



**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN  
ESCHERİCHİA COLİ İZOLATLARININ MOLEKÜLER  
EPİDEMİYOLOJİK KARAKTERİZASYONU VE  
YÜKSEK RİSKLİ ST131 KLONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**Elif AYDIN**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Selahattin ÇELEBİ**

**Doktora Tezi-2022**

T.C.  
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KLİNİK ÖRNEKLERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERİCHIA*  
*COLI* İZOLATLARININ MOLEKÜLER  
EPİDEMİYOLOJİK KARAKTERİZASYONU VE YÜKSEK  
RİSKLİ ST131 KLONUNUN ARAŞTIRILMASI**

**Elif AYDIN**

**Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı  
Doktora Tezi**

**Tez Danışmanı  
Prof. Dr. Selahattin ÇELEBİ**

**ERZURUM  
2022**

# İÇİNDEKİLER

<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>I</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>VII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VIII</b>
<b>SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>IX</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>X</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>XII</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>3</b>
2.1. <i>Escherichia coli</i> ' nin Tarihçesi .....	3
2.2. Taksonomi .....	4
2.3. Morfoloji Özellikleri.....	5
2.4. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri.....	5
2.5. <i>E. coli</i> Patotipleri .....	6
2.5.1. Intestinal <i>E. coli</i> Patotipleri .....	7
2.5.1.1. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC).....	7
2.5.1.2. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC).....	8
2.5.1.3. Enteroagregatif <i>E. coli</i> (EAEC).....	8
2.5.1.4. Enteroinvaziv <i>E. coli</i> (EIEC).....	9
2.5.1.5. Vero- veya Shiga-Toksin Üreten / Enterohemorajik <i>E. coli</i> (VTEC veya STEC / EHEC).....	9
2.5.1.6. Diffuz Aderent <i>E. coli</i> 'dir (DAEC) .....	10
2.5.2. Ekstraintestinal <i>E. coli</i> Patotipleri (ExPEC).....	10
2.5.2.1. Septisemik Patojenik <i>E. coli</i> (SEPEC) .....	10

2.5.2.2. Neonatal Meningitis <i>E. coli</i> (NMEC) .....	10
2.5.2.3. Üropatojenik <i>E. coli</i> (UPEC) .....	11
2.5.2.4. Avian Patojenik <i>E. coli</i> (APEC) .....	11
2.6. <i>E. coli</i> Virulans Faktörleri .....	11
2.6.1. Adezinler.....	13
2.6.2. Toksinler .....	15
2.6.3. Patojenite Adaları .....	17
2.6.4. Aerobaktin ve Siderofor.....	18
2.6.5. Serum Direnci .....	18
2.6.6. Kolisin.....	19
2.7. <i>E. coli</i> 'nin Filogenetik Gruplandırması .....	19
2.8. <i>E. coli</i> 'de Antimikrobiyal Direnç .....	20
2.8.1. Doğal Direnç.....	21
2.8.2. Kazanılmış Direnç .....	21
2.9. Yatay Gen Aktarımında Rol Oynayan Hareketli Elemanlar .....	23
2.9.1. Plazmidler .....	23
2.9.2. Transpozonlar .....	23
2.9.3. İntegronlar.....	23
2.9.3.1. İntegronların Yapısı .....	24
2.9.3.2. İntegronların Sınıflandırılması.....	24
2.10. Beta –Laktam Antibiyotiklerde Direnç Mekanizmaları .....	27
2.10.1. Beta-Laktamazlar.....	27
2.10.1.1. Genişlemiş Spektrumlu $\beta$ -Laktamazlar (GSBL).....	28
2.10.1.2. GSBL Tanı Yöntemleri.....	30
2.11. <i>E. coli</i> Sekans Tipi (ST) 131.....	34

2.11.1. Epidemiyoloji.....	35
2.11.2. Filogenetik Grup ve Serotip.....	36
2.12. Biyofilm.....	38
2.12.1. Biyofilmin Tarihçesi.....	38
2.12.2. Biyofilmin Yapısı.....	38
2.12.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları.....	39
2.12.4. Biyofilm ve Enfeksiyon Hastalıkları.....	40
<b>3. MATERYAL VE METOT.....</b>	<b>41</b>
3.1. Materyal.....	41
3.1.1. Besiyerleri ve Kimyasallar.....	41
3.1.2. Cihazlar.....	41
3.1.3. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması.....	42
3.1.3.1. Luria Broth (LB).....	42
3.1.3.2. % 2 Glukoz içeren Luria Broth.....	42
3.1.3.3. Nutrient Agar.....	43
3.1.3.4. Kongo Red Agar.....	43
3.1.3.5. Gliserollü Triptik Soy Broth %16 (TSB).....	44
3.1.3.6. Mueller Hinton Agar.....	44
3.1.4. Kullanılan Solüsyonların ve Kimyasalların Hazırlanması.....	45
3.1.4.1. Kristal Viyole (%1).....	45
3.1.4.2. Fosfat Buffer (pH 7.2).....	45
3.1.4.3. EDTA 0.5 M (pH 8.0).....	45
3.1.4.4. Sodyum hidroksit NaOH (10 M).....	45
3.1.4.5. TAE (50X) Elektroforez Tamponu.....	45
3.1.4.6. TAE (1X) Elektroforez Tamponu.....	46

3.1.4.7. Tris EDTA (TE) Tamponu (pH 8.0).....	46
3.1.4.8. Tris-HCL Tamponu (pH 8.0).....	46
3.1.4.9. Yükleme Boyası 6X.....	46
3.1.4.10. DNA ladder.....	46
3.2. Yöntem.....	46
3.2.1. Bakteri İzolatları .....	46
3.2.2. <i>E. coli</i> izolatların Tanımlanması ve Doğrulaması .....	47
3.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri .....	48
3.2.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi.....	48
3.2.3.2. GSBL Varlığının Fenotipik Olarak Gösterilmesi .....	49
3.2.4. Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi .....	50
3.2.4.1. Kongo red agar (CRA) yöntemi.....	50
3.2.4.2. Kantitatif Cam Tüp Test Yöntemi .....	51
3.2.5. Moleküler Analiz .....	53
3.2.5.1. Toplam DNA izolasyonu .....	53
3.2.5.3.1. CTX-M İçin PCR Yöntemi.....	56
3.2.5.3.2. TEM İçin PCR Yöntemi .....	56
3.2.5.3.3. OXA İçin PCR Yöntemi .....	56
3.2.5.3.4. SHV İçin PCR Yöntemi.....	57
3.2.5.4 Virülans Gen Bölgelerinin Multiplex PCR ile Analizleri.....	57
3.2.5.5. ST131 Klonu ve Alt Klonlarının Moleküler Yöntemle Belirlenmesi.....	59
3.2.5.6. İntegraz ve İntegron Gen Varlığının Moleküler Yöntemle Belirlenmesi .....	61
3.2.5.7. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme .....	62
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>64</b>
4.1. <i>E. coli</i> İzolatların Toplanması.....	64

4.2. <i>E. coli</i> İzolatların Ait Olduğu Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri.....	64
4.3. <i>E. coli</i> İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları .....	65
4.4. <i>E. coli</i> Suşlarında Biyofilm Oluşumu .....	67
4.4.1. <i>E. coli</i> Suşlarında "Kongo Red Agar yöntemi" İle Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi .....	67
4.4.2. <i>E. coli</i> Suşlarında "Kantitatif Cam Tüp Testi" İle Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi .....	67
4.4.3. <i>E. coli</i> Suşlarında " Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Test yöntemi " İle Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi .....	68
4.5. <i>E. coli</i> Suşların Filogenetik sonuçları .....	68
4.6. <i>E. coli</i> Suşların GSBL Direnç Genlerinin Sonuçları .....	70
4.7. <i>E. coli</i> Suşların Virulans Genlerinin Sonuçları.....	73
4.8. <i>E. coli</i> İzolatlarında ST131 Klonu ve Alt Klonlarının Moleküler Sonuçları.....	76
4.10. Araştırmanın İstatistiksel Çalışmalarına İlişkin Bulgular.....	79
<b>5. TARTIŞMA.....</b>	<b>89</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>97</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>99</b>
<b>EKLER .....</b>	<b>132</b>
<b>EK-1. ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>132</b>
<b>EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU .....</b>	<b>133</b>
<b>EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU .....</b>	<b>133</b>

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, deneyim ve bilgisini paylaşmaktan kaçınmayan, saygıdeğer hocam, tez danışmanım Prof. Dr. Selahattin ÇELEBİ 'ye saygı ve şükranlarımı sunarım.

Yine doktora eğitimim boyunca sundukları bilimsel ve manevi destekler için Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Öğretim Üyeleri Prof. Dr. Halil YAZGI, Prof. Dr. Osman AKTAŞ, Prof. Dr. Muhammet Hamidullah UYANIK, Prof. Dr. Hakan USLU, Prof. Dr. Ülkü ALTOPARLAK, Dr. Öğr. Üyesi Özgür ÇELEBİ ve Doç.Dr. Demet ÇELEBİ (Veteriner Fakültesi) ve anabilim dalının tüm çalışanlarına,

Tez çalışmamın her aşamasında zaman ayırıp çalışmamı takip eden, her daim fikirleri ile bana yol gösteren, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Duygu PERÇİN RENDERS'a, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji ABD başkanı Prof. Dr. Barış OTLU 'ya ve Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Başkanı Prof. Dr. Salih OTLU ve Prof. Dr. Fatih BÜYÜK'e;

*E.coli* izolatlarının teminini sağlayan S.B. KSBÜ Tıp Fakültesi Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarında görevli başta Hanife ALTINGÖL olmak üzere tüm laboratuvar çalışanlarına, çalışmalarım boyunca bilimsel ve manevi destekleri için sevgili arkadaşlarım Doç. Dr. Ayşe KOÇAK SEZGİN, Doç. Dr. Derya BERİKTEN, Dr. Öğr. Üyesi Meliha KOLDEMİR, Dr. Öğr. Üyesi Güllü KAYMAK, Dr. Öğr. Üyesi Serel AKYOL, Öğr. Gör. Dr. Güleser YILMAZ, Öğr. Gör. Dr. Erva RAKICI ve Sümeyye BAŞER'e teşekkür ederim.

İhtiyaç duyduğum her anımda benimle olan aileme, desteğini her daim gösteren yol arkadaşım eşim Neşet AYDIN'a ve özellikle gösterdikleri anlayıştan ötürü çocuklarım Kerem ve İdil'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Canım Babam

Yusuf ŞAHİN'e ithafen

(*Aynen istediğin gibi*)



## ÖZET

### Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia Coli* İzolatlarının Moleküler Epidemiyolojik Karakterizasyonu ve Yüksek Riskli ST131 Klonunun Araştırılması

**Amaç:** *E. coli* ST131, beta-laktamaz üretimi ve başta florokinolon direnci ile başlayan çok ilaca direnç ile ilişkili ve önemli sistemik enfeksiyonlara yol açan pandemik bir klondur. Ülkemizde antimikrobiyal direnç sıklığı ve yayılım hızı sonucu gelişen klonların araştırılması gereken önemli bir konu olmaktadır. Bu çalışmanın amacı, *E. coli* kökenlerinin fenotipik yöntemlerle teşhisi, antimikrobiyal direnç profillerinin, virülans özelliklerinin, dahil oldukları filogenetik gruplarının, integron gen kaset varlığının ve biyofilm oluşturma özelliğinin *E. coli* ST131 klonu varlığı ve yokluğu oranlarını karşılaştırmak ve ST131 taşıyıcılığı için risk faktörlerini değerlendirmektir.

**Materyal ve Metot:** Çalışmaya toplam 160 adet *E. coli* izolatu dahil edildi. Bakteri identifikasyonları konvansiyonel ve otomatize yöntemler ile yapıldı. GSBL varlığını göstermek için çift disk sinerji yöntemi kullanılmıştır. Tüm *E. coli* izolatlarında moleküler çalışmalar, gerçek-zamanlı PZR yöntemi ile yapıldı.

**Bulgular:** İzolatların %86.25'i idrar, %11.25'i apse, %1,87'si kan, %0.63'ü trakeal aspirasyon olmak üzere toplam 160 izolat ile çalışıldı. İzolatların %72.5'i kadın, %27,5'i erkek hasta, yaş ortalaması 51,73 olarak belirlendi. 160 izolatın %69.38'i ST131pozitif, bunların %30,63'ünde H30 alt klonu, H30 alt klonu pozitif izolatların %29,41'inde H30-Rx alt klonu tespit edildi. Bu izolatların %73.87' si GSBL pozitif olarak tespit edildi. ST131 klonu pozitif izolatların %36.03'ü A, %29,73'ü B1, %25,23'ü B2 ve %9,01'i D grubu olarak tespit edildi. ST131 klonu pozitif numunelerin % 95.5 'inde en az bir virülans geni görülürken, %4,5 'inde ise herhangi bir virülans geni görülmemiş olup en çok fim A genine rastlandı. ST131 klonu pozitif numunelerin % 65.77 'sinde int1 ve %5,4'ünde int 2 geni tespit edildi. Son olarak ise %81.99 'inde herhangi bir yöntem ile biyofilm oluşturduğu tespit edilirken, %18.01'inde biyofilm oluşturmadığı tespit edildi.

**Sonuç:** Çalışmamızda GSBL üreten *E.coli* izolatlarının yüksek riskli ST131 klonuyla beraber dramatik bir şekilde yaygınlığını, bu riskli klonun H30Rx alt klonunun hakimiyetini, ayrıca direnç, virülans, integron ve biyofilm ile birlikte direnç mekanizmalarının etkisinin önemini gösterebilir.

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, çok ilaç direnç, *E. coli* ST131, filogenetik, GSBL, integron, virülans, Yüksek riskli klon,

## ABSTRACT

### **Molecular Epidemiological Characterization of Escherichia Coli Isolates Isolated from Clinical Specimens and Investigation of High-Risk Clone ST131**

**Objective:** The pandemic clone *E. coli* ST131 is known to be multi-drug resistant and causes serious systemic infections. It produces beta-lactamases and is primarily fluoroquinolone resistant. The clones that develop in our country as a result of the prevalence of antibiotic resistance and the rate of propagation represent a significant problem that requires further research. This study's objectives include using phenotypic techniques to identify *E. coli* strains, comparing rates of antimicrobial resistance profiles, virulence traits, phylogenetic groups, integron gene cassette presence and biofilm formation, the presence and absence of an *E. coli* ST131 clone, and assessing risk factors for ST131 carriage.

**Materials and Methods:** The study consisted of a total of 160 *E. coli* isolates. Both traditional and automated techniques were used to identify the bacteria. The double disc synergy method was used to demonstrate the presence of ESBL. Molecular studies on all *E. coli* isolates were performed by the real-time PCR method.

**Results:** 160 isolates in all were examined, of which 86.25% were urine, 11.25% were abscesses, 1.87% were blood, and 0.63% were tracheal aspirates. 72.5% of the isolates were female and 27.5% were male, and the mean age was 51.73. 69.38% of the 160 isolates were ST131-positive, 30.63% of them had H30 subclones, and 29.41% of H30 subclone-positive isolates were H30-Rx subclones. 73.87% of these isolates were found to be ESBL-positive. 36.03% of the ST131 clone positive isolates belonged to group A, 29.73% to group B1, 25.23% to group B2, and 9.01% to group D. While at least one virulence gene was observed in 95.5% of ST131 clone positive samples, no virulence gene was found in 4.5% of them, and the most *fim A* gene was found. The *Int1* gene was detected in 65.77% of ST131 clone positive samples and the *int2* gene in 5.4%. Finally, it was discovered that, regardless of the method, 81.99% of them produced biofilms whereas just 18.01% did not.

**Conclusion:** The prevalence of ESBL-producing *E. coli* isolates together with the high-risk ST131 clone in our study may indicate the dominance of H30Rx subclone of this high-risk clone, as well as the significance of resistance, virulence, integron and biofilm, as well as the effect of resistance mechanisms.

**Keywords:** Biofilm, multidrug resistance, *E. coli* ST131, phylogenetics, ESBL, integron, virulence, High-risk clone,

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<b>Afa</b>	: Afimbrial adezinler
<b>CLSI</b>	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
<b>cnf</b>	: Sitotoksik Nekrotizan Faktör
<b>CTX-M</b>	: Sefotaksimi hidroliz eden $\beta$ -laktamaz tipi (Cefotaksimase-Munich)
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b><i>E. coli</i></b>	: Escherichia coli
<b>EUCAST</b>	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
<b>ExPEC</b>	: Ekstraintestinal patojenik <i>E. coli</i>
<b>fim A</b>	: Tip 1 (F1) Fimbria A
<b>GSBL</b>	: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
<b>İYE</b>	: İdrar yolu enfeksiyonu
<b>PAI</b>	: Patojenite adaları
<b>pap</b>	: Piyelonefritle ilişkili pilus
<b>PZR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>sfa</b>	: Sialik asid spesifik fimbria
<b>ST131</b>	: Sekans tipi 131 olan klon
<b>UPEC</b>	: Uropatojenik <i>E. coli</i>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil No</u>	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1. Çift disk sinerji testi .....	31
Şekil 2.2. Üç boyutlu GSBL test .....	32
Şekil 2.3. GSBL için E-test .....	33
Şekil 2.4. <i>E. coli</i> ST131'in H30 alt klonlarının ve diğer alt klonlarının popülasyon yapısı .....	37
Şekil 2.5. Biyofilm oluşum aşamaları .....	40
Şekil 3.1. İzolatların ekimi, değerlendirilmesi ve antibiyogram .....	48
Şekil 3.2. Kongo kırmızısı agarda <i>E. coli</i> biyofilm oluşumu. ....	51
Şekil 3.3. Kalitatif cam tüp yöntemiyle biyofilm oluşumunun gözlenmesi .....	52
Şekil 3.3. a. İnkübasyonun ardından plakta oluşan kültürler, b. Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Yöntemi .....	53
Şekil 4.1. <i>E. coli</i> izolatlarının klinik örneklerle göre dağılımlar .....	64
Şekil 4.2. Çalışmaya dahil edilen hastalarda tespit edilen hastalıkların dağılımı.....	65
Şekil 4.3. <i>E. coli</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları .....	66
Şekil 4.4. <i>E. coli</i> izolatlarının filogenetik gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),33,53-70 <i>E.coli</i> izolatları.....	69
Şekil 4.5. <i>E. coli</i> suşlarının filogenetik sonuçları .....	69
Şekil 4.6. <i>E. coli</i> izolatlarının SHV gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),84-102 <i>E.coli</i> izolatları. ....	70
Şekil 4.7. <i>E. coli</i> izolatlarının TEM gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),60-78 <i>E.coli</i> izolatları. ....	71
Şekil 4.8. <i>E. coli</i> izolatlarının CTX-M gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),1-19 <i>E.coli</i> izolatları. ....	71

<b>Şekil 4.9.</b> <i>E. coli</i> izolatlarının OXA gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),79-97 <i>E.coli</i> izolatları. ....	72
<b>Şekil 4.10.</b> GSBL direnç genlerinin bulunma sıklığı.....	73
<b>Şekil 4.11.</b> <i>E. coli</i> izolatlarının 1.grup virülans gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),58-95 ile <i>E.coli</i> izolatları.....	74
<b>Şekil 4.12.</b> <i>E. coli</i> izolatlarının 2.grup virülans gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),143-160 <i>E.coli</i> izolatları.....	75
<b>Şekil 4.13.</b> <i>E. coli</i> izolatlarının 3.grup virülans gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),77-95 <i>E.coli</i> izolatları.....	75
<b>Şekil 4.14.</b> <i>E. coli</i> izolatlarının ST 131 gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),72-88 <i>E.coli</i> izolatları. ....	76
<b>Şekil 4.15.</b> <i>E. coli</i> izolatlarının H30 alt klonu gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),26-40 <i>E.coli</i> izolatları.....	77
<b>Şekil 4.16.</b> <i>E. coli</i> izolatlarının H30-Rx alt klonu gen bölgelerine ait jel görüntüleri....	77
<b>Şekil 4.17.</b> intI-1 ve intI-2 gen bölgelerine ait jel görüntüleri. ....	78
<b>Şekil 4.18.</b> Sınıf 1 integron gen bölgelerine ait jel görüntüleri. ....	78
<b>Şekil 4.19.</b> Sınıf 2 integron gen bölgelerine ait jel görüntüleri. ....	79
<b>Şekil 4.20.</b> ST131 klonunun cinsiyetlere göre dağılımı .....	79

## TABLULAR DİZİNİ

<b><u>Tablo No</u></b>	<b><u>Sayfa No</u></b>
<b>Tablo 2.1.</b> Clermont tiplendirme yöntemine göre filogenetik sınıflandırma .....	20
<b>Tablo 2.2.</b> GSBL saptanmasında tarama testi olarak önerilen MIK ve inhibisyon zon çapları.....	31
<b>Tablo 3.1.</b> Filogenetik gen bölgeleri için primerler .....	55
<b>Tablo 3.2.</b> GSBL gen bölgeleri için primerler .....	56
<b>Tablo 3.3.</b> Virulans gen bölgeleri için primerler .....	58
<b>Tablo 3.4.</b> ST131 Klonu ve Alt Klonlarına ait gen bölgeleri için primerler .....	59
<b>Tablo 3.5.</b> İntegraz ve İntegron gen bölgeleri için primerler .....	61
<b>Tablo 4.1.</b> <i>E. coli</i> Suşlarında Biyofilm Oluşum Sonuçları.....	68
<b>Tablo 4.2.</b> ST131 ve antibiyotikler arasındaki ilişki .....	80
<b>Tablo 4.3.</b> ST131 klonu ve Filogenetik özellikler arasındaki ilişki .....	83
<b>Tablo 4.4.</b> S131 klonu ve GSBL arasındaki ilişki.....	83
<b>Tablo 4.5.</b> ST131 klonu ve direnç genleri arasındaki ilişki .....	84
<b>Tablo 4.6.</b> ST131 klonu ve virulans genleri arasındaki ilişki .....	85
<b>Tablo 4.7.</b> ST131 klonu ve integron arasındaki ilişki .....	87
<b>Tablo 4.8.</b> ST131 klonu ve biyofilmler arasındaki ilişki .....	88

# 1. GİRİŞ

Çok çeşitli enfeksiyöz ajanlar içindeki antimikrobiyal direnç (AMR), Dünyanın dört bir yanından ülkeler ve çok sayıda sektör için geniş bir endişe kaynağı olan, modern tıbbın başarılarını tehdit edecek kadar artış gösteren, 21.yüzyıl ve sonrası için ciddi bir halk sağlığı tehdididir.<sup>1</sup>

*Escherichia coli* hem hastane hem de toplum kaynaklı enfeksiyonlarında önemli bir yere sahiptir. *E. coli* flora üyesi olması, virülans faktörleri taşıması ve antibiyotiklere direnç geliştirmesi sık görülen enfeksiyöz ajan olma nedenlerindedir. *E. coli*, başta idrar yolları enfeksiyonları olmak üzere yenidoğan menenjit, peritonit, sepsis, yumuşak doku enfeksiyonları gibi enfeksiyonlardan sorumludur.<sup>2</sup> *E. coli* virülans özellikleri, spesifik olup hastalık yapabilme yeteneğine ile spesifik patotipler oluşturabileceklerdir.<sup>3</sup> Patojenite ve nişe göre *E. coli*, ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC), intestinal (diyarejenik) patojenik ve kommensal olmak üzere üç temel gruba ayrılmaktadır.<sup>4</sup>

*E. coli* 'nin enfeksiyon oluşturabilme farklılıkları, oluşturdukları klinik tablo ve patofizyolojik özelliklerine göre sınıflandırma ihtiyacı duyulmuştur. Kökenlerin patojen veya kommensal köken farklılığı, her patojen tipin özel virülans faktörlerine sahip olmaları ile ilgilidir; bundan dolayı farklı klinik tablolardan farklı tipler sorumludur.<sup>5</sup> Ayrıca A, B1, B2 ve D olarak tanımlanan dört farklı filogenetik grup içerisinde yer almaktadırlar. A ve B1 filogenetik grup insan ve sıcakkanlı hayvanların bağırsağında bulunan gruplar iken, B2 ve D filogenetik grup özellikle patojen suşları içerirler.<sup>3-4</sup>

*E. coli*'nin flora elemanı olması, antimikrobilyallere karşı kolay ve hızlı direnç gelişim göstermesi, virülans faktörlerine sahip olması ve bu sebeplerden dolayı sık enfeksiyon etkeni olarak izole edilmesi, *E. coli* suşlarının canlı veya cansız yüzey alanlara tutunmasını ve biyofilm oluşumunu arttırmaktadırlar.<sup>6</sup> Biyofilmler, biyotik veya abiyotik yüzeylere yapışan mikrobiyal topluluklardır ve bir biyofilm içindeki hücreler, kendi

ürettikleri matriks içine yerleştirilmiştir. Biyofilmler, antibiyotiklerle başarılı bir şekilde eradike edilmesi zor olan çok sayıda bakteriyel enfeksiyonun patogenezinde yer aldıkları için tıbbi açıdan önemlidir.<sup>7-8</sup>

Mikroorganizmaların konak canlılarda gelişebilmeleri, yaşamlarını devam ettirebilmeleri ve konak canlıların immun yanıtlarıyla mücadele edebilmeleri için virülans faktörleri önemli rol oynarlar.<sup>9</sup> *E. coli* suşları geliştirdikleri virülans faktörleri ile insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu virülans faktörleri; adezinler, toksinler, kapsül üretimi, sideroforlar ve serum komplementine direnç geliştirme yeteneğidir.<sup>9-11</sup> Virülans faktörlerini kodlayan önemli genlerin araştırılması, suşların patojenitesinin tespit edilmesi ve enfeksiyon patogenezini hakkında yorum yapılması açısından önemlidir.<sup>12</sup>

Plazmid kaynaklı konjugasyon, *E. coli* bakterilerinde ana yatay gen aktarımı mekanizmalarından biri olup, çok ilaca direnç genlerinin meydana gelmesine yol açmaktadır. Bu mekanizmalarla kazanılan direnç, tedavide sorunlara ve başarısızlıklara sebep olmaktadır. Bu nedenle hareketli genetik elemanlardan olan R plazmidleri ve içerdikleri integron gen kasetlerine ait direnç mekanizmalarının belirlenmesi önemlidir.<sup>13</sup>

Bu tez çalışması ile, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarına gönderilen çeşitli klinik materyallerden izole edilen çoklu ilaç dirençli *E. coli* kökenlerinin fenotipik yöntemlerle teşhisi, antimikrobiyal direnç profillerinin, virülans özelliklerinin (*iutA*, *sfa cnf-1*, *aer*, *iroN*, *afa*, *hlyA*, *pap A*, *pap C*, *fim A*, *PAI*, *ompT*, *iucC*, *traT* ve *iss* genleri), dahil oldukları filogenetik gruplarının, integron gen kaset varlığının ve ST131 klon ile H30-alt klonlarının moleküler yöntemler ile tespit edilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bunlara ek olarak, bu izolatların biyofilm oluşumlarının fenotipik yöntemlerin karşılaştırılarak belirlenmesi tezin bir diğer amacıdır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. *Escherichia coli*' nin Tarihçesi

*Enterobacteriaceae* familyası içerisinde yer alan *E. coli*, 1884'te Alman bir mikrobiyolog, aynı zamanda çocuk doktoru olan Theodor Escherich tarafından, çocukluk çağı öncesi bağırsak mikroorganizmaları ve bu organizmaların sindirim sistemi ile hastalık oluşturma potansiyelleri hakkında bir çalışmaya başladı. Bu çalışma sırasında, *Bacterium coli commune* adını verdiği, hızlı büyüyen bir bakteri keşfetti.<sup>14</sup> 1895 yılında, Migula tarafından *Basillus coli* olarak yeniden adlandırılmıştır. 1919 yılında ise, Chalmers ve Castellani tarafından, Theodor Escherich'in adına itafen *Escherichia coli* olarak değiştirilmiştir.<sup>15</sup>

1940'lara gelindiğinde, birçok temel çalışmada kullanımı, *E. coli*'yi tercih edilen bakteri modeli organizması olarak sağlam bir şekilde belirledi ve 1950'lerde moleküler biyoloji devriminin başlangıcında birlikte çalışılacak bakteri haline getirdi. Nihayetinde, transkripsiyon, translasyon, replikasyon ve genetik kod olmak üzere birçok özelliğinin üzerinde ilk kez çalışıldığı mikroorganizma haline geldi.<sup>16-17</sup> İnsan sağlığı için hastalık etkeni olan ilk *E. coli* suşu 1950'li yıllarda bulunmuş ve Enteropatojenik *E. coli* ismi verilmiştir.<sup>18</sup>

1980'li yıllarda yapılan çalışmalarda, *E. coli* suşlarının çeşitli filogenetik gruplara ayrıldığı görülmüştür<sup>(19)</sup>. A, B1, B2, C, D ve E olarak adlandırılan altı ana filogenetik grup, ilk olarak Multi-Lokus Enzim Elektroforez (MLEE) yöntemi ile tespit edilmiştir.<sup>20</sup> Yapılan ileri filogenetik analizler sonrasında, *E. coli* suşları A, B1, B2 ve D olmak üzere dört ana filogenetik grupta yer almıştır. 2000 yılında, Clermont Tiplendirme olarak bilinen *E. coli* filogruplarının hızlı ve kolay bir şekilde tespit edilmesini sağlayan tripleks PZR yöntemini tanımlamışlardır.<sup>21</sup> Daha sonraki yıllarda, tüm genom sekans analiz ve "multi-lokus" sekans tiplendirme (MLST) verileri toplanarak, *E. coli* suşlarına ait "A, B1,

B2, C, D, E, F "diye adlandırılan 7 filogrup ve *Esheria* genusuna ait "*Esheria* clade I" olmak üzere sekiz filogrup tespit edilmiştir.<sup>22</sup> 2013'de, tripleks PZR metodu modifiye edilerek, dörtlü primerin kullanıldığı ve tüm filogrupların saptandığı kuadrupleks PZR yöntemini geliştirilmiştir.<sup>21</sup> Son yıllarda, filogrup G, yeni bir filogrup olarak tanımlanmıştır.<sup>23</sup>

Biyofilm oluşum 17. yüzyılda Antoni van Leeuwenhoek tarafından basit mikroskop kullanarak ilk kez tanımlanmıştır. Dişinin plağı sürüntüsünü inceleyerek mikrobiyal kümeleşme görmesine rağmen bu görüntünün biyofilm olduğu farkına varmamıştır. Costerton 1970'li yılların ilk döneminde, akarsularda yaşamını sürdüren bakterilerin neredeyse tamamının bir yüzeye yapışarak yaşam sürdüklerini ortaya koymuştur. Characklis 1973'de, su sistemlerindeki yüzeye kuvvetle tutunan mikrobiyal toplulukları inceleyerek dezenfektanlara karşı direnç geliştirdiklerini tespit etmiştir.<sup>24</sup> 1978'de Costerton ve arkadaşları, diş plakları ve ırmaklardaki mikrobiyal toplulukları için ilk defa 'biyofilm' terimini kullanmıştır. Bu toplulukların, ekolojik çevreden yararlandıklarını tespit etmişlerdir. Yüksek çözünürlükte ve ışık mikroskobundan çok daha büyük görüntü elde edilen elektron mikroskobunun kullanılmasıyla biyofilm yapısı daha da aydınlatılmıştır.<sup>25</sup>

## 2.2. Taksonomi

Enterobacteriaceae ailesi, Gram negatif bakterilerin en büyük ve en heterojen grubudur. Bu ailenin üyeleri sporsuz fakültatif anaerob bakterilerdir. En fazla glikoz olmak üzere birçok karbohidratı fermente eder, karmaşık bir antijenik yapı gösterir, çeşitli toksin ve virülans faktörleri üretirler.<sup>26-27</sup>

Enterobacteriaceae karmaşık bir taksonomiye sahip olup, yüzlerce tür bakteri tanımlanmıştır ve her gün yenileri eklenmektedir. 25 üzeri cins ve 110 üzeri tür tanımlanmıştır. *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Klebsiella*,

Serratia, Proteus ailenin en önemli cinsleridir. *E. coli*, Escherichia cinsinin en önemli üyesidir.<sup>27-28</sup> *E. coli*'nin taksonomisi;

**Alem:** Bacteria

**Bölüm:** Proteobacteria

**Sınıf:** Gamma Proteobacteria

**Takım:** Enterobacteriales

**Aile:** Enterobacteriaceae

**Genus:** *Escherichia*

**Tür:** *Escherichia coli* (*E. coli*) şeklindedir.

### 2.3. Morfoloji Özellikleri

*E. coli*, insan ve hayvan kalın bağırsağında en yaygın olara yaşayan normal flora bakterisidir. Gram negatif, 2-6 µm boyunda, 1-2mm eninde, besiyerinde hafif kabarık, 1-2 mm çapında, Smooth (S) tipi koloniler oluştururlar. Hareketli olup, peritrik kirpikler ile aktif hareket halindedirler. fimbrialar hücre ve yüzeylere adhezyonunu sağlayan morfolojilerinin ve antijenik özelliklerinin birbirinden farklı olması ile ayrılırlar. Kalın bağırsak dışında yaşayan ve mukoid (M) koloniler oluşturan kapsüllü suşları da vardır. Kapsüller mikroskopta boyanmamış bölge olarak görülürler.<sup>29, 30</sup>

### 2.4. Kültür ve Biyokimyasal Özellikleri

*E. coli*; aerop ve fakültatif anaerob olup 15–45 °C aralığında üreyebilen, 37 °C optimal üreme ısısı, 7.2 optimal üreme pH'sı olan bakterilerdir. Bu bakteriler dış etmenlere karşı oldukça dirençli olup 55 ° C'de bir saat, 60 ° C'de 20-30 dakika, oda ısısında ise uzun süre canlı kalabilmektedir. Dezenfektanlara duyarlı soğuğa ise dirençlidirler. Buyyon, jeloz, peptonlu su ve agarda kolaylıkla üreyebilmektedirler. Sıvı besiyerinde yoğun üreme sonucu homojen bulanıklık yaparlar. Agarda 1-2 mm çapında düzgün kenarlı, S tipi koloni yaparlar. Tekrar yapılan pasajlarda ise mat görünümlü, kaba-

granüler R tipi koloni oluştururlar. Kapsülü olan suşlar ise M koloniler oluşturabilirler. Genellikle idrar yolu infeksiyonlarından (İYE) izole edilen *E. coli*'lerin bazıları kanlı besiyerinde hemoliz oluşturabilirler.<sup>31-32</sup> *E. coli* bakterileri başta şeker olmak üzere karbonhidratları parçalayarak asit ve gaz oluştururlar. Laktoza olan etkisi sonucu gaz oluşturması ile Shigella türleri başta olmak üzere diğer barsak bakterilerinden ayıran önemli bir özelliktir. İçinde eozin metilen mavisi ve laktoz bulunan Eosin Metilen Blue (EMB) agarda ve içinde sodyum sülfid, laktoz, diyament füksin olan Endo agarda mavimsiyah yeşilimsi metalik röfle parlaklığı veren koloniler oluştururken, Salmonella-Shigella (SS) ve Mc Conkey agarda kırmızı, kanlı agarda ise gri koloniler oluştururlar.<sup>31-32</sup>

*E. coli*'nin biyokimyasal özellikleri IMVIC olarak bilinen (İndol oluşturma, Metil kırmızısı testi, Voges Proskauer testi, Sitratı kullanma) (+ + - -) olarak gösterilir. Bu bakteriler Katalaz pozitif, oksidaz negatif olup üreyi parçalama özellikleri yoktur. Çok az kökeni dışında hidrojen sülfür (H<sub>2</sub>S) oluşturamaz, fakat sisteinli besiyerinde az oranda H<sub>2</sub>S oluşturdukları tespit edilmiştir.<sup>31,33</sup>

*E. coli*'nin kirpik (H), somatik (O), fimbria (F) ve kapsül (K) antijenleri bulunmaktadır. H ve K antijenleri ile serotiplere, O antijenlerine göre de gruplara ayrılırlar.<sup>31-32</sup> O antijenleri alkol, ısı ve kaynatmaya karşı dayanıklıdırlar. Lipopolisakkarit yapısında ve formole dayanıksız en önemli hücre duvarı antijenidir. H antijenleri, hareketli kökenlerde bulunmaktadır. Formole karşı dirençli, 100°C ısıtılmaya ve alkole karşı ise duyarlıdırlar. K antijenleri, polisakkarit yapısında olup ısıya dayanıklıdırlar. 100°C ila 120°C'de bir iki saat kaynatmakla ortadan kaldırılabilirler.<sup>34</sup>

### **2.5. *E. coli* Patotipleri**

İntestinal *E. coli* suşları, fenotipik, epidemiyolojik ve klinik özellikleri ile virülans faktörlerine göre kategorilere ayrılmıştır. Bunlar;

- Enteropatojenik *E. coli* (EPEC),

- Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC),
- Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)
- Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)
- Vero- veya Shiga-Toksin Üreten / Enterohemorajik *E. coli* (VTEC veya STEC / EHEC)
- Diffuz Aderent *E. coli* 'dir (DAEC).<sup>35</sup>

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) suşları ise, sağlıklı hayvanların bağırsak florasında kommensal, fakültatif patojen özelliğine sahiptirler. Bunlar;

- Septisemik Patojenik *E. coli* (SEPEC)
- Neonatal Meningitis *E. coli* (NMEC)
- Uropatojenik *E. coli* (UPEC)
- Avian Patojenik *E. coli* (APEC).<sup>26,39</sup>

### **2.5.1. Intestinal *E. coli* Patotipleri**

#### **2.5.1.1. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)**

*E. coli*'nin ilk tanımlanan patotipidir. 1940-1950'de diyare etkeni olan *E. coli* suşlarını tanımlamak için "EPEC" terimi 1955'de ilk kez Neter tarafından kullanılmaya başlanmıştır. Bu patotip tüm hayvanlarda ve insanlarda diyareye neden olmaktadır.<sup>3,36</sup> Özellikle gelişmekte olan ülkelerde bebeklerde, kanlı ve sulu diyare ile karakterize en önemli patotiplerden biridir.<sup>37</sup> Bu suşlar toksin salgılamadan, hücre içi sinyalizasyonu bozarak diyareye sebep olurlar.<sup>38</sup>

EPEC suşları, barsak epitel hücrelerindeki mikrovilluslara kolonize olduktan sonra, barsak enterositlerini etkileyerek lezyon ve bozukluklara yol açarak bebeklerde diyareye sebep olmaktadır.<sup>36,38</sup> EPEC suşlarının önemli virulans faktörleri, plazmid tarafından kodlanan, EPEC Adezyon Faktörü (EAF) ve adezyonun son aşamasında görev alan intimindir.<sup>39</sup>

EPEC, tipik (tEPEC) ve atipik (aEPEC) olmak üzere iki kategoriye ayrılır.<sup>37</sup> Suşların tanımlanmasında eski yıllarda O ve H serotipleri esas alınırken; günümüzde LEE (Locus of Enterocyte Effacement) patojenite adasının varlığının saptanması ve Shiga toksin kodlayan genlerin yokluğu göz önünde bulundurulur.<sup>39</sup> Ayrıca, sınıflandırmada, EAF plazmidi üzerinde kodlanan ve bakteriler arası etkileşim ile mikrokoloni oluşumunda görevli bundle-forming pili (bfp)'de önemli rol oynar. LEE patojenite adası, EAF plazmidi ve bfp pilusları bulunan suşlar tEPEC olarak, LEE pozitif ve EAF, BFP negatif suşlar ise, aEPEC olarak sınıflandırılırlar.<sup>37</sup>

