**T.C.**

**RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ**

**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

# DOĞU KARADENİZ BÖLGESİ'NDE YAŞAYAN *PELOPHYLAX* SP. TÜRLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENTERİK BAKTERİLERDEKİ ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN BELİRLENMESİ ve MOLEKÜLER ANALİZİ

**ERVA RAKICI**

**TEZ DANIŞMANI**

**PROF. DR. OSMAN BİROL ÖZGÜMÜŞ**

**DOKTORA TEZİ**

**TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**RİZE-2022**

**ONAY**

Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Doktora Programı öğrencisi Erva RAKICI'nın hazırladığı "Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Yaşayan *Pelophylax* sp. Türlerinden İzole Edilen Enterik Bakterilerdeki Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi ve Moleküler Analizi" başlıklı çalışma Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi:

| | |
|---|---|
| Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ<br>(Danışman) | |
| Prof. Dr. Kurtuluş BURUK | |
| Doç. Dr. Kazım ŞAHİN | |
| Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK | |
| Doç. Dr. Irmak BARAN | |

---

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü'ne 27/01/2022 tarihinde teslim edilen bu tez Enstitü Yönetim Kurulu'nun ..…/…../20..…. tarih ve …… sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Doç. Dr. Ahmet YANIK
Enstitü Müdürü

## BEYAN

Bu tez çalışmasının Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

*27/01/2022*

*Erva RAKICI*

## *İthaf*

*Çalışmalarımda her zaman yanımda olan ve varlıklarıyla beni mutlu eden canım annem Neşe AKKOYUN, canım kardeşim Mert ESMER, sevgili eşim Serkan RAKICI ve bir tanecik oğlum Mustafa Emir RAKICI'ya ithaf ediyorum.*

## TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince her konuda destek, hoşgörü ve anlayışını benden esirgemeyen, çalışmalarım boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak bana yol gösteren sevgili danışman hocam Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ' e, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr Zihni Açar YAZICI' ya, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden değerli yardımlarını esirgemeyen Doç. Dr. Ayşegül ÇOPUR ÇİÇEK' e, tezimin moleküler analizlerinde destek sağlayan Doç. Dr. Alper KARAGÖZ' e, bilimsel paylaşımları ve manevi desteği ile her zaman yanımda olduğunu hissettiren değerli dostum Dr. Öğr. Üyesi Mehtap ATAK' a, manevi desteklerini esirmeyen sevgili dostlarım Dr. Öğr. Üyesi Zehra TOPAL SUZAN' a ve Arş. Gör. Eda YILMAZ KUTLU' ya, sevgili oda arkadaşlarım Öğr. Gör. Dr. Nebahat AYDOĞAN EJDER, Öğr. Gör. Sibel KARAKAŞ ve Arş. Gör. Sena ŞAHİN AKTURA' ya teşekkürlerimi sunarım.

DNA dizi analizi çalışmalarımda bilgi ve teknik imkânlarını benimle paylaşan Prof. Dr. Ersan KALAY'a ve Arş. Gör. İdris ER'e ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı üyelerine teşekkür ederim.

Akademik yolculuğumun ilk gününden itibaren her zorluğa benimle birlikte katlanan, desteklerini ve sevgilerini bir an olsun esirgemeyen canım annem Neşe AKKOYUN ve canım kardeşim Mert ESMER'e ve sevgili eşim Serkan RAKICI' ya, bu süreçte hayatıma bir güneş gibi doğan ve hayatımı anlamlandıran bir tanecik oğlum Mustafa Emir RAKICI'ya sonsuz teşekkürlerimi ve sevgilerimi sunarım.

Bu doktora tezini TSA-2016-526 numaralı proje kodu ile Araştırma Projesi olarak destekleyen RTEÜ-BAP birimine teşekkür ederim.

Erva RAKICI

# İÇİNDEKİLER


**Sayfa**

**İÇ KAPAK SAYFASI**

**KABUL ve ONAY**

**BEYAN**

**İTHAF**

**TEŞEKKÜR**

**İÇİNDEKİLER** **vi**

**TABLOLAR DİZİNİ** **vii**

**ŞEKİLLER DİZİNİ** **viii**

**RESİMLER DİZİNİ** **ix**

**KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ** **x**

**ÖZET** **xiv**

**ABSTRACT** **xv**

**1. GİRİŞ ve AMAÇ** **1**

**2. GENEL BİLGİLER** **4**

2.1. Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları 4

2.1.1. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması 4

2.1.2. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları 6

2.1.3. Antibiyotik Direnci 7

2.1.4. Antibiyotik Direnç Mekanizmaları 8

2.1.5. Antibiyotik Direncinin Yayılması 12

2.1.5.1. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Gen Aktarım Mekanizmaları 13

2.1.5.1.1. Transformasyon 13

2.1.5.1.2. Transdüksiyon 14

2.1.5.1.3. Konjugasyon 15

2.1.5.2. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Hareketli Elemanlar 16

2.1.5.2.1. Plazmitler 16

2.1.5.2.2. Transpozonlar 17

2.1.5.2.3. İntegronlar 18

2.2. *Enterobacteriaceae* Ailesi 22
2.3. Çevre Orijinli Bakteriler ve Antimikrobiyal Direnç 23
2.4. *Pelophylax* sp. ve Çevresel İndikatör Özelliği 25
**3. GEREÇ ve YÖNTEM** **28**
3.1. Gereçler, Besiyerleri ve Kimyasallar 28
3.1.1. Gereçler 28
3.1.2. Laboratuvar Suşları ve Standart Suşlar 28
3.1.3. Besiyerleri ve Ayraçlar 29
3.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi İçin Solüsyonlar 31
3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar 32
3.1.6. Pulsed Field Jel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar 32
3.2. Yöntem 32
3.2.1. Arazi Çalışması 32
3.2.2. Bakteri İzolasyonu 37
3.2.3. Biyokimyasal Testler 38
3.2.4. VITEK 2 Otomatize Sistemi ile Tanımlama 40
3.2.5. MALDI-TOF-MS Analizi ile Tanımlama 40
3.2.6. Antimikrobiyal Hassasiyet Deneyleri 40
3.2.7. Toplam DNA İzolasyonu 41
3.2.8. PZR ile İntegron Gen Kasetleri ve Direnç Genlerinin Taranması 42
3.2.9. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE) 46
3.2.10. Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) Yöntemi ile GSBL Tayini 49
3.2.11. Konjugasyon Deneyi 49
**4. BULGULAR** **51**
4.1. *Enterobacteriaceae* İzolatlarının Tür Tayinleri 51
4.2. Antibiyotik Hassasiyet Testi 52
4.3. PZR Testleri 63
4.3.1. İntegron Gen Kasetleri 63
4.3.2. Beta Laktam ve Diğer Direnç Genleri 64
4.4. Pulsed Field Jel Elektroforezi 67
4.5. Çift Disk Sinerji Testi 69
4.6. Konjugasyon Deneyi 69
**5. TARTIŞMA** **70**

**6. SONUÇ ve ÖNERİLER** **76**
**7. KAYNAKLAR** **78**
**EKLER** **96**
EK 1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Belgesi 97
**ÖZGEÇMİŞ** **98**

## TABLOLAR DİZİNİ


| Tablo No | | Sayfa |
|---|---|---|
| **Tablo 1.** | Şehir, lokasyon, örnek isimlendirmesi ve örneklemenin yapıldığı tarihler | **35** |
| **Tablo 2.** | PZR reaksiyonunda kullanılan master mix bileşenleri | **42** |
| **Tablo 3** | Kullanılan oligonükleotit primer dizileri ve amplikon büyüklükleri | **43** |
| **Tablo 4.** | Polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyon koşulları | **45** |
| **Tablo 5.** | Kurbağalardan izole edilen bakterileri türleri ve yüzde oranları | **51** |
| **Tablo 6.** | VITEK 2 ve MALDI-TOF-MS analizleri ile suşların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık test sonuçları | **53** |
| **Tablo 7.** | Bakterileri izolatlarının antibiyotiklere direnç oranları | **60** |
| **Tablo 8.** | Tek, iki, üç veya daha fazla antimikrobiyal ajana direnç gösteren bakteri izolatlarının sayısı/oranı | **62** |
| **Tablo 9.** | PZR ile direnç geni tespit edilen suşlar ve antibiyotik direnç fenotipleri. | **64** |
| **Tablo 10.** | Kinolon dirençli suşlarda *gyrA* ve *parC* genlerindeki nükleotit değişimleriyle birlikte kodladığı amino asitlerdeki değişimler | **67** |

# ŞEKİLLER DİZİNİ


| Şekil No | | Sayfa |
|---|---|---|
| **Şekil 1.** | Sınıf 1 integronun genel yapısı | **20** |
| **Şekil 2.** | Sınıf 2 integronun genel yapısı | **21** |
| **Şekil 3.** | Antibiyotiklerin çevreye giriş ve dağıtım yolları | **24** |
| **Şekil 4.** | Kurbağaların yakalandığı iller ve koordinatları | **33** |
| **Şekil 5.** | İntegronların agaroz jel elektroforezi | **63** |
| **Şekil 6.** | a) *Klebsiella pneumoniae* A1B1 suşunda *gyrA* genindeki (GenBank no: MW119567) nükleotit değişiminin gözlendiği DNA dizileme kromatogramı. b) *Klebsiella pneumoni* A1B1 *gyrA* (GenBank no: MW119567) ve *K. pneumoniae* NCTC8464 suşunun *gyrA* genlerinin (GenBank no: CABEEL010000003) 248. nükleotitleri ve 83. amino asitlerinin karşılaştırmalı analizi. | **66** |
| **Şekil 7.** | *Escherichia coli* suşlarının direnç fenotipleri ve pulsed field jel elektroforezi profilleri | **68** |

## RESİMLER DİZİNİ


| Resim No | | Sayfa |
|---|---|---|
| **Resim 1.** | *Pelophylax* sp.'den kloakal sürüntü örneğinin alınması | **36** |
| **Resim 2.** | Yakalanmış juvenil *Pelophylax* sp. birey | **37** |

## KISALTMA, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

### Kısaltmalar

| | |
|---|---|
| **AD** | Ana Bilim Dalı |
| **AAC** | Asetiltransferaz |
| **ABD** | Amerika Birleşik Devletleri |
| **AMP** | Ampisilin |
| **ANT** | Adeniltransferaz |
| **APH** | Fosfotransferaz |
| **ATCC** | Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu |
| **BLAST** | Basic Local Alignment Search Tool |
| **bç** | Baz Çifti |
| **C** | Kloramfenikol |
| **CAZ** | Seftazidim |
| **CAT** | Kloramfenikol asetiltransferaz |
| **CDC** | Hastalık Kontrol ve Koruma Merkezi |
| **CFU** | Koloni Oluşturan Birim |
| **CIP** | Siprofloksasin |
| **CS** | Korunmuş Bölge |
| **CXM** | Sefuroksim |
| **CZ** | Sefazolin |
| **ÇDST** | Çift Disk Sinerji Testi |
| **Dhfr** | Dihidrofolat Reduktaz |
| **DHPS** | Dihidropteroat Enzimi |
| **DNA** | Deoksiribo Nükleik Asit |
| **dNTP** | Deoksinükleotit |
| **DSÖ** | Dünya Sağlık Örgütü |
| **EDTA** | Etilen Diamintetra Asetik Asit |
| **EMB** | Eozin Metilen Blue Agar |
| **EtBr** | Etidyum Bromür |
| **EUCAST** | Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Komitesi |

| | |
|---|---|
| **GN** | Gentamisin |
| **GSBL** | Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz |
| **Hfr** | Yüksek Rekombinasyon Sıklığı |
| **HLS** | Hücre Liziz Tamponu |
| **HST** | Hücre Süspansiyon Tamponu |
| **IMP** | İmipenem |
| **IRT** | İnhibitör dirençli TEM |
| **INC** | Incompatibility (uyumsuzluk) |
| **KTÜ** | Karadeniz Teknik Üniversitesi |
| **LB** | Luria Bertani |
| **MALDI-TOF-MS** | Matris Destekli Lazer Desorpsiyon/İyonizasyonu kütle spektrometri |
| **MHA** | Mueller Hinton Agar |
| **MHB** | Mueller Hinton Broth |
| **MR** | Metil Kırmızısı |
| **NCBI** | National Center for Biotechnology Information |
| **NIH** | National Institutes of Health |
| **OMP** | Dış Zar Proteini |
| **OriV** | Vejetatif Orijin |
| **PABA** | Para Aminobenzoik Asit |
| **PBP** | Penisilin bağlayan protein |
| **PBS** | Fosfat Tampon Solusyonu |
| **PFGE** | Pulsed Field Jel Elektroforezi |
| **pH** | Hidrojenin İyonik Gücü |
| **PZR** | Polimeraz Zincir Reaksiyonu |
| **RIF** | Rifampisin |
| **RTEÜ** | Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi |
| **S** | Streptomisin |
| **SAM** | Sulbaktam Ampisilin |
| **SDS** | Sodyum Dodesilsülfat |
| **SXT** | Trimetoprim/Sulfametoksazol |
| **TAE** | Tris Asetikasit EDTA |
| **TBE** | Tris Borikasit EDTA |

| | |
|---|---|
| **TE** | Tris EDTA |
| **TE** | Tetrasiklin |
| **TIFF** | Tagged Image File Format |
| **Tn** | Transpozon |
| **TSIA** | Triple Sugar İron Agar |
| **UV** | Ultraviyole |
| **vb** | ve benzeri |
| **VP** | Voges Proskauer |

**Simgeler**

| | |
|---|---|
| **%** | Yüzde |
| **&** | ve |
| **µg** | Mikrogram |
| **µL** | Mikrolitre |
| **µm** | Mikrometre |
| **µM** | Mikromolar |
| **atm** | Atmosfer Basıncı Birimi |
| **º** | Santigrad Derece |
| **cm** | Santimetre |
| **dk** | Dakika |
| **g** | Gravitiy |
| **gr** | Gram |
| **kg** | Kilogram |
| **L** | Litre |
| **mg** | Miligram |
| **mL** | Mililitre |
| **mm** | Milimetre |
| **mM** | Milimolar |
| **mW** | Megawatt |
| **nm** | Nanometre |
| **nmol** | Nanomol |
| **rpm** | Revolutions Per Minute |

| | |
|---|---|
| **sn** | Saniye |
| **U** | Ünite |
| **V** | Volt |

**Formüller**

| | |
|---|---|
| **$BaCl_2$** | Baryum Klorür |
| **$CaCl_2$** | Kalsiyum Klorür |
| **$H_2O$** | Su |
| **$H_2S$** | Hidrojen Sülfür |
| **$H_2SO_4$** | Hidrojen Sülfat |
| **HCl** | Hidroklorik Asit |
| **$K_2HPO_4$** | Di-Potasyum Hidrojen Fosfat |
| **KCl** | Potasyum Klorür |
| **KOH** | Potasyum Hidroksit |
| **$MgCl_2$** | Magnezyum Klorür |
| **$Na_2HPO_4$** | Di-Sodyum Hidrojen Fosfat |
| **NaCl** | Sodyum Klorid |
| **NaOH** | Sodyum Hidroksit |
| **$NH_4Cl$** | Amonyum Klorid |

# ÖZET

## Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Yaşayan *Pelophylax* sp. Türlerinden İzole Edilen Enterik Bakterilerdeki Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi ve Moleküler Analizi

Bu çalışmada çevre kirliliği açısından indikatör organizmalar olarak bilinen *Pelophylax* sp. cinsine ait kurbağalardan elde edilen, kloak orijinli enterik bakterilerde antimikrobiyallere direnç prevalansının belirlenmesi ve moleküler analizi amaçlanmıştır. Türkiye'nin Doğu Karadeniz Bölgesi'ndeki altı ilin, (Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin) farklı ekolojik koşullara sahip üç istasyonundan genç, erkek ve dişi olmak üzere toplam 54 kurbağa bireyi yakalandı. Kloakal sürüntü örneklerinden 160 bakteri izole edildi ve bakteri türleri biyokimyasal testler, otomatize sistem (VITEK 2) ve matriks destekli lazer desorpsiyon/iyonizasyonu kütle spektrometri (MALDI-TOF-MS) yöntemleri ile tanımlandı. Toplamda 160 suşta 15 farklı cinse ait türler saptandı. On iki farklı antibiyotiğe karşı disk difüzyon yöntemiyle antimikrobiyal duyarlılık testleri yapıldı. Bakteri türlerinde en yüksek direnç oranı ampisilin ve sefazoline karşı iken, en düşük oran kloramfenikol ve tetrasikline karşı olduğu belirlendi. Antimikrobiyal direncin altında yatan mobil genetik elemanlardan sınıf 1 ve/veya sınıf 2 integron gen kasetleri, kaynatma yöntemi ile DNA elde edilerek PZR yöntemi ile tarandı. Suşların birinde (*E. coli*, S1C2) *IntI1* geni pozitif, boş bir sınıf 1 integron tespit edildi. Direnç geni taramalarında sekiz suşta $bla_{TEM}$, dört suşta $bla_{SHV}$ geni pozitif olarak belirlendi, tetrasikline dirençli iki suşta *tetA* geni saptandı. Kinolon dirençli üç suştan bir *Klebsiella* suşunda (*Klebsiella pneumoniae* A1B1), *gyrA* geninin Ser83Thr değişimi belirlendi. Ayrıca iki *Klebsiella* suşunda (*Klebsiella pneumoniae* A1B1, *Klebsiella oxytoca* G1C3) *parC* geninde Glu84Val mutasyonu saptandı. Plazmit aracılı kinolon direnç genleri tespit edilmedi. Farklı lokasyonlardan izole edilen fekal koliform (*E. coli*) suşlarının klonal yakınlıkları pulsed field gel elektroforezi ile belirlendi. *Pelophylax* gibi kozmopolit bir türün barsak mikrobiyotasındaki çoklu dirençli enterik bakterilerden bir suşta sınıf 1 integron varlığının tespit edilmesi ve bu genetik elemanın boş dahi olsa, farklı çevrelerdeki bakterilerden antibiyotik direnç genleri yakalayarak çoğul dirençli hale gelme ve bu genetik elemanları kara ve su ekosistemlerinde var olan diğer bakterilere de aktarabilme potansiyelinin olması halk sağlığı için bir risk oluşturabileceğini düşündürmektedir.



**Anahtar Sözcükler:** Antibiyotik direnci, integron, enterik bakteri, amfibi

## ABSTACT

### Determination and Molecular Analysis of Antibiotic Resistance in Enteric Bacteria Provided from *Pelophylax* sp. in Eastern Blacksea Region

The aim of this study was to molecular analyze the antimicrobial resistance in enteric bacteria from cloacal swabs of a frog species, *Pelophylax* sp. regarded as an indicator for environmental pollution. Fifty-four frog individuals were captured from six provinces (Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize and Artvin) in the Eastern Blacksea Region of Turkey. One hundred and sixty bacterial colonies from the cloacal swab cultures were randomly picked, and the bacterial species were identified by biochemical tests, automated systems (VITEK 2) and matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS). Fifteen different genera were identified in 160 strains. Antimicrobial sensitivity tests were performed against 12 different antibiotics by disk diffusion method. The highest rate of resistance was to ampicillin and cefazoline while the lowest rate was against chloramphenicol and tetracycline in the bacterial species individually. Class 1 and/or class 2 integron gene cassettes were screened by PCR method. One of the strains (*E. coli*, S1C2) was positive for *intI1* gene, which lacked a gene cassette, indicating an empty class 1 integron. In the resistance gene analysis eight strains had $bla_{\mathrm{TEM}}$ and, four were positive for $bla_{\mathrm{SHV}}$. *tetA* gene was found in two tetracycline resistant strains. In one *Klebsiella* strain (*Klebsiella pneumoniae* A1B1) of three quinolone-resistant strains, the Ser83Thr substitution of the *gyrA* gene was detected. In addition, Glu84Val mutation was detected in the *parC* gene in two *Klebsiella* strains (*Klebsiella pneumoniae* A1B1, *Klebsiella oxytoca* G1C3). No plasmid-mediated quinolone resistance genes were detected. The clonal relations between *E. coli* isolates from different locations were examined by pulsed-field gel electrophoresis. Detection of the presence of class 1 integron in a strain of multi drug resistant enteric bacteria in the intestinal microbiota of a cosmopolitan frog species indicates that these animals might be a reservoire for the resistance genes, and therefore their potential for the transfer of resistance genes to human pathogenic bacteria can create a risk for public health.



**Keywords:** Antibiotic resistance, integron, enteric bacteria, amphibia

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Antibiyotiklerin gereksiz kullanımı dünyada önemli sağlık alanı problemlerinden biridir. Son yirmi yılda aşırı antibiyotik kullanımının sonucunda direnç gelişiminin hızla arttığı görülmektedir. Antibiyotik direncini kontrol edebilmek için multidisipliner araştırmaların hem klinik ve hem de pre-klinik değerlendirmelerle birlikte yapılması önerilmektedir (Hoşoğlu, 2005).

