu <i>E. coli</i> izolatları <i>chuA</i> , <i>YjaA</i> ve TSPE4 pozitif	41
Şekil 3.19. Çalışmada izole edilen 9 (GenBank accession number: PX125962- <i>Escherichia coli</i> -FISH 9) ve 10 (GenBank accession number: PX125961- <i>Escherichia coli</i> -FISH10) nolu izolata ait filogenetik ağaçlandırılması.....	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile GSBL gen bölgelerinin belirlenmesinde kullanılan primerler	14
Tablo 2.2. <i>bla</i> _{TEM} geni PZR reaksiyon bileşenleri	14
Tablo 2.3. <i>bla</i> _{TEM} geni amplifikasyon programı	14
Tablo 2.4. <i>bla</i> _{SHV} geni PZR reaksiyon bileşenleri	15
Tablo 2.5. <i>bla</i> _{SHV} geni Amplifikasyon programı.....	15
Tablo 2.6. <i>bla</i> _{CTX-M} geni PZR reaksiyon bileşenleri.....	15
Tablo 2.7. <i>bla</i> _{CTX-M} geni Amplifikasyon programı.....	15
Tablo 2.8. Meropenem için MİK değerinin değerlendirilmesi (EUCAST,2025).....	17
Tablo 2.9. Karbapenemaz genlerin varlığının PZR yöntemiyle saptanmasında kullanılan primerler.....	19
Tablo 2.10. Karbapenem genlerinin PZR reaksiyon bileşenleri ve amplifikasyon programı.....	19
Tablo 2.11. AmpC β-Laktamaz saptanmasında amplifikasyon amacıyla kullanılan primerler (Pérez-Pérez ve Hanson (2002)).....	21
Tablo 2.12. AmpC β-Laktamaz genleri için amplifikasyon programı.....	22
Tablo 2.13. <i>chuA</i> , ve <i>yjaA</i> ile <i>TspE4C</i> belirlenmesinde kullanılan primerlerin dizilimi (Clermont et al.2000).....	22
Tablo 2.14. <i>E. coli</i> izolatlarının Escobar -Paramo and vd. (2004)'e göre filogenetik gruplandırılmasına ilişkin tablo.....	23
Tablo 3.1. Çipura, levrek ve gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyogram sonuçları.....	27
Tablo 3.2. <i>Escherichia coli</i> izolatlarında <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} ve <i>bla</i> _{CTX-M} gen dağılımları.....	32
Tablo 3.3. <i>E.coli</i> izolatlarının fenotipik ve genotipik yöntemlerle karbapenemaz üretimi....	37
Tablo 3.4. <i>Escherichia coli</i> izolatlarında AmpC β-laktamaz genlerin dağılımları.....	38
Tablo 3.5. <i>E. coli</i> izolatlarının filogenetik gruplandırılması.....	40
Tablo 3.6. <i>E. coli</i> izolatlarında GSBL, Karbapenemaz, AmpC genlerinin dağılımları.....	42

1. GİRİŞ

Dünya genelinde penisilinler, sefalosporinler (sefalosporinlerden sefamisinler) ve karbapenemler en sık reçete edilen β -laktam grubu antibiyotikler arasında yer almaktadır. β -laktamazlar; β -laktam grubu antibiyotiklerin (Tablo 1.1) yapısında β -laktam halkasında bulunan siklik amid bağına parçalayarak bu tür antibiyotikleri etkisiz hale getiren enzimlerdir. Başta *Escherichia (E.) coli* olmak üzere *Enterobacteriaceae* ailesinin bir veya daha fazla üyesi β -laktamazları üretebilme yeteneklerine sahiptir ve dolayısıyla bu grup antibiyotiklere karşı dirençlidir (Pitout, 2008; Roy et al., 1983; Sheng et al., 2013). Antibiyotiklere dirençli bakteriler arasında, 2012 yılından beri genişlemiş spektrumlu β -laktamaz (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* (GSBL-E) olgularında bir artış görüldüğü bildirilmiş ve 2017 yılından bu yana da 9100'ü ölümlle sonuçlanan 197400 olgu bildirilmiştir. Bu nedenle günümüzde bakterilerdeki antibiyotik direnci (AR) küresel ölçüde giderek büyüyen bir halk ve hayvan sağlığı problemidir. Antibiyotik dirençliliğine bağlı ölüm oranının 2019 yılında 4,95 milyon olduğu tahmin edilmektedir (CDC, 2019).



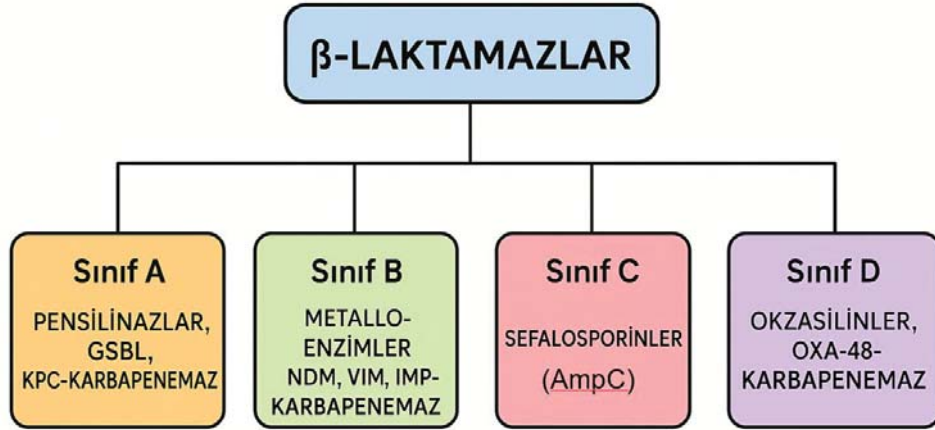
Şekil 1.1. β - laktam antibiyotiklerin sınıflandırılması (Yao and Moellering, 2007)

E. coli insan ve çiftlik hayvanlarında kommensal ve aynı zamanda onların bağırsak ve bağırsak dışı enfeksiyonlarına neden olan ve potansiyel patojen olma özelliğine (patobiyont) sahip bir bakteridir (Denamur et al., 2021). *E. coli*'de artan antibiyotik dirençliliklerin görülmesi büyüyen bir endişe kaynağıdır. Bunun nedeni bağırsak mikrobiyotasının ana bileşenlerinden olan bu organizma antibiyotik direnç genlerini (ARGler) koruyabilmesi ve diğer bakteri popülasyonlarına aktarabilmesidir (Szmolka and Nagy, 2013). β -laktam antibiyotiklerin yaygın kullanılması nedeniyle *E. coli*'nin dirençli hale gelmesi, toplumda yaygın hastalıklara yol açmaktadır (Bajaj

et al., 2016; Parker et al., 2016). GSBL üreten *E. coli*'nin oluşturduğu enfeksiyonlar, etkili ampirik tedavilerin azlığı nedeniyle sağlık hizmetleri ortamı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır (Islam et al., 2021).

β -laktamazlar: β -laktamazlar yapısal (Ambler) ve fonksiyonel (Bush, Jacoby ve Medeiros) olarak iki şekilde sınıflandırılır. Ambler sınıflamasında beta-laktamazlar A, B, C ve D olmak üzere 4 farklı sınıfta tanımlanmıştır (Bush, 2018):

- 1) Ambler Sınıf A (Penisilinazlar, GSBL, KPC-karbapenemaz);
- 2) Ambler Sınıf B Metallo-enzimler (NDM, VIM, IMP-karbapenemaz),
- 3) Ambler Sınıf C (Sefalosporinler) ve
- 4) Ambler Sınıf D (Okzasilinler, OXA-48-karbapenemaz) olmak üzere dört sınıf altında toplanır (Bush, 2018).

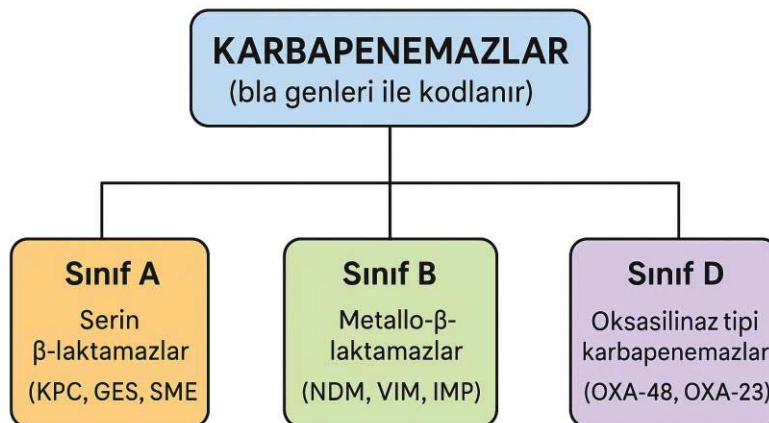


Şekil 1.2. β -laktamazların Ambler Sınıfına göre gruplandırılması (Bush, 2018)

Sınıf A β -laktamazlar: β -laktamazları kodlayan *bla* genleri ya plazmit ya da bakteriyel kromozomlarda lokalize olurlar (Bradford, 2001). Plazmit kaynaklı β -laktamazlar (sırasıyla *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} tarafından kodlanan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1) *Enterobacteriaceae* familyası türlerinde oldukça yaygındır ve plazmit yoluyla diğer bakterilere de aktarılabilir. Bu tür β -laktamazlar, önceleri penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilme kabiliyetine sahip iken sonraları TEM-1, TEM-2 ve SHV-enzimlerini kodlayan genlerde ortaya çıkan nokta mutasyonları sonucu GSBL'ler ortaya çıkmıştır. GSBL'ler penisilin ve birinci kuşak sefalosporinler dışında üçüncü kuşak sefalosporinleri ve monobaktamlar da dahil olmak üzere β -laktam antibiyotik türlerini hidrolize edebilir ve bu antibiyotiklere karşı bakterilere direnç

kazandırabilir (McDanel et al., 2017; Sheng et al., 2013). Klasik TEM ve SHV enzimlerinden türetilen ikinci grup GSBL'ler piperasilin-tazobaktam kombinasyonu dışında diğer antibiyotik-inhibitör kombinasyonlarına duyarlı değildirler (Drieux et al., 2008; Paterseon and Bonomo, 2005). Genişlemiş spektrumlu β -laktamazlardan TEM ve SHV dışında *bla*_{CTX-M} tarafından kodlanan CTX-M tarafından temsil edilen GSBL kategorisi de vardır. Bu enzim grubu sefotaksim için yüksek afiniteye sahiptir ve dünya çapında yaygın olarak tespit edilen 40'tan fazla varyantla beş gruba ayrılmıştır (Bradford, 2001; Bush, 2018). CTX-M enzimleri bağımsız olarak *Kluyvera* spp. nin kromozomal olarak kodlanan β -laktamazlardan gelişmiştir ve klavulanik aside duyarlıdır (Bush, 2018).

β -laktam grubu antibiyotiklerden karbapenemler (Sınıf A, Sınıf B ve Sınıf D): Sefalosporin ve penisilin gibi diğer β -laktam antibiyotiklerle karşılaştırıldığında geniş spektrumlu aktiviteye sahiptirler. Bu özellikleri nedeniyle çok daha fazla kullanıldığından karbapenem dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına neden olur (Elshamy et al., 2020). Karbapenem dirençliliğine karbapenemaz enzimleri neden olur. Bu grup antibiyotikler bakteri duvarındaki penisilin bağlayan proteinlerden PBP (penicillin binding proteins-penisilin bağlayan proteinler)-1 ve PBP-2'ye bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe ederler. Karbapenemazlarda *bla* genleri tarafından kodlanır ve Ambler Sınıfına göre 3 grup altında toplanır (Şekil 1.3) (Castanheira et al., 2012; Gupta et al., 2011; Sawa et al., 2020).



Şekil 1.3. Karbapenemazların Ambler Sınıfına göre gruplandırılması

1)Karbapenemaz Ambler Sınıf A enzimler: Tüm β -laktamları, karbapenemleri, sefalosporinleri, penisilinleri ve aztreonamı hidrolize edebilir ancak klavulanat ve tazobaktam tarafından inhibe edilir. Ayrıca, yeni sefalosporin antibiyotiği, seftarolin ve avibaktam (seftarolin/avibaktam) kombinasyonunun karbapenem dirençli (KPC) *Enterobacteriaceae* üreticilerine karşı aktivite ürettiği gösterilmiştir (Castanheira et al., 2012). Bu grupta KPC (plazmit kökenli- *Klebsiella pneumoniae* karbapenemaz), NMC (metaloenzim karbapenemaz), IMI (imipenem hidrolize edici beta-laktamaz), SME (*Serratia marcescens* enzimi) ve GES tipleri yer alır. Ancak sadece KPC *Klebsiella (K.) pneumonia* ve *Enterobacteraceae* üyeleri tarafından üretilir. KPC enzimleri tüm β -laktamazlara ve kinolonlar ve aminoglikozidler gibi diğer antibiyotik türlerine karşı direnç sağlar. Klavulanik asit, tazobaktam ve boronik asit gibi β -laktamaz inhibitörleri tarafından yalnızca kısmen inhibe edilirler (Anderson and Boerlin, 2020; Aurilio et al., 2022; Codjoe and Donkor, 2017; Gupta et al., 2011; Meletis et al., 2016; Nordmann et al., 2012; Taggar et al., 2020).

2) Karbapenemaz Ambler Sınıf B veya Metallo β -laktamazlar (MBL): β -laktam halkasını hidrolize etmek için çinko iyonu (Zn^{2+}) kullanılır. MBL'ler tüm β -laktam antibiyotiklere direnç sağlarlar ancak aztreonam ve etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) gibi β -laktam inhibitörlerine karşı duyarlıdırlar. Başlıcaları NDM (New Delhi metallo- β -laktamaz), VIM (Verona integron-encoded metallo- β -laktamaz) ve IMP (imipenem) yer alır. Bu enzim de *Enterobacteriaceae*'ler tarafından üretilir. Bunlar dışında SPM (São Paulo metallo β -laktamaz), GIM (German imipenemase) ve SIM (Seoul imipenemaz)'de bu grupta yer alırlar (Anderson and Boerlin, 2020; Aurilio et al., 2022; Codjoe and Donkor, 2017; Gupta et al., 2011; Meletis et al., 2016; Nordmann et al., 2012; Taggar et al., 2020).

3) Karbapenemaz Ambler Sınıf D enzimler: Sınıf D serin oksasilinazlar (OXA'lar) dünya çapında yaygın olarak tespit edilmiştir. β -laktamlara karşı hidrolitik aktiviteye, penisiline karşı yüksek aktiviteye ve geniş spektrumlu sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı zayıf aktiviteye sahiptirler. Bu grupta OXA-23, OXA-24 ve OXA-58 tipleri ile OXA-48 yer alır. Bunlardan sadece OXA-48 *Enterobacteriaceae* üyeleri tarafından kodlanırken, diğerleri *Acinobacter* tarafından üretilir (Sawa et al., 2020).

Beta-laktamaz grubundan üçüncü grubu oluşturan Ambler Sınıf C (AmpC) enzimler: AmpC / sefalosporinazlar: β -laktamaz grubu antibiyotiklerin sınıflandırılmasında yer alan bir diğer grup ise Ambler Sınıf C (AmpC) enzimleridir. AmpC-laktamazları aşırı eksprese eden organizmalar genellikle sefepim, sefpirom ve karbapenemler dışındaki tüm laktam ilaçlara dirençli olmaları nedeniyle önemli bir klinik sorun oluşturmaktadır (Girlich et al., 2000). Gram-negatif organizmalarda AmpC-laktamazların yapısal aşırı ekspresyonu, *ampC* kromozomal geninin serbest bırakılmasıyla veya bir plazmid veya başka aktarılabılır element üzerinde aktarılabılır bir *ampC* geninin edinilmesiyle gerçekleşir. Aktarılabılır *ampC* gen ürünlerine genellikle “plazmid aracılı AmpC-laktamazlar” adı verilir (Bauernfeind et al., 2000). Kromozomal genleri yapısal olarak aşırı eksprese eden organizmalara toplu olarak “baskılanmamış mutantlar” adı verilir (Hanson et al., 1999). Plazmid aracılı *ampC* genlerinin çoğunluğu *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin nozokomiyal izolatlarında bulunur. Ancak bu enzimler *Enterobacteriaceae* familyasının diğer cinslerinin suşlarında da tespit edilmiştir (Pérez-Pérez and Hanson, 2002).

β -laktamazlar grubunda yer alan GSBL'ler bazı *E. coli* suşları tarafından üretilmektedir; bu antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnç, artan yayılım ve bu bakteri suşlarının klinik önemi nedeniyle de endişe oluşturmaktadır (Dortet et al., 2015). GSBL-*E. coli* penisilin, birinci ve dördüncü kuşak sefalosporinler, β -laktamaz inhibitörleri ile terapi kombinasyonunu ve monobaktam aztreonam gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin etkisi azaltacak direnç mekanizmalarına sahiptir (Fair and Tor, 2014). β -laktamazlar arasında yer alan karbapenemler, GSBL-Gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavi etmek amacıyla kullanılan son basamak antimikrobiyal ilaçlar olarak kabul edilir (van Duin and Doi, 2017). Karbapeneme dirençli *E. coli* (CREc), temel olarak karbapenemaz üretiminin aracılık ettiği önemli halk sağlığı sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir (Gupta et al., 2011). Başta balık olmak üzere deniz ürünleri CREc ile kontamine olabilme ve onların antibiyotik dirençli genleri için bir rezervuar görevi görme potansiyeline sahiptir (Dwivedi et al., 2023; Hamza et al., 2020; Sing et al., 2020).

Akuatik ortamın antimikrobiyallerle kontaminasyonu, ekosistemde yalnızca ortamdaki bakteri çeşitliliğini etkilemekle kalmaz, aynı zamanda antimikrobiyal

direncin ortaya çıkmasına da neden olur. Böylece, akuatik çevre ortak bir antimikrobiyal direnç havuzu görevini görür ve besin zinciri yoluyla direncin yayılımına katkıda bulunur (Cabello et al., 2016). Ayrıca bu ortamda yetiştirilen balıklar da halk sağlığı yönünden endişe yaratır. Su ürünleri yetiştiriciliğinde profilaktik amaçlı veya metafilaktik tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin yüksek miktarı ve bunların çoklu sınıfları dikkat çekicidir. Kinolonlar, tetrasiklinler, amfenikoller ve sülfonamidler en sık kullanılan antibiyotik sınıflardır. Ancak bunlar aynı zamanda aminoglikozitler, antimikobakteriyel (rifampin), β -laktamlar (aminopenisilinler ve sefalosporinler) ve polimiksinleri de içerir. Bu faktör, antimikrobiyal direncin ortaya çıkması ve deniz ürünleri hayvanları arasında çoklu ilaca dirençli organizmaların seçilmesi için seçici baskıyı destekleyebilir. Aslında küresel antimikrobiyal tüketimin 2030 yılına kadar 13.600 tona ulaşacağı tahmin edilmektedir (Schar et al., 2020). Imipenem, meropenem, ertapenem, doripenem, biapenem, faropenem ve panipenem gibi karbapenemlerin insan klinik ortamında kullanımı onaylanmıştır (Taggar et al., 2020). Ancak karbapenemlerin hayvancılık veya veterinerlik alanlarında ruhsatı yoktur; bu nedenle karbapenem direnci hayvanlarda yaygın olarak test edilmemektedir. Ancak seftiofur, sefkinon, sefpodoksim, sefoperazon ve sefovesini içeren GSBL bu sektörde yaygın olarak bulunur. Ayrıca üçüncü nesil bir sefalosporin olan seftiofur, veterinerlik alanlarında kullanılan ana sefalosporindir ve gıda üretimi amacıyla yetiştirilen hayvanlarda bakteriyel tedavisinde onaylanmıştır (McEwen and Collington, 2018). Bu nedenle bu antibiyotikler, karbapenem dirençli suşların ekspresyonunu destekleyen seçim baskısı sağlayabilir (Ramírez-Castillo et al., 2023).