#### **2.5.1.2. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)**

ETEC suşları, insanlarda ve evcil hayvanlarda diyarenin önemli nedenlerindedir.<sup>35</sup> Hijyen koşullarının iyi uygulandığı gelişmiş ülkelere, hijyen şartlarının zayıf olduğu sıcak iklimli ülkelere giden turistlerde özellikle çocuklarda görülür. ETEC, insan veya hayvan dışkı ile kontamine olmuş su, süt ve gıdalarla bulaşarak, insan ve hayvanlarda sulu ishal, dehidratasyon ve barsak emiliminde azalmaya yol açar.<sup>36</sup>

ETEC suşları, barsak epitel hücrelerine zarar vermezler, fakat ısıya duyarlı termolabil enterotoksin (LT) veya ısıya dirençli termostabil enterotoksin (ST) üretirler. Bu toksinler de kolera toksini ile yakından ilişkilidirler.<sup>40</sup> Ayrıca konakçı barsak epiteline yapışmayı sağlayan fimbrial ve afimbrial adhezinler de önemli virulans faktörlerindedir.<sup>35</sup>

#### **2.5.1.3. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)**

EAEC, ilk kez 1987'de Nataro'nun 500'den daha fazla suşun yapışma paternlerini karşılaştırarak tanımlanmıştır.<sup>41</sup> İlk tanımlanmasından beri küresel olarak endemik ve epidemik diyarelerde tespit edilmiştir ve diyare hastalarına ait dışkılarda en yaygın bakteri patojeni olduğu bulunmuştur. EAEC endemik bölgelerde çocuklarda ve özellikle

HIV ile enfekte immün sistem hastalarında kalıcı diyareye nedeni olup, gezgin ishali için bir ajan olduğu belirlenmiştir.<sup>42</sup> Bağırsaklardaki epitel tipi-2 hücrelerine yapışarak tuğla görünümü alması en karakteristik özelliğidir. Bu adezyon özelliği, plazmid aracılıdır.<sup>43</sup> EAEC suşları, enteroagregatif stabil toksin (EAST) olarak adlandırılan bir toksin üretmektedirler.<sup>36</sup>

#### **2.5.1.4. Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC)**

EIEC suşları enterotoksin üretmezler ve özellikle çocukların bağırsak epitelinde hasara yol açarlar. Shigella türleri ile yakın ilişkilidirler ve bu türler gibi, insanlarda distal kalın bağırsağın epitel hücrelerine kolonize olup çoğalabilirler. Hastalarda şiddetli kramp tarzı karın ağrısı, hipertermi, kanlı ve dizanteri tarzı diyarelere neden olmaktadır.<sup>44</sup>

#### **2.5.1.5. Vero- veya Shiga-Toksin Üreten / Enterohemorajik *E. coli* (VTEC veya STEC / EHEC)**

*E. coli* izolatında Shiga toksini 1 veya 2 geninin (stx1 veya stx2) varlığı, verotoksin üreten *E. coli* (VTEC) veya Shiga toksini üreten *E. coli* (STEC) olarak nitelendirilir. 400 STEC serotipinin tespit edilmiş ve bir alt kümeleri insanlardaki hastalıkla ilişkilendirilmiştir.<sup>45</sup>

STEC, ilk olarak 1977'de tanımlanmıştır.<sup>39</sup> STEC hafif seyirde kanlı ishal ve hemolitik üretilik sendroma (HÜS) yol açmaktadır. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), STEC'in bir alt kümesidir ve başlangıçta shigellozdan klinik olarak farklı olan hemorajik kolitle (HC) ilişkisi ile tanımlanmıştır ve EPEC'den farklı fenotipik ve genotipik özelliklere sahiptir.<sup>46-47</sup> Bir *E. coli* suşunda sitotoksin üretimi ile birlikte, barsak epitelinde adhezyon ve bozukluğa sebep olan LEE (Locus of Enterocyte Effacement) patojenite adası mevcut ise EHEC adı verilir.<sup>36</sup> Bu suşların ana rezervuarı sığır bağırsak sistemi olup, insanlarda görülen ilk vakalar, az pişmiş hamburger tüketimiyle

ilişkilendirilmiştir. Daha sonra, sosis, pastörize edilmemiş süt, elma suyu, turp, kavun, marul ve Brüksel lahanası gibi gıda maddeleri kaynak olarak bildirilmiştir.<sup>3</sup>

#### **2.5.1.6. Diffuz Aderent *E. coli* 'dir (DAEC)**

DAEC Gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde görülen, çocuklarda hastalık yapma potansiyeli oldukça yüksek olan (süreklilik gösteren ishale) patotiptir.<sup>36</sup> *E. coli* suşlarının Hep-2 hücrelerinde diffüz adezyon (DA) özelliğinin saptanması ile tanımlanmaktadır.<sup>3</sup>

#### **2.5.2. Ekstraintestinal *E. coli* Patotipleri (ExPEC)**

Ekstraintestinal *E. coli* suşları; herhangi bir hastalığa neden olmadan, konakçı gastrointestinal sisteminde (GİS) kommensal yaşayabilirler. Konağın GİS'ndem diğer vücut kısımlarına geçtiğinde, kolonize olarak enfeksiyona neden olabilirler. Virülans genlerini; patojenite adaları kodlar.<sup>48-50</sup>

##### **2.5.2.1. Septisemik Patojenik *E. coli* (SEPEC)**

SEPEC, böbrek epitel hücrelerine yapışarak, istila etmektedir. Bu olay, kan dolaşımına girişi sağlamakta ve sepsis gelişimi açısından önemlidir. SEPEC suşu kan dolaşımına girdikten sonra uygun şartlar mevcutsa sepsis meydana getirir. Bu suşlarda fim H virülans geni bulunmakta ve bu gen tip 1 fimbriya üretiminden sorumludur. D mannoz varlığında hücrelere yapışarak istila eder.<sup>51</sup>

##### **2.5.2.2. Neonatal Meningitis *E. coli* (NMEC)**

NMEC, ciddi nörolojik sıkıntılara sebep olan yenidoğan menenjitin en sık görülen nedenidir. Yenidoğanlarda %20-40 oranında ölüme neden olmaktadır.<sup>3</sup> Bu suş, K1 kapsüler antijeni varlığı ile karakterizedir.<sup>52</sup> NMEC'de K1 kapsülü, NMEC'i kompleman aracılı ölümden, bakteriyofajlardan korumakta ve beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde hayatta kalmasını kolaylaştırmakta ve fagositozdan kaçışını sağlamaktadır.<sup>53</sup>



### **2.5.2.3. Uropatojenik *E. coli* (UPEC)**

UPEC, üriner sistem enfeksiyonlarından, İYE %90'ından sorumlu başlıca etken olarak kabul edilmektedir. Dünya çapında önemli mortalite ve morbidite ile sonuçlanan toplum (%70-95) ve hastane (%50) İYE nedenidir.<sup>54</sup> UPEC, sistit, bakteriüri, piyelonefrit ve prostatit dahil İYE'lerin en önemli nedenidir.<sup>55</sup>

UPEC suşları, PAI-I (70 kb) ve PAI-II (190 kb) olmak üzere iki patojenite adası içermektedirler.<sup>39</sup> Bu suşların patogeneğinde rol oynayan virülans faktörü çeşitli adezinler (fimbrialar), hemolizin, aerobaktin ve sitotoksik nekrotizan faktör 1 (CNF-1) bulunur. UPEC suşlarında en yaygın olarak tespit edilen O serogrupları; O1, O2, O4, O6, O7, 27 O15, O16, O18ac, O75'dir. Bu suşlar, K antijenine (K1, K2, K3, K5, K12 ve K13) sınırlı sayıda sahiptirler.<sup>35</sup> Kapsüler polisakkarit üretiminden kpsMT II geni, bakterinin invazyonunda fimH geni, idrar yoluna yayılmayı ve orda kalıcılığı sağlamaktan ise CNF-1 geni sorumludur.<sup>56</sup>

### **2.5.2.4. Avian Patojenik *E. coli* (APEC)**

APEC, insanlarda alveolitis, perikarditis, septisemi ve selülit gibi enfeksiyonlara, kanatlı hayvanlarda ise koliseptisemi, kolibasillozis, poliserozit, ovaritis, yumurta kesesi yangısı, artrit, sinovitis gibi enfeksiyonlara neden olmaktadır.<sup>57</sup>

APEC suşları, O1, O2 ve O78 serogruplarına ve sınırlı sayıda klona aittirler. Virülans faktörleri; adezinler (F1, P ve kıvrık fimbrialar), aerobaktin demir kazanım sistemi, K1 kapsülü, sıcaklığa duyarlı hemaglutinin (TSH), serum direnci ve çeşitli toksinlerdir.<sup>39</sup>

## **2.6. *E. coli* Virülans Faktörleri**

Virülans, mikroorganizmanın hastalık oluşturma yeteneğini ifade eden terimdir. Doğumdan itibaren ilk birkaç saat içerisinde insan gastrointestinal sistemi, *E. coli* bakterisi ile kolonize olmaya başlamaktadır. Bakteri-konak uzun yıllar karşılıklı fayda

sağlayarak "kommensal" yaşam sürdürmektedirler. Fakat kommensal *E. coli* izolatları dışında patojenik formlar da kolonizasyon oluşturabilmektedirler ve enfeksiyonlara sebep olabilirler.<sup>4</sup> Patojenik olan *E. coli* suşları, insanlarda yol açtıkları enfeksiyon tipine ve konakçı türüne göre değişiklik göstermekte olup, çeşitli enfeksiyonların patogeneğinde bu suşların virulans faktörleri önemli yer tutmaktadır.<sup>39</sup> Yani enfeksiyon gelişebilmesi için konağın immün sisteminde bir sorun olmaması, yapısal- işlevsel bir bozukluk bulunmaması, bakteri miktarı ve virulans faktörleri önemlidir. Bağırsak florasında bulunan *E. coli* patojen değildir. Virülans faktörleri patojen ve patojen olmayan suşları belirlemektedir.<sup>58</sup>

*E. coli*'ye ait virulans faktörleri, bakteri genomu veya plazmidlerde yer alan bazı genler tarafından kodlanır. Patojenik *E. coli* suşların, patojen olmayan suşlardan ayırt edilmesi bazı virulans faktörlerinin tespiti ile mümkün olmaktadır. Virulans faktörleri, patojenik *E. coli*'nin konağı enfekte etmesinde, kolonizasyonunda ve konağın immün sistemi ile mücadele etmesinde önemli rol oynarlar.<sup>3,9</sup> Özellikle ExPEC enfeksiyonların oluşmasında, mukozal yüzeye adezyonu, epitel hücre katmanını geçme, komplementin bakterisidal etkisine direnç gösterme, fagositozdan kaçma ve canlı kalarak çoğalma yeteneğini sürdürme önemli yer tutmaktadır. Aynı zamanda, virulans faktörlerinin sentezlenmesi daimî değildir, sadece çevreden ve/veya konakçıdan çeşitli sinyalleri aldıkları zaman sentez olmaktadır.<sup>59-60</sup>

Patojenik *E. coli* virülans faktörleri ile başarılı olmasının yanı sıra, anti bakteriyel ilaçlara direnç göstermesi nedeni ile, tedavide başarısızlıklara sebep olmaktadır.<sup>61</sup> Organizmanın bu yüksek direnç yeteneği sayesinde, tedavi seçiminde de zorluklar önemli günümüz sorunlarından olmuştur.<sup>62</sup>

*E. coli* suşlarının önemli virülans faktörlerine sahiptirler. Bunlar;

- Adezinler (Tip1 fimbria, S fimbria, P fimbria, F1C fimbria,)

- Toksinler (hemolizin, sitotoksik nekrorizan faktör),
- Sideroforlar (aerobaktin sistemleri),
- Konak hücrelerine salınan proteinlerdir,
- Polisakkarit kılıflar (lipopolisakkarit ve kapsüller),
- Proteazlar,
- Serum dirençlilik proteinleri,
- İnvazinler.<sup>39</sup>

Virulans faktörlerin birçoğu "patojenite adaları" (PAI) denilen kromozoma entegre olan ekstrakromozomal virülans gen kümeleri tarafından kodlanmaktadır.<sup>63</sup>

### 2.6.1. Adezinler

En önemli ve en yaygın görülen virulans faktörlerinden olan adezinler genelde “pili” ve “fimbria” diye adlandırılan farklı boyutlarda saç benzeri yüzey yapıları ile birlikte bulunmaktadırlar.<sup>64</sup> Adezinler, hücresel iletim yollarını direk etkileyerek, bakteriye ait ürünleri konakçı hücreye iletme, bakterinin yüzeye tutunma ve invazyonu ile etkisini göstermektedir.<sup>65</sup> ExPEC’ e ait adezinler: Tip 1 (F1) Fimbria (fim), P fimbria/piyelonefritle ilişkili pilus (pap), S fimbria veya sialik asid spesifik fimbria (sfa), bundle-forming pilus (bfp), afimbrial adezinler (afa), Dr fimbria (dra), F1C fimbria (foc), intimin, sıcaklık duyarlı hemaglutinin (tsh), F9 fimbria, Ygi fimbria, Yad fimbria, Pix fimbria, FdeC adezin, curli fiber (csg), Tos A adezin ve putatif adezinlerdir.<sup>66-67</sup>

**Tip 1 (F1) fimbrialar,** D-mannoz varlığında eritrositleri aglütine edemeyen fimbrialardır. Bu fimbrialar, *E. coli* suşlarının çoğunda bulunmaktadırlar.<sup>35</sup> Tip 1 (F1) fimbrialar, kromozom üzerinde bulunan fim geni aracılığıyla kodlanan, koloni ve biyofilm oluşturma, inflamasyon, kolon mukozası, vajina mukozası ve üriner sistem epitel hücrelerine adezyon ve hücre içi canlılığın devamında rol alan adezinlerdir.<sup>68</sup> Tip 1 (F1) fimbrialar, fimA, fimC, fimE, fimF, fimH ve fimI diye dokuz farklı genden oluşan

bir operon tarafından kodlanmaktadır. Üroepitele yapışma en çok fim H aracılığı ile gerçekleşmektedir.<sup>69-70</sup> Tip 1 (F1) fimbrialar, yaygın sıklıkta ve alt üriner enfeksiyonlarında görülmektedirler.<sup>71</sup>

**P fimbrialar**, D-mannoz varlığında eritrositleri aglütine edebilen fimbriyalardır.<sup>35</sup> P fimbrialar, pap (piyelonefrit ile ilişkili pilus) geni aracılığıyla kodlanan en önemli adezinlerden olup, pyelonefritis olgularının patogeneğinde önemli role sahip, özellikle böbrek transplantasyonu olan hastalarda daha yaygın olarak bulunan bir virülans faktörüdür.<sup>68</sup> P fimbria, papA ve papE, papF ve papG'den oluşan bir heteropolimer olduğu gösterilmiştir.<sup>66</sup> P fimbrialar Gal-Gal reseptörleri ile üriner sistem epitel hücrelerine bağlanırlar.<sup>72</sup>

**S fimbrialar**, *E. coli* suşlarının beyin mikrovasküler endotel hücrelerine adezyonu ve invazyonunda rol oynayan adezinlerdir.<sup>73</sup> Bu fimbrialar, neonatal sepsis, meningitis sebepli patojenik *E. coli* suşlarında görülmekle birlikte, UPEC suşlarında da mevcuttur.<sup>3,9</sup> *E. coli* kromozomu üzerine lokalize sfa geni tarafından kodlanmaktadır.<sup>74</sup>

**Bundle-Forming Pilus (bfp)**, sınıf I EPEC suşları tarafından üretilen fimbrial adhezinlerdir. Bu fimbria, demet oluşturur ve bakterinin reversibl otoagregasyonu ile birlikte, hücre kültüründe HEp-2 hücrelerine adhezyonu sağlar. Bfp, bir outer membran proteini olan EspA ile birlikte, EPEC suşlarının konak intestinal epitel hücrelerine adhezyonunun ilk aşamasını gerçekleştirir.<sup>75</sup> Tipik EPEC suşları, EAF olarak adlandırılan bir plazmide sahiptirler. Bfp, bu plazmitte bulunan BfpA geni tarafından kodlanır. Atipik EPEC suşları ise bu plazmidi taşımadıklarından dolayı bfp geni yoktur ve daha az patojeniteye sahiptirler.<sup>3,76</sup>

**Afimbrial adezinler (afa)**, pili bulundurmeyen, bazı *E. coli* suşlarının hücre kültürlerine diffuz adezyonunu ve koloni oluşumunu sağlayan ve afa genleri tarafından

kodlanan kronik ve tekrarlayan sistite neden olan polipeptid yapılarıdır.<sup>59,77</sup> AfaA, afaE, afaD, afaB ve afaC genleri, AfaE-1 adezin gen kümesini oluşturmaktadırlar.<sup>78</sup>

**Dr adezinler (dra)**, dra genleri tarafından kodlanırlar. Dr adezinleri, *E. coli* suşlarının kompleman regülatörle etkileşim sonucu epitelyal hücreleri invazyon yaparak sistite yol açmaktadır.<sup>79</sup>

**FIC Fimbria (foc)**, tip 1 fimbria'ya benzer. Mesane ile böbrek endotelial hücreleri, böbrek distal tübüleri üzerinde bulunan b-GalNac1, 4b-Gal rezidülerine bağlanarak İYE ilerlemesinde etkilidirler. Bu adezin, 6 genden oluşmuş foc gen kümesi tarafından kodlanmaktadır.<sup>66</sup>

**İntimin (eae)**, en önemli virulans faktörlerinden olup, LEE5 patojenite adasında bulunan eae geni tarafından kodlanan, bir outer membran proteinidir.<sup>39,75</sup> EPEC ve EHEC patotipleri tarafından üretilir ve konak hücrelerde attaching (bağlanma) ve effacing (silinme) lezyonlarına yol açmaktadırlar. Barsak mukozasına adezyon ve dejenerasyonların şekillenmesi ile tipik lezyonlar meydana gelmektedir.<sup>39,60</sup>

### 2.6.2. Toksinler

**Endotoksin (lipopolisakkarit)**, *E. coli* suşlarının hepsinde bulunan, patojenitede önemli rol oynayan virulans faktörüdür.<sup>80</sup> Lipopolisakkarit (LPS), Lipid A (toksijeniteden sorumlu) ve O antijeni (antijeniteden sorumlu) olan polisakkarid komponentlerini içermektedir.<sup>81</sup> Bu toksinler, konakçıda çeşitli hasarlara yol açar ve bakteri hücresi parçalandığı zaman açığa çıkarak inflamatuvar yanıtı neden olur. İmmun sistemi ve pıhtılaşma sistemleri etkilediğinden dolayı, canlılarda şiddetli toksik reaksiyonlara yol açar. Ateş, hemoraji, kan pıhtılaşması, lökopeni ve septik şok şeklinde vücutta bozukluklar meydana getirmektedir.<sup>59,75</sup>

**Nörotoksinler**, bazı *E. coli* serotipleri (O139:K82) ve hemolitik *E. coli* suşları tarafından üretilen, lipoprotein yapıda, ısıya duyarlı toksinlerdir. Aynı zamanda, farelerin

merkezi sinir sisteminde bozukluklara ve domuzlarda enterotoksemiye sebep olabilmektedir.<sup>75</sup>

**Termolabil enterotoksin (Labil Toksin) (LT)**, 60°C’de 15 dk içinde inaktive olabilen yüksek moleküllü bir toksindir. LT-I ve LT-II diye 2 ana gruba ayrılır. Bunlar arasında immünolojik çapraz reaksiyon yoktur. LT-I, hem insan hem de hayvan enfeksiyonları ile ilişkilendirilirken, LT-II’nin enfeksiyonlarla spesifik bir ilişkisi yoktur ve LT-II genellikle hayvansal orijinli *E. coli* suşları tarafından, çok nadir olarak da insan orijinli *E. coli* suşları tarafından salgılanır.<sup>35</sup>

**Termostabil enterotoksin (Stabil Toksin) (ST)**, 100°C’de 15 dk içinde inaktive olabilen düşük moleküllü bir toksindir. Yapısal ve etki mekanizmalarına göre ST-I ve ST-II diye 2 ana gruba ayrılır. ST-I, sadece ETEC suşlarınınca değil aynı zamanda *Yersinia enterocolitica* ve non-O1 *Vibrio cholerae* gibi diğer bakterilerce de salgılanır. Bu grupta, ST-Ia (STp) domuzlardan, STIb (STh) insanlardan izole edilmiş olan iki alt grup vardır. ST-II, büyük çoğunlukta domuzlardan izole edilen ETEC suşları başta olmak üzere, insanlardan izole edilen bazı ETEC’lerde de salgılandığı tespit edilmiştir.<sup>39</sup>

**Shiga / Vero Toksin (Stx / VT)**, *E. coli* suşlarından bazıları, sitotoksik etki gösteren *Shigella* spp.’lerin ürettiği toksin salgırlar ve Shigatoksine (Shiga like) ile verotoksin olarak adlandırılır. Bu toksinler, *E. coli* O157:H7 serotipi tarafından salgılanır ve HÜS, ishal, hemorajik kolitis etkenidir.<sup>82-83</sup>

Shigatoksin, immünolojik olarak çapraz reaksiyon göstermeyen Stx1 ve Stx2 olmak üzere iki alt grup içerir. Bunlar, enzimatik açıdan aktif bir A ve bir pentamerik B alt ünitesinden oluşmaktadırlar. A alt ünitesi, ökaryot hücrelerde protein sentezini bloke ederken, pentamerik B alt ünitesi ise, fonksiyonel reseptörlere bağlanmaya aracılık eder. Stx1 toksini, *Shigella dysenteriae* serotip 1 tarafından üretilen Shiga toksini ile aynıdır veya sadece bir aminoasit farklılık gösterir. Stx2 toksini ise, Stx1’e göre 1000 kat daha

fazla toksik etkiye sahiptir. Stx'ler, ayrıca, kromozoma entegre olmuş lambdoid fajlar tarafından kodlanırlar.<sup>75</sup>

**Sitotoksik Nekrotizan Faktör (CNF)**, patojenik *E. coli* suşlarının bazıları tarafından üretilen, hücrelerde nekroza yol açan, 110-115 kDa molekül ağırlığında toksinlerdir. Bu toksinlerin, CNF1 ve CNF2 olmak üzere immunolojik olarak birbiriyle ilişkili olan iki tipi bulunmaktadır. CNF1, kromozom tarafından kodlanmasına, CNF2 plazmitte bulunan genler tarafından kodlanır.<sup>9,75</sup>

CNF-1, UPEC'lerde tanımlanan en önemli virulans faktörlerindedir. Genellikle ekstraintestinal enfeksiyonlarda (meningitis, septisemi) tespit edilmiştir. Bu toksinin varlığı, üriner sistem enfeksiyonunu sebep olmakla birlikte, konak hücrede bozukluklara ve hücre lizisine yol açmaktadır.<sup>9,39</sup> CNF2 varlığı olan *E. coli* suşları ise, kuzu ve buzağı enteriti ile septisemi etkenidir.<sup>75</sup>

**Hemolizinler**, sitotoksik protein olup eritrositleri lizise uğratırlar. *E. coli* suşları alfa (hlyA), beta, gama ve enterohemolizin (Ehly), silotizin A (clyA) olmak üzere çeşitli hemolizin üretirler.<sup>84</sup> Ekstraintestinal *E. coli* suşları tarafından salgılanan hlyA, tip I sekresyon sistemi tarafından salgılanır, kromozom tarafından kodlanan protein yapılı bir ekzotoksindir.<sup>3,75</sup> Genellikle UPEC patotipi tarafından üretilen hlyA, eritrosit ve lenfositlerin lizisine neden olmaktadır. Lizis oluşumundan meydana gelen demir, bakterilerde siderofor sistemi aracılığıyla değerlendirilmektedir. Bu toksin tarafından meydana getirilen hemoliz, koyun kanlı agar da yüzeyinde görülen kolonileri çevreleyen beta ( $\beta$ ) hemolitik zonların varlığı ile tespit edilir.<sup>9,35</sup>

### 2.6.3. Patojenite Adaları

Birçok virulans faktör, "patojenite adaları" (PAI) denilen farklı genom bölgelerinde entegre olmuş ekstrakromozomal virulans gen kümeleri tarafından kodlanmaktadır.<sup>63</sup>

İlk olarak Jorg Hacker ve arkadaşları tarafından tanımlanmış olana PAI, patojenik organizmalarda bulunurken, fekal *E. coli* genomunda bulunmayan, 30 Kb' dan büyük DNA bölgeleri olarak tanımlanmıştır.<sup>85-86</sup> Bu bölgeler, tRNA genleri ile ilişkili olup tüm genomun G+C içeriğinden farklı bir G+C içeriğine ve kodona sahiptir.<sup>85</sup>

#### **2.6.4. Aerobaktin ve Siderofor**

Tüm hücreler gibi *E. coli*'nin de konak hücrelerde üremesi için gerekli olan demiri, oksijen taşınma ve depolamada, DNA sentezinde, elektron taşınmasında ve peroksit metabolizmasında kullanmaktadır.<sup>87</sup> Fakat, dokularda serbest demir (Fe) miktarı az olduğu için, *E. coli*, ihtiyacı olan demiri konaktan, aerobaktin, enterobaktin ve bakteriosin gibi sideroforlar aracılığıyla almakta ve bakteriyel sitozolde depolamaktadır.<sup>88</sup>

Siderofor aerobaktin, iki lizin ve bir sitrat molekülünden oluşmuş, *E. coli* için en etkili demir elde etme sistemidir. Bu sistem iucA, iucB, iucC, iucD ve iutA genleri tarafından kodlanmaktadır. iuc geni demir alımını kodlarken, iut geni de demir alımı için gerekli reseptördür.<sup>89</sup> *E. coli*, fenolat siderofor enterobaktin ve hidrosomat siderofor aerobaktin olmak üzere iki tip iki tip siderofor sentezler.<sup>90</sup> Aerobaktin sideroforları, plasmid tarafından kodlanır ve EIEC, APEC patotiplerinde bulunurlarken, fenolat siderofor enterobaktin ise, EPEC ve ETEC patotipleri tarafından üretilmektedirler.<sup>39</sup>

#### **2.6.5. Serum Direnci**

Serumda bulunan komplement sistemi aktivitesinin bakterisidal etkisine karşı, *E. coli*'lerin gösterdikleri direnç, virulans özellikleri arasında yer almaktadır.<sup>9</sup> Bu dirençten bakteri yüzeyinde bulunan K1 kapsülü veya dış membran proteinleri (OmpA, TraT ve iss proteinleri) yapılar sorumludur. Bu yapılar, membran atak kompleksine ve komplement komponentleri karşı savunma ile bakterisidal etkiyi önlerler.<sup>3,59</sup>



### 2.6.6. Kolisin

Kolisinler, *E. coli* tarafından sentezlenen bir bakteriyosin olup, Shigella ve Salmonella gibi *E. coli*'nin yakın ilişkili olduğu türler üzerinde de öldürücü etkisi bulunan maddelerdir. Bu maddeler, bakteri hücre zarında porlar açarak, endonükleaz etki ile kromozomal DNA'yı parçalarlar ve lipopolisakkarit, protein ve mürein sentezini inhibe ederler.<sup>91</sup> Ayrıca DNA/RNA hasarı oluşturma, aktif transportun engelleme ve glikojen sentezinin inhibe etme şeklinde etki mekanizmaları bulunmaktadır.<sup>92</sup>

Kolisinler, plazmitte (Col plazmidi) bulunan genler tarafından kodlanırlar ve kolisin üretmeyen *E. coli* ve diğer bazı bakteriler için öldürücü etkiye sahiptirler.<sup>39</sup> A ile V arasında tanımlanmış yirmiden fazla kolisin tipi bulunmaktadır.<sup>9</sup>

### 1.7. *E. coli*'nin Filogenetik Gruplandırması

*E. coli* suşlarının genetik altyapıya sahip oluşunun açıklanması, ilk 1980 yılında açıklanmış ve ilerleyen yıllarda bu alt yapının çok kapsamlı olduğu doğrulanmıştır. Bu araştırmalara göre, *E. coli* suşları, çeşitli filogenetik sınıflara ayrılmıştır.<sup>19</sup> Filogenetik gruplandırma için multilokus enzim elektroforezi ve ribotipleme gibi karmaşık ve zaman alıcı referans teknikler bulunmaktadır.<sup>93-96</sup> Clermont ve arkadaşları, chuA, yjaA ve TspE4C2 kullanarak basit ve hızlı bir tripleks PZR yöntem tanımlamıştır. chuA heme transportundan sorumlu gendir. yjaA *E. coli* K12'nin tüm genom dizisinden sonra bir gendir ve görevi hala bilinmemektedir. TspE4C2 DNA fragmentidir.<sup>95,97</sup>

İlk filogenetik sınıflandırmada, A, B1, B2, C, D ve E diye isimlendirilen altı grup tespit edilmiştir.<sup>20</sup> Daha sonraki yıllarda yapılan yeni analiz yöntemleri ile, A, B1, B2 ve D olmak üzere dört ana filogenetik grupta belirlenmiş ve sınıflandırılmayan *E. coli* suşları filogrup E'ye dahil edilmiştir.<sup>97</sup> Bakterilerin filogenetiği ve virülans özelliği arasında bir ilişki olduğu tespit edilmiş olup, virülan suşların genellikle B2 ve daha az bir kısmı D grubuna ait iken, kommensal suşların grup A ve B1'e ait olduğu bulunmuştur.<sup>94-</sup>

<sup>95</sup> A ve B1 filogrupları birkaç virülans gene ve daha yüksek direnç modeline sahiptir. B2 ve D filogrupları ise birçok patojenite adası, biyofilm oluşumu, adezyon faktörleri ve yüksek yüzey hidrofobikliği gibi çeşitli virülans faktörlerine de sahiptir.<sup>98</sup>

Clermont tiplendirme yöntemine göre (Tablo 2.1),

- *chuA* geni, filogrup B2 ve D *E. coli* suşlarında olmasına rağmen; filogrup A ve B1 *E. coli* suşlarında bulunmaz.
- *yjaA* geni, filogrup B2 suşlarında olmasına rağmen; filogrup D suşlarında bulunmaz.
- TSPE4.C2, filogrup B1 suşlarında olmasına rağmen; filogrup A, B2 ve D suşlarında bulunmaz.<sup>97</sup>

**Tablo 2.1.** Clermont tiplendirme yöntemine göre filogenetik sınıflandırma

<i>GRUP</i>	<i>GEN</i>		
	<i>chuA</i>	<i>yjaA</i>	<i>TspE.C2</i>
A	-	±	-
B1	-	±	+
B2	+	+	±
D	+	-	±

### 2.8. *E. coli*'de Antimikrobiyal Direnç

Antimikrobiyal direnç; bakterinin antimikrobiyal etkenin, bakterisit veya bakteriyostatik etkisine karşı etkilenmemesi demektir. Bu direnç gelişimi, gereksiz fazla ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı sonucu ortaya çıkmaktadır. Fakat ilaçların henüz kullanılmadığı yerlerde de bu ilaçlara karşı dirençli bakteriler olduğu tespit edilmiştir. Bu direncin nedeni, bakterilerin olumsuz çevre şartlarında, bir savunma mekanizması olarak direnç oluşturma yetenekleridir. Aynı zamanda antimikrobiyal direnç her geçen gün artmasının yanı sıra çoklu ilaç direnci de yaygınlaşmaktadır.<sup>99-100</sup>

Antibiyotik direncinin yayılmasının temel mekanizması, genetik materyalin yatay transferi olup üç ana mekanizması tanımlanmıştır. Antibiyotik direnç genleri, farklı konjugasyon (bakteriyel sex) ile mobil genetik elemanların bitişik iki bakteri arasında birleştirilmiş pili yapılarıyla transferi, transformasyon (serbest DNA alımı) veya transdüksiyon (faj aracılı), bakteriyofajla enfekte olmuş bakteriyel bakteriyofaja duyarlı bir bakteri arasında bakteriyel DNA'nın transferi ile gerçekleşebilir. Antimikrobiyal direnç, doğal ve kazanılmış direnç olmak üzere iki şekildedir.

### **2.8.1. Doğal Direnç**

Doğal direnç, bakteri kromozomunun yapısında doğal bulunan genler ile meydana gelen bir direnç türüdür. Bu direnç türü; antimikrobiyal ilacın bakterinin etkinliğini ortadan kaldırmak için etki edeceği yapıyı bakterinin taşımadığı olması veya antimikrobiyal ilacın sahip olduğu bir özellikten dolayı, bakteri üzerinde hedeflenen etkiyi gösterememesi sonucu ortaya çıkar. Bazı Gr (-) bakterilerde var olan AmpC  $\beta$ -laktamaz ve bazı çoklu ilaç dirençli eflüks sistemi doğal direnç mekanizmasına örnektir.<sup>101</sup>

### **2.8.2. Kazanılmış Direnç**

Kazanılmış direnç, bakteriye ait olan genetik özellik mutasyonu, plazmit, transpozon, bakteriyofaj ve diğer hareketli genetik elemanlar (HGE) ile yabancı bir direnç geninin bakteriye girmesi sonucu oluşur<sup>(102)</sup>. Bu dirence farklı mekanizmalar sebep olabilir. Bunlar;

- Florokinolonlara direnç; ilaç hedefinde değişiklik, plazmid aracılı direnç aktarımı ve hücrede ilaç birikiminin azalması (membran permeabilitede azalma, aktif pompalama ile antibiyotiğin hücre dışına atılması) ile olmaktadır. DNA giraz alt birimleri olan gyrA, gyrB ve Topoizomeraz IV subuniteleri olan parC ve parE genlerindeki mutasyonla İlaç hedefinde değişiklik olabilmektedir.<sup>103-104</sup>

- Aminoglikozidlere karşı direnç, ribozomal subunitenin modifikasyonu, aminoglikozid molekülünün enzimatik nötralizasyonu yolu ile olabilmektedir.<sup>105</sup>
- Son zamanlarda bildiri artan kolistin direnci genellikle kromozomal kaynaklı olup, özgül iki bileşenli düzenleyici sistemlerini kodlayan genlerde mutasyonlara neden olan mekanizmalardan kaynaklanmaktadır.<sup>106</sup>

Kazanılmış direnç kromozom veya kromozom harici organellerde oluşmaktadır.<sup>102</sup>

Kromozomal direnç, bakteri kromozomunda kalıcı değişiklikler sonucu oluşan mutasyonlara bağlı gerçekleşir. Kimyasal, sıcaklık veya fiziksel değişimler sonucu ortaya çıkabilir. Bu değişimler sonucunda bakterinin antimikrobiyal ajana karşı permeabilitesi azalır ve ilaç hücre içinde istenen bölgeyi etkisi altına alamaz. Streptomisin, eritromisin ve aminoglikozidlere karşı oluşan direnç bu dirence örnektir.<sup>107</sup>

Ekstrakromozomal direnç, plasmid, transpozon ve integron adı verilen HGE ile oluşmaktadır. HGE, konak ile genomun fiziksel açıdan hareket edebilme kapasitesine sahip olmasından dolayı bakteri popülasyonunda oldukça fazla bulunmaktadır.<sup>108</sup> Bunlar bakterinin genomunun değişimine, genomun boyutunda ve patojenitesinde farklılıklara neden olarak yol açarlar.<sup>109</sup> HGE'ler iki şekilde görülebilir. Birincisi bakteriden diğer bakteriye antibiyotik direncinin aktaran konjugatif direnç plazmidleri ve transpozonları, diğeri ise hücre içinde bir genetik bölgeden diğerine hareket eden elemanlardır.<sup>110</sup> Bunlar transpozonlar, plazmidler, integronlar, genomik adalar, bakteriyofajlar, integratif ve konjugatif elementler, insersiyon sekanslarıdır. HGE yatay gen transferi, çoklu ilaç direncinin yayılması ve rekombinasyona sebep olur.<sup>109</sup>

## **2.9. Yatay Gen Aktarımında Rol Oynayan Hareketli Elemanlar**

### **2.9.1. Plazmidler**

Plazmidler, bakteri kromozomuna göre daha küçük olup, boyutları 150 kilo baza kadar değişebilen, bakterilerde yaygın olarak bulunan ekstrakromozomal genetik elemanlardır. *Borrelia* ve *Streptomyces*'lerin bazı türleri hariç sirküler yapıdadırlar. Plazmitler bakteri lehine olan direnç genleri taşırlar. Bunun yanında yanında  $Hg^{+2}$  gibi metal iyonlarına, klorheksidin veya kuaterner amonyum bileşikleri gibi bazı antiseptik ile dezenfektanlara ve UV ışınlarına karşı direnç genleri taşıyabilirler. Direnç plazmitlerinin birçoğu konjugatif ve kendi transferini teşvik etmek için gerekli olan fonksiyonları kodlarlar. Az bir kısmı ise hücrede bulunan konjugatif bir plazmit tarafından desteklendiklerinde mobilize olabilirler.<sup>111</sup>

### **2.9.2. Transpozonlar**

Bir hücre geninde bir yerden başka bir yere hızlı hareket edebilen sıçrayıcı gen olarak adlandırılan elemanlara transpozon denir. Yapı farklılığı, sahip oldukları direnç genleri, genetik ilişkileri, transpozisyon mekanizmalarına göre farklılık göstermektedirler.<sup>110</sup> Bu hareketli elemanlar yaygın olarak *Enterobacteriaceae* ailesindeki dirençten sorumlu olup, konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyon yoluyla aktarılırlar ve kromozomda bulunan genlerden hızlıdırlar.<sup>112</sup> Konjugatif transpozonlar plazmit özelliğine sahip olup, endojen plazmitlerin bir mikroorganizmadan diğerine transfer edilmelerini sağlamaktadırlar.<sup>113</sup>

### **2.9.3. İntegronlar**

İntegronlar, ilk olarak 1980'lerin sonunda tanımlanmış olan antimikrobiyal ilaç direnç gen kasetlerini içeren bu yüzden direnç determinantlarının tespiti, yayılımı ve rekombinasyonunda rol oynayan mobil genetik elemanlardır. Genellikle Gram (-) bakteriler arasında antibiyotik direncinin yayılmasında rol almaktadırlar.<sup>114</sup> Hareketsiz

olup, hareketli olan transpozon ve plazmitlerin üzerine yerleşmişlerdir.<sup>115</sup> İntegron içeren bakteri genomlarının belli bir kısmının veya tamamının sekansı ile, integras genlerinin veya integronların genomun yaklaşık %10-17' sini oluşturdukları yapılan biyoinformatik analizlerle bildirilmiştir. Tanımlanan integronların çoğu, insan klinik izolatlarında tespit edilmiş olmasının yanısıra, su ve toprak gibi çevresel örneklerde de bulunabilirler.<sup>116</sup>

### **2.9.3.1. İntegronların Yapısı**

İntegronlar üç elementten oluşur. Bunlar;

- İntegron içinde bölgeye özgü rekombinasyon için gerekli olan bir tirozin rekombinazı (integraz, intI geni tarafından kodlanan) kodlayan gen,
- Integral tarafından tanınan bitişik rekombinasyon bölgesi (attI),
- İntegronda bulunan gen kasetlerinin verimli transkripsiyonu ve ekspresyonu için gerekli entegrasyon bölgesinin yukarısında yer alan promotor bölgedir.<sup>117</sup>

Promotor tüm integron sınıflarının bir parçası olduğu bilinmesine rağmen, varlığı ve aktivitesi hepsi için gösterilmemiştir.<sup>117</sup>

Gen kasetleri, tek ve çoğunlukla promotorsüz bir gen ve bir rekombinasyon bölgesinden (attC) oluşan küçük mobil elementlerdir. Gen kasetleri, integrona entegre edildiğinde lineer, eksizyondan sonra veya bölgeye özgü rekombinasyondan önce, serbestken dairesel formdadır. attC bölgesi, integras tarafından tanınır ve bu bölge ile integronun attI bölgesi arasında rekombinasyon gerçekleşir, böylece integron yapısına gen kaseti eklenmiş olur.<sup>118</sup> Bilinen 194 gen kaseti tanımlanmıştır, bu gen kasetlerinin aminoglikozitlere, βlaktamlara, kinolonlara, kloramfenikol ve trimetoprim'e direnç genleri taşımaktadır.<sup>119</sup>