Antibiyotik direnci sadece patojen bakterilerde değil, karasal ve sucul çevrelerde yaşayan çevre mikroorganizmalarında da gösterilmiştir (Özgümüş vd., 2007; Özgümüş vd., 2009). Antimikrobiyal ajanların insan ve hayvanlarda yoğun kullanımı sonucunda bakterilerde antibiyotiklere direnç kodlayan genetik elemanların genetik transferi meydana geldiği bilinmektedir. Bunun sonucunda dirençli bakteriler seçilerek yayılmaktadır (Schwarz vd., 2001). Kommensal bakterilerin direnç genlerinin bir rezervuarı olabileceği ve bu genleri diğer kommensal veya patojenik bakterilere aktarabileceği düşünülmektedir (Gonçalves vd., 2012; Silva vd., 2010). Doğal ortamlardaki antimikrobiyallere karşı dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve direncin bakteri türleri arasında yayılması insan ve hayvan sağlığı açısından çok önemlidir ve bu direnci kodlayan genlere sahip bakterilere farklı yaşam ortamlarında rastlanmaktadır (Carroll vd., 2015). Antibiyotiklere dirençli mikrobiyota elemanlarının yaban hayatında ve uzak yerlerde yaşayan insanlarda da arttığına dair raporlar mevcuttur (Benavides vd., 2012; Pallecchi vd., 2012). Dünya Sağlık Örgütü Nisan 2015'te antimikrobiyal direncin dünyanın her yerinde ortaya çıktığını, yeni direnç mekanizmalarının küresel çapta yayıldığını, küresel bir halk sağlığı problemi haline geldiğini ve bütün devlet sektörlerinin ve bilimsel topluluklarının bu konuda harekete geçmesi gerektiğini belirtmiştir (WHO, 2015a). Mayıs 2015'te ise antimikrobiyal direnç ile mücadele etmek için küresel bir eylem planı taslağı hazırlayarak 68. Dünya Sağlık Asamblesi'ne sunmuştur. Bu taslakta antimikrobiyal direncin sürveyanında bölgesel, ulusal ve küresel bilgilerin güçlendirilmesi gerekliliği dikkati çekmektedir (WHO, 2015b).

Amfibi türlerinin biyo-değişkenliğin ve çevresel değişiklikleri gösteren indikatör canlıları olabileceği belirtilmektedir (Sewell ve Griffiths, 2009). Amfibiler, dünyada açık okyanuslar, uzak okyanus adaları ve güney ve kuzey kutbunun donmuş bölgeleri hariç uygun habitatın olduğu her yerde bulunur (Wells, 2007). Amfibiler hayat döngülerinin ergin evresinde karasal ortamda yaşasalar da suya bağımlıdır. Bu sebeple hem karasal hem de sucul ortamları kullandıkları için bu alanlarda meydana gelen değişikliklerden direkt

etkilenirler (Mahaney, 1994; Watt ve Oldham, 1995; Hecnar, 1995; Shi, 2000). Bu özellikleri nedeniyle biyolojik indikatör olarak kullanılmaktadırlar (Blaustein ve Wake, 1990; Wyman, 1990; Lips, 1998, Pollet ve Young, 2000). Bu çalışmada kullanılan *Pelophylax* sp. diğer bir adıyla su kurbağaları olarak da bilinir, yaz aylarının büyük bir kısmını suda geçirir. Yeterli nemin olduğu her alanda yaşayabilir. Dünya üzerinde *Pelophylax* cinsine ait 26 tür bulunmakta olup Türkiye'de 3 türü mevcuttur. Bu türler *Pelopylax bedriagae, Pelophylax caralitanus* ve *Pelophylax ridibundus*' dur (Amphibiaweb, 2021). *Pelophylax* sp. Türkiye uygun yaşam ortamı bulduğu hemen hemen her alanda yayılım göstermektedir (Başoğlu, 1994).

Enterik bakterilerin (*Enterobacteriaceae* familyası üyeleri), enfeksiyon hastalıklarına yol açan zararlı cinslerine rastlandığı gibi gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanılan yararlı cinsleri de vardır. Birçoğu ise insan ve diğer hayvanların normal bağırsak florasını oluşturan büyük bir bakteri ailesidir (Rock ve Donnenberg, 2014). Hayvanların normal enterik mikroflorası, zoonotik patojenlerle bulaşabilecek antibiyotik dirençli suşlar ve bu suşlardaki dirençli genlerinin bir rezervuarını temsil eden indikatör bakterilerdir (Caprioli vd., 2000). İndikatör bakterilerdeki antibiyotik direnci birçok yolla kazanılmış olabilir. Antibiyotiklere direnç oluşturmakta direnç genlerinin kazanımı ve transferi bazı konjugatif direnç plazmitleri, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genetik elemanlar vasıtasıyla gerçekleşir (Aminov, 2011).

İntegronlar, genetik yapısına dışarıdan gen kasetlerinin eklenip orada ifade olmasına izin veren genetik elemanlardır (Escudero vd., 2015). Gen kasetleri integronlar üzerinde birleşerek veya halkasal DNA olarak serbest halde bulunabilirler. İntegronlar antibiyotik direnci ile ilişkilendirilmişlerdir. Özellikle Gram negatif patojenlerin antibiyotiklere dirençleri ile ilgili oldukça fazla çalışma yapılmıştır. İntegron sistemi bakterilerde çok yönlü gen kazanım sistemleri olarak tanımlanabilirler. Farklı evrimsel zaman dilimlerinde, birçok farklı çevre ortamında karşımıza çıkmakta, tür ve soylar arasında hareket etme yetenekleri ile önem kazanmaktadır (Mazel, 2006). Çevresel örneklerden elde edilen integronlar, antibiyotik kullanımı ve bu antibiyotiklerin yeryüzündeki dağılımı hakkında bizlere fikir verebileceği düşünülmektedir (Stalder vd., 2012).

Ülkemiz bölgesel antimikrobiyal direnç sürveyan ağlarından birine üyedir ve özellikle ülke çaplı klinik orijinli bakteriyel direnç bilgileri düzenli olarak rapor

edilmektedir (Sağlık Bakanlığı, 2016). Fakat raporlarda çevre orijinli direnç ile ilgili çok sınırlı bilgiler mevcuttur veya hiç bilgi bulunmamaktadır. Dirençli bakterilerin ve genlerin insanlar arasında, hayvanlar arasında ve insan, hayvan ve çevre arasında yayılabildiği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında, kozmopolit bir amphibi türü olan *Phelopylax* sp.'den izole edilen enterik bakterilerin antibimikrobiyal direncinin moleküler epidemiyolojisi ve analizi amaçlanmıştır.

## 2.GENEL BİLGİLER

Çevresel direncin ortaya çıkmasındaki etmenler iki kısımda incelenebilir: i) antibiyotik kullanımı, onlara karşı bakteriyel direnç ve yayılma mekanizmaları ii) sıcak ve soğuk kanlı hayvanların mikrobiyotalarındaki antibiyotik dirençli bakterilerin çevreye yayılması.

### 2.1. Antibiyotikler ve Direnç Mekanizmaları

Mantar veya bazı mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikroorganizmaların ve başka canlıların gelişmesini durduran ya da onları öldüren doğal veya sentetik maddelere "antibiyotik" denir (Öner, 1992). Antibiyotik terimi, Yunanca “anti” yani “karşı” ve “bios” yani “yaşam” kelimelerinden türetilmiştir. Sözlükdeki tanımıyla ‘bitkilerde, özellikle küf mantarlarında bulunan, yapay olarak üretilen bakteri ve diğer mikroorganizmaların gelişimini durduran ya da onları yok eden maddelerin ortak adıdır’ (Aktuğlu, 1997; Tunçtan ve Buharalıoğlu, 2005; Türkoğlu, 2008).

Mikrobiyolojinin büyük atılım yaptığı 19. yüzyılın ikinci yarısında, Louis Pasteur bazı mikroorganizmaların diğerlerini öldürdüğünü gözlemlemiştir. Daha sonra 1928 yılında Londra’da St Mary’s Hospital’da stafilokok varyantları üzerinde çalışırken Alexander Fleming, bir rastlantı sonucu kültür ortamına bulaşmış bir küf mantarının çevresindeki stafilokokların üreyemediklerini, hatta öldüklerini gözlemlemiştir. Fleming, üreyen küf mantarlarının Penicillinum türünden oluşundan yola çıkarak, etkili maddeye ‘penicillin’ adını vermiştir. Böylece ilk antibiyotik 1928 yılında Sir Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir (Aktuğlu, 1997; Türkoğlu, 2008).

Bununla birlikte, antibiyotiklerin etkinliği ve kolay erişimi de aşırı kullanımlarına yol açmıştır ve bazı bakteriler bunlara karşı direnç geliştirmiştir. Dünya Sağlık Örgütü, antimikrobiyal direncin artık gelecek için bir tahmin değil, şu anda dünyanın her bölgesinde yaşanıyor ve her yaştan herkesi etkileme potansiyeline sahip "ciddi tehdit" olarak sınıflandırmıştır (WHO, 2014).

#### 2.1.1. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler birçok kritere göre sınıflandırılabilir. Günümüzde en yaygın bilimsel sınıflandırma etki güçlerine, etki mekanizmalarına ve kimyasal yapılarına göre yapılan sınıflandırmadır.

**a. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılması:** Antibiyotikler, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre iki gruba ayrılır. Bakteriyostatik antibiyotikler, bakteri hücrelerinin gelişmesini veya üremesini önler, böylece vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilir. Tetrasiklinler, makrolid, sülfonamidler, amfenikoller, linkozamidler, metronidazol ve mikonazol bu şekilde etki gösteren antibiyotiklerdir. Bakterisid antibiyotikler ise; bakteri hücresini yok eder ve hücrenin ölmesine neden olur. Beta laktamlar (penisilinler, sefalosparinler, monobaktamlar, karbapenemler, beta laktamaz inhibitörleri), polipeptidler, florokinolonlar, vankomisin, rifamisin ve teikoplanin bakterisid etki gösteren antibiyotiklerdir (Akkan, 1997).

**b. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılması:** Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre 5 gruba ayrılır. i) bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive eden antibiyotikler, ii) sitoplazma membran permeabilitesini bozan antibiyotikler, iii) ribozomlarda protein sentezini bozan antibiyotikler, vi) bakteri genetik materyali üzerine etki yapan antibiyotikler ve v) bakteriyel antimetabolitlerdir. Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive eden antibiyotikler; beta laktamlar (penisilinler, sefalosparinler, monobaktamlar, karbapenemler), siklosein, ristosetin, basitrasin, teikoplanin ve vankomisindir. Sitoplazma membran permeabilitesini bozan antibiyotikler; polimiksinler, gramisidin, nistatin, amfoterisin B, kandisein, ketokonazal ve diğer antifungal imidazoller, flukonazol ve diğer antifungal trizoller, hekzaklorofen ve katyonik deterjanlardır. Ribozomlarda protein sentezini bozan antibiyotikler, tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler, amfenikoller, linkozamidler ve fusidik asit olarak sınıflandırılabilir. Bakteri genetik materyali üzerine etki yapan antibiyotikler, DNA ve RNA sentezini bozanlar olarak da bilinir, florokinolonlar, rifamisinler, nalidiksik asit, metronidazol, aktinomisetler, mitomisinler, bleomisin, asiklovir, doksorubisin, dounorubisin ve metotreksattır. Bakteriyel antimetabolitler ise sülfonamidler, sülfonlar, PAS, izoniazid, etambutol ve trimetoprim'dir (Akkan, 1997).

**c. Antibiyotiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması:** Kimyasal yapılarına göre antibiyotikler; beta laktamlar, fenikoller, sülfonamidler, tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolidler, linkozamidler, polipeptidler, kinolonlar, nitrofuranlar, imidazoller ve rifamisinler olarak sınıflandırılırlar (Akkan, 1997).

### 2.1.2. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları

Son yıllarda oldukça artan antibiyotik kullanımı, hayatımızın her alanında karşımıza çıkmaktadır. İnsan ve hayvan sağlığı, besinlerin korunması, balık gibi sucul canlıların sağlığı, gelişimi ve hastanelerde ve ilaç endüstrisinde bilimsel araştırma faaliyetleri için antibiyotikler oldukça sık kullanılmaktadır. Ancak gereksiz ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı, hem çevresel sorunları meydana getirmekte hem de besin zinciri yoluyla canlılarda, ciddi sağlık problemleri oluşturmaktadır. Tüm dünyada en çok kullanılan ilaçlar arasındadır. Antibiyotikler, özellikle gelişmekte olan ülkelerde aşırı ve yanlış kullanılmaktadır (Hart, 1998).

1950'lerden beri antibiyotikler, yemlerde katkı maddesi ve büyümeyi geliştirici ve enfeksiyonları tedavi amacıyla çiftlik hayvanlarında kullanılmaktadır (Fedesa, 2001; Kemper, 2008). Antibiyotik kullanımının amacı, hayvan çiftliklerinde meydana gelen hastalıkların süresini azaltmaktır (Kemper, 2008). Bu nedenle, hayvanların sağlığını korumak için kullanılan antibiyotikler, kolay temin edilebilmektedir ve maliyetinin ucuz olması sebebiyle yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Örneğin, kümes hayvanlarında ortaya çıkan hastalıklarla mücadele için tavuk yemine antibiyotiklerin katıldığı bilinmektedir. Bu antibiyotikler, hayvanların eti veya yumurtası ile insanlara ulaşmaktadır. Antibiyotik kullanımı bilinçsizce ve aşırı yapıldığında, hayvanlarda sorunlara neden olan bakteri ve mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı direnç kazanabilmektedir. Bunun sonucunda, antibiyotik kalıntıları besin zinciri yoluyla insanlara ve diğer canlılara ulaşmakta ve sağlık sorunları oluşturmaktadır.

İnsan tıbbında antibiyotikler, ilaçlar arasında en büyük 3. gruptur ve tüm reçetelenen ilaçların % 6'sından fazlasını oluşturur (Schwabe ve Paffrath, 2001). Antibiyotiklerin reçete oranı ve reçetesiz alınan miktar, ülkeler arasında farklılık gösterir (Mölstad vd., 2002).

Su kültüründe antibiyotikler, aslında terapatik ve profilaktik ajanlar olarak kullanılır. Su kültüründe kullanılan antibiyotikler oksitetrasiklin, florfenikol, premiks, sarafloksasin, eritromisin, sülfonamidler ve trimetroprim veya ormetroprimdir (Serrano, 2005; Kümmerer, 2009). Balık çiftliklerinde uyulması gerekli kurallar yerine getirilmediğinden dolayı sıklıkla hastalıklar meydana gelmekte ve büyük ekonomik kayıplar ortaya çıkmaktadır. Balıkların bakteriyel hastalıklarının tedavisinde en yaygın yöntem, antibiyotikler ve bazı diğer kimyasallardır. Antibiyotiklerin aşırı kullanımı,

standart antimikrobiyal uygulamalara karşı dirençli patojenlerin gelişimini de teşvik eder. Kullanılan antibiyotikler besin zinciri yoluyla ya da su ekosistemi ile diğer canlıları olumsuz etkiler.

### 2.1.3.Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direnci, bakteri ve mantar gibi mikroorganizmalar, onları öldürmek için tasarlanmış ilaçları yenme yeteneğini geliştirdiğinde ortaya çıkar. Bu durum, mikroorganizmaların öldürülmediği ve büyümeye devam ettiği anlamını taşır.

Antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisi zor hatta bazen imkansızdır. Çoğu durumda, antibiyotiğe dirençli enfeksiyonlar hastanede daha uzun süre kalma, ek doktor ziyaretleri gerektirebilir bu durum oldukça maliyetlidir. Antibiyotik direnci, vücudun antibiyotiklere karşı direnç kazandığı anlamına gelmez; bakterilerin onları öldürmek için tasarlanmış antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesidir.

Antibiyotik direnci; sağlık, veterinerlik ve tarım sektörlerinin yanı sıra yaşamın herhangi bir bölümündeki insanları etkileme potansiyeline sahiptir ve bu da onu dünyanın en acil halk sağlığı sorunlarından biri haline getirmektedir. ABD'de her yıl en az 2,8 milyon kişiye antibiyotiğe dirençli bakteri veya mantarlar bulaşmakta ve bunun sonucunda 35.000'den fazla insan ölmektedir.

Hiç kimse dirençli enfeksiyon riskinden tamamen kaçamaz, ancak bazı insanlar diğerlerinden daha büyük risk altındadır (örneğin, kronik hastalıkları olan kişiler). Antibiyotikler etkinliklerini kaybederse, enfeksiyonları tedavi etme ve halk sağlığı tehditlerini kontrol etme yeteneği kaybedilebilir. Eklem replasmanları, organ nakilleri, kanser tedavisi, diyabet, astım ve romatoid artrit, kronik hastalıkların tedavisi gibi birçok tıbbi gelişme antibiyotik kullanarak enfeksiyonlarla savaşma yeteneğine bağlıdır.

Penisilin'in keşfinden beri, yeni antibiyotiklerin keşfinin yanı sıra direnç de keşfedildi ve kabul edildi. Aslında, mikroorganizmalar her zaman hayatta kalmanın ve yeni ilaçlara direnmenin yollarını aramaya devam edecektir. Gittikçe daha fazla mikroorganizma dirençlerini birbirleriyle paylaşmakta ve bu durumda bizim için işleri zorlaştırmaktadır (CDC, 2020).

Bir mikroorganizmanın aynı anda birden fazla antimikrobiyal ilaca direnç mekanizması geliştirebilir. Bu durum 'çapraz direnç' olarak adlandırılır. Mikroorganizmaların birbirinden farklı yapı ve etki mekanizması olan birden fazla

antimikrobiyal ilaca direnç geliştirmesine 'çoklu ilaç dirençliliği' denir (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011). 1970'lerden beri gelişen Gram negatif mikroorganizmaların meydana getirdiği direnç sorunu günümüzde hala önemini korumaktadır. Bakteriyal dirençli sorunu en çok hastanelerde görülür; çünkü antimikrobiyal ilaç kullanımının en fazla olduğu yerler hastanelerdir. Türkiye'de nozokomiyal infeksiyonlarda en sık direnç sorunu oluşturan mikroorganizmalar; *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae,* koagülaz negatif stafilokoklar, enterokoklar, *Enterobacter* spp, *ve Acinetobacter* spp.'dir (Keyik, 2013; Erbay, 2009).

Antimikrobiyal ilaçlara direnç çeşitli şekilde olabilir: i) doğal direnç, ii) kazanılmış direnç iii) çevre ve koşullara bağlı direnç. Doğal direnç, bazı antimikrobiyal ilaçlar bakterinin genetik özelliği sebebiyle bakteriyi etkilemez; bu özellik bakterinin doğal direnci olarak tanımlanır. Örnek olarak; Gram negatif bakterilerde bulunan AmpC beta laktamaz veya *Stenotrophomonas maltophilia*'nın karbapeneme dirençli olması verilebilir. Kazanılmış direnç, bakterideki genetik özelliklerin değişimi ile oluşan dirençtir, transpozon veya plazmit DNA'sında meydana gelen mutasyonlarla olur. Dirençli bakteriler tarafından konjugasyon, transformasyon veya transdüksiyonla meydana gelir. Çevre ve koşullara bağlı direnç, oksijen basıncı değişiklikleri, dokudaki pH değişiklikleri ve antimikrobiyal ilacın infeksiyon bölgesine ulaşamaması gibi sebeplerle in vitro testlere yanıt veren antimikrobiyal ilaçların in vivo ortamda yanıt vermemesi durumudur (Keyik 2013).

### 2.1.4. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları

**a) İlaç Hedefinin Değişmesi**: Hedef bölge değişiklikleri genellikle bakteri geninin kromozomunda meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanır. Örneğin; RNA polimerazda meydana gelen hedef nokta mutasyonu sonucu rifampisine, DNA giraz mutasyonlarında meydana gelen hedef nokta mutasyonu sonucu da kinolonlara direnç oluşur. Kinolon direncinden sorumlu mutasyonların birçoğu giraz enzimini kodlayan genlerde meydana gelir. Günümüzde en çok bilinen kromozomal mutasyonlar *gyrA* alt ünitesindeki mutasyonlardır (Lambert, 2005; Pazarlı, 2010).

**b) Alternatif Metabolik Yol Kullanımı:** Bazı bakterilerde ilaca duyarlı hedefe gereksinimi ortadan kaldıracak yeni bir metabolik yol geliştirirler. Örnek olarak; trimetoprim/sulfametoksazol kombinasyonu, bakterinin yaşamsal önemi olan kromozomun

replikasyonunda rol oynayan enzimleri inhibe eder böylece bakteriler folat sentez etmek yerine ortamdaki hazır folatı alarak alternatif bir metabolik yol kullanırlar (Işık, 2008).

**c) Enzimatik İnaktivasyonu:** Bazı mikroorganizmalar ilacı parçalayan, onları modifiye eden enzimler oluşturur. Hem Gram negatifler hem de Gram pozitifler bu tip enzimler sentezler. Örnek olarak; beta laktam grubu antibiyotikleri parçalayan beta laktamaz enzimi, aminoglikozit grubu antibiyotikleri inaktive eden fosforilaz, asetilaz ve adenilaz enzimleri, kloramfenikolu inaktive eden asetil transferaz enzimi ve eritromisini inaktive eden esteraz enzimi direnç gelişiminde oldukça önemli enzimlerdir (Işık, 2008; Oğuz, 2013).