Balık dahil su ürünlerinden başta GSBL, karbapenamaz ve ampC- β -laktamaz olmak üzere β -laktamaz üretimine sahip dirençli *E. coli* ve diğer *Enterobacteriaceae*'ler ile ilgili bazı çalışmalar yapılmıştır (Benlikurt, 2016; Cherak et al., 2021; Das et al., 2019; Hamza et al., 2020; Singh et al., 2016; Sing et al., 2020). Bu çalışmaların birinde Sing vd. (2020) Hindistan'da satışa sunulan toplam 50 deniz ürünü [balık (n=37) ve karides (n=13)] örneğini *E. coli*'nin izolasyonu, antibiyotik duyarlılık özellikleri ve önemli β -laktamaz kodlayan genlerin varlığı yönünden analiz etmişlerdir. Araştırmacılar toplam 475 *E. coli* izolatlarının %71,58'inin GSBL pozitif olduğunu, GSBL genlerinden *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{TEM} genlerini sırasıyla %62,37,

%23,35 ve %2,6 oranlarında saptadıklarını bildirmişlerdir. Çalışmalarında ayrıca *E. coli* izolatlarında indikatör sefolosporinlerden sefotaksime %95, sefpodoksime %90,88'e ve seftazidime %90,29 oranında dirençli olduklarını saptamışlardır. Çalışma bulguları çerçevesinde imipeneme %74,41, sefoksitine %66,76 ve meropeneme %51,18 oranlarında yüksek direnç sergilediklerini de bildirmişlerdir. Çalışmalarında elde ettikleri *E. coli* zolatlarının GSBL genleri dışında metallo- β -laktamazı kodlayan *bla_{OXA}*'yı %7,06, *bla_{NDM}*'yi %4,42 ve *bla_{VIM}* genini de %0,88 oranlarında saptamışlardır. Bu çalışma ile MDR *E. coli*'nin yayılma riskini ve ayrıca kıyı sularının ve perakende pazarlarının hijyeninin iyileştirilme ihtiyacını vurgulamaktadır.

Başka bir çalışmada Hamza vd. (2020) dört balık çiftliğinde yetiştirilen 105 tilapia (tatlı su çipurası) balığının (*Oreochromis niloticus*) iç organları (karaciğer, dalak ve böbrek) ile havuz sularından izole ettikleri toplam 66 (%63) *Enterobacteriaceae* [*E. coli* (n=45), *Enterobacter cloacae* kompleks (n=12) ve *Klebsiella pneumonia* (n=9)] izolatını karbapenem (CRE) [imipenem (IPM), meropenem (MEM), ertapenem (ETP)] ve sefalosporinler [CEPH: sefotoksin (FOX), seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX), seftriaksone (CRO)] antibiyotikleri ile dirençli izolatları β -laktamaz genleri (*bla_{CTX-M-15}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{PER-1}*) ve karbapenemazı kodlayan genler (*bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, ve *bla_{NDM}*) yönünden analiz etmişlerdir. Toplam 66 *Enterobacteriaceae* izolatın 64'ünde (34 *E. coli*, 12 ECC ve 7 *K. pneumonia*) dirençlilik saptanırken, bu 64 izolatın 29'u CRE ve bütün test edilen CEPH'lere; 5'inin karbapenem ve test edilen sefalosporinlerin 2'sine; 26'sının yalnız karbapenem ve 4 izolatında yalnız CEPH'lere karşı dirençli olduklarını; 26 karbapenem dirençli izolatların ise yalnızca 17'si karbapenemazı üretimine sahip olduklarını ve 9 izolatın ise taranan üç taranan karbapenemazı geni (*bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}* ve *bla_{NDM}*) yönünden negatif olduklarını yine çalışma bulguları olarak bildirmişlerdir. Çalışmalarında balık dışında sular ve işçi ellerin de bu yönden analiz ettiklerini ve aldıkları örnek orijinine bakılmaksızın, tüm örneklerde baskın antibiyotik direnç geninin *bla_{KPC}* olduğunu ve bu genin yalnız veya β -laktam genleri (*bla_{CTX-M-15}*, *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-1}*, ve *bla_{PER-1}*) ile birlikte saptamışlardır.

Portekiz'de 2017 yılında yapılan bir çalışmada marketlerden satın alınan 150 taze balık örneğini *E. coli* ve GSBL-*E. coli* yönünden analiz edildiği, analiz edilen

örneklerden 45 örnekte *E. coli* saptandığı, bu izolatlardan 3'ünü ESBL-*E. coli* olarak tanımlanmış ve ESBL üreten izolatlarının tamamı β -laktamlara dirençli olduğu ve *bla*_{CTM-1} genini bu izolatlarda saptandığı bildirilmiştir. Ayrıca izolatların değişik oranlarda tetrasiklin, streptomisin, sulfamethoxole-trimethoprim, ampicilin ve kloramfenikollere karşı dirençli olduklarını da bildirmişlerdir (Silva et al., 2019).

Jinna vd. (2024) Japonya'da 80 yenilebilir nehir balıklarının bağırsak içeriğinin alınan örneklerinin 52 (%52,5)'sinden 87 *E. coli* izolatı elde ettikleri, *bla*_{CTX-M} genlerinden *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-55}, *bla*_{CTX-M-27} ve *bla*_{CTX-M-65} genlerini sırasıyla %9,2, %62,1, %3,4 ve %10,3 oranlarında saptadıklarını bildirmişlerdir.

Yapılan literatür taramaları sonucu Türkiye'de bu konu ile ilgili çok sınırlı çalışma yapılmış olduğu görülmüştür. Bu çalışmada Benlikurt (2016) Türkiye'nin çeşitli bölgelerinde 55 adet deniz ve tatlı su av balığı ve 45 adet deniz ve tatlı su kültür balığı örneklerinden izole ettikleri *Enterobacteriaceae* izolatlarının GSBL ve MBL tipi enzimlerin varlıkları yönünden analiz etmiş, yaptıkları tiplendirme sonucu av balıklarında 3 *E. coli* ve 1 *E. cloaca/asburiae* olmak üzere 4 adet, kültür balıklarında ise 4 *E. coli*, 1 *C. freundii* ve 1 *E. cloaca/asburiae* olmak üzere 6 adet GSBL-pozitif enterobakteri suşlarını saptamışlardır. Metallo beta laktamaz ise sadece 1 *Pseudomonas putida* suşunda saptamışlardır.

Başka bir çalışmada Dinc vd. (2020) 50 tatlı su balığı örneğinden, 70 bakteri saptadıkları ve bu bakterilerden 11'inin *E. coli*/O157:H7 olarak tanımlanmış ve bu izolatların 8'inde *bla*_{CTX-M}, 5'inde *bla*_{SHV} ve 4'ünde ise *bla*_{TEM} saptadıklarını bildirmişlerdir.

Birçok ülke karbapenem dirençli *E. coli*'nin çeşitli deniz ürünlerinde ve akuatik ortamda varlığı bildirilmiş olmakla beraber (Cherak et al., 2021; Das et al., 2019; Singh et al., 2016), balık ve tatlı su çevrelerini kapsayan sınırlı çalışmalar mevcuttur (Dwivedi et al., 2023). Bu çalışmaların biri Hindistan'dan Dwivedi vd. (2023) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar, çalışmalarını Hindistan'da tatlı su balıklarında 2020-2021 yılları arasında yürütmüşler ve tatlı su balıklarında CREc prevalansını %6,99 (95% CI: 3.78–10.20%) oranında saptamışlardır. Bütün izolatların MDR

olduğu ve başta karbapenem dirençli gen (*bla_{NDM-5}*) olmak üzere diğer antibiyotik dirençli [*(bla_{TEM}* (%64,7 olmak üzere toplam 100 adet balık örneklerini), *bla_{CTX-M-15}* (%35,3%), *bla_{OXA-1}* (%5,9), *tet* (A) (%100), *sul1* (%94,1), *qnrS* (%82,3), *cat1* (%35,3), ve *cat2* (%23,5)] genleri de taşıdıklarını bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca ERIC-PZR uygulayarak izolatların 5 (I-V) kümeye ayrıldıklarını; bu kümelerden küme I, II ve III ST167 (%76,4) olarak ve küme IV ise ST361 (%17,6) olarak tanımlanmıştır. Yine Hindistan’da yapılan başka bir çalışmada, Kalasseril vd. (2020) iki balık çiftliğinden sekiz CREC izolatı elde ettiklerini ve bütün CREC’ler karbapenem dirençli genler (*bla_{NDM-1}*, *bla_{VIM}*, ve *bla_{IMP}*) yönünden negatif olduğunu, bu dirençliliğe göle hastaneden gelen atık sudan kaynaklanmış olacağını bildirmişlerdir. Türkiye’de ise balıklarda bu konu ile ilgili bir veriye ulaşılamamıştır.

Escherichia coli, insan ve hayvanların bağırsak florasında bulunan ve dışkı ile atıldığında çevredeki ortamları kolayca kirletebilen ve genellikle dünya çapında antibiyotik direncinin yaygınlığını belirlemek için indikatör organizma olarak kullanılan bir bakteridir (Huang et al., 2012; Kostyla et al., 2015). Ayrıca, içme suyu, akuatik sistem ve gıdalarda mikrobiyal kontaminasyon için de önemli indikatördür (Divya et al., 2020; Kostyla et al., 2016; Nowicki et al., 2021). *E. coli*’deki antibiyotik direnci mutasyonlar, hareketli genetik unsurların kazanılması veya yatay gen transferi nedeniyle ortaya çıkar ve gıda zinciri yoluyla çapraz rezervuar bulaşması yoluyla yayılabilir (Summers, 2006). *Escherichia coli* klinik olarak anlamlı çoklu antibiyotiklere karşı direnç, antibiyotik kemoterapisinin etkinliğini ciddi şekilde tehlikeye atar. Çoklu antibiyotik direncine sahip *E. coli* yalnızca klinik ortamlarla sınırlı kalmaz. İnsanlar ve hayvanlar su ortamlarının kirlenme kaynakları olduğundan, Çoklu antibiyotik direnci (ÇAD) *E. coli* sıklıkla deniz ürünlerinde de bulunabilir. ÇAD *E. coli*’nin bir aracı olarak deniz ürünleri ciddi bir endişe kaynağıdır, çünkü bu tür bakteriler, deniz ürünleri aracılığıyla, bu tür direnç modellerini daha önce bilinmediği uzak coğrafi bölgelere taşıyabilmektedir (Lekshmi et al., 2017; Singh et al., 2020). Yapılan literatür taramaları sonucu Samsun dahil Türkiye’de bu kapsamda bir çalışmaya rastlanılamamıştır. Kültüre edilen balıkların yukarıda bahsedilen antibiyotik direnç profilleri konusunda halk sağlığını tehdit edip etmediği bilinmemektedir. Bu nedenle, yapılan bu çalışma ile Samsun bölgesinde tüketime sunulan çupra, levrek ve gökkuşağı alabalıklarından klasik kültür yöntemiyle izole edilen ve MALDI-TOF MS

ile doğrulanması yapılan toplam 34 *E. coli* izolatları materyal olarak kullanıldı. İzole edilen *E. coli* izolatlarında; i) Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemiyle CLSI (2021) ve EUROCAST (2023)'e göre genel antibiyotik direnç profilleri; ii) GSBL enzimlerinin üretimi fenotipik (çift disk sinerji testi) ve genotipik (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} gen bölgelerinin PZR ile belirlenmesi) olarak; iii) Sadece *Enterobacteriaceae* ailesi üyeleri tarafından üretilen karbapenemaz enzim üretimlerinin 3 farklı fenotipik [MİK testi, Modifiye Hodge Testi ve Modifiye karbapenem inaktivasyonu (mCIM ve EDTA – CIM (eCIM))] ve genotipik (KPC, NDM, VIM, IMP ve OXA-48 enzimlerini kodlayan genlerin PZR ile belirlenmesi) olarak; iv) AmpC- β -laktamaz üretimini de fenotipik (Boronik asit disk testi) ve genotipik (*LAT-1-4*, *CMY-2-7*, *BIL-1*; *DHA-1-2*; *ACC*, *MIR-1T ACT-1*; *FOX-1-5b*; *MOX-1,2*, *CMY-1*, *CMY-8'de-11*) yöntemlerle belirlendi. Çalışmada ayrıca *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplandırması (*chuA*, ve *yjaA* ile *TspE4C* genleri) yapıldı. Daha sonra rastgele seçilen *E. coli* izolatları çift yönlü Sanger dizi analizi ile filogenitiği yapıldı.

2. MATERYAL VE METOD

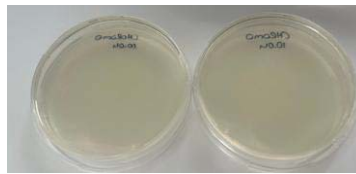
2.1. Materyal

Samsun bölgesinde tüketime sunulan 64 adet kültür balıklardan izole ve identifiye edilen toplam 34 adet *E. coli* izolatları materyal olarak kullanıldı. Bu amaçla 2024-2025 yılları arasında çipura, levrek ve gökkuşağı alabalıkları süpermarket ve balık satışı yapan balık marketlerinden satın alınarak en kısa sürede soğuk zincir altında laboratuvara getirildi ve *E. coli* varlığı ve antibiyotik direnç profilleri yönünden analiz edildi.

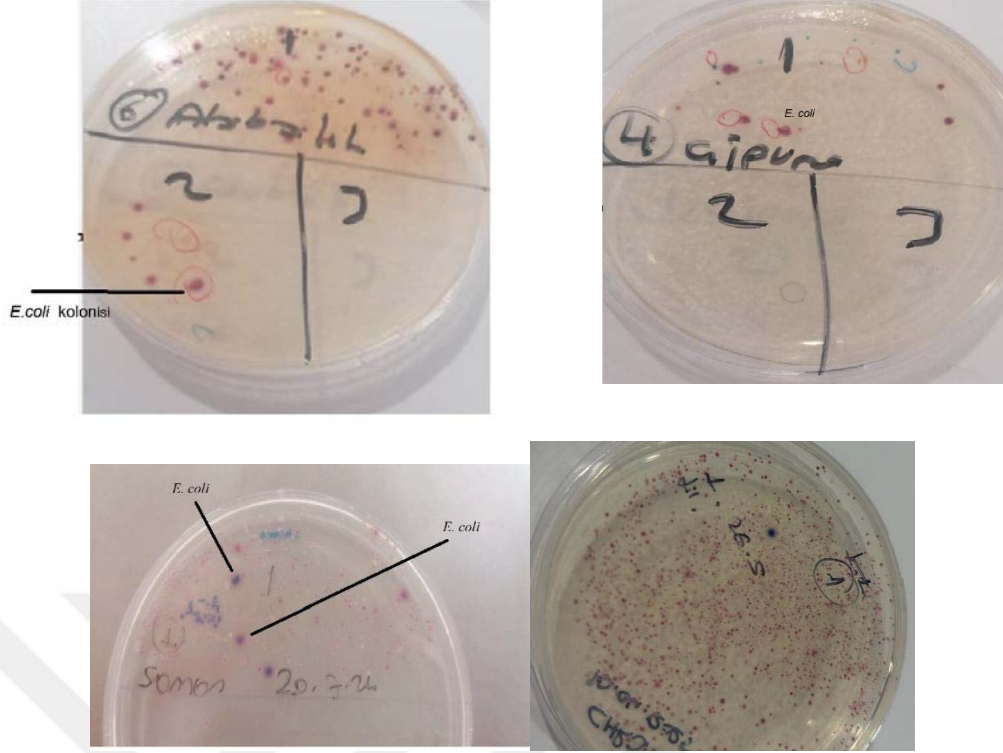
2.2. Yöntem

Laboratuvara getirilen balıklar steril poşetlere konuldu ve üzerlerine 225 ml Tamponlanmış Peptonlu su (BPW-Oxoid-CM 0509) ilave edildi ve 1-3 dakika ovuşturuldu (rinse metodu) ve takiben balıklar aseptik koşullarda poşetlerden uzaklaştırıldı. Daha sonra 10^{-1} desimal dilüsyonları yapılarak Harlequin® *E. coli*/Coliform Agar (Neogen-NCM1002A) agar plaklarına (Şekil 2.1) damla ve yayma plak yöntemleriyle ekimleri yapıldı ve plaklar 37 °C’de 24-48 saat aerobik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Plaklardan en fazla 5 koloniye kadar koloni (koyu mavi-mavi - menekşe renkli) seçildi (Şekil 2.2) (Dwivedi et al., 2023). Daha sonra bu koloniler Tryptone Soy Agar (TSA-Neogen-NCM0020A)’a geçilerek subkültüre edildi ve MALDI- TOF-MS (VITEK MS-Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) ve mass analyser is time-of-flight (TOF) anslyser)’la doğrulanması yapıldı. Bu şekilde 34 *E. coli* izolatu elde edildi.

E. coli izolatları %20 glyserollü Trypticasein Soy Broth (TSB) EP/USP/ISO- (Condolab 1224.00) içeren ependorf tüplerinde -20 C’de daha sonraki işlemler için muhafaza edildi.



Şekil 2.1. Harlequin® *E. coli*/Coliform Agar



Şekil 2.2. Harlequin® *E. coli*/Coliform Agar'da üreyen *E. coli* izolatları

2.3. İzolatlarda antibiyotik dirençlilik özelliklerinin belirlenmesi

Bu amaçla Kirby-Bauer Disk Difüzyon metodu uygulandı. Bu kapsamda 0,5 McFarland bulanıklık derecesine ayarlanmış izolatlar (Şekil 2.3) steril bir swap ile Mueller Hinton Agar (MHA-Oxoid-CM0337)'a yayıldı ve sonuçlar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (2021) ve EUROCAST (2023)'e göre yorumlandı. Bu kapsamda 11 farklı antibiyotik grubuna dahil 22 antibiyotik kullanıldı. Bunlar; 1)**Penisilinler** [ampisilin (AMP; 10 µg), amoksisilin/klavulanik asit (AMC; 20/10 µg) ampisilin/sulbaktam (SAM; 20 µg)], 2)**Sefalosporinler** [sefepim (FEP; 30 µg), sefotaksim (CTX; 30 µg), seftriakson (CRO;30 µg), seftazidim (CAZ; 30 µg), sefoksitin (FOX; 30 µg)], 3)**Karbapenemler** [imipenem (IMP; 10 µg), ertapenem (ETP; 10 µg), meropenem (MEM; 10 µg)]; 4)**Monobaktam grubu antibiyotikler** [aztreonam (ATM; 30 µg)]; 5)**Florokinolonlar** [siprofloksasin (CIP; 5 µg), levofloksasin (LEV; 5 µg)]; 6)**Aminoglikozitler** [gentamisin (CN;10 µg) ve tobramisin (10 µg)]; 7)**Tetrasiklinler** [tetrasiklin (TE; 30 µg) ve tigesiklin (TGC;15 µg)]; 8)**Kinolonlar** [(nalidiksik asit (NA; 30 µg)]; 9)**Amfenikoller** [kloramfenikol

(CHL; 30 µg)]; **10) Fosfomisin** (FF; 200 µg) ve **11) Trimetoprim/-sulfametoksazol** (SXT; 1,25/23,75 µg) idi. Tüm diskler BIOANALSES’den temin edildi. *E. coli* ATCC 25922 ise kalite kontrol suşu olarak kullanıldı.



Şekil 2.3. İzolatların McFarland cihazında 0,5 bulanıklık derecesine ayarlanması

2.4. İzolatlarda Beta-Laktamaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Bu amaçla iki yöntem uygulandı.

2.4.1. GSBL- Çift Disk Sinerji Testi (Double Disc Synergy Test (DDST))

Bu yöntem Stürenburg and Mack (2003) ve CLSI (2014)’e göre yapıldı. Bu amaçla izolatlar MHA üzerine geçildi ve plaklar 35 °C’de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyonu takiben iki koloni alındı ve fizyolojik tuzlu su ile 0,5 McFarland bulanıklık derecesinde hazırlanan bakteri süspansiyonları MHA plak yüzeyine steril koton swap ile yayıldı. Sonra besiyerin merkezine amoksisilin-klavulanik asit (AMC-20/10 µg) diski yerleştirildi ve bu diskten 25 mm uzaklıkta (merkezden merkeze) olacak şekilde sefriakson (CRO-30 µg), seftazidim (CAZ-30 µg), sefotaksim (CTX-30 µg) ve aztreonam (ATM) (30 µg) diskleri yerleştirildi. Plaklar 35 °C’de bir gece boyunca inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında CRO, CAZ, CTX veya ATM inhibisyon zonlarında AMC diskine doğru belirgin genişleme olması ya da iki inhibisyon zonu arasındaki bakteri üreyen alanda üremenin inhibe olduğu bir bölgenin görülmesi GSBL pozitif olarak değerlendirildi.

2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile GSBL gen bölgelerinin belirlenmesi

Bu kapsamda *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} gen bölgeleri Estaji vd. (2019)'a göre, *bla*_{CTX-M} ise Edelstein vd. (2003)'a göre saptandı. Çalışmada PZR analizinde kullanılan aletlerin bir kısmı Şekil 2.4'te; kullanılan primer dizilimi ve amplikon büyüklükleri Tablo 2.1'de, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genlerinin PZR bileşimleri ve amplikon programları da sırasıyla Tablo 2.2 ve Tablo 2.3; Tablo 2.4, ve Tablo 2.5; Tablo 2.6 ve Tablo 2.7'de yer almaktadır.