### **2.9.3.2. İntegronların Sınıflandırılması**

Bugüne kadar, intI genindeki dizilerdeki farklılıklarda göre integronlar integron sınıf 1- 4 sınıflar olarak sınıflandırılmıştır. Sınıf 1-3 integronlar çoklu dirençli olarak

bilinen ve bu rekombinasyon bölgeleri ile in vitro eksizyon ve entegrasyon ile gen kasetlerini alma yeteneğine sahip integronlardır. Çalışmalar genellikle sınıf 1 integronları Gram (-) mikroorganizmalar üzerinde yürütülmüştür.<sup>120</sup> Bunlardan farklı olarak sınıf 4 integron, ilk olarak *Vibrio cholerae*'da tanımlanmış antimikrobiyal direnç ve bakteriyal genom evriminde rol oynadığı sınırlı kaynaklarla da olsa gösterilmiştir<sup>(121)</sup>. Diğer integron sınıfları da antibiyotik direnci gen kasetleri içerebilir ancak küresel yaygınlıkları fazla değildir.<sup>122</sup>

**Sınıf 1 İntegronlar:** Sınıf 1 integronlar 5'korunmuş bölge (5'CS) ve 3' korunmuş bölge (3'CS) ile gen kasetlerinin yerleşmiş olduğu variable region (VR) olarak adlandırılan değişken bir bölge içerirler.<sup>123</sup> 5'CS bölgesi temel olarak 3 yapı içerir. Bu yapılar tirozin rekombinaz enzimini kodlayan integras gen (*intI*), *attI* olarak bilinen rekombinasyon bölgesi ve insert olan gen veya gen kasetlerinin ekspresyonunda rol alan bir promotor bölgeden (P) oluşur. 3'CS bölgesi ise *qacEΔ1* olarak adlandırılan defektif kuaterner amonyum direnç geni ve sulfonamidlere dirençten sorumlu olan *sulI* geni içerirler. Bu iki korunmuş bölge arasında bulunan değişken bölge ise çeşitli antibiyotik direnç kasetlerinin girdiği 59 baz çiftlik *attC* gen bölgesi içerir. Bu bölge rekombinasyonun olduğu bölgedir.<sup>124</sup>

Sınıf 1 integronlar Tn21 gibi transpozonlar üzerinde tespit edilmiştir ve prototip olarak bilinirler. Sınıf 1 integronlar tek başına hareket edemez, Tn21 integras veya *intI1* integrasın aracılık ettiği bölgeye özgü rekombinasyonlar ile konjugatif plazmit ya da transpozon gibi hareketli elemanlar üzerinde tür içi ya da türler arası genetik materyali transfer edebilir.<sup>125</sup> Sınıf 1 integronlar *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* ve *Vibrio* gibi birçok gram negatif bakterilerde tespit edilmiştir.<sup>125</sup>

**Sınıf 2 İntegronlar:** Sınıf 2 integronlar genelde çoğalmayan Tn7 transpozon ailesi ile ilişkilidir.<sup>126</sup> Bu aile 14 kb'lık bakteri transpozonu olup, hücrede spesifik bir bölge bulunduğu zaman transpozisyon mekanizmasını aktive ederler.<sup>127</sup> Tn7 transpozonları hücreye transpoze olacakları zaman konjugatif plazmitleri tercih ederler ve antibiyotik direnç genlerini taşırlar.<sup>128</sup> Tn7'nin integronu ve sınıf 1 integron benzer ve üç tane direnç gen kaseti taşırlar. Bunlar streptomisin/spektinomisin direncinden sorumlu aminoglikozit adenil transferaz (aadA1), streptotrisin direncinden sorumlu streptotrisin asetil transferaz (sat2) ve trimetoprim direncinden sorumlu dihidrofolat redüktaz (dfrA1) gen kasetleridir.<sup>126</sup> Sınıf 2 integronlar *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Escherichia*, *Morganella*, *Salmonella* ve *Shigella*'da bulunmuştur.<sup>125</sup>

**Sınıf 3 İntegronlar:** Sınıf 3 integronlar Tn402 transpozonlar tarafından yakalanırlar ve transpozona ters oryantasyonda yerleşirler. Sınıf 3 integraz geni (intI3) sınıf 1 integraz genine (intI1) % 60 oranında benzemektedir. Bu integron sınıfı integron sınıfları arasında en az bulunmalarına rağmen hızla gelişmekte, yeni türlere aktarılmakta ve yeni direnç kasetleri kazanmaktadırlar.<sup>129</sup> Sıklıkla *Escherichia*, *Klebsiella*, *Serratia* ve çevresel *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes xylosoxidans*, *Enterobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, ve *Citrobacter* türlerinde tespit edilmişlerdir.<sup>130</sup>

**Sınıf 4 İntegronlar:** Sınıf 4 integronlar sadece antibiyotik direnci ve patojenite için değil aynı zamanda adaptasyon için gerekli genleri kodlayan çok sayıda gen kasetini barındıran integron sınıfı olup, ilk kez *Vibrio* izolatlarında tespit edilmiştir.<sup>131</sup> *Vibrio* türlerinde trimetoprim ve sulfametoksazol direncinden sorumludurlar.<sup>129</sup> Bu integronlar, sadece *Vibrionaceae*, *Shewanella*, *Xanthomonas*, *Pseudomonas* ve diğer proteobakterilerde tanımlanmış olup hakkında bilgiler sınırlıdır.<sup>132</sup> Kloramfenikol ve fosfomisinlere karşı direnç gen kasetleri taşıdıkları bilinmektedir.<sup>133</sup>



## 2.10. Beta –Laktam Antibiyotiklerde Direnç Mekanizmaları

*E. coli* etkenli infeksiyonların tedavisinde kullanılan beta-laktam grubu antibiyotikler (penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler ve monobaktamlar) hücre duvar sentez sırasında transpeptidasyonu katalize eden penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) bağlanarak hücre duvar sentezini inhibe etmesi ile bakteriyi lizise uğrattırır.<sup>134</sup> Bu direnç üç şekildedir.<sup>135</sup>

- PBP'nin beta-laktam afinitesinin azalması, PBP sayısında azalma ve Beta-laktamlara düşük affiniteli yeni PBP'lerin sentezi sonucu, PBP'lerde oluşan farklılıklarla antibiyotiğin hedefine bağlanmasının engellenmesi,
- Dış membran proteinlerinde oluşan değişikliklerle ve aktif pompa (efflux) sistemlerinin ilacın hedefine etkin konsantrasyonda ulaşamaması.<sup>135</sup>
- Bakterilerin antibiyotikleri inaktive edecek beta-laktamaz enzimlerini sentezlemeleri ile ilacın inaktive edilmesidir. Bu en sık gözlenen direnç şeklidir.<sup>136</sup>

### 2.10.1. Beta-Laktamazlar

Bakteriler kromozom, plazmidler veya transpozonlar aracılığıyla sentezlenen beta – laktamaz enzimi, Beta-laktam grubu antibiyotiklerin beta-laktam halkasının siklik amid bağını parçalayarak ilaçları etkisiz duruma getirirler. Bu enzim 1929'da Fleming tarafından bulunmuş olup, ampisilin ve diğer penisilinlere karşı direnç geliştirmesi ile 1960'lı yıllarda hastane infeksiyonlarında artışa yol açmıştır.<sup>137</sup> Günümüzde birçok bakteri (Gr - , Gr +, mikobakteri) türlerinde moleküler yapı, inhibitör duyarlılığı, substrat profili ve hidrolitik etkinlik gibi özellikler açısından birçok yeni beta-laktamaz tanımlanmış olup, bunların 300'den fazlası genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimidir.<sup>138</sup> Bu enzimler bakteriyel kaynaklı olup, Gr (-) bakterilerde periplazmik

boşlukta bulunan, başta Enterobacteriaceae'ler olmak üzere birçok patojen için ciddi direnç mekanizmalarındandır.<sup>139</sup>

Beta-laktamaz enzimlerindeki artışla birlikte sınıflandırılmaları ve adlandırılmaları gerekli görülmüştür. Buna göre;

- Etkiledikleri substratlara göre: CARB (karbenisilin), IMP (imipenem), OXA (oksasilin)
- Biyokimyasal özelliklerine göre: SHV (sülfidril hiper varyabl, aktif bölgesinde serin bulunur)
- İlk izole edildiği etkene göre: AER (Aeromonas), PSR (Pseudomonas)
- İlk izole edildiği suşlara göre: P99
- İlk izole edildiği hasta adına göre: TEM (Temoniera)
- İlk izole edildiği eyalete göre: OHIO 7) İlk izole edildiği hastaneye göre: MIR (Miriau Hospital) diye adlandırılmışlardır.<sup>140</sup>

#### **2.10.1.1. Genişlemiş Spektrumlu $\beta$ -Laktamazlar (GSBL)**

GSBL'ler, oksiminino-sefalosporinleri benzilpenisiline eşit ya da %10 daha fazla hidroliz edebilen, aktif bölgelerinde serin içeren, plazmidlerle kodlanan, sulbaktam, klavulanik asit ya da tazobaktam gibi inhibitörler ile inhibe olan enzimlerdir. GSBL üreten bakteriler, karboksipenisilinlere aminopenisilinlere ve asilüreidopenisilinlere dirençliken, sefamisin ile karbapenemlere hassastır. Aynı zamanda dış membrandaki porin protein kaybı ile bunlara da direnç gelişmektedir.<sup>141</sup> Global açıdan ciddi anlamda bir halk sağlığı sorunu olmaya başlayan GSBL, ilk defa 1980'li yıllarda Federal Almanya Cumhuriyeti'nde izole edilmiştir *E. coli* familyasında farklı türlerde GSBL enzimleri,  $\beta$  laktam grubu antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucu tanımlanmıştır. CTX-M, TEM, SHV ve OXA grubu enzimler sık izole edilen GSBL'dirler.<sup>142-143</sup>

TEM (Hasta Adı: Temoneira)  $\beta$ -Laktamazlar; ilk tanımlanan  $\beta$ -Laktamazlar enzimidir. İsmi Temoneria isimli Yunan bir hastadan ilk izole edilmesi sonucu, ilk üç harfinden almıştır. TEM yaklaşık 200 farklı varyasyona sahip olup, bunların yarısından fazlası GSBLdir.<sup>144</sup> Penisilin ve sefaloridin ile sefalotine karşı dirençlidir. Enterobacteriaceae üyelerinden, en çok *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Proteus mirabilis* olmak üzere diğer üyelerden de izole edilmektedir. Ayrıca *H. influenzae* ve *N. gonorrhoeae*'nin ampisilin ve penisilin direncindeki artışın TEM ile alakalı olduğu bulunmuştur.<sup>145-146</sup>

CTX-M (Cefotaximase Munich)  $\beta$ -Laktamazlar; 1989'da ilk kez Japonya'da bir *E. coli* izolatında tanımlanmıştır. Plazmid aracılı beta -laktamazlara ait bu enzim, amino, karboksi ve üreidopenisilinler ile dar spektrumlu sefalosporinlere karşı oldukça dirençli olan bu enzimin 124 değişik varyasyona sahiptir.<sup>144</sup> *E. coli* ve *K. pneumoniae* en sık olmak üzere, tifo harici Salmonella türleri, *V. cholerae* ve *Shigella* spp. gibi birçok Enterobacteriaceae üyesinde saptanmışlardır.<sup>147-148</sup> Hastane enfeksiyonları ile yakın ilişki içinde olan CTX-M, seftriakson ile sefotaksim toplumda fazla kullanımı ile ortaya çıktığı düşünülmekte olup, toplum kökenli GSBL üreten üriner sistem enfeksiyonlarına neden olan *E. coli* izolatlarında sık görülmektedir. CTX-M-2, CTX-M-3 ve CTX-M-14 en yaygın olanlarıdır.<sup>147-148</sup>

SHV (sulphydryl variable)  $\beta$ -Laktamazlar; İlk kez *K. pneumoniae*'den tanımlanan SHV-1 enzimi, geniş spektrumlu penisilinlere karşı dirençten sorumludur.<sup>136</sup> 1983 yılında Almanya'da *K. ozaena*'den ise SHV-1'den farklılaşan SHV-2 tanımlanmıştır. Bunlar özellikle dar spektrumlu sefalosporinlere, penisilinlere ve ampisiline (%20) karşı direnç geliştirildiği bildirilmiştir. Bu enzimlerin 143 farklı varyasyonu vardır.<sup>149</sup> SHV en çok sırasıyla *K. pneumoniae*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da bulunmaktadır.<sup>147,150</sup>

OXA (Oxacillin)  $\beta$ -Laktamazlar; En sık *K. pneumoniae*'de görülmek üzere *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve *E. coli* gibi diğer gram-negatif bakterilerde de

saptanmaktadır.<sup>147-148</sup> OXA enziminin dar spektrumlu olanları OXA 1 ile OXA-10 arasındadır ve substrat olarak oksasilin ve kloksasilini kullanırlar. Birinci kuşak sefalosporinler ve ampisiline direnç, oksiiiminocefalosporinlere ise zayıf direnç geliştirirler. Seftazidime yüksek düzeyde dirence neden olması diğer GSBL'lerden ayıran özelliğidir. İlk geniş spektrumlu OXA enzimi ülkemizde izole edilen OXA-11'dir.<sup>151</sup>

### **2.10.1.2. GSBL Tanı Yöntemleri**

GSBL üretiminin belirlenmesi, antibiyotik seçimi ve hastane direnç durumu hakkında bilgi sahibi olmak, enfeksiyon kontrol önlemlerinin alınması ve uygun tedavinin başlanması açısından önemlidir.<sup>152</sup>

GSBL fenotipik ve genotipik yöntemler ile tespit edilirler. Fenotipik yöntemler, tarama ve doğrulama testleri, genotipik yöntemler ise moleküler analizlerdir.

Fenotipik Yöntemler: Tarama yöntemi olarak disk difüzyon, dilüsyon, çift disk sinerji testi, klavulanat içeren agar veya üç boyutlu test yöntemleri, doğrulama yöntemi olarak ise sefalosporin/klavulanik asit kombinasyon disk, sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılmaktadır.

Disk difüzyon yöntemini, CLSI izole edilen *E. coli*, *P.mirabilis* ve Klebsiella türleri için tarama yöntemidir. Buna göre seftazidim, sefotaksim, aztreonam, seftriakson veya sefpodoksim antibiyotiklerine göre değerlendirilmektedir.<sup>153</sup>

Dilüsyon yöntemini, CLSI izole edilen *E. coli* ve Klebsiella türleri için dilüsyon yöntemi önermektedir. Sefotaksim, aztreonam, seftazidim veya seftriaksonun 1 µg/ml, sefpodoksim için se 4 µg/ml'lik konsantrasyonlar kullanılmaktadır. Testin duyarlılığı için birden fazla antibiyotik tercih edilmektedir. Bu yöntemle seftriakson ya da sefotaksim MİK değeri  $\geq 2$  µg/ml, sefpodoksim MİK değeri ise 8 µg/ml olması GSBL üretimini düşündürür ve doğrulanması fenotipik testler ile yapılmalıdır.<sup>154</sup>

GSBL tarama testinde değerlendirmede inhibisyon zon çapları ve MIK değerleri

Tablo 2.2’de verilmiştir.<sup>155</sup>

**Tablo 2.2.** GSBL saptanmasında tarama testi olarak nerilen MIK ve inhibisyon zon çapları

Antibiyotik	Zon çapları (mm)		MIK değerleri ( $\mu\text{g}/\text{mm}$ )	
	Duyarlı suş	GSBL üreten suş	Duyarlı suş	GSBL üreten suş
<i>Sefotaksim 30 <math>\mu\text{g}</math></i>	$\geq 23$	$\leq 27$	$\leq 8$	$\geq 2$
<i>Sefpodoksim 10 <math>\mu\text{g}</math></i>	$\geq 21$	$\leq 17$	$\leq 8$	$\geq 2$
<i>Seftazidim 30 <math>\mu\text{g}</math></i>	$\geq 18$	$\leq 22$	$\leq 8$	$\geq 2$
<i>Seftriakson 30 <math>\mu\text{g}</math></i>	$\geq 21$	$\leq 25$	$\leq 8$	$\geq 2$
<i>Aztreonam 30 <math>\mu\text{g}</math></i>	$\geq 22$	$\leq 27$	$\leq 8$	$\geq 2$

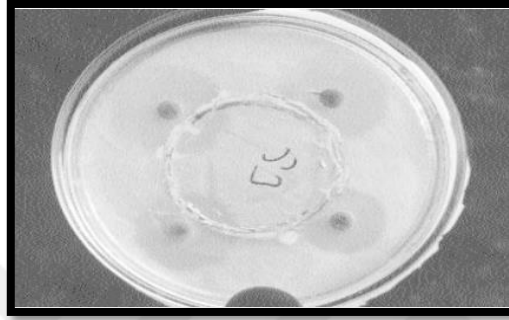
ift disk sinerji testinde, 0.5 McFarland yoğunluğunda ayarlanan bakteri sspansiyonunun Mueller-Hinton Agar (MHA) plağının merkezine amoksisilin-klavulanik asit (AMC 20/10  $\mu\text{g}$ ) yerleştirildikten sonra diskler arası 20 mm uzaklık olacak şekilde seftriakson (CRO), seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM) ya da sefpodoksim (CPD) diskleri yerleştirilir. 37°C’de 18-24 saatlik inkübasyon sonunda AMC diskiye doğru, sefalosporin ve ATM diski çevresindeki inhibisyon zonunun genişlemesi ya da aralarında bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL varlığını gösterir (şekil 2.1).<sup>156</sup>



**şekil 2.1.** ift disk sinerji testi

Klavulanat içeren agar testlerinde, 4 µg/ml klavulanik asit agara ilave edilerek geniş spektrumlu sefalosporin içeren disklerin inhibisyon zonu arttırılır.<sup>156</sup>

Üç boyutlu testte, agar üzerine açılan bir yarık içine bakteri süspansiyonu doldurulur ve açılan bu yarıkların 3 mm uzağına diskler yerleştirilir. Zon çaplarının daralması veya bozulması yarığa doğru yönde olursa GSBL olarak değerlendirilir (Şekil 2.2).<sup>157</sup>



**Şekil 2.2.** Üç boyutlu GSBL test

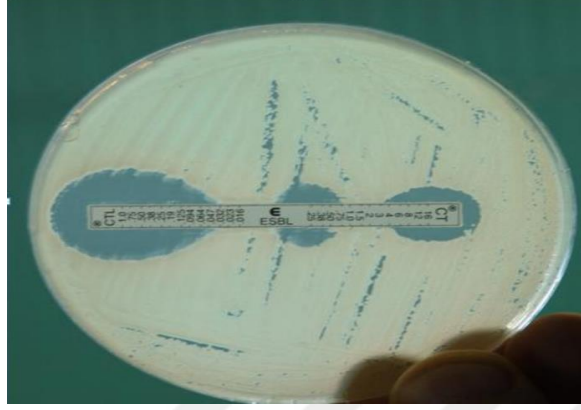
Kombine disk difüzyon yönteminde; Seftazidim ve Sefotaksim (30 µg ) diskleri ile bu disklerin etken maddelerine klavulanik asit (10 µg ) ilave edilmiş antibiyotik disklerinin besiyerinde 37°C’de 18 saat inkübasyonu sonrası, klavulanik asit ilave edilen disklerin zon çapının, klavulanik asit ilave edilmeyenlerden  $\geq 5$  mm daha büyük olması GSBL olduğunu göstermektedir.<sup>158</sup>

Sıvı mikrodilüsyon yönteminde; Sefotaksim ve Seftazidiminin tek başına MİK değerleri ile bunlara klavulanik asit ilavesi ile elde edilen MİK değeri tespit edilir. Klavulanik asit ile elde edilen MİK değerlerinin 8 kat az olması GSBL varlığını gösterir.<sup>154-155</sup>

Ticari yöntemler:

E-test yöntemi, bir tarafına seftazidim veya sefotaksim diğer tarafına ise bu antibiyotiğe klavulanik asit eklenmesi ile hazırlanmış stripler besiyerine yerleştirilip inkübasyona bırakılma esasına dayanmaktadır. İnkübasyon sonrası elips şeklinde oluşan

zon çapının stripi kestiği yer MİK değeridir. Klavulanik asit eklenmiş tarafın zon çapının diğer tarafa göre 8 kat az olması GSBL üretimini gösterir (şekil 3). GSBL retimi için bu yöntem hem tarama hem de doğrulama yapmış olur.<sup>154</sup>



**şekil 2.3.** GSBL için E-test

Otomatize sistemler; Phoenix ve VITEK 2 sistemleri bakteri izolasyonunda kullanılabildiği gibi, mikro-scan panel testler aracılığıyla GSBL varlığını da tespit edilebilmektedir. Bu sistemler; sefalosporin, penisilin ve aztreonam dirençlerini belirleyerek GSBL varlığını tespit etmek için çeşitli algoritmaları işletirler.<sup>159</sup>

Moleküler Yöntemler; Fenotipik yöntemlere göre hem özgüllüğü fazla olması hem de GSBL tiplerini ve üretilen enzimın belirlenmesi açısından önemli yöntemlerdir.<sup>160</sup>

İzoelektrik nokta tayini; sadece enzimın ailesini belirlemeye yönelik bilgi veren bu yöntem bakteri DNA'sının poliakrilamid jelde yürütülerek,  $\beta$ -laktamazların izoelektrik noktalarında odaklanmaları esasına dayanmaktadır.<sup>145</sup>

Polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR); GSBL belirlenmesi için en kolay ve yaygın bir moleküler yöntem olup, Beta-laktamaz geni için özgül oligonükleotidlerin seçilerek PZR tekniği ile beta-laktamazın tespiti esasına dayanır.<sup>161</sup>

PZR- RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) yönteminde; restriksiyon endonükleazlar yardımıyla amplifiye PZR rnlerinin kesilerek elektroforez

ile gen ürünlerinin ayrımı gerçekleşmektedir. Beta-laktamaz içindeki nokta mutasyonu saptamaya dayanır.<sup>161</sup>

PZR- single strand conformational polymorphism analysis (PZR-SSCP); Özgül lokalizasyonlardaki tek baz mutasyonlarını saptar. Bu yöntemle alt gruplar saptanabilir.<sup>161</sup>

Ligaz zincir reaksiyonu (LCR); hedef DNA denatüre edilmesi sonucu, biotinle işaretli oligonükleotitler ile bağlanarak farklı pozisyondaki mutasyonlar saptanır.

Nükleotid sekanslamada; enzimin kesin olarak saptanması için dizi analizi çıkarılır ve böylece farklı enzim tipleri ve mutasyonlar saptanabilir.<sup>162</sup>

Pulsed-field jel elektroforez (PFGE) yönteminde; suşlar arasındaki klonal ilişki belirlenmektedir. İncelenecek bakterinin agaroz içine gömülerek izole edilen genomik DNA'sının çeşitli restrüksiyon endonükleaz enzimi ile kesilmesi sonucu oluşan profillerin yorumlanması esasına dayanır. PFGE yönteminde elektroforez işlemi sırasında farklı yönlerde elektrik akımı verilerek özellikle büyük DNA moleküllerinin analizi gerçekleştirilir.<sup>163</sup>

### **2.11. *E. coli* Sekans Tipi (ST) 131**

Bakterinin eşeysiz üreme ile neslini devam ettirmesi bakteriyel klon olarak adlandırılır. Uluslararası çoklu ilaca dirençli yüksek riskli klonların özelliği ise küresel dağılım, çeşitli antimikrobiyal direnç belirleyicileriyle bir ilişki, konakçıda 6 aydan daha uzun süre kalarak kolonileşmesi, konakçılar arasında etkili bulaşma yeteneği, artmış patojenite ve uygunluk, tekrarlayan ve şiddetli enfeksiyonlara neden olabilme yetenekleridir.<sup>164</sup> Son zamanlarda birçok ülkede tespit izole edilen *E. coli* ST131, kısa bir süre önceye kadar bilinmeyen bir klon olup günümüzde ekstraintestinal patojenik *E. coli* izolatları arasında önemli bir klon haline gelmiştir. ST131 klonu taşıyan izolatların CTX-



M-15 geni gibi GSBL ürettiği ve en sık florokinolonlar olmak üzere birçok antibiyotiklere direnç göstermektedirler.<sup>165</sup>

*E. coli* ST131 klonunun hızla tüm dünyada artışının önlenmesi, yeni direnç genleri geliştirip geliştirmedeğinin tespiti, etkili ampirik antibiyotik tedavi seçeneklerinin belirlenmesi ve antibiyotik direnç kontrolünde yeni stratejilerin geliştirilmesi için bu klon ile ilgili çalışmaların önemi vurgulanmaktadır. Ayrıca çok ilaca direncin global yayılımından dolayı, önemli halk sağlığı sorunu olan bu klonunun rezervuarlarının saptanması, direnç aktarım mekanizmaları ve risk faktörlerinin anlaşılabilmesi açısından da araştırılması son derece önem arz etmektedir.<sup>166</sup>

### **2.11.1. Epidemiyoloji**

ST131 klonu, 2008'de, Fransa, Hindistan, İspanya, İsviçre, Kanada, Lübnan, Kuveyt, Kore ve Portekiz 'de aynı anda tanımlanan CTX-M-15 üreten *E. coli* izolatlarında MLST ile sekans tiplendirmesi sonucu tespit edilmiştir.<sup>167-168</sup> Birleşik Krallık'ta A'dan E'ye tanımlanan izolatların da ST131 klon taşıdığı tespit edilmiştir.<sup>169</sup> Aynı anda dünyanın farklı bölgelerinde üç kıtada görülmesi araştırmacılar tarafından, kontamine gıda ve sulardan kaynaklanabileceğini seyahat aracılığıyla yayılabileceğini göstermiştir.<sup>167-170</sup>

Daha sonraki yıllarda CTX-M-15 üreten ST131 izolatları yıllara göre sırasıyla İtalya, Türkiye, Hırvatistan, Japonya, Amerika Birleşik Devletleri ve Norveç'de tespit edilmiştir.<sup>171-176</sup> Kanada'da idrar izolatlarından elde edilen GSBL üretmeyen florokinolon dirençli *E. coli* suşlarında, Paris'te ise sağlıklı gönüllülerin dışkılarında yapılan bir çalışmada ise CTX-M-15 üretmeyen ST131 izolatları izole edilmiştir.<sup>177-178</sup>

Yeni Zelanda'da CTX-M-15 üreten *E. coli* 'nin sebep olduğu İYE üzerine yapılan bir çalışmada, Hint Yarımadası'na, Afrika kıtasına ve Orta Doğu'ya son üç ay içerisinde yapılan seyahatin risk oluşturduğu bildirilmiştir. Aynı bilim insanlarının yaptığı başka bir

çalışmada ise CTXM-15 üreten *E. coli* ST131 klonunun yüksek enfeksiyon riski olduğu tekrar bildirmişlerdir.<sup>174,179</sup>

GSBL üreten *E. coli* izolatlarında ST131 klonunun (özellikle de CTX-M-15 üretenlerde) ilişkili olduğu düşünülse de GSBL negatif fakat florokinolon, aminoglikozid ve trimetoprim-sülfametoksazole dirençli olabildiği bildirilmiştir.<sup>180</sup> ST131 klon oranı, GSBL (+) izolatlarda % 50–60 iken florokinolon dirençli izolatlarda %70–80 olarak tespit edilmiştir.<sup>181</sup>

ST131, İYE, bakteriyemi, pnömoni, karın içi ve yumuşak doku -yara enfeksiyonu, menenjit, osteoartiküler enfeksiyonlar, miyozit gibi çeşitli ekstraintestinal enfeksiyon etkeni olabilmektedir.<sup>170</sup> Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, ST131'in nozokomiyal enfeksiyonlarla güçlü bir şekilde ilişkili olduğu belirlenmiş ve yoğun bakım ünitelerinde büyük nozokomiyal salgın sebebi olduğu bildirilmiştir.<sup>182-183</sup>

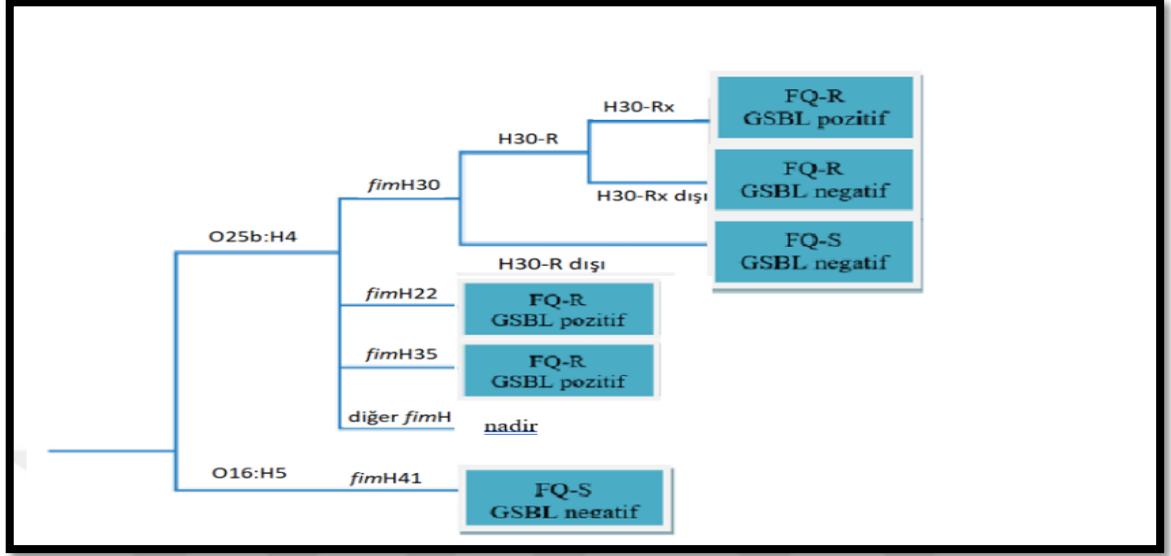
ST131 enfeksiyonları yaşlı popülasyonunda daha sık görülmekte olup, huzur evleri gibi uzun süreli bakım yapılan ve bu popülasyonun yoğun olduğu kurumlarda yüksek bir prevalansa sahiptir.<sup>183</sup> Ayrıca bu izolatlar evcil ve diğer hayvanlar, besin kaynakları ve çevre gibi insan dışı kaynaklarda da izole edilmiş olup;<sup>180</sup> insanlar arasında, hayvanlara ve çevreye göre daha yüksek saptanmıştır.<sup>184</sup>

ST131 yayılımının temel nedeni insan kaynaklı olup, bu klonun insanlara başarılı bir şekilde adapte olduğu çalışmalar ile ispatlanmıştır. Ancak, ST 131'in insan dışı konaklar arasında yaygınlığıyla ilgili küresel çalışmalara ihtiyaç vardır.<sup>185</sup>

### **2.11.2. Filogenetik Grup ve Serotip**

*E. coli* ST131, filogenetik B2 grubunda yer almaktadır. Bu suşların en yaygın alt klonu H30'dur. H30 alt klonu ilk olarak 2000 yılında ortaya çıkmış olup hızlı bir şekilde yayılım göstermiştir. Yakın genetik benzerlik gösteren H30 izolatının, fimH30 geni taşıyan tek bir atadan kaynaklandığını ortaya koymuştur. Bu alt klonu aynı zamanda tip

1 fimbrial adezin geni fimH'nin H30 varyantını (fimH30) içerir. H30 alt klonu, MLST ve PFGE ile fimH, gyrA ve parC genlerinin alt tiplendirmesi sonucu tanımlanmıştır.<sup>186</sup> H30 içinde, CTX-M-15 taşıyan H30 suşlar H30-Rx ve GSBL-negatif H30'dan ayrılmış H30-Rx dışı ayrı bir alt soy oluşmuştur<sup>(186)</sup>. ST131 popülasyon yapısı Şekil 2.4'de gösterilmiştir.<sup>186</sup>



**Şekil 2.4.** *E. coli* ST131'in H30 alt klonlarının ve diğer alt klonlarının popülasyon yapısı

*E. coli* ST131 izolatlarında virülans faktör genlerinden fimH (tip 1 fimbriae), fyuA (yersiniabactin reseptörü), iha (adezin siderofor reseptörü), iutA (aerobactin reseptörü), iucD (aerobactin), kpsM II (grup 2 kapsül sentezi), mal X (patojenite adası belirteci), ompT (dış membran reseptörü), sat (salgılanmış ototransporter toksin), tratT 'nin (serum direnci), usp (üropatojene spesifik protein) aynı olduğu bulunmuştur.<sup>164</sup>

ST131 alt klonlarının (H30-R ve H30-Rx) virülans profillerini incelendiği bir çalışmada, H30-Rx alt klonunun en yüksek agregatif virülans skoruna sahip olduğunu bildirmişlerdir. H30 ve H30-Rx soylarının H30 dışı ST131 izolatlarına göre daha farklı virülans profillerine sahip olduklarını göstermişlerdir.<sup>187</sup>

## **2.12. Biyofilm**

Biyofilmler, bir yüzeyle geri dönüşümsüz olarak ilişkili olan ve esas olarak polisakkarit materyalden oluşan bir matris içine alınmış bir mikrobiyal hücre topluluğunu temsil eder.<sup>188</sup> Biyofilmler, bakterileri mevcut besin maddelerini etkin bir şekilde kullanacak ve antimikrobiyal ajanlara, antikorlara ve beyaz kan hücrelerine erişimi engelleyecek şekilde konumlandırarak onlara bir hayatta kalma stratejisi sağlar.<sup>189</sup> Ayrıca beta laktamazlar gibi çok sayıda antibiyotik inaktive edici enzimi barındırdıkları ve dolayısıyla bir antimikrobiyal direnç adası oluşturdukları bulunmuştur.<sup>190</sup>

### **2.12.1. Biyofilmin Tarihçesi**

Biyofilm, 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek'un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları ilk olarak göstermesi ile ortaya çıkmıştır<sup>(191)</sup>. Caracklis 1973'de, su sistemlerindeki mikroorganizma topluluğunu incelerken, mikroorganizmaların yüzeye kuvvetle tutunduklarını ve klor gibi dezenfektanlara karşı çok dirençli olduklarını da göstermiştir.<sup>192</sup> Marshall ise 1976 'da bakteri yüzeyine çok ince ekstraselüler polimer fibrillerin sabitlendiğini göstermiştir.<sup>193</sup> 1978 ve sonrasında biyofilmler, yaşamları için gerekli besinlerin olduğu ekosistemde, bakterilerin bir çoğu biyofilm oluşturan matrikste geliştiğine ve bu bakterilerin farklılık gösterdiğine dair ilk bilgiler yayınlanmıştır.<sup>191</sup> Okyanusun derinlikleri ve derin yeraltı suları hariç biyofilmler tüm doğal ekosistemlerde tespit edilmiştir.<sup>194</sup>

### **2.12.2. Biyofilmin Yapısı**

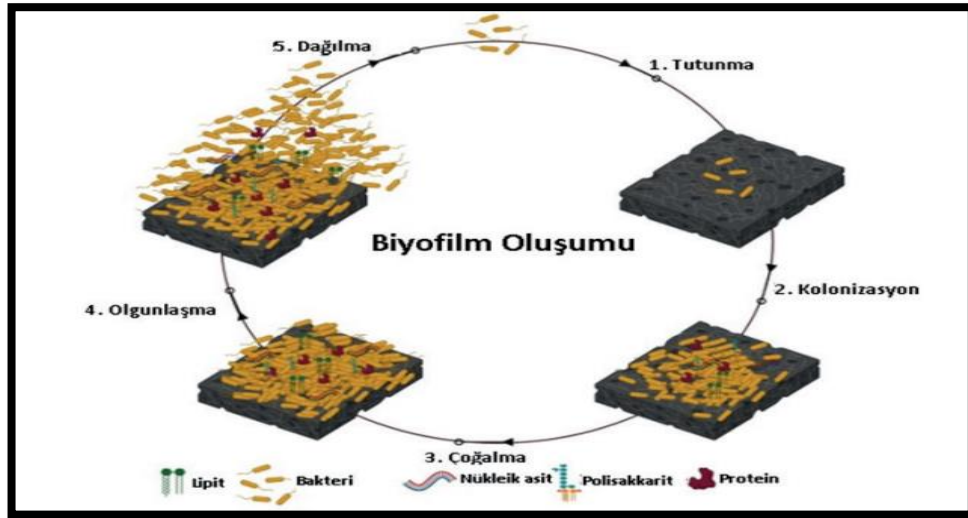
Biyofilm kütlelerinin %73- %97'lik kısmını su, matriks içinde %1-2 globuler glikoproteinler ve diğer proteinler, %1-2 lipit, nükleik asit ve fosfolipit bulunmaktadır. Mikroorganizmaların fizyolojik özelliklerine, çeşidine, ortam pH'sına ile sıcaklık gibi fiziksel özelliklerine göre bu oranlar değişebilmektedir.<sup>195</sup>

Biyofilm hücrelerinin yüzeye kuvvetli bir şekilde tutunmasını ekstraselüler matriks sağlamaktadır. Yüzeye tutunan mikroorganizmalar çoğalarak mikrokolonileri ve mikrokoloniler de büyüyüp genişleyerek makrokolonileri oluşturmaktadır. Makrokolonilerin bir araya gelmesiyle biyofilm tabakası oluşmaktadır.<sup>196</sup>

### **2.12.3. Biyofilm Oluşum Aşamaları**

Biyofilm yapısı bakterinin yüzeye tutunmasıyla başlamaktadır. Bakterilerin yüzeye kesin olarak temasa geçtiklerini garantiye almaları, yüzeye tutunması için gereklidir. Bakteriler, alıcı-verici sistemleri ile çevresel faktörleri algılamaları ile fenotipik farklılık gösterirler. Tutunmadan sonrası farklılıklar ise, bakterilerin yoğunluğunu belirlemesini sağlayan “quorum sensing” sistemleri ile gerçekleşir. Bu sistemde, yüzeye tutunan bakteriler “ben buradayım” sinyali verir ve daha fazla bakterinin yüzeye tutunmasıyla bu sinyalin yoğunluğu artmaktadır. Bu sayede bakteriler hücreler arası düşük molekül ağırlığına sahip habercilerle haberleşip, biyofilmin gelişmesini desteklemektedirler.<sup>197-198</sup> 2.aşamada, bakterilerin yüzeye yapışması ile kuvvetlice tutunması gerçekleşir. 3. aşamada, bakteriler mikrokoloniler halinde kümeleşir. 4.aşamada, bu kolonilerin büyüyerek olgunlaşması sonucu mantar görünümlü hal alırlar.<sup>199-200</sup> Biyofilm oluşumunda 5. aşama ise kopma- ayrılma evresidir. Tek bir bakteri veya bakteri kümesi koparak ayrılmaktadır. Bu ayrılış, EPS'nin azalması gibi dış kuvvetlerin etkisiyle, biyofilm yapısının kazınması gibi fiziksel kuvvetlerin etkisiyle veya tek bir hücre / hücre kümesinin kopmasıyla gerçekleşmektedir (Şekil 2.5).<sup>197</sup>

Biyofilm oluşumu, besin ihtiyacı, su aktivitesi, potansiyel hidrojen (pH) değeri, antimikrobiyal madde içeriği, oksijen değişkeni, asidite ve elektriksel değişkenlik gibi iç faktörler, yüzey materyali, yüzey alanı, yüzey düzgünlüğü, sıvının akış hızı, sınırlı besin maddesi gibi dış faktörlere bağlıdır.<sup>201-203</sup>



Şekil 2.5. Biyofilm oluşum aşamaları

#### 2.12.4. Biyofilm ve Enfeksiyon Hastalıkları

Uzmanlara göre, mikrobiyal plakların yaygınlığı birçok bulaşıcı hastalığa sebep olmaktadır.<sup>202</sup> Tüm bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık % 65' inin biyofilmlerle ilişkili olduğu tahmin edilmektedir.<sup>204</sup> Bu enfeksiyonlar, doğal kapak endokarditi, kistik fibrozis, periodontit, kronik prostat, orta kulak iltihabı gibi doğal seyirli ve üriner kateter, protez kapak, ortopedik protez, kontakt lens, santral venöz kateter ve spiral gibi yabancı cisim enfeksiyonlardır. Sağlık kurumlarında bulunan birçok tıbbi cihazda görülen biyofilm plakları cihaz kaynaklı enfeksiyonlara oluşturmaktadır.<sup>205</sup>

İçme suyu şebekelerinde biyofilm oluşturan bakteriler ise *Legionella pneumophila*, enterik patojenler, *Helicobacter pylori* ve tüberküloz dışı mikobakterilerdir.<sup>205</sup>

### **3. MATERYAL VE METOT**

Çalışma, Atatürk Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun **30/09/2021** tarihli oturumu ve **B.30.2.ATA.0.01.00/06/6** sayılı kararı ile onaylanmıştır. Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri TDK-**2021-9910** sayılı proje ile destek almıştır.