**d) Hücre Zarı Permeabilitesinin Azalması:** Antibiyotiklerin etkili olabilmesi için bakteri hücresine girebilmesi gerekir. Gram negatif bakterilerde ilaçların hücre içine girmesi, dış membrandaki porin proteinler yardımı ile olur. Mutasyonlarla dış membrandaki porinlerde meydana gelen değişim sonucu hücre zarı geçirgenliği azalır ve dirençli suşlar oluşur. Kinolon grubu antibiyotikler, Gram pozitif bakterilerde hücre duvarı ve sitoplazmik membranı, Gram negatif bakterilerde ise bunlara ek olarak dış membran engelini de aşmak zorundadır.

**e) Eflüks Pompası ile İlacın Dışarı Atılması:** Bakterilerdeki aktif pompa sistemi proteinlerinin asıl görevi besinlerin ve iyonların hücreye alınması, metabolik son ürünlerin ve zararlı maddelerin hücre dışına atılması, bakterilerin birbirleri ve çevreleriyle olan ilişkilerini düzenlenmesidir. Bu proteinler, yapısal düzeyde sentezlendiklerinde bakterinin doğal direncine katkı sağlar. Yüksek düzeyde üretildiklerinde ise antibiyotikler, dezenfektanlar ve çeşitli boyalar gibi çok sayıda bileşiğe karşı direnç oluşumuna neden olmaktadır (Coyne vd., 2011; Gürbulak vd., 2014).Antibiyotik gruplarına göre direnç mekanizmaları şu şekildedir:

**-Beta Laktamlara Direnç:** Beta laktamlara direnç dört yolla gelişir: i) beta laktamaz enzimi nedeniyle ilacın inaktif olması, plazmit veya kromozom kaynaklı gen aktarımı ile beta laktamaz enzimi üretilir. Genellikle OXA-51 ve ampC gen bölgeleri ile aktarılır. Moleküler yapılarına ve işlevsel özelliklerine göre A, B, C, D beta laktamaz şeklinde gruplandırılmıştır. ii) penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) meydana gelen değişikliktir. Bu değişiklik ile ilaç hedefe bağlanamaz. Kromozomlarda meydana gelen mutasyon nedeniyle oluşur (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011; Çiftçi, 2011, Öztürk, 2002). iii) eflüks pompa sistemi, aktif pompa sistemleri yapısal olarak ifade edilir veya

mutasyonla indüklenir. Bu sistem düzenleyici genler ile kontrol edilir. Düzenleyici genlerde meydana gelen mutasyonlar sistemin fazla çalışmasına ve ilaçların dışarı atılmasına neden olur. Gram negatif bakterilerde, outher membrane protein (OMP) adı verilen porin proteinleri ile beta laktamlar hücre içine alınır (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011; Işık, 2008, Oğuz, 2013). vi) enzimlerin eksikliği veya olmayışı, penisilinler tarafından tetiklenen otolitik aktivitenin azalması veya tamamen ortadan kalkması ile oluşan dirençtir (Öztürk, 2002).

**-Aminoglikozitlere Direnç:** Aminoglikozit grubu antibiyotiklere direnç farklı yollarla olabilir. Ribozomal 30S alt biriminde meydana gelen mutasyon sonucu oluşan değişiklik, kromozomal mutasyon ile iç ve dış zarda meydana gelen değişim ile ilacın hücre içine alınamaması bunlardan ikisidir. Bir diğeri, aminoglikozitler hücre içine enerji harcayarak taşınır ve bu taşınmanın nedeni aminoglikozitlerin pozitif yüklü olmasıdır, mutasyonlarla hücrede yük değişimi meydana gelirse direnç gelişir. Son olarak da enzimatik gerçekleşen direnç gösterilebilir, kromozomal veya plazmit kaynaklı olabilir ve enzimlerin yapısını değiştirdiğinden direnç meydana gelir. Enzim yapısını değiştiren 3 grup enzim vardır; bu enzimler: asetiltransferaz (AAC), adeniltransferazlar (ANT) ve fosfotransferazlar (APH)'dır (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011; Öztürk, 2002).

**-Kloramfenikollere Direnç:** Kloramfenikollere direnciin ana kaynağı kromozom ve plazmitlerdir. Kromozom ve plazmit kontrolünde sentezlenen kloramfenikol asetiltransferaz (CAT) enzimi üretilir. Bu enzim ilacta değişiklik yaparak ribozomun 50S alt birimine bağlanamasını engeller (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011; Öztürk, 2002).

**-Makrolid, Linkozamid ve Streptogramin B Antimikrobiyal İlaçlara Direnç:** Bu gruptaki ilaçların kimyasal yapıları farklı olsa da benzer mekanizmalar ile etki ederler. Bundan dolayı bu ilaçlardan birinde direnç gösteren genler bu gruptaki diğer ilaçlara da direnç geliştirebilir (Dinc vd., 2009). Bu ilaç grubu Gram negatif bakterilerin dış zarından geçemediği için bu ilaçlara doğal dirençlidir (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011). Bu ilaç grubu bakterilerin 23S rRNA ribozomal alt birimine bağlanıp protein sentezini inhibe eder. *erm* genleri tarafından kodlanan metilaz enzimleri ile veya eflüks pompa sistemi ile ilaç etkisiz hale getirilerek direnç meydana gelir. Bunlardan en sık rastlananı enzim sentezi ile meydana gelen dirençtir (Durmaz vd., 2014).

**-Glikopeptidlere Direnç:** Glikopeptidler, Gram negatif bakterinin hücre duvarından geçemediği için bu bakteriler doğal dirençlidir. Enterokoklarda vankomisin

direnci D-ala-D-ala ligaz enziminin peptidoglikan molekülünün D-ala-D-ala yapısını değiştirip vankomisinin buraya tutunmasını engeller. Enterekoklarda vankomisin dirençli 4 fenotip belirlenmiştir; *vanA, vanB, vanC* ve *vanD*'dir. Bu gen bölgeleri vankomisine dirençte etkilidir (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011; Öztürk, 2002).

**-Tetrasiklinlere Direnç:** Doğada en fazla karşılaşılan dirençtir. Hayvan yemlerine katılması, özellikler hayvan üreticilerinin çok sık kullanımı sonucu direnç gelişimi oldukça artmıştır. Ribozomal direnç ve eflüks pompası ile direnç gelişir. Gram negatif bakterilerde direnç mekanizmasında önemli olan *tetA*'dan *tetE*'ye kadar farklı direnç genleri belirlenmiştir (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011; Çiftçi, 2011).

**-Tigesiklinlere Direnç:** Aerob Gram pozitif, Gram negatif ve anaerob patojenlere karşı etkinlik gösteren bir antimikrobiyaldir. Ribozomal 30S alt birimlerine bağlanarak protein sentezini inhibe ederek etki gösterir. Tetrasiklinlerden farklı bağlanma noktaları bulunur bu nedenle Tet*M* proteininden etkilenmez ve tetrasiklinlerden çok daha etkili olur. Direnç gelişimi ise eflüks pompası ve ribozomal koruma mekanizmalarıyla meydana gelmektedir (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011; Çalık, 2007).

**-Kinolonlara Direnç:** Gram negatif bakterilere kinolon grubu ilaçlar dış membrandaki porinler vasıtasıyla veya fosfolipitlerden difüzyon ile girmektedir. Kinolon grubu ilaçlara direnç; kromozomal mutasyonla olur. İki yolla gerçekleşir; hedef enzimde değişiklik olabilir veya ilacın hücre içine girmesi azalır (Park vd., 2011).

**-Rifampisinlere Direnç:** DNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimini kodlayan rpoB gen bölgesinde meydana gelen kromozomal mutasyonlar ile direnç gelişir. Gram negatif bakteriler dış zar nedeniyle doğal dirençlidir. Aynı zamanda mikobakterilerde de etki gösterir (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011; Yüce, 2001).

**-Sulfonamid ve Trimetoprimlere Direnç:** Kromozom veya plazmit kaynaklı olarak gerçekleşebilir. Kromozomal kaynaklı dirençte para-aminobenzoik asit (PABA)'yı yüksek düzeyde sentezleyip folat metabolizmasında sülfonamidlerin inhibasyonu gerçekleşir. Plazmit kaynaklı dirençte ise, sülfonamidlere düşük afinite gösteren dihidropteroat (DHPS) enzimi sentezlenir. Plazmit veya transpozon kontrolünde trimetoprime dirençli dihidrofolatreduktaz enziminin sentezlenmesi en fazla görülen mekanizmadır (Abbasoğlu ve Çevikbaş, 2011; Öztürk, 2002).

### 2.1.5. Antibiyotik Direncinin Yayılması

Antibiyotik direncinin yayılması genelde yatay gen transferleri ile gerçekleşir. Yatay gen aktarımı, aynı jenerasyondaki bakteriler arasında genetik materyalin birinden diğerine transfer edilmesidir ve bakteriler arasında genetik çeşitliliğe yol açar (Domingues vd., 2012). Yatay gen transferi ile aktarılan DNA, konak olan bakteriye hareketli genetik elemanlar aracılığıyla taşınır (Bennet, 2008).

Yabancı bir DNA'nın gen transferi ile kazanılması antimikrobiyal direncin gelişiminde oldukça önemlidir. Klinik uygulamalarda kullanılan çoğu antimikrobiyal ajan doğal olarak çevrede çoğunlukla da toprakta bulunur veya topraktan köken alır. Doğal olarak antibiyotik direnç genlerini içeren bakteriler çevreyle ilişkilidir ve hastane izolatlarının direnç genlerini kazanmasında çevrenin önemli bir kaynaktır. Bu tür genetik değişimler antibiyotik direncinin yayılmasında oldukça önemlidir (Munita, 2016).

Hareketli genetik elemanlar, hareket etme yetenekleri sayesinde bakterilerde yaygın olarak bulunur (Domingues vd., 2012). Bu elemanlar bakterinin genomunda ve bakterinin patojenitesinde değişiklikler yapabilirler (Bennet, 2008). Hareketli elemanlar iki faklı şekilde olabilir; bunlardan ilki konjugatif direnç plazmitlerdir. Bir bakteriden diğerine antibiyotik direncinin aktarılmasını sağlar, diğeri ise direnç transpozonlarıdır. Aynı hücrede bir genetik bölgeden diğerine hareket edebilirler (Von Wintersdorff Christian vd., 2016). Bu elemanlar bakteriyofajlar, plazmitler, transpozonlar, genomik adalar, integratif ve konjugatif elementler, insersiyon sekansları, integronlar ve küçük ters tekrarlı dönüştürülebilir elementlerdir. Hareketli genetik elemanların yatay gen transferi patojen bakteriler arasında çoklu ilaç direncinin yayılmasına ve rekombinasyonuna neden olur (Domingues vd., 2012).

Bakteriler arasında DNA transferi, konakçının antibiyotiklere ve/veya metallere direnç, patojenite, simbiyoz ve yeni substratların metabolizmasını sağlayan genler kazandırarak evrim ve adaptasyonda büyük ölçüde katkı sağlar. Yalnızca yeni substratların kullanılmasıyla değil, aynı zamanda bakterilerin toksik ortamlarda gelişmesine izin vererek bir bakterinin uyumunu iyileştirebilir (Shintani, 2017). Prokaryotik organizmalarda tanımlanan üç ana DNA transfer mekanizması vardır: konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon.

### 2.1.5.1. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Gen Aktarım Mekanizmaları

Bakterilerde genetik maddenin değişimi 3 farklı mekanizma ile gerçekleşir; i) transformasyon, bir hücrenin ortama saldığı DNA'nın başka bir hücre tarafından alınmasıdır. ii) transdüksiyon, verici hücreye ait DNA'nın virüs aracılığı ile aktarılmasıdır. iii) konjugasyon, bakteri hücreleri arasındaki temasla verici hücrede bulunan konjugatif plazmitlerin kendini aktarmasıdır.

#### 2.1.5.1.1. Transformasyon

Serbest haldeki DNA'nın alıcı hücreye katılması ve genetik değişiklik oluşturmasıdır. Birçok bakteri doğal olarak transforme olabilme yeteneğindedir. Bakteri DNA'sı hücre içrisinde büyük ve tek bir molekül halindedir, hücre liziz edildiğinde, DNA dışarıya çıkabilir.

Bakterilerde transformasyon ilk olarak Frederick Griffith isimli bir İngiliz bilim adamı tarafından 1920'li yıllarda keşfedilmiştir. *Streptococcus pneumoniae*'lar vücut istilasını taşıdığı polisakkarit bir kapsüle borçludur. Bu suşlar S suşlar olarak isimlendirilir. Kapsül taşımayanlar enfeksiyona neden olmaz. Bu suşlar R suşlarıdır. Griffith'in yaptığı deneyde, S tipi suşlarla enfekte ettiği fareler pnömokok enfeksiyonundan ölür. R suşları ile enfekte olan farkler ise hayatta kalmaya devam eder. Isıtılarak öldürülmüş S suşları ile canlı R suşları fareye ferildiğinde farenin enfeksiyon geçirdiği görülmüştür. Ölü farelerden izole edilen bakterilerin S tipinde olduğu görülmüştür. Böylece Griffith R hücelerinin yeni bir tipe dönüştüğünü düşünmüştür ve bu genetik olay DNA'nın keşfi için çok önemli bir basamak olmuştur. Daha sonra 1944 yılında Avery ve arkadaşları pnömokoklardaki bu transformasyonun kapsül özelliği ile sınırlı olamadığını aynı zamanda antibiyotik direnci ve şeker fermentasyonu gibi genetik özelliklerin de transforme olabildiğini göstermiştir.

Bakterilerin belirli suşları ve türleri transforme olabilme yeteneğindedir, bu hücrelere kompetan denir. Yüksek verimli doğal transformasyon yaptığı bilinen sadece birkaç bakteri vardır. Örneğin; *Acinetobacter, Azotobacter, Bacillus, Streptococcus, Haemophilus, Neisseria* ve *Thermus* doğal kompetan bakterilerdir. *Escherichia coli* ve diğer birçok Gram negatif bakteri zayıf kompetandır. Yüksek konsantrasyondaki kalsiyum iyonları ile muamele edilip birkaç dakika soğutulduklarında hücreler transforme olabilir (Medigan ve Martinko, 2012).

Transformasyon yapacak olan DNA hücre yüzeyine bir DNA bağlanma proteini ile bağlanır, daha sonra organizmaya göre çift zincirli veya zincirlerden biri nükleazlarla parçalanarak tek zinciri içeri alınır. Hücreye alınan DNA molekülü kompetans spesifik bir proteine bağlanır; bu protein DNA molekülünü kromozoma ulaşana kadar nükleaz saldırılarından korur. Kromozoma ulaşınca bu görevi RecA proteini alır. DNA molekülü rekombinasyonla alıcı hücreye entegre olur, heterodubleks DNA molekülü replikasyonu sırasında bir atasal bir de rekombinant DNA molekülü oluşur. Hücre bölünmesinden sonra rekombinant DNA molekülü transforme olmuş hücrede yer alır ve bu hücre atasal hücreden genetik olarak farklılaşmıştır (Medigan ve Martinko, 2012).

#### 2.1.5.1.2. Transdüksiyon

Yabancı DNA'nın bakteriofaj adı verilen bakteriyal virüslerin aracılığı ile başka bir hücreye transferi ve genetik bilgi aktarımıdır. DNA'yı veren hücre ile DNA'yı alan hücre arasında fiziksel temas gerektirmez. Bir faj, bakteri kromozomunu parçalayıp kendi DNA'sını çoğaltmak için konak organizmayı aracı olarak kullanır (Harbottle vd., 2006). Wisconsin-Madison Üniversitesi'nde Norton Zinder ve Joshua Lederberg tarafından 1952'de *Salmonella*' da keşfedildi (Zinder ve Lederberg, 1952). Transdüksiyon yalnızca bazı bakterilerde gerçekleşebilir. Bunlar; *Desulfovibrio, Escherichia, Pseudomonas, Rhodococcus, Rhodobacter, Salmonella, Staphylococcus, Xanthobacter* cinsleridir (Medigan ve Martinko, 2012).

Konak genlerinin transferi iki şekilde gerçekleşebilir; genelleştirilmiş transdüksiyon, verici hücre genomunun bir parçasının alıcı hücreye litik veya lizojenik (ılımlı) bir faj aracılığıyla aktarılmasıdır. Özelleşmiş transdüksiyon, sadece lizojenik fajlar aracılığıyla gerçekleşebilir ve verici hücreye yanlızca sınırlı kısımları alıcı hücreye taşır (Balcazar, 2014).

Virüs enfeksiyonu olarak da adlandırılan litik döngüde, enfekte edici faj, konak hücreyi öldürür. Konak hücreye enjeksiyonun hemen ardından, faj genomu, konakçı DNA'yı parçalayan erken proteinleri sentezler ve faj hücrenin kontrolünü ele geçirir. Faj daha sonra yeni faj partiküllerini oluşturmak için gerekli olan proteinleri sentezlemek için konakçı hücreyi kullanır. Kafa ve kılıflar ayrı ayrı birleştirilir, yeni genetik materyal baş kısmına paketlenir ve yeni yavru faj parçacıkları oluşturulur. Bu süreç sırasında, konak hücreler faj enzimleri tarafından yavaş yavaş zayıflatılır ve sonunda patlayarak, ortama ortalama 100-200 yeni faj salınır.

Ilıman veya virülent olmayan enfeksiyon olarak adlandırılan lizojenik döngü de ise, faj konak hücreyi öldürmez, bunun yerine onu uyku halindeyken bir sığınak olarak kullanır. Faj DNA'sının konak hücreye enjeksiyonu sonrasında, faj kodlu integrazların yardımıyla kendisini konak genomuna entegre eder ve bu yapıya profaj adı verilir. Profaj genomu daha sonra konak hücre orada kaldığı sürece bölünür ve yeni nesil üretmek için gerekli proteinleri oluşturmadığı için konak genomu ile birlikte pasif olarak kopyalanır. Faj genomu genellikle nispeten küçük olduğundan, bakteriyel konaklar normalde bu işlemden nispeten zarar görmezler (Erez vd., 2017).

**2.1.5.1.3. Konjugasyon**

Bakteriyal konjugasyon bir genetik aktarım yolu olup, hücrelerarası temas ile gerçekleşir. İlk olarak 1946'da Lederberg ve Tatum tarafından benzer *Escherichia coli* suşları arasında tanımlanmıştır. Bu süreçten sorumlu ajanın daha sonra kromozom üzerinde F 'doğurganlık' faktörü adı verilen bir bölge olduğu bulunmuştur. F faktörü kromozomdan kesilip çıkarılabileceği ve kromozom dışı bir element veya plazmit olarak var olabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca diğer bakterilere kendi kendini aktarabilir ve kromozomu da birlikte aktarabilir böylece konakçının DNA'sına rastgele entegre olabilmektedir (Frost, 2009).

Konjugasyon, fertilite faktörü veya seks faktörü (F) olarak adlandırılan halkasal bir plazmit DNA ile gerçekleştirilir. Eğer hücrede F plazmiti varsa $F^+$, yoksa $F^-$ olarak isimlendirilir. F plazmiti, hücre bölünmesi sırasında kendi DNA'sını çoğaltabilir. F plazmiti içeren hücre, bakteri yüzeyinde pili adı verilen, hücrelerin birbirine yapışmasını sağlayan yapıları sentezler. Bu yapılar sayesinde hücre birbirine konjuge olur.

Konjugasyon $F^+$ ve $F^-$ hücreler arasında gerçekleşir. $F^+$ hücre verici hücredir, DNA'sı replike olur ve yeni sentezlenen halkasal F molekülünün kopyası $F^-$ hücrelere aktarılır. Alıcı hücre artık halkasal F genomuna sahip olduğu için $F^-$'hücreden $F^+$ hücreye dönüşmüştür. $F^+$ hücreler diğer $F^+$ hücrelerle temas etmezler. Bu yüzden $F^+$ hücreden $F^+$ hücreye aktarım gerçekleşmez.

Bazen F hücre kendi genomunda, insersiyon sekansı (IS elementleri) olarak adlandırılan hareketli genetik elemanları taşır. IS elementlerinin hem plazmit içinde hem de kromozomda yer alması crossing-overa (çapraz geçiş) yol açar. İki halkasal DNA arasında çapraz geçiş olması ile plazmitin bakteri kromozomuna entegrasyonu gerçekleşir. Bu şekilde bir entegrasyon gerçekleştiğinde F kendi DNA'sı ile alıcı hücredeki bütün konak kromozomunu da beraberinde transfer edebilir. Bazen F faktör konak kromozomuna

entegre olabilir. Bu yapıya ‘high frequency of recombination’ (Hfr) ismi verilir. Entegre olmuş F faktörü bazen bir Hfr hücresinin kromozomundan ayrılır ve bazen de birkaç konak kromozomuna ait geni beraberinde sitoplazmaya taşır. Bu yapı F’ olarak isimlendirilir, bu genleri alıcı bir hücreye ($F^-$) aktarabilir. Böylece alıcı hücre aynı genin iki kopyasını birden içerebilir. Bu iki kopyadan biri bakteri kromozomu üzerindedir, diğeri yeni aktarılan F’ faktöründe yer alır (Griffiths vd., 2000).