Tablo 2.1. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile GSBL gen bölgelerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primer adı	Primer dizisi (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>bla</i> _{CTX-M} -F <i>bla</i> _{CTX-M} -R	TTTGCATGTGTCAGTACCAGTAA CGATATCGTTGGTGGTGCCATA	544	Edelstein vd. (2003)
<i>bla</i> _{TEM} -F <i>bla</i> _{TEM} -R	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	861	Estaji vd. (2019)
<i>bla</i> _{SHV} F <i>bla</i> _{SHV} R	AAGATCCACTATCGCCAGCAG ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG	231	Estaji vd. (2019)

Tablo 2.2. *bla*_{TEM} geni PZR reaksiyon bileşenleri

Bileşenin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (µL)	Son konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	2,5 mM/ µL
dNTP mix (10 mM)	0,5	5 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5	5 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5	5 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,30	0,05 U/ µL
Kalıp DNA 30 (ng/µL)	2	1,2 ng/ µL
dH ₂ O	16,20	-
TOPLAM	25	

Tablo 2.3. *bla*_{TEM} geni amplifikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	30 döngü
Bağlanma	56	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	5 dk	1

Tablo 2.4. *bla_{SHV}* geni PZR reaksiyon bileşenleri

Bileşenin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (µL)	Son konsantrasyonu
Taq tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	2,5	0,5 mM/ µL
dNTP mix (10 mM)	0,5	5 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	0,5	5 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	0,5	5 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,30	0,05 U/ µL
Kalıp DNA 30 (ng/µL)	2	1,2 ng/ µL
dH ₂ O	16,20	-
TOPLAM	25	

Tablo 2.5. *bla_{SHV}* geni Amplifikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	5 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	40 döngü
Bağlanma	58	30 sn	
Uzama	72	30 sn	
Son uzama	72	5 dk	1

Tablo 2.6. *bla_{CTX-M}* geni PZR reaksiyon bileşenleri

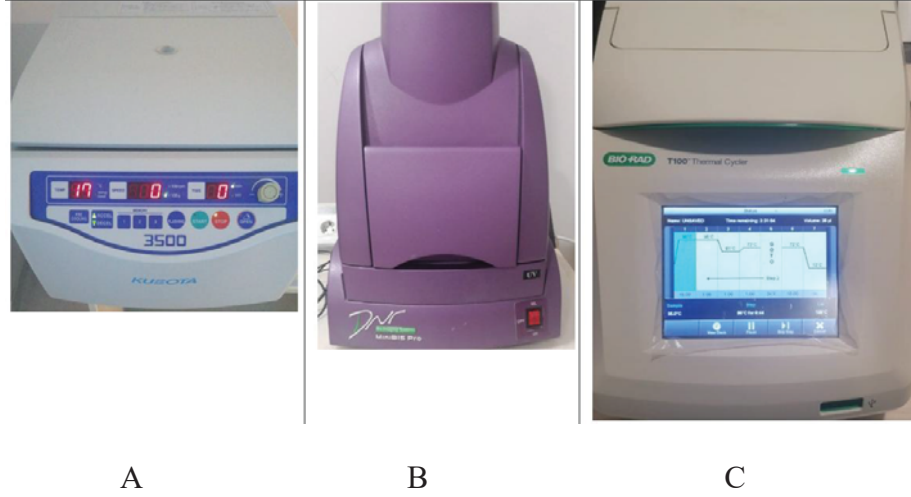
Bileşenin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (µL)	Son konsantrasyonu
PCR tamponu (10X)	2,5	1X/ µL
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	0,5 mM/ µL
dNTP mix (10 mM)	0,5	5 mM/ µL
Primer Forward (10 pmol/µL)	1	2,5 pmol/ µL
Primer Reverse (10 pmol/µL)	1	2,5 pmol/ µL
Taq DNA polimeraz (5U/µL)	0,30	0,05 U/ µL
Kalıp DNA 30 (ng/µL)	2	2,4 ng/ µL
dH ₂ O	16,20	-
TOPLAM	25	

Tablo 2.7. *bla_{CTX-M}* geni Amplifikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	95	1 dk	1
Denatürasyon	94	60 sn	35 döngü
Bağlanma	56	60 sn	
Uzama	72	55 sn	
Son uzama	72	10 dk	1

Klebsiella pneumoniae ATCC 700603-GSBL pozitif kontrol suşu olarak kullanıldı.

Amplikonlar ethidium bromide içeren %1 agaroz jelde 110 V'da 90 dakika yürütüldü.



Şekil 2.4. PZR çalışmasında kullanılan aletler: A: OWL OSP300-2Q elektroforez güç kaynağı, B: Bio-Imaging Systems Mini BIS PRO (Jel Görüntüleme cihazı), C: BIO RAD T100TM Thermal Cycler

2.4.3. Fenotipik Yöntemlerle karbapenamaz üretiminin belirlenmesi

Bu amaçla Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK), Modifiye Hodge Testi (MHT) ve Modifiye karbapenem inaktivasyon Testleri [mCIM ve EDTA-CIM (eCIM)] olmak üzere üç yöntem kullanıldı.

2.4.3.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK)

Meropenem antibiyotik solüsyonunun hazırlanışı: Meropenem (TCI M2279) antibiyotiğinden 51,2 mg meropenem tartıldı ve 10 ml distile suda çözündürülerek stok solüsyonu hazırlandı. Daha sonra stok solüsyondan 1 ml alınıp 9 ml steril distile suya eklenip vortekslenerek 10^{-1} dilüsyonu (512 µg /L) yapıldı.

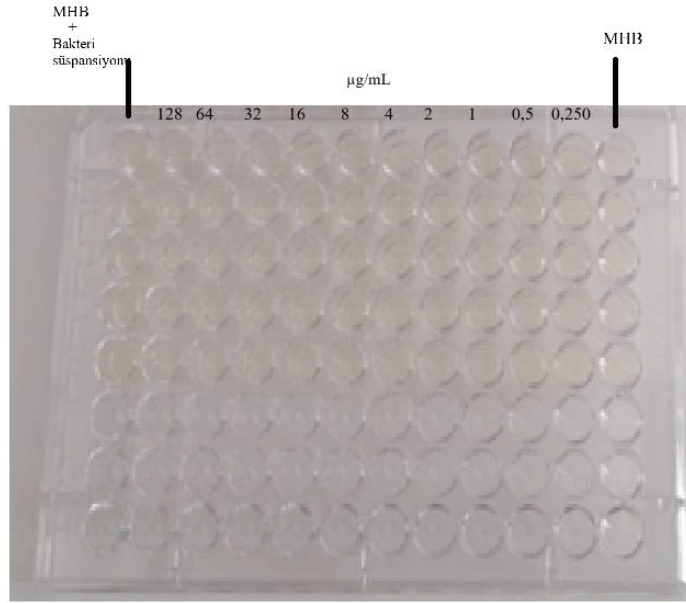
Bakteri süspansiyonunun hazırlanışı: 0,5 McFarland bulanıklık derecesine ayarlanan bakteri süspansiyonu MHB içerisinde 1:100 dilüe edilir.

Yapılışı: Bu yöntem için öncelikle steril U tabanlı MİK plağının tüm kuyucuklarına, katyon ayarı yapılacak olan Müller Hinton Broth (HIMEDIA M391-500 g) besiyerinden 100 µL dağıtıldı. Hazırlanmış olan meropenem antibiyotik solüsyonundan Şekil 2.5'te gösterildiği gibi sadece iki numaralı sütundaki kuyucuğa 100 µl meropenem antibiyotik solüsyonu ilave edildi ve pipetasyon yapıldı. Daha sonra ikinci kuyucuktan 100 µl alınıp üçüncü kuyucuğa ilave edildi. Bu şekilde 11. kuyucuk dahil seri dilüsyonları yapıldı (128-0,250 µg/ml). On birinci (11) kuyucuktan

100 µl alınıp atıldı. Daha sonra birinci kuyucuk ile 11. kuyucuk dahil 100 µl bakteri solüsyonu ilave edildi. Birinci kuyucukta sadece bakteri solüsyonu konuldu (pozitif kontrol). Son kuyucuğa ise sadece MHB (Müller Hinton Broth) kondu (negatif kontrol). MİK plakları 36 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında gözle görülebilir olarak üremesinin inhibe olduğu en düşük meropenem konsantrasyonu “Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK)” olarak belirlendi ve sonuçlar Tablo 2.8’e göre değerlendirildi (EUCAST, 2025; CLSI 2014).

Tablo 2.8. Meropenem için MİK değerinin değerlendirilmesi (EUCAST, 2025)

Kategori	EUCAST mg/L	µg/ml
Duyarlı (S)	≤2 mg/L	≤2 µg/ml
Intermediate (I)	4 mg/L	4 µg/ml
Dirençli (R)	> 8 mg/L	> 8 µg/ml



Şekil 2.5. Meropenem için MİK değerinin belirlenmesinde kullanılan mikropalaklar ve mikropalak kuyucuklardaki meropenem konsantrasyonları (µg/ml)

2.4.3.2. Modifiye Hodge Testi (MHT)

Bu amaçla 5 ml saline solüsyonunda 0,5 McFarland bulanıklık derecesine ayarlanmış karbapenem-sensitive *E. coli* ATCC 25922 indikatör suşunun 1:10’luk dilüsyonları MHA plaklarına yayılarak ekimleri yapıldı. Takiben plakların merkezine

10 µg meropenem diski yerleştirildi. Test edilecek *E. coli* izolatlarının 24 saatlik taze kültüründen steril tek kullanımlık yuvarlak uçlu öze ile 2-3 koloni alınarak meropenem diskinin kenarından petrinin kenarına kadar en az 25 mm olacak şekilde düz bir hat şeklinde ekimleri yapıldı ve plaklar 35±2 °C'de 16-24 saat inkübasyona bırakıldı. Karbapenem-sensitive *E. coli* ATCC 25922 test edilecek izolat ile karbapenem diske doğru genişleyerek üredi. Aynı şekilde *Klebsiella pneumonia* ATCC BAA-1705 suşu pozitif, *K. pneumonia* ATCC BAA-2146 izolatı ise negatif kontrol olarak kullanıldı. İnkübasyon sonrasında ekim hattında yonca yaprağı şeklindeki girinti veren üreme test yönünden pozitif olarak kabul edildi.

2.4.3.3. Modifiye karbapenem inaktivasyon Testler: (mCIM) ve EDTA-CIM (eCIM) metotları

Bu yöntem Tsai vd. (2020)'a göre yapıldı. Bu testin prensibi 10 µg meropenem (MEM) disk eşit miktarda karbapenem-üreten mikroorganizma ile aynı miktarda inkübe edilir. Karbapenem disk karbapemaz üretimi tarafından degrade edilir; aksine, eğer test mikroorganizma karbapenemaz üretimine sahip değilse, bakteriyal süspansiyon içindeki MEM inkübasyon süresi boyunca antimikrobiyal aktivitesi sabit kalır.

Bu kapsamda 2 ml TSB içeren iki tüp hazırlandı. Her iki tüpe 1'er µl (bir öze dolusu) ya da bir öze dolusu test edilecek bakteri kolonileri inoküle edildi. eCIM testi için ikinci TSB içeren ikinci tüpe ise 20 µl EDTA [0.5M EDTA, pH 8.0 (HIMEDIA-ML014-500)] eklendi. Daha sonra 10 µg meropenem diski her iki tüpe konuldu ve tüpler 35 °C'de 4 saat (± 15 dakika) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu takiben diskler *E. coli* ATCC 25922 suşunu 0,5 McFarland derecesine ayarlanmış süspansiyonu swap ile MHA plaklarına ekimi yapılan plaklara yerleştirildi ve plaklar 35 °C'de 16-20 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda zon çapları ölçüldü.

Sonuçların değerlendirilmesi: MEM diski zon çapı eğer 6-15 mm çapında ise pozitif; eğer zon çapı 16-18 mm ise intermediate (İ), zon çapı ≥19 mm ise negatif olarak yorumlandı (Pierce et al., 2017).

2.4.3.4. PZR ile karbapenem dirençli gen bölgelerinin saptanması

Bakteriyal DNA eldesi kaynatma yöntemiyle yapıldı. Karbapenemaz genlerin varlığı (*bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{OXA-48}) mütipleks PZR ile Poirel vd. (2011)'nin belirlediği yöntem modifiye edilerek uygulandı. Bu kapsamda 5 gen bölgesine ait primerler Tablo 2.9'de, PZR reaksiyon bileşenleri ve amplikasyon programı Tablo 2.10'da gösterildi.

Tablo 2.9. Karbapenemaz genlerin varlığının PZR yöntemiyle saptanmasında kullanılan primerler

Saptanacak genler	Primer Dizilimi ((5'-3') ^c (D = A veya G veya T; Y = C veya T)	Amplikon büyüklüğü (bp)	Kaynak
<i>bla</i> _{NDM}	F-GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC R-CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC	621	Poirel vd. (2011)
<i>bla</i> _{VIM}	F-GAT GGT GTT TGG TCG CAT A R-CGA ATG CGC AGC ACC AG	390	
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-FM CGT CTA GTT CTG CTG TCT TG KPC-RM-CTT GTC ATC CTT GTT AGG CG	798	
<i>bla</i> _{IMP}	F-GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C R-GGT TTA AYA AAA CAA CCA CC	232	
<i>bla</i> _{OXA-48}	F-GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC R-CAT CAA GTT CAA CCC AAC CG	438	

F, sense primer; R, antisense primer. D=A veya G veya T; Y=C or T

Tablo 2.10. Karbapenem genlerinin PZR reaksiyon bileşenleri ve amplikasyon programı

Bileşenin adı ve konsantrasyonu	Miktarı (μL)	Amplikon Programı
Steril distile Su	11,35 μl	95 °C'de 3 dk 95 °C'de 30 sn 52 °C'de 30 sn 72 °C'de 1 dk 72 °C'de 10 dk } 36 döngü
10X PCR buffer	5 μl	
MgCl ₂ (25 mM)	6 μl	
dNTP (10 mM)	0,4 μl	
KPC-F (10 pmol)	2,5 μl	
KPC- R (10 pmol)	2,5 μl	
OXA-48-F (10 pmol)	2,5 μl	72 °C'de 10 dk
OXA-48-R	2,5 μl	
NDM-F (10 pmol)	2,5 μl	
NDM-R	2,5 μl	
IMP-F (10 pmol)	2,5 μl	
IMP-R	2,5 μl	
VIM-F 10 pmol)	2,5 μl	72 °C'de 10 dk
VIM-R	2,5 μl	
Taq DNA polimeraz	0,25 μl	
Template DNA	2 μl	
Toplam hacim	50 μl	

Amplikonlar %1,5 agaroz jelde -ethidium bromide içeren- 115 V'da 90 dk yürütüldü. 100 bp DNA ladder kullanıldı

2.5.1. Ambler Sınıf C β -laktamaz (AmpC- β -laktamaz) Saptanması

AmpC- β -laktamaz fenotipik (Boronik asit disk testi) ile ve genotipik olarak AmpC gen varlıkları PZR tekniği ile belirlendi.

2.5.1.1. Fenotipik olarak Boronik asit disk testi ile Ambler Sınıf C β -laktamaz (AmpC- β -laktamaz) Saptanması

Cefoxitin (sefoksitine) (30 μ g)'ne dirençli izolatlar AmpC- β -laktamaz identifikasyonu için şüpheli suşlar olarak değerlendirildi (Coudron et al., 2003; Elsherif et al., 2016).

Test edilecek izolatlar normal saline solüsyonu ile 0,5 McFarland turbidite derecesine ayarlanarak yaklaşık 10^8 k.o.b/ml olacak şekilde hazırlandı. Daha sonra CLSI'nin önerdiği şekilde MHA plaklarına swap ile yayılarak ekimleri yapıldı. Bu kapsamda IMP (10 μ g); IMP (10 μ g) ile APB (300 μ g); meropenem (10 μ g); meropenem (10 μ g) ile APB (3-Aminophenylboronic acid - 300 μ g); ceftazidime (30 μ g); ceftazidime (30 μ g) ile APB (300 μ g), IMP (10 μ g), IMP (10 μ g) ile APB (600 μ g), meropenem (10 μ g), meropenem(10 μ g) ile APB (600 μ g), ceftazidime (30 μ g), ve ceftazidime (30 μ g) ile APB (600 μ g) diskleri kullanıldı (Elsherif et al., 2016).

APM Hazırlanışı: 3-Aminophenylboronic acid (APB) (900988-1 G Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 50 mg/ml suda çözöldü ve 6 ve 12 μ l (300 ve 600 μ g konsantrasyon sırasıyla) ticari olarak satılan diske damlatılarak uygulandı. Diskler daha sonra kurutuldu ve 60 dakika içinde uygulandı. Boronik asit ile uygulanan IMP, meropenem ve ceftazidime ile APB'siz diskler arasında zon çaplarında ≥ 5 mm fark dirençli izolatlar olarak değerlendirildi (Tsakris et al., 2009).

2.5.1.2. PZR Yöntemi ile AmpC- β -laktamaz aktivitesinin belirlenmesi

PZR ile plazmid-AmpC- β -laktamaz aktivitesi Pérez-Pérez ve Hanson (2002)'e göre yapıldı. Bu kapsamda kullanılan primerler Tablo 2.11, amplikasyon programı da Tablo 2.121'de, yer almaktadır.

PZR karışımı: Toplam hacim 50 μ l; 20 mM Tris-HCl (pH 8.4); 50 mM KCl, her bir dNTP'den 0,2 mM; 1,5 mM MgCl₂; 0,6 μ M MOXMF, MOXMR, CITMF, CITMR,

DHAM ve DHAMR primerleri; 0,5 µM ACCMF, ACCMR, EBCMF ve EBCMR primerleri; 0,4 µM FOXMF ve FOXMR primerleri; 1,25 U Taq DNA polimeraz. Template DNA ise 48 µl master karışıma 0,2 µl eklendi. Uygulanan amplikon programı Tablo 2.12’de yer almaktadır.

Tablo 2.11. AmpC β-Laktamaz saptanmasında amplifikasyon amacıyla kullanılan primerler (Pérez-Pérez and Hanson (2002))

Hedef Genler	Primer dizilimi (5' → 3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	Nükleotid pozisyonu	Gen Bankası Erişim No
<i>LAT-1</i> 'den <i>LAT-4</i> 'e kadar, <i>CMY-2</i> 'den <i>CMY-7</i> 'ye kadar, <i>BIL-1</i>	CITMF: 5'-TGG CCA GAA CTG ACA GGC AAA-3' CITMR: 5'- TTT CTC CTG AAC GTG GCT GGC-3'	462	478-498	X78117
<i>DHA-1</i> , <i>DHA-2</i>	DHAMF: 5'-AAC TTT CAC AGG TGT GCT GGG T-3' DHAMR: 5'- CCG TAC GCA TAC TGG CTT TGC-3'	405	1244-1265 1648-1628	Y16410
<i>ACC</i>	ACCMF: 5'- AAC AGC CTC AGC AGC CGG TTA-3' ACCMR: 5'-TTC GCC GCAATC ATC CCT AGC-3'	346		AJ133121
<i>MIR-1T</i> <i>ACT-1</i>	EBCMF: 5'-TCG GTA AAG CCG ATG TTG CGG-3' EBCMR: 5'-CTT CCA CTG CGG CTG CCA GTT-3'	302	1115-1135 1416-1396	M37839
<i>FOX-1</i> 'den <i>FOX5b</i> 'ye kadar	FOXMF: 5'-AAC ATG GGG TAT CAG GGA GAT G-3' FOXMR: 5'- CAA AGC GCG TAA CCG GAT TGG-3'	190	1475-1496 1664-1644	X77455
<i>MOX-1</i> , <i>MOX-2</i> , <i>CMY-1</i> , <i>CMY-8</i> 'den - <i>CMY-11</i> 'e kadar	MOXMF: 5'- GCT GCT CAA GGA GCA CAG GAT-3' MOXR: 5'- CAC ATT GAC ATA GGT GTG GTG C-3'	520	358-378 877-856	D13304

Tablo 2.12. AmpC β -Laktamaz genleri için amplifikasyon programı

Basamak	Sıcaklık (°C)	Süre	Döngü sayısı
Ön denatürasyon	94	3 dk	1
Denatürasyon	94	30 sn	} 25
Bağlanma	64	30 sn	
Uzama	72	1 dk	
Son uzama	72	1 dk	1

Amplikon ürünü %2 agaroz jelde yürütüldü. 100 bp DNA ladder kullanıldı.

2.6. β -laktamaz *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplarının belirlenmesi

Bu amaçla mltipleks PZR ile Clermont vd. (2000)'ne göre belirlendi. Bu amaçla kullanılan primerler ve amplikon programı Tablo 2.13'te yer almaktadır. Çalışmada *chuA* ve *yjaA* genlerin varlığı/yokluğuna ve Escobar-Paramoand vd. (2004)'e göre DNA fragmanları (TSPE4) belirlenerek gruplandırma yapıldı (Şekil 2.5, Tablo 2.14).