#### **3.1. Materyal**

##### **3.1.1. Besiyerleri ve Kimyasallar**

Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasal ve biyokimyasal maddeler değişik firmalardan temin edildi. Kanlı/EMB agar (Neogen, ABD), Muller-Hinton agar (Neogen, ABD), eosin metilen blue agar (Neogen, ABD), triptone soy broth (Neogen, ABD), luria bertani broth (Neogen, ABD), beyin kalp infüzyon agar (Biokar Diagnostics, Fransa), nutrient agar (Biokar Diagnostics, Fransa), nutrient broth (Neogen, ABD), antibiyotik diskleri, gliserol (Isolab, Almanya), dNTP (Ampliqon, Danimarka), Tris EDTA (Sigma, Amerika), Tris HCL, DNA ladder 100bp (Hibrogen, Türkiye), agarose moleculer biology grade (Prona), tris base (Sigma, Amerika), etilen diamin tetra asetik asit disodyum (Sigma, Amerika), sodyum hidroksit pelet (AFG SCI, Amerika), glacial acetic asit (Isolab, Almanya), Safe DNA gel (Hibrogen, Türkiye), DNA gel loading dye 6X (Thermo Fisher Scientific, ABD), sükroz (Sigma, Amerika), agar agar (Liofilchem, İtalya), phosphate buffered saline (Sigma, Amerika), kristal viole (Sigma, Amerika), etil alkol (Isolab, Almanya), kongo red (Sigma, Amerika), Taq DNA polimeraz (5U/mikrolitre) (Hibrogen, Türkiye), oligonükleotid (Macrogen) firmalarından temin edildi.

##### **3.1.2. Cihazlar**

Çalışmada kullanılan cihazlar değişik firmalardan temin edildi. +4°C buzdolabı (Arçelik, Türkiye), -20°C buzdolabı (Arçelik, Türkiye), BacT/Alert 3D cihazı (bioMérieux, Fransa), biogüvenlik kabin-2 (Microtest, Türkiye), elektroforez tankı (Biorad, Amerika), elektroforez güç kaynağı (Biorad, Amerika), jel görüntüleme cihazı

(Biorad, Amerika), jel yürütme cihazı (Biorad, Amerika), PZR cihazı (T100 thermal cyclers Biorad, Amerika), McFarland cihazı (Biosan, Türkiye), McFarland tüpü (Biosan, Türkiye), mikrodalga fırın (Samsung, Güney Kore), mini spin cihazı (Biosan, Türkiye), otoklav (Alp, Türkiye), etüv (Nüve, FN 500 Türkiye), Vortex (Velp ZX3, İtalya), otomatik pipetler (Eppendorf, Almanya), nanodrop (*Allsheng Nano-400A*), hassas terazi (Dikomsan ES 410, Türkiye), soğutmalı santrifüj (*Hermle Z 326 K, Almanya*), mikro santrifüj (Weightlab WN-CMV6000, Türkiye), mikro santrifüj (Sigma, Almanya), **Benmari** ( ), pH metre (Isolab, Almanya), distile su cihazı firmalarından temin edildi.

### 3.1.3. Kullanılan Besiyerlerinin Hazırlanması

#### 3.1.3.1. Luria Broth (LB)

<i>İçindekiler</i>	<i>Miktar g/l</i>
Enzymatic digest of Casein	10.0
Sodyum kloride	10.0
Maya ekstraktı	5.0

---

*pH: 7.3 ± 0.2*

Toz besiyerinden 25 gram 1 litre distile su ile karıştırıldı ve 121 °C otoklavda 15 dakika sterilize edildi ve 55°C sıcaklığa gelince aseptik şartlarda 5ml lik steril tüplere dağıtıldı. LB broth, bakteri suşlarının büyütülmesi amacı ile kullanıldı.

#### 3.1.3.2. % 2 Glukoz içeren Luria Broth

<i>İçindekiler</i>	<i>Miktar g/l</i>
Enzymatic digest of Casein	10.0
Sodyum kloride	10.0
Maya ekstraktı	5.0

---

*pH: 7.3 ± 0.2*



Toz besiyerinden 25 gram ve 20 gr glukoz tartılarak 1 litre distile su ile karıştırıldı. 121 °C otoklavda 15 dakika sterilize edildi ve 55°C sıcaklığa gelince aseptik şartlarda 5ml lik steril tüplere dağıtıldı. %2 glukoz içeren LB broth, *biyofilm* oluşumunun incelenmesi amacı ile kullanıldı.

### 3.1.3.3. Nutrient Agar

<i>İçindekiler</i>	<i>Miktar g/l</i>
Tripton	5.0
Et ekstraktı	3.0
Agar	12.0
<i>pH: 7.0 ± 0.2</i>	

20 gram toz besiyeri 1 litre distile su ile karıştırıldı ve 121 °C otoklavda 15 dakika sterilize edildi ve 55°C sıcaklığa gelince aseptik şartlarda petrilere dağıtıldı. Nutrient Agar, stoklanan bakteri suşlarının yeniden canlandırılması için üreme ortamı olarak amacı ile kullanıldı.

### 3.1.3.4. Kongo Red Agar

<i>İçindekiler</i>	<i>Miktar g/l</i>
Beyin kalp infüzyon agar	37.0
Sükroz	50.0
Kongo kırmızısı	0.8
<i>pH: 7.0 ± 0.2</i>	

Belirtilen miktardaki maddeler 1 litre distile su ile karıştırıldı ve 121 °C otoklavda 15 dakika sterilize edildi ve 55°C sıcaklığa gelince aseptik şartlarda petrilere dağıtıldı. Kongo Red Agar, biyofilm oluşumunun kalitatif olarak değerlendirilmesi amacı ile kullanıldı.

### 3.1.3.5. Gliserollü Triptik Soy Broth %16 (TSB)

<i>İçindekiler</i>	<i>Miktar g/l</i>
Enzymatic Digest of Casein	17.0
Enzymatic Digest of Soybean	3.0
Sodyum kloride	5.0
Dipotasyum Hidrojen Fosfat	2.5
Glukoz Monohidrat	2.5

---

*pH: 7.3 ± 0.2*

30 gram toz besiyeri 840 ml distile su ile karıştırıldı ve daha sonra 160 ml gliserol eklendi karıştırıldıktan sonra 121 °C otoklavda 15 dakika sterilize edildi ve 55°C sıcaklığa gelince aseptik şartlarda ependorf tüplere dağıtılmıştır. %16 gliserollü TSB, bakteri suşlarının stoklanması amacı ile kullanıldı.

### 3.1.3.6. Mueller Hinton Agar

<i>İçindekiler</i>	<i>Miktar g/l</i>
ET ekstraktı	2.0
Asit Hidrolize Kazein	17.5
Nişasta	1.5
Agar	17.0

---

*pH: 7.0 ± 0.2*

38 gram toz besiyeri 1 litre distile su ile karıştırıldı ve 121 °C otoklavda 15 dakika sterilize edildi ve 55°C sıcaklığa gelince aseptik şartlarda petrilere dağıtıldı. Mueller hinton agar, disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılık testi amacı ile kullanıldı.

### **3.1.4. Kullanılan Solüsyonların ve Kimyasalların Hazırlanması**

#### **3.1.4.1. Kristal Viyole (%1)**

1 gr kristal viyole boyası ,20 ml alkol ile karıştırılarak çözdürüldü. Bu karışım ana stok olarak elde edildi. Esas stok için, ana karışımdan %1, distile sudan ise %98 karıştırıldı. %1 oranında phenol (fenik asit) benmaride eritilerek soğutuldu ve esas stok içine eklendi. Belirli aralıklarla çözelti karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı. Kristal viyole, biyofilm oluşumunun kantitatif olarak değerlendirilmesi amacı ile kullanıldı.

#### **3.1.4.2. Fosfat Buffer (pH 7.2)**

1 adet tablet 200 ml distile su içinde çözdürüldü. pH 7.2 'ye ayarlandıktan sonra 121 °C otoklavda 15 dakika sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

#### **3.1.4.3. EDTA 0.5 M (pH 8.0)**

46.525 g etilen diamin tetra asetik asit disodyum (EDTA 2Na, MW: 372,24 g/mol) 250 ml distile su içinde çözdürüldü. Manyetik çalkalayıcıda solüsyona 10M NaOH ilave edilerek pH'sı 8.0'a ayarlandı. 121°C otoklavda 30 dakika sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı. TAE solüsyonu hazırlamak amacı ile kullanıldı.

#### **3.1.4.4. Sodyum hidroksit NaOH (10 M)**

40 g NaOH 100 ml distile su içinde çözdürüldü. NaOH 0.5 EDTA hazırlamak amacı ile kullanıldı.

#### **3.1.4.5. TAE (50X) Elektroforez Tamponu**

242 gr Tris base, 57.1 ml glacial asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA ve distile su kullanıldı. Önce tris base 500 ml distile su içinde manyetik karıştırıcı ile çözülene kadar karıştırıldı. Daha sonra bu karışıma glasiyal asetik asit ve 0.5 M EDTA eklendi ve karışım berraklaşana kadar karıştırıldı. Son hacim distile su ile 1 L'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı. 50XTAE agaroz jel elektroforezde 1X TAE tamponu hazırlamak amacı ile kullanıldı.

#### **3.1.4.6. TAE (1X) Elektroforez Tamponu**

50X TAE Elektroforez Tampon çözeltisinden 20 ml, distile sudan ise 980 ml alınarak karıştırıldı ve oda sıcaklığında saklandı. 1X TAE elektroforez tamponu, agaroz jel elektroforezde jel hazırlamak amacı ile kullanıldı.

#### **3.1.4.7. Tris EDTA (TE) Tamponu (pH 8.0)**

1M Tris-Cl (pH 8.0) solüsyonundan 10 ml, 0.5 M EDTA (pH 8.0) solüsyonundan 2ml, distile sudan ise 988 ml alınarak karıştırıldı. 121°C otoklavda 30 dakika sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı. TE tamponu primer sulandırma ve DNA izolasyonu amacı ile kullanıldı.

#### **3.1.4.8. Tris-HCL Tamponu (pH 8.0)**

Tris – base 12.11 gr tartılarak 80 ml distile suda manyetik karıştırıcıda çözdürüldü. pH 8.0 ayarlamak için hidroklorik asit (HCl) solüsyonunu yavaşça eklendi. İstenen pH'a ulaşıldığında, distile su ile 100 mL'ye tamamlandı. 121°C otoklavda 30 dakika sterilize edildi ve oda sıcaklığında saklandı. Tris-HCL Tamponu, Tris EDTA (TE) Tamponu hazırlamak için kullanıldı.

#### **3.1.4.9. Yükleme Boyası 6X**

Ticari 1 ml'lik 6X Loading Dye (Hibrogen, Türkiye) kullanıldı.

#### **3.1.4.10. DNA ladder**

Ticari GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (Hibrogen, Türkiye) kullanıldı.

### **3.2. Yöntem**

#### **3.2.1. Bakteri İzolatları**

Çalışma kapsamında 2021 yılı içerisinde T.C. Sağlık Bakanlığı Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesi'ne başvuran hastalardan 15.09.2021- 28.02.2022 tarihleri arasında çeşitli klinik örneklerden (idrar, kan, yara vb.) izole edilen toplam 160 adet çok ilaca dirençli ve /veya GSBL üreten *E.*

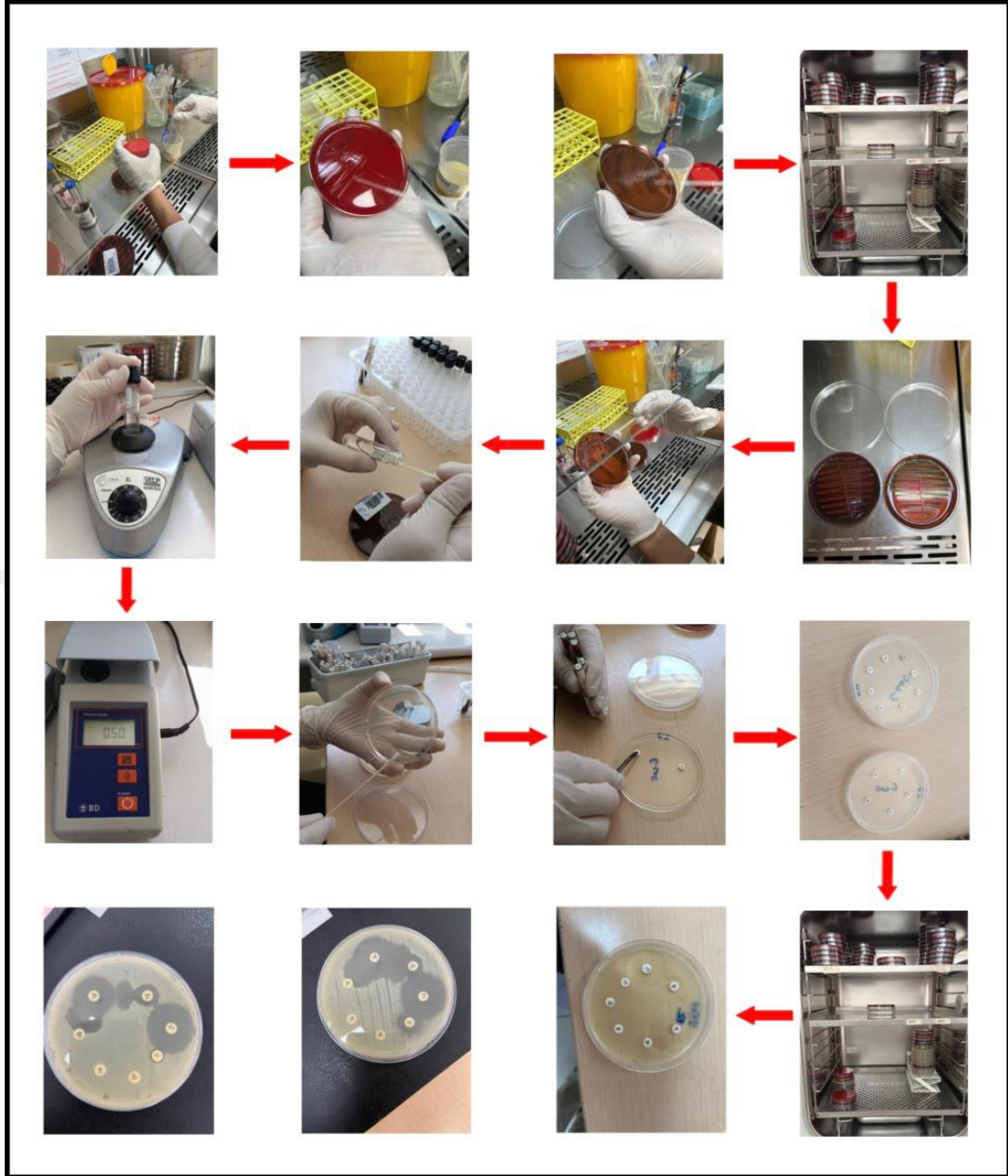
*coli* izolatu çalışmaya dahil edildi. Çalışmada yoğun bakım uniteleri dahil olmak üzere yatan hasta ve ayakta tedavi gören hastaların klinik örneklerinden elde edilen *E. coli* izolatları dahil edildi.

Bu çalışmada, hastaların demografik bilgileri (yaş, cinsiyet) ile numune çeşidi, antibiyotik duyarlılık test sonuçları gibi bilgiler kayıt edildi.

DNA izolasyonu, filogenetik gruplama, virulans ve direnç genlerinin belirlenmesi, ST131 klonal grubunun tanımlanması, integron gen karakterizasyonu belirlenmesi ve biyofilm oluşturma yeteneklerinin kalitatif ve kantitatif tespitinin araştırılması işlemleri, Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde gerçekleştirildi.

### **3.2.2. *E. coli* izolatların Tanımlanması ve Doğrulaması**

Laboratuvara kabul edilen örneklerin ekimi yapıldıktan sonra 37 C'de 24 saat inkübe edildi. Inkübasyon süresi sonrası, *E. coli* şüpheli koloniler konvansiyonel teknikler ile (IMVIC, oxidaz, re, TSI besiyerinde fermentasyon testi vb.) identifiye edildi. Tüm izolatlarda tür düzeyinde tanımlama, GSBL kontrolü için ADT'i Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde konvansiyonel yöntemlerle tekrar çalışılarak doğrulandı (şekil 6).



Şekil 3.1. İzolatların ekimi, değerlendirilmesi ve antibiyogram

### 3.2.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

#### 3.2.3.1. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi

İzole edilen suşların antibiyotik duyarlılık testleri (ADT) manuel ve BD Phoenix otomatize ile “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing” (EUCAST) önerileri doğrultusunda Mueller Hinton Agar (Bioanalyse) besiyeri kullanılarak gerçekleştirildi.

*E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. Bu amaçla; amikacin, amoksisilin/klavulonat (AMC) (30 µg), ampisilin (AM) (10µg), ampisilin-sulbaktam (SAM) (10µg), sefazolin (30 µg), seftazidime (30 µg), ertapenem (ETP) (10µg), fosfomisin (FF) (200µg), gentamisin (CN) (10µg), imipenem(IPM) (10µg), levofloxacin (5 µg), meropenem (MEM) (10µg), nitrofurantoin(F) (100µg), norfloksasin (NOR) (10µg), piperacillin-tazobactam (TPZ) (110µg), sefepim (FEB) (30µg), seftriakson (CRO) (30 µg), sefuroksim(CXM) (10µg), siprofloksasin (CIP) (5µg), tigesiklin, tobramycin (100 µg), trimetoprim & sulfametokzasol (SXT) (25µg) (Bioanalyse, Ankara, Türkiye) antibiyotik diskleri kullanıldı.

Test edilecek suşlara ait saf koloniler 2 ml steril tuzlu su içinde homojenize edildikten sonra, 0,5 McFarland standart bulanıklığında ( $10^8$  cfu /ml) ayarlandı. Steril sıvı kùltüre steril eküvyon çubuk daldırılıp iyice eminceye kadar bekletildikten sonra, eküvyon çubuktaki kùltür petri yüzeyinin tüm alanına eşit dağılımını sağlayacak şekilde inoküle edildi. 3-5 dakika oda ısısında besiyeri yüzeyinin kuruması bekletildikten sonra antibiyotik diskleri, MHA petri kutuları üzerine yerleştirilerek,  $35\pm 2^\circ\text{C}$  de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonrası inhibisyon zonlarının çapı milimetre olarak ölçülerek, duyarlı (S) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi. ADT sonucuna göre, iki ya da daha fazla farklı sınıf antimikrobiyale dirençli olan suşlar çoklu dirençli olarak kabul edildi.<sup>206</sup>

### **3.2.3.2. GSBL Varlığının Fenotipik Olarak Gösterilmesi**

GSBL varlığı çift disk sinerji yöntemi ile gösterildi. Test edilecek suşlara ait saf koloniler 2 ml steril tuzlu su içinde homojenize edildikten sonra, 0,5 McFarland standart bulanıklığında ( $10^8$  cfu /ml) ayarlandı. Steril sıvı kùltüre steril eküvyon çubuk daldırılıp iyice eminceye kadar bekletildikten sonra, eküvyon çubuktaki kùltür petri yüzeyinin tüm

alanına eşit dağılımını sağlayacak şekilde inoküle edildi. 3-5 dakika oda ısısında besiyerinin kuruması beklenildikten sonra, plağın ortasına amoksisilin/klavulanik asit antibiyotik diski ile etrafına, aztreonam (ATM, 30 µg), seftriakson, seftazidim ve sefotaksim antibiyotik diskleri yerleştirildikten sonra, 16-18 saat, 35 ±2 °C' de inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kullanılan antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonlarının, amoksisilin/klavulonik asit yönünde genişleme göstermesi veya diskler arasındaki bölgede bir inhibisyon alanının gözlenmesi, başka bir şekilde klavulanik asitin, diğer antibiyotikler ile sinerjik etki göstermesi GSBL varlığı açısından pozitiflik olarak kabul edildi.<sup>207</sup>

İzolatlar, %16 gliserollü Triptik Soy Broth (TSB) (Merck, Almanya) besiyerinde-20°C' de dondurucuda (Arçelik, Türkiye) muhafaza edildi.

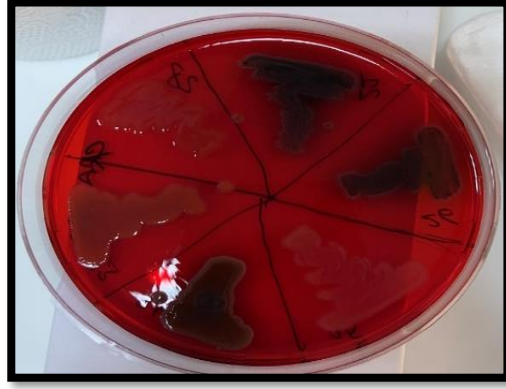
#### **3.2.4. Biyofilm Oluşturma Kapasitelerinin Belirlenmesi**

Suşlar çalışmaya alınmadan önce -20 °C' den çıkartılarak Nutrient agara ekim yapılarak 37±2 °C' de 18±2 saat etüvde bekletildi ve taze kültürlerden elde edilen koloniler çalışmaya alındı. Selektif besiyerlerinde gerçekleştirilen deneyler, bakterilerin biyofilm oluşturma özelliklerini tespit edilmesini etkileyebilmektedir.<sup>208</sup> Biyofilm oluşturma kapasitelerinin belirlenmesinde kongo red agar (kalitatif yöntem) yöntemi, cam tüp test yöntemi ve kantitatif mikrodilüsyon plak test yöntemi kullanıldı.

##### **3.2.4.1. Kongo red agar (CRA) yöntemi**

Nutrient agarda üretilen bakterilerin biyofilm oluşumları için Kongo Red Agara ekim yapıldı. Bu yöntem kalitatifdir. Petriler, 37°C' de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası Şekil 7' de görüldüğü gibi bakterilerin petrilerde siyah renk koloniler oluşturmaları pozitif, kırmızı- pembe renk koloni oluşturmaları ise negatif olarak değerlendirildi.<sup>209</sup>





**Şekil 3.2.** Kongo kırmızısı agarda *E. coli* biyofilm oluşumu.

### 3.2.4.2. Kantitatif Cam Tüp Test Yöntemi

NA besiyerinde üretilen tek koloniden, LB broth besiyerine ekilerek 37°C de 160 rpm hızında 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında %1 glukoz içeren LB ortamında 0,5 McFarland standart bulanıklığında ( $10^8$  cfu /ml) olacak şekilde inoküle edildi. İnokülasyon sonrası bu besiyerinden 100 µl alınarak %1 glukoz içeren LB broth besiyerine aktarıldı. Aktarım sonrasında cam tüpler 37°C de 160 rpm'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerleri dökülerek tüpler 2 ml steril PBS ile nazik bir şekilde yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrar edildi. Ardından tüplere 2 ml %1'lik kristal viyole aktarılarak 20 dk oda ısısında boyanması beklenildi. Boyama sonrasında steril PBS ile 3 kez kristal viyole yıkanarak boya uzaklaştırıldı. Tüpler kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutuldu. Kuruyan tüplere 80:20 etanol-asetik asit çözeltisi eklendi ve oluşan kristal viyole halkasının çözünmesi için 10 dk beklenildi. Çözünen bu boyanın 1 ml'spektrofotometrede  $OD_{540}$  nm'de okutulularak biyofilm oluşum (kuvvetli-zayıf) seviyeleri tespit edildi (Şekil 8). Tüpte biyofilm oluşumu, kristal viyole ile boyama sonrasında absorbans ölçümü yapılarak tüm suşların biyofilm üretimi değerlendirildi.

*E. coli* suşlarının biyofilm oluşturma dereceleri aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı ve değerlendirildi.<sup>210-211</sup>

$OD \leq OD_c$  Negatif

$OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$  Zayıf

$2 \times OD_c \leq OD < 4 \times OD_c$  Orta

$4 \times OD_c < OD$  Kuvvetli

(OD: optik dansite;  $OD_c$ =Negatif kontrolün OD ortalaması + 3x negatif kontrolün standart sapması)

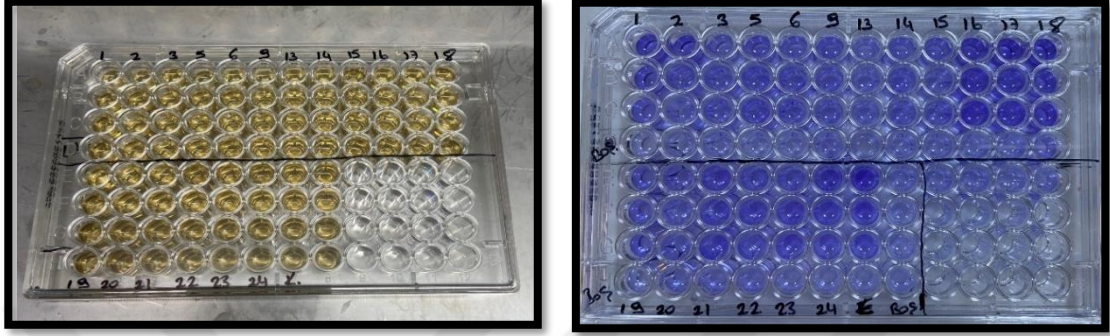


**Şekil 3.3.** Kalitatif cam tüp yöntemiyle biyofilm oluşumunun gözlenmesi

### 3.2.4.3. Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Test yöntemi

NA besiyerinde üretilen tek koloniden, LB broth besiyerine ekilerek 37°C’de 160 rpm hızında 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında %1 glukoz içeren LB ortamında 0,5 McFarland standart bulanıklığında ( $10^8$  cfu /ml) olacak şekilde inoküle edildi. İnokülasyon sonrası düz tabanlı mikropalak kuyucuklarına bu besiyerinden 20 µl, %1 glukoz içeren LB ise 180 µl konuldu (1/100 dilüsyon). Her bir bakteri ve kontrol suşu için için üçer kuyucuk kullanıldı. 37°C’de 160 rpm’de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında besiyerleri dökülerek mikropalaklar 200 µl steril PBS ile nazik bir şekilde yıkandı ve bu işlem 3 kez tekrar edildi. Ardından mikropalaklara 200 µl %1’lik kristal viyole aktarılarak 20 dk oda ısısında boyanması beklenildi. Boyama sonrasında 200 µl steril PBS ile 3 kez kristal viyole yıkanarak boya uzaklaştırıldı. Mikropalaklar

kurutma kağıdına ters çevrilerek kurutuldu. Kuruyan mikroplaklara 80:20 etanol-asetik asit çözeltisi eklendi ve oluşan kristal viyole halkasının çözünmesi için 10 dk beklenildi (Şekil 9a,9b). Mikroplaklar OD<sub>540</sub> nm’de multi pleyt okuyucuda okutulmuş biyofilm oluşum (kuvvetli-zayıf) seviyeleri tespit edildi.<sup>212</sup>



**Şekil 3.3. a.** İnkübasyonun ardından plakta oluşan kültürler, **b.** Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Yöntemi

### 3.2.5. Moleküler Analiz

Liyofilize halde gelen her bir primer, üretici firmanın önerdiği miktara göre Tris EDTA (TE) ile çözündürerek 100 µM’lık stok primer çözeltileri elde edildi.

#### 3.2.5.1. Toplam DNA izolasyonu

İzolatların total DNA ekstraksiyonu Ausubel’in kaynatma metoduna göre yapılmıştır.<sup>213</sup> DNA izolasyon basamakları sırasıyla;

- Nutrient agarda yeniden canlandırılan bakteriler 3 mL LB broth besiyerine inoküle edildi ve 37°C’de 160 rpm hızında 18-24 saat inkübe edildi.
- İnkübasyon süresi sonrasında broth besiyerinden 1.5 mL eppendorf tüpüne aktararak 13.000 rpm’de 1 dk çöktürüldü.
- Süpernatant atıldı ve pelet 1 mL deiyonize suda vorteksenerek çözüldü. Bu yıkama işlemi toplam 3 kez tekrarlandı.
- Son santrifüj yapıldıktan sonra, süpernatant atıldı ve 300 µl apirojen su eklendi.

- Daha önceden ayarlanan ısıtıcı blokta 95°C’de 10 dk ısıtılarak lizise uğrattıldı. Oda sıcaklığına gelmesi beklendi.
- Son olarak 4°C’de 13.000 rpm’de 10 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Süpernatant temiz bir ependorfa alındı.
- Genomik DNA’lar agaroz jel elektoroforez ile kontrol edilerek görüntüledi.
- Genomik DNA ekstraktlarının miktar tayinleri ve saflık kontrolleri Nanodrop Spektrofotometrede (Allsheng Nano-400A) ölçülerek belirlendi.<sup>214</sup> Bu işlem; belirli dalga boylarındaki ışığın numune içinden geçirilmesi esasına dayanır ve ışığın numune tarafından ne kadarının tutulduğunu belirler. Nükleik asitlerin ışığı en iyi absorbe ettiği dalga boyu 260/280 nm’dir. DNA’nın saflığı, spektrofotometrede yapılan ölçüm sonunda okunan değer 1.8-2.0 olması ile açıklanır. Bu aralıktan daha düşük olması RNA kontaminasyonu, daha yüksek olması ise protein kontaminasyonu olduğunu göstermektedir.<sup>215</sup>
- Yeterli saflıkta bulunmayan DNA ekstraktları tekrar ekstraksiyon işlemine alındı.
- Yeterli saflığa sahip olan DNA ekstraktları, alikotlanarak PZR’da kalıp DNA olarak kullanılmak üzere -20 °C derin dondurucuda saklandı.

### **3.2.5.2. Filogenetik Gruplamasının Belirlenmesi**

İzole edilen *E. coli* izolatlarının filogenetik olarak sınıflandırılması için, chuA, yjaA ve TSPE4.C2’ye ait referans primerler kullanılarak tripleks PZR yapıldı.<sup>216</sup>

**Tablo 3.1.** Filogenetik gen bölgeleri için primerler

<i>Gen</i>	<i>Primerler</i>	<i>Ürün (bp)</i>
<i>chuA</i>	F- 5'-ATGATCATCGCGGCGTGCTG-3' R- 5'-AAACGCGCTCGCGCCTAAT-3'	281
<i>yjaA</i>	F- 5'-TGTTTCGCGATCTTGAAAGCAAACGT-3' R- 5'-ACCTGTGACAAACCGCCCTCA-3'	216
<i>TspE4.C2</i>	F- 5'- GCGGGTGAGACAGAAACGCG-3' R- 5'-TTGTCGTGAGTTGCGAACCCG-3'	152

PCR toplamdaki toplam hacim 20 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 3 µl, dNTP mix 1,4 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,4 µl, her primerden 0.5µl, Taq polimeraz 0.2 µl, kalıp DNA 3 µl, distile su 8 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 95°C'de 5 dk ilk denatürasyon, takiben 95°C'de 1 dk denatürasyon, 58°C'de 1 dk primer bağlanması, 72 °C' de 2 dk zincir uzaması (35 siklus) 72 °C' de 10 dk son uzama ve takiben 4 °C' de ∞ soğutma şeklinde gerçekleştirildi. Sonuçlar Clermont ve ark. (2000)'na göre yorumlandı.

Grup A (*chuA*-, *yjaA* ±, *TspE.C2*-)

Grup B1 (*chuA*-, *yjaA* ±, *TspEC2* +)

Grup B2 (*Chua* + *yjaA* + *spE.C2* ±)

Grup D (*Chua* + *yjaA*-, *TspE.C2* ±)

### 3.2.5.3. GSBL Direnç Genlerinin Analizleri

İzole edilen *E. coli* izolatlarının GSBL direnç genlerinden, CTX-M, TEM, OXA ve SHV direnç genleri araştırıldı.<sup>217</sup>

**Tablo 3.2.** GSBL gen bölgeleri için primerler

<i>Gen</i>	<i>Primerler</i>	<i>Ürün (bp)</i>
<i>bla</i> CTX-M	F- 5'- ATGTGCAGYACCAGTAARGT -3' R- 5'- TGGGTRAARTARGTSACCAGA -3'	593
<i>bla</i> TEM	F- 5'- CGCCGCATACACTATTCTCAGAATG -3' R- 5'- ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT -3'	445
<i>bla</i> OXA	F- 5'- ACACAATACATATCAACTTCGC -3' R- 5'- AGTGTGTTTAGAATGGTGATC -3'	885
<i>bla</i> SHV	F- 5'- CTTTATCGGCCCTCACTCAA -3' R- 5'- AGGTGCTCATCATGGGAAAG -3'	237

### 3.2.5.3.1. CTX-M İçin PCR Yöntemi

PCR toplam hacim 25 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5 µl, dNTP mix 0,5 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl, her primerden 0.25µl, Taq polimeraz 0.1 µl, kalıp DNA 1 µl, distile su 18,9 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 57°C'de 1 dk primer bağlanması, 72 °C' de 1 dk zincir uzaması (35 siklus) 72 °C' de 10 dk son uzama ve takiben 4 °C' de ∞ soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

### 3.2.5.3.2. TEM İçin PCR Yöntemi

PCR toplam hacim 25 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5 µl, dNTP mix 0,5 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl, her primerden 0.25µl, Taq polimeraz 0.1 µl, kalıp DNA 1 µl, distile su 18,9 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55°C'de 1 dk primer bağlanması, 72 °C' de 1 dk zincir uzaması (35 siklus) 72 °C' de 10 dk son uzama ve takiben 4 °C' de ∞ soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

### 3.2.5.3.3. OXA İçin PCR Yöntemi

PCR toplam hacim 25 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5 µl, dNTP mix 0,5 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl, her primerden 0.5µl, Taq polimeraz 0.1 µl, kalıp DNA 1

$\mu\text{l}$ , distile su 18,4  $\mu\text{l}$  bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 95°C'de 10 dk ilk denatürasyon, takiben 95°C'de 1 dk denatürasyon, 60,8 °C'de 1 dk primer bağlanması, 72 °C' de 1,5 dk zincir uzaması (35 siklus) 72 °C' de 3 dk son uzama ve takiben 4 °C' de  $\infty$  soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

#### **3.2.5.3.4. SHV İçin PCR Yöntemi**

PCR toplam hacim 25  $\mu\text{l}$  olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5  $\mu\text{l}$ , dNTP mix 0,5  $\mu\text{l}$ , MgCl<sub>2</sub> 1,5  $\mu\text{l}$ , her primerden 0.5 $\mu\text{l}$ , Taq polimeraz 0.1  $\mu\text{l}$ , kalıp DNA 1  $\mu\text{l}$ , distile su 18,4  $\mu\text{l}$  bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 94°C'de 5 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C'de 1 dk denatürasyon, 55 °C'de 1 dk primer bağlanması, 72 °C' de 1 dk zincir uzaması (34 siklus) 72 °C' de 7 dk son uzama ve takiben 4 °C' de  $\infty$  soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

#### **3.2.5.4 Virülans Gen Bölgelerinin Multiplex PCR ile Analizleri**

İzole edilen *E. coli* izolatlarının virülans genleri üç grup halinde incelendi. Birinci grupta, iutA, sfa cnf-1, aer, iroN, afa, hlyA; ikinci grupta, pap A, pap C, fim A, PAI, ompT, iucC ve üçüncü grupta ise traT ve iss genleri olacak şekilde PCR reaksiyonuna tabi tutuldu.<sup>218-223</sup>

**Tablo 3.3.** Virulans gen bölgeleri için primerler

<i>1.GRUP</i>		
<i>Gen</i>	<i>Primerler</i>	<i>Ürün (bp)</i>
<b>iutA</b>	F- 5'- GGCTGGACATCATGGGAACTGG-3' R- 5'- CGTCGGGAACGGGTAGAATCG -3'	300
<b>Sfa</b>	F- 5'- CTCCGGAGAACTGGGTGCATCTTAC-3' R- 5'- CGGAGGAGTAATTACAAACCTGGCA3'	410
<b>cnf1</b>	F- 5'- AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG-3' R- 5'- CATTCAAGAGTCCTGCCCTCATTATT-3'	498
<b>Aer</b>	F- 5'- TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT-3' R- 5'- AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG-3'	602
<b>iroN</b>	F- 5'- AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG-3' R- 5'- GACGCCGACATTAAGACGCAG-3'	665
<b>Afa</b>	F- 5'- GCTGGGCAGCAAACCTGATAACTCTC-3' R- 5'- CATCAAGCTGTTTGTTCGTCGCCCG-3'	750
<b>hlyA</b>	F- 5'- AACAAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT-3' R- 5'- ACCATATAAGCGGTCATTCCCGTCA-3'	1177
<i>2.GRUP</i>		
<i>Gen</i>	<i>Primerler</i>	<i>Ürün (bp)</i>
<b>pap A</b>	F- 5'- ATGGCAGTGGTGTCTTTTGGTG-3' R- 5'- CGTCCCACCATA CGTGCTCTTC-3'	720
<b>pap C</b>	F- 5'- GACGGCTGTAAGTGCAGGGTGTGGCG-3' R- 5'- ATATCCTTTCTGCAGGGATGCAATA-3'	328
<b>fim A</b>	F- 5'- GTTGTCTGTTCGGCTCTGTC-3' R- 5'- ATGGTGTGGTTCCGTTATTC-3'	447
<b>PAI</b>	F- 5'- GGACATCCTGTTACAGCGCGCA-3' R- 5'- TCGCCACCAATCACAGCCGAAC-3'	930
<b>ompT</b>	F- 5'- ATCTAGCCGAAGAAGGAGGC -3' R- 5'- CCCGGGTCATAGTGTTCATC-3'	559
<b>iucC</b>	F- 5'- AAACCTGGCTTACGCAACTGT -3' R- 5'- ACCCGTCTGCAAATCATGGAT-3'	269
<i>3.GRUP</i>		
<i>Gen</i>	<i>Primerler</i>	<i>Ürün (bp)</i>
<b>İss</b>	F- 5'- GTGGCGAAAACCTAGTAAAACAGC-3' R- 5'- CGCCTCGGGGTGGATAA-3'	760
<b>traT</b>	F- 5'- GGTGTGGTGCATGAGCACAG -3' R- 5'- CACGGTTCAGCCATCCCTGAG-3'	290



1. grup için PCR toplam hacim 25 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5 µl, dNTP mix 0,5 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl, her primerden 0.25µl, Taq polimeraz 0.1 µl, kalıp DNA 1 µl, distile su 15,9 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlanmıştır. PCR koşulları; 94°C’de 3 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C’de 1 dk denatürasyon, 61,1 °C’de 30 sn primer bağlanması, 72 °C’ de 1 dk zincir uzaması (30 siklus) 72 °C’ de 7 dk son uzama ve takiben 4 °C’ de ∞ soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

2. ve 3.grup için ise reaksiyon 1. grup ile aynı olup, 95°C’de 12 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C’de 30 sn denatürasyon, 62,7 °C’de 30 sn primer bağlanması, 68 °C’ de 3dk zincir uzaması (25 siklus) 72 °C’ de 10 dk son uzama ve takiben 4 °C’ de ∞ soğutma şeklinde reaksiyona tabi tutuldu.