### 2.1.5.2. Antibiyotik Direncinin Yayılmasında Rol Oynayan Hareketli Elemanlar

#### 2.1.5.2.1. Plazmitler

Plazmitler konak kromozomundan bağımsız olarak replike olabilen genetik elemanlardır. Virüslerden farklı olarak plazmitlerin hücre dışı formu bulunmaz. Plazmitlerle kromozomlar arasındaki en önemli fark ise, plazmitlerin zorunlu olmayan fakat çoğunlukla hücreye avantaj sağlayan özellikler kazandırmasıdır. Bunlara örnek olarak; antibiyotik direnci, virülans faktörleri ve ekstra metabolik yetenekler sayılabilir. Zorunlu genler ise kromozom üzerinde yer alır.

Plazmitler genellikle dairesel DNA molekülleridir, ancak bazen doğrusal (Örneğin; *Borrelia* ve *Streptomyces*’lerin plazmitleri) veya RNA'dan yapılmış plazmitler de mevcuttur. Doğal plazmitlerin büyüklükleri 1 kilobaz ile 1 megabaz arasında değişir. Tek ya da çoklu kopyalar halinde bulunabilirler, birkaç yüz gene kadar taşıyabilirler. Tipik bir plazmit kromozomun %5’inden daha küçüktür. Hücrelerden izole edildiğinde plazmitler süpersarmal yapıdadır. Çoğu plazmit bakterilerde yaşar ve aslında vahşi doğada bulunan bakterilerin yaklaşık %50'si bir veya daha fazla plazmit içerir. Plazmitler ayrıca maya ve mantar gibi daha yüksek organizmalarda da bulunur (Medigan ve Martinko, 2012; Clark vd., 2019).

Plazmitler çeşitli mekanizmalarla yeni konaklara dahil edilebildiğinden, olan bir ekstra kromozomal DNA havuzu olarak kabul edilebilir. Üç ana faktör plazmit araştırmasının gelişimine katkıda bulunmuştur: i) genetik organizasyonu oldukça basittir, ii) in vitro olarak kolay izole edilebilir ve manipüle edilebilirler ve iii) plazmitler vazgeçilebilir olduğundan, manipülasyonlarında meydana gelen olumsuz sonuçlar göz ardı edilebilebilir (Solar vd., 1998).

Plazmit sınıflaması, genelde uyumsuzluk (*incompatibility*=Inc grubu) gruplaması ile yapılır. Replikasyon mekanizmaları birbirine çok benzeyen iki plazmit aynı hücrede

birlikte bulunamaz. Bunu test etmek için, uyumsuzluk testinde kullanılan plazmit taşıyan standart suşlara bilinmeyen bir plazmiti transfer edilir. Örneğin F plazmiti IncFI grubundadır ve aynı gruptaki ColV-K94 plazmiti ile uyumsuzdur. Konjugatif direnç plazmiti olan R100 plazmiti aynı konjugasyon ve transfer sistemine sahip olmasına rağmen, F plazmiti ile uyumludur. R100 plazmiti IncFII grubundadır (Dale ve Park, 2004).

Plazmit replikasyonu, oriV (vejetatif orijin) denilen sabit bir noktadan başlar. Ancak, bazı plazmitlerin iki veya daha fazla alternatif orijine sahip oldukları bilinmektedir. Replikasyon bu noktadan başlar ve her iki yönde ilerleyerek (bidirectional) dairesel yapı oluşana kadar devam eder. Plazmit replikasyonu detaylı bir şekilde R100 ve ColE1 plazmitinde çalışılmıştır.

Çoğu bakteri, plazmit kazanarak antibiyotiklere direnç sağlamaktadır. Neredeyse bütün antibiyotik gruplarına karşı plazmit kaynaklı direnç mevcuttur. Antibiyotik direnç genleri çeşitlidir: plazmit kaynaklı beta laktamazlar vasıtasıyla penisilinlere direnç, gentamisin, streptomisin, amikasin vb. gibi aminoglikozid grubu antibiyotiklere direnç, tetrasiklin ve sülfanomidlere direnç ve bu gibi birçok antibiyotik direnci sayılabilir. Tabii ki bunun yanında, hastane enfeksiyonlarından sorumlu olan ve antibiyotik direnç genlerini kromozomunda taşıyan bakteri suşları da direnç konusunda önemli problemlerden biridir (Dale ve Park, 2004).

#### 2.1.5.2.2. Transpozonlar

Bir hücrenin genomunda farklı yerlere hareket edebilen, aynı zamanda bir veya birden fazla geni de beraberinde taşıyabilen hareketli elemanlardır. İlk olarak 1940 yılında Barbara Mcclintock tarafından mısır bitkisinde keşfedilmiştir. Transpozonların sebep olduğu genomdaki değişiklikleri fark eden McClintock bu keşfiyle, 1983 yılında Nobel Bilim Ödülü almıştır (Ravindran, 2012).

Transpozonlar bulundukları genom içerisinde yer değiştirebilecekleri çeşitli diziler içermektedirler. Yer değiştirecekleri pozisyon için sahip oldukları mekanizmaları kullanan transpozonlar iki sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar; retrotranspozonlar ve DNA transpozonlarıdır. Retrotranspozonlar, bir RNA yoluyla kendini yeni bir pozisyona kopyala-yapıştır mekanizmasıyla kopyalarken, DNA transpozonları kes-yapıştır mekanizmasıyla hareket eder (Agren ve Clark, 2018). Böylece, retrotranspozonlar sayılarını DNA transpozonlarına kıyasla arttırmış olurlar. Bununla ilişkili olarak insan genomunda %2'den daha az DNA transpozonlarının bulunmaktadır (Pray, 2008).

DNA transpozonlar, her iki ucunda yaklaşık 9 ile 40 baz çifti uzunluğunda ters tekrarlardan oluşur. Ters tekrarların görevlerinden biri DNA transpozonların sıçramalarını sağlayan transpozaz enzimleri tarafından tanınmaktır. Retrotranspozonlar ise, DNA transpozonlardan farklı olarak tranpozaz kodlamak yerine RNA transkriptleri üretirler ve RNA dizileri ters transkriptaz enzimiyle dönüştürülerek hedef bölgeye yerleştirilmektedir (Pray, 2008).

Antibiyotik direnç genlerini içeren bazı transpozonlar, plazmitler aracılığı ile bakteriler arasında direnç aktarımına neden olabilmektedir (Iyer vd., 2013; Van Hoek vd., 2011). Geçmişte bakteriyel antibiyotik direnci çok önemli değildi ancak günümüzde küresel bir sorun haline geldi (Van Hoek vd., 2011). Penisilinlere, aminoglikozidlere, sefalosporinlere ve çoğu antibiyotiğe direnç (çoklu ilaç direnci) bakteriyel enfeksiyon hastalıklarının tedavisini zorlaştırmaktadır (Van Hoek vd., 2011; Roberts ve Mullany, 2011). Bakterilerde antibiyotik direnci transpozonlar, integron ve plazmitlerde bulunan direnç genlerinin alınması yoluyla yayılmaktadır (Iyer vd., 2013). *Clostridium difficile*'nin hareketli genetik elementleri kazanması ve en güçlü antibiyotiklere karşı direnç oluşturma yeteneği transpozonların önemini göstermektedir. Ayrıca, vankomisine direnç ($van^R$), *Enterococcus* türleri arasında transpozonlar aracılığı ile aktarılır (Roberts ve Mullany, 2011). Bir antibiyotik direnç geninin bir bakteriden diğer bakterilere geçişi konjugatif transpozonlarla gerçekleşir (Bennet, 2008). Örneğin; konjugatif Tn*916* ailesi, enterokoklarda antibiyotik direnç genlerinin yaratıcısıdır (Graham vd., 2009). Antibiyotik direnci, Gram negatif bakterilerin çoğunda kompozit transpozonlar tarafından oluşturulur (Liebert vd., 1999). Bakteriyel antibiyotik direncinde (özellikle *Escherichia coli*) en önemli kompozit transpozonlar Tn*903,* Tn*9,* Tn*10* ve Tn*5*'tir (Goryshin vd., 1998). Tn*3,* ampisiline direnç geninin taşıyıcısıdır hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilerde bulunur (Dahlberg ve Hermansson M, 1995). Gram negatif bakterilerde beta laktamaz genleri (*bla*$_{TEM-1}$ gibi) içerir (Gomez-Lus, 1998).

### 2.1.5.2.3. İntegronlar

İntegronlar, gene dışarıdan antibiyotik direnç genlerinin eklenmesi ile orada ifade olmasını sağlayan genetik elemanlardır. Özellikle Gram negatif bakteriler arasında antibiyotik direncinin yayılmasında rol almalarıyla bilinirler (Gillings, 2014). Hareketsizdirler ve hareketli elemanlar olan transpozon ve plazmitlerin üzerine yerleşmişlerdir. İntegronlar antibiyotik direnç genlerinin türler içerisinde ve farklı türler

arasında yayılmasına aracılık ederler (Deng vd., 2015). İntegronlar ilk olarak 1980'lerin sonunda tanımlanmıştır. Yapılan biyoinformatik analizlerle integron içeren bakteri genomlarının kısmen veya tamamının sekansı ile, integronların veya integraz genlerinin genomun yaklaşık %10-17' sini oluşturduklarını gözlemlemişlerdir. Tanımlanan integronların çoğu, insan klinik izolatlarında belirlenmiştir, ancak aynı zamanda su ve toprak gibi birçok klinik olmayan ortamda da bulunabilirler (Tennstedt vd., 2003).

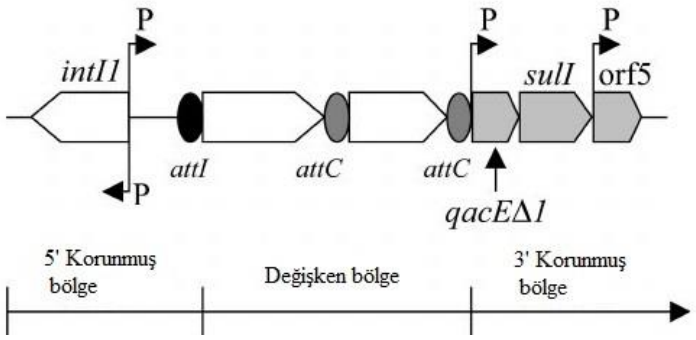
**-İntegronların Yapısı:** İntegronlar üç elementten oluşur: integron içinde bölgeye özgü rekombinasyon için gerekli olan bir tirozin rekombinazı (integraz, *intI* geni tarafından kodlanan) kodlayan gen; integral tarafından tanınan bitişik rekombinasyon bölgesi (*attI*); ve integronda bulunan gen kasetlerinin verimli transkripsiyonu ve ekspresyonu için gerekli entegrasyon bölgesinin yukarısında yer alan promotor bölgedir. Promotor tüm integron sınıflarının bir parçası olduğu varsayılmasına rağmen, varlığı ve aktivitesi hepsi için gösterilmemiştir (Boucher vd., 2007).

Gen kasetleri, tek ve çoğunlukla promotorsüz bir gen ve bir rekombinasyon bölgesinden (*attC*) oluşan küçük mobil elementlerdir. Gen kasetleri, integrona entegre edildiğinde lineer halde, eksizyondan sonra veya bölgeye özgü rekombinasyondan önce, serbestken dairesel formdadır. *attC* bölgesi (59-baz element olarak da isimlendirilir), integraz tarafından tanınır ve bu bölge ile integronun *attI* bölgesi arasında rekombinasyon gerçekleşir, böylece integron yapısına gen kaseti eklenmiş olur (Collis ve Hall, 1992). Bilinen 194 gen kaseti identifiye edilmiştir, bu gen kasetlerinin aminoglikozitlere, β-laktamlara, kinolonlara, kloramfenikol ve trimetoprim'e direnç genleri taşımaktadır (Maura vd., 2009).

**-İntegronların Sınıflandırılması:** Bugüne kadar, intI genindeki dizilerdeki farklılıklarda göre integronlar sınıflandırılmıştır. Dört genel integron sınıfı tanımlanmış, integron sınıf 1-4 sınıflar olarak adlandırılanmıştır. Sınıf 1-3 çoklu dirençli integron olarak bilinir, bu integronlar rekombinasyon bölgeleri ile in vitro eksizyon ve entegrasyon ile gen kasetlerini alma yeteneğine sahiptir. İntegronlarla ilgili mevcut çalışmaların çoğu sınıf 1 integronları Gram negatif mikroorganizmalar üzerinde odaklanarak yürütmüştür (Hall, 1999). 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 (Martin vd., 2008). Diğer integron sınıfları da antibiyotik direnci gen kasetleri içerebilir ancak dünya çapında yaygınlıkları fazla değildir (Nield vd., 2001).

**a) Sınıf 1 İntegronlar**

Sınıf 1 integronlar 5’ korunmuş bölge (5’CS) ve 3’ korunmuş bölge (3’CS) ile gen kasetlerinin yerleşmiş olduğu variable region olarak adlandırılan değişken bir bölgeden oluşur (Guerra vd., 2003). 5’korunmuş bölge temel olarak üç yapı içerir; tirozin rekombinaz enzimini kodlayan integraz geni (*intI*), rekombinasyon bölgesi *attI* ve insert olan gen kasetlerini ekspresyonunda görevli promotor bölge. 3’CS bölgesi ise *qac*EΔ1 olarak bilinen defektif kuaterner amonyum direnç geni ve sulfonamidlere dirençten geni *sul1* (Şekil 1) ve ayrıca streptomisin ve spektinomisin direncinden sorumlu *aadA1* gen kasetlerini içerir (Partridge vd., 2001). Korunmuş bölgeler arasındaki değişken bölge ise antibiyotik direnç kasetlerinin girdiği 59 baz çiftlik *attC* gen bölgesidir.

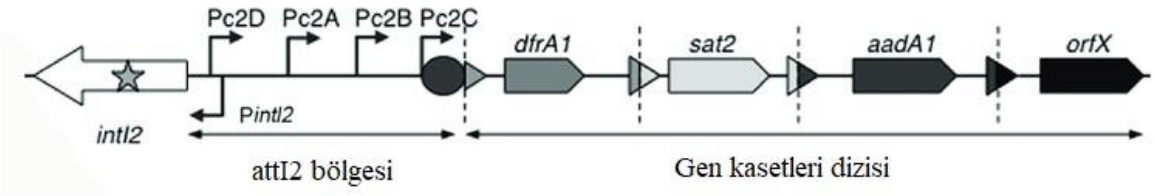



**Şekil 1.** Sınıf 1 integronların genel yapısı (Drouin vd., 2002). P: promotor bölge. *intI1*: integraz geni. *attI* ve *attC*: rekombinasyon bölgesi. *qac*EΔ1: kuaterner amonyum direnç geni. *Sul1*: sulfonamid direnç geni. *orf5*: fonksiyonu bilinmeyen gen.

Sınıf 1 integronlar Tn*21* gibi transpozonlar üzerinde tespit edilmiştir ve prototip olarak bilinirler (Rowe-Magnus ve Mazel, 2001). Sınıf 1 integronlar tek başına hareket edemez, Tn*21* integraz veya *intI1* integrazın 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. İntegronlar yaklaşık 9% bakteri genomunda belirlenmiştir, sınıf 1 integronlar en yaygın olanıdır, birçok çalışmada klinik bakterilerde rapor edilmiştir. Bu klinik bakteriler çoğunlukla; *Acinetobacter, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Escherichia, Aeromonas, Proteus, Burkholderia, Campylobacter, Enterobacter, Citrobacter, Klebsiella, Mycobacterium, Serratia* gibi Gram negatif bakterilerdir (Kargar vd., 2014).

**b) Sınıf 2 İntegronlar**

Sınıf 2 integronlar incelendiğinde, sınıf 1 integronun ile yaklaşık % 50 homoloji gösterir. Farklı olarak, 5' korunmuş bölgesinde *intI2, attI2* ve promotor bölge bulunur. 3' korunmuş bölgesi sınıf 1 integronlardan farklıdır, sınıf 2 integronlarda bu bölgede *sul* genleri yoktur (Xu vd., 2009). Çoğunlukla Tn*7* transpozonu üzerinde bulunurlar ve beş *tns* geni içerir (*tnsA, tnsB, tnsC, tnsD ve tnsE*). Bu genler, bakteri kromozomları içindeki tek bir bölgeye tercih ederek sınıf 2 integronun hareketliliğine aracılık eder yani kısaca transpozon hareketlerinde görevlidir (Senda vd., 1996). Sınıf 2 integronlar yaygın olarak dihidrofolat reduktaz (*dhfr*) gen kaseti içermektedir ve sırasıyla trimetoprime, streptomisine ve streptomisin/spektinomisine direnç sağlayan *dfrA1, sat2* ve *aadA1* gibi üç klasik gen kasetleri taşımaktadır (Şekil 2) (Barlow ve Gobius, 2006).




**Şekil 2.** Sınıf 2 integronun genel yapısı (Jove vd., 2017). Pc: promotor bölgesi. *intI2*: integraz geni. *attI*: rekombinasyon bölgesi. *dfrA1*: dihidrofolat reduktaz gen kaseti. *sat2*: streptomisin gen kaseti. *aadA1*: spektinomisin gen kaseti. *orfX*: fonksiyonu bilinmeyen gen.

**c) Sınıf 3 İntegronlar**

Bu sınıf integronlar ilk olarak 1993 yılında Japonya'daki *Serratia marcescens* izolatlarından tanımlandı ve daha sonra *Klebsiella pneumoniae* suşundaki *bla*$_{GES-1}$ ile ilişkili olduğu bulundu (Arakawa vd., 1995). Sınıf 3 integronlar Tn*402* transpozonu üzerinde yer alır. Sınıf 1 integronlara benzer şekilde transpozona ters şekilde yerleşirler. Sınıf 3 integraz geni *intI3 intI1* %60 oranında homoloji gösterir. Sınıf 3 integronlar integronlar arasında en az rastlanılmasına rağmen gelişerek yeni türlere aktarıldığı ve yeni direnç kasetlerini bir araya getirdiği görülmektedir (Kaushik vd., 2017). *Acinetobacter* spp., *Alcaligenes, Citrobacter freundii, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas putida, Salmonella* spp. ve *Serratia marcescens* gibi sınırlı mikroorganizmada tanımlanmışlardır (Mohammadalipour vd., 2017).

**d) Sınıf 4 İntegronlar**

Antibiyotik direnci ve patojenitenin ötesinde haricinde adaptasyon için gerekli genleri kodlayan çok sayıda gen kasetini barındıran sınıf 4 integron, ilk kez *Vibrio* izolatlarında tespit edilmiştir (Shibata vd., 2003). *Vibrio* türlerinde trimetoprim ve sülfametoksazol direncinden sorumludurlar (Kaushik vd., 2017). Bu integronlar hakkındaki bilgiler kısıtlıdır, sadece Vibrionaceae, *Shewanella, Xanthomonas,* Pseudomonad ve diğer proteobakterilerde tanımlanmıştır (Clark vd., 2000). Bugüne kadar, kloramfenikol ve fosfomisinlere karşı direnç kazandıran genleri bulunan gen kasetleri taşıdıkları bilinmektedir (Fluit ve Schmitz, 2004).

## 2.2. *Enterobacteriaceae* Ailesi

*Enterobacteriaceae* ailesi; bakterileri *Protobacteria* şubesi, *Gammaproteobacteria* sınıfına ait *Enterobacteriaceae* takımı içinde yer alır. *Enterobacteriaceae* üyeleri birbirlerine çok yakındır, genomları yüksek derecede homoloji gösterir. Bu ailede 31 cins ve 100'den fazla tür bulunmaktadır. Ancak bazıları nadir olarak insandan izole edilebilir. İnsan patojenlerini içine alan cinsler *Escherichia, Shigella, Proteus, Salmonella, Klebiella, Yersinia, Serratia, Enterobacter, Citrobacter, Hafnia, Providencia ve Edwardsiella*'dır. Bunlardan da ilk 9'u daha patojen, sık rastlananlarıdır. Genel olarak %95'inden fazlası klinik öneme sahiptir (Jahansson, 1999).