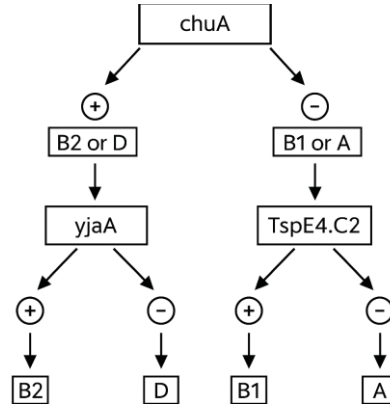
Tablo 2. 13. *chuA* ve *yjaA* ile TspE4C belirlenmesinde kullanılan primerlerin dizilimi (Clermont et al., 2000)

Primer Adı	Primer dizisi (5'-3')	Amplikon büyüklüğü (bp)	Anneling derecesi (°C)	Kaynak
<i>chuA</i>	F: 5'-GACGAACCAACGGTCAGGAT-3' R: TGCCGCCAGTACC AAAGACA-3'	279	55*	Clermont vd. (2000)
<i>yjaA</i>	F: 5'-TGAAGTGTGACGAGACGCT G-3' 5'-ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC-3'	211	55*	
TspE4C	F: 5'GAGTAATGTCGGGGCATTCA3' R: 5'GCGCCAACAAAGTATTACG-3'	152	55*	Escobar-Paramoand vd. (2004)

*Gerektiğinde 59 °C

Amplikon Programı: Başlangıç denatürasyon: 94°C'de 4 dakika; 30 döngü: 94°C'de 5 s, 59 °C'de 20 s, son uzama 72°C'de 5 dakika

Toplam PZR hacmi 20 μ L; 2 μ L 10X buffer, her bir primerden 20 pmol, her bir dNTP 'den 2 μ M, 2,5 U Taq polimeraz ve 200 ng genomik DNA.



Şekil 2.5. *E. coli* izolatlarının Clermont vd. (2000)'a göre filogenetik gruplandırılmasına ilişkin şema

Tablo 2.14. *E. coli* izolatlarının Escobar -Paramoand vd. (2004)'e göre filogenetik gruplandırılmasına ilişkin tablo

Grup	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	TspEC2
A ₀ (Grup A)	-	-	-
A ₁	-	+	-
B ₂ (Grup B ₂)	+	+	-
D ₁ (Grup D)	+	-	+
D ₂ (Grup D)	+	-	+

2.7. *E. coli* izolatlarının Sanger Dizi Analizi

Hizmet alımı şeklinde yapıldı. İzolatlardan DNA izolasyonu EurX GeneMATRIX Bacterial & Yeast DNA izolasyon kiti (Polonya), Universal primer olarak 27F – 1492R kullanıldı. Kullanılan primer dizilimi: 27F 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve 1492R 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T- 3''dir. PZR reaksiyonunuz Solis Biodyne (Estonya) FIREPol® DNA Polymerase Taq polimeraz enzimiyle gerçekleştirilmiştir. Amplikon programı ise 95°C 5 dakika (ön denatürasyon); 30°C'de 45 saniye (denatürasyon); 30°C'de 45 saniye- bağlanma); 30°C'de 80 saniye; 30°C'de 5 dakika –son uzama (Kyrathec thermocycler). PZR ürünü saflaştırılmasında MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti kullanılmıştır. Sanger Dizileme örnekleriniz için ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA). 27F ve 1492R primerleriyle elde edilen okumalarda BioEdit yazılımı içinde CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır.

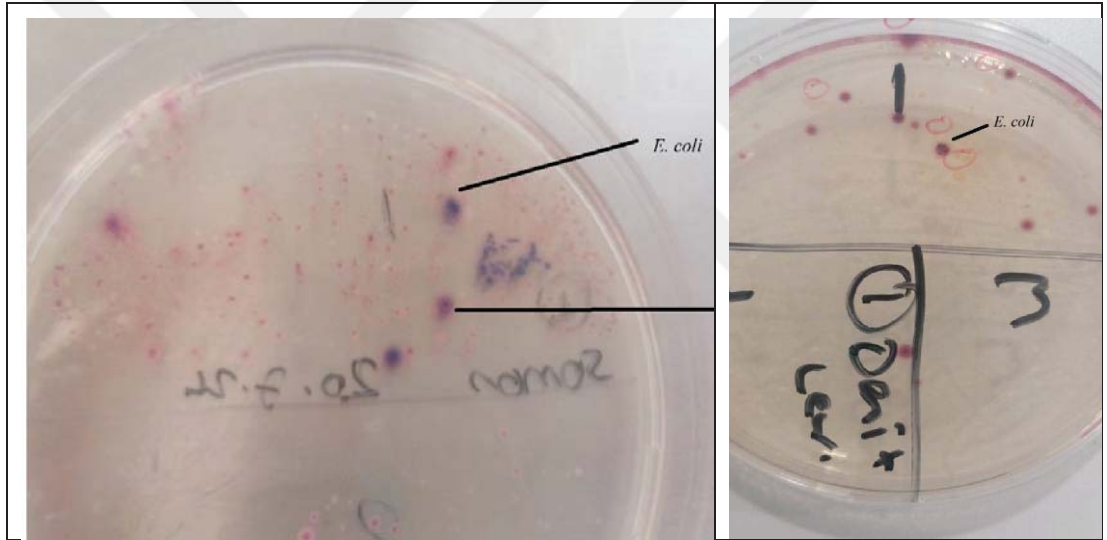
2.8. *E. coli* izolatlarının Maksimum Olabilirlik Yöntemi ve Tamura-Nei Modeli ile Filogenetik Analizi

Filogenetik ağaçlandırma, “Maksimum Olabilirlik yöntemi” ve “Tamura-Nei modeli” kullanılarak çıkarılmıştır (Tamura and Nei, 1993). En yüksek log olabilirlik değerine (-2980,90) sahip ağaç gösterilmektedir. Heuristik arama için başlangıç ağaç (lar)ı, Tamura-Nei modelini kullanarak tahmin edilen çift yönlü mesafeler matrisine Neighbor-Join ve BioNJ algoritmaları uygulanarak otomatik olarak elde edilmiş ve ardından daha yüksek log olabilirlik değerine sahip topoloji seçilmiştir.

Ağaç ölçekli olarak çizilmiş olup, dal uzunlukları bölge başına düşen yer değiştirme (substitüsyon) sayısını göstermektedir. Bu analiz 10 nükleotit dizisini içermektedir. Nihai veri setinde toplam 1520 pozisyon bulunmaktadır. Evrimsel analizler MEGA11 (Tamura et al., 2021) kullanılarak yapılmıştır.

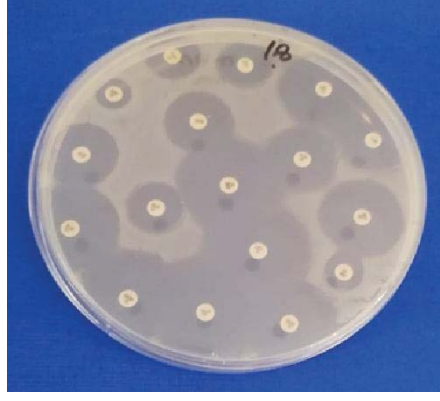
3. BULGULAR

Analiz edilen 64 kültür balık örneğinden toplam 34 *E. coli* izolatu tanımlanmış (Şekil 3.1). Tanımlanmış *E. coli* izolatlarının genel antibiyotik direnç özellikleri disk difüzyon yöntemiyle belirlenirken, beta-laktamaz aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla; GSBL, karbapenamaz üretimi, Ambler Sınıf C-β-laktamaz (AmpC- β-laktamaz) özellikleri çeşitli fenotipik ve genotipik yöntemleri kullanılarak analiz edildi. Çalışmada *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplarının belirlenmesi de PZR yöntemi kullanılarak belirlendi. Ayrıca rastgele seçilen izolatlara çift yönlü Sanger dizi analizi ile filogenetik ağacı belirlendi.



Şekil 3.1. Kromojenik agarda üreyen *E. coli* kolonileri

***E. coli* izolatlarının Antibiyogram sonuçları:** Bu kapsamda *E. coli* izolatları 11 farklı antibiyotik grubuna ait toplam 22 farklı antibiyotiğe karşı analiz edildi (Şekil 3.2) ve analiz bulguları Tablo 3.1.'de gösterildi.



Şekil 3.2. *E. coli* izolatının MHA’da antibiyogram sonucu

Tablo 3.1. Çipura, levrek ve gökkuşuğu alabalıklarından izole edilen *E. coli* izolatlarının antibiyogram sonuçları

SUŞ	Penisilin			Sefalosporin			Karbapenem			Mo no bak tam	Floroki- nolon	Amino- glükozit	Tetrasik- lin	Kino- lon	Am- feni- kol	Fos fo- mis in	Sül- fo- no- mid					
	A M	A M	SA M	FE P	CT X	CR O	CA Z	FO X	IP M	ET P	ME M	AT M	CI P	L E	CN	TOB	TE	TG C	NA	C	FF	SXT R
1	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	5
2	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
6	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
7	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
8	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
9	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	IR	S	1
10	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
11	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
12	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	3
13	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
14	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
15	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
16	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
17	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2
18	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
19	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
20	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
21	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3
22	R	S	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3
23	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	1
24	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	8
25	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4
26	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	2

Tablo 3. 1 (devamı)

27	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4
28	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	R	S	5
29	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4
30	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	3
31	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	3
32	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	4
33	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	S	R	S	S	S	6
34	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
35	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	0
No	16	11	17	2	0	0	0	6	0	4	0	0	2	2	0	4	2	2	0

1)Penisilinler [ampisilin (AMP; 10 µg), amoksisilin/klavulanik asit (AMC; 20/10 µg) ampisilin/sulbaktam (SAM; 20 µg)], 2)Sefalosporinler [sefepim (FEP; 30 µg), sefotaksim (CTX; 30 µg), seftriakson (CRO;30 µg), seftazidim (CAZ; 30 µg), sefoksitin (FOX; 30 µg)], 3)Karapenemler [imipenem (IMP; 10 µg), ertapenem (ETP; 10 µg), meropenem (MEM; 10 µg)]; 4)Monobaktam grubu antibiyotikler [aztreonam (ATM; 30 µg)]; 5)Florokinolonlar [siprofloksasin (CIP; 5 µg), levofloksasin (5 µg)]; 6)Aminoglikozidler [gentamisin (CN;10 µg) ve tobramisin (TOB;10 µg)]; 7)Tetrasiklinler [tetrasiklin (TE; 30 µg), tigesiklin (TGC;15 µg)]; 8)Kinolonlar [(nalidiksik asit (NA; 30 µg)]; 9)Amfenikoller [kloramfenikol (CHL; 30 µg)]; 10)Fosfomisin (FF;200 µg) ve 11)Trimetoprim/-sulfametoksazol (SXT; 1,25/23,75 µg)

Escherichia coli izolatlarının antibiyotiğe dirençlilik profilleri Tablo 3.1, Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

1) Penisilin grubu antibiyotiklerden;

Ampisiline (AMP) karşı: 16,

Amoksisilin/klavulanik aside (AMC) karşı: 11 ve

Ampisilin/sulbaktama (SAM) karşı: 17 *E. coli* izolatı dirençli;

2) Sefalosporin grubu antibiyotiklerden;

Sefepime (FEP) karşı: 2 *E. coli* izolatı dirençli bulunurken,

Sefotaksime (CTX), sefriaksona (CRO), seftazidime (CAZ) ve sefoksitine (FOX) karşı tüm izolatlar duyarlı;

3) Karbapenem grubu antibiyotiklerden sadece

Ertapeneme (ETP) karşı: 4 *E. coli* izolatı dirençli bulunurken,

imipenem (IMP) ve meropeneme (MEM) karşı tüm izolatların duyarlı;

4) Monobaktam grubu antibiyotiklerden;

Aztreonam (ATM)’ye karşı tüm izolatlar duyarlı;

5) Florokinolon grubu antibiyotiklerden;

Siprofloksasine (CIP) karşı: 2

Levofloksasin (LEV)’e karşı: 2 izolat dirençli;

6) Aminoglikozid grubu antibiyotiklerden;

Tüm izolatlar gentamisin (CN) ve tobramisine (TOB) karşı duyarlı;

7) Tetrasiklin grubundan;

Tetrasiklin (TE)’e karşı: 4 izolat dirençli iken,

Tigesikline (TBC) karşı tüm izolatların duyarlı;

8) Kinolon grubu antibiyotiklerden;

Nalidiksik aside (NA) karşı: 2 *E. coli* izolatı dirençli;

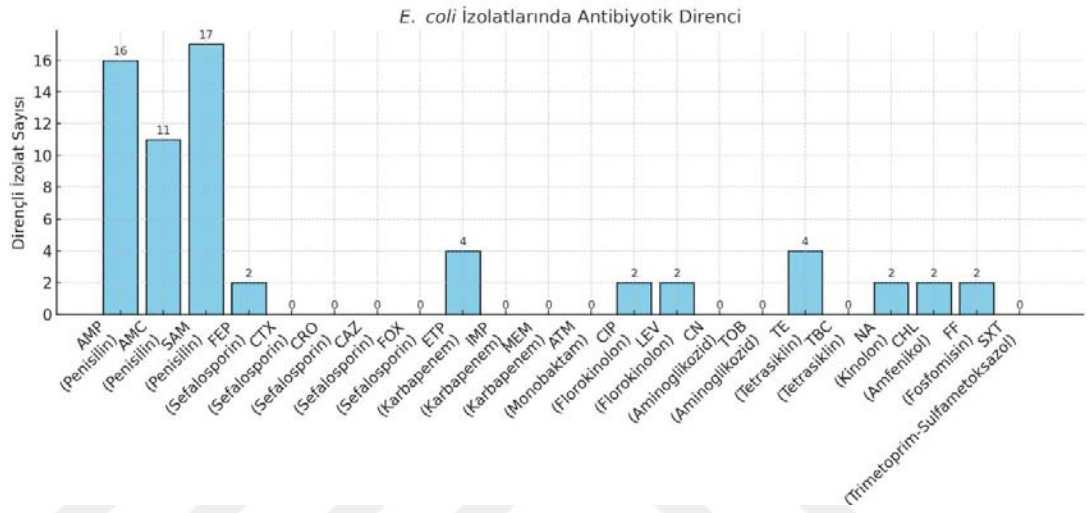
9) Amfenikoller grubundan;

Kloramfenikole (CHL; 30 µg) karşı: 2 *E. coli* izolatu dirençli;

10) Fosfomisin grubundan

Fosfomisine (FF) karşı: 2 *E. coli* izolatu dirençli;

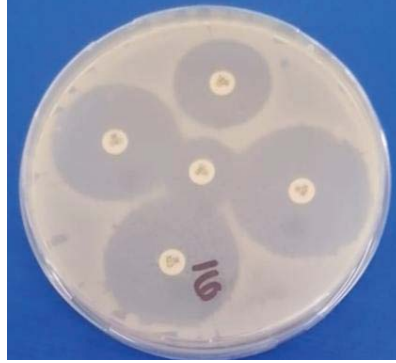
11) Trimetoprim/-sulfametoksazol (SXT)'e karşı ise tüm isolatlar duyarlı oldukları belirlendi.



Şekil 3. 1. *Escherichia coli* izolatlarının antibiyotik dirençlilik profilleri

İzolatlar çoklu antibiyotik dirençliliği (ÇAD): Çalışmada en az üç farklı antibiyotik grubuna direnç gösteren isolatlar ÇAD olarak değerlendirildi. Bulgular bu açıdan değerlendirildiğinde 34 izolattan 4 (%11,76)'ünün ÇAD olduğu saptandı (Tablo 3.1). ÇAD özelliği gösteren 1 nolu *E. coli* izolatu penisilin (AM, AMC, SAM), sefalosporin (FOX) ve tetrasiklin (TE) olmak üzere 3 farklı antibiyotik grubundan 5 farklı antibiyotiğe; 24 nolu *E.coli* izolatu penisilin (AM, AMC, SAM), florokinolon (CIP, LEV), tetrasiklin (TE), kinolon (NA) ve amfenikol (C) olmak üzere 5 farklı antibiyotik grubundan 8 farklı antibiyotiğe; 28 nolu *E. coli* izolatu penisilin (AM, AMC), sefalosporin (FOX), tetrasiklin (TE) ve fosfomisin (FF) olmak üzere 4 farklı antibiyotik grubundan 5 farklı antibiyotiğe, 33 nolu *E. coli* izolatu ise penisilin (AM, AMC), sefalosporin (FOX), florokinolon (CIP,LEV) ve kinolon (NA) grubu olmak üzere 4 farklı antibiyotik grubuna ait 6 antibiyotiğe karşı dirençli idi.

GSBL Sonuçları: Analiz edilen 34 *E. coli* izolatının tamamı Çift Disk Sinerji Testi (Double Disc Synergy Test (DDST sonucu GSBL yönünden negatif bulundu (Şekil 3.3, Tablo 3.2).



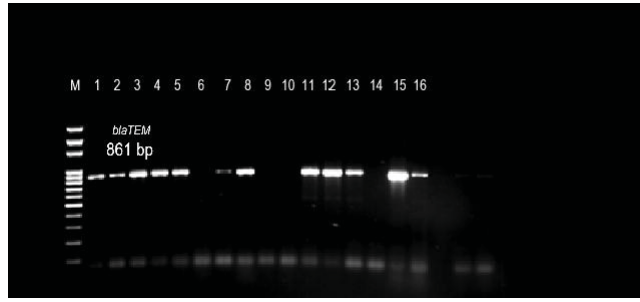
Şekil 3. 3. GSBL-negatif izolat

Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz genlerinden *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M}'in varlıklarını belirlemek amacıyla yapılan PZR analiz sonuçları Tablo 3.2'de gösterilmiştir. Bu çerçevede bulgular değerlendirildiğinde; 34 (%100) izolatın tamamında en az bir GSBL geni saptandı. Üç GSBL geninin izolatlara göre dağılımları: en 34 izolatın 31 (%91,18)'inde *bla*_{TEM} (Şekil 3.4), 20 (%58,82)'sinde *bla*_{SHV} (Şekil 3.5) ve 8 (%23,53)'inde ise *bla*_{CTX-M} (Şekil 3.6) belirlendi.

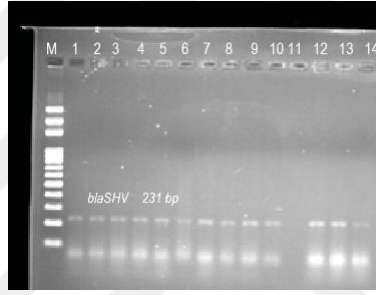
GSBL genlerinden *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} 17 (%50) *E. coli* izolatında birlikte bulunurken; 6 (%17,35) izolatta *bla*_{TEM} ve *bla*_{CTX-M}; 7 (%20,59) izolatta *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genleri birlikte saptandı. Her üç genin de birlikte bulunduğu izolat sayısı ise 5 (%14,71) idi.

Tablo 3.2. *Escherichia coli* izolatlarında *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} gen dağılımları

İzolat No	GSBL genler		Çift Disk Difüzyon	
	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	
1	Poz.	Poz	Neg	Neg
2	Poz.	Poz	Neg	Neg
3	Poz.	Poz	Neg	Neg
4	Poz.	Poz	Neg	Neg
6	Poz.	Poz.	Neg	Neg
7	Poz.	Poz	Neg	Neg
8	Poz.	Poz	Neg	Neg
9	Poz.	Poz	Poz	Neg
10	Poz.	Neg	Poz	Neg
11	Poz.	Poz	Poz.	Neg
12	Poz.	Poz	Poz	Neg
13	Poz.	Poz	Poz.	Neg
14	Neg	Poz	Poz.	Neg
15	Poz.	Neg	Neg	Neg
16	Poz.	Neg	Neg	Neg
17	Poz.	Neg	Neg	Neg
18	Poz.	Neg	Neg	Neg
19	Poz.	Neg	Neg	Neg
20	Poz.	Neg	Neg	Neg
21	Poz.	Poz	Poz	Neg
22	Neg	Poz	Poz.	Neg
23	Neg	Poz	Neg	Neg
24	Poz.	Poz	Neg	Neg
25	Poz.	Poz	Neg	Neg
26	Poz.	Neg	Neg	Neg
27	Poz.	Neg	Neg	Neg
28	Poz.	Poz.	Neg	Neg
29	Poz.	Poz	Neg	Neg
30	Poz.	Neg	Neg	Neg
31	Poz.	Neg	Neg	Neg
32	Poz.	Neg	Neg	Neg
33	Poz.	Neg	Neg	Neg
34	Poz.	Poz.	Neg	Neg
35	Poz.	Neg.	Neg	Neg
n=34 (%)	31 (91,18)	20 (58,82)	8 (23,53)	0 (0,0)



Şekil 3. 4. *E. coli* izolatlarının PZR ile GSBL genlerinden *bla*_{TEM} geninin elektroforez görüntüsü. M: Marker (100 bp), 1-5; 7,8, 11-13 ve 15,16 sütunlar pozitif izolatlar. 6,9,10 ve 14 nolu sütunlar negatif.