### 3.2.5.5. ST131 Klonu ve Alt Klonlarının Moleküler Yöntemle Belirlenmesi

İzole edilen *E. coli* izolatlarının ST 131 klonu ve alt klon genleri araştırıldı.<sup>4,224</sup>

**Tablo 3.4.** ST131 Klonu ve Alt Klonlarına ait gen bölgeleri için primerler

<i>Gen</i>	<i>Primerler</i>	<i>Ürün (bp)</i>
<b>O25 pab B spe</b>	F- 5’- TCC AGCAGGTGCTGGATCGT -3’ R- 5’- GCGAAATTTTCGCCGTA CTGT -3’	347
<b>trpA2</b>	F- 5’- GCTACGAATCTCTGTTTGCC -3’ R- 5’- GCAACGCGGCCTGGCGGAAG 3’	427
<b>fim H30</b>	F-21-5-CCG CCA ATG GTA CCG CTA TT-3 R-20-5-CAG CTT TAA TCG CCA CCC CA-3	354
<b>H30-Rx</b>	F-5-GGT TGC GGT CTG GGC A-3 R-5-CAA TAT CCA GCA CGT TCC AGG TG-3	194

#### *pabB rfb* Geninin PCR Protokolü

İzole edilen *E. coli* izolatlarının ST131 Klon varlığı için önce O25pabBspe ve trpA2 varlığı incelendi.<sup>224</sup>

PCR toplam hacim 25 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5 µl, dNTP mix 0,5 µl, MgCl<sub>2</sub> 2,5 µl, her primerden 0.8µl, Taq polimeraz 0.2 µl, kalıp DNA 2

$\mu$ l, distile su 14,7  $\mu$ l bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 94°C'de 4 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C'de 5 sn denatürasyon, 63 °C'de 20 sn primer bağlanması, 72 °C' de 30 sn zincir uzaması (30 siklus) 72 °C' de 5 dk son uzama ve takiben 4 °C' de  $\infty$  soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

### ***H30 Geninin PCR Protokolü***

ST 131 gen varlığı için incelenen *E. coli* izolatlarda O25pabBspe ve trpA2 varlığı görülen örneklerde H30 alt klonu varlığı açısından incelendi<sup>(224)</sup>.

PCR toplam hacim 25  $\mu$ l olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5  $\mu$ l, dNTP mix 0,5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 2,5  $\mu$ l, primer 0.5 $\mu$ l, Taq polimeraz 0.2  $\mu$ l, kalıp DNA 2  $\mu$ l, distile su 16,3  $\mu$ l bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 95°C'de 8 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C'de 20 sn denatürasyon, 68 °C'de 45 sn primer bağlanması, 72 °C' de 5 dk zincir uzaması (30 siklus) 72 °C' de 5 dk son uzama ve takiben 4 °C' de  $\infty$  soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

### ***H30-Rx Geninin PCR Protokolü***

ST 131 gen varlığı için incelenen *E. coli* izolatlarda H30 alt klonu varlığı görülen örneklerde H30-Rx varlığı açısından incelendi<sup>(4)</sup>.

PCR toplam hacim 25  $\mu$ l olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5  $\mu$ l, dNTP mix 0,5  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 2,5  $\mu$ l, primer 0.5 $\mu$ l, Taq polimeraz 0.2  $\mu$ l, kalıp DNA 2  $\mu$ l, distile su 16,3  $\mu$ l bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 95°C'de 8 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C'de 20 sn denatürasyon, 72°C'de 40 sn primer bağlanması, 72 °C' de 5 dk zincir uzaması (31 siklus) 72 °C' de 5 dk son uzama ve takiben 4 °C' de  $\infty$  soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

### 3.2.5.6. İntegraz ve İntegron Gen Varlığının Moleküler Yöntemle Belirlenmesi

İzole edilen *E. coli* izolatlarının Sınıf 1 ve sınıf 2 integronun integraz gen bölgelerine ait spesifik primerler kullanılarak integraz gen varlığı incelendi. İntegraz gen pozitif çıkan örneklerde sınıf 1 ve sınıf 2 integron değişken bölgelerine ait spesifik primerler kullanılarak integron varlığı incelendi.<sup>225-227</sup>

**Tablo 3.5.** İntegraz ve İntegron gen bölgeleri için primerler

<i>Gen</i>	<i>Primerler</i>	<i>Ürün (bp)</i>
<b>IntI1</b>	F-5- GGTC AAGGATCTGGATTTGG-3 R-5-ACATGCGTGTAATCATCGTC-3	500
<b>IntI 2</b>	F-5- CACGGATATGCGACAAAAAGGT-3 R-5-GTAGCAAACGAGTGACGAAATG-3	740
<b>5'-CS</b> <b>3'-CS</b>	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	Değişken
<b>hep51</b> <b>hep74</b>	GATGCCATCGCAAGTACGAG CGGGATCCCGGACGGATGCACGATTTGTA	Değişken

#### *İntI-1 ve İntI-2 Geninin PCR Protokolü*

PCR toplam hacim 25 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5 µl, dNTP mix 0,5 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl, her bir primer 0.25µl, Taq polimeraz 0.1 µl, kalıp DNA 2 µl, distile su 17,4 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 95°C'de 5 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C'de 45 sn denatürasyon, 57°C'de 1 dk primer bağlanması, 72 °C' de 1 dk zincir uzaması (34 siklus) 72 °C' de 10 dk son uzama ve takiben 4 °C' de ∞ soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

## **İntegronların Değişken Bölgelerinin (5'CS;3'CS, hep51; hep74) PZR**

### **Protokolü**

İntegraz geni pozitif olan suşlarda integron değişken bölge için PZR reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu amaçla integronların değişken bölgelerinin çoğaltılmasında sınıf 1 integron için 5'CS ve 3'CS, sınıf 2 integron için ise hep51 ve hep74 primerleri kullanıldı.

5'CS ve 3'CS için PCR toplam hacim 25 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5 µl, dNTP mix 0,5 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl, primer 0.25µl, Taq polimeraz 0.1 µl, kalıp DNA 2 µl, distile su 17,9 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 94°C'de 2 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C'de 30 sn denatürasyon, 56°C'de 45 sn primer bağlanması, 72 °C' de 2 dk zincir uzaması (34 siklus) 72 °C' de 5 dk son uzama ve takiben 4 °C' de ∞ soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

hep51 ve hep74 için PCR toplam hacim 25 µl olacak şekilde ilk olarak 10x Reaksiyon Tampon 2,5 µl, dNTP mix 0,5 µl, MgCl<sub>2</sub> 1,5 µl, primer 0.25µl, Taq polimeraz 0.1 µl, kalıp DNA 2 µl, distile su 17,9 µl bileşenleri içeren bir master mix hazırlandı. PCR koşulları; 94°C'de 3 dk ilk denatürasyon, takiben 94°C'de 45 sn denatürasyon, 55°C'de 1 dk primer bağlanması, 72 °C' de 2 dk zincir uzaması (34 siklus) 72 °C' de 5 dk son uzama ve takiben 4 °C' de ∞ soğutma şeklinde gerçekleştirildi.

### **3.2.5.7. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme**

Çalışmada PZR ürünlerinin yürütülmesinde %1,5 agaroz ve elektrolit olarak Tris EDTA asetik asit tamponu (TAE, pH 8.4) kullanıldı. 100 ml TAE tamponu içine konulan 1,5 gr agaroz mikrodalga fırında düzenli olarak karıştırılarak eritildi. Jel hazırlandıktan sonra 5 µl Safe DNA gel (HibriGen) eklendi. Elektroforez düzeneği kurulduktan sonra, agaroz çözeltisi tarağın dişleri arasında ya da altında hava kabarcıkları olmamasına dikkat edilerek kalıbın içerisine döküldü. 15 µl amplifikasyon ürününe 5 µl DNA gel loading dye 6X (Thermo Fisher Scientific, ABD) yükleme boyası ilave edilerek toplam 20 µl

hacimde olacak şekilde kuyucuklara yüklendi. Bantların büyüklüklerinin kıyaslanması için moleküler ağırlık standardı 100bp DNA ladder (Hibrigen, Türkiye) kullanıldı. Örnekler 90 V voltajda 1 saat yürütüldü. Süre sonunda jelde oluşan bantlar UV transilluminatörde gözlemlendi ve görüntüler bilgisayara aktarıldı.

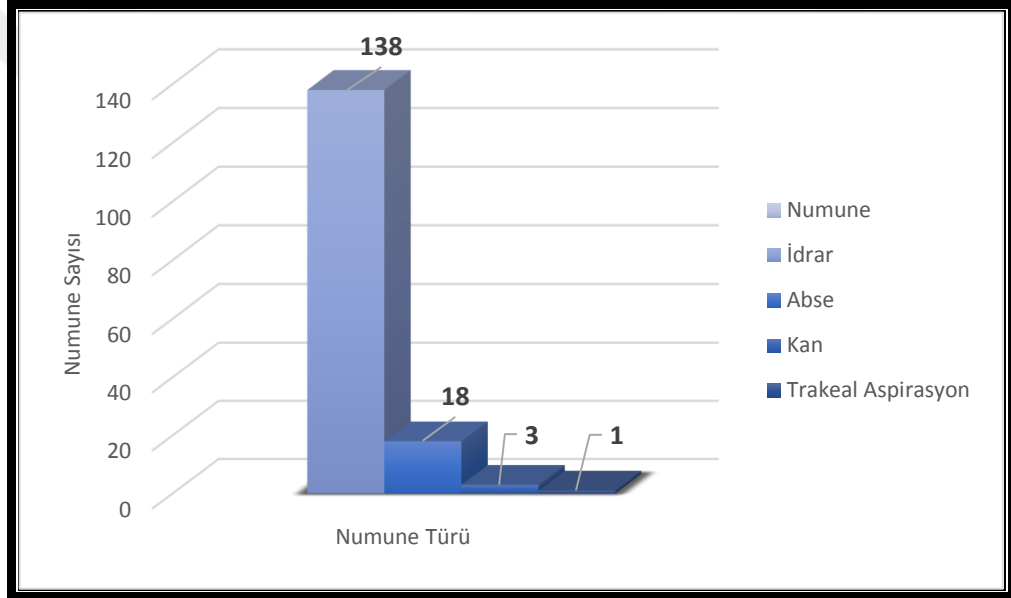
### **3.2.5.8. Veri Analizi**

Çalışmada kayıt altına alınan verilerin istatistiksel analizi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 24.00 programı ile yapıldı. Bireylere ait sosyodemografik bilgiler kaydedildi. Bireylerin demografik bilgilerinden sayısal değişkenler ortalama ve standart sapma değeri ile kategorik değişkenler ise oran değerleri ve frekans tabloları ile gösterildi. Nominal verilere ait kategorik değişkenlerin korelasyon analizi için seçilen korelasyon katsayıları arasında phi korelasyonu kullanımının yaygın olduğu literatürdeki çalışmalarda vurgulanmıştır.<sup>228-230</sup> Bu çalışmada temel hipotez olan ST131 genine ait pozitif ve negatif olma durumlarının ilgili genler ile ilişkisi Phi korelasyon V testi ile incelenmiş ve verilere ait çapraz tablo istatistiklerine yer verilmiştir. Bu çalışmada korelasyon katsayısına ait mutlak değer 0.7 ile 1 arasında ise “yüksek ilişki”, 0.7 ile 0.3 arasında ise “orta ilişki” ve 0.3 ile 0 arasında ise “düşük ilişki” şeklinde nitelendirilmiştir olup  $p < 0.05$  istatistiksel anlamlılık düzeyi olarak kabul edilmiştir.<sup>231</sup> Cinsiyete göre ST131 genine sahip olup olmama arasında anlamlı bir farklılık olup, olmadığını test etmek için ki kare uygunluk testi kullanıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. *E. coli* İzolatların Toplanması

Sağlık Bakanlığı Kütahya Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıp Fakültesi Evliya Çelebi Eğitim ve Araştırma Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarına başvuran, yatan hastalar ve poliklinik hastalarından çeşitli kültür örnekleri toplandı. Çeşitli kültürlerden 160 *E. coli* suşu izole edildi. Bu izolatların %86,25 (138/160) 'i idrar, %11,25 (18/160)'i apse, %1,87 (3/160)'si kan, %0,63 (1/160)'ü trakeal aspirasyon kültürlerinden izole edildi (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *E. coli* izolatlarının klinik örneklere göre dağılımlar

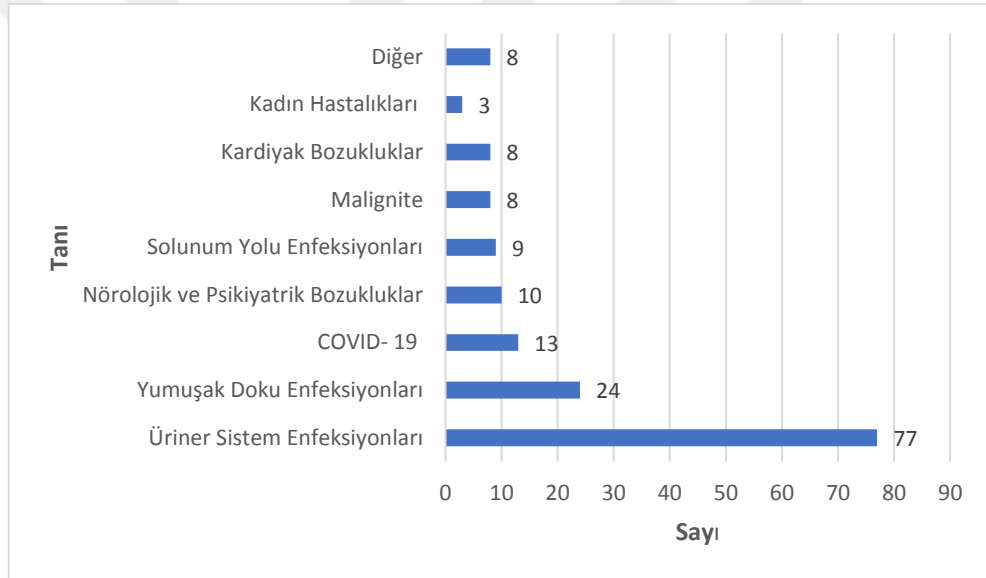
### 4.2. *E. coli* İzolatların Ait Olduğu Hastaların Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışmaya dahil edilen toplam 160 hastanın, 116'sı (%72,5) kadın, 44'ü (%27,5) erkek olduğu tespit edildi. Çalışmaya dâhil edilen hastaların ortalama yaşı 51,73 olarak belirlendi.

160 izolatın %45,63 (n=73)'ü polikliniklerden, %54,37 (n=87)'si servislerden gönderilen örneklerden izole edildi. Hastaların yattığı servislere göre dağılımı; %5,63

(n=9) 'ü acil servis, %7,5 (n=12) 'i cerrahi branş servisleri, %13,12 (n=21)'si yoğun bakım üniteleri, %26,88 (n=43)'i ise dahili branş servisleri, polikliniklere göre dağılımı ise %20,62 (n=33)'si cerrahi branş poliklinikleri, %26,25 (n=42)'i dahili branş poliklinikleri şeklindedir.

Çalışmaya dahil edilen hastaların %48,13 (n=77)'ü üriner sistem enfeksiyonları, %15 (n=24)'i yumuşak doku enfeksiyonları, %8,13 (n=13)'ü COVID- 19 enfeksiyonu, %6,25 (n=10)'i nörolojik ve psikiyatrik bozukluklar, %5,62 (n=9)'si solunum yolu enfeksiyonları, % 5 (n=8) 'i malignite, % 5 (n=8)'i kardiyak bozukluklar, % 1,87 (n=3)'si kadın hastalıkları ile ilgili tanılar ve % 5 (n=8)'inde ise diğer tanılar saptandı (Şekil 4.2).



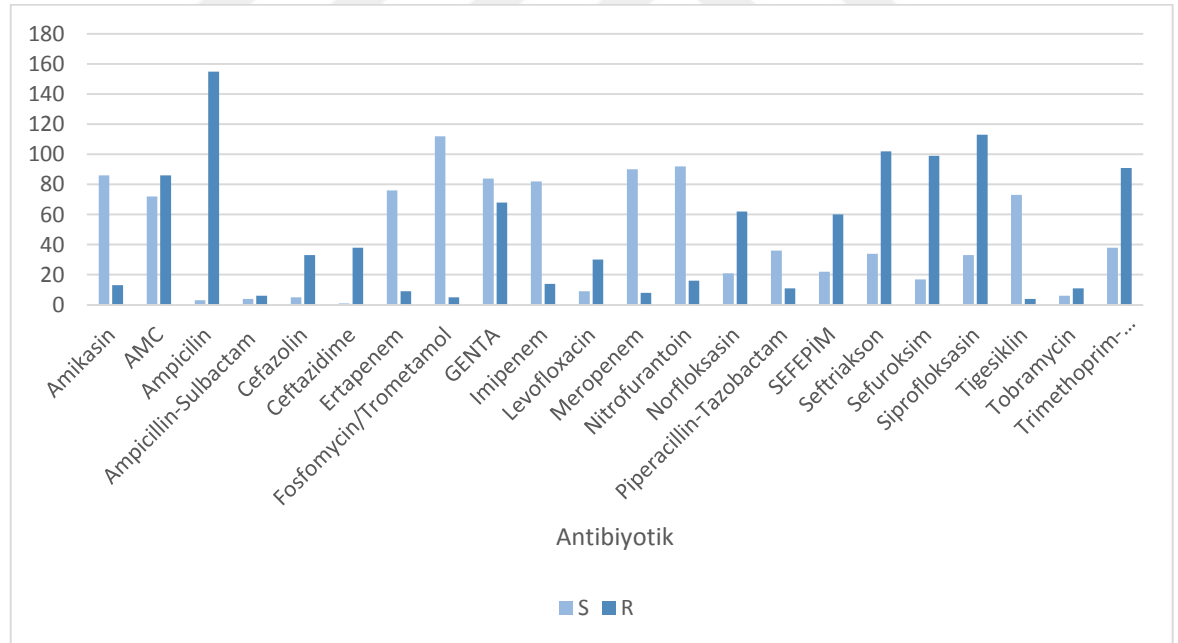
Şekil 4.2. Çalışmaya dahil edilen hastalarda tespit edilen hastalıkların dağılımı

#### 4.3. *E. coli* İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

*E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi disk difüzyon yöntemi ile yapıldı. EUCAST standartlarına göre zon çapları dikkate alınarak duyarlı (S) veya dirençli (R) olarak değerlendirildi. *E. coli* izolatlarının disk difüzyon testi ve GSBL varlığı Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) ile aynı petride değerlendirildi. Bu sonuçlara göre *E. coli* suşlarının 22 farklı antibiyotiğe karşı geliştirdikleri direnç oranları belirlendi.

İzolatlarda duyarlılık test sonuçlarına göre saptanan direnç oranları amikasin %13, amoksisilin-klavunata %54,43, ampisiline %98,1, ampisilin-sulbaktama %60, sefozolin %86,84, seftazidime %90,48, sefepime %73,17, seftriaksona %74,45, sefuroksime %79,2, siprofloksasine %77,4, fosfomisin/trometamole %4,27, gentamisine %44,74, levofloxacin %76,92, nitrofurantoin %14,81, norfloksasine %74,7, piperasilin-tazobaktama %22,45, trimetoprim/sulfametoksazole %70,54, tigesikline %5,2, tobramycine %64,7 olarak tespit edilmiştir. İzolatların altısında karbapenemlere (ertapenem %10,6, imipenem %14,43 ve meropenem %8,08) karşı direnç saptandı (Şekil 4.3).

İzolatlardan 119 (%74,38)'u fenotipik olarak GSBL pozitif, 41 (%25,62)'i GSBL negatif. GSBL pozitif numunelerin %81,52 (97)'i idrar izolatu, %15,12 (18) abse izolatu, %2,52 (3) kan izolatu, %0,84 (1) trakeal aspirasyon izolatıdır.



Şekil 4.3. *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları



#### **4.4. *E. coli* Suşlarında Biyofilm Oluşumu**

*E. coli* suşlarında biyofilm oluşumunun incelenmesi kongo red agar yöntemi, kantitatif cam tüp testi ve kantitatif mikrodilüsyon plak testi ile yapıldı. Biyofilm oluşturan bakterilerin en iyi hangi yöntemle biyofilm oluşturdıklarının belirlenmesi amacıyla çalışılan bakterilerin kongo red agar, kantitatif cam tüp testi, kantitatif mikrodilüsyon plak test yöntemleriyle biyofilm oluşturmalarının karşılaştırılması Tablo 4.8’de verildi.

##### **4.4.1. *E. coli* Suşlarında "Kongo Red Agar yöntemi" İle Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi**

Kongo Red Agara ekimi yapılan 160 numune 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası petrilere siyah koloniler oluşturan suşlar biyofilm pozitif, kırmızı veya pembe renkli koloni oluşturan suşlar ise biyofilm negatif olarak değerlendirildi.<sup>209</sup>

Toplam 160 *E. coli* izolatının % 40, 63 (65)’ü kongo red agar yöntemi ile pozitif olarak tespit edildi. Biyofilm pozitif suşların %76,9 (50)’u GSBL pozitif suşlardı.

##### **4.4.2. *E. coli* Suşlarında "Kantitatif Cam Tüp Testi" İle Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi**

Cam Tüp Test yönteminde inkübasyonun ardından kristal viyole boyası ile boyanarak 540 nm dalga boyunda spektrofotometre cihazında 3 defa okutularak absorbans değerleri ölçüldü.

Toplam 160 *E. coli* izolatının %66,88 (107)’i cam tüp test yöntemi ile pozitif olarak tespit edildi. Bunların %98,13(105)’ü hafif, %1,87(2)’ sinin ise orta şiddette biyofilm oluşturduğu tespit edildi.

#### 4.4.3. *E. coli* Suşlarında " Kantitatif Mikrodilüsyon Plak Test yöntemi " İle Biyofilm Oluşumunun İncelenmesi

Kantitatif mikrodilüsyon plak test yönteminde inkübasyonun ardından kristal viyole boyası ile boyanarak 540 nm dalga boyunda multi pleyt okuyucu cihazında 3 defa okutularak absorbans değerleri ölçüldü.

Toplam 160 *E. coli* izolatının %16,25 (26)'i mikrodilüsyon plak test yöntemi ile pozitif olarak tespit edildi. Bunların %96,15 (25)'i hafif, %3,85(1)'inin ise orta şiddette biyofilm oluşturduğu tespit edildi.

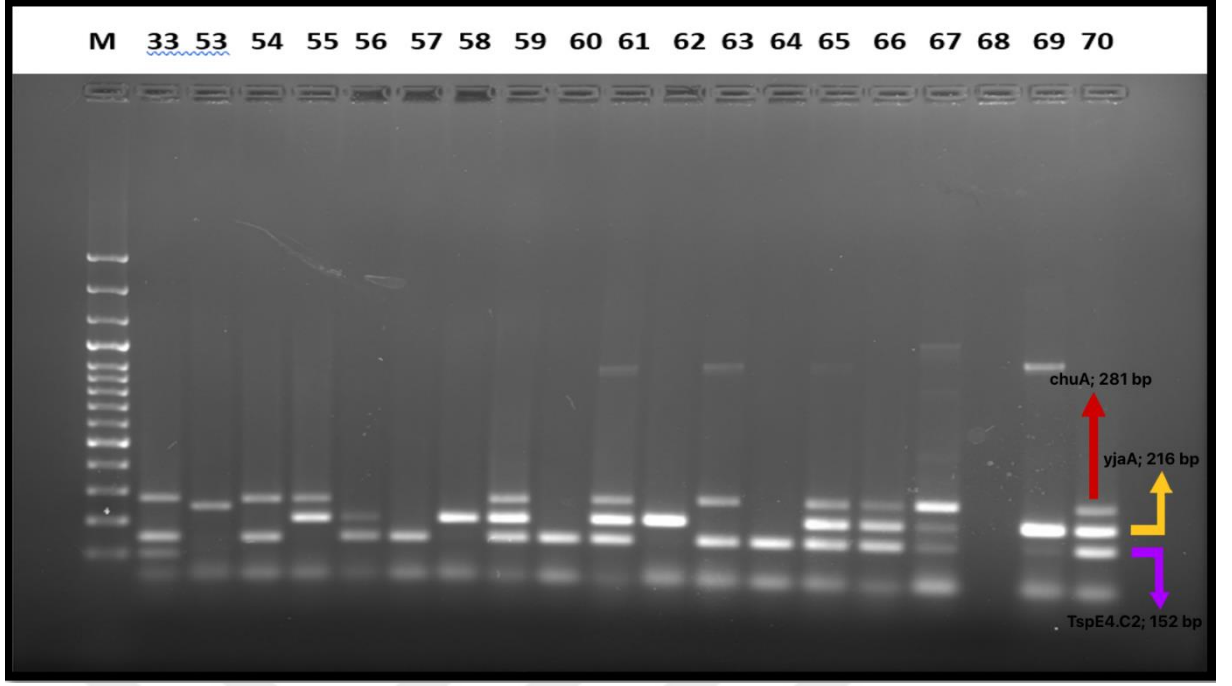
**Tablo 4.1.** *E. coli* Suşlarında Biyofilm Oluşum Sonuçları

<i>YÖNTEM</i>	<i>POZİTİF</i>				<i>NEGATİF</i>	
	<i>Hafif</i>		<i>Orta</i>		<i>n</i>	<i>%</i>
	<i>n</i>	<i>%</i>	<i>n</i>	<i>%</i>		
<b>Kongo Red Agar Yöntemi</b>	16	10	49	30,63	95	59,37
<b>Kantitatif Cam Tüp Testi</b>	105	65,62	2	1,25	53	33,13
<b>Kantitatif mikrodilüsyon plak test</b>	25	15,63	1	0,62	134	83,75

#### 4.5. *E. coli* Suşların Filogenetik sonuçları

İzole edilen *E. coli* suşlarında filogenetik olarak sınıflandırılması için chuA, yjaA ve TSPE4.C2'ye ait genler ile konvansiyonel tripleks PZR yöntemi yapıldı.

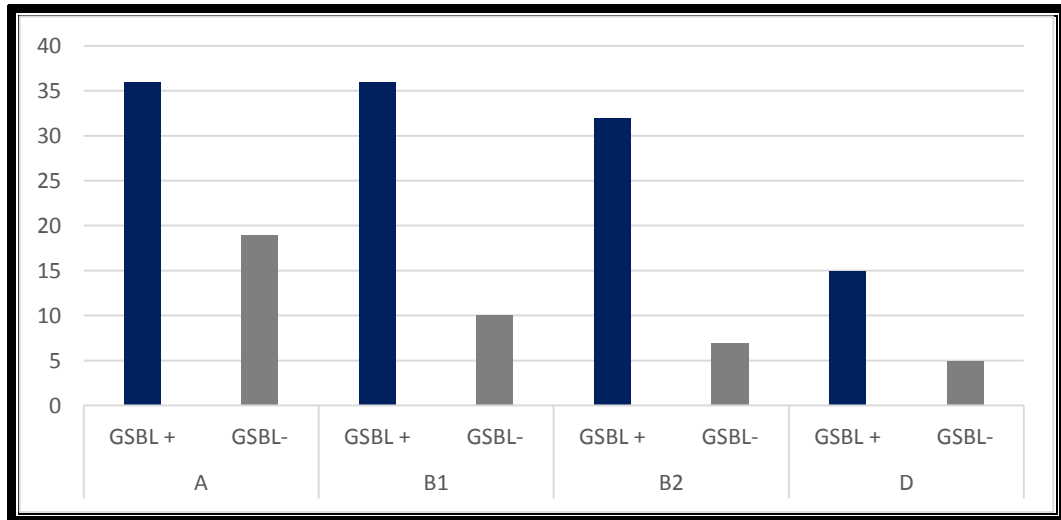
Yapılan tripleks PZR çalışmaları sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforez testinde, 281 bp (chuA geni), 216 bp (yjaA geni) ve 152 bp (TspE4.C2 geni) büyüklüğünde bant oluşumları saptandı (Şekil 4.4).



**Şekil 4.4.** *E. coli* izolatlarının filogenetik gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),33,53-70 *E.coli* izolatları.

Çalışmada tanımlanan 160 *E. coli* izolatının filogenetik tiplendirmesinde A grubunda olanların sayısı %34,37 (55), B1 grubunda olanların sayısı %28,75 (46), B2 grubunda olanların sayısı %24,38 (39) ve D grubunda olanların sayısı %12,5 (20) olarak belirlendi.

GSBL pozitif suşların %30,25 (36) 'i A grubu, %30,25(36) 'i B1, %26,89 (32)'u B2 grubu ve %12,60(15)'i D grubu olarak tespit edildi (Şekil 4.5).

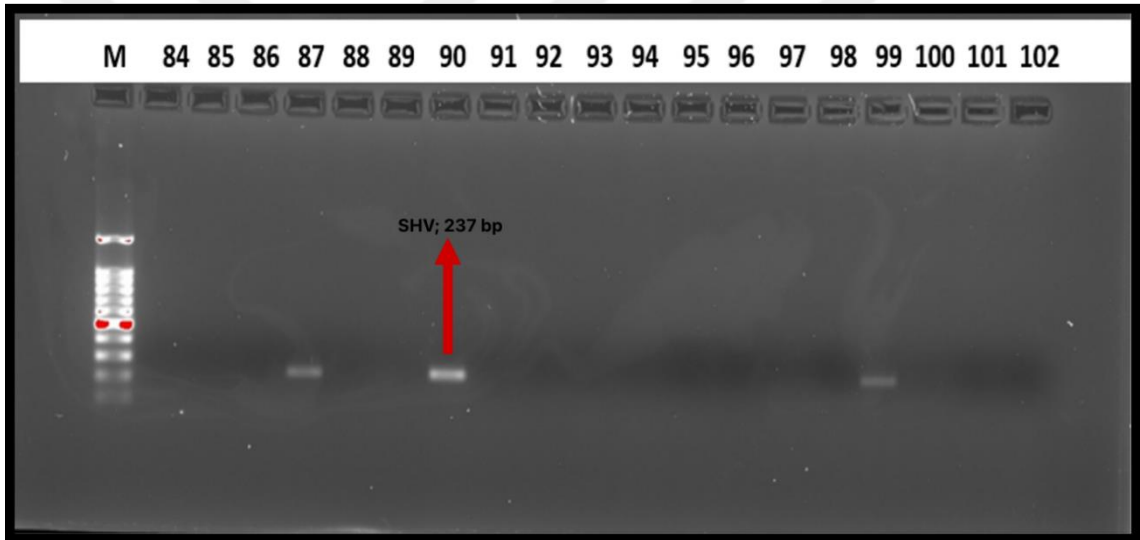


**Şekil 4.5.** *E. coli* suşlarının filogenetik sonuçları

#### 4.6. *E. coli* Suşlarının GSBL Direnç Genlerinin Sonuçları

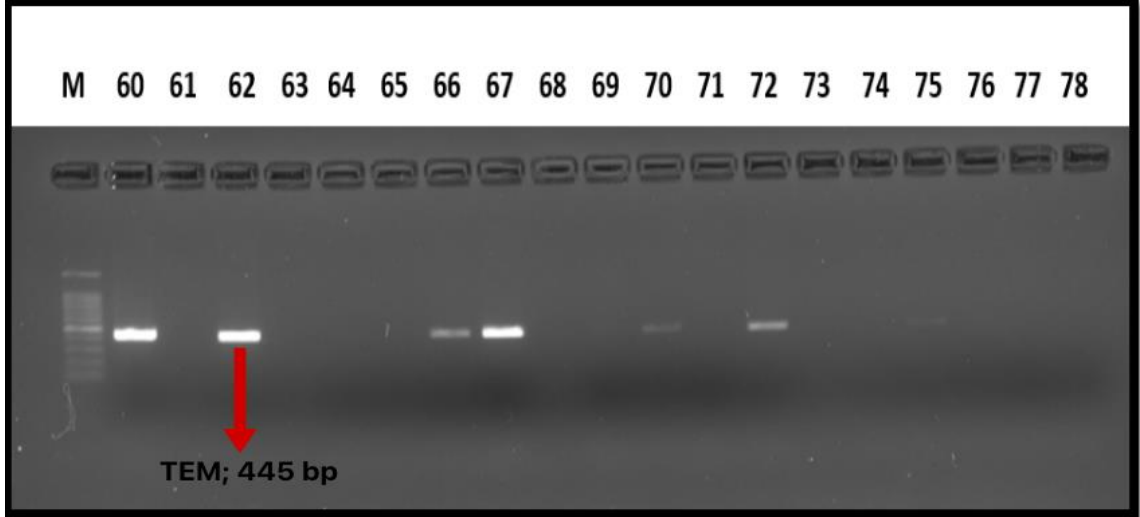
İzole edilen toplam 160 *E. coli* suşlarında GSBL direnç genleri konvansiyonel PZR yöntemi ile analiz edildi. Bu amaçla, GSBL pozitifliğinden sorumlu olan en yaygın gen bölgeleri (CTX-M, TEM, SHV ve OXA) çalışıldı.

Yapılan PZR çalışmaları sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforez testinde, 237 bp uzunluğunda amplifiye ürünler SHV geni (Şekil 4.6), 445 bp uzunluğunda amplifiye ürünler TEM geni (Şekil 4.7), 593 bp uzunluğunda amplifiye ürünler CTX-M geni (Şekil 4.8) ve 885 bp uzunluğunda amplifiye ürünler OXA geni (Şekil 4.9) varlığında bant oluşumları saptandı.



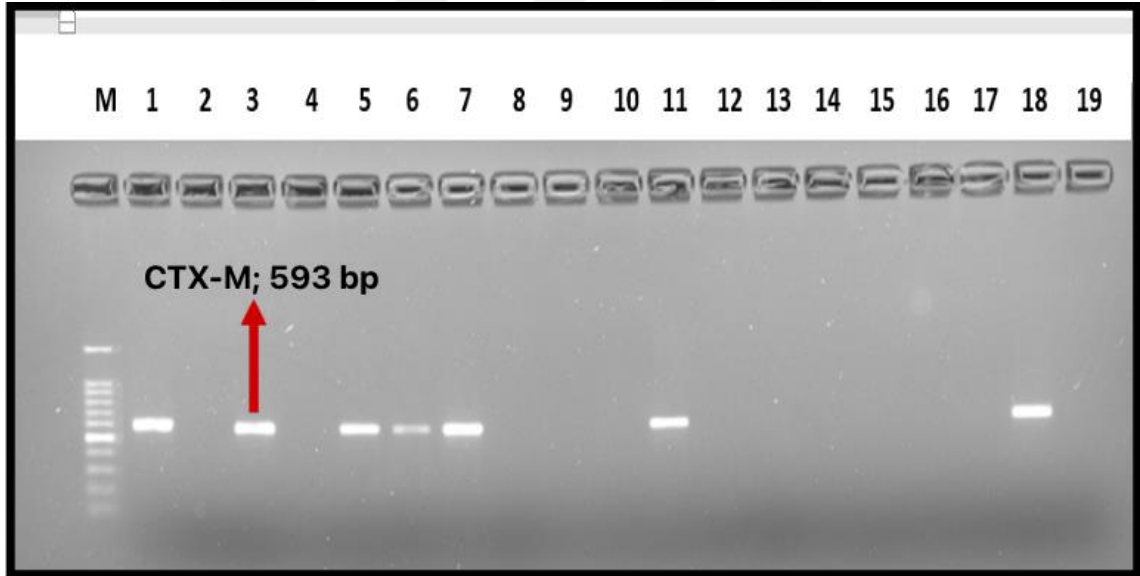
**Şekil 4.6.** *E. coli* izolatlarının SHV gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp), 84-102 *E. coli* izolatları.

Çalışmaya dahil edilen 160 izolatın %6,88 (11) 'inde SHV pozitifliği, %93,12 (149) 'sinde SHV negatifliği tespit edildi.



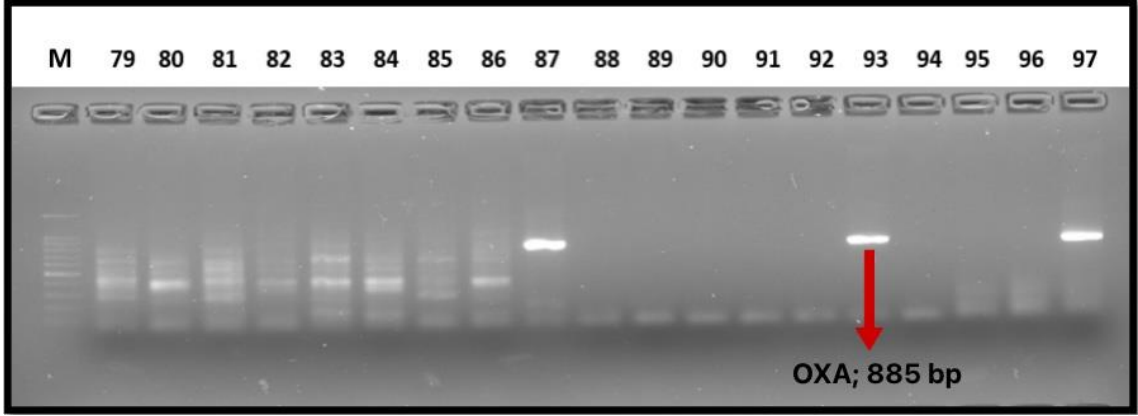
**Şekil 4.7.** *E. coli* izolatlarının TEM gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),60-78 *E.coli* izolatları.

Çalışmaya dahil edilen 160 izolatın %51,25 (82) 'inde TEM pozitifliği, %48,75 (78)'inde TEM negatifliği tespit edildi.



**Şekil 4.8.** *E. coli* izolatlarının CTX-M gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),1-19 *E.coli* izolatları.

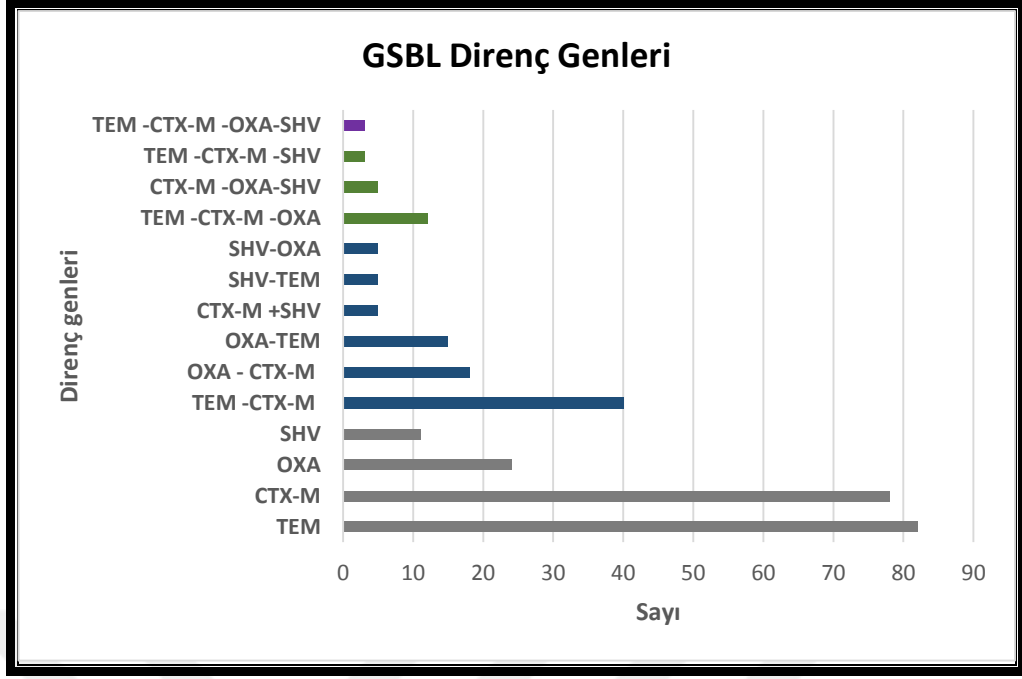
Çalışmaya dahil edilen 160 izolatın %48, 75 (78) 'inde CTX-M pozitifliği, %51,25(82)'inde CTX-M negatifliği tespit edildi.