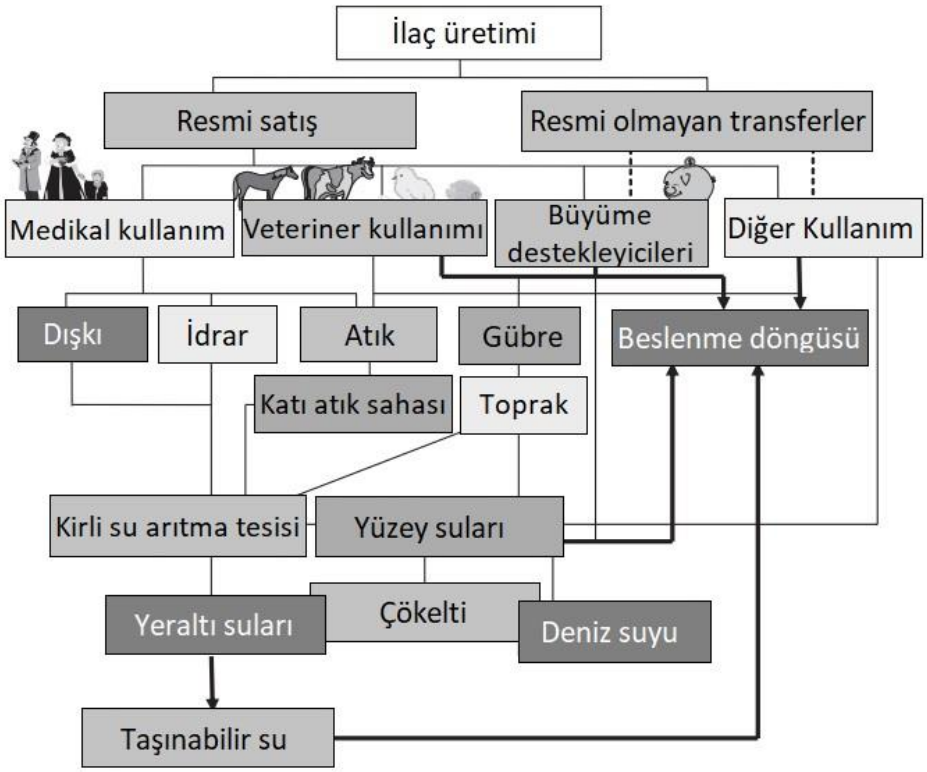
*Enterobacteriaceae*; kısa, yuvarlak uçlu Gram negatif basillerdir. 2-3µm'den başlayıp, silindir şeklinde 6-7µm'ye kadar giden uzunluğa sahiptir. Genişlikleri ise 0.5-2µm'yi bulmaktadır. Bazı türler peritriş flagellası ile hareketliyken, diğerleri hareketsizdirler (*Klebsiella* ve *Shigella*). Spor oluşturmazlar (Paterson vd., 2004). Hemen hepsi fakültatif anaerobdur, en iyi $CO_2$'siz ortamda 35-37 ºC 'de ürerler. Ancak bazı türler (*Serratia* ve *Yersinia*) 1-5 ºC gibi düşük ısılarda da üreyebilirler. Glukozu fermente edebilirler, nitratı nitrite indirgerler ve oksidaz negatiftirler. Farklı koloni morfolojileri gösterebilirler, *Klebsiella pneumoniae*, fagositozdan koruyan ve aderansında yardımcı olan mukoid polisakkarit kapsülünden dolayı büyük ve nemli koloniler oluştururken *E. coli* ise jelozda yuvarlak, hafif kabarık, düzgün 1-2 mm çapında S tipi koloni yapar. Enterobacter türleri EMB Agar besiyerinde pembe mukoid, 3- 4mm çapında koloniler oluştururlar (Bilgehan, 1992).

*Enterobacteriaceae* üyeleri; yara enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, gastroenterit, menenjit, pnömoni, septisemi ve hemolitik üremik sendromu gibi çok çeşitli hastalıklara neden olabilir. Hepsi gerçekten patojenik olarak kabul edilmez, bazıları fırsatçı patojendir. Çevrede toprakta, suda, bitkilerde her yerde bulunurlar, ayrıca hayvanların ve insanların mide bağırsak sisteminde tespit edilmişlerdir (Agostino ve Cook, 2016). *Escherichia coli* ve enterokoklar gibi sıcak ve soğukkanlı hayvanların ve insanın normal mikrobiyota elemanları kolaylıkla direnç genlerini kazanarak transfer edebilir. Patojenik bakteriler için direnç genlerinin bir rezevuarı olan bu kommensal bakteriler antimikrobiyal dirençteki değişimlerin bir indikatörü olarak kullanılabilir (Caprioli vd., 2000). Fekal indikatör bakterilerdeki antibiyotik direncinin birçok akıbeti vardır. Örneğin, *E. coli* ve enterokoklar antibiyotiklere direnç oluşturmada insanın hastane kaynaklı (nozokomiyal) enfeksiyonlarının etken patojenleri olarak daha etkili hale gelebilirler (Jett vd., 1994).

### 2.3. Çevre Orijinli Bakteriler ve Antibiyotiklere Direnç

Antibiyotik direnci insanlar, hayvanlar ve çevre arasında bakterlerin ve genlerin yayılımı ile meydana gelen küresel bir sağlık sorunudur. Birçok bariyerin olmasına karşın, bakteriler sürekli yeni direnç genleri kazanarak enfeksiyonları önleme ve tedavi etme yeteneğimizi giderek kısıtlamaktadır (Larsson ve Flach 2021).

Antibiyotiklerin ana kaynakları evler, hastaneler, sağlık ocakları (tedavi ve kullanılmayan ilaçların uzaklaştırılması), kümes hayvanları ve çiftlik hayvanları yetiştiriciliği (büyüme artırıcıları) ve ilaç üreticileridir (Kulis vd., 2003; Türkdoğan ve Yetilmezsoy, 2009). Kanalizasyon, tıbbi atıklar, endüstriyel aktiviteler, antibiyotik ve ilaç üretimi, gıda üretimi, ev gereçleri, ürünler üzerine spreyleme, çiftlik hayvanlarının üretimi, balık çiftlikleri gibi faaliyetler antibiyotiklerin bilinen temel kaynaklarıdır. İlaç aktif maddeleri çeşitli yollarla çevreye girebilir. İnsanlar ve hayvanlardan başlayan bu döngüde ilaç aktif maddeleri atıksulara, toprağa, yeraltısularına ve yeterli arıtım yapılmadığı takdirde içme sularımıza kadar ulaşabilir (Halling-Sorensen vd., 1998; Ternes, 1998; Daughton ve Ternes, 1999). Bunun sonucunda sular ve diğer çevre ortamları kirlenebilir (Şekil 3). Bu şekilde doğaya ulaşan antibiyotiklerin bir kısmı yarı ömürlerinin uzun olması nedeniyle uzun yıllar doğada bulunabilir. Aktif bileşikler hemen hemen hiç değişmeden atıksu arıtma tesislerinden alıcı ortama deşarj edilirler. Metobolitlerin biyolojik olarak hala aktif olmaları durumunda da ortamdaki sucul organizmaları etkilemekte, ekosisteme ve insan sağlığı üzerine gerçek bir tehdit oluşturmaktadır (Halling-Sorensen vd., 1998).




**Şekil 3.** Antibiyotiklerin çevreye giriş ve dağıtım yolları (Kümmerer, 2010)

Sucul ortamda antibiyotiklerin varlığı, bazı ülkelerde çalışılan pek çok araştırmanın konusunu oluşturmaktadır. Otuzdan fazla antibiyotik maddesi, kanalizasyon giriş ve çıkış suyu örneklerinde, yüzeysel sularda ve hatta yeraltı ve içme sularında bulunmuştur. Antibiyotiklerin metabolitleri veya parçalanma ürünleri, tarımsal olarak kullanılan alanlara çamur veya gübrenin uygulanmasıyla veya arazi üzerine doğrudan hayvan dışkısıyla, yüzeysel yağmurlar vasıtasıyla veya yerkürenin derin tabakalarında sızmayla sucul ortama ulaşırlar. Bu yolla topraklar, sucul ortamın antibiyotik kirliliğinin bir kaynağı olarak hareket edebilir (Alder vd., 2001).

Canlıların yaşam alanı olan çevrede gerçekleşen bu değişimden etkilenmesi de beklenen bir durumdur. Önceki araştırmalar, çeşitli çevresel kaynaklarda antibiyotik direncinin oluşumunu anlamak için vahşi hayvanları hedef almıştır. İnsan etkisindeki ortamda yiyecek arayan vahşi hayvanlarda, klinik olarak önemli antibiyotik direncine sahip bakteriler tarafından kolonize olur. Yaban hayatında bu tür bakterilerin oluşumu, henüz tam olarak anlaşılmamış çeşitli biyolojik, ekolojik ve coğrafi faktörlerden etkilenir. Antibiyotik direncinin bulaşmasında vahşi hayvanların rolünü anlamak ve halk sağlığı için

potansiyel riskleri değerlendirmek için insan-hayvan-çevre ilişkisine odaklanan yeni yaklaşımlar gereklidir (Dolejska ve Literak, 2019).

Vahşi doğada antimikrobiyal direncin incelenmesi için birçok hayvan türü insanla ilişkili çevrelere yakınlığı nedeniyle tercih edilmiş ve direnç genlerinin yayılımı açısından bir vektör olarak görev yapıp yapmadıkları incelenmiştir (Gilliver vd., 1999; Cole vd., 2005; Poeta vd., 2009). Hayvanlar ve insanlar antibiyotik direncinin üst üste çakışan rezervuarlarıdır. Bu nedenle hayvanlarda var olan antmikrobiyaller halk sağlığı ile yakından ilişkilidir (Wegener, 2003).

Sığır, süt inekleri, kafes hayvanları yüzeyel suların ve yer altı sularının fekal kontaminasyonunun kaynakları arasında yer almaktadır. Fekal kontaminasoyun nedeniyle antimikrobiyal dirençli bakterileri içeren yüzey sularının kontaminasyonu da gün geçtikçe endişeleri artırmaktadır (Parveen vd., 2006). Çiftlik hayvanlarının fekal kontaminasyon vasıtasıyla dirençli genlerin kazanımına neden olduğu, temiz bir bölgede yaşan ve hayvan atıklarına maruz kalanlar arasında direnç fenotipleri arasında açık ara fark olduğu belirlenmiştir (Cole vd., 2005). Vahşi doğada etçil beslenen birçok hayvan yiyecek ve yaşama alanı bulmak için büyük mesafeler katetmekte, yaşam alanları çoğu zaman insan ve diğer hayvanların yakınları olduğu için yiyecekleri ortak kullanmaktadır. Bu nedenle de yaban hayvanlarının incelenmesinin direnç faktörlerinin seçimi ve yayılımı konusunda katkı sağlamadığı rapor edilmektedir (Poeta vd., 2009). Antibiyotik dirençli bakteri dinamiklerinde yaban hayatının önemli bir rol oynayabileceği giderek daha fazla hipotezlense de, bu güne kadarki veriler yetersiz kalmaktadır. Çiftlik hayvanları sistemindeki sucul çevrelerde yaşayan kurbağa ve iribaşlar, hayvan feçeslerinden gelen antimikrobiyal dirençli bakterileri sindirerek uzun süre taşıyabilirler (McDiarmid ve Altig, 1999; Minette, 1984). Antimikrobiyal dirençli bakterileri daha sonra yaşam ortamları olan su birikintilerine taşıyabilirler. Böylece mikroorganizmalar diğer hayvanlar ve insanlar tarafından tekrar kazanılabilir.

### 2.4. *Pelophylax* sp. ve Çevresel İndikatör Özelliği

*Pelophylax* türleri, Avrasya'da yaygın olan ve birkaç türü Kuzey Afrika'ya kadar uzanan bir kurbağa cinsidir. Bu cins, 1843'te Leopold Fitzinger tarafından, Carl Linnaeus'un *Rana* cinsinin kahverengi gölet kurbağalarından farklı olduğunu düşünmesiyle ortaya çıkmıştır. Bu kurbağa ailesi tür sayısı bakımından oldukça geniş bir alanda yayılım göstermektedir. Orta ve Güney Avrupa, Kuzey Afrika ve ayrıca Batı Asya'da yayılım

gösterir. Ülkemizde yaşamak için uygun ortamın olduğu geniş bir alanda yaşamını sürdürmektedir. Karadeniz Bölgesi, İç Anadolu'nun Doğu ve Kuzey bölümleri, Doğu ve Güneydoğu Anadolu Bölgelerinde dağılış gösterir. Genellikle göl, nehir, dere gibi sucul alanlarda yaşar (Başoğlu vd., 1994).

Vücut boyları 15 cm kadardır, kulak zarları belirgindir, baş yanlarında koyu renkli şeritler yoktur, sırt yanlarında boyuna uzanan deri kıvrımları iyi gelişmiştir. Derileri genellikle pürtüklüdür (Baran vd., 2021). Erkek bireylerde ağzın arka kısmında timpanal zarın arkasında gri renk dış ses keseleri bulunur. Genel olarak; ovalık alanlarda, suya yakın bölgelerde yaşarlar. Bitkilerin çok olduğu sulak bölgeleri tercih ederler, sudan fazla ayrılmazlar, yaklaşıldığında suya zıplama hareketi yaparak saklanırlar. Bazen akıntılı sularda da bulunurlar. Besinlerini böcek türleri teşkil eder. Ticari önemleri de vardır. Deniz seviyesinden 2500 m yüksekliğe kadar rastlamak mümkündür (Budak ve Göçmen, 2008). Kulak zarları önemli bir özellikleridir, arka bacakları uzun, ayakları perdelidir. Erkeklerin dış ses keseleri mevcuttur. Erkek ve dişileri ayırmada en belirgin özellik; erkek ön bacaklarının daha güçlü bir yapıda olması, birinci parmaklarında şişkinliğin olmasıdır. Farklı renk tonlarına sahip olabilirler, sırt kısımlarında yeşilimsi gri, açık veya koyu kahverengi olabilir, bu zemin üzerinde koyu lekeler görülür (Başoğlu vd., 1994). Karın kısımları kirli beyaz veya sarımsı renkte, ekseriyetle küçük lekelidir. Alt tarafı kırmızımsı olanlara da rastlanır. Üreme dönemlerinde dişiler sessizdir, erkekler ise oldukça seslidir. Ses keseleri başın iki yan kısmında yer alır (Budak ve Göçmen, 2008).

Amphibiler özellikle de *Ranidae* üyeleri kardiyovasküler ve bağışıklık sistemi olarak oldukça gelişmiştir, yüksek düzeyde kirlilik ve şehirleşme etkilerine dayanabilirler bu da onları iyi bir biyoindikatör yapar (Manning ve Horton, 1982; Vershinin, 2008). Dünya çapında son yıllarda amphibi populasyonunda belirgin bir azalma söz konusudur (Houlahan ve Findlay, 2000). Bu azalmanın sebeplerinden biri de çevresel etmenlerdir (Carey ve Bryant, 1995). Amfibiler, dünyadaki muhtemel en hassas canlılardandır. Çevresel değişikliklere çok çabuk tepki verirler, bu nedenle de çevrede insan faaliyetlerinin etkisini gösteren bir indikatör olarak kabul edilirler. Günümüzde dünyada yaşayan yedi binin üzerinde amfibi türü olduğu düşünülmektedir (Amphibiaweb, 2021).

*Pelophylax* sp. su kurbağaları olarak da bilinir. Yaz aylarının çoğunu sudaki yaşama ortamında geçirirler; yeterli nem olduğu sürece havuz kurbağaları kuru araziye kıyasla daha sık bulunur. *Pelophylax* sp.'nin Türkiye'nin her yerinde yaşayan türleri

mevcuttur. (*P. ridibundus, P. bedriagae ve P. caralinatus*) (Amphibiaweb, 2021). Amfibiler hayat döngülerinin ergin fazında karasal habitatlarda yaşasalar da, suya daima bağımlıdırlar. Beslenme, üreme, larval gelişme ve kış uykusu esnasında sucul habitatlardan yararlanırlar. Bu fizyolojik özellikleri amfibileri su ve toprak kirliliğinin etkilerine karşı daha duyarlı hale getirmektedir ve bu yüzden de biyolojik indikatör olarak kabul edilmektedirler. Amfibilerin biyoindikatör olarak olarak kullanılması amfibi popülasyon azalmasının yoğun bir şekilde arttığı 1980 sonlarına kadar uzanmaktadır (Sewel ve Griffiths, 2009). Özellikle kurbağalar olmak üzere, amfibiler mikroorganizmalarca zengin olan çamur ve topraklardaki su birikintilerinde ve havuzlarda yaşarlar. Hird vd. (1983) kurbağa ve iribaşlardan *E. coli* ve *Salmonella arizonae* türleri başta olmak üzere 29 *Enterobacteriaceae* türü izole etmişlerdir. Bunun yanında, kurbağalardan insanlarda hastalık nedeni olabilien Gram-negatif bakteriler (*Klebsiella pneumoniae, Proteus vulgaris, Aeromonas hydrophila ve Enterobacter agglomerans*) izole etmişlerdir. Bu izolatlarda ise nalidiksit aside, rifampisine ve streptomisine direnç tespit edilmiştir (Boman, 2000). Kurbağa ve iribaşlar barsak floraları direnç genlerini sucul çevrelerden kazanabilirler. Doğada kurbağa ve iribaşlar kaprofajiktir (feçes yiyen). Feçesin barsakta kalma süresi uzadıkça mikrobiyal sindirim o kadar kolaylaşmaktadır (McDiarmid ve Altig, 1999; Minette, 1984). Çiftlik hayvanları sistemindeki sucul çevrelerde yaşayan kurbağa ve iribaşlar, hayvan feçeslerinden gelen antimikrobiyal dirençli bakterileri sindirerek uzun müddet taşıyabilirler. Antimikrobiyal dirençli bakteriler daha sonra çevreye (örneğin, su birikintileri) tekrar geri dönebilirler ve çiftlik hayvanları tarafından bu mikroorganizmalar potansiyel olarak tekrar kazanılabilir.

# 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, Mayıs 2016 ile Ekim 2020 tarihleri arasında Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ), Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında gerçekleştirildi. Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi (RTEÜ), Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı tarafından 2020/41 nolu karar ile onay alındı (Ek 1). Tez çalışması RTEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (BAP, Rize, Türkiye) tarafından TSA-2016-526 numaralı proje kodu araştırma projesi olarak desteklendi ve deneylerde kullanılan sarf malzemeler ve kitler temin edildi.

## 3.1. Gereçler, Besiyerleri ve Kimyasallar

### 3.1.1. Gereçler

Çalışmada kullanılan gereçler farklı firmalardan temin edildi. Mikrosantrifüj (Beckman coulter), çalkalayıcılı benmari (Memmert), ısıtıcı blok (HLC), inkübatör (WiseCube), derin dondurucu (Bosch), -80°C derin dondurucu (New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U570), -20°C derin dondurucu (Bosch), buzdolabı (Bosch), vorteks (Velp Scientifica), hassas terazi (Ohaus), otomatik pipetler (Rainin), soğutmalı santrifüj (Hettich Rotina 380R), çalkalamalı inkübatör (IKA 4000i), elektroforez tankı (Cleaver), elektroforez güç kaynağı (Thermo Scientific), jel dökümantasyon ve işleme sistemi (DNR Bio-Imaging Systems, MiniLumi), polaroid kamera filmi yazıcısı (Sony), UV transillüminatörü (Vilber lourmat), manyetik karıştırıcı (WiseStir), buz/kar makinesi (Scotsman), termosyklırlar (Techne Genius, Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific), pHmetre (Hanna), mikrodalga fırın (Bosch), distile su cihazı (GFL), Pastör fırını (Ecocell), otoklav (WiseClave), Pulse field gel elektroforezi (BioRad Chef-DRII), sınıf 2 kabin (Mars safety class training institute), Vitek 2 sistemi (Biomerieux), spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda 25).

### 3.1.2. Laboratuvar Suşları ve Standart Suşlar

Bu çalışmada, konjugasyon deneyleri için alıcı hücre olarak *E. coli* K-12 laboratuvar suşu J53-2 ($F^-$, methionin ve prolin amino asitleri için oksotrof ve rifampisine dirençli, Dr. Metin Otkun [Trakya Üniversitesi, Tıp Fakültesi]'dan sağlandı suşu ve antimikrobiyal duyarlılık testleri ve pulse field jel elektroforezinde *E. coli* ATCC 25922 suşu kontrol olarak kullanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) deneylerinde integraz geni ve sınıf 1 integron değişken bölge için pozitif kontrol olarak *E. coli* KD39 (Özgümüş

vd., 2009), sınıf 2 integraz geni için pozitif kontrol olarak *E. coli* ACC172 (Çopur Çicek vd., 2014), *tetA* geni için pozitif kontrol olarak *E. coli* KD8 (Özgümüş vd., 2009), *tetB* geni için pozitif kontrol olarak *E. coli* KD27 (Özgümüş vd., 2009), TEM-tipi beta laktamaz geni için pozitif kontrol olarak *Klebsiella pneumoniae* TRE40 (Özgümüş vd., 2007), SHV-tipi beta laktamaz geni için pozitif kontrol olarak *E. coli* TRE73 (Özgümüş vd., 2007) suşları kullanıldı.