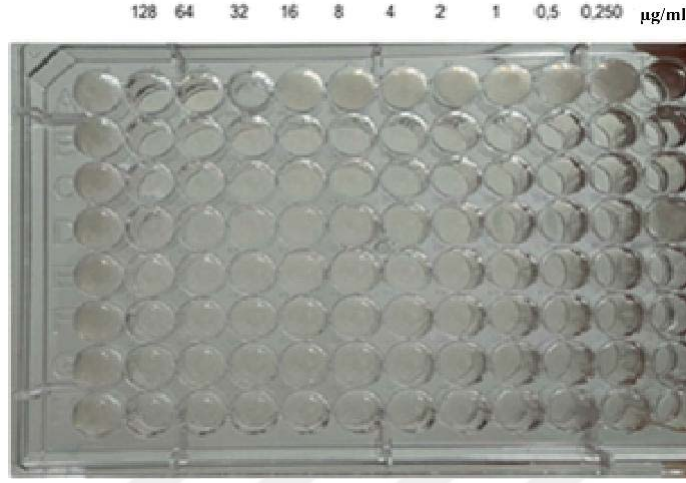
Şekil 3.5. *E. coli* izolatlarının PZR ile GSBL genlerinden *bla*_{SHV} elektroforez görüntüsü. M: Marker (100 bp); 1-10. Ve 12-14. sütunlar pozitif, 11. sütun negatif.



Şekil 3.6. *E. coli* izolatlarının PZR ile GSBL genlerinden *bla*_{CTX-M} genlerinin elektroforez görüntüsü. M: Marker (100 bp); 2 ve 5. Sütunlar pozitif; diğer sütunlar negatif.

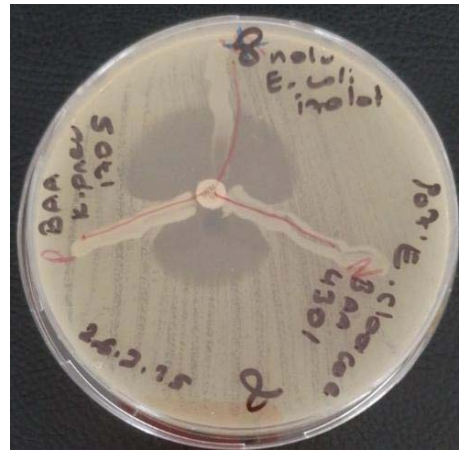
Karbapenem test sonuçları: İzolatlarda fenotipik yöntemlerle karbapenamaz üretiminin belirlenmesi amacıyla uygulanan üç yöntemden birisi meropeneme karşı yapılan MİK testi idi. MİK testi sonucu MİK değerleri <0,225µg/ml -16 µg/ml

arasında değiştiği görüldü (şekil 3.7). Bir izolatta 0,500  g/ml ve üç izolatta ise 0,250  g/ml olduğu belirlendi Sonuç olarak 34 izolatın sadece 1'inde meropeneme karşı dirençli (16  g/ml) olduğu saptandı. (Tablo 3.3).

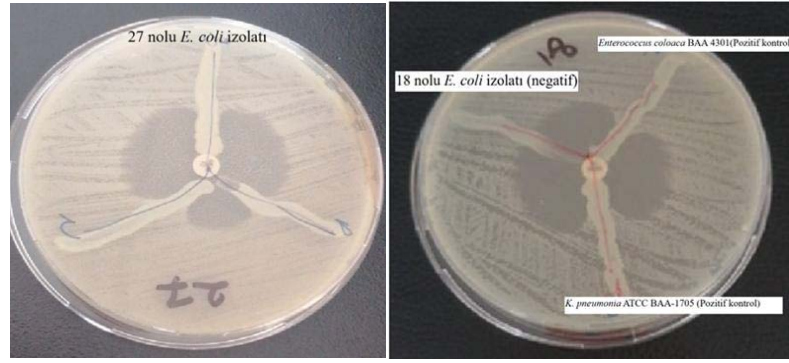


şekil 3.7. İzolatların MİK sonuçları

İzolatların karbapenemaz üretimini belirlemek amacıyla yapılan fenotipik testlerden biri de MHT'dir. Analiz sonuçları Tablo 3.3'te gösterilmiştir. Analiz sonucunda 22, 24, 27 ve 30 nolu izolatlar olmak üzere toplam 4 (%11,76) izolatın pozitif olduğu saptandı (şekil 3.8, şekil 3.9).

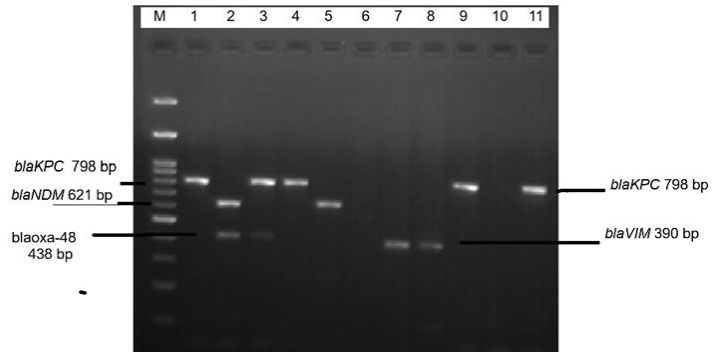


şekil 3.8. MHT pozitif izolat P: *Klebsiella pneumoniae* (Schroeter) Trevisan BAA 1705: MHT testi için pozitif kontrol



Şekil 3.9. A: 27 nolu *E. coli* izolatinın MHT testi (MHT pozitif). B: 18 nolu balık kökenli *E. coli* izolatu ile yapılan MHT testi (MHT negatif)

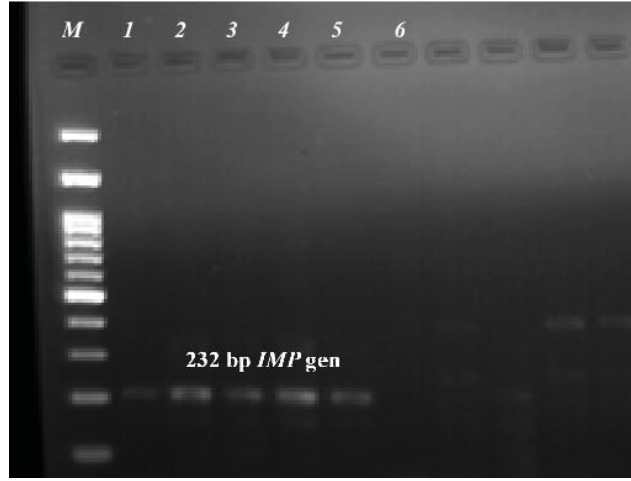
Yapılan çalışmada karbapenemaz üreten genlerinin varlığı amacıyla *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} ve *bla*_{oxa-48} olmak üzere 5 gen bölgesi PZR ile belirlenmiş (Şekil 3.10, Şekil 3.11 ve Şekil 3.12) ve sonuçlar Tablo 3.3'te gösterilmiştir. *E. coli* izolatlarında *bla*_{NDM} ve *bla*_{KPC} izolatların hiçbirinde saptanamazken, *bla*_{VIM} geni 4 (%11,76), *bla*_{IMP} geni 5 (%14,71) ve *bla*_{oxa-48} geni ise 4 (%11,76) izolatta belirlendi.



Şekil 3.10. M: Marker, 1. Sütun: S2- *bla*_{KPC} pozitif ATCC suşu; 2. Sütun: S3: *Klebsiella pneumonia* ATCC BAA-2146: *bla*_{NDM} ve *bla*_{oxa-48} pozitif ATCC suşu; 3. Sütun: *bla*_{KPC} ve *bla*_{oxa-48} pozitif klinik izolat; 4. sütun: *bla*_{KPC} pozitif klinik izolat, 5. sütun: *bla*_{NDM} pozitif klinik izolat; 7. ve 8. sütunlar: *bla*_{VIM} pozitif klinik izolatlar; 9. ve 11. Sütun: *bla*_{KPC} pozitif klinik izolatlar



Şekil 3.11. M: Marker; 1-4 sütun *bla*_{VIM} pozitif *E. coli* izolatları; sütun 6: pozitif balık izolatu



Şekil 3.12. IMP pozitif *E. coli* izolatları: 1,2,3,4 nolu sütunlar sırasıyla 11,12,13,14 nolu *E. coli* izolatları; 5 nolu sütun: 22 nolu *E. coli* izolatı

Karbapanemaz üretimini belirlemek amacıyla yapılan fenotipik testlerden mCIM ve eCIM test sonuçları (Şekil 3.13) çerçevesinde tüm izolatlar negatif olarak değerlendirildi (Tablo 3.3).



Şekil 3.13. *E. coli* izolatlarına uygulanan mCIM ve eCIM sonuçları

Tablo 3.3. *E. coli* izolatlarının fenotipik ve genotipik yöntemlerle karbapenemaz üretimi

İzolot No (n=34)	Fenotipik Yöntemlerle karbapenemaz üretiminin Belirlenmesi				Karbapenemaz genleri				
	Meropenem MİK (µg/ml)	MHT Testi	mCIM	eCIM	<i>bla</i> NDM	<i>bla</i> VIM	<i>bla</i> KPC	<i>bla</i> IMP	<i>bla</i> OXA-48
1	16	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
3	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
4	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
6	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.
7	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.
8	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.
9	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
10	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
11	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.
12	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.
13	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.
14	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.
15	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.
16	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.
17	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.
18	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.
19	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
20	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
21	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
22	0,250	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.
23	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.
24	<0,250	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
25	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
26	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
27	0,250	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
28	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
29	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
30	<0,250	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
31	0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
32	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
33	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
34	<0,250	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
35	0,500	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Toplam									
Poz.	1	4	0	0	0	4	0	5	4
İzolot	(2,94)	(11,8)	(0,00)	(0,00)	(0,00)	(11,76)	(0,00)	(14,71)	(11,76)
n (%)									

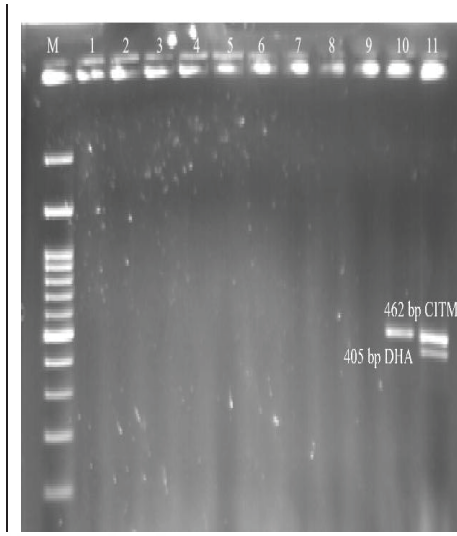
Çalışmada ayrıca AmpC β-laktamaz genleri kapsamında *LAT-1*'den *LAT-4*'e kadar, *CMY-2*'den *CMY-7*'ye kadar, *BIL-1*, *DHA-1*, *DHA-2*, *ACC*, *MIR-1* *ACT-1*, *FOX-1* 'den *FOX5b* 'ye kadar, *MOX-1*, *MOX-2*, *CMY-1*, *CMY-8*'den *-CMY-11*'e kadar olmak üzere gen varlıkları araştırılmış ve CITM ve DHA 2'şer izolatta, toplamda ise 34 izolatın 4'ünde en az bir AmpC β-laktamaz geni saptanmıştır (Tablo 3.4; Şekil 3.14,

Şekil 3.15 ve Şekil 3.16). Boronik asit disk testi sonucu ise 5 izolatın pozitif olduğu görüldü (Şekil 3.17).

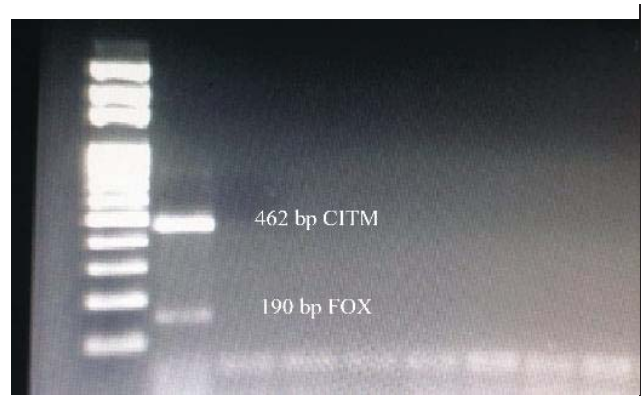
Tablo 3.4. *Escherichia coli* izolatlarında AmpC β-laktamaz genlerinin dağılımları ile boronik asit disk testi sonuçları

	AmpC β-laktamaz genleri						Boronik asit disk
	CITM ^a	DHAM ^b	ACCM ^c	EBCM ^d	FOXME ^e	MOXME ^f	
1	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
4	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
6	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
7	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
8	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
9	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz (CAZ)
10	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
11	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
12	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
13	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
14	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
15	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
16	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
17	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
18	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz (MEM).
19	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
20	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz (MEM, CAZ)
21	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
22	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
23	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
24	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
25	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
26	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
27	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
28	Neg.	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Poz (MEM)
29	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
30	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
31	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
32	Poz	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
33	Poz	Poz.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
34	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg
35	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
Toplam	2	3	0	0	0	0	4
n (%)	(5,88)	(5,88)	(0,00)	(0,00)	(0,00)	(0,00)	(11,76)

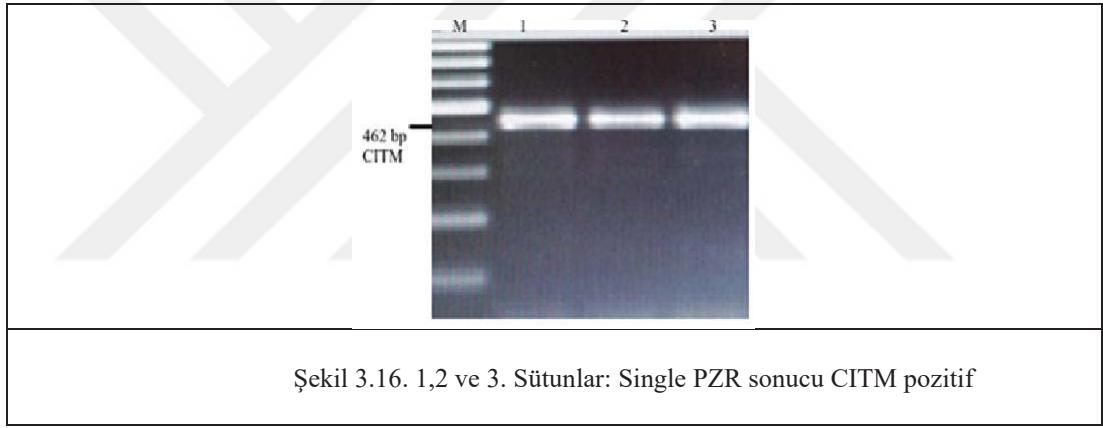
^a: LAT-1'den LAT-4'e kadar, CMY-2'den CMY-7'ye kadar, BIL-1; ^b:DHA-1, DHA-2; ^c:ACC; ^d:MIR-IT ACT-1; ^e: FOX-1'den FOX5b'ye kadar; ^f:MOX-1, MOX-2, CMY-1, MY-8'den-CMY-11'e kadar



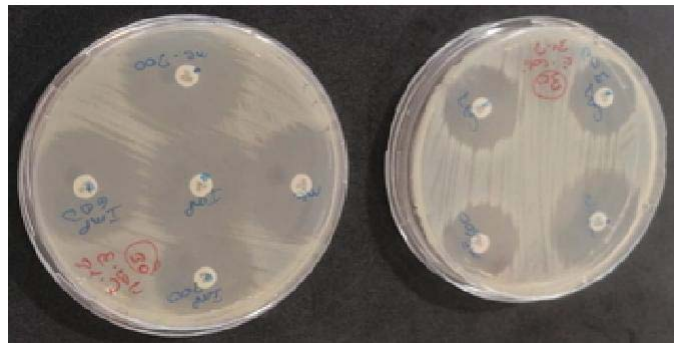
Şekil 3.14. CITM ve DHA pozitif klinik izolatlar



Şekil 3.15. CITM ve FOX pozitif klinik izolatlar



Şekil 3.16. 1,2 ve 3. Sütunlar: Single PZR sonucu CITM pozitif

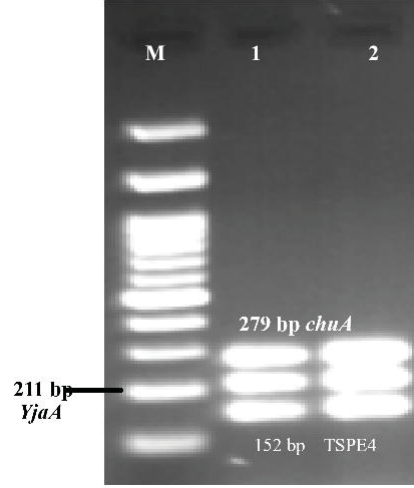


Şekil 3.17. *E. coli* izolatlarına yapılan Boronik asit disk test sonuçları: IMP (10 µg); IMP (10 µg) ile APB (3-Aminophenylboronic acid- 300 µg); ME (10 µg); ME (10 µg) ile APB (300 µg); ceftazidime (30 µg); ceftazidime (30 µg) ile APB (300µg), IMP (10µg), IMP (10µg) ile APB (600µg), meropenem (10µg), meropenem(10µg) ile APB (600µg), ceftazidime (30µg), ve ceftazidime (30µg) ile APB (600µg)

Çalışmada izole edilen *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplandırılması PZR tekniği uygulanarak yapılmış (Şekil 3.18) ve sonuçlar Tablo 3.5'te gösterilmiştir. Analiz bulguları çerçevesinde; 34 izolatın 25 (%73,53)'ünün B₂₃ filogenetik gruba, 5 (%14,71) izolatın A1 filogenetik gruba, 2 izolatın A₀ (grup A) filogenetik gruba ve 1 izolatın ise D2 (grup D) filogenetik gruba ait olduğu belirlendi.

Tablo 3.5. *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplandırılması

İzolat No	<i>chuA</i> 279 bp	<i>yjaA</i> 211 bp	TSPE4 152 bp	Filogenetik grup
1	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
2	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
3	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
4	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
6	Negatif	Pozitif	Negatif	A1
7	Negatif	Pozitif	Negatif	A1
8	Negatif	Pozitif	Negatif	A1
9	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
10	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
11	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
12	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
13	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
14	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
15	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
16	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
17	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
18	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
19	Negatif	Negatif	Negatif	A ₀ (grup A)
20	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
21	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
22	Negatif	Pozitif	Negatif	A1
23	Negatif	Pozitif	Negatif	A1
24	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
25	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
26	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
27	Pozitif	Pozitif	Negatif	B ₂₂ (grup B2)
28	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
29	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
30	Negatif	Negatif	Negatif	A ₀ (grup A)
31	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
32	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
33	Pozitif	Negatif	Pozitif	D2 (grup D)
34	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃
35	Pozitif	Pozitif	Pozitif	B ₂₃



Şekil 3.18. *E. coli* izolatlarının filogenetik analiz sonuçları M: 100 bp Marker; Sütun 1 ve 2: sırasıyla 9 ve 10 nolu *E. coli* izolatları *chuA*, *YjaA* ve TSPE4 pozitif

Tablo 3.6. *E. coli* izolatlarında GSBL, Karbapenemaz, AmpC genlerinin dağılımları

No	GSBL Genler				Karbapenemaz Genleri						AmpC Genleri				Filogenetik grup
	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>CITM</i> ^a	<i>DHA</i> ^b	<i>ACC</i> ^c	<i>EBC</i> ^d	<i>FOX</i> ^e	<i>MOX</i> ^f	
1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
2	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
3	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
4	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
6	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A1
7	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A1
8	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A1
9	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
10	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
11	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
12	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
13	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
14	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
15	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
16	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
17	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
18	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
19	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A ₀ (grup A)
20	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
21	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
22	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	A1
23	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A1
24	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
25	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
26	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
27	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₂ (grup B2)
28	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	B2 ₃
29	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
30	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A ₀ (grup A)

Tablo 3.6 devamı

31	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
32	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	B2 ₃
33	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	D2 (grup D)
34	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃
35	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	B2 ₃

^a: *LAT-I*'den *LAT-4*'e kadar, *CMY-2*'den *CMY-7*'ye kadar, *BIL-I*; ^b: *DHA-I*, *DHA-2*; ^c: ACC; ^d: *MIR-IT ACT-I*; ^e: *FOX-I*'den *FOX5b*'ye kadar; ^f: *MOX-1*, *MOX-2*, *CMY-1*, *MY-8*'den-*CMY-11*'e kadar

Tablo 3.6’da görüldüğü gibi *E. coli* izolatlarının GSBL ve Karbapenemaz genleri ile (n=12; %35,29) veya GSBL ile AmpC genleri ile (n=3; %8,82) birlikte bulundukları saptandı.