**Şekil 4.9.** *E. coli* izolatlarının OXA gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),79-97 *E.coli* izolatları.

Çalışmaya dahil edilen 160 izolatın %15 (24) 'inde OXA pozitifliği, %85 (136)'inde OXA negatifliği tespit edildi.

Çalışmada tanımlanan 160 izolat içerisinde en yaygın direnç geni 82 (%51,25) izolatta TEM olup, bunu 78 (%48, 75) izolat ile CTX-M, 24 (%15) izolat ile OXA ve 11 (%6,88) izolat ile SHV izledi (Şekil 4.10). Tanımlanan 160 izolat arasından 126 (%78,75)'sında bir veya birden fazla direnç geni saptanırken, 34 (%21,25) izolatta çalışılan direnç genlerinden hiçbirine rastlanmadı. İzolatların 5 (%3,13) 'inde CTX-M ile SHV, 5 (%3,13) 'inde SHV ile TEM, 5 (%3,13) 'inde SHV ile OXA, 15 (%9,37)'inde TEM ile OXA, 18 (%11,25)'inde OXA ile CTX-M ve 40(%25)'inde TEM -CTX-M birlikte görülmüş olup,3(1,87) izolatla ise her dört direnç geni saptandı (Şekil 4.10).

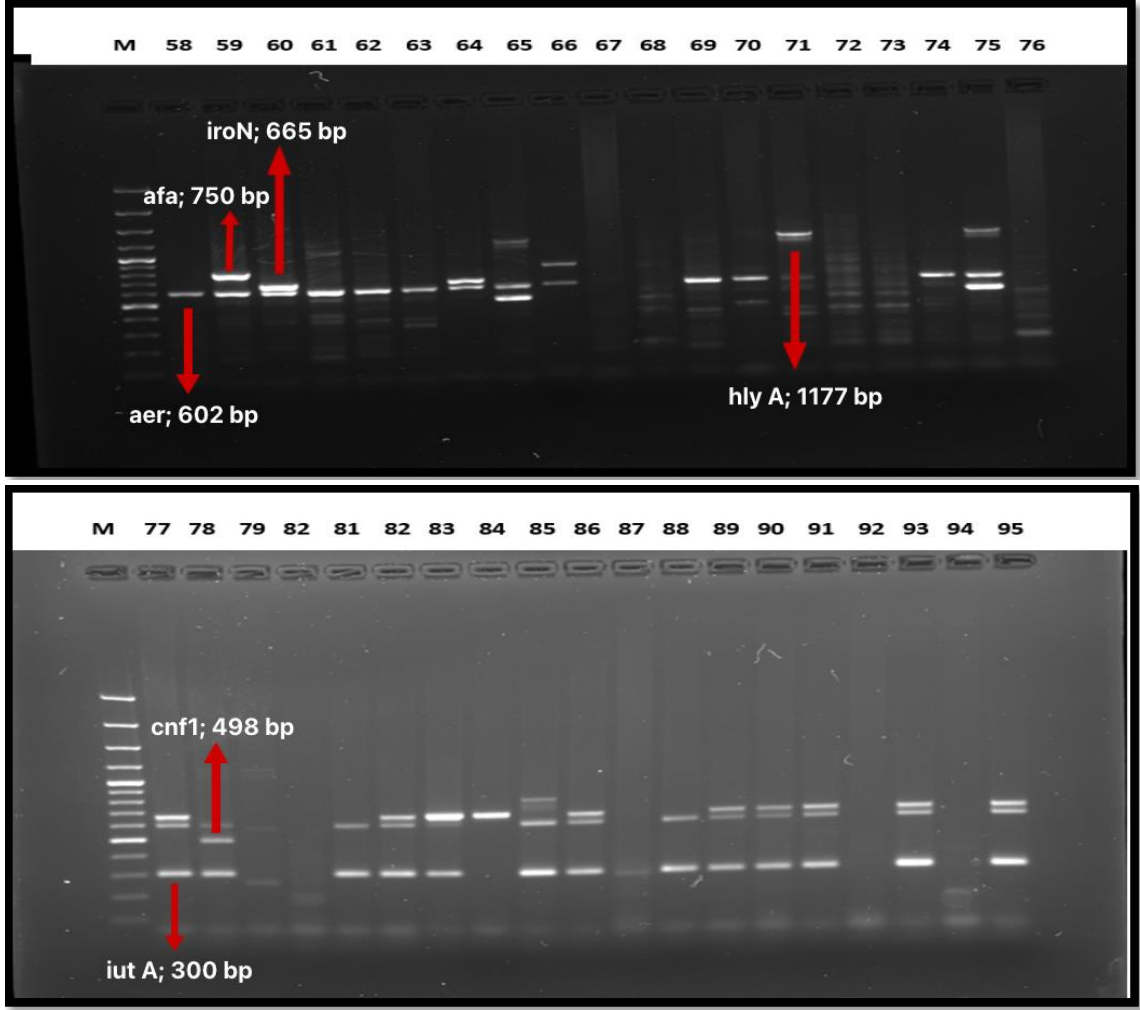


**Şekil 4.10.** GSBL direnç genlerinin bulunma sıklığı

#### 4.7. *E. coli* Suşların Virulans Genlerinin Sonuçları

İzole edilen *E. coli* izolatlarının virulans genleri üç grup halinde incelendi. Birinci grupta, iutA, sfa cnf-1, aer, iroN, afa, hlyA; ikinci grupta, pap A, pap C, fim A, PAI, ompT, iucC ve üçüncü grupta ise traT ve iss genleri olacak şekilde PCR reaksiyonuna tabi tutuldu.

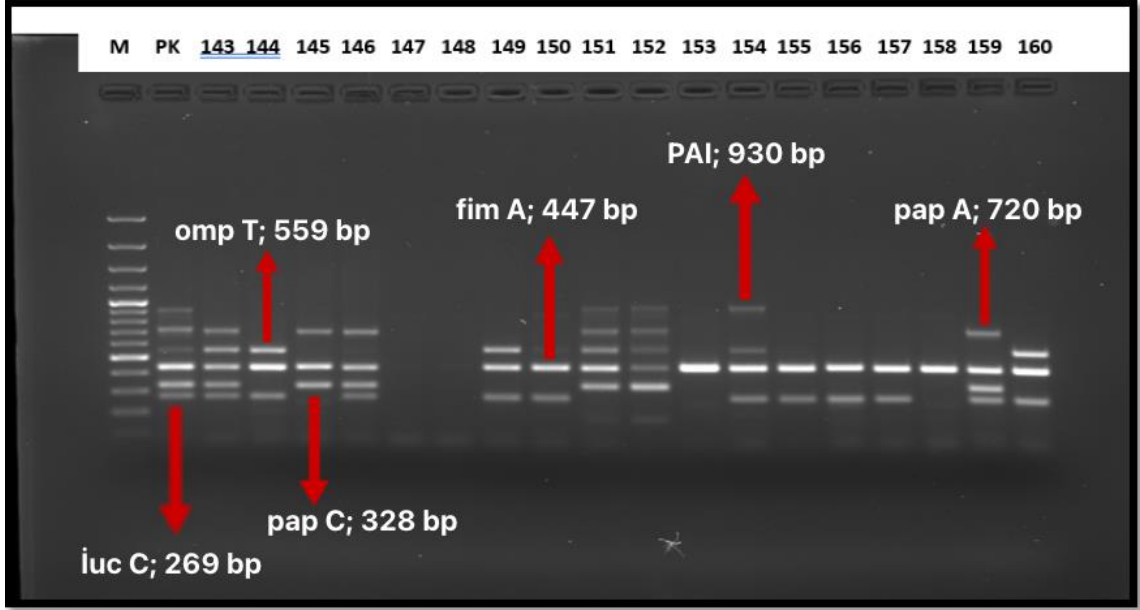
Yapılan birinci grup PZR çalışmaları sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforez testinde, 300 bp uzunluğunda amplifiye ürünler iut A geni, 410 bp uzunluğunda amplifiye ürünler sfa geni, 498 bp uzunluğunda amplifiye ürünler cnf1 geni, 602 bp uzunluğunda amplifiye ürünler aer geni, 665 bp uzunluğunda amplifiye ürünler iroN geni, 750 bp uzunluğunda amplifiye ürünler afa geni ve 1177 bp uzunluğunda amplifiye ürünler hly A geni varlığında bant oluşumları saptandı (Şekil 4.11).



**Şekil 4.11.** *E. coli* izolatlarının 1.grup virülans gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),58-95 ile *E.coli* izolatları.

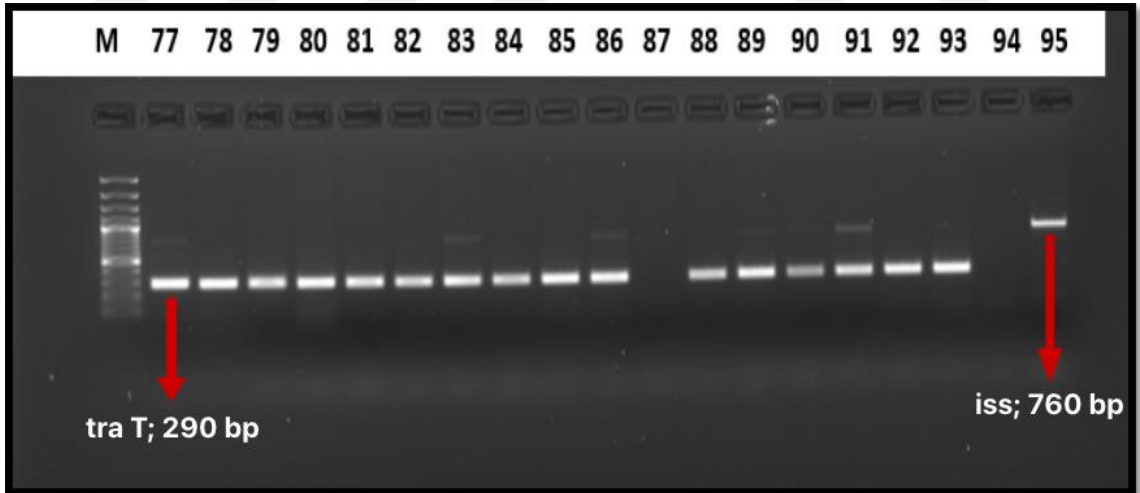
Yapılan ikinci grup PZR çalışmaları sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforez testinde, 720 bp uzunluğunda amplifiye ürünler pap A geni, 328 bp uzunluğunda amplifiye ürünler pap C geni, 447 bp uzunluğunda amplifiye ürünler fim A geni, 930 bp uzunluğunda amplifiye ürünler PAI geni, 559 bp uzunluğunda amplifiye ürünler omp T geni ve 269 bp uzunluğunda amplifiye ürünler iuc C geni varlığında bant oluşumları saptandı (Şekil 4.12).





**Şekil 4.12.** *E. coli* izolatlarının 2.grup virülans gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),143-160 *E.coli* izolatları.

Yapılan üçüncü grup PZR çalışmaları sonrasında gerçekleştirilen agaroz jel elektroforez testinde, 760 bp uzunluğunda amplifiye ürünler iss geni, 290 bp uzunluğunda amplifiye ürünler tra T geni varlığında bant oluşumları saptandı (Şekil 4.13).



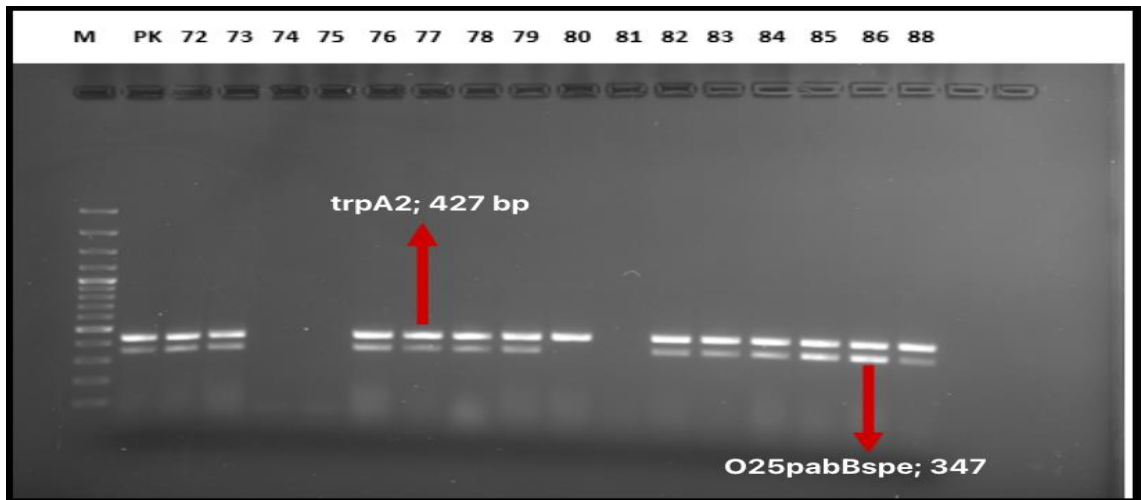
**Şekil 4.13.** *E. coli* izolatlarının 3.grup virülans gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),77-95 *E.coli* izolatları.

Çalışmada tanımlanan 160 izolat arasında sıklıkla rastlanan gen bölgeleri sırasıyla; %76,87 (123) Tip I fimbriya'yı ifade eden adhezyondan sorumlu fim A, %66,87 (107) serum komplementine direnç geliştirmeden sorumlu tra T, % 60 (96) demir alımının

kodlanmasından sorumlu iuc, %59,37(95) oranında siderofor tiplerinden ferrik aerobaktin üretiminden sorumlu olan iutA, %53,75(86) aerobaktin üretiminden sorumlu olan aer, %38,12(61) salmochelin sideroforunun üretiminden sorumlu olup üroteliyel hücrelerde invazyona neden olan iroN, %37,5 (60) serum komplementine direnç geliştirmeden sorumlu omp A , %30,62 (49) yapışma/bozma lezyonları oluşturma kapasitesinden ve virülans faktörlerinin kodlanmasından sorumlu PAI, % 26,25 (42) ve %25,62 (41) piyelonefrit ile ilişkili pilusu ifade eden adhezyondan sorumlu pap A ve pap C, %13,75(22) S fimbria'yı ifade eden adhezyondan sorumlu sfa, %10 (16) serum komplementine direnç geliştirmeden sorumlu iss, %7,5(12) afimbrial adezinleri ifade eden adhezyondan sorumlu afa gen bölgesi tespit edildi. İzolatlar arasında en az görülen virülans gen bölgesi ise; %3,75 (6) oranında hemolizinden sorumlu olan hly gen bölgesidir.

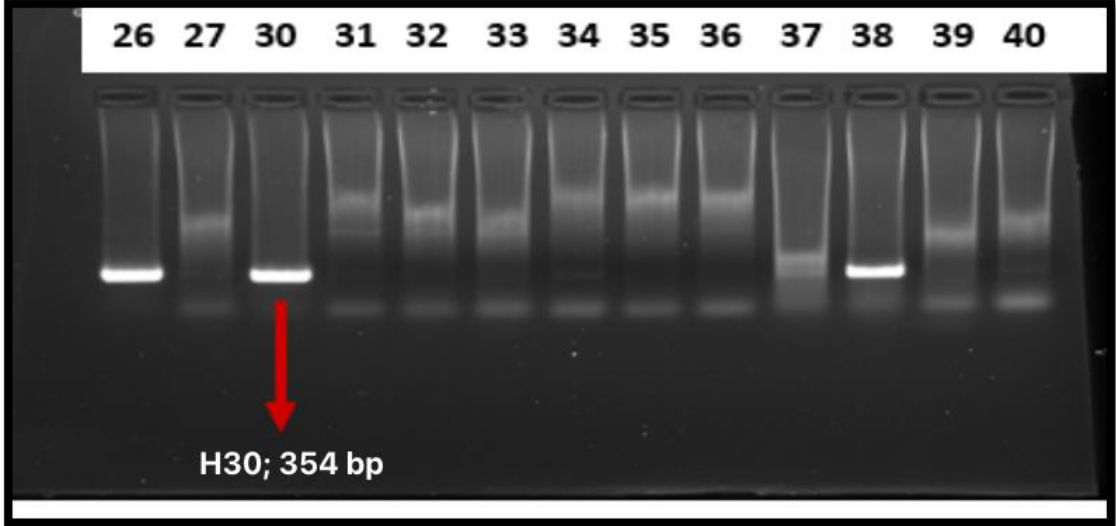
#### 4.8. *E. coli* İzolatlarında ST131 Klonu ve Alt Klonlarının Moleküler Sonuçları

İzole edilen *E. coli* izolatlarının ST131 Klon varlığı için önce O25pabSpe ve trpA2 varlığı mütipleks PZR ile incelendi. Çalışmada tanımlanan 160 izolatın % 69,38 (111)'i ST131 (O25pabSpe ve trpA2) pozitif, %21,25 (34)'i sadece trpA2 pozitif ve %9,38(15)'i negatif olarak belirlendi (Şekil 4.14).



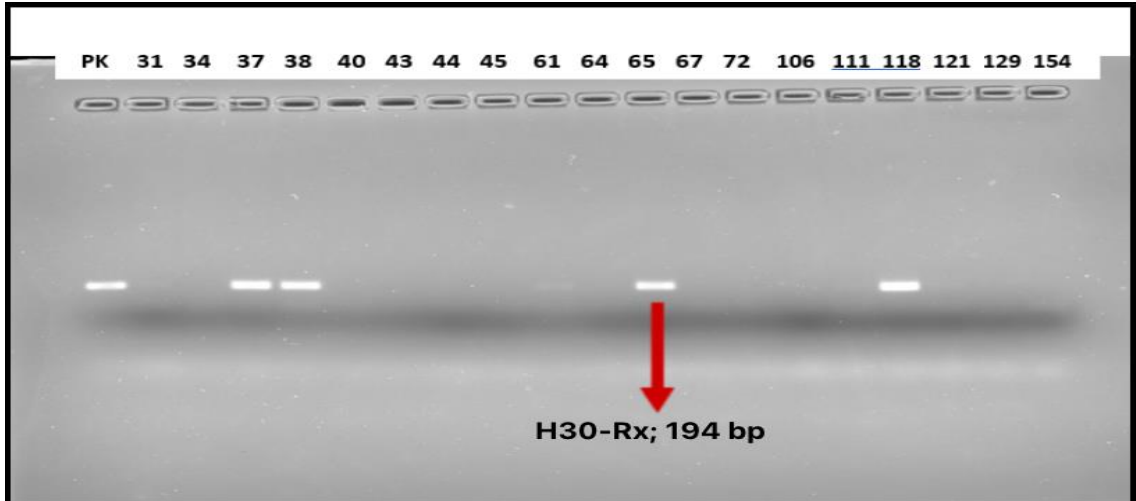
Şekil 4.14. *E. coli* izolatlarının ST 131 gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp),72-88 *E.coli* izolatları.

ST 131 gen varlığı için incelenen *E. coli* izolatlarında O25pabBspe ve trpA2 varlığı görülen 111 örnekte H30 alt klonu varlığı açısından incelendi. İncelenen 111 izolatın %30,63 (34)'ünde H30 alt klonu tespit edildi (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. *E. coli* izolatlarının H30 alt klonu gen bölgelerine ait jel görüntüleri. M, Moleküler marker (100-1500 bp), 26-40 *E. coli* izolatları.

H30 alt klonu varlığı görülen 34 *E. coli* izolatı H30-Rx varlığı açısından incelendi. 34 izolatla %29,41 (10)'ünde H30-Rx alt klonu tespit edildi (Şekil 4.16).

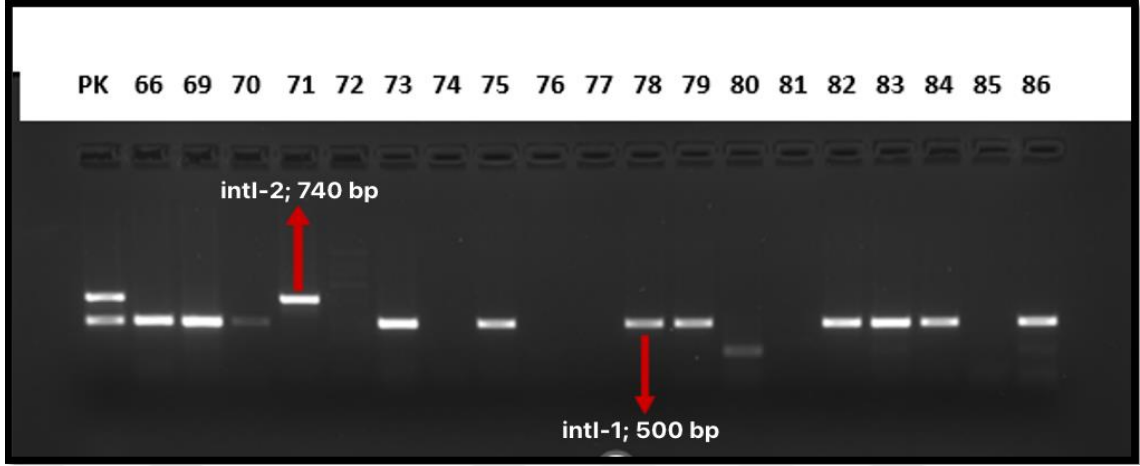


Şekil 4.16. *E. coli* izolatlarının H30-Rx alt klonu gen bölgelerine ait jel görüntüleri

#### 4.9. İntegraz Genlerinin ve İntegron Varlığının Belirlenmesi

İzole edilen *E. coli* izolatlarının sınıf 1 ve sınıf 2 integronun integraz gen bölgelerine ait integraz gen varlığı multiplex PZR ile incelendi. 160 *E. coli* izolatının

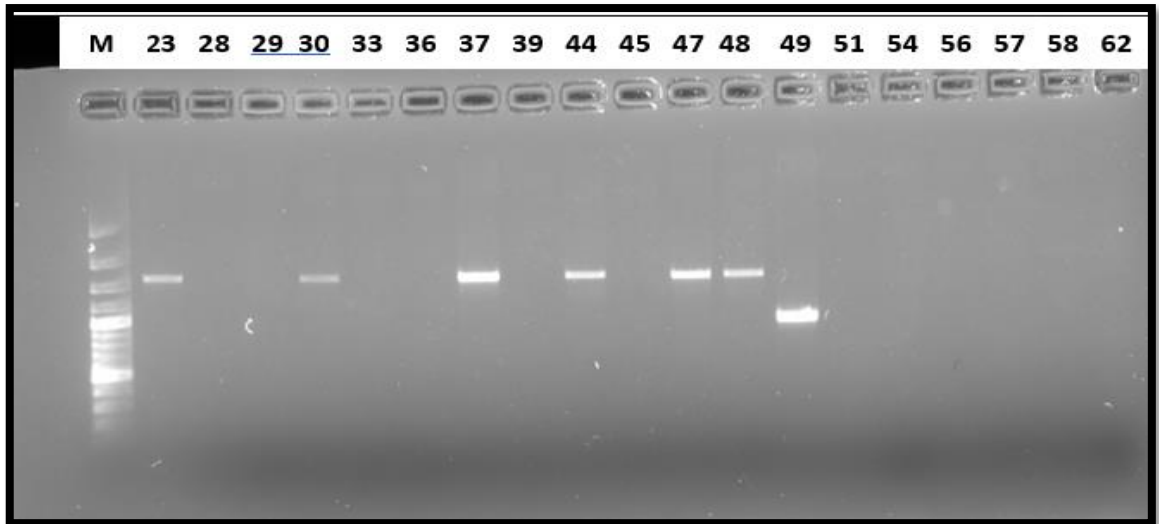
%61,87 (99) si intI-1,% 6,25 (10) intI-2 ve %5(8)'inde ise her iki gen birlikte tespit edildi (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. intI-1 ve intI-2 gen bölgelerine ait jel görüntüleri.

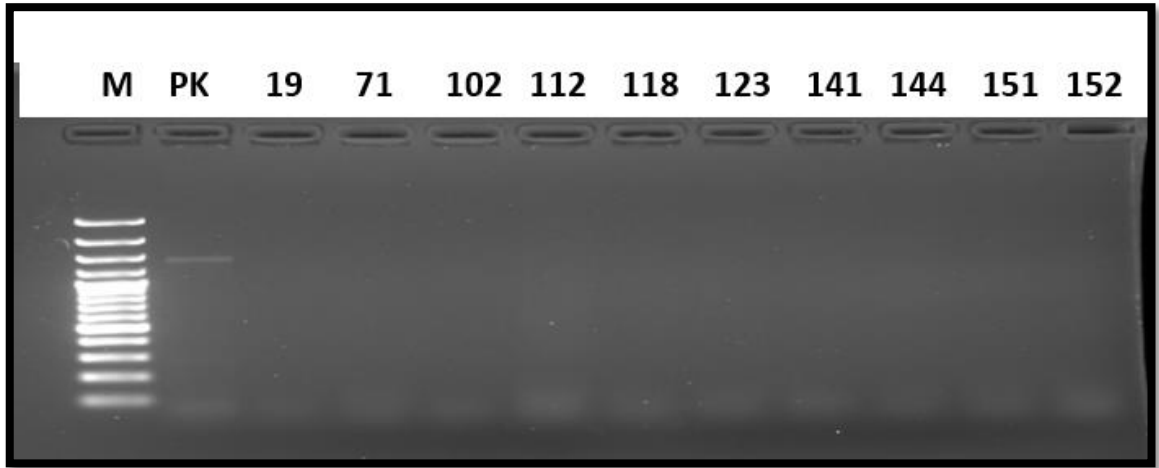
İntegraz gen (intI-1 ve intI-2) pozitif çıkan örneklerde sınıf 1 ve sınıf 2 integron değişken bölgelerine ait spesifik primerler kullanılarak integron varlığı belirlendi.

intI-1 pozitif çıkan 99 *E.coli* izolatında % 30,30 (30)'unda 5'CS ve 3'CS primerleri kullanılarak sınıf 1 integron varlığı saptandı. Kalan 69 (%69,70) izolatın boş integron içerdikleri belirlendi (Şekil 4.18).



Şekil 4.18. Sınıf 1 integron gen bölgelerine ait jel görüntüleri.

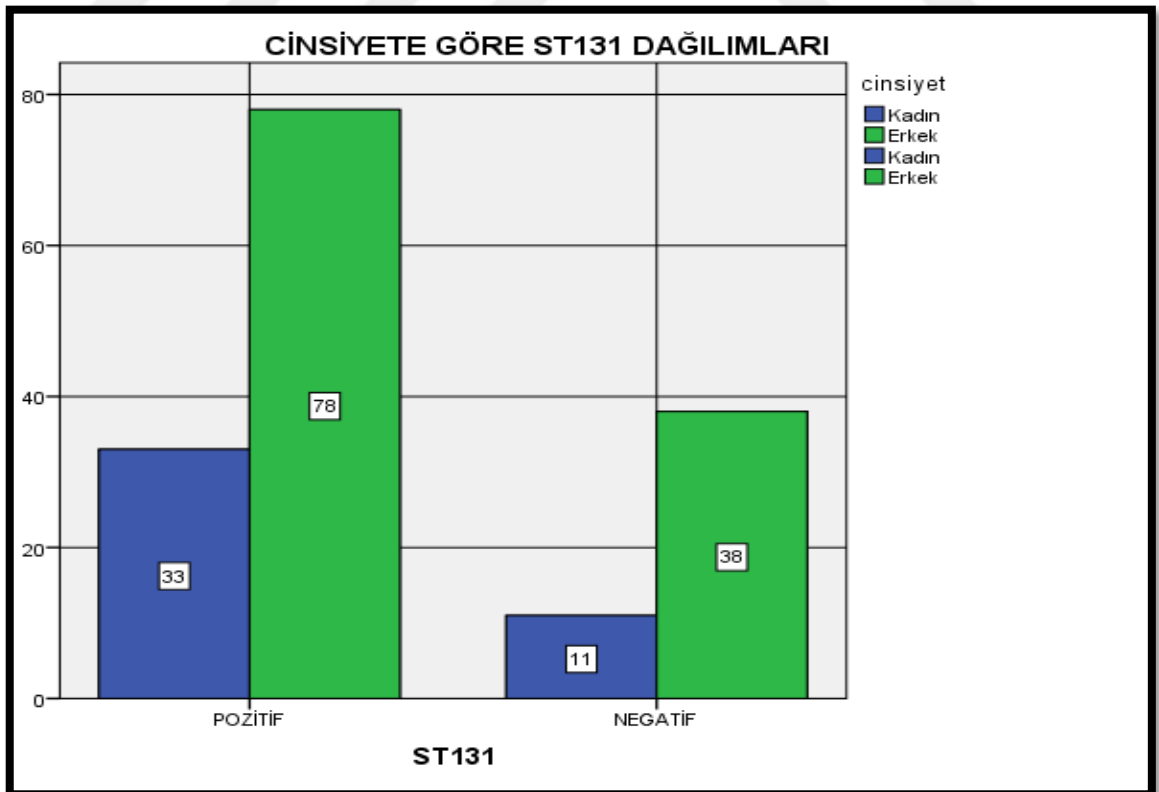
intI-2 pozitif çıkan 10 *E.coli* izolatında hep51 ve hep74 primerleri kullanılarak Sınıf 2 integron varlığı incelendi ve Sınıf 2 integron genine rastlanmadı (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Sınıf 2 integron gen bölgelerine ait jel görüntüleri.

#### 4.10. Araştırmanın İstatistiksel Çalışmalarına İlişkin Bulgular

Çalışmada yüksek riskli ST131 klonu pozitif çıkan hastaların % 70,27 (78/111)'si kadın, %29,73 (33/111)'ü ise erkek hasta olarak görüldü (Şekil 4.20). Yapılan  $X^2$  uygunluk testi sonrasında kadın ve erkek cinsiyete sahip olmak ve ST131 klonuna sahip olmak arasında frekans değerleri bakımından anlamlı bir fark elde edilemedi ( $p > 0.05$ ).



Şekil 4.20. ST131 klonunun cinsiyetlere göre dağılımı

ST131 ve antibiyotik dirençleri arasındaki ilişki incelendiğinde ST131 geni ile ertapenem, fosfomisin, meropenem, nitrofurontain arasında pozitif yönlü güçlü korelasyonlar saptandı ( $p < 0.05$ ). ST131 geni ile amikasin, AMC, ampisilin-sulbaktam, cefazolin, ceftazidim, gentamisin imipenem, levofloksasin, norfloksasin, piperasilin/tazobaktam, sefepim, seftriakson, sefuroksim siprofloksasin, tigesiklin, trimetoprim-sulfametaksazol arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı belirlendi ( $p > 0.05$ ). (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** ST131 ve antibiyotikler arasındaki ilişki

n=160						
<b>Amikasin</b>						
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>	Total	p	$\phi/r\phi$
ST131	<i>POZİTİF</i>	11	57	68	0.169	0.138
	<i>NEGATİF</i>	2	30	49		
Total		13	87	100		
<b>AMC</b>						
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	58	53	111	0.398	0.067
	<i>NEGATİF</i>	28	19	47		
Total		86	72	158		
<b>Ampisilin Sulbaktam</b>						
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	5	3	8	0.747	0.102
	<i>NEGATİF</i>	1	1	2		
Total		6	4	10		
<b>Cefazolin</b>						
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	25	4	29	0.835	-0.034
	<i>NEGATİF</i>	8	1	9		
Total		33	5	38		
<b>Ceftazidim</b>						
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>	Total	p	$\phi/r\phi$
ST131	<i>POZİTİF</i>	25	2	27	0.975	0.005
	<i>NEGATİF</i>	13	1	14		
Total		38	3	41		
<b>Ertapenem</b>						
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	2	54	56	0.003*	0.317
	<i>NEGATİF</i>	7	22	29		
Total		9	76	85		

**Tablo 4.2.** (Devamı)

		<b>Fosfomisin</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	1	83	84	0.009*	0.243
	<i>NEGATİF</i>	4	29	33		
Total		5	112	117		
		<b>Gentamisin</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	51	54	105	0.155	-0.115
	<i>NEGATİF</i>	17	30	47		
Total		68	84	152		
		<b>İmipenem</b>		Total	p	φ/rφ
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	6	62	68	0.16	0.244
	<i>NEGATİF</i>	8	21	29		
Total		14	83	97		
		<b>Levofloksasin</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	24	6	30	0.405	0.133
	<i>NEGATİF</i>	6	3	9		
Total		30	9	39		
		<b>Meropenem</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	1	67	68	0.001*	0.359
	<i>NEGATİF</i>	7	24	31		
Total		8	91	99		
		<b>Nitrofurontain</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	6	68	74	0.004*	-0.279
	<i>NEGATİF</i>	10	24	34		
Total		16	92	108		
		<b>Norfloksasin</b>		Total	p	φ/rφ
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	44	15	59	0.968	0.004
	<i>NEGATİF</i>	18	6	24		
Total		62	21	83		
		<b>Piperasilin/Tazobaktam</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	7	28	35	0.516	0.093
	<i>NEGATİF</i>	4	10	14		
Total		11	38	49		
		<b>Sefepim</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	42	14	56	0.583	0.061
	<i>NEGATİF</i>	18	8	26		
Total		60	222	82		

**Tablo 4.2.** (Devamı)

		<b>Seftriakson</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	71	25	96	0.839	-0.017
	<i>NEGATİF</i>	31	10	41		
	Total	102	35	137		
		<b>Sefuroksim</b>		Total	p	φ/rφ
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	69	17	86	0.673	0.038
	<i>NEGATİF</i>	30	9	39		
	Total	99	26	125		
		<b>Siprofloksasin</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	83	19	102	0.080	0.145
	<i>NEGATİF</i>	30	14	44		
	Total	113	33	146		
		<b>Tigesiklin</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	2	51	53	0.906	0.014
	<i>NEGATİF</i>	1	22	23		
	Total	3	73	76		
		<b>Trimetoprim-Sulfametaksazol</b>		Total		
		<i>Dirençli</i>	<i>Duyarlı</i>			
ST131	<i>POZİTİF</i>	60	29	89	0.245	-0.102
	<i>NEGATİF</i>	31	9	40		
	Total	91	38	129		

ST131 klonu ve filogenetik özellikler arasındaki ilişki incelendiğinde bu genin en fazla A (%36,03) grubunda pozitif olduğu belirlendi. Bunu sırasıyla B1 grubu (%29,73), B2 grubu (%25,23) ve D grubu (%9,01) izlemekteydi. Farklı filogenetik gruplarda olmak ve ST131 klonuna sahip olmak arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki saptanmadı ( $p>0.05$ ). (Tablo 4.7).



**Tablo 4.3.** ST131 klonu ve Filogenetik özellikler arasındaki ilişki

		n=160						
		FİLOGENETİK				Total	p	$\phi/r\phi$
		A	B1	B2	D			
		GRUBU	GRUBU	GRUBU	GRUBU			
ST131	POZİTİF	40	33	28	10	111		
	NEGATİF	15	13	11	10	49	0.159	0.256
	Total	55	46	39	20	160		

Çalışmada yüksek riskli ST131 klonu pozitif çıkan numunelerin %73,87 (82/111)'sinde GSBL pozitif olarak tespit edildi (Tablo 4.8). ST131 klonu ve GSBL arasındaki ilişki incelendiğinde istatistiksel olarak anlamlı ilişki olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.4.** ST131 klonu ve GSBL arasındaki ilişki

		n=160				
		GSBL		Total	p	$\phi/r\phi$
		Pozitif	Negatif			
ST131	POZİTİF	82	29	111		
	NEGATİF	37	12	49	0.827	0.017
	Total	119	41	160		

$\phi/r\phi$ : Phi korelasyon katsayısı

ST131 klonu pozitif çıkan numunelerin %25,23 (28/111)'sinde herhangi bir direnç genine rastlanmazken, %74,77 (83/111)'sinde ise en az bir direnç geni tespit edildi. ST131 klonu pozitif numunelerin %1,80 (2/111)'inde SHV geni, %13,51 (15/111)'inde OXA geni, %45,04 (50/111)'ünde CTX-M geni ve %51,35 (57/111)'inde TEM genine rastlandı (Tablo 12). ST131 klonu ve direnç genleri arasındaki ilişki incelendiğinde ise SHV ile pozitif yönlü çok güçlü korelasyon saptandı ( $p<0.005$ ). ST131 klonu ve CTX-M, TEM, OXA genleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.5.** ST131 klonu ve direnç genleri arasındaki ilişki

n=160						
<b>CTX-M</b>						
		<i>Pozitif</i>	<i>Negatif</i>	Total	p	$\phi/r\phi$
ST131	<i>POZİTİF</i>	50	61	111	0.168	0.112
	<i>NEGATİF</i>	28	21	49		
	Total	78	82	160		
<b>SHV</b>						
		<i>Pozitif</i>	<i>Negatif</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	2	109	111	0.001**	0.803
	<i>NEGATİF</i>	9	40	49		
	Total	11	149	160		
<b>TEM</b>						
		<i>Pozitif</i>	<i>Negatif</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	57	54	111	0.959	0.003
	<i>NEGATİF</i>	25	24	49		
	Total	82	78	160		
<b>OXA</b>						
		<i>Pozitif</i>	<i>Negatif</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	15	96	111	0.428	-0.063
	<i>NEGATİF</i>	9	40	49		
	Total	24	136	160		

$\phi/r\phi$ : Phi korelasyon katsayısı

ST131 klonu pozitif çıkan numunelerde en çok fim A (90) geni olmak üzere sırasıyla, tra t (78), iut A (70), iuc C (69), aer (66), iroN (45), ompT (42), PAI (34), pap A (33), pap C (32), cnf-1(23), sfa (15), iss (13), hlyA (6), afa (4) geni görüldü. ST131 klonu pozitif numunelerin %95,5 (106/111)'inde en az bir virülans geni görülürken, %4,5 (5/111)'inde ise herhangi bir virülans geni görülmedi (Tablo 4.10). ST131 klonu ve virülans genleri arasındaki ilişki incelendiğinde ST131 geni ile fimA, afa, aer genleri arasında pozitif yönlü güçlü korelasyonlar saptandı ( $p<0.05$ ). ST131 geni ile iut A, iss,

tra T, iucC, ompT, PAI, pap C, pap A, hlyA, iroN, cnf-1, sfa arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.6.** ST131 klonu ve virulans genleri arasındaki ilişki

		<b>iutA</b>		Total	p	$\phi/r\phi$
		VAR	YOK			
ST131	<i>POZİTİF</i>	70	25	95	0.113	0.153
	<i>NEGATİF</i>	41	24	65		
	Total	111	49	160		
		<b>iss</b>		Total	p	$\phi/r\phi$
		VAR	YOK			
ST131	<i>POZİTİF</i>	13	98	111	0.277	0.086
	<i>NEGATİF</i>	3	46	49		
	Total	16	144	160		
		<b>tra T</b>		Total	p	$\phi/r\phi$
		VAR	YOK			
ST131	<i>POZİTİF</i>	78	33	111	0.109	0.170
	<i>NEGATİF</i>	29	20	49		
	Total	107	43	160		
		<b>iuc C</b>		Total	p	$\phi/r\phi$
		VAR	YOK			
ST131	<i>POZİTİF</i>	69	42	111	0.401	0.066
	<i>NEGATİF</i>	27	22	49		
	Total	96	64	160		
		<b>ompT</b>		Total	p	$\phi/r\phi$
		VAR	YOK			
ST131	<i>POZİTİF</i>	42	69	111	0.894	0.011
	<i>NEGATİF</i>	18	31	49		
	Total	60	100	160		
		<b>PAI</b>		Total	p	$\phi/r\phi$
		VAR	YOK			
ST131	<i>POZİTİF</i>	34	77	111	0.998	0.001
	<i>NEGATİF</i>	15	34	49		
	Total	49	111	160		
		<b>Fim A</b>		Total	p	$\phi/r\phi$
		VAR	YOK			
ST131	<i>POZİTİF</i>	90	21	111	0.05*	0.350*
	<i>NEGATİF</i>	33	16	49		
	Total	123	37	160		

**Tablo 4.6.** (Devamı)

		<b>pap C</b>				
		<b>VAR</b>	<b>YOK</b>	<b>Total</b>		
	<i>POZİTİF</i>	32	79	111		
ST131	<i>NEGATİF</i>	9	40	49	0.162	0.110
	Total	41	119	160		
		<b>pap A</b>				
		<b>VAR</b>	<b>YOK</b>	<b>Total</b>		
	<i>POZİTİF</i>	33	78	111		
ST131	<i>NEGATİF</i>	9	40	49	0.119	0.132
	Total	42	118	160		
		<b>hlyA</b>				
		<b>VAR</b>	<b>YOK</b>	<b>Total</b>		
	<i>POZİTİF</i>	6	105	111		
ST131	<i>NEGATİF</i>	0	49	49	0.097	0.131
	Total	6	154	160		
		<b>afa</b>				
		<b>VAR</b>	<b>YOK</b>	<b>Total</b>		
	<i>POZİTİF</i>	4	107	111		
ST131	<i>NEGATİF</i>	8	41	49	0.005**	0.423**
	Total	12	148	160		
		<b>iron</b>				
		<b>VAR</b>	<b>YOK</b>	<b>Total</b>		
	<i>POZİTİF</i>	45	66	111		
ST131	<i>NEGATİF</i>	16	33	49	0.344	0.075
	Total	61	99	160		
		<b>aer</b>				
		<b>VAR</b>	<b>YOK</b>	<b>Total</b>		
	<i>POZİTİF</i>	66	45	111		
ST131	<i>NEGATİF</i>	20	29	49	0.029*	0.372
	Total	86	84	160		
		<b>cnf-1</b>				
		<b>VAR</b>	<b>YOK</b>	<b>Total</b>		
	<i>POZİTİF</i>	23	88	111		
ST131	<i>NEGATİF</i>	11	38	49	0.805	-0.019
	Total	34	126	160		
		<b>sfa</b>				
		<b>VAR</b>	<b>YOK</b>	<b>Total</b>		
	<i>POZİTİF</i>	15	96	111		
ST131	<i>NEGATİF</i>	7	42	49	0.896	-0.010
	Total	22	138	160		

$\phi/r\phi$ : Phi korelasyon katsayısı

ST131 klonu pozitif çıkan numunelerin %65,77 (73)'ünde int1 ve %5,4 (6/111)'ünde int 2 geni tespit edildi (Tablo 14). ST131 klonu ve integron arasındaki ilişki incelendiğinde İNT1 ve İNT2 arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı bulundu ( $p>0.05$ ).