### 3.1.3. Besiyerleri ve Ayraçlar

Çalışmada kullanılan besiyerleri, kimyasal ve biyokimyasal maddeler değişik firmalardan sağlandı. Koyun kanlı agar (RTA Lab), maya özütü (Pronadisa), agar-agar (Himedia), triple sugar iron agar (TSIA) (Or-Bak Lab), metilen mavisi (Mediko Kimya), sodyum klorid (NaCl) (Sigma), sodyum hidroksit (NaOH) (Himedia), sodyum dodesil sülfat (SDS) (Merck), metil kırmızısı (Himedia), α-naphtol (Himedia), glacial asetik asit (Sigma), hidroklorik asit (HCl) (Merck), potasyum hidroksit (KOH) (Himedia), gliserol (Merck), orange red (Himedia), etil alkol (Merck), di-potasyum hidrojen fosfat ($K_2HPO_4$) (Himedia), *p*-dimetilaminobenzaldehit (Himedia), amonyum klorid ($NH_4Cl$) (Merck), di-sodyum hidrojen fosfat ($Na_2HPO_4$) (Himeda), rifampisin (Koçak Farma), sükroz (Himedia), serum fizyolojik (Türktıpsan), laktoz buyyon (Merck), kalsiyum klorür ($CaCl_2$) (Merck), trizma® hidroklorid (Tris-HCl) (Himedia), trizma® base (Tris base) (Merck), tris asetat (Merck), isoamil alkol (Merck), xylene cyanole (Sigma), molecular grade agaroz (Vivantis), etidyum bromid (Amresco), isopropanol (Sigma), etilen diamintetra asetik asit (EDTA) (Merck), deoksi nükleotit three fosfat (dNTP) set (Biodyne), ampisilin sodyum tuzu (Sigma), *Xba*I restriksiyon enzimi (Thermo scientific), 100 bp DNA Ladder (Vivantis), *Taq* DNA polimeraz (Biodyne), tripton (Pronadisa), Mueller Hinton agar (RTA lab), Mueller Hinton broth (Himedia), eosine methylene blue (EMB) agar (RTA Lab), antibiyotik diskleri (Oxoid), pepton (Pronadisa), Simmon' s citrate agar (Or-Bak Lab), borik asit (Merck), oligonükleotit primerler (IDT, İngiltere), D(+) glukoz (Riedel-de Haen), potasyum dihidrojen fosfat ($KH_2PO_4$) (Merck), lizozim (Sigma), proteinaz K (Merck), N-Lauryl sarkozin sodyum tuzu (Sigma), pulsed field sertifikalı agaroz (BioRAD), düşük erime sıcaklıklı agaroz (Lonza) firmalarından sağlandı.

**a.Luria Bertani (LB) Yumuşak Agar (Transport Besiyeri):** Laktoz buyyon üretici firmanın önerisi doğrultusunda tartıldı, içerisine % 0.7 olacak şekilde agar eklendi,

121 ˚C 1 atm basınçta 15-20 dk otoklavlandı, 1 mL olarak ependorflara dağıtıldı ve katılaştırıldı.

**b.Luria Bertani Broth ve Agar:** % 1 tripton, % 0.5 maya özütü % 0.5 NaCl (pH 7.4) distile su ile hazırlandı. Besiyeri pH'sı sodyum hidroksit ile ayarlandı. Sıvı besiyerine istendiğinde % 1.5 agar ilavesi ile LB agar yapıldı ve 121 ˚C 1 atm basınçta 15-20 dk otoklavlandı.

**c.İndol Test Besiyeri**: % 1.5 Polipepton, % 0.5 NaCl, pH 7.1 distile su ile hazırlandı. Bir mL olarak tüplere dağıtılıp otoklavlandı.

**d.Metil kırmızısı/VogesProskauer (MR-VP) Besiyeri**: % 0.7 Polipepton, % 0.5 glukoz, % 0.5 $K_2HPO_4$ (pH 6.9) oranlarında distile su ile hazırlandı. Bir mL olarak tüplere dağıtılıp otoklavlandı.

**e.Minimal Medyum (5X M9 medium)**: % 3 $Na_2HPO_4$, % 1.5 $KH_2PO_4$, % 0.5 $NH_4Cl$, % 0.25 NaCl deiyonize su kullanılarak hazırlandı, otoklavlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

**f.Minimal Agar:** Minimal agar yapmak için (1 L), 800 mL deiyonize su, 15 gr agar ilave edildi ve otoklavlandı. Agar karışımı 45-50 ˚C' ye soğutuldu ve aynı sıcaklığa ayarlanmış 200 mL 5X M9 minimal medyum eklendi ve iyice homojenize etmek için karıştırıldı. Karbon kaynağı olarak % 0.2 (v/v) filtreyle steril edilmiş glukoz solüsyonu ilave edildi. Organizmanın oksotrof olduğu maddelerden filtreyle steril edilmiş amino asit solüsyonlarından 20 µg/mL olacak şekilde ilave edildi. Steril petri plaklarına döküldü ve kullanılana kadar 4 ˚C' de saklandı.

**g.Kovac's Ayıracı**: % 75 isoamil alkol, % 25 konsantre HCl, % 5 *p*-dimetil aminobenzaldehit hazırlandı ve 4˚C' de saklandı.

**h.Metil Kırmızısı Ayıracı**: % 0.02 metil kırmızısı, % 60 etil alkol (%95'lik) oranında deiyonize su ile hazırlandı ve 4 ˚C' de saklandı.

**ı.Voges Proskauer Ayıraçları:** İki ayıraç hazırlandı. İlk ayıraç % 5 α-naphtol, % 100 etil alkol (% 95' lik) oranlarında hazırlandı; ikinci ayıraç olarak % 40 KOH hazırlandı ve 4 ˚C' de saklandı.

**j.Ampisilin:** Üretici firmanın önerisi doğrultusunda konjugasyon deneylerinde kullanmak üzere 25 mg/mL'dan, besiyeri mL'sinde 10µg olacak şekilde hazırlandı.

**k.Rifampisin:** Üretici firmanın (Koçak Farma) önerisi doğrultusunda konjugasyon deneylerinde kullanmak üzere 42 mg/mL'dan besiyeri mL'sinde 150µg olacak şekilde hazırlandı.

**l.Proteinaz K:** İlk olarak Proteinaz K seyreltme tamponu hazırlandı. Proteinaz K seyreltme tamponu: 0,7880 g Tris-HCl ve 0,011 g $CaCl_2$ tartılır ve 80 mL saf suda çözünür. Hacmi 100 mL'lik balon joje ile 100 mL'ye tamamlandıktan sonra otaklavlandı ve 4 $^oC$'de saklandı. Daha sonra Proteinaz K çözeltisi 100 mg proteinaz K tartılıp, 10 mL proteinaz K seyreltme tamponunda çözülerek, 500 µL hacimlerde alikotlandı ve -20 $^oC$'de saklandı.

### 3.1.4. Agaroz Jel Elektroforezi için Solüsyonlar

**a.TAE Elektroforez Tamponu:** 50X konsantre olarak hazırlandı. % 24.2 Tris base, % 5.71 glacial asetik asit, % 3.72 EDTA (pH~8.5) olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. pH ayarlamak için, NaOH peletleri kullanıldı. Çalışma solüsyonu olarak distile veya deiyonize su ile sulandırılarak 1X solüsyon kullanıldı. Çalışma solüsyonunda 40 mM Tris-asetat, 2 mM EDTA içerik sağlanmış oldu.

**b.Etidyum Bromid Solüsyonu:** 10 mg/mL (w/v) stok solüsyon olacak şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlandı. Işık almayan ortamda muhafaza edildi.

**c.10X Orange Red Solüsyonu (Yükleme Tamponu):** 50 mL için; 20g sükroz tartıldı 40 mL $dH_2O$ içerisinde çözüldü. 100mg Orange G çözeltiye eklenerek, çözeltinin hacmi 50mL'ye tamamlandı. Bir filtre yardımı ile steril edildi ve 1'er mL olacak şekilde 1.5mL'lik ependorflara dağıtıldı ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

**d. EDTA (0.5 M):** 73.05 g etilen diamin tetra asetik asit (EDTA, MW: 292.2 g/mol) tartılıp distile su ile 500 mL'ye hazırlandı. Solüsyonun berraklaşması için manyetik çalkalayıcı üstündeki solüsyona NaOH peleti ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Solüsyonun pH'sı 8.0'a ayarlanarak 121 °C'de 1 atm'de 30 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

**e. Tris-HCl (1 M):** Ticari Tris-HCl'den (MW:157.60 g/mol) 78.8 g tartılıp distile su ile 500 mL'ye hazırlandı. Solüsyonun pH'sı HCl ile 7.5'e ayarlandı. Daha sonra 121 °C'de 1 atm'de 30 dk otoklavda steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

**f.TE (Tris/EDTA) Tamponu:** 1 M Tris-HCl solüsyonundan son konsantrasyonu 10 mM Tris-HCl olacak şekilde (5 mL) alındı. 0.5 M EDTA solüsyonundan son

konsantrasyonu 1 mM EDTA olacak şekilde (1 mL) alındı. Ardından distile su ile (494 mL) hacim 500 mL'ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

**g.10X TBE Tamponu:** 108g Tris base ve 55g Borik asit tartıldı, 40 mL 0.5M EDTA pH:8.0 içerisinde çözüldü, toplam hacim $dH_2O$ ile 1 L'ye tamamlandı.

### 3.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu İçin Kullanılan Solüsyonlar

**a.dNTP Karışımı:** Mikrosantrifüj tüplerine 100 mM'lık dATP, dGTP, dCTP, dTTP stoklarından 10'ar µL alınıp 60 µL deiyonize suda çözüldü. Karışım vortekslenerek 10 mM'lık dNTP stok solüsyonu hazırlandı. Hazırlanan karışım steril ependorf tüplere 50 µL'lik hacimler halinde bölündü ve kullanılıncaya kadar -20°C'de saklandı.

**b.Primer Karışımı:** Liyofilize haldeki primerler; üretici firmanın talimatlarına uygun olarak stok konsantrasyonları 100 pmol/µL olacak şekilde TE tamponu ile sulandırılıp stok solüsyonu hazırlandı. Santrifüj tüplerine stok karışımdan her bir primer çifti için 10 µL transfer edildi ve üzerine 90 µL steril enjeksiyonluk su eklenerek son konsantrasyonu 10 pmol/µL olan primer çalışma stoğu hazırlandı. Çalışma stokları kullanılıncaya kadar -20°C'de muhafaza edildi.

### 3.1.6. Pulsed Field Gel Elektroforezi İçin Kullanılan Solüsyonlar

**a.Hücre Süspansiyon Tamponu (HST):** 100mM Tris-HCL, 100mM EDTA pH:8.0 olacak şekilde istenen iktarda hazırlandı ve 4 °C'de muhafaza edildi.

**b.Hücre Liziz Solüsyonu–1 (HLS-1):** 50 mM Tris-HCL (pH 8.0), 50 mM EDTA istenilen miktarda hazırlandı, kullanılacağı anda 2.5 mg/mL lizozim ve 1.5mg/mL proteinaz K eklendi. 4 °C'de muhafaza edildi.

**c.Hücre Liziz Solüsyonu–2 (HLS-2)**: 0.5 M EDTA ve % 1 sarkozil içerecek şekilde istenen miktarda hazırlandı, kullanım esnasında 400 µg/mL proteinaz K eklendi ve 4 °C'de muhafaza edildi.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. Arazi Çalışması

Çalışmada yer alan, *Pelophylax* sp. bireyleri şekil 4'deki haritada gösterilen Doğu Karadeniz Bölgesi'nde yer alan altı ilin (Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin) her biri birbirinden farklı ekolojik koşullara sahip üç istasyondan (yerleşim yeri, ekolojik

habitat ve sanayi bölgesi) örnekleme yapılarak elde edildi. Kurbağaların yakalandıkları illerdeki koordinasyonları şekil 4’ de belirtilmiştir.




**ARTVİN**

Artvin Borçka Karagöl (ekolojik habitat)

42° 23' 07.90" N, 41° 54' 14.74" E

Artvin Hopa Sundura mah. (yerleşim yeri)

41° 22' 51 13" N, 41° 26' 56.62" E

Artvin Hopa Nahşeni mah. (sanayi bölgesi)

41° 23' 08.51" N, 42° 24' 58.22" E

**TRABZON**

Trabzon Beşikdüzü Kurbağalı dere (yerleşim yeri)

41° 02' 55 23" N, 39° 14' 15.34" E

Trabzon Yomra (sanayi bölgesi)

40° 57' 47.61" N, 39° 50' 30.88" E

Trabzon Düzköy yolu, Of (ekolojik habitat)

40° 52' 10.38" N, 40° 16' 41.39" E

**ORDU**

Ordu Fatsa (yerleşim yeri)

41° 02' 50.04" N, 37° 28' 38.03" E

Ordu Turnasuyu deresi (ekolojik habitat)

40° 58' 30.58" N, 37° 59' 54.52" E

Ordu Katı Atık Tesisi (sanayi bölgesi)

40° 57' 28.90" N, 37° 56' 02.81" E

**RİZE**

Rize Yaylacılar köyü dere mevki (yerleşim yeri)

40° 58' 45.15" N, 40° 20' 32.60" E

Rize İkizdere yolu (ekolojik habitat)

40° 53' 30.27" N, 40° 26' 09.45" E

Rize Engindere mah. (sanayi bölgesi)

41° 02' 35.10" N, 40° 34' 55.60" E

**GİRESUN**

Giresun Tirebolu kıyı (yerleşim yeri)

41° 00' 16.52" N, 38° 50' 58.72" E

Giresun Espiye oto sanayi (sanayi bölgesi)

40° 56' 45.33" N, 38° 43' 15.38" E

Giresun Göbel yaylası (ekolojik habitat)

40° 32' 38.68" N, 38° 27' 15.21" E

**SAMSUN**

Samsun Yeniköseli köyü (yerleşim yeri)

41° 13' 59.32" N, 36° 41' 31.35" E

Samsun sanayi (sanayi bölgesi)

41° 14' 26.92" N, 36° 24' 43.36" E

Samsun Kızılırmak Deltası Kuş Cenneti (ekolojik habitat)

41° 40' 12.67" N, 36° 02' 05.82" E

**Şekil 4.** Kurbağaların yakalandığı iller ve koordinatları

10.05.2016 ile 30.07.2017 tarihleri arasında yapılan arazi çalışmasında, kurbağa örneklerinin yakalandığı şehirler, lokasyon numaraları, örneklerin isimlendirilmesi ve örneklendirmenin yapıldığı tarihler tablo 1'de gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Şehir, lokasyon, örneklerin isimlendirmesi ve örneklemenin yapıldığı tarihler

| ŞEHİR | LOKASYON | ÖRNEKLERİN İSİMLENDİRMESİ* | ÖRNEKLEMENİN YAPILDIĞI TARİH |
|---|---|---|---|
| **RiZE** | Rize 1. Lokasyon (yerleşim yeri) | R1A R1B R1C | 13.05.2016 |
| | Rize 2. Lokasyon (ekolojik habitat) | R2A R2B R2C | 13.05.2016 |
| | Rize 3. Lokasyon (sanayi bölgesi) | R3B R3BR3B | 26.07.2017 |
| **TRABZON** | Trabzon 1. Lokasyon (yerleşim yeri) | T1A T1B T1B | 27.07.2017 |
| | Trabzon 2. Lokasyon (sanayi bölgesi) | T2A T2B T2B T2C | 29.10.2017 |
| | Trabzon 3. Lokasyon (ekolojik habitat) | T3C T3CT3C | 29.10.2017 |
| **ARTViN** | Artvin 1. Lokasyon (ekolojik habitat) | A1A A1B A1C A1CR | 28.07.2017 |
| | Artvin 2. Lokasyon (yerleşim yeri) | A2A A2B A2B | 28.07.2017 |
| | Artvin 3. Lokasyon (sanayi bölgesi) | A3B A3B A3C | 28.07.2017 |
| **GiRESUN** | Giresun 1. Lokasyon (yerleşim yeri) | G1A G1B G1C | 25.07.2017 |
| | Giresun 2. Lokasyon (sanayi bölgesi) | G2A G2B G2C | 25.07.2017 |
| | Giresun 3. Lokasyon (ekolojik habitat) | G3AR G3A G3C | 25.07.2017 |
| **ORDU** | Ordu 1. Lokasyon (yerleşim yeri) | O1A O1B O1C | 26.07.2017 |
| | Ordu 2. Lokasyon (ekolojik habitat) | O2A O2B O2C | 26.07.2017 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| | Ordu 3. Lokasyon (sanayi bölgesi) | O3C O3CO3C | 26.07.2017 |
| **SAMSUN** | Samsun 1. Lokasyon (yerleşim yeri) | S1A S1B S1C | 25.07.2017 |
| | Samsun 2. Lokasyon (sanayi bölgesi) | S2A S2B S2C | 25.07.2017 |
| | Samsun 3. Lokasyon (ekolojik habitat) | S3B S3C-S3C-S3C | 26.07.2017 |

*Suşların isimlendirmesi: izolasyon yerinin adı: birinci harf. izolasyon yerinin türü: birinci sayı (1-yerleşim, 2-ekolojik habitat 3-sanayi bölgesi). konakçının cinsiyeti/yaşı: ikinci harf (A- erkek, B-dişi, C-juvenil) ve aynı noktadaki izolatın seri numarası: ikinci numara. R: *Rana* sp. cinsine ait kurbağaları temsil etmektedir.

*Pelophylax* sp. populasyonlarına ait bireyler elle veya atrapla yakalandı. Her bir örnekleme yerinde bulunan *Pelophylax* sp. türlerinin genç (juvenil) , erkek ve dişi bireylerin kloak açıklığından, anüs kısmı saf temiz su ile yıkandıktan sonra, steril nemli, pamuklu ve ince uçlu eküvyonlar vasıtasıyla 1-1.5 cm girilerek sürüntü örneği alındı (Resim 1).



**Resim 1.** *Pelophylax* sp.'den kloakal sürüntü örneğinin alınması (Orijinal Fotoğraf).

Her bir bireyin cinsiyet tayini dış ses kesesinin ve baş parmakta yastık şeklinde çıkıntının olup olmamasına göre belirlendi. Dış ses kesesi ve yastık şeklindeki çıkıntı sadece erkek bireylerde bulunmaktadır. İkincil eşeysel karakterleri göstermeyen ve boyut olarak erginlerden daha küçük olanlar ise juvenil (genç birey) (Resim 2) olarak değerlendirilmiştir.



**Resim 2.** Yakalanmış juvenil *Pelophylax* sp. birey (Orijinal Fotoğraf)

Sonuçta 18 sürüntü örneği bakteriyal izolasyon için kullanıldı. Her bir sürüntü örneğinden üreyen en az üç farklı koloni morfolojisi gösteren ve muhtemel koliform koloniler alınarak çalışmaya dahil edildi. Kloakal sürüntü örneklerinin laboratuvar ortamına taşınmasına kadarki süre için transport besiyeri hazırlandı. Bir buçuk mL'lik ependorf tüpler içerisindeki bu besiyerine sürüntü örneğinin pamuklu kısmı batırılarak bir makas yardımı ile eküvyonun diğer kısmı kesildi ve kapağı kapatıldı, steril bir şekilde örneklerin laboratuvara getirilmesi sağlandı (Bilgehan, 1995).

### 3.2.2. Bakteri İzolasyonu

Oda sıcaklığında laboratuvara transfer edilen kloakal sürüntü örnekleri, laboratuar ortamında önce zenginleştirme ve saklama amaçlı sıvı LB besiyerine ekildi ve bir gece 37 °C'de çalkalamalı olarak inkübasyona bırakıldı. Sıvı kültür örnekleri % 20 gliserollü ortamda -80°C'lik derin dondurucuda daha sonraki bakteriyolojik çalışmalar için stoklandı.

Sıvı örnekler Eosine Methylen Blue (EMB) agar besiyerine tek koloni yöntemiyle ekim yapıldı ve bir gecelik inkübasyon sonunda renkli ve renksiz koloniler muhtemel koliformlar olarak saf kültür elde etmek için, steril kürdan yardımıyla replika olarak temiz bir EMB agar besiyerine ekildi. Kültür besiyerleri 37 °C'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında değerlendirmeye alındı. Koloni morfolojisi, Gram boyama yöntemiyle boyanma özelliği ve biyokimyasal testler (sitratı kullanma testi, üre hidrolizi, Three Sugar Iron (TSI) agar besiyerinde üreme özellikleri, metil kırmızısı testi, Voges Proskauer testi ve indol üretme özelliği) kullanılarak tanımlanması klasik mikrobiyolojik yöntemlerle yapıldı (Bilgehan, 1995). Test sonuçları, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*'de belirtilen biyokimyasal yöntemlere dayalı kriterlere göre değerlendirilerek, enterobakterilerin tür identifikasyonları yapıldı (Brenner, 1986).

On sekiz yaşam ortamı ve her yaşam ortamından üçer kurbağa örneği ve her kurbağadan üçer bakteri izolasyonu yapılarak toplamda 160 suş (iki suş Gram pozitif özellik göstermesi nedeniyle çalışmadan çıkarılmıştır) çalışmaya dahil edildi. Tanımlanan suşlar diğer testleri yapmak üzere % 20 gliserol içeren sıvı LB besiyerinde -20 °C' de ve -80 °C'lik derin dondurucuda stoklandı.

### 3.2.3. Biyokimyasal Testler

**a.İndol Testi:** İndol testi, triptofan amino asitinden indol maddesinin üretildiğinin tespit edilmesi amacıyla yapılır. Bakterinin indol üretimi triptofanaz enzimi ürettiğini gösterir. Triptofanaz enzimi, pridoksal fosfat koenzimi varlığında triptofanı indol, piruvik asit ve amonyağa deamine eder ve böylece Kovac' s ayıracı eklendiğinde aldehit (p-dimetilaminobenzaldehit) ile birleşerek kültürde kırmızı renkli bir kompleks olarak birikir (Yu vd., 1985).

Test edilecek olan mikroorganizmalar EMB agarda saf olarak üretildikten sonra, 1-2 koloni 2 mL indol buyyona ekildi vortekslenerek karıştırıldıktan sonra 35 ˚C' de 18-24 saat inkübe edildi. Kültüre 0.5 mL Kovac' s ayıracı damlatılarak sallandı ve yüzeyde pembe bir halka oluşumu gözlenenler indol pozitif, sarı renk halka ise indol negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak daha önce identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* suşu, negatif kontrol olarak *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 suşu kullanıldı.