Çalışmada izole edilen *E. coli* izolatlarından rastgele iki izolata çift yönlü Sanger dizi analizi de yaptırılmış ve gen dizilimleri aşağıda gösterilmiştir.

1: 10 BALIK *Escherichia coli* BENZERLİK ORANI: %99,91

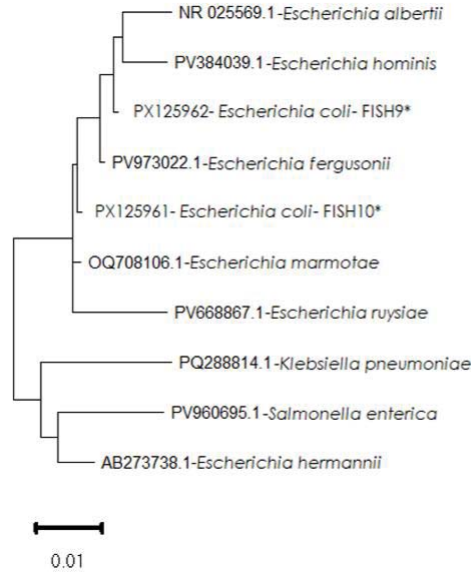
TACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCT
TGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGC
TCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACT
GGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATA
TTGCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAAAA
GGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTT
AATACCTTTGCTCATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCC
GTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTA
CTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCC
CCGGGCTCAACCTGGGAAGTGCATCTGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGT
AGAGGGGGGTAGAAATTCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGG
AGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAG
GTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACG
CCGTAAACGATGTGCACTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGG
AGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAA
ACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTT
AATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGTCTTGACATCCACAGAACT
TTCCAGAGATGGAATGGTGCCTTCGGGAAGTGTGAGACAGGTGCTGCAT
GGCTGTGCTCAGCTCGTGTGTTGTGAAATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTCCGGCCGGGAAGTCAAAGGAG
ACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCAT
GGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGA
GAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCC
GGATTGGAGTCTGCAACT

2: 9 BALIK *Escherichia coli* BENZERLİK ORANI: %99,92

GGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGAC
CAAAGAGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGG
ATTAGCTAGTAGGTGGGGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTG
GTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTGGAAGTGAAGACACGGTCCAGACTC
CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGCAAGCCTGAT
GCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTC
AGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATTGACGTTACC
CGCAGAAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGG
AGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCG

GTTTGTAAAGTCAGATGTGAAATCCCCGGGCTCAACCTGGGAACTGCATC
 TGATACTGGCAAGCTTGAGTCTCGTAGAGGGGGGTAGAATTCCAGGTGT
 AGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGC
 CCCCTGGACGAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACA
 GGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTGCGACTTGGAGGT
 TGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGCTAACGCGTTAAGTCGACCGCCT
 GGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCCCG
 CACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTT
 ACCTGGTCTTGACATCCACGGAAGTTTTTCAGAGATGAGAATGTGCCTTCG
 GGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTTGTGAAA
 TGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGC
 GGTCCGGCCGGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAG
 GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACAC
 GTGCTACAATGGCGCATACAAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGG
 ACCTCATAAAGTGCGTCGTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCA
 TGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATACCACGGTG

Çalışmada izole edilen *E. coli* izolatlarından rastgele iki izolat seçilen ve Sanger Dizi Analizine gönderilen 9 ve 10 nolu izolatlar GenBank veri tabanına PX125962-*Escherichia coli*-FISH9 ve PX12708106.1-*Escherichia coli* -FISH10 Erişim noları ile kaydedilmiştir.



Şekil 3.19. Çalışmada izole edilen 9 (GenBank accession number: PX125962-*Escherichia coli*-FISH 9) ve 10 (GenBank accession number: PX125961-*Escherichia coli*-FISH10) nolu izolata ait filogenetik ağaçlandırılması

4. TARTIŞMA

Antibiyotiklere karşı direnç, 1990 yılından bu yana her yıl en az bir milyon kişinin ölümüne yol açtığı ve eğer bu konu ile ilgili gerekli politikalar hayata geçirilmezse, antibiyotiklere dirençli enfeksiyonların 2050 yılına kadar 39 milyondan fazla kişinin ölümüyle sonuçlanabileceği GRAM (Global Research on Antimicrobial Resistance) tarafından yapılan bir proje ile bildirilmiştir (The Oxford University, 2025). Dünya Sağlık Örgütü tarafından yayınlanan raporda da kritik öncelikli bakteriler arasında üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli Enterobacterales ile karbapenem-dirençli Enterobacterales'ler de yer almaktadır (WHO, 2024).

Antibiyotik kullanımının su ürünleri açısından değerlendirildiğinde, Dünya Sağlık Örgütü su ürünleri yetiştiriciliğinde yaygın olarak kullanılan altı temel antibiyotik sınıfını; penisilinler, aminoglikozidler, tetrasiklinler, makrolidler, kinolonlar ve sülfonamidler olarak tanımlamaktadır (İbrahim et al., 2020). Küresel düzeyde kullanım sıklığı açısından değerlendirildiğinde, en yaygın antimikrobiyal gruplar sırasıyla kinolonlar (%27), tetrasiklinler (%20), amfenikoller (%18) ve sülfonamidler (%14) olarak bildirilmektedir. Tür bazında antimikrobiyal tüketim yoğunluğu şu şekilde belirlenmiştir: yayın balığında 157 mg/kg; alabalıkta 103 mg/kg; tilapiada 59 mg/kg; karideste 46 mg/kg; somonda 27 mg/kg ve farklı türlerin bir arada değerlendirildiği grupta da 208 mg/kg olarak bildirilmiştir. 2030 yılı için küresel toplam insan, karasal ve sucul gıda hayvanı antimikrobiyal kullanım miktarının 236.757 ton olacağı tahmin edilmekte olup, bunun %5,7'sini su ürünleri yetiştiriciliği oluşturmakta, ancak kilogram biyokütle başına en yüksek kullanım yoğunluğunu (164,8 mg/kg) göstermektedir (Schar ve ark., 2020).

Antimikrobiyal direnç (AMR), özellikle genişlemiş spektrumlu β -laktamaz üreten bakterilerin neden olduğu yayılım ile küresel ölçekte ciddi bir sağlık tehdidi oluşturmaktadır. Arıtılmamış kanalizasyon suları, tarımsal yüzey akışı ve farmasötik atıklarla meydana gelen kirlenme, sucul ekosistemleri bu bakteriler için kritik birer rezervuar haline getirmektedir. Su ortamlarında bulunan GSBL üreten bakteriler, doğrudan temas, kontamine su veya sucul organizmaların tüketimi ile ya da bu sularla

sulanan tarımsal ürünler aracılığıyla direnç genlerinin yayılımını kolaylaştırarak halk sağlığı, biyolojik çeşitlilik ve su ürünleri yetiştiriciliği üzerinde önemli riskler yaratmaktadır.

Escherichia coli, genellikle dünya çapında antibiyotik direncinin yaygınlığını belirlemede indikatör organizma olarak kullanılan bir bakteridir (Huang et al., 2012; Kostyla et al., 2015). Ayrıca, içme suyu, akuatik sistem ve gıdalarda mikrobiyal kontaminasyon için de önemli indikatördür (Divya et al., 2020; Kostyla et al., 2016; Nowicki et al., 2021). *E. coli*'deki antibiyotik direnci mutasyonlar, hareketli genetik unsurların kazanılması veya yatay gen transferi nedeniyle ortaya çıkar ve gıda zinciri yoluyla çapraz rezervuar bulaşması yoluyla yayılabilir (Summers, 2006). *Escherichia coli* klinik olarak anlamlı çoklu antibiyotiklere karşı direnç, antibiyotik kemoterapisinin etkinliğini ciddi şekilde tehlikeye atar. Çoklu antibiyotik direncine sahip *E. coli* sadece klinik ortamlarla sınırlı kalmaz. Aynı zamanda, insanlar ve hayvanlar su ortamlarının kirlenme kaynakları olduğundan, ÇAD *E. coli* sıklıkla deniz ürünlerinde de bulunabilmekte ve deniz aracılığıyla uzak coğrafi bölgelere de taşınabilmektedir (Lekshmi et al., 2017; Singh et al., 2020).

Yapılan çalışmada 34 *E. coli* izolatı 11 farklı gruba dahil toplam 22 antibiyotiğe karşı analiz edildi ve 7 farklı gruptan 11 antibiyotiğe karşı %5,88 ila %50,00 oranlarında dirençli olduğu görüldü. Analiz bulgular doğrultusunda; en yüksek dirençliliğin penisilin grubu antibiyotiklere karşı olduğu [17'si SAM (%50,00), 16'sı AM (%47,05), 11'i AMC'ye (%32,35)]; bu grubu karbapenem [4'ü ETP'ye (%11,76)]; tetrasiklin [4'ü TE'ye (%11,76)]; kinolon [2'si NA'ya (%5,88), florokinolon [2'si CIP (%5,88), 2'si LEV'e (%5,88)] grubunun takip ettiği; bu grupları sefalosporin [2'si FEP'e (%5,88)]; amfenikol [2'si C'ye (%5,88)] ve fosfomisin [2'si FF (%5,88)] gruplarına karşı dirençli bulundu.

İzolatlar ÇAD yönünden değerlendirildiğinde ise 34 *E. coli* izolatından 4 (%11,76) 'ünün ÇAD olduğu; izolatların 3-8 farklı antibiyotiğe; antibiyotik grubu olarak değerlendirildiğinde ise penisilin, sefalosporin, tetrasiklin, kinolon, florokinolon, amfenikol grubu antibiyotiklere karşı dirençli olduğu görüldü. Bu konu ile yapılan çalışmaların biri Hindistan'dan Sing vd. (2020) tarafından bildirilmiştir. Araştırmacılar, *E. coli* izolatlarında indikatör sefalosporinlerden sefotaksime %95,

sefpodoksime %90,88'e ve seftazidime %90,29 oranında dirençli olduklarını saptamışlardır. Çalışma bulguları çerçevesinde imipeneme %74,41, sefoksitine %66,76 ve meropeneme %51,18 oranlarında yüksek direnç sergilediklerini de bildirmişlerdir. Bu oranlar bizim çalışmada elde ettiğimiz bulgulardan çok yüksek olduğu görülmektedir. Hindistan'dan bildirilen başka bir çalışmada da Dwivedi vd. (2023), 2020-2021 yılları arasında tatlı su balıklarında CREc prevalansını %6,99 (95% CI: 3.78–10.20%) oranında saptadıklarını ve bütün izolatların ÇAD olduğunu saptamışlardır. Bu sonuçlar Hindistan'da balık dahil su ürünlerinde antibiyotik kullanımının çok yaygın olduğu, sularında bu yönüyle kontamine olduğuna işaret etmektedir. Bangladeş'te yapılan bir çalışmada Rana vd. (2005), 70'si doğal ortamdan 60'sı kültüre edilen olmak üzere toplam 130 balık örneğini *E. coli* yönünden analiz etmişler ve 130 balık örneğinin 87 (%64)'sinden *E. coli*'yi izole etmişlerdir. Araştırmacılar *E. coli* izolatlarını 10 farklı antibiyotiğe karşı [CIP, CN, TE, sefriakson (CTR), AMP, CAZ, C, IMP, FF ve nitrofurantoin (NIT)] dirençlilik özelliklerini belirlemişler ve tüm izolatların (%100,0) ampisilin ve seftazidim antibiyotiklerine karşı dirençli olduklarını saptamışlardır. Vahşi balıkların %30'unun imipeneme dirençli iken, %66,0'ının siproflaksosine karşı orta düzeyde dirençli olduklarını saptamışlardır. Çalışmada, vahşi izolatların %60,0'ının ÇAD olarak sınıflandırdıklarını; %45,0 izolatların IMP'ye karşı dirençli olduklarını bildirmişlerdir. Ayrıca, kültür balıklarından izole edilen *E. coli* izolatlarından 1/3'ünün sefriakson ve FF'e karşı dirençli olduklarını da saptamışlardır. Kültür balık kökenli izolatlarda beş farklı ÇAD tablosuna sahip oldukları, yaklaşık bütün izolatlar (%97,0) ÇAD olarak sınıflandırdıklarını da bildirmişlerdir. Son yıllarda yapılan bir çalışmada da Mitiku vd. (2022) Etopya'da yaptıkları çalışmada otel ve restoranlardan 115'i çiğ formda olmak üzere toplam 180 balık (Nil tatlı su çipurası, labeobarbus -*Cyprinidae* familyasına ait- ve African catfish-karayayın balığı) örneklerini *E. coli* yönünden analiz ettiklerini ve çiğ ve pişmiş balık örneklerinde etkeni sırasıyla 27 (%23,5) ve 9 (%13,8) örnekte ve toplamda ise 36 (%20) örnekte saptadıklarını bildirmişlerdir. İzolatları 7 farklı antibiyotiğe karşı duyarlık yönünden yaptıkları analiz sonucunda; tüm izolatlar siprofloksasin ve gentamisine, %58,3 ve %75 *E. coli* izolatlarının sırasıyla kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametazola karşı duyarlı iken, eritromisin, streptomisin ve tetrasikline karşı dirençlilik oranları sırasıyla %58,3, %88,9 ve %55,6 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar bizim çalışma bulgularımızdan çok yüksek oranda

ve daha fazla antibiyotik grubuna karşı izolatların dirençli olduğunu göstermektedir. Bu konu ile yapılan başka bir çalışmada da Kusunur vd. (2022), farklı tatlı su balığı tedarik noktalarından (balık çiftliğinden 16, toptan balık pazarından 14, perakende balık pazarından 29, sokak balık satış biriminden 30 ve modern balık satış biriminden 6)- toplam 95 *E. coli* izolatını antimikrobiyal direnç profili ve antibiyotik direnç genlerinin varlığı açısından incelenmiştir. Genel olarak balık tedarik zincirinde ÇAD *E. coli* oranı %21 olarak saptanmış ve bu oran tedarik zincirinin aşağı basamaklarına doğru artış göstermiştir. ÇAD oranı, üçüncül balık tedarik noktaları olan perakende balık pazarı (%45), sokak balık satış birimi (%30) ve modern balık satış biriminde (%15) daha yüksek bulunmuştur. Buna karşın, ikincil tedarik noktası olan toptan balık pazarında ve birincil tedarik noktası olan balık çiftliğinde bu oran %5 olarak belirlenmiştir. Araştırmacılar, β -laktam dirençli izolatların yalnızca %21’inde *bla*_{CTX-M-gp1} geni taşıdığını saptamışlardır. Bizim çalışmamızda ise *bla*_{CTX-M} geni araştırılmış ve bu gen %23,53 oranında saptanmıştır. Araştırmacılar çalışmalarında *tetA* (%89), *tetB* (%11) ve *tetD* (%11) genleri ile *dfrA* ve *sulI*, genlerini de %9 oranında saptadıklarını bildirmişlerdir.

β -laktamazlar grubunda yer alan GSBL’ler bazı *E. coli* suşları tarafından üretilmektedir; bu antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnç, artan yayılım ve bu bakteri suşlarının klinik önemi nedeniyle de endişe oluşturmaktadır (Dortet et al., 2015). GSBL-*E. coli* penisilin, birinci ve üçüncü kuşak sefalosporinler, β -laktamaz inhibitörleri ile terapi kombinasyonunu ve monobaktam aztreonam gibi yaygın olarak kullanılan antibiyotiklerin etkisi azaltacak direnç mekanizmalarına sahiptir (Fair and Tor, 2014). Yapılan bu çalışmada toplam 64 kültüre edilen balık örnekleri yönünden analiz edilmiş ve 34 *E. coli* izolatı elde edilmiştir. Bu izolatların antibiyotik direnç profilleri; β -laktam antibiyotiklere karşı fenotipik ve genotipik yöntemlerle analiz edilmiştir. Beta laktamaz kapsamında; i) GSBL, ii) Karbapenamaz ve iii) Ambler Sınıf C β -laktamaz [*AmpC* β -laktamaz- Metallo beta lactamaz (*AmpC*)] yönlerinden analiz edildi.

Analiz bulguları çerçevesinde; GSBL-*E. coli* çift disk difüzyon testi ile fenotipik olarak saptanamazken 3 *bla* geninden TEM %91,18, SHV %58,82 ve CTX-M ise %23,53 oranlarında saptanmıştır. Bu veriler ışığında TEM geninin izolatlarda çok yaygın olduğu, bu geni sırasıyla SHV ve CTX-M genlerinin izlediği

görülmektedir. Analiz edilen 34 (%100) *E. coli* izolatının tümünde en az bir *bla*-GSBL geni mevcut olduğu saptandı (Tablo 3.2). Bizim bulgularımızın aksine Sezener (2022) fenotipik test pozitif, genotipik test negatif GSBL durumlarda izolatlar belirlediklerini ve bunun nedenini bakterilerde oluşan mutasyonlara ve porin kaybına bağlı olarak GSBL enzimlerin aşırı ekspresyonundan kaynaklanabileceğini ve bu durumda fenotipik testler ile pozitif olan izolatlarda GSBL genlerin olmadığı bildirilmiştir.

Bu konu ile yapılmış çalışmalar bulunmaktadır. Türkiye’de yapılan bir çalışmada, Benlikurt (2016), Türkiye’nin çeşitli bölgelerinde 55 adet deniz ve tatlı su av balığı ve 45 adet deniz ve tatlı su kültür balığı örneklerinden identifiye edilen *Enterobacteriaceae* izolatlarında GSBL yönünden analiz etmiş, yaptıkları tiplendirme sonucu av balıklarında 3 *E. coli* ve 1 *E. cloaca/asburiae* olmak üzere 4 adet, kültür balıklarında ise 4 *E. coli*, 1 *C. freundii* ve 1 *E. cloaca/asburiae* olmak üzere 6 adet GSBL-pozitif enterobakteri suşlarını saptadıklarını bildirmişlerdir. Dünya genelinde yapılan bir çalışmada, Sing vd. (2020) Hindistan’da satışa sunulan toplam 50 deniz ürünü [balık (n=37) ve karides (n=13)] örneğini *E. coli*’nin izolasyonu, antibiyotik duyarlılık özellikleri ve önemli β -laktamaz kodlayan genlerin varlığı yönünden analiz etmişlerdir. Araştırmacılar toplam 475 *E. coli* izolatlarının %71,58’inin GSBL pozitif olduğunu, GSBL genlerinden *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{TEM} genlerini sırasıyla %62,37, %23,35 ve %2,6 oranlarında saptadıklarını bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada Hamza vd. (2020), dört balık çiftliğinde yetiştirilen 105 tilapia balığının (*Oreochromis niloticus*) iç organları (karaciğer, dalak ve böbrek) ile havuz sularından izole ettikleri toplam 66 (%63) *Enterobacteriaceae* [*E. coli* (n=45), *Enterobacter cloacae* kompleks (n=12) ve *Klebsiella pneumonia* (n=9)] izolatını elde ettiklerini ve antibiyotiklere dirençli izolatların β -laktamaz genleri (*bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{PER-1}) ihtiva ettiğini saptamışlardır. Hindistan’da yapılan başka bir çalışmada da Dwivedi vd. (2023) 2020-2021 yılları arasında yürütülen çalışmalarında, tatlı su balıklarında CREc prevalansını %6,99 (95% CI: 3.78–10.20%) oranında saptadıklarını ve bu izolatlarda GSBL genlerinden *bla*_{TEM} geni %64,7% (n=100 adet balık örneklerini), *bla*_{CTX-M-15} %35,3 oranında saptadıklarını bildirmişlerdir. Bangladeş’ten bildirilen bir çalışmada Rana vd. (2005) toplam 130 balık örneğinin 87(%64)’sinden *E. coli*’yi izole ettiklerini ve PZR analizi sonucu *bla*_{TEM} genini 25 (%66,66) izolatta saptadıklarını ve β -laktamaz üretimi ile ilişkili olduklarını saptamışlardır. Aynı şekilde *bla*_{SHV} geni 27 (%61,36) ve

*bla*_{CTX-M} de 28 (%66,66) izolatta saptanmıştır. Kültür balıklarında ise; toplam 42 *E. coli* izolatından GSBL genlerinden *bla*_{TEM}, *SHV* ve *CTX-M* genlerini sırasıyla 35(%83,33), 34 (%80,95) ve 33 (%78,57) izolatta saptadıkları bildirmişlerdir.