**Tablo 4.7.** ST131 klonu ve integron arasındaki ilişki

n=160						
İNT1						
		<i>Pozitif</i>	<i>Negatif</i>	Total	p	$\phi/r\phi$
ST131	<i>POZİTİF</i>	73	38	111	0.121	0.127
	<i>NEGATİF</i>	26	23	49		
Total		99	61	160		
İNT2						
		<i>Pozitif</i>	<i>Negatif</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	6	105	111	0.507	-0.053
	<i>NEGATİF</i>	4	45	49		
Total		10	150	160		

$\phi/r\phi$ : Phi korelasyon katsayısı

Son olarak ST131 klonu pozitif çıkan numunelerin %81,99 (91/111)'inde herhangi bir yöntem ile biyofilm oluşturduğu tespit edilirken, %18,01 (20/111)'inde biyofilm oluşturmadığı tespit edildi. Biyofilm pozitif olan ST131 klonu taşıyan suşların %66,66 (74)'sında tüp yöntemi ile, %35,13 (39/111)'ünde CRA yöntemi ile ve %12,61 (14/111)'inde ise pleyt yöntemi ile oluşturduğu görüldü. ST131 klonu ve biyofilmler arasındaki ilişki incelendiğinde ise, CRA yöntemi ile biyofilm pozitif suşlar ve ST131 klonu arasında pozitif yönlü orta şiddette ilişki saptandı ( $p<0.05$ ). ST131 ve biyofilm tüp, biyofilm pleyt ölçümleri arasında ise istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olmadığı belirlendi ( $p>0.05$ ). (Tablo 4.8).

**Tablo 4.8.** ST131 klonu ve biyofilmler arasındaki ilişki

		<b>BİYOFİLM TÜP</b>			P	$\phi/r\phi$
		<i>Pozitif</i>	<i>Negatif</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	74	37	111	0.933	0.017
	<i>NEGATİF</i>	33	26	49		
Total		107	53	160		

		<b>BİYOFİLM CRA</b>			P	$\phi/r\phi$
		<i>Pozitif</i>	<i>Negatif</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	39	72	111	0.033*	0.468*
	<i>NEGATİF</i>	26	23	49		
Total		65	95	160		

		<b>BİYOFİLM PLEYT</b>			P	$\phi/r\phi$
		<i>Pozitif</i>	<i>Negatif</i>	Total		
ST131	<i>POZİTİF</i>	14	97	111	0.061	0.148
	<i>NEGATİF</i>	12	37	49		
Total		26	124	160		

$\phi/r\phi$ : Phi korelasyon katsayısı

## 5. TARTIŞMA

*Escherichia coli* sekansı tip 131 (*E. coli* ST131) klonunun tespiti ile bu klonun *E. coli* soylarıyla karşılaştırıldığında daha fazla virülans geni taşıması ve çoklu ilaca direnç göstermesi, dünyada hızlı yayılım gösterdiğini ve bu nedenle küresel olarak halk sağlığı için büyük bir problem teşkil ettiğini göstermektedir.<sup>232</sup> GSBL'lerin küresel olarak yayılmasındaki artışın ST131'in daha iyi kolonize olması ile ilişkili olduğu bildirilmektedir.<sup>233</sup>

Yüksek riskli bir klon da tanımlanarak önem arz eden tüm özellikler, *E. coli* ST131 klonunda da tespit edildi ve bu nedenle uluslararası yüksek riskli klon olarak kabul edildi.<sup>185</sup> Bu kadar yüksek risk taşıyan bir klonun sürveyansının bilinmesi, antibiyotik direncindeki artışın ve enfeksiyonun kontrolü, gerekli önlemlerin alınması açısından önemlidir.<sup>165</sup> Sağlık hizmeti veren kurumların, hasta profili, hastane florasını oluşturan mikroorganizmaları ve bunların direnç özelliklerini bilmesi, doğru stratejiler geliştirmesi açısından önemlidir.<sup>234</sup>

ST131, ilk olarak 2008'de CTX-M tipi geniş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *E. coli*'yi inceleyen iki araştırma grubu tarafından rapor edildi.<sup>167-168</sup>

2009 yılında Avrupa (Fransa, İngiltere), Asya (Türkiye, Kamboçya, Tayland), Afrika (Orta Afrika Cumhuriyeti) ve Amerika (Brezilya, Kanada) kıtalarından toplanan 627 *E. coli* izolatının 373'ünde GSBL pozitifliği ve bunların tamamında ST131 klonunun görüldüğü bildirildi.<sup>235</sup> Güney Afrika, 23 GSBL pozitif *E. coli* izolatının %43'ünde, Orta Afrika Cumhuriyeti ise 10 izolat ile yaptığı çalışmada %50 oranında ST131 tespit etmişlerdir.<sup>235-236</sup> Avustralya'da yapılan iki çalışmada %31 ve %35 oranında ST131 klonu tespit etmişlerdir.<sup>238-239</sup> Japonya'da GSBL pozitif *E. coli* izolatlarında yapılan çalışmada %21 oranında ST131 klonu tespit edilmiştir (174). Kore'de ise % 25 oranında ST131 tespit edilmiş olup bunların sadece %19'u GSBL pozitif izolatlarıdır.<sup>240</sup>

Türkiye’de ilk olarak 2008 yılında GSBL pozitif 17 *E. coli* izolatu ile yapılan bir çalışmada bir izolatta ST131 klonu olduğu bildirildi.<sup>172</sup>

2011 yılında 107 *E.coli* izolatu ile yapılan çalışmada %24.3’ünde ST131 klonu, %55.1’inde GSBL pozitifliği ve bu GSBL pozitif izolatların %31’inde ST131 klonu tespit ettiklerini bildirdiler (237). Aynı araştırmacılar 294 *E. coli* izolatu ile yaptığı başka bir çalışmalarında %12 oranında ST131 klonu tespit ettiklerini bildirdiler.<sup>61</sup> Gürpınar’ın 157 *E. coli* kan izolatları ile yaptığı çalışmasında %99,4 oranında ST131 klonu bulmuştur.<sup>241</sup> Güller’in GSBL pozitif 85 *E. coli* suşu ile yaptığı çalışmada %27,1’inde ST131 klonunu tespit etmiştir.<sup>242</sup> Arslan çalışmasında 340 *E. coli* izolatu’nun %24,7’sinde, 200 klinik izolatu’nun ise %44.5’inde ST131 klonu tespit etmişlerdir.<sup>243</sup> Hasli ‘nin 100 *E. coli* izolatu ile yaptığı çalışmada % 17’sinde ST131 klonu tespit etmiş olup, GSBL pozitif olan izolatların %29.4’ü, GSBL negatif olan izolatların %4.1’inde *E. coli* ST131 klonu tespit etmiştir.<sup>244</sup> Çalışmamıza dahil edilen 160 klinik örnekten elde edilen *E. coli* izolatlarında yüksek oranda (%69,38) ST131 klonu tespit edildi. ST131 tespit edilen izolatlarda, GSBL üreten (73,87) izolatlar, GSBL üretmeyen (%26,13) izolatlara göre anlamlı derecede yüksek bulundu.

ST131 klonunun *E.coli* izolatlarında antibiyotik direncinin yayılımına büyük ölçüde katkı sağladığı düşünülmektedir.<sup>245</sup> Japonya’da 2008-2011 yılları arasında yapılan bir çalışmada GSBL pozitif *E. coli*’nin %52’sini ST131 oluşturmuştur. GSBL pozitif *E. coli* izolatlarında GSBL negatiflere göre kinolon direnç artışı görülürken, levofloksasin direnç oranı 2008-2016 arasında %27 ‘den %39’a yükselmiştir.<sup>246</sup> Fransa’da 2008 – 2009 arasında *E. coli* ST131 klonları ile yapılan çalışmada, en yüksek direnç amoksilin/ampisilinde görülürken, seftazidim ve amikasin direnci tespit edilememiştir.<sup>247</sup> Amerika Birleşik Devletleri’nde 2011 yılında yapılan ST131 klonuna sahip *E. coli* izolatları ile yapılan bir çalışmada florokinolonlara %78, TMP/SMX %56, gentamisine



de %76 direnç tespit etmişlerdir.<sup>224</sup> İspanya'da 2014 yılında yapılan bir çalışmada da en yüksek direnç amoksilin/ampisiline karşı görülürken, seftazidim ve fosfomisin direnci tespit edilememiştir.<sup>248</sup> Kore'de 2015 yılında yapılan çalışmada ST131 izolatlarında siprofloksasin ve seftazidim direncinin anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir.<sup>249</sup> Nepal'de yapılan bir çalışmada, *E. coli* ST131 klonuna ait izolatlarda en yüksek antibiyotik direnci levofloksasin (%96,3)'de görülmüştür.<sup>250</sup> Etiyopya'da 2018 yılında dört sağlık tesisinden toplanan 204 GSBL üreten *E. coli* izolatı üzerinde yapılan çalışmada, ST 131 klonu taşıyan suşlarda taşımayanlara göre daha fazla siprofloksasine direnç saptanmıştır.<sup>245</sup>

Ülkemizde ise 2010-2013 yılları arasında toplanan *E.coli* izolatları ile yapılan çalışmada *E. coli* ST131 kan izolatlarında levofloksasin ve siprofloksasine %98 oranında direnç saptanmıştır. Bunu Ampisilin/sulbaktam ve seftriakson (%93) takip etmiş olup en düşük direnç oranı piperacillin/tazobaktam (%40) olarak belirlenmiştir.<sup>251</sup>

2017 yılında GSBL pozitif *E. coli* ST131 izolatları ile yapılan çalışmada trimetoprim/sulfametoksazole %65.5, siprofloksasine % 62.1 direnç tespit ederlerken, karbapenemler ve amikasine direnç geliştirmediklerini görmüşlerdir<sup>(252)</sup>. 2016-2017 yılları arasında yapılan başka bir çalışmada ise siprofloksasin direnci ST131 izolatları arasında %78.2 oranında olduğunu belirtmişlerdir.<sup>166</sup>

2018 yılında yapılan başka bir çalışmada siprofloksasin direnci %53,5, trimetoprim sulfametoksazol direnci %37 olarak bulunurken, imipenem ve ertapenem direnci olmadığını bildirmişlerdir<sup>(241)</sup>. 2019 yılında yapılan çalışmada ST131 klonuna sahip suşlarda nitrofurantoinde direnç saptanmaz iken siprofloksasinde %95,7 oranında direnç tespit edilmiştir.<sup>242</sup> 2019 yılında yapılan başka bir çalışmada ise ST131 izolatlarında siprofloksasin direnç oranı %56.3 olarak belirlenmiş olup, ST131 izolatlarında ST131 dışındaki izolatlara göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur.

Ayrıca amikasin, amoksisilin-klavunat, aztreonam, sefepim, seftazidim, seftriakson, sefuroksim, norfloksasin, piperasilin-tazobaktam antibiyotiklerindeki direnç oranlarının da ST131 izolatlarında anlamlı derecede yüksek olduğunu bildirmişlerdir.<sup>253</sup> Bizim çalışmamızda ST131 klonuna ait izolatların, ampisilin (%98,19), sefazolin (%86,2) siprofloksasin (%81,37), sefuroksim (%80,23), levofloksasim (%80) ve karbapenemler de dahil olmak üzere bakılan tüm antimikrobiyallere direnç gösterdiği tespit edildi.

*E. coli* ST131, filogenetik B2 grubunda yer almaktadır.<sup>186</sup> Çin'in Hunan Eyaletinde sağlıklı bireylerde yapılan çalışmada tüm ST131 taşıyan klonların B2 filogenetik grubuna ait olduğu fakat 2 izolat için MLST yapılması gerektiği bildirilmiştir.<sup>254</sup> İran'da yapılan bir çalışmada 69 izolattan 68'ini B2 filogenetik grubu olarak bildirmişlerdir.<sup>255</sup> Chicago'da yapılan bir çalışmada ise 16 ST131 izolatının tamamını B2 grup olarak tespit etmişlerdir.<sup>256</sup> ST 131 klonunun filogenetiği üzerine yapılan iki farklı çalışmada literatür bilgilerinin aksine B2 grubu dışında izolatlarla rastlanmıştır. Lee ve arkadaşlarının Kore'de yaptıkları çalışmada 36 izolatın 32'sinde B2, 4'ünde ise D grubu tespit ettiklerini, A ve B1 grubu bulmadıklarını bildirmişlerdir.<sup>257</sup> Japonya'da yapılan bir çalışmada ise 215 izolatın 3 tanesinin B1 grubuna ait olduğunu göstermişlerdir.<sup>258</sup> Türkiye'de ST131 izolatlarında tek bir filogenetik çalışmaya rastlanmış olup, çalışma literatürle uyumlu olup B2 grubunda olduğu bildirilmiştir.<sup>259</sup> Bizim çalışmamızda izolatların %36,03'ünde A grubu, %29,73'ünde B1 grubu, %25,23'ünde B2 grubu ve %9,01'inde D grubu olarak tespit edildi. Bu verilerin Türkiye'de ilk tespit edilen B2 filogenetik grup dışı izolat varlığı ile literatüre farklı yeni bir veri olacağını düşünmekteyiz.

1990'ların ortalarında beta laktamazlardan TEM ve SHV türevleri, *E. coli* ST131 için antibiyotik direncin yayılmasından sorumlu tutulan genler olarak belirlenmiştir.<sup>260</sup> Günümüzde ise, ilk kez Münih'te izole edilen ve sefotaksim üzerinde önemli etkisi olan

CTX-M tipi enzim sorumlu tutulmaktadır.<sup>261</sup> 2010 yılında Chicago’da yapılan bir çalışmada *E. coli* ST131 izolatlarında TEM-1 OXA-1, CTX-M-14, CTX-M-15 genleri tespit edilmiştir.<sup>256</sup> GSBL pozitif izolatlar ile yapılan farklı çalışmalarda ST131’de CTX-M geni en yaygın gen olarak bulunmuş olup, SHV ve TEM genlerini nadiren tespit etmişlerdir.<sup>262</sup> İran’da 57 ST131 izolatının direnç genlerini incelediklerinde %86 CTX-M geni , % 70.2 TEM geni, % 47.4 SHV geni, % 12.3 oranında ise OXA-48 geni bulmuşlardır.<sup>263</sup> Ülkemizde *E.coli* ST 131 izolatlarında direnç genlerinin analizi ile ilgili çalışmalar sınırlıdır. Gürpınar yaptığı çalışmada *E. coli* ST131 kan izolatları arasında CTX-M enzimini %50 oranında görmüştür.<sup>241</sup> Can ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise 24 ST131 izolatının %58’inde CTX-M-15 β-laktamaz saptamışlardır.<sup>237</sup> Bizim çalışmamızda ise ST131 klonu pozitif numunelerin, %1,80’inde SHV geni, %13,51’inde OXA geni, %45,04 ‘ünde CTX-M geni ve %51,35’inde TEM genine rastlandı. Çalışmamızda literatürden farklı olarak TEM geni daha baskın çıkmış olup, ST131 izolatlarında nadir görülen OXA geni de diğer nadir görülen genler gibi yüksek bir oranda görüldü. CTX-M geni görülme oranı ise literatür ile uyumludur.

*E.coli* izolatları arasında Grup B2 suşlarının, diğer gruplarından çok daha fazla virülans faktörü kodlayan gen barındırdığı bilindiğinden dolayı araştırmalar B2 grubundan olan ST131 için virülans faktörlerinin incelenmesine yönelmiştir.<sup>4</sup> Güney Kore’de yapılan bir çalışmada *E. coli* ST 131 izolatlarında 14 virülans geni incelemişler ve fimH ve fyuA genlerini %100, iutA %78,6 ve traT %71,4 oranında tespit etmişlerdir.<sup>264</sup> Tunus’ta yapılan bir çalışmada ise, papA , iutA, ompT ve usp,virülans genleri ile çalışmış ve bu genlerin oranlarını sırası ile %30, %56, %67 ve %79 olarak tespit etmişlerdir.<sup>265</sup> Suudi Arabistan’da yapılan bir çalışmada ST131 izolatlarında, %97.3 fimH , %78.4 iut A , %75.7 PAI, 74.1 ompT, %62.2 traT, %35.1 pap A ve pap C, %27 hlyA , %24.3 afa, %16.2 iroN ve cnf-1, %8.1 sfa geni bulmuşlardır.<sup>266</sup> İran’da

yapılan çalışmada ise %96,5 iutA, %45,6 papC, %40,4 pap A ve %1,8 oranında sfa geni bulmuşlardır. Ülkemizde *E.coli* ST 131 virulans genleri üzerine üç çalışmaya rastlanmıştır. Can ve arkadaşları %100 iutA ve %16 papA geni olduğunu bildirmiştir.<sup>251</sup> *E.coli* ST131 olarak tanımlanan 39 izolat ile yaptığı çalışmasında, virülans genlerinin görülme sıklığını %100 fimH, %89,7 iha, %35,9 afa/draBC, %25,6 papAH, %2,6 sfa/focDE olarak bulmuştur.<sup>259</sup> Gürpınar ise çalışmasında ST131 klonu pozitif izolatlarda en sık görülen virülans genleri, %22,9 papA, %73,2 iutA ve %82,2 ompT şeklinde bulmuştur.<sup>241</sup> Biz çalışmamızda 15 virulans geni ile çalıştık. Çalışmamız sonucunda ST131 klonu pozitif çıkan numunelerde en çok fim A %81,08 (90) geni olmak üzere sırasıyla, tra T %70,27 (78), iut A %63,06 (70), iuc C %62,16 (69), aer %59,46 (66), iroN %40,54 (45), ompT%37,83 (42), PAI %30,63 (34), pap A %29,73 (33), pap C %28,83 (32), cnf-1%20,72 (23), sfa %13,51 (15), iss11,71 (13), hlyA %5,4 (6), afa%3,6 (4) geni görüldü. ST131 klonu pozitif numunelerin %95,5 (106/111)'inde en az bir virülans geni görülürken, %4,5 (5/111)'inde ise herhangi bir virülans geni görülmedi.

Dünya da önemli bir dağılım gösteren sınıf 1 ve 2 integronlar Enterobacteriaceae'de sık görülmektedir. Bu integronların *E. coli* ST131'de antimikrobiyal direnç genlerinin yayılmasına dahil olduğu düşünülmektedir.<sup>267</sup> Çin'de yapılan bir çalışmada 83 *E. coli* ST131 izolatının % 27'sinde sınıf 1 integron bulmuşlardır. Fakat sınıf 2 integronlara rastlamamışlardır.<sup>267</sup> Avustralya 'da ST131 izolatlarında, 41 izolatın %14'ünde sınıf 1 integron, %2,43'ünde ise sınıf 2 integron bulmuşlardır.<sup>268</sup> Ülkemizde *E. coli* ST131 izolatlarında integron gen kasetleri ve integraz üzerine çalışmaya rastlanmamıştır. Ülkenin bu parametre açısından ilk araştırması olan bizim çalışmamızda ST131 klonu pozitif çıkan numunelerin %65,77 (73)'sinde integraz gen (intI-1) ve %5,4 (6/111)'ünde integraz gen (intI-2) tespit edildi. I ntI-1 geni pozitif

suşların %28,76 (21)'sında sınıf 1 değişken bölgelerine rastlandı. Sınıf 2 integrona ise rastlanmadı.

ST131 tarafından biyofilm üretimi, bakterileri yüksek düzeyde antibiyotiklere maruz kalmaktan koruyabilir ve böylece düşük seviyeli maruziyetlerde direnç gelişimini teşvik edebilir. *E. coli* ST131 izolatlarının biyofilm üretimini araştıran çok az sayıda çalışma vardır. Fransa'da yapılan bir çalışmada, 2 ST131 suşunun 48 saat sonra biyofilm ürettiği görülmüştür.<sup>269</sup> Avusturalya'da 135 adet *E. coli* ST131 izolatın %95,55'inin biyofilm oluşturduğu görülmüş ve ST131 izolatlarının ST131 olmayan izolatlara göre biyofilm oluşturma kabiliyetlerinin anlamlı derecede daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.<sup>270</sup> Çin'de yapılan bir çalışmada *E. coli* ST131 izolatlarının %70'inin biyofilm oluşturduğunu bulmuşlar.<sup>271</sup> Bizim çalışmamızda ST131 klonu pozitif çıkan numunelerin %81,99'unun herhangi bir yöntem ile biyofilm oluşturduğu tespit edilirken, %18,01'inin biyofilm oluşturmadığı tespit edildi. Biyofilm pozitif olan ST131 klonu taşıyan izolatların biyofilm oluşturma kabiliyetleri tüp yöntemi ile %66,66, CRA yöntemi ile %35,13 ve pleyt yöntemi ile ise %12,61 oranında oluşturduğu görüldü.

Bu çalışma, çalıştığımız hastanenin klinik izolatlarında GSBL üreten *E.coli* izolatlarının yüksek riskli ST131 klonuyla beraber dramatik bir şekilde yaygınlığını, bu riskli klonun H30Rx alt klonunun hakimiyetini, ayrıca direnç, virülans, integron ve biyofilm ile birlikte direnç mekanizmalarını başarılı şekilde yürüttüğünü işaret etmektedir.

Araştırmamızın prospektif olarak yapılması, ülkemizde klinik örneklerde ST131 klonunun, filogenetiğinin, GSBL direnç genlerinin, virülans genlerinin, integron gen kasetlerinin ve biyofilm oluşturma kapasitesi gibi birçok direnç etkenleri karşılaştırılarak çalışılması açısından ilk çalışma olması ve literatürden farklı bulguları tespit etmiş olması çalışmamızın güçlü yönlerindedir.

Çalışmamızda filogenetik analizi için daha duyarlı olan MLST yöntemi ile çalışmamızın kısıtlılığı olarak değerlendirilebilir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

- ST131 *E. coli*, potansiyel olarak ciddi antimikrobiyal dirençli enfeksiyonlara neden olan dünya çapında son 30 yıldır görülen yüksek riskli bir patojendir. Bu patojenin yayılımı, *E. coli* enfeksiyonunu tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan birçok düşük maliyetli ve kolayca temin edilebilen antimikrobiyale karşı dirençtir. Direnç geliştiren *E. coli* enfeksiyonundan dolayı, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre yılda yaklaşık 550 milyon kişinin hastalandığını ve bunların 230.000'inin hayatını kaybettiğini açıklanmıştır.
- Bu çalışma, ülkemizin ST131 klonunun GSBL üreten ve üretmeyen tüm klinik *E. coli* izolatları dahil edilerek GSBL direnç genlerinin, virülans genlerinin, integron gen kasetlerinin ve biyofilm oluşturma kapasitesinin birlikte araştırıldığı ilk çalışmadır. Çalışmamızda yüksek oranlarda ST131 klonu tespit edilmiştir.
- ST131 klonuna ait izolatlarda, ampisilin, sefalosporin ve kinolonlar başta olmak üzere çeşitli antibakteriyellere karşı direnç yüksek bulunmuştur.
- Araştırmamız ilk kez *E. coli* izolatlarında ST131 klonunda filogenetik grup A'nın tespit edilmesi açısından dikkat çekicidir.
- Yüksek riskli *E. coli* ST131 klonunun ilimizde yüksek oranda tespit edilmesi ve bu sonuçların klinisyenler ile paylaşılması sonucu etkili tedavilerin belirlenmesi açısından önemli rol oynayacağı kanaatindeyiz. Bu izolatların varlığı ve dağılımının tespiti, tedavi protokollerinin geliştirilebilmesine katkı sağlayabilecektir.
- Riskli gruptaki hastalarda, yüksek riskli *E. coli* ST131 klonunun araştırılmasının ve tespitinin antimikrobiyal tedavinin şekillenmesi ve

başarısına katkı sağlayarak bu klonun yayılımının engellenmesine destek olacağına inanmaktayız.

- Bulgularımız ülkemizde yüksek riskli *E. coli* ST131 klonu ile ilgili sınırlı bilgiye katkıda bulunmasının yanında, literatür verilerinden farklı olarak elde ettiğimiz sonuçlar tüm bilim dünyasına katkıda bulunacak ve yeni çalışmalara ışık olacaktır.
- ST131 klonunun hızlı yayılımı ve sağlıklı bireylerde de ciddi enfeksiyona neden olma riski göz önüne alındığında, enfeksiyonu kontrol etmeye yönelik çalışmaların ve önlemlerinin planlanması ve bilinçsiz antibiyotik kullanımının önüne geçilmesi gerekmektedir. Müdahaleleri başarılı bir şekilde planlamak ve yürütmek için, bu patojenin temel yönleri ve bulaşma dinamikleri hakkında daha fazla kapsamlı ve moleküler epidemiyolojik çalışmalarla desteklenmiş verilere ihtiyacımız vardır.



## KAYNAKLAR

1. 2019 W. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance 2014. Available from: (<https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748/>).
2. Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of *Escherichia coli* sequence type 131. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58:4997-5004.
3. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2004, 2:123-140.
4. Russo TA, Johnson JR. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: *ExPEC*. *J Infect Dis*, 2000, 181:1753-1754.
5. Escobar-Páramo P, Grenet K, Le Menac'h A, et al. Large-scale population structure of human commensal *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70:5698-5700.
6. Fidan I, Yüksel S, Sipahi AB, Özkan S, Sultan N, Üriner Sistem İnfeksiyonlarından Etken Olarak İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Hemagglütinasyon ve Hemolizin Üretimi. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 2006, 20:22-25.
7. Hassan A, Usman J, Kaleem F, Omair M, Khalid A, Iqbal M. Evaluation of different detection methods of biofilm formation in the clinical isolates. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2011, 15:305-311.
8. Leone S, Molinaro A, Alfieri F, Cafaro V, Lanzetta R, Donato A, Parrilli M. The biofilm matrix of *Pseudomonas* sp. OX1 grown on phenol is mainly constituted by alginate oligosaccharides. *Carbohydrate Research*, 2006, 341:2456 – 2461.
9. Beköz Yarar M. Mastitisli Sığır Sütlerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Önemli Virulens Genlerinin ve Antibakteriyel Duyarlılıklarının İncelenmesi.

- Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, Aydın: Aydın Adnan Menderes Üniversitesi, 2017, 62.
10. Harel J, Fairbrother J, Forget C, Desautels C, Moore J. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* isolated from piglets and calves. *Vet Microbiol*, 1993, 38:139-155.
  11. China B, Goffaux F. Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*. *Vet Res*, 1999, 30:181-202.
  12. Weintraub A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: epidemiology, virulence and detection. *J Med Microbiol*, 2007, 56:4-8.
  13. Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A. Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon. *Pathogens and Global Health*, 2015, 109:309-317.
  14. Blount ZD. The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, 2015, 4:e05826.
  15. Barnes JH, Nolan KL, Vaillancourt PJ. Colibacillosis. In: Saif MY, Fadly MA, Glisson RJ, McDougald RL, Nolan KL, Swayne ED. *Disease of Poultry*, 12th Edition. Iowa State, Blackwell publishing, 2008: 691-739.
  16. Crick FH, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature*, 1961, 192:1227–1232.
  17. Nirenberg M, Leder P, Bernfield M, Brimacombe R, Trupin J, Rottman F, O'Neal C. RNA codewords and protein synthesis, VII. On the general nature of the RNA code. *Biochemistry*, 1965, 53:1161–1168.
  18. Chen HD, Frankel G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29:83-98.
  19. Clermont O, Christenson J K, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revised: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep*, 2013, 5: 58-65.

20. Selander RK, Caugant DA, Whittam TS. Genetic structure and variation in natural populations of Escherichia coli. *Escherichia coli and Salmonella typhimurium. Cell. Mol. Biol*, 1987, 2:1625-1648.
21. Beghain J, Bridier-Nahmias A, Le Nagard H, Denamur E, Clermont O. ClermonTyping: an easy-to-use and accurate in silico method for Escherichia genus strain phylotyping. *Microb Genom*, 2018, 4:e000192.
22. Müştak HK, Torun E, Kaya İB, Kaya EE, Diker Ş, Anadol E, Günaydın E. Wistar ırkı ratlardan izole edilen Escherichia coli'lerin filogenetik analizi. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 2013, 24:60-63.
23. Clermont O, Dixit OVA, Vangchhia B, Condamine B, Dion S, Bridier-Nahmias A, Denamur E, Gordon D. Characterization and rapid identification of phylogroup G in Escherichia coli, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environ Microbiol*, 2019, 21:3107-3117.
24. Donlan RM, Casterton JW, 'Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms'. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, 15:167 – 193.
25. Sakarya S, 'Biyofilm Yapısı ve İnfeksiyon Hastalıklarının Virülans ve Tedavisindeki Rolü'. *Klinik Dergisi*, 2005, 18:3-8.
26. Donnenberg M, Mandel G, Bemmet J, John R, Mandel D. Enterobacteriaceae: In Principles and Practice of infectious diseases, London. *Elsevier*, Churchill, Livingstone, 2005.
27. Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB, Strockbine NA. Escherichia, shigella, and salmonella. *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. Eds: American Society of Microbiology, 2011:603-626.

28. Abbott S. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In: Murray PR (ed). *Manual of clinical microbiology*. Washington, DC, ASM Press, 2003: 44: 684-700.
29. Murray PR. *Manuel of Clinical Microbiology*, 9th ed. Washington, ASM PRESS, 2007: 670-698.
30. Bottone EJ. Hypermucoviscous Phenotype Expressed by an Isolate of Uropathogenic Escherichia coli: an Overlooked and Underappreciated Virulence Factor. *Clinical Microbiology Newsletter*, 2010: 32:81-85.
31. Baron EJ, Peterson LR, Finegold SM. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*, 1st ed. Baltimore, Mosby Publications, 1994: 362-387.
32. Ryan KJ. *Sherris medical Microbiology*, 1st ed. Montreal, Prentice-Hall International, 1994: 323-329.
33. Bilgehan H. Enterobacteriaceae Familyası. *Klinik Mikrobiyoloji Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları Kitabı*, İzmir, 2000, 1-103.
34. Naylor SW, Gally DL, Low JC. Enterohaemorrhagic E. coli in Veterinary Medicine. *International Journal of Medical Microbiology*, 2005, 295, 419-441.
35. Scheutz F, Strockbine NA. Escherichia. In: Trujillo ME, Dedys S, DeVos P, Hedlund B, Kämpfer P, Rainey FA, Whitman WB (eds). *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. John Wiley & Sons, Chichester, 2015: 1-49.
36. Yontar A. Kayseri Yöresindeki Süt Sığırlarında Escherichia coli O157:H7'nin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri: Erciyes Üniversitesi, 2009, 74.

37. Fard RMN, Dallal MMS, Moradi RZ, Rajabi Z. Molecular Pathotyping of Escherichia coli Isolates and Detection of Residual Antibiotics in Raw Cow Milk in Iran. *Alex. J. Vet. Sci*, 2019, 60: 79-85.
38. Milon A, Oswald E, De Rycke J. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic Escherichia coli. *Vet Res*, 1999, 30: 203-219.
39. Omerovic M, Müştak HK, Kaya İB. Escherichia coli Patotiplerinin Virülens Faktörleri. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 2017, 28: 1-6.
40. Cohen MB, Giannella RA. Enterotoxigenic Escherichia coli. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL (eds). *Infections of the Gastrointestinal Tract*. New York, Raven Press, 1995: 691-707.
41. Gatermann S, Funfstuck R, Handrick W, Leitritz L, Naber KG, Podbielski A, et al. MIQ 02: Urinary Tract Infections: Quality standards for microbiological infections. Munchen, Germany, *Urban & Fischer*, 2005, 8-21.
42. Cohen MB, Nataro JP, Bernstein DI, Hawkins J, Roberts N, Staat MA. Prevalence of diarrheagenic Escherichia coli in acute childhood enteritis: a prospective controlled study. *J. Pediatr*, 2005, 146:54 – 61.
43. Vila J, Gene A, Vargas M, Gascon J, Latorre C, Anta MTJ. A case-control study of diarrhoea in children caused by Escherichia coli producing heat-stable enterotoxin (EAST-1). *J. Med. Microbiol*, 1998, 47: 889-891.
44. Kılınç Ç. Klinik örneklerden izole edilen E. coli izolatlarının genotiplendirilmesi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Tayfur Ata Sökmen Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Hatay, 2013.
45. Blanco M, Blanco JE, Mora A, Dahbi G, Alonso MP, et al. Virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing Escherichia coli isolates from

- cattle in Spain and identification of a new intimin variant gene (eae-). *J. Clin. Microbiol*, 2004, 42:645– 651.
46. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev* 11, 1998, 142–201.
  47. Levine MM. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis*, 1987, 155:377–389.
  48. Vila J, Sáez-López E, Johnson JR, Römling U, Dobrindt U, Cantón R, ... & Bosch J. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. *FEMS microbiology reviews*, 2016, 40(4), 437-463.25.
  49. Dobrindt U, Chowdary MG, Krumbholz G, Hacker J. Genome dynamics and its impact on evolution of *Escherichia coli*. *Medical Microbiology and Immunology*, 2010, 199, 145-154.
  50. Subashchandrabose S, Mobley HL. Virulence and fitness determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 2017, 235-261.27.
  51. Conceição RA, Ludovico MS, Andrade CG, Yano T. Human sepsis-associated *Escherichia coli* (SEPEC) is able to adhere to and invade kidney epithelial cells in culture. *Braz J Med Biol Res*, 2012, 45: 417-424.
  52. Ferreira JC, Penha Filho RAC, Kuaye APY, Andrade LN, Chang Y F, Darini ALC. Virulence potential of commensal multidrug resistant *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. *Infect Genet Evol*, 2018, 65: 251- 256.
  53. Wiles TJ, Kulesus RR, Mulvey MA. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol*, 2008, 85: 11-19.

54. Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections-transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect Dis Clin N Am*, 2003, 17: 227-241.
55. Ferjani S, Saidani M, Ennigrou S, Hsairi M, Ben Redjeb S. Virulence determinants, phylogenetic groups and fluoroquinolone resistance in Escherichia coli isolated from cystitis and pyelonephritis. *Pathol Biol (Paris)*, 2012, 60: 270-274.
56. Hashemizadeh Z, Kalantar-Neyestanaki D, Mansouri S. Association between virulence profile, biofilm formation and phylogenetic groups of Escherichia coli causing urinary tract infection and the commensal gut microbiota: A comparative analysis. *Microb Pathog*, 2017, 110: 540-545.
57. Sadeqy H. Hastalardan İzole edilen üropatojenik Escherichia Coli (Upec) suşlarında bazı virulans genlerin ve Mcr-1 geninin prevalansı. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Konya: Selçuk Üniversitesi, 2020.
58. Johnson JR, Russo TA. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "The other bad E. coli". *J Lab Clin Med*, 2002, 139: 155-162.
59. Dinç G. Sığır Mastitislerinden ve Çevresel Kaynaklardan İzole Edilen Escherichia coli Suşlarının Virulens Faktörlerinin Belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara: Ankara Üniversitesi, 2009, 78.
60. Vurucu N. Mastitisli Sütlerden İzole Edilen Escherichia coli Suşlarında Virülens Genlerin Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans Tezi, Aydın: Adnan Menderes Üniversitesi, 2016, 44.
61. Can F, Azap OK, Seref C ve diğ. Emerging Escherichia coli O25b/ST131 clone predicts treatment failure in urinary tract infections. *Clin Infect Dis*. 2015, 60(4): 523-527.
62. Gupta K, Hooton TM, Naber KG ve diğ. International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: a

- 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis*, 2011, 52: e103-e120.
63. Oelschlaeger AT, Dobrindt U, Hacker J. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents*, 2002, 19 : 517-21.
  64. Firoozeh F, Saffari M, Neamati F, Zibaei M. Detection of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from patients with cystitis and pyelonephritis. *Int J Infect Dis*, 2014, 19:219-222.
  65. Mulvey MA: Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, 2002, 4:257-271.
  66. Antao E, Wieler HL, Ewers C. Adhesin threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog*, 2009, 10:22-12.
  67. Spurbeck RR, Mobley HL. *Uropathogenic Escherichia coli*. *Escherichia coli, Pathotypes and Principles of Pathogenesis*, 2th ed. Elsevier, 2013: 275-304.
  68. Schembri MA, Klemm P. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel fimH variants and ramifications for virulence. *Infection and Immunity*, 2001, 69:1322-1328.
  69. Ragnarsdóttir B, Lutay N, Grönberg-Hernandez J. Genetics of innate immunity and UTI susceptibility. *Nat Rev Urol*, 2011, 8:449–468.
  70. Schwann WR. Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J Clin Infect Dis*, 2011, 1:17-25.
  71. Naveen R, Mathai E. Some virulence characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* in different patient groups. *Indian J Med Res*, 2005, 122: 143-147.