**b.Metil Kırmızısı (MR) Testi:** Bu test, glikozun fermentatif metobolize olması sonucu besi yerinde organik asitlerin meydana gelmesi ve pH düşmesini ortaya koymak için yapılır. Glukozun ayrışarak piruvik asite dönüşür. Piruvik asit metabolizması laktik

asit, asetik asit, formik asit ve suksinik asit gibi karışık asitlerin oluşmasını sağlar. Ortam pH'sı yaklaşık 4.4'e düşer. Metil kırmızısı solüsyonu pH 6.0 da sarı renk ve pH 4.4 den aşağıda kırmızı renk gösterir. (Yu vd., 1985).

MR-VP buyyona (500 µL) test yapılacak olan bakteri ekimi yapıldı ve tüpler 35 ˚C' de 18-24 inkubasyona bırakıldı. Kültüre metil kırmızısı solusyonundan 3-4 damla damlatıldı ve iyice karıştırıldı. Kültürün rengi kırmızı kalınca pozitif, sarıya dönünce negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* ATCC25922 suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella pneumoniae* ATCC700603 suşu kullanıldı.

**c.Voges Proskauer (VP) testi:** Bu test, bakterilerin glikozu fermente edilerek, butilen glikol oluşumunun bir ara ürünü olan asetilmetilkarbinol' ü (asetoin) meydana getirme yeteneğini tayinde kullanılır. Asetoin üretim yolunu seçen bakteriler butilen glikol, etanol, asetoin ve organik asit gibi nötral ürünler üretir. Atmosfer ortamında, KOH varlığında, asetoin maddesi kırmızı renkli diasetile oksitlenir. α-naphtol ise bu reaksiyonu hızlandırır (Yu vd., 1985).

MR-VP buyyona (500µl) testi yapılacak bakteriden ilave edildi ve 35 ˚C' de 18-24 saat enkübe edildi. Kültüre 3-4 damla % 40'lık KOH damlatıldı daha sonra 6 damla α-naphtol solüsyonu damlatıldı. Tüpler iyice karıştırıldı ve havaya alması için kapakları açılarak 10-15 dk beklendi. Kırmızı renk oluşumu pozitif, renk oluşumunun olmaması negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* ATCC25922 suşu kullanıldı.

**d.Sitrat Kullanım Testi:** Bu test, bakterilerin besi yerlerine katılan sitratı karbon kaynağı ve amonyum tuzlarını da nitrojen kaynağı olarak kullanabilme yeteneğini saptamada kullanılır. Bakteriler tarafından sitratın ayrışması enzim sistemi tarafından gerçekleştirilir. Organizmada sitratı hücre içine alan enzim olan permeaz ve parçalayan enzim olan sitrat liyaza sahipse Simmons sitrat agarda alkali bir reaksiyon meydana gelir ve besiyerindeki bromtimol mavisi ayıracının yeşil rengi maviye döner (Yu vd., 1985).

Yatık olarak tüplerde Simmons sitrat agar (pH 7.0) hazırlandı ya da hazır besiyerleri (Or-Bak Lab) firmalardan temin edildi. Tüpün yüzey kısmına testi yapılacak bakteri öze yardımı ile yayılarak ekim yapıldı. Fazla miktarda inokülüm yanlış pozitif sonuç verebileceğinden dolayı az sayıda bakteri inoküle edilmesi hususunda dikkat edildi.

Tüp kapağı gevşek şekilde kapatılarak 35 ˚C' de 18-24 saat inkübe edildi. Koyu Prusya mavisi renge dönüşen tüpler pozitif olarak, besiyerinin normal rengi olan yeşil renk değişmemiş ise negatif olarak değerlendirildi. Pozitif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *Klebsiella* spp suşu, negatif kontrol olarak identifikasyonu yapılmış bir *E. coli* ATCC25922 suşu kullanıldı.

**e.Triple Sugar Iron (TSI) Agarda Üreme Özellikleri :** Bu test; TSI agarda, *Enterobacteriaceae* üyelerinin glukoz ve laktoz veya sükrozu fermentatif olarak kullanıp kullanamadığı, hidrojen sülfür ve karbondioksit gazı oluşturup oluşturamadığı incelenmesi amacıyla gerçekleştirildi (Yu vd., 1985).

TSI agar yatık bir şekilde tüplerde hazırlandı ya da hazır TSI agar besiyerine (Or-Bak Lab) kulanıldı. Test edilecek bakteriler TSI agar yüzeyine öze ile ekildi ve iğne öze ile besiyerinin dip kısmına bakteriler inoküle edildi. Tüp kapağı gevşek bir şekilde kapatılarak 35 ˚C' de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda yüzeyin ve dip kısmın kırmızı renkte kalması ve yüzeyin kırmızı renkte kalması dip kısmın sarı renge dönmesi laktoz negatif, yüzeyin ve dip kısmın sarı renkte olması laktoz pozitif olarak değerlendirildi. Besiyeri ile tüpün camı arasındaki hava kabarcıkları karbondioksit gazı üretimi olarak değerlendirildi. Ayrıca besiyerinin renginin siyaha dönmesi ve dip kısma çökmesi $H_2S$ pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

### 3.2.4. VITEK 2 Otomatize Sistemi ile Tanımlama

Biyokimyasal testlerle tanımlama yanında VITEK 2 otomatize sistemi (Biomerieux, Vitek 2) ile tekrar tanımlama yapıldı. Biyokimyasal testler haricinde 160 suşun 154 tanesi VITEK 2 ile tekrar tanımlandı.

### 3.2.5. MALDI-TOF-MS Analizi ile Tanımlama

Yüzaltmış suşta, biyokimyasal tertlerle ve VITEK 2 otomatize tiplendirme sistemi ile tanımlanamayan altı suş, Acıbadem Üniversitesi (İstanbul), Acıbadem Labmed Tıbbi Mikrobiyoloji Laboratuvarı' nda Maldi Biotyper Automation Control and Bruker Biotyper software version 3.4 (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya) cihazında MALDI-TOF-MS analizi ile cins ve tür seviyesinde tanımlandı.

### 3.2.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Deneyleri

Antimikrobiyal duyarlılık deneyleri *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* rehberine uygun olarak standart disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır

(EUCAST, 2016). Trimetoprim/sulfametoksazol (SXT, 1.25 μg/23 μg), streptomisin (S, 300 μg), gentamisin (GN, 10 μg), siprofloksasin (CIP, 5 μg), sulbaktam/ampisilin (SAM, 10/10 μg), imipenem (IMP, 10 μg), ampisilin (AMP, 10 μg), seftazidim (CAZ, 30 μg), sefazolin (CZ, 30 μg), sefuroksim (CXM, 30 μg), tetrasiklin (TE, 10 μg) ve kloramfenikol (C, 30 μg) olmak üzere 12 antibiyotik duyarlılık testlerinde kullanıldı. Bakteriler logaritmik üreme fazına kadar LB buyyonda üretilerek, su veya steril serum fizyolojik ile 0.5 McFarland bulanıklık serisine (% 1.175 $BaCl_2.2H_2O$ çözeltisinden 0.5 mL ile % 1 $H_2SO_4$ çözeltisinden 99.5 mL karıştırılarak hazırlandı) uyacak şekilde sulandırıldı (yaklaşık 1,5 x $10^8$ bakteri/mL). Dört milimetre kalınlığındaki Mueller-Hinton agar (pH 7.2-7.4) besiyeri plakları hazırlandı ve besiyeri yüzeyi kurutuldu. Ucu pamuklu steril bir eküvyon, bulanıklığı ayarlanmış kültüre batırılarak bakteriler Mueller Hinton agar yüzeyine ekildi. Plaklar her defasında döndürülerek agar yüzeyinde ekim yapılmamış yer kalmamasına dikkat edildi, son olarak eküvyon, plağın kenarlarında çepeçevre gezdirilerek ekim işlemi tamamlandı ve agar yüzeyi tekrar kurutuldu. Buzdolabında (4 ºC) saklanan antibiyotik diskleri agar üzerine yerleştirildi, diskler arasında en az 24 mm olmasına dikkat edildi. Yüzelli mm' lik petriler en fazla 12, 100mm' lik plaklara en fazla beş disk yerleştirildi. Diskler yerleştirildikten sonra plakların kapakları alt kısma gelecek şekilde ters çevrilerek, 35-36.5 ºC'de 16-18 saat inkübasyona bırakıldı. İnhibisyon sınırı çıplak gözle görülebilir üremenin bittiği çizgi olarak kabul edildi. İnkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları (mm) bir cetvel yardımı ile ölçülerek bu antibiyotiklere karşı hassasiyetleri EUCAST kriterlerine göre hassas (S), orta hassas (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi (EUCAST, 2016). Direnç sıklığı hesaplamalarında orta hassas izolatlar hassas olarak kabul edildi. Testlerde kalite kontrolü için *Escherichia coli* ATCC25922 suşu kullanıldı.

### 3.2.7. Toplam DNA İzolasyonu

Bakteriler 3-5 mL LB sıvı besiyerine inoküle edildi ve 20 saat 37 ˚C'de sallayıcılı inkübatörde üretildi. Kültürün 1.5 mL'si mikrosantrifüj tüpüne alınarak 13.000 rpm'de 1 dk çöktürüldü. Süpernatant atıldı ve pelet 1 mL deiyonize suda vortekslenerek çözüldü. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Üçüncü kez vorteks yapıldıktan sonra daha önce hücreler 95 ˚C'de 10 dk ısıtılarak lizise uğratıldı. Debris, 4 ˚C'de 13.000 rpm'de 10 dk santrifüjlenerek çöktürüldü. Süpernatant temiz bir mikrosantrifüj tüpüne alınarak alikotlar

halinde PZR'da kalıp DNA kaynağı olarak kullanılmak üzere derin dondurucuda saklandı (Ausubel vd., 1995).

### 3.2.8. PZR ile İntegron Gen Kasetleri ve Direnç Genlerinin Taranması

**a.İntegron Gen Kasetlerinin PZR ile Taranması:** PZR reaksiyonu için suşların kaynatma metodu ile elde edilen DNA'ları kullanıldı. Master mix hazırlama aşamasında bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Bileşenler -20 °C'den çıkartılıp buz üzerinde çözünmeleri sağlandı. PZR toplam 50 µL'lik hacimde hazırlandı, 200 µL'lik PZR tüperinde yapıldı. Her bir primerden 10 pmol, 1X reaksiyon tamponu (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9.0, % 1 Triton-X-100), 0.2 mM her bir deoksinükleotit trifosfat (dNTP; dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 1.5 mM $MgCl_2$ ve 1 U Taq polimeraz kullanılarak reaksiyon karışımı hazırlandı. PZR reaksiyonu için kullanılan primerler Tablo 3' de gösterilmektedir. Her bir PZR tüpüne master mix karışımdan 48 µL ve 2' şer µL kalıp DNA eklendi. Negatif kontrol olarak master mix hazırlanırken kullanılan su, pozitif kontrol olarak *E. coli* KD39 (sınıf 1 integron pozitif, sınıf 1 integron değişken bölge pozitif) (Özgümüş vd. 2009) kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi ve uygun programda (Tablo 3) çalıştırıldı.

**Tablo 2.** PZR reaksiyonunda kullanılan master mix bileşenleri

| **Reaksiyon bileşenleri** | **Stok konsantrasyon** | **Miktar (µL) 1X** |
|---|---|---|
| Buffer | 10X | 5 |
| dNTP mix | 2.5 mM | 1 |
| $MgCl_2$ | 25 mM | 3 |
| Primer 1 | 10 pmol/µL | 0.5 |
| Primer 2 | 10 pmol/µL | 0.5 |
| *Taq* polimeraz | 5 U/µL | 0.2 |
| Steril deiyonize su | | 37.8 |
| Kalıp DNA | | 2 |
| Toplam hacim | | 50 |

**b.Beta Laktamaz ve Diğer Direnç Genlerinin PZR ile Taranması:** Beta laktamaz direnç genlerinin varlığının araştırılması için spesifik PZR ile TEM, SHV ve OXA genlerinin tarandı. Diğer direnç genleri taranırken kendi içerisinde yapılan gruplandırma ile tetrasiklin genleri; *tetA, tetB, tetC, tetD* ve *tetE* genleri tarandı. Kinolon dirençli suşlarda plazmit aracılı kinolon direncinin belirlenmesi için; *qnrA, qnrB, qnrS, qepA, aac(6')-Ib-cr* genleri PZR ile tarandı. Kromozomal kinolon direncinin belirlenmesi için de *gyrA ve parC* genlerinin kısmi PZR ürünlerinin DNA dizi analizleri yapıldı. PZR reaksiyonu için kullanılan primerler tablo 4' te verilmiştir.

**Tablo 3.** Kullanılan oligonükleotit primer dizileri ve amplikon büyüklükleri

| **Primer Adı** | **Gen** | **Primer Dizisi (5' ➔ 3')** | **Ürün Büyüklüğü (bç)** | **Referanslar** |
|---|---|---|---|---|
| IntI1F | *IntI1* integraz | GGTCAAGGATCTGGATTTGG | 500bç | (Machado vd., 2005) |
| IntI1R | | ACATGCGTGTAAATCATCGTC | | |
| IntI2F | *IntI2* integraz | CACGGATATGCGACAAAAAGGT | 740bç | (Machado vd., 2005) |
| IntI2R | | GTAGCAAACGAGTGACGAAATG | | |
| 5'-CS | Sınıf 1 integron değişken bölge | GGCATCCAAGCAGCAAG | Değişken | (Lévesque vd., 1995) |
| 3'-CS | | AAGCAGACTTGACCTGA | | |
| hep51 | Sınıf 2 integron değişken bölge | GATGCCATCGCAAGTACGAG | Değişken | (White vd., 2001) |
| hep74 | | CGGGATCCCGGACGGATGCACGATTTGTA | | |
| TEM-F | $bla_{TEM}$ | ATGAGTATTCAACATTTCCG | 857bç | (Arlet vd., 1995) |
| TEM-R | | CCAATGCTTAATCAGTGAGG | | |
| SHV-F | $bla_{SHV}$ | TTATCTCCCTGTTAGCCACC | 796bç | (Arlet vd., 1997) |
| SHV-R | | GATTTGCTGATTTCGCTCGG | | |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| OXA-F<br>OXA-R | *bla*$_{OXA}$ | ACACAATACATATCAACTTCGC<br>AGTGTGTTTAGAATGGTGATC | 885bç | (Lim vd., 2009) |
| tet(A)-1<br>tet(A)-2 | *tetA* | GTAATTCTGAGCACTGTCGC<br>CTGCCTGGACAACATTGCTT | 917bç | (Guardabassi vd., 2000) |
| tet(B)-1<br>tet(B)-2 | *tetB* | CTCAGTATTCCAAGCCTTTG<br>ACTCCCCTGAGCTTGAGGGG | 396bç | (Guardabassi vd., 2000) |
| tet(C)-1<br>tet(C)-2 | *tetC* | GGTTGAAGGCTCTCAAGGGC<br>CCTCTTGCGGGAATCGTCC | 589bç | (Schmidt vd., 2001) |
| tet(D)-1<br>tet(D)-2 | *tetD* | AAACCATTACGGCATTCTGC<br>GACCGGATACACCATCCATC | 787bç | (Marshall vd., 1983) |
| tet(E)-1<br>tet(E)-2 | *tetE* | AAACCACATCCTCCATACGC<br>AATAGGCCACAACCGTCAG | 278bç | (Marshall vd., 1983) |
| qnrA1<br>qnrA2 | *qnrA* | ATTTCTCACGCCAGGATTTG<br>GATCGGCAAAGGTTAGGTCA | 516bç | (Robicsek vd., 2006) |
| qnrB1<br>qnrB2 | *qnrB* | GGMATHGAAATTCGCCACTG[a]<br>TTTGCYGYYCGCCAGTCGA[a] | 264bç | (Cattoir vd., 2007) |
| qnrS1<br>qnrS2 | *qnrS* | GCAAGTTCATTGAACAGGGT<br>TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG | 428bç | (Cattoir vd., 2007) |
| gyrAWR<br>gyrAWF | *gyrA* | GCCATACCTACGGCGATACC<br>AAATCTGCCCGTGTCGTGGT | 344bç | (Kim vd., 2009) |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| parCWR<br>parCWF | *parC* | GCGAACGATTTCGGATCGTC<br>CTGAATGCCAGCGCCAAATT | 168bç | (Kim vd., 2009) |
| qepAF<br>qepAR | *qepA* | AACTGCTTGAGCCCGTAGAT<br>GTCTACGCCATGGACCTCAC | 596bç | (Kim vd., 2009) |
| accIbR<br>accIbF | *acc(6')-Ib-cr* | CTGGAATGCCTGGCGTGTTT<br>TTGCGATGCTCTATGAGTGGC | 482bç | (Park vd., 2006) |

[a] M: A ya da C. H: A ya da C ya da T. Y: C ya da T.

PZR karışımları 50 µL son hacim olacak şekilde; 1 ünite *Taq* DNA polimeraz I, 2 µL DNA, 5 µL 10X DNA polimeraz tamponu, 3 µL 1.5 mM $MgCl_2$, 2,5 µL 1 mM dNTP mix ve 0.5 µL her bir primer stoğu (10 pmol/µL) ve son hacim steril deiyonize su tamamlanarak hazırlandı. PZR için kullanılan amplifikasyon programları tablo 4' te belirtilmiştir. Amplifikasyon ürünleri % 1.5-2 'lik agaroz jelde yürütüldü ve UV ile görüntülendi.

**Tablo 4.** Polimeraz zincir reaksiyonu amplifikasyon koşulları

| | **Genler**<br><br>**Sıcaklık°C/Süre(dk/sn)/ Döngü** | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Aşama ve Döngü** | *IntI1*<br>*IntI2* | Sınıf 1 integron değişken bölge | Sınıf 2 integron değişken bölge | *bla*$_{TEM}$ | *bla*$_{SHV}$ | *bla*$_{OXA}$ | *tetA* | *tetB* | *tet C,D,E* | *qnr A,B,S* | *parC*<br>*gyrA* | *qepA* | *acc-6-Ib-cr* |
| **İlk denatüras** | 94 (5dk | 94 | 94 | 94 (5d | 94 (5d | 96 (5dk | 94 (3dk | 94 (3dk | 94 (5dk | 95 (10d | 94 (5dk | 96 (1d | 94 (5dk |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **yon** | ) | (2dk) | (3dk) | k) | k) | ) | ) | ) | ) | k) | ) | k) | ) |
| **Denatürasyon** | 94 (1dk ) | 94 (30sn) | 94 (45sn) | 94 (1dk) | 94 (1dk) | 96 (1dk ) | 94 (30sn) | 94 (30sn) | 94 (30sn) | 95 (1dk ) | 94 (40sn) | 96 (1dk) | 94 (1dk ) |
| **Bağlanma** | 57 (1dk ) | 56 (45sn) | 55 (1dk) | 55 (1dk) | 55 (1 dk) | 60 (1dk ) | 58 (1dk ) | 55 (1dk ) | 56 (30sn) | 54 (1dk ) | 54 (40sn) | 60 (1dk) | 54 (1dk ) |
| **Uzama** | 72 (1dk ) | 72 (2dk) | 72 (2dk) | 72 (1dk) | 72 (1dk) | 72 (2dk ) | 72 (1dk ) | 72 (45sn) | 72 (45sn) | 72 (1dk ) | 72 (40sn) | 72 (1dk) | 72 (1dk ) |
| **Son uzama** | 72 (10dk) | 72 (5dk) | 72 (5dk) | 72 (7dk) | 72 (7dk) | 72 (10dk) | 72 (5dk ) | 72 (5dk ) | 72 (7dk ) | 72 (10dk) | 72 (5dk ) | 72 (5dk) | 72 (10dk) |
| **Döngü sayısı** | 34 | 34 | 34 | 34 | 34 | 35 | 34 | 34 | 29 | 35 | 35 | 30 | 30 |

**c.Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme:** Çalışmada PZR ürünlerinin yürütülmesinde % 2 agaroz ve elektrolit olarak Tris EDTA asetik asit tamponu (TAE, pH 8.4) kullanıldı. Jele son konsantrasyonu 0.5 μg/mL olacak şekilde etidyum bromür eklendi. DNA'nın jel üzerinde izlenebilmesi için yükleme tamponu olarak Orange G bileşeni kullanıldı. Örneklerin jelde dağılmaması için ilk etapta jel düşük voltta yürütüldükten sonra elektroforez tankının hızı 80-100 volt aralığına çıkartıldı (Ausubel vd., 1995). Bantların büyüklüklerinin belirlenmesi için moleküler ağırlık standardı 100bp DNA ladder (Vivantis) kullanıldı. Oluşan bantlar UV transilluminatörde gözlendi ve jelin fotoğrafı jel görüntüleme cihazında çekildi ve değerlendirildi.

### 3.2.9. Pulsed Field Jel Elektroforezi (PFGE)

PFGE uygulamasında Durmaz vd. (2007)' nin optimize ettikleri protokol izlendi.