CLSI, *E. coli*, *Klebsiella* spp., ve *P. mirabilis* gibi bakterilerin GSBL olup olmadığını saptamak amacıyla sefpodoksim, seftazidim, aztreonam, sefotaksim ve seftriakson disklerini kullanılarak yapılan disk difüzyon metodunu tavsiye etmektedir. Tarama testi yaparken kullanılan sefpodoksim, seftazidim, aztreonam, sefotaksim ve seftriakson antibiyotiklerden birkaçının birlikte kullanımının yapılacak testin güvenilirliğini artıracakını belirtilmiş, ölçülen zon çaplarına göre GSBL üretimi şüpheli olan izolatların GSBL üretimini doğrulanması amacıyla fenotipik doğrulama testlerinden birinin daha uygulanması gerektiği bildirilmiştir (NCCLS, 2005, Paterson and Bonomo, 2005). Genotipik olarak GSBL olarak tanımlanan ve tanımlanmayan izolatların çift disk difüzyon testi ile değerlendirilmesi ile sensitivite ve spesifitelerinin sırasıyla %79-97 ve %94-10 oranlarına kadar artırabileceği de bildirilmiştir (Thomson and Sanders, 1992). Yanlış negatif izolatların *SHV* genlerinden *SHV*-2, *SHV*-3 ve *TEM* genlerinden *TEM*-12 genlerini içermesinden kaynaklanabileceği birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Ho et al., 1998; MacKenzie et al., 2002; Thomson and Sanders, 1992; Vercauteren vd., 1997). Vercauteren vd. (1997)'da GSBL üretiminin saptanmasında kullanılan fenotipik testlerden çift disk difüzyon metodunun kolay uygulanması nedeniyle avantajlı olduğunu, ancak, testin yorumlanmasının oldukça subjektif olması nedeniyle de dezavantajlı olduğunu belirtmişlerdir. Bu durum ise sefalosporinler ve aztreonamın çevresinde geniş zon çaplarının oluşmasına neden olduğunu bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda uygulanan çift disk difüzyon metodunda diskler arasındaki mesafe 30 mm olarak uygulanmış ve test sonucunda tüm izolatlar GSBL üretimi yönünden negatif bulunmuştur. Yapılan literatür araştırmalarında GSBL diskler arasında 30 mm'lik mesafenin şüpheli negatif durumlarda azaltılarak 20 mm'ye kadar azaltılabileceği ya da aksine 40 mm'ye kadar artırılarak testin tekrar edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Thomson and Sanders, 1992; Ho et al.,1998).

Karbapeneme dirençli *E. coli* (CREc), temel olarak karbapenemaz üretiminin aracılık ettiği önemli halk sağlığı sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir (Gupta et al., 2011). Başta balık olmak üzere deniz ürünleri CREc ile kontamine olabilme ve

onların antibiyotik dirençli genleri için bir rezervuar görevi görme potansiyeline sahiptir (Dwivedi et al., 2023; Hamza et al., 2020; Sing et al., 2020). Bizim çalışmamızda karbapenem dirençli *E. coli* varlığını belirlemek amacıyla fenotipik ve genotipik testler uygulanmıştır. Uygulanan fenotipik testlerden biri karbapenem grubu antibiyotiklerden IMP, ETP ve MEM'e karşı antibiyogram testi, diğerleri de MİK (meropeneme), MHT, mCIM ve eCIM testleri idi (Tablo 3.3). Yapılan antibiyogram sonucunda tüm izolatların IMP ve ETP'ye karşı duyarlı oldukları saptanırken MEM'e karşı dirençli izolat sayısı 4 (%11,76) idi (Tablo 3.1). MİK testi sonucu ise bir (%2,94), MHT testi ile 4 (%11,8; 22, 24, 27 ve 30 nolu) izolatın karbapenem dirençli olduğu saptandı. Tüm izolatlar mCIM ve eCIM testlerinde negatif sonuç verdi (Tablo 3.3). Bu üç yöntem sonuçları izolat bazında değerlendirildiğinde MİK değeri pozitif izolatın (1 nolu) antibiyogram ve MHT, mCIM ve eCIM testlerinde negatif olarak belirlendi.

Çalışmamızda karbapenem dirençliliğini saptamak amacıyla genotipik test yöntemlerinden PZR tekniği ile *bla*_{NDM}, *VIM*, *KPC*, *IMP* ve *OXA-48* olmak üzere toplam 5 gen varlığı araştırıldı. Bu kapsamda *bla*_{NDM} ve *bla*_{KPC} gen varlıkları saptanamazken, *bla*_{IMP} 5 (%14,71), *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{VIM} genleri de 4'er (%11,76) izolatta saptandı. Toplamda ise 5 karbapenemaz üretiminden sorumlu genlerden en az biri 13 (%38,23) *E. coli* izolatında saptandı. Bu izolatların biri hem PZR hem de MHT testi sonucu (22 nolu izolat -*bla*_{IMP} pozitif, MHT testi) pozitif idi. Çalışmamızda uygulanan farklı testler sonucu farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bu konu ile yapılmış bazı çalışmalar bulunmaktadır. Bu çalışmaların birinde Dwivedi vd. (2023) 2020-2021 yılları arasında yürütülen çalışmalarında, tatlı su balıklarında CREC prevalansını %6,99 (95% CI: 3.78–10.20%) oranında saptadıklarını, karbapenem dirençli genlerden *bla*_{NDM-5} ve *bla*_{OXA-1} (%5,9%) genlerini saptamışlardır. Hindistan bildirilen başka bir çalışmada da Sing vd. (2020), çalışmalarında 50 deniz ürünü [balık (n=37) ve karides (n=13)] örneğinden izole ettikleri *E. coli* izolatlarının GSBL genleri dışında metallo- β -laktamazı kodlayan *bla*_{OXA}'yı %7,06, *bla*_{NDM}'yi %4,42 ve *bla*_{VIM} genini de %0,88 oranlarında saptamışlardır.

β -laktamazlar arasında yer alan karbapenemler, GSBL-Gram-negatif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan son basamak antibiyotik olarak bilinmektedir (van Duin and Doi, 2017). Karbapeneme dirençli *E.*

coli (CREc) varlığı temel olarak karbapenemaz üretiminin aracılık ettiği etmesi nedeniyle önemli halk sağlığı sorunlarından biridir (Gupta et al., 2011). Başta balık olmak üzere deniz ürünleri CREc ile kontamine olabilme ve onların antibiyotik dirençli genleri için bir rezervuar görevi görme potansiyeline sahiptir (Dwivedi et al., 2023; Hamza et al., 2020; Sing et al., 2020). Bu nedenle WHO (2024) kritik öncelikle bakteriler arasında karbapenem dirençli Enterobacterales'e de yer vermiştir. Bu çalışmada izole edilen *E. coli* izolatlarının %38,23'ünün CREc ile kontamine olması ve CREc izolatlarından 5'ünün *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} genlerini, 3 izolatın üç GSBL genlerini, iki izolatın *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX} genlerini birlikte, 5 izolatın yalnız *bla*_{TEM} genleriyle yani GSBL-*E. coli* oluşları ve balık etlerinin bu izolatlarla kontamine oluşu halk sağlığı yönünden tehlikenin boyutunu ortaya koymaktadır. Yapılan bir çalışmada Hamza vd. (2020) dört balık çiftliğinde yetiştirilen 105 tilapia balığının (*Oreochromis niloticus*) iç organları (karaciğer, dalak ve böbrek) ile havuz sularından izole ettikleri toplam 66 (%63) *Enterobacteriaceae* [*E. coli* (n=45), *Enterobacter cloacae* kompleks (n=12) ve *Klebsiella pneumonia* (n=9)] izolatını karbapenemazı kodlayan genler (*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, ve *bla*_{NDM}) yönünden analiz etmişlerdir. Analiz edilen 66 balık izolatının 64 (45 *E. coli*, 12 ECC, 7 *K. pneumoniae*)'ünden 29'u karbapenemlere ve test edilen tüm sefalosporinlere, 5'i karbapenemlere ve test edilen sefalosporinlerden ikisine, 26'sı yalnızca karbapenemlere, 4'ü ise yalnızca sefalosporinlere dirençli bulunmuştur. Karbapenem dirençli 26 izolattan yalnızca 17'si karbapenemaz üretimine sahip olduklarını ve 9 izolatın ise taranan üç taranan karbapenemaz geni (*bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} ve *bla*_{NDM}) yönünden negatif olduklarını yine çalışma bulguları olarak bildirmişlerdir. Başka bir çalışmada da Kalasseril vd. (2020) iki balık çiftliğinden sekiz CREc izolatı elde ettiklerini ve bütün CREc'ler karbapenem dirençli genler (*bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM}, ve *bla*_{IMP}) yönünden negatif olduğunu, bu dirençliliğe göle hastaneden gelen atık sudan kaynaklanmış olacağını bildirmişlerdir. Türkiye'de ise balıklarda bu konu ile ilgili bir veriye ulaşılammıştır.

Bu çalışmada da üçüncü grup beta laktamazdan AmpC β-laktamaz genleri olarak toplam 6 farklı gen grubu araştırılmıştır. Analiz edilen toplam 34 *E. coli* izolatından sadece iki izolatta (32 ve 33 nolu, Tablo 3.4) hem *LAT-1*'den *LAT-4*'e kadar, *CMY-2*'den *CMY-7*'ye kadar (n=2, %5,88), *BIL-1* ile *DHA-1* ve *DHA-2* (n=2, %5,88)

genleri saptanmıştır. Her iki izolatında aynı zamanda *bla*_{TEM} genini de taşıması nedeniyle GSBL-*E. coli* oluşları başka bir deyişle GSBL ve AmpC-*E. coli* oluşları tehlikenin boyutunu artırmakta bu yönleriyle de halk sağlığını tehdit etmektedir.

AmpC'ler; cAmpC (kromozomal) ve pAmpC (plazmidal) olmak üzere iki grup altında toplanır (Bauernfeind et al., 1989; Meini et al., 2019). AmpC beta-laktamazlar kromozomal olarak kodlanan sefalosporinazlar olup, bu enzime sahip olan izolatlar çok sayıda penisilin, sefoksitine, sefazoline, sefalotine ile β -laktamaz inhibitörleri ile kombine β -laktamlara karşı da dirençli hale gelebileceği Jacoby (2009) ve Philippon vd. (2002) tarafından bildirilmiştir. Bizim çalışmamızda da genotipik olarak 2 izolat AmpC β -laktamaz olarak belirlenmiş ve bu iki izolatta biri penisin grubundan AM, AMC ve SAM ile sefalosporin grubundan FOX'a karşı dirençli olduğu, diğer bir izolatın da penisilin grubundan AM ve AMC ile sefalosporin grubu antibiyotiklerden FOX'a karşı dirençli olduğu saptanmıştır. Bu bulgular Jacoby (2009) ve Philippon vd. (2002)'in görüşünü doğrulamaktadır.

Çalışma bulguları *bla*-GSBL, *bla*-karbapenemaz ve *bla*-AmpC genlerini birlikte bulunmaları yönünden değerlendirildiğinde; %35,29 (n=12) oranında izolatın GSBL ve karbapenemaz genleri ile, %8,32 (n=3) oranında izolatın ise GSBL ile AmpC genlerini birlikte bulundurdıkları görülmektedir.

Yapılan bu çalışma bulguları sonucu balık etlerinin halk sağlığı yönünden önem taşıyan ve WHO tarafından kritik öneme sahip antibiyotiklere dirençli oluşları ve taşımış oldukları direnç genleri nedeniyle bu direnç genlerini çevreye ve insana yayabilme potansiyeline sahip oldukları ve bu nedenle önemli halk sağlığı problemi oluşturduklarını analiz bulguları sonucu söylenebilir. Nitekim bazı araştırmacılar da balıkların antibiyotik dirençli genleri için bir rezervuar görevi görme potansiyeline sahip olduklarını bildirmişlerdir (Dwivedi et al., 2023; Hamza et al., 2020; Sing et al., 2020).

Çalışmada izole edilen *E. coli* izolatlarının filogenetik gruplandırılması PZR tekniği uygulanarak yapılmış (Şekil 3.18) ve sonuçlar Tablo 3.5'te gösterilmiştir. Analiz bulguları çerçevesinde; 34 izolatın 25 (%73,53)'ünün B2₃ filogenetik gruba, 5 (%14,71) izolatın A1 filogenetik gruba, 2 izolatın Ao (grupA) filogenetik gruba ve 1 izolatın ise D2 (grup D).

E. coli suşlarının filogenetik gruplandırması ile enfeksiyonların önlenmesi ve kontrol edilmesinde ile yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Bizim çalışmamızda en yaygın filogenetik grubun B2₃ (n=25, %73,53) filogenetik grubu olduğu, bu grubu A1 filogenetik (n= 5, %14,71) ve Ao (grup A) (n=2, %5,88) filogenetik grubu izlediği ve sadece bir izolatın ise D2 (grup D) filogenetik gruba ait olduğu belirlendi. Yapılan çeşitli çalışmalarda insan kommensal suşları çoğunlukla A grubuna ait (%43) olduğu, ancak tropik bölgelerde hem A hem de B1 gruplarının yaygın olduğu bildirilirken (Escobar-Páramo et al., 2004; Escobar-Páramo et al., 2006; Li et al., 2010), hayvanlardan izole edilen suşlar çoğunlukla B1 grubuna (%34–50) ait olduğu bildirilmiştir (Carlos et al., 2010; Higgins et al., 2007). Bu sonuçlar bizim sonuçlarımızla bir ölçüde paralellik göstermektedir. Sonuç olarak filogenetik gruplar ile konak türleri arasında bir ilişki olduğu bildirilmiştir (de Castro Stoppe et al., 2017).

Araştırmacılar, filogrup D ve B2'nin iklim bölgesinden bağımsız olarak atık su örneklerinden izole edilen *E. coli* suşları arasında baskın olup, ılıman bir bölgede izolatların %50'sini, subtropikal bir bölgede ise %95'ten fazlasını oluşturduğunu (Anastasi et al., 2010; Mokracka et al., 2011); bu filogruplar, sıklıkla patojenik *E. coli* suşlarıyla ilişkili olduğu bildirilmiştir (Clermont et al., 2000). Anastasi vd. (2010)'de bir suşun patojenik olup olmadığını belirlemede filogrubun basit bir araç olarak kullanılmasını önermektedir. Ramadan vd. (2016)'de B2 ve D gruplarının ekstraintestinal *E. coli* enfeksiyonlarından sorumlu, A veya B1 gruplarının da kommensal gruplar olduklarını değerlendirmişlerdir. Sonuçlar bu açıdan değerlendirildiğinde de filogenetik grubun B2₃ (n=25, %73,53) ve bir (%2,94) izolatın ise D₂ (grup D) toplamda ise 26 (%76,47) izolatın patojen özellikte olabileceği şeklinde değerlendirilebilir.

Escherichia coli'nin B2₃ genetik alt grubu, insan kaynaklı örneklerde bulunan ve yüksek virülans potansiyeline sahip bir suş olarak tanımlanmıştır. Bu alt grup, özellikle SHV tipi β -laktamaz üretimiyle ilişkilidir ve *pap*, *sfa/foc* ve *hly* gibi virülans faktörleriyle sıkça birlikte bulunur. Bu özellikler, B2₃ alt grubunu potansiyel olarak yüksek virülanslı bir grup olarak tanımlar (Yılmaz ve Aslantaş, 2020). Bizim çalışmamızda bu filogenetik grup 25/34 izolatta belirlenmiştir. Yapılan bu çalışmada *bla*_{SHV} geni toplam 20 *E. coli* izolatta belirlenmiş ve bu izolatlardan 15'i B2₃

filogenetik grup olarak belirlendi. Bu sonuçlar Ramadan vd. (2016) ile Yılmaz ve Aslantaş (2020)'in görüşleriyle paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda izole edilen ve MALDI-TOF MS ile identifiye edilen 34 *E. coli* izolatlarından rastgele iki izolat seçilmiş ve çift yönlü Sanger dizi analizi yapılmış ve dizileme sonucu izolatların %99,91-%99,92 benzerlik oranıyla *E. coli* oldukları doğrulanmıştır. Bu sonuçlar da bize MALDI-TOF MS'in *E. coli* izolatlarını tanımlamada güvenilir olduğunu göstermektedir.

Sonuç

Çalışmamızda balıklardan izole edilen ve MALDI-TOF MS ile identifiye edilen 34 *E. coli* izolatında çeşitli grup antibiyotiklere karşı direnç özellikleri belirlenmiş ve sonuçlar çoklu antibiyotik dirençlilik yönünden de değerlendirilmiştir. İzolatların yedi farklı gruptan 11 antibiyotiğe karşı %5,88-%50,00 oranında direnç saptandı. En yüksek dirençliliğin penisilin grubu antibiyotiklere %32,35-%50,00; karbapenem ve tetrasiklin grubu antibiyotiklere %11,76, kinolonlara ve florokinolonlara, sefalosporinlere, amfenikollere ve fosfomisinlere karşı da %5,88 oranlarında direnç saptandı. İzolatların %11,76'sı çoklu antibiyotik dirençlilik gösterdi. İzolatlar GSBL-*E. coli* yönünden çift disk difüzyon testi ile fenotipik olarak saptanamazken, 3 *bla* genlerinden *TEM* %91,18, *SHV* %58,82 ve *CTX-M* ise %23,53 oranlarında saptandı. Karbapenem dirençliliğinden sorumlu 5 gen (*bla*_{NDM}, *VIM*, *KPC*, *IMP* ve *OXA-48*) araştırıldı. Analiz sonucunda *NDM* ve *KPC* gen varlıkları saptanamazken, *IMP* 5 (%14,71), *OXA-48* ve *VIM* genleri 4'er (%11,76) izolatla saptandı. Toplamda ise 5 karbapenemaz üretiminden sorumlu genlerden en az biri 13 (%38,23) *E. coli* izolatında saptandı. Fenotipik testlerden MEM'e karşı MİK testinde 1 (%2,94), MHT testinde 4 (%11,8) izolat karbapenem dirençli idi. İzolatların AmpC β-laktamaz genlerinden toplam 6 farklı gen grubu da araştırıldı ve sadece iki izolatla hem *LAT-1*'den *LAT-4*'e kadar, *CMY-2*'den *CMY-7*'ye kadar (n=2, %5,88), *BIL-1* ile *DHA-1* ve *DHA-2* (n=2, %5,88) genleri saptandı. Her iki izolat aynı zamanda *bla*_{TEM} genini de taşıması nedeniyle GSBL ve AmpC-*E. coli* oluşları tehlikenin boyutunu artırmaktadır.

Sonuç olarak, balık etlerinin halk sağlığı yönünden önem taşıyan ve WHO tarafından kritik öneme sahip antibiyotiklere dirençli olukları ve taşımış oldukları

direnç genleri nedeniyle bu direnç genlerini çevreye ve insana yayabilme potansiyeline sahip oldukları ve bu nedenle önemli halk sağlığı problemi oluşturabilme potansiyeline sahip oldukları görülmektedir. Ayrıca, analiz bulguları sonucu *E. coli* izolatlarının patojen özellikte olan B2₃ filogenetik grubunun %73,53 gibi yüksek oranda saptanması da izolatların antibiyotik direnç sorunun yanı sıra patojenik özelliğe sahip olabileceği sonucuna varılmıştır.



KAYNAKLAR

- Anderson, R.E.V., Boerlin, P. (2020). Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in animals and methodologies for their detection. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 84,3–17.
- Anastasi, E. M., Matthews, B., Gundogdu, A., Vollmerhausen, T. L., Ramos, N. L., Stratton, H., et al. (2010). Prevalence and persistence of *Escherichia coli* strains with uropathogenic virulence characteristics in sewage treatment plants. *Applied and Environment Microbiology*. 76, 5788–5786. doi: 10.1128/AEM.00141-10
- Aurilio, C., Sansone, P., Barbarisi, M., Pota, V., Giaccari, L.G., and Coppolino, F. (2022). Mechanisms of action of carbapenem resistance. *Antibiotic (Bael)*,11 (3), 421. doi:10.3390/antibiotics11030421.
- Bajaj, P., Singh, N.S., and Viridi, J.S. (2016). *Escherichia coli* β -lactamases: what really matters. *Frontiers in Microbiology*, 7, 417.
- Bauernfeind, A., Chong, Y., and Schweighart, S. (1989). Extended broad-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. *Infection*, 17, 316–321.
- Bauernfeind, A., Chong, Y., Lee, K. (1998). Plasmid-encoded AmpC beta-lactamases: how far have we gone 10 years after the discovery? *Yonsei Medical Journal*. 139,520–525
- Benlikurt, G. (2016). Deniz ve kültür balıklarından izole edilen Enterobacteriaceae türü suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz ve metallo beta-laktamaz tipi dirençlik enzimlerinin incelenmesi. İstanbul aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Güvenliği ve Beslenme Ana Bilim Dalı, Gıda Güvenliği Bölümü, Temmuz 2016.
- Bradford, P.A. (2001). Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiological Review*, 14, 933–951.
- Bush, K. (2018). Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 62 (10), e01076-18.
- Cabello, F.C., Godfrey, H.P., Buschmann, A.H., and Dölz, H.J. (2016). Aquaculture as yet another environmental gateway to the development and globalisation of antimicrobial resistance. *Lancet Infectious Diseases*, 16(7), e127–e133. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00100-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00100-6).
- Carlos, C., Aires, M. M., Stoppe, N. C., Hachich, E. M., Sato, M. I. Z., Gomes, T. A. T., et al. (2010). *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology*. 10:161. doi: 10.1186/1471-2180-10-161
- Castanheira, M., Sader, H.S., Farrell, D.J., Mendes, R.E., Jones, R.N. (2012). Activity of ceftaroline-avibactam tested against Gram-negative organism populations, including strains expressing one or more β -lactamases and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying various staphylococcal cassette chromosome mec types. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 9, 4779–85. doi:10.1128/AAC.00817-12.