72. Jann K, Jann BJ. Capsules of *Escherichia coli*. In: Sussman M (Ed.). *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*. Cambridge, UK, Cambridge University Press, 1977:113-143.
73. Garner AM, Kim KS. The effects of *Escherichia coli* S-fimbriae and outer membrane protein A on rat pial arterioles. *Pediatr Res*, 1996, 39: 604-608.
74. Dobrindt U, Blum-Oehler G, Hartsch T, Gottschalk G, Ron EZ, Fünfstück R, Hacker J. S-Fimbria-encoding determinant *sfa(I)* is located on pathogenicity island III (536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun*, 2001, 69: 4248- 4256.
75. Moxley R. Family Enterobacteriaceae and Enterobacteriaceae: *Escherichia*. In: McVey DS, Kennedy M, Chengappa MM (eds). *Veterinary Microbiology*, 3rd ed. New Jersey, Wiley-Backwell, 2013: 53-74.
76. Melo AR, Lasunskaja EB de Almeida CM, Schriefer A, Kipnis TL, Dias da Silva W. Expression of the virulence factor, BfpA, by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for apoptosis signalling but not for NF-kappaB activation in host cells. *Scand J Immunol*, 2005, 61: 511-519.
77. Jahandeh N, Ranjbar R, Behzadi P, Behzadi E: Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: Invaluable approaches for designing DNA microarray probes. *Central European Journal of Urology*, 2015, 68: 452-458.
78. Labigne-Roussel AF, Schmidt MA, Walz W. Genetic organization of the afimbrial adhesion operon and nucleotide sequence from a uropathogenic *Escherichia coli* gene encoding an afimbrial adhesion. *J Bacteriol*, 1985, 162: 1285-1292.
79. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, 3. baskı. Nobel Tıp Kitapevi, 2008, 1487-1499, 2136-2147.

80. Mainil J. Escherichia coli virulence factors. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013, 152: 2-12.
81. Burvenich C, Van Merris V, Mehrzad J, Diez-Fraile A, Duchateau L. Severity of E. coli mastitis is mainly determined by cow factors. *Vet. Res*, 2003, 34: 521-564.
82. Erdem B. Enterobacteriaceae. İçinde: Ustaçelebi Ş (editör). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*, 1. Baskı. Ankara, Güneş Kitabevi, 1999: 471-515.
83. Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr*, 2014, 2: 1-13.
84. Küçükbaşmacı Ö, Büyükbaba-Boral Ö, Ögüt T, Susever S. Escherichia coli strainlerinde çeşitli antibiyotiklere direncin hemolizin üretimi ve tipleri ile ilişkisi. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2003, 33:211-213.
85. Hacker J, Kaper J. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*, 2000, 54: 641-679.
86. Mougéot BF, Gunter WN, Sonnenberg SM. Uropathogenic Escherichia coli, In Sonnenberg, S. M. Ed. Escherichia coli Virulence Mechanism of a Versatile Pathogen. *Elsevier*, 2000, 239-268.
87. Demir M. Patojen Escherichia coli Suşlarında Siderofor ve Diğer Virulans Faktörlerinin Araştırılması ve Patojenitedeki Rollerinin Cilt İnfeksiyon Modeliyle Gösterilmesi. Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Denizli: Pamukkale Üniversitesi, 2001.
88. Carbonetti NH, Boonchai S, Parry SH, Väisänen – Rhen V, Korhonen TK, Williams PH. Aerobactin-mediated iron uptake by Escherichia coli isolates from human extraintestinal infections. *Infect Immun*, 1986, 51: 966-968.

89. Lane MC, Lockett V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel JR, Johnson DE, Mobley HLT. Role of Motility in The Colonization of Uropathogenic *Escherichia coli* in The Urinary Tract. *Infect. Immun*, 2005, 73: 7644- 7656.
90. İzgür M. Enterobakteri İnfeksiyonları (Enterobacteriaceae). İçinde: Aydın N, Paracıkoğlu J (editörler). *Veteriner Mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar)*, 1. Baskı. Ankara: İlke-Emek Yayınları, 2006: 109-127.
91. Johnson JR. Virulence Factors in *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *Clin. Microbiol. Rev*, 1991, 4: 80- 128.
92. Cascales E, Buchanan SK, Duché D, Kleanthous C, Lloubès R, Postle K, Riley M, Slatin S, Cavard D. Colicin biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2007, 71(1): 158-229.
93. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM, Gilmour MN, Whittam TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics, *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 51, 873-884.
94. Desjardins P, Picard B, Kaltenbock B, Elion J, Denamur E. Sex in *Escherichia coli* does not disrupt the clonal structure of the population: evidence from random amplified polymorphic DNA and restriction-fragment-length polymorphism, *Journal of Molecular Evolution*, 1995, 41, 440-448.
95. Ahmed MYA. Characterization and molecular epidemiology of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* derived from University Hospitals of Egypt and Germany. Doktora Tezi, Mısır, Giessen: Justus-Liebig-University Giessen, 2012: 1-10.
96. Bingen EH, Denamur E, Elion J. Use of ribotyping in epidemiological surveillance of nosocomial outbreaks. *Clinical Microbiology Reviews*, 1994, 7:311- 327.

97. Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66:4555-4558.
98. Smith JL, Fratamico PM, Gunther NW. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis*, 2007, 4: 134–63.
99. Tenover FC, Hugles JM. The challenges of emerging infectious diseases development and spread of multiply resistant bacterial pathogens. *JAMA*, 1996, 275:300-4.
100. Gold HS, Moellering RC Jr. Antimicrobial drug resistance. *N Engl J Med*, 1996, 335:1445-53.
101. Alekshun MN, Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 2007, 128: 1037-50.
102. Yüce A. Antimikrobiyal Glaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 2001, 14:44-46.
103. Jacoby GA. Mechanisms of Resistance to Quinolones. *Clinical Infectious Diseases*, 2005, 15:120–126.
104. Bansal S, Tandon V. Contribution of mutations in DNA gyrase and topoisomerase IV genes to ciprofloxacin resistance in *Escherichia coli* clinical isolates. *International journal of antimicrobial agents*, 2011, 37:253–255.
105. Ulusal Antimikrobiyal Direnç Surveyans Sistemi Y, Raporu THSK, Sağlık Bakanlığı Ankara. Ulusal antimikrobiyal direnç surveyans sistemi 2016 yıllık raporu. 2016. Available from: <http://uamdss.thsk.gov.tr>.
106. Miller AK, Brannon MK, Stevens L, Johansen HK, Selgrade SE, Miller SI et al. PhoQ Mutations Promote Lipid A Modification and Polymyxin Resistance of

- Pseudomonas aeruginosa* Found in Colistin-Treated Cystic Fibrosis Patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55:5761-5769.
107. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Medical Microbiology. *East Norwalk, CT: Appleton & Lange*, 1995, 137-67.
108. Öztürk R. Antimikrobik ilaçlara Karşı Direnç Gelişim Mekanizmaları ve Günümüzde Direnç Durumu. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi. 2002: 83-100.
109. Domingues S, da Silva GJ, Nielsen KM. Integrins. Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. *Mobile Genetic Elements*, 2012, 2: 211-223.
110. Von Wintersdorff Christian JH, Penders J, vanNiekerk JM, D.Mills N, Majumder S, Van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolffs PFG. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1-10.
111. Clewell DB. Antibiotic Resistance Plasmids in Bacteria. In: eLS. John Wiley & Sons, 2014.
112. Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas)*, 2011, 47(3): 137-46.
113. Dakic I, Lilakos D, Svabic-Vlahovic M, Christofilopoulou S, Poggas N, Charvalos E. Integron-associated antimicrobial resistance in isolates of members of Enterobacteriaceae causing community-acquired urinary infections. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2007, 19: 201-206.
114. Gillings MR. Integrins: Past, Present, and Future. *MMBR*, 2014, 78: 257-277.

115. Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, Chen D, Bian H, Li Y, Yu G. Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2015, 14: 45.
116. Tennstedt T, Szczepanowski R, Braun S, Pühler A, Schlüter A. Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. *FEMS Microbiol Ecol*, 2003, 45: 239-52.
117. Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW. Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. *Trends Microbiol*, 2007, 15: 301–9.
118. Collis CM, Hall RM. Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. *Mol Microbiol*, 1992, 6: 2875–85.
119. Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A. Integrall: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1096–8.
120. Hall RM, Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW. Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, 870: 68–80.
121. Martín BS, Lapierre L, Cornejo J, Bucarey S. Characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and 2 integrons in strains of *Salmonella* spp. isolated from swine. *Can J Microbiol*, 2008, 54: 569–576.
122. Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC, Nevalainen KM, Stoke HM. Recovery of new integron classes from environmental DNA. *FEMS Microbiol Lett*, 2001, 195: 59–65.
123. Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, 52: 489-492.

124. Çolakoğlu F, Özgümüş OB, Sandallı C, Sevim Çelik E, Karaoğlu Alpay Ş. Deniz Suyu Kökenli Koliformlarda Sınıf 1 ve Sınıf 2 İntegron Gen Kasetleri ve Antibiyotik Direncinin Karakterizasyonu. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 2010, 40: 97- 108.
125. Kargar M, Mohammadalipour Z, Doosti A, Lorzadeh S, Japoni-Nejad A. High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. *Osong Public Health Res Perspect*, 2014, 5: 193- 198.
126. Hansson K, Sundström L, Pelletier A, Roy PH. IntI2 integron integrase in Tn7. *J Bacteriol*, 2002, 184: 1712-21.
127. Finn JA, Parks AR, Peters JE. Transposon Tn7 directs transposition into the genome of filamentous bacteriophage M13 using the element encoded TnsE protein. *J Bacteriol*, 2007, 189: 9122-5.
128. Peters JE, Craig NL. Tn7: smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001, 2: 806-14.
129. Kaushik M, Kumar S, Kapoor RJ, Viridi JS, Gulati P (2017). Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents* doi.org/doi:10.1016/j.ijantimicag.
130. Mohammadalipour Z, Kargar M, Doosti A. High Frequency of Class 2 and 3 Integrons Related to Drug-Resistance in Clinical Isolates of Diarrheagenic *E. coli* in Iran. *Novel Biomed*, 2017, 5: 30-6.
131. Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *J Clin Microbiol*, 2003, 41: 5407–5413.

132. Clark CA, Purins L, Kaewrakon P, Focareta T, Manning PA. The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. *Microbiol*, 2000, 146:2605–2612.
133. Fluit AC, Schmitz FJ. Resistance integrons and super-integrons. *Clin Microbiol Infect*, 2004, 10: 272–288.
134. Neuhauser MM, Danziger LH.  $\beta$ -Lactam Antibiotics. In: Piscitelli SC, Rodvold KA (eds). *Drug Interactions in Infectious Diseases*. Infectious Disease. USA, Humana Press, 2005, 255-287.
135. Yorgancıgil B. Beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. *Turgut Özal Tıp Merkezi Dergisi*, 1999, 6: 176-182.
136. Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*, 1995, 8: 557-584.
137. Gür D. Beta-laktamazlar. *Hacettepe Tıp Dergisi*, 2002, 33: 102-109.
138. Bush K, Jacoby GA. Updated Functional Classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54: 969–976.
139. Gür D. Hastane enfeksiyonlarında önem kazanan gram olumsuz bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, 1997, 1: 38-45.
140. Kızmaz Y U. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Üreten *Escherichia coli* (*E.coli*) Suşlarının Etken Olduğu Üriner Sistem İnfeksiyonlarında Dışkıda GSBL Üreten *E.coli* Taşıyıcılığının Saptanması.2014.
141. Martinez-Martinez L, Hernandez-Alles S, Alberti S, et al. In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother*, 1996, 40: 342-348.



142. EFSA. Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food producing animals. *EFSA Journal*, 2011, 9:2322-2417.
143. Shaikh S, Fatima J, Shakil S, Rizvi SM, Kamal MA. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*, 2015, 22:90-101.
144. Görgeç S. Genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz üreten nozokomiyal Escherichia coli izolatlarında beta-laktamaz genleri ve klonal ilişkinin araştırılması. Tıp Fakültesi. Uzmanlık Tezi, Malatya: İnönü Üniversitesi, 2012.
145. Bradford PA: Extended spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14, 933-951.
146. Schwaber MJ, Carmeli Y: Mortality and delay in effective therapy associated with extended spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and metaanalysis. *J Antimicrob Chemother*, 2007, 60; 913–920.
147. Jacoby GA, Munoz-Price LS: The new  $\beta$ -lactamases. *N Engl J Med*, 2005, 325, 380-391.
148. Jacoby GA. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. *Infect Dis Clin N Am*, 1997, 11, 875-887.
149. Knothe H, Shah P, Krcmery V, et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and ceforoxime in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens. *Infection*, 1983, 11: 315-317.
150. Poirel L, Lebessi E, Castro M, Fevre C, Foustoukou M, Nordmann P. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of

- Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrob Agents Chemother*, 2004, 48, 2277-2279.
151. Hall LM, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1993, 37: 1637-44.
152. Akyıldız R, Özsoy MF, Alyunay H, ve ark. *Klebsiella pneumoniae* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz sıklığı ve beta laktam antibiyotik direncinin araştırılması. *Klimik Dergisi*, 1998, 11: 53-58.
153. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute): M100-S23—Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-third informational supplement. *CLSI*, Wayne, Pennsylvania, 2013.
154. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, 2005, 18: 657-86.
155. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standarts for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-fourth Informational supplement. CLSI document M100- S24 Pennsylvania: *CLSI*, 2014.
156. Gülay Z. ESBL'lerin tanı yöntemleri. İçinde: Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ (editörler). Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi, 2004: 13-26.
157. Akyıldız R, Özsoy M. F, Altunay H, Koçak N, Şaban Ç, Yenen O. Ş. *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Sıklığı ve Beta-Laktam Antibiyotik Direncinin Araştırılması. *Klimik Dergisi*, 1998, 11: 53-58.

158. Drieux L, Brossier F, Sougakoff W, Jarlier V. Phenotypic detection of extended-spectrum betalactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14:90-103.
159. Dağlar D, Öngüt G. Genişlemiş spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve tanı yöntemleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 2012, 1:1-9.
160. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect*, 2003, 47(4): 273-95.
161. Dolapçı İ. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar: Klinik mikrobiyoloji laboratuvarı, tedavi ve enfeksiyon kontrolündeki rolleri. *Mikrobiyol Bült*, 2005, 39: 229-40.
162. Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microbiol Rev*, 2001, 14, 836-871.
163. Tutun H, Karagöz A, Altıntaş L, Koçak N: Determination of antibiotic susceptibility, ESBL genes and pulsed-field gel electrophoresis profiles of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-containing Escherichia coli isolates. *Ankara Univ Vet Fak Derg*, 2019, 66: 407-416.
164. Güller Ö. Escherichia coli'nin 025b-ST131 klonunun ve CTX-M-15 benzeri genişlemiş spektrumlu betalaktamazın pcr ile belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2021.
165. Nicholas-Chanoine MH, Bertrand X, Madec JY. Escherichia coli ST131, an intriguing clonal group. *Clin Microbiol Rev*, 2014, 27: 543-574.
166. Çizmecı Z, Otlı B, Aktaş E, Ördekçi S, Açıkgöz Ö, Güleç N. İdrar ve idrar dışı klinik örneklerden izole edilen GSBL üreten Escherichia coli izolatlarında yüksek

- riskli ST131 klonunun MALDI-TOF ve Gerçek Zamanlı PCR ile araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, 2018, 52(1): 13-22.
167. Nicolas-Chanoine MH, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso MP, Canica MM, et al. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, 2008, 61:273-281.
168. Coque TM, Novais A, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTXM-15. *Emerg Infect Dis*, 2008, 14:195-200.
169. Lau SH, Kaufmann ME, Livermore DM, Woodford N, Willshaw GA, Cheasty T, et al. UK epidemic *Escherichia coli* strains A–E, with CTX-M-15  $\beta$ -lactamase, all belong to the 44 international O25: H4-ST131 clone. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2008, 62:1241-4
170. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev*, 2015, 28: 565-91.
171. Cagnacci S, Gualco L, Debbia E, Schito GC, Marchese A. European emergence of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clonal groups O25: H4-ST 131 and O15: K52: H1 causing community-acquired uncomplicated cystitis. *Journal of clinical microbiology*, 2008, 46:2605-12.
172. Yumuk Z, Afacan G, Nicolas-Chanoine M-H, Sotto A, Lavigne J-P. Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2008, 62:284-8.
173. Literacka E, Bedenic B, Baraniak A, Fielt J, Tonkic M, Jajic-Bencic I, et al. blaCTX-M genes in *Escherichia coli* strains from Croatian hospitals are located in

- new (blaCTX-M-3a) and widely spread (blaCTX-M-3a and blaCTX-M-15) genetic structures. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009, 53:1630-5.
174. Suzuki S, Shibata N, Yamane K, Wachino J-i, Ito K, Arakawa Y. Change in the prevalence of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan by clonal spread. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008, 63:72-9.
175. Peirano G, Pitout JD. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M  $\beta$ lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25: H4. *International journal of antimicrobial agents*, 2010, 35:316-21.
176. Naseer U, Haldorsen B, Tofteland S, Hegstad K, Scheutz F, Simonsen GS, et al. Molecular characterization of CTX- M- 15- producing clinical isolates of *Escherichia coli* reveals the spread of multidrug- resistant ST131 (O25: H4) and ST964 (O102: H6) strains in Norway. *Apmis*, 2009, 117:526-36.
177. Johnson JR, Menard M, Johnston B, Kuskowski MA, Nichol K, Zhanel GG. Epidemic clonal groups of *Escherichia coli* as a cause of antimicrobial-resistant urinary tract infections in Canada, 2002 to 2004. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009, 53:2733-9.
178. Leflon-Guibout V, Blanco J, Amaqdouf K, Mora A, Guize L, Nicolas-Chanoine MH. Absence of CTX-M enzymes but high prevalence of clones, including clone ST131, among fecal *Escherichia coli* isolates from healthy subjects living in the area of Paris, France. *J Clin Microbiol*, 2008, 46:3900-5.
179. Laupland KB, Church DL, Vidakovich J, Mucenski M, Pitout JD. Community-onset extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *Journal of Infection*, 2008, 57:441-8.
180. Nicolas-Chanoine M-H, Bertrand X, Madec J-Y. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical microbiology reviews*, 2014, 27:543-74.

181. Banerjee R, Johnson JR. A new clone sweeps clean: the enigmatic emergence of Escherichia coli ST131. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2014, AAC.02824-14.
182. Silwedel C, Vogel U, Claus H, Glaser K, Speer C, Wirbelauer J. Outbreak of multidrug-resistant Escherichia coli sequence type 131 in a neonatal intensive care unit: Efficient active surveillance prevented fatal outcome. *Journal of Hospital Infection*, 2016, 93:181-6.
183. Banerjee R, Johnston B, Lohse C, Porter SB, Clabots C, Johnson JR. Escherichia coli sequence type 131 is a dominant, antimicrobial-resistant clonal group associated with healthcare and elderly hosts. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 2013, 34:361-9.
184. Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR, Heisig A, Heisig P, Clabots C, et al. Commonality among fluoroquinolone-resistant sequence type ST131 extraintestinal Escherichia coli isolates from humans and companion animals in Australia. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2011: AAC. 00306-11.
185. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. Escherichia coli ST131: The quintessential example of an international multiresistant high-risk clone. *Adv Appl Microbiol.* 2015, 90:109-154.
186. Johnson JR, Tchesnokova V, Johnston B, Clabots C, Roberts PL, Billig M, et al. Abrupt emergence of a single dominant multidrug-resistant strain of Escherichia coli. *The Journal of infectious diseases*, 2013, 207:919-28.
187. Banerjee R, Robicsek A, Kuskowski MA, Porter S, Johnston BD, Sokurenko E, et al. Molecular epidemiology of Escherichia coli sequence type ST131 and its H30 and H30-Rx subclones among extended-spectrum beta-lactamase-positive and-

- negative *E. coli* clinical isolates from the Chicago region (2007-2010). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2013, AAC. 01604-13.
188. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*, 2002, 8(9):881.
189. Nandakumar V, Chittaranjan S, Kurian VM, Doble M. Characteristics of bacterial biofilm associated with implant material in clinical practice. *Polym J*, 2013, 45:137.
190. Davies J, Davies D. Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2010, 74:417–33.
191. Costerton JW, Geesey GG, Cheng KJ, How Bacteria Stick. *Scientific American*, 1978, 238:86-95.
192. Williams MM, Yakrus MA, Arduino MJ, et al. Structural Analysis of Biofilm Formation by Rapidly and Slowly Growing Nontuberculous Mycobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75:2091-2098.
193. Marshall. *Interfaces in Microbial Ecology*, 1976, 44-47.
194. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol*, 1995, 49:711-745
195. Allison DG. The Biofilm Matrix. *Journal of Biofouling*, 2003, 19(2):139-150.
196. Padera, R. F., Infection in Ventricular Assist Devices: The Role of Biofilm. *Cardiovascular Pathology*, 2006, 15:264– 270.
197. Srinivasan R, Vigneshwari L, Rajavel T, Durgadevi R, Kannappan A, Balamurugan K, et al. Biogenic synthesis of silver nanoparticles using Piper betle aqueous extract and evaluation of its quorum sensing and antibiofilm potential against uropathogens with cytotoxic effects: an in vitro and in vivo approach. *Environ Sci Pollut Res*, 2018, 25:10538–54.

198. Shrout JD, Tolker-Nielsen T, Givskov M, Parsek MR. The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. *MRS Bulletin*, 2011, 36:367-73.
199. Danese PN, Pratt LA, Kolter R. Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol*, 2000, 182:3593-6.
200. Watnick PI, Kolter R. Steps in the development of a Vibrio cholerae El Tor biofilm. *Mol Microbiol*, 1999, 34:586-95.
201. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev*, 2002, 15:167-93.
202. Donlan RM. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002, 8:881-890.
203. Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol*. 2003, 11:30-36.
204. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001, 45:999-1007.
205. Kuba M. İçme Suyu Pompalarında Escherichia Coli'nin Oluşturduğu Biyofilm Yapısının İncelenmesi ve Oluşmasının Önlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, İzmir: Dokuz Eylül Üniversitesi, 2012.
206. Sahm DF, Thornsberry C, Mayfield DC, Jones ME, Karlowsky JA. Multidrug-resistant urinary tract isolates of Escherichia coli: Prevalence and patient demographics in the United States in 2000. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45:1402-6.



207. Pitout JD, Reisbig MD, Venter EC: Modification of the double-disc test for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC  $\beta$ -lactamases. *J Clin Microbiol*, 2003, 41:3933-3935.
208. Harrison JJ, Stremick CA, Turner RJ ve diğ. Microtiter susceptibility testing of microbes growing on peg lids: a miniaturized biofilm model for high-throughput screening. *Nat Protoc*, 2010, 5:1236-1254.
209. Freeman DJ, Falkiner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *J Clin Pathol*, 1989 Aug, 42:872-4.
210. Nasr AR, AbuShady MH, Hussein SH. Biofilm formation and presence of icaAD gene in clinical isolates of staphylococci. *The Egyptian Journal of Medical Human Genetics*, 2012, 13:269–274.
211. Stepanovic S, Vukovic D, Dakic I, Savic B, Svabic- Vlahovic M. “A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation”. *Journal of Microbiological Methods*, 2000, 40:175–179.
212. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*, 1985, 22:996-1006.
213. Ausubel FM, Brient R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Short protocols in molecular biology*, 2nd ed. New York, John Willey & Sons, 1995.
214. Sambrook J, Fritsch EF, Shuman HA. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989, p. 3520.
215. Turner PC, McLennan AG, Bates AD, White MRH. Moleküler Biyoloji Önemli Notlar. *Nobel Yayın*, Ankara, 2004, 613, 346.

216. Yun KW, Kim DS, Kim W, Lim IS. Molecular typing of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from Korean children with urinary tract infection. *Korean J Pediatr*, 2015; 58:20-27
217. Jegadeeshkumar D, Rajen KS, Nirmala P, Gopinath LR, Prakash B. Determination of acquaintance between biofilm and extended spectrum  $\beta$ -lactamases producers from diarrheal stool isolates of *Escherichia coli*. *Int. J. Curr. Res. Biosci. Plantbiol*, 2016, 3:174-178.
218. Guiral E, Bosch J, Vila J, Soto SM. Prevalence of *Escherichia coli* among samples collected from the genital tract in pregnant and nonpregnant two men: relationship with virulence. *FEMS, Microbiology Letters*, 2011, 314, 170–173.
219. Arısoy M, Yousefi Rad A, Akin A, Akar N. Relationship between susceptibility to antimicrobials and virulence factors in pediatric *Escherichia coli* isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2008, 31:4–8.
220. James R. Johnson, Adam L. Stell, Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*, 2000, 181, 1, 261–272.
221. Derakhshandeh A, Firouzi R, Motamedifar M, Motamedi Borojeni A, Bahadori M, Arabshahi S, et al. Distribution of virulence genes and multiple drug-resistant patterns amongst different phylogenetic groups of uropathogenic *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infection. *Lett Appl Microbiol*, 2015, 60:148–154.
222. Arslan A. İdrar Yolları Enfeksiyonu Etkeni *E.coli*'lerin Adezinleri ile Antibiyotik Direnci Arasındaki İlişkinin Klasik ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Ankara: Gazi Üniversitesi, 2010.

223. Usein CR, Damian M, Tatu-Chitoiu D, et al. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. *J Cell Mol Med*, 2001, 5:303-310.
224. Colpan A, Johnston B, Porter S, et al. *Escherichia coli* sequence type 131 (ST131) subclone H30 as an emergent multidrug-resistant pathogen among US veterans. *Clin Infect Dis*, 2013, 57:1256-1265.
225. Machado E, Canto R, Baquero F, Gala JC, Rolla A, Peixe L, Coque TM. Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. *Antimicrob Agents Chemother*, 2005, 49:1823-1829.
226. Lévesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob Agents Chemother*, 1995, 39:185-191.
227. White PA, McIver CJ, Rawlinson WD. Integrons and gene cassettes in the Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 5:2658-6261.
228. Islam TU, Rizwan M. Comparison of correlation measures for nominal data. *Communications in Statistics-Simulation and Computation*, 2020, 51(3):698-714.
229. Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish journal of emergency medicine*, 2018, 18:91-93.
230. Parker RI, Vannest KJ, Davis JL. Effect size in single-case research: A review of nine nonoverlap techniques. *Behavior modification*, 2011, 35:303-22.
231. Baykul Y. Sosyal bilimler için istatistik: SPSS uygulamalı. *Pegem Akademi*, 2014.
232. Al-Guranie DR, Al-Mayahie SM. Prevalence of *E. coli* ST131 among Uropathogenic *E. coli* Isolates from Iraqi Patients in Wasit Province, Iraq. *Int J Microbiol*, 2020 Oct 16, 2020:8840561.

233. Merino I, Hernández-García M, Turrientes MC, et al. Emergence of ESBL-producing *Escherichia coli* ST131-C1-M27 clade colonizing patients in Europe. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73:2973-2980.
234. Şardan YÇ. Hastane Enfeksiyonları: Tanımlar, Sürveyans, Epidemilere Yaklaşım. İçinde: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. (Editörler). *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, 3. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 2008: 545-557.
235. Peirano G, Van Greune C, Pitout J. Characteristics of infections caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* from community hospitals in South Africa. In: Abstracts of the Forty-ninth Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Boston, MA, 2010. Abstract C2-682. Washington, DC, USA, American Society for Microbiology.
236. Clermont O, Dhanji H, Upton M, Gibreel T, Fox A, Boyd D, Mulvey MR, Nordmann P, Ruppé E, Sarthou JL, Frank T, Vimont S, Arlet G, Branger C, Woodford N, Denamur E. Rapid detection of the O25b-ST131 clone of *Escherichia coli* encompassing the CTX-M-15-producing strains. *J Antimicrob Chemother*, 2009 Aug, 64:274-277.
237. Can F, Kurt-Azap Ö, İspir P, Nurtop E, Seref C, Loçlar İ, et al. The clinical impact of ST131 H30-Rx subclone in urinary tract infections due to multidrug-resistant *Escherichia coli*. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2016, 4:49-52.
238. Sidjabat HE, Derrington P, Nimmo GR et al. *Escherichia coli* ST131 producing CTX-M-15 in Australia. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65:1301–1303.
239. Platell JL, Cobbold RN, Johnson JR et al. Clonal group distribution of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* among humans and companion animals in Australia. *J Antimicrob Chemother*, 2010, 65:1936–1938.

240. Lee MY, Choi HJ, Choi JY et al. Dissemination of ST131 and ST393 community-onset, ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* clones causing urinary tract infections in Korea. *J Infect*, 2010, 60:146–153.
241. Gürpınar Ö. Kinolon Dirençli ve Duyarlı İnvaziv *Escherichia Coli* Kan İzolatlarında St131/H30 Klon/Subklonunun Virülans ile İlişkisi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Ankara: Hacettepe Üniversitesi, 2018.
242. Güller Ö. *Escherichia coli*'nin 025b-ST131 klonunun ve CTX-M-15 benzeri genişlemiş spektrumlu betalaktamazın pcr ile belirlenmesi. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Adana: Çukurova Üniversitesi, 2021.
243. Arslan FM. Sağlıklı çocuklarda yüksek riskli *Escherichia coli* ST131 klonu taşıyıcılığının araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, 2022.
244. Haslı F. Yoğun bakım ve dışındaki servislerde yatan hastalardan izole edilen *Escherichia coli* izolatlarında st131 klonunun gerçekzamanlı pcr ile araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi, Samsun: On Dokuz Mayıs Üniversitesi 2019.
245. Negeri AA, Mamo H, Gurung JM, Firoj Mahmud AKM, Fällman M, Seyoum ET, Feleke Desta A and Francis MS. Antimicrobial Resistance Profiling and Molecular Epidemiological Analysis of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamases Produced by Extraintestinal Invasive *Escherichia coli* Isolates From Ethiopia: The Presence of International High-Risk Clones ST131 and ST410 Revealed. *Front. Microbiol*, 2021, 12:706846.

246. Teramae M, Osawa K, Shigemura K, et al. Prevalence of Quinolone Resistance of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* with ST131-fimH30 in a City Hospital in Hyogo, Japan. *Int J Mol Sci*, 2019, 20:5162.
247. Brisse S, Diancourt L, Laouenan C, Vigan M, Caro V, Arlet G, et al. Phylogenetic distribution of CTX-M- and non-extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates: group B2 isolates, except clone ST131, rarely produce CTX-M enzymes. *J Clin Microbiol*, 2012, 50:2974-81.
248. Lopez-Cerero L, Navarro MD, Bellido M, Martin-Pena A, Vinas L, Cisneros JM, et al. *Escherichia coli* belonging to the worldwide emerging epidemic clonal group O25b/ST131: risk factors and clinical implications. *J Antimicrobial Chemother*, 2014, 69:809-814.
249. Cho SY, Kang CI, Cha MK, Wi YM, Ha YE, Chung DR, et al. Clinical Features and Treatment Outcomes of Bloodstream Infections Caused by Extended-Spectrum betaLactamase-Producing *Escherichia coli* Sequence Type 131. *Microbial drug resistance (Larchmont, NY)*, 2015, 21:463-469.
250. Sherchan JB, Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Ohmagari N, Kirikae T, Nagamatsu M, et al. Clinical epidemiology and molecular analysis of extended-spectrum-beta-lactamaseproducing *Escherichia coli* in Nepal: characteristics of sequence types 131 and 648. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59:3424-3432.
251. Can F, Kurt-Azap O, Nurtop E, Ispir P, Seref C, Ergonul O. Molecular epidemiology of bloodstream-associated *Escherichia coli* ST131 H30-Rx subclone infection in a region with high quinolone resistance. *Journal of medical microbiology*, 2016, 65:306-310.
252. Aktaş E, Otlu B, Erdemir D, Ekici H, Bulut E. A First Insight into *Escherichia coli* ST131 High-Risk Clone Among Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing

- Urine Isolates in Istanbul with the Use of Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry and Real-Time PCR. *Microbial Drug Resistance*, 2017, 23:1032-1036.
253. Kına N. Klinik Escherichia coli İzolatlarında Yüksek Riskli St131 Klonunun Araştırılması. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Tıpta Uzmanlık Tezi, İstanbul: Sağlık Bilimleri Üniversitesi, 2019.
254. Zhong YM, Liu WE, Liang XH, Li YM, Jian ZJ, Hawkey PM. Emergence and spread of O16-ST131 and O25b-ST131 clones among faecal CTX-M-producing Escherichia coli in healthy individuals in Hunan Province, China. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70:2223-2227.
255. Hojabri Z, Darabi N, Arab M, Saffari F, Pajand O. Clonal diversity, virulence genes content and subclone status of Escherichia coli sequence type 131: comparative analysis of E. coli ST131 and non-ST131 isolates from Iran. *BMC Microbiol*, 2019, 30;19.
256. Peirano G, Costello M, Pitout JD. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli from the Chicago area: high prevalence of ST131 producing CTX-M-15 in community hospitals. *Int J Antimicrob Agents*, 2010, 36:19-23.
257. Lee E, Lee Y. Prevalence of Escherichia coli Carrying pks Islands in Bacteremia Patients. *Ann Lab Med*, 2018, 38:271-273.
258. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsushima A, Ito Y, Ichiyama S. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing Escherichia coli in Japan. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2012, 67, 2612-2620.

259. Er DK, Dündar D, Uzuner H. Üriner Sistem Enfeksiyonu Etkeni Olan Escherichia coli İzolatlarında, ST131 Sekans Tipinin ve Alt Klonlarının Belirlenmesi, 2016,1-37.
260. Blanc V, Leflon-Guibout V, Blanco J, Haenni M, Madec JY, Ragainon G, et al. Prevalence of day-care centre children (France) with faecal CTX-M-producing Escherichia coli comprising O25b:H4 and O16:H5 ST131 strains. *J Antimicrob Chemother*, 2014, 69:1231- 1237.
261. Dahbi G, Mora A, Lopez C, Alonso MP, Mamani R, Marzoa J, et al. Emergence of new variants of ST131 clonal group among extraintestinal pathogenic Escherichia coli producing extended-spectrum beta-lactamases. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 42:347-351.
262. Rogers BA, Sidjabat HE, Paterson DL. Escherichia coli O25b-ST131: a pandemic, multiresistant, community-associated strain. *J Antimicrob Chemother*, 2011, 66 :1-14.
263. Hojabri Z, Mirmohammadkhani M, Kamali F, Ghassemi K, Taghavipour S, Pajand O. Molecular epidemiology of Escherichia coli sequence type 131 and its H30/H30-Rx subclones recovered from extra-intestinal infections: first report of OXA-48 producing ST131 clone from Iran. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2017, 36:1859-1866.
264. Shin J, Ko KS. Effect of plasmids harbouring blaCTX-M on the virulence and fitness of Escherichia coli ST131 isolates. *Int J Antimicrob Agents*, 2015, 46: 214-218.
265. Safi M, Achour W, Baaboura R, El Fatmi R, Ben othmen T, Ben Hassen A. Distribution of virulence associated traits among urine Escherichia coli isolates



- from patients in oncohematology. *J Infect Chemother: official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 2016, 22:221-224.
266. Alqasim A, Abu Jaffal A, Alyousef AA. Prevalence and molecular characteristics of sequence type 131 clone among clinical uropathogenic *Escherichia coli* isolates in Riyadh, Saudi Arabia. *Saudi J Biol Sci*, 2020, 27:296-302.
267. Huang J, Lan F, Lu Y, Li B. Characterization of Integrons and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Sequence Type 131 Isolates. *Can J Infect Dis Med Microbiol*, 2020, 24.
268. Li D, Wyrsh ER, Elankumaran P, Dolejska M, Marena MS, Browning GF, Bushell RN, McKinnon J, Chowdhury PR, Hitchick N, Miller N, Donner E, Drigo B, Baker D, Charles IG, Kudinha T, Jarocki VM, Djordjevic SP. Genomic comparisons of *Escherichia coli* ST131 from Australia. *Microb Genom.*, 2021, 7(12):000721.
269. Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, Denamur E, Arlet G. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2008, 61:1024 –1028.
270. Kudinha T, Johnson JR, Andrew SD, Kong F, Anderson P, Gilbert GL. *Escherichia coli* sequence type 131 as a prominent cause of antibiotic resistance among urinary *Escherichia coli* isolates from reproductive-age women. *J Clin Microbiol*, 2013, 51:3270-3276.
271. Zhang S, Zhang Q, Huang J, Cao Y, Zhao Z, Li B. Epidemic Potential of *Escherichia coli* O16:H41-ST131: Compared with Pandemic O25b:H30-ST131 Lineage. *Infect Drug Resist*, 2021, 8;14:2625-2632.

## EKLER

### EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	:
Doğum tarihi	:
Doğum yeri	:
Medeni hali	:
Uyruğu	:
Adres	:
Tel	:
Faks	:
E-mail	:
Eğitim	
Lise	:
Lisans	:
Yüksek lisans	:
Doktora	:
Yabancı Dil Bilgisi	
İngilizce	:
Almanca:	.....
Rusça:	.....
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar	
.....	
İlgi Alanları ve Hobiler	
.....	

## EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU

### EK-2. ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU



**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
Graduate School of Health Sciences

#### ETİK BİLDİRİM VE İNTİHAL BEYAN FORMU<sup>1</sup>

Öğrencinin Adı ve Soyadı	Elif AYDIN
Öğrencinin Numarası	-----
Ana Bilim Dalı	<b>Tıbbi Mikrobiyoloji</b>
Öğrencinin Kayıtlı Olduğu Program Türü	Doktora

Yukarıda bilgileri verilen tezin intihal tespit yazılımıyla (Turnitin) yapılan tarama sonucunda elde edilen benzerlik oranları aşağıdaki gibidir. Beyan edilen bilgilerin doğru olduğunu, aksi hâlde doğacak hukuki sorumlulukları kabul ve beyan ederiz.

Bölümler	Benzerlik Oranı	Maksimum Benzerlik Oranları
I. Giriş	% 4	% 15
II. Genel Bilgiler	% 15	% 35
III. Materyal ve Metod	% 34	% 35
IV. Bulgular	% 10	% 15
V. Tartışma	% 13	% 20

**Not:** Yedi kelimeye kadar benzerlikler ile Başlık, Kaynakça, İçindekiler, Teşekkür, Dizin ve Ekler kısımları tarama dışı bırakılabilir. Yukarıdaki azami benzerlik oranları yanında tek bir kaynaktan olan benzerlik oranlarının %5'den büyük olmaması gerekir.

Tez Yazarı (Öğrenci)	Tez Danışmanı
----------------------	---------------

## EK-3. ETİK KURUL ONAY FORMU



### ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU



#### KARAR

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı
	TELEFON	+90 442 234 65 11
	FAKS	+90 442 236 09 68
	E-POSTA	atatipetikkurul@gmail.com
SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Selahattin ÇELEBİ	
ARAŞTIRMACININ AÇIK ADI	Klinik örneklerden izole edilen <i>Escherichia coli</i> izolatlarının moleküler epidemiyolojik karakterizasyonu ve yüksek riskli ST131 klonunun araştırılması	
KARAR BİLGİLERİ	Toplantı Sayısı: 06 Karar No: 6	Tarih: 30.09.2021
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmacı/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın bütçesinin BAP tarafından karşılanması koşulu ile yapılmasında bilimsel ve etik açıdan sakınca olmadığına oy birliği ile karar verildi.  Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir. Araştırmacıya çalışmalarında başarılar dileriz.	