**a.İzolatların Hazırlanması:** Daha önce tür düzeyinde tanımlanmış ve -80 ºC'de stoklanmış yapılmış olan bakteri suşlarının koyun kanlı agar besiyerine tek koloni ekimi

yapıldı. Etüvde 37 ºC'de 20–24 saat koşullarda inkübe edildi. Bir gecelik inkübasyondan sonra saflığı kontrol edilerek tek koloniden tekrar Mueller Hinton agar besiyerine pasaj yapıldı. Bir gece inkübasyona bırakıldı. Saf kültür halinde üreyen koloniler, plastik öze ile toplanarak 2 mL HST içinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu 11.200 rpm'de 4 ºC'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı. Peletin üzerine tekrar 1 mL soğuk HST eklenerek kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre ile 590 nm' de 1 absorbans ayarlandı. Bakteri süspansiyonu kısa süre içinde (5 dakika) agaroza gömülecek ise oda ısısında, gecikecek ise kırık buz içinde bekletildi.

**b.İzolatların Agaroza Gömülmesi:** HST içerisinde % 2'lik düşük erime ısılı agaroz hazırlandı. Hazırlanan agaroz 50ºC'lik ısı bloğuna bekletildi ve % 10' luk SDS'den 1 mL eklenerek pipetajlanarak köpürmemesi için özen gösterilerek karıştırıldı. Agaroz-SDS karışımından 100 µL ependorf tüplere dağıtılırak 50 ºC deki ısı bloğunda bekletildi. Bakteri süspansiyonunda 100 µL alınarak 50 ºC'de tutulan ve içerisinde 100 µL düşük erime ısılı agaroz-SDS bulunan tüpe eklendi. Birkaç defa pipetaj yapıldı. Hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanarak bekletilmeden hücre-agaroz-SDS karışımından hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına 100 µL dağıtıldı. Kalıplar, 4 ºC'de agaroz katılaşıncaya kadar 10 dakika bekletildi. Agaroz kalıpların soğukta tutulması kaliteli DNA hazırlanması için önemlidir, erken parçalanması ve endonükleaz aktivitesi azalır, agarozun homojen katılaşması sağlanır.

**c.Agaroz İçindeki Hücrelerin Parçalanması:** Hücre liziz solusyonu–1 (HLS–1) hazırlandı. Ancak, lizozim ve proteinaz K parçalama tamponunun içerisine kullanım sırasında eklendi. 5 mL'lik steril kapaklı tüplere 0.5 mL HLS–1 konuldu. Agaroz, kalıptan çıkarılarak lizis solusyonuna yerleştirildi. 37 ºC'de 1.5 saat çalkamalı su banyosunda bekletildi. HLS–1 dökülerek yerine hücre liziz solusyonu–2 (HLS–2) konuldu. HLS-1'de olduğu gibi proteinaz K, parçalama tamponu içerisine kullanım sırasında eklendi. 55 ºC'de 2.5 saat çalkamalı su banyosunda bekletildi.

**d.Agaroz Kalıpların Yıkanması:** Tüpler buz içerisinde 15 dakika bekletilerek agaroz kalıbının katılaşması sağlandı. Sonra HLS–2 dikkatlice aspire edildi. Agaroz kalıp bulunan tüpe, 50 °C'ye ısıtılmış olan steril ultra saf sudan 4 mL eklenerek 50 °C çalkamalı su banyosunda 15 dakika bekletildi. Su tamamen aspire edilerek yıkama işlemi iki defa daha tekrarlandı. Daha sonra agaroz kalıpları üç defa (her biri 50 °C'de 15 dakika olmak

üzere) 4 mL TE tamponuyla yıkandı. Yıkama sonrasında agaroz kalıplarının şeffaflaştığı görüldü.

**e.Agaroz Kalıpları İçindeki DNA'nın Restriksiyon Endonükleazlarla Kesilmesi:** Bir lam üzerine alınan agaroz kalıbı bistürü yardımıyla ¼ oranında kesilerek ependorflara konuldu. Parçalardan biri 100 µL 1X XbaI tamponu içerisine konularak çalkamalı su banyosunda 37 °C'de 10 dakika bekletildi. (Diğer parçalar sonraki çalışmalarda kullanılmak üzere 1X TE tamponu içerisinde saklandı). Sonra sıvı aspire edildi.

Her agaroz kalıbı için; 10 µL 10X XbaI tamponu, 3 µl *Xba*I enzimi (20 U/örnek), 87 µL steril saf su toplam hacim 100 µL olacak şeklinde hazırlandı. Süre sonunda enzim tamponu aspire edilerek yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanan enzim karışımından ependorflara konulup çalkamalı su banyosunda 37 ºC'de 2 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda tüpler buzdolabında 15 dakika bekletildi.

**f.Elektroforez Jelinin Hazırlanması ve Kalıpların Jele Yüklenmesi:** 0.5X TBE içinde 100 mL % 1'lik agaroz hazırlandıktan sonra 45–50 ºC'de su banyosunda bekletildi. Agaroz dökülecek kaset hazırlanarak su terazisi ile tamamen düzgün olduğu kontrol edilmiş bir zemine konuldu. On beş dişli tarağın uç kısmına enzimle kesilmiş agaroz kalıplarının her biri yerleştirildi. Tarağın iki kenar ve ortasındaki dişlere kontrol suşuna (*E. coli* ATCC25922) ait kalıplar yüklendi. Sıcaklığı yaklaşık 45–50 ºC olan agaroz, dikkatli bir şekilde hava kabarcığı oluşturulmadan kaset içine döküldü. Oda ısısında katılaşıncaya kadar bekletildi. Tarak dikkatlice çıkarıldı. Sonra agaroz kasetinin çerçeveleri çıkarılarak tabla üzerindeki agaroz, içerisinde 1900–2000 mL 0.5X TBE tamponu bulunan PFGE tankına yerleştirildi.

**g.Elektroforez:** CHEF DR II sisteminde; başlangıç vuruş süresi 5 sn, bitiş vuruş süresi 30 sn, vuruş açısı 120º akım 6V/cm$^2$, sıcaklık 14 ºC, süre 20 saat olacak şekilde elektroforez koşulları belirlendi.

**h.Sonucun Gözlenmesi ve Analizi:** Belirtilen süre sonunda elektroforezden sonra jel, etidyum bromür içeren ultra saf su içine alındı. 20 dakika boyanarak UV ışığı altında görüntülendi DNrBio-Imaging Systems ile DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kaydedildi. BioNumerics (AppliedMaths, Inc., Belçika, 6.01 versiyon) yazılım sistemi kullanılarak bant profilleri analiz edildi. Öncelikle her resimde üç adet bulunan kontrol suşu yardımı ile resimler arası normalizasyon yapıldı. PFGE

profillerinin dendogramı oluşturularak kümeleşme analizi yapıldı. Bantlara bağlı "Dice" benzerlik katsayısına göre suşlar arasındaki ilişki belirlendi. Tenover vd. (1997), tarafından geliştirilmiş kriteler kullanılarak izolatlar aynı, yakın ilişkili, muhtemel ilişkili ve ilişkisiz olarak değerlendirildi.

### 3.2.10. Çift Disk Sinerji Testi (ÇDST) Yöntemi ile GSBL Tayini

Ampisiline dirençli bakterilerde GSBL üretiminin fenotipik taranması için, Jarlier vd. (1988)' in önerileri doğrultusunda ÇDST ile yapıldı. GSBL üretimi test edilecek enterobakteriler materyal ve methodun 3.2.6' sında belirtildiği gibi bulanıklığı 0.5 McFarland olarak ayarlanmış bakteri süspansiyonu Mueller Hinton agar besiyerine ekimi yapıldı. Petrinin merkezine amoksisilin/klavulanik asit (30µg) diski ve bu diskin 25-30mm uzağına seftazidim (30µg) diski yerleştirildi. Agarlar 35 °C'de 18-20 saatlik inkübasyondan sonra değerlendirmeye alındı. Seftazidim diskinin amoksisilin/klavulanik asit diskine doğru belirgin olarak genişlemesi ve üreme olan bölümlerde inhibisyonların görülmesi GSBL üretimi olarak kabul edildi. Gerektiğinde diskler arası mesafe 20-25 mm'ye indirilerek yalancı negatiflik ihtimali bertaraf edildi.

### 3.2.11. Konjugasyon Deneyi

Plazmit DNA'nın konjugasyon ile transfer deneyleri *broth mating* (sıvıda çiftleşme) prensibine dayanılarak, Özgümüş (2001) doktora tezinde kullandığı yöntem doğrultusunda gerçekleştirildi. Deneylerde verici hücre olarak TEM ve SHV genleri içeren bakteri suşları, alıcı hücre olarak rifampisine dirençli *E. coli* K12 J53-2 (met pro $F^-$ $Rif^r$) suşu kullanıldı.

Alıcı ve verici hücrelerden tek koloni alınıp, 3 mL LB broth besiyerine ekildi ve çalkalayıcılı inkübatörde 37 °C'de 18-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda alıcı ve verici hücre süspansiyonundan eşit hacimde (1:1) alınıp, temiz bir tüpte karıştırıldıktan sonra, 35-37 °C'de 24 saat çalkalamadan inkübe edildi. İnkübasyon sonunda transkonjugant karışımları vortekslendi ve seçici besiyerlerine ekimleri yapıldı. Transkonjugantların seçimi için; daha önceden hazırlanmış olan alıcı hücre *E. coli* J53-2'nin dirençli olduğu rifampisin (150 µg/ml), verici hücrenin dirençli olduğu ampisilin (50 µg/mL) eklenmiş EMB agar besiyerlerinin yüzeyine konjugasyon karışımının $10^{-1}$ dilüsyonundan otomatik pipet yardımıyla 100 µL transfer edildi ve steril cam baget ile agar yüzeyine yayılarak 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. Metalik mavi-yeşil röfleli koloniler

fenotipik olarak transkonjugant oldukları düşünülerek, seçici EMB agarlara pasajlandılar. Aynı fenotipte üreyen bakteri kolonileri, 4 farklı içerikteki seçici agarlara replika ekimleri yapıldı:

**Minimal Agar Besiyeri:** Alıcı hücre olan *E. coli* J53-2' nin oksotrof olduğu methionin ve prolin amino asitlerinden sadece birini içeren minimal agar.

**Rifamisin ve Ampisilin İçeren Agar Besiyeri:** 150 µg/mL rifampisin+50 µg/mL ampisilin içeren EMB agar plağı.

**Rifamisin İçeren Agar Besiyeri:** 150 µg/mL rifampisin içeren EMB agar plağı.

**Ampisilin İçeren Agar Besiyeri:** 50 µg/mL ampisilin içeren LB agar plağı.

Minimal agarda üremeyen, 2, 3 ve 4'te üreyen metalik yeşil röfleli kolonilerin transkonjugant olarak kabul edildi. Konjugasyon etkinliğinin hesaplanması için konjugasyon karışımından önce verici hücrelerin canlı bakteri sayımı yapıldı. Bunun için verici hücre kültürlerinin $10^{-1}$'den $10^{-7}$' ye kadar dilüsyonları yapıldı ve $10^{-6}$ ve $10^{-7}$ dilüsyonlardan 100 µL alınıp LB agara yayma ekimleri yapıldı ve 37 °C'de 18-24 saat inkübe edilerek kolonilerin sayımı yapıldı. Canlı bakteri sayısının hesaplanması için "Eşitlik 1" kullanıldı.

*Canlı Bakteri Sayısı (mL'de) = Agardaki Koloni Sayısı / Ekilen Miktar (mL) X Sulandırım Katsayısı*

(Eşitlik1)

İzolatlardaki konjugasyon etkinliğinin belirlenmesi için primer seleksiyon plağında üreyen transkonjugant kolonileri sayıldı, mililitredeki transkonjugant sayısı belirlenerek "Eşitlik 2" yardımı ile konjugasyon etkinliği hesaplandı.

*Konjugasyon Etkinliği = Transkonjugant Sayısı (mL'de) / Verici Hücre Sayısı (mL'de)* (Eşitlik2)

# 4. BULGULAR

## 4.1. *Enterobacteriaceae* İzolatlarının Tür Tayinleri

Tez çalışmasında; yapılan biyokimyasal testler, VITEK 2 ve MALDI-TOF-MS analizleri sonucunda, 162 suşun (iki suş Gram pozitif boyanma özelliği gösterdiği için çalışmadan çıkarıldı); 68' i *Citrobacter*, 25' i *Enterobacter*, 17' si *E. coli*, 14' ü *Raoultella,* 13' ü *Klebsiella*, 4' ü *Aeromonas*, 4' ü *Serratia*, 4' ü *Hafnia*, 3' ü *Kluyvera*, 2' si *Pseudomonas*, 2' si *Sphingomonas*, 1' i *Morganella*, 1' i *Stenotrophomonas*, 1' i *Pantoea,* 1' i *Leclercia* olarak belirlendi. Yapılan biyokimyasal testler haricinde VITEK 2 ile tüm örneklerin tiplendirmesi doğrulandı, altı örneğin tiplendirmesi, VITEK 2 ile yapılamadığından MALDI-TOF-MS analizi ile yapıldı.

**Tablo 5.** Kurbağalardan izole edilen bakterileri türleri ve yüzde oranları

| BAKTERI TÜRLERİ | Sayı (Yüzde) |
|---|---|
| *Citrobacter* spp (*C. freundii, C. braakii, C. amalonaticus*) | 68 (42.5%) |
| *Enterobacter* spp (*E. amnigenus, E. asburiae, E. cloacae complex*) | 25 (15.6%) |
| *Esherichia coli* | 17 (10.6%) |
| *Raoultella* spp (*R. planticola, R. ornithnolytica*) | 14 (8.8%) |
| *Klebsiella* spp (*Klebsiella spp, Klebsiella oxytoca, Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae*) | 13 (8.1%) |
| *Aeromonas* spp (*A. sobria, A. hydrophila, A. veronii*) | 4 (2.5%) |
| *Serratia* spp (*S. fonticola, S. liquefaciens group*) | 4 (2.5%) |
| *Hafnia* (*H. alvei*) | 4 (2.5%) |
| *Kluyvera* (*K. cryocrescens*) | 3 (1.9%) |
| *Pseudomonas* (*P. putida*) | 2 (3.3%) |

| | |
|---|---|
| *Sphingomonas* (*S. paucimobilis*) | 2 (3.3%) |
| *Morganella* (*M. morganii ssp sibonii*) | 1 (0.6%) |
| *Stenotrophomonas* (*S. maltophilia*) | 1 (0.6%) |
| *Pantoea* | 1 (0.6%) |
| *Leclercia* (*L. adecarboxylata*) | 1 (0.6%) |
| | **160 (100%)** |

Kurbağa örneklemesi ve bakteri identifikasyonu sonucunda toplam 160 suş elde edildi. Bu suşlardan 42 tanesi erkekler kurbağalardan, 58 tanesi dişi kurbağalardan ve 60 tanesi de genç (juvenil) kurbağalardan izole edildi.

### 4.2. Antibiyotik Duyarlılık Testi

Antibiyotik duyarlılık testleri yaptıktan sonra, erkek kurbağalardan elde edilen 42 suşun 34'ünün (% 80.9), dişi kurbağalardan elde edilen 58 suşun 41' inin (% 70.6) ve genç kurbağalardan alınan 60 suşun 47' sinin (% 78.3) çoklu ilaca (2 ya da daha fazla ilaca karşı direnç) dirençli olduğunu belirledi.

**Tablo 6.** VITEK 2 ve MALDI-TOF-MS analizleri ile suşların tanımlanması ve antibiyotik duyarlılık test sonuçları

| No | Suş Kodu* | VITEK 2/MALDI-TOF-MS Sonuç Oranlarına Göre Tanımlama** | Antibiyotikler*** | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | SXT 25 | S 300 | GN 10 | CIP 5 | SAM 20 | IMP 10 | AMP 10 | CAZ 30 | CZ 30 | CXM 30 | TE 10 | C 30 |
| **1.** | R1A1 | %87 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| **2.** | R1A2 | %96 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | S | I | R | S | I | S | S | S |
| **3.** | R1A5 | %96 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | S | I | R | R | R | R | S | S |
| **4.** | R1B1 | %95 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | S | I | R | R | R | R | S | S |
| **5.** | R1B2 | %97 *Citrobacter freundii* | S | I | I | S | I | R | R | I | R | S | S | S |
| **6.** | R1B4 | %95 *Citrobacter freundii* | S | I | S | S | R | I | R | R | I | R | S | S |
| **7.** | R1C1 | %95 *Enterobacter amnigenus* | S | S | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S |
| **8.** | R1C2 | %99 *Enterobacter amnigenus* | S | I | S | S | S | I | I | S | R | R | S | S |
| **9.** | R1C3 | %99 *Enterobacter amnigenus* | S | S | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S |
| **10.** | R2B3 | %99 *Citrobacter braakii* | S | S | S | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **11.** | R2C1 | *Citrobacter* ssp. | S | R | S | S | R | I | R | R | R | R | S | S |
| **12.** | R2C2 | *Citrobacter* ssp. | S | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | S |
| **13.** | R2C3 | %95 *Escherichia coli* | S | I | S | S | R | I | R | S | R | R | S | S |
| **14.** | R2A1 | %99 *Citrobacter braakii* | S | I | S | S | S | S | R | I | R | S | S | S |
| **15.** | R2A2 | %99 *Citrobacter braakii* | S | I | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S |
| **16.** | R2A3 | %99 *Citrobacter braakii* | S | S | S | S | S | S | I | S | I | S | S | S |
| **17.** | R3B2 | %99 *Enterobacter asburiae* | S | S | S | S | I | I | R | S | I | S | S | S |
| **18.** | R3B5 | *Enterobacter* ssp. | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| **19.** | R3B6 | *Citrobacter* ssp. | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| **20.** | R3B7 | %95 *Raoultella planticola* | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| **21.** | R3B8 | %97 *Enterobacter cloacae complex* | S | S | S | S | R | I | R | S | S | S | S | S |
| **22.** | R3B9 | %95 *Raoultella ornitnolytica* | S | S | S | S | I | S | R | S | I | S | S | S |
| **23.** | R3B10 | *Enterobacter asburiae* (MALDI-TOF-MS) | S | S | S | S | R | I | R | S | S | S | S | S |
| **24.** | R3B11 | *Enterobacter* ssp. | S | S | S | S | I | I | R | S | S | S | S | S |
| **25.** | R3B12 | %99 *Escherichia coli* | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **26.** | T1A1 | *Citrobacter freundii* (MALDI-TOF-MS) | S | S | S | S | R | R | R | S | S | S | S | S |
| **27.** | T1A2 | *Enterobacter ssp.* | I | I | S | S | R | R | R | S | S | R | S | S |
| **28.** | T1A3 | %98 *Aeromonas sobria* | I | I | S | S | R | R | R | S | S | S | R | S |
| **29.** | T1B1 | %91 *Raoultella ornitnolytica* | S | I | S | S | R | I | R | S | R | R | S | S |
| **30.** | T1B2 | %94 *Serratia fonticola* | S | S | S | S | R | I | R | R | R | S | S | S |
| **31.** | T1B3 | *Citrobacter* ssp | S | R | S | S | S | I | R | S | I | R | S | S |
| **32.** | T1B4 | *Citrobacter* ssp | S | I | S | S | S | I | R | S | I | S | S | S |
| **33.** | T1B5 | *Citrobacter* ssp | S | I | S | S | S | I | R | S | S | S | S | S |
| **34.** | T1B6 | *Citrobacter* ssp | S | I | S | S | S | I | I | S | S | S | S | S |
| **35.** | T2A1 | *Citrobacter* ssp | S | I | S | S | R | I | R | S | I | S | S | S |
| **36.** | T2A2 | *Citrobacter* ssp | S | I | S | S | R | S | R | I | R | R | S | S |
| **37.** | T2A3 | *Citrobacter* ssp | S | S | S | S | S | S | R | R | R | R | S | S |
| **38.** | T2B3 | *Citrobacter* ssp | S | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S |
| **39.** | T2B5 | *Enterobacter asburiae* (MALDI-TOF-MS) | S | I | S | S | R | I | R | R | R | R | S | S |
| **40.** | T2B6 | %95 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | R | I | R | S | R | R | S | S |
| **41.** | T2C1 | %99 *Citrobacter freundii* | S | I | I | S | S | S | R | R | R | S | S | S |
| **42.** | T2C2 | %89 *Citrobacter freundii* | S | R | S | S | R | R | R | I | I | R | S | S |
| **43.** | T2C3 | %95 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | S | I | R | R | R | R | S | S |
| **44.** | T3C1 | %99 *Escherichia coli* | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| **45.** | T3C2 | %99 *Escherichia coli* | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| **46.** | T3C3 | %99 *Escherichia coli* | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| **47.** | T3C4 | %94 *Klebsiella oxytoca* | S | I | S | S | R | I | R | R | R | S | S | S |
| **48.** | T3C5 | %97 *Raoultella planticola* | S | S | S | S | S | S | R | S | R | S | S | S |
| **49.** | T3C6 | %91 *Raoultella planticola* | S | S | S | S | S | I | R | R | R | S | S | S |
| **50.** | T3C7 | %96 *Enterobacter cloacae complex* | S | S | S | S | R | I | R | I | I | R | S | S |
| **51.** | T3C8 | %95 *Raoultella ornitnolytica* | S | I | S | S | R | I | R | S | I | S | S | S |
| **52.** | T3C9 | %95