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2019). AR threats report. Available at: <https://www.cdc.gov/drugresistance/biggest-threats.html#extend>. Erişim Tarihi:10 Kasım 2023.
- Cherak, Z., Loucif, L., Moussi, A., Rolain, J.M. (2021). Carbapenemase producing Gram-negative bacteria in aquatic environments: a review. *Journal Global Antimicrobial Resistance*, 25, 287–309. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2021.03.024>.
- Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). (2021). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 31st ed.
- Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI). M100-S24 (2014) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth informational supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, p 230. ISBN: 1-56238-897-5.
- Codjoe, F.S., and Donkor, E.S. (2017). Carbapenem resistance: a review. *Medical Science (Basel)*, 6 (1),1. doi:10.3390/medsci6010001.
- Coudron, P.E., Hanson, N.D., and Climo, M.W. (2003). Occurrence of Extended-Spectrum and AmpC Beta-Lactamases in Bloodstream Isolates of *Klebsiella pneumoniae*: Isolates Harbor Plasmid-Mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC Beta-Lactamases. *Journal of Clinical Microbiology*, 41 (2), 772–777. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.41.2.772-777.2003>
- da Silva, P., Lustri, B.C., Castilho, I.G., Ferreira, A.M., Hernandez, R., Schembri, M.A., and Moreira, A.M. (2021). Genome profiling of fluoroquinolone-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolates from Brazil. *Brazil Journal of Microbiology*, 52 (3), 1067-1075. doi:10.1007/s42770-021-00513-3.
- Das, U.N., Singh, A.S., Lekshmi, M., Nayak, B.B., and Kumar, S. (2019). Characterization of *bla*_{NDM} harboring, multidrug-resistant Enterobacteriaceae isolated from seafood. *Environment Science and Pollution Research*, 26(3), 2455–2463. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-3759-3>.
- De Castro, N., Silva, J. S., Carlos, C., Sato, M. I. Z., Saraiva, A. M., Ottoboni, L. M. M., & Torres, T. T. (2017). Worldwide phylogenetic group patterns of *Escherichia coli* from commensal human and wastewater treatment plant isolates. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2512. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02512>
- Denamur, E., Clermont, O., Bonacori, S., Gordon, D. (2021). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 19(1), 37-54. doi: 10.1038/s41579-020-0416-x. Epub 2020 Aug 21.
- Dinc, H., Yigin, A., Demirci, M., and Dortbudak, M.Y. (2020). An Investigation of Food-Borne Bacteria Detected in Fresh Water Fish and Their Antimicrobial Resistance Genes in Turkey. *International Journal of Veterinary and Animal Research*, 3(2): 25-28.
- Divya, P.S., Thajudeen, J., Yousuf, J., Madavan, A., Abdulla, M.H. (2020). Genetic relatedness, phylogenetic groups, antibiotic resistance, and virulence genes associated with ExPEC in *Escherichia coli* isolates from finfish and shellfish.

- Journal of Food Processing and Preservation*, 44(11), e14837. doi: 10.1111/jfpp.14837
- Dortet, L. (2015). Rapid detection of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in blood culture. *Emerging Infectious Diseases*, 21 (3), 504-507.
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W., and Jarlier, V. (2008). Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in *Enterobacteriaceae*: Review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infections*, 14 (Suppl. 1), 90–103.
- Dwivedi, A., Bhushan Kumar, C.B., Kumar, A., Soni, M., Sahu, V., Awasthi, A., and Rathore, G. (2023). Molecular characterization of carbapenem resistant *E. coli* of fish origin reveals the dissemination of NDM-5 in freshwater aquaculture environment by the high-risk clone ST167 and ST361. *Environmental Science and Pollution Research*. 30,49314–49326. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25639-9>.
- Escobar-Páramo, P., Grenet, K., Menac'h, A. L., Rode, L., Salgado, E., Amorin, C., et al. (2004). Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Applied and Environment Microbiology*. 70, 5698–5700. doi: 10.1128/AEM.70.9.5698-5700.2004.
- Escobar-Páramo, P., Le Menac'h, A., LeGall, T., Amorin, C., Gouriou, S., Picard, B., et al. (2006). Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environment Microbiology*. 8, 1975–1984. doi: 10.1111/j.1462-2920.2006.01077.x
- Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., and Stratchounski, L. (2003). Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* In Russian Hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 47(12), 3724–3732.
- Elshami, A.A., Aboshanab, K.M., Yassien, M.A., and Hassouna, N.A. (2020). Prevalence of plasmid-mediated resistance genes among multidrug-resistant uropathogens in Egypt. *African Health Sciences*, 20 (1), 190-198. doi:10.4314/ash.v20i1.24.
- Elsherif, R., Ismail, D., Elawady, S., Jastaniah, S., Al-Masaudi, S., Harakeh, S., and Karroufi, D. (2016). Boronic acid disk diffusion for the phenotypic detection of polymerase chain reaction-confirmed, carbapenem-resistant, gram-negative bacilli isolates. *BMC Microbiology*, 16,135 DOI:10.1186/s12866-016-0754-z.
- Estaji, M., Tabasi, M., Sadeghpour, H.F., Khezerloo, J.K., Radmanesh, A., Raheb, J., Ghadirzadeh, M. R. and Tabatabaei, A. (2019). Genotypic Identification of *Pseudomonas aeruginosa* Strains Isolated From Patients With Urinary Tract Infection. *Comparative Immunology Microbiology & Infectious Disease*, 65, 1-20.
- EUCAST (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases). (2023). European Committee on antimicrobial susceptibility testing.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. (2025). *Enterobacterales: Calibration of zone diameter breakpoints to MIC values (Version 13.0)*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. <https://www.eucast.org>

- Fair, J.R., and Tor, Y. (2014). Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 6, 25-64.
- Firdous, Z., Islam, M. S., Ullah, M. A., Rana, M. L., Ferdous, F. B., Rahman, A.-M. M. T., Hassan, J., and Rahman, M. T. (2025). Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in raw seafood from the coastal area of Bangladesh. *MicrobiologyOpen*, 14, e70023
- Girlich, D., Naas, T., Bellais, S., Poirel, L., Karim, A., and Nordmann, P. (2000). Heterogeneity of AmpC cephalosporinases of *Hafnia alvei* clinical isolates expressing inducible or constitutive ceftazidime resistant cephenotypes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 44,3220–3223.
- Gupta, N., Limbago, B.M., Patel, J.B., and Kallen, A.J. (2011). Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Diseases*, 53(1),60–67. <https://doi.org/10.1093/cid/cir202>.
- Hamza, D., Dorgham, S., Ismael, E., AbdEl-Moez, S.I., Elhariri, M., Elhelw, R., and Hamza, E. (2020). Emergence of β -lactamase-and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at integrated fish farms. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 9,67 <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00736-3>.
- Hanson, N.D., and Sanders, C.C. (1999). Regulationof inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. *Current Pharmaceutical Design*, 5, 881–894.
- Higgins, J., Hohn, C., Hornor, S., Frana, M., Denver, M., and Joerger, R. (2007). Genotyping of *Escherichia coli* from environmental and animal samples. *Journal of Microbiological Methods*. 70, 227–235. doi: 10.1016/j.mimet.2007.04.009
- Ho, P. L., Chow, K. H., Yuen, K. Y., Ng, W. S. and Chau, P. Y. (1998). Comparison of a novel, inhibitor-potentiased disc-diffusion test with other methods for the detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42 (1), 49–54.
- Huang, J.J., Hu, H.Y., Lu, S.Q., Fang Tang Y.L., and Bin Wei, Y.L. (2012). Monitoring and evaluation of antibiotic-resistant bacteria at a municipal wastewater treatment plant in China. *Environment International*, 42,31–36. Doi: 10.1016/j.envint.2011.03.001.
- Ibrahim, M., Ahmad, F., Yaqub, B., Ramzan, A., Imran, A., Afzaal, M., Mirza, S. A., Mazhar, I., Younus, M., Akram, Q., Taseer, M. S. A., Ahmad, A., & Ahmed, S. (2020). Current trends of antimicrobials used in food animals and aquaculture. In H. A. Rizvi & A. K. Baig (Eds.), *Antibiotics and antimicrobial resistance genes in the environment* (Vol. 1, pp. 39–69). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818882-8.00004-4>.
- Islam, K., Heffernan, A.J., Naicker,S., Henderson, A., Chowdhury, M.A.H., Roberts, J.A., and Sime, F.B. (2021). Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase and metallo- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in South Asia. *Future Microbiology*, 16 (7), 521–535.
- Jacoby, G. A. (2009). AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (1), 161–182.

- Jomehzadeh, N., Ahmadi, K., and Rahmani, Z. (2021). Prevalence of plasmid-mediated AmpC β -lactamases among uropathogenic *Escherichia coli* isolates in southwestern Iran. *Osong Public Health Research Perspectives*, 12 (6), 390-395.
- Kalasseril, S.G., Krishnan, R., Vattiringal, R.K., Paul, R., Mathew, P., and Pillai, D. (2020). Detection of New Delhi metallo- β -lactamase 1 and cephalosporin resistance genes among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in water bodies adjacent to hospitals in India. *Current Microbiology*, 77(10), 2886–2895. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02107-y>.
- Kostyla, C., Bain, R., Cronk, R., and Bartram, J. (2015). Seasonal variation of fecal contamination in drinking water sources in developing countries: A systematic review. *The Science of the Total Environment*, 514, 333–343; doi: 10.1016/j.scitotenv.2015.01.018.
- Kusunur, A. B., Kuraganti, G. K., Mogilipuri, S. S., Vaiyapuri, M., and Narayanan, S. V. (2022). Multidrug resistance of *Escherichia coli* in fish supply chain: A preliminary investigation. *Journal of Food Safety*, 42(1), e12972. <https://doi.org/10.1111/jfs.12972>
- Lekshmi, M., Ammini, P., Kumar, S., and Varela, M.F. (2017). The food production environment and the development of antimicrobial resistance in human pathogens of animal origin. *Microorganisms*. 5, 11.
- Li, B., Sun, J. Y., Han, L. Z., Huang, X. H., Fu, Q., and Ni, Y. X. (2010). Phylogenetic groups and pathogenicity islands markers in fecal *Escherichia coli* isolates from asymptomatic humans in China. *Applied and Environment Microbiology*. 76, 6698–6700. doi: 10.1128/AEM.00707-10
- MacKenzie, F. M., Miller, C. A. and Gould, I. M. (2002). Comparison of screening methods for TEM- and SHV derived extended-spectrum beta-lactamase detection. *Clinical Microbiology and Infection*, 8 (11), 715–724.
- McDanel, J., Schweizer, M., Crabb, V., Nelson, R., Samore, M., Khader, K., Blevins, A.E., Diekema, D., Chiang, H.-Y., Nair, R., and Perencevich, E. (2017). Incidence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* infections in the United States: A systematic literature review. *Infections Control and Hospital Epidemiology*, 38, 1209–1215.
- McEwen, S.A., and Collignon, P.J. (2018). Antimicrobial resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, 6 (2). doi:10.1128/microbiolspec. ARBA-0009-2017
- Meini, S., Tascini, C., Cei, M., Sozio, E. and Rossolini, G. M. (2019). AmpC β -lactamase-producing Enterobacterales: what a clinician should know. *Infection*, 47 (3), 363–375.
- Meletis, G., Protonotariou, E., Papadopoulou, D., and Skoura, L. (2016). Comment on: The carbapenemase Menace: Do dual mechanisms code for more resistance? *Infections Control and Hospital Epidemiology*, 37, 1392–4. doi:10.1017/ice.2016.197.
- Mokracka, J., Kokzura, R., Jabłonska, L., and Kaznowski, A. (2011). Phylogenetic groups, virulence genes and quinolone resistance of integron-bearing

- Escherichia coli strains isolated from a wastewater treatment plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 99, 817–824. doi: 10.1007/s10482-011-9555-4
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 15th informational supplement (M100–S15)* (2005). Wayne, Pennsylvania.
- Nordmann, P., Dortet, L., and Poirel, L. (2012). Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends in Molecular Medicine*, 18, 26372. doi:10.1016/j.molmed.2012.03.003.
- Nowicki, S., de Laurent, Z.R., de Villiers, E.P., and Gihinji, G. (2021). The utility of Escherichia coli as a contamination indicator for rural drinking water: Evidence from whole genome sequencing. *PLoS One*, 16(1), e0245910; doi: 10.1371/journal.pone.0245910
- Parker, D., Sniatynski, M.K., Mandrusiak, D., and Rubin, J.E. (2016). Extended-spectrum β -lactamase producing Escherichia coli isolated from wild birds in Saskatoon, Canada. *Letters Applied Microbiology*, 63 (1), 11–15.
- Paterson, D. L. and Bonomo, R. A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*. 18 (4), 657–686.
- Paterson, D.L., and Bonomo, R.A. (2005). Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Review*, 18, 657-686.
- Pérez- Pérez, F.J., and Hanson, N.D. (2002). Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 40 (6), 2153-2162.
- Philippon, A., Arlet, G. and Jacoby, G. A. (2002). Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46 (1), 1–11.
- Pierce, V.M., Simner, P.J., Lonsway, D.R., Roe-Carpenter, D.E., Johnson, J.K., Brasso, W.B, Bobenchik, A.M., Lockett, Z.C, Chamot-Katsikas, A., Ferraro, M.J., Thomson, R.B., Jenkins, S.G., Limbago, B.M., and Das, S. (2017). Modified Carbapenem inactivation method for phenotypic detection of Carbapenemase production among *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 55(8), 2321–33.
- Pitout, J.D.D. (2008). Multiresistant *Enterobacteriaceae*: New threat of an old problem. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 6, 657–669.
- Poirel, L., Walsh, T.R., Cuvillier, V., and Nordmann, P. (2011). Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnosis of Microbiol Infectious Disease*, 70, 119–23. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002> PMID: 21398074.
- Ramadan H, Awad A, Ateya A, (2016). Detection of phenotypes, virulence genes and phylotypes of avian pathogenic and human diarrheagenic Escherichia coli in Egypt. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 10(6), 584-591.
- Ramírez-Castillo, F.Y., Guerrero-Barrera, A.L., and Avelar-González F.J. (2023). An overview of carbapenem resistant organisms from food producing animals, seafood, aquaculture, companion animals, and wildlife. *Frontiers in Veterinary Science*, 10, 1158588. doi:10.3389/fvets.2023.1158588.

- Rana, L., Ullah, A., Nazmul Hoque, M., Hassan, J., Mahbubul Pratik Siddique, M.P., and Rahman, T. (2025). Preliminary survey of biofilm forming, antibiotic resistant *Escherichia coli* in fishes from land based aquaculture systems and open water bodies in Bangladesh. *Scientific Reports*, 15, 7811.
- Roy, C., Foz, A., Segura, C., Tirado, M., Fuster, C., and Reig, R. (1983). Plasmid-determined identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 12, 507-10.
- Sawa, T., Kooguchi, K., and Moriyama, K. (2020). Molecular diversity of extended-spectrum β -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *Journal of Intensive Care*, 8, 13.
- Schar, D., Klein E.Y., Laxminarayan R., Gilbert, M., and Van Boeckel, T.P. (2020). Global trends in antimicrobial use in aquaculture. *Scientific Reports*, 10 (1), 21878. doi:10.1038/s41598-020-78849-3.
- Sezener, M.G. (2022). Kedi ve köpeklerde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz, Ampc beta laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* izolatlarının prevalansı ve moleküler tiplendirmesi. Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Doktora Tezi, Samsun.
- Sheng, W.-H., Badal, R.E., and Hsueh, P.R. (2013). SMART Program Distribution of extended-spectrum β -lactamases, AmpC β -lactamases, and carbapenemases among *Enterobacteriaceae* isolates causing intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: Results of the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 57, 2981–2988.
- Singh, A.S., Lekshmi, M., Nayak, B.B., and Kumar, S.H. (2016). Isolation of *Escherichia coli* harboring bla_{NDM-5} from fresh fish in India. *Journal of Microbiology, Immunology and Infections*, 49(5), 822–823. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2014.11.004>.
- Singh, A.S., Nayak, B.B., and Kumar, S.H. (2020). High Prevalence of Multiple Antibiotic-Resistant, Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* in Fresh Seafood Sold in Retail Markets of Mumbai, India. *Veterinary Science*, 7(2), 46; <https://doi.org/10.3390/vetsci7020046>
- Stürenburg, E., and Mack, D. (2003). Extended Spectrum Beta Lactamases Implications for The Clinical Microbiology Laboratory, Therapy and Infection Control. *Journal of Infections*, 47, 273-95.
- Summers, A.O. (2006). Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotic multi-resistance problem. *Animal Biotechnology*, 17(2), 125–135; doi: 10.1080/10495390 600957217.
- Szmolka, A., and Nagy, B. (2013). Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Frontier in Microbiology*, 3, 4, 258. doi: 10.3389/fmicb.2013.00258.
- Taggar G., Attiq Rheman M., Boerlin, P., and Diarra, M.S. (2020). Molecular epidemiology of carbapenemases in Enterobacteriales from humans, animals, food and the environment. *Antibiotics*, 9, 693. doi:10.3390/antibiotics9100693.

- Tamura, K., and Nei, M. (1993). İnsanlar ve şempanzelerde mitokondriyal DNA'nın kontrol bölgesindeki nükleotit değişimlerinin sayısının tahmini. *Molecular Biology and Evolution*, 10,512-526.
- Tamura, K., Stecher, G., and Kumar, S. (2021). MEGA 11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120.r>:
- Oxford University (2025). Antibiotic resistance has claimed at least one million lives each year since 1990. In: Global Research on Antimicrobial Resistance (GRAM) Project <https://www.ox.ac.uk/news/2024-09-17-antibiotic-resistance-has-claimed-least-one-million-lives-each-year-1990>. Publishing date: 17 September 2025Erişim Tarihi: 12.06.2025.
- Thomson, K. S. and Sanders, C. C. (1992). Detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the double-disk and three-dimensional tests. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36 (9), 1877–1882.
- Tsai, Y-M., Wang, S., Chiu, H-C., Kao, C-Y., and Wen, L.L. (2020). Combination of modified carbapenem inactivation method (mCIM) and EDTA-CIM (eCIM) for phenotypic detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *BMC Microbiology*, 20,315. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-02010-3>
- van Duin, D., and Doi, Y. (2017). The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Virulence*, 8, 460–469.
- Vercauteren, E., Descheemaeker, P., Ieven, M., Sanders, C. C. and Goossens, H. (1997). Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 35 (9), 2191–2197.
- WHO (World Health Organisation). (2024). WHO updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health. <https://www.who.int/news/item/17-05-2024-who-updates-list-of-drug-resistant-bacteria-most-threatening-to-human-health>. Erişim Tarihi: 12.06.2025.
- Yılmaz, E. Ş., ve Aslantaş, Ö. (2020). Phylogenetic group/subgroups distributions, virulence factors, and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* strains from urinary tract infections in Hatay. *Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine*, 53, e20190429. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0429-2019>
- Yohans, H., Mitiku, B.A., and Tassew, H. (2022). Levels of *Escherichia coli* as bio-Indicator of contamination of fish food and antibiotic resistance pattern along the value chain in Northwest Ethiopia. *Veterinary Medicine: Research and Reports*,13, 299–311.
- Yao, JDC; Moellering, RC Jr. (2007). "Antibacterial agents". Murray, PR (Ed.). *Manual of Clinical Microbiology*. 9th. Washington D.C.: ASM Press.

ÖZ GEÇMİŞ

Mehmet Furkan ÖZTÜRK Yeşilyurt Lisesi'ni bitirdikten sonra Fırat Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden 2014 yılında mezun oldu. 2017 yılında OMÜ Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Su Ürünleri Hastalıkları (Veteriner) Ana Bilim Dalı Yüksek Lisans programına girdi ve 2025 tarihinde mezun oldu. 2014-2020 Ada Veteriner Kliniği (Veteriner Hekim), 2020-2025 Adaklı İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü (Veteriner Hekim) görev aldı ve 2025 yılından beri Yazıhan İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü (Veteriner Hekim) olarak çalışmaya devam etmektedir.

İletişim Bilgileri

ORCID ID : 0009_0003_4903_5642.

Yayınlar:

1. Mehmet Furkan Öztürk, Belgin Sırken, Volkan Kaydu, Eda Keleş (2025). Paralitik Deniz Kabukluları Zehirlenmeleri, Bölüm 4. In: Sağlık Bilimleri Alanında Akademik Araştırmalar. Ed. Arzu Betül Çuhacıoğlu, Platunus Publishing, Mamak Ankara. pP:79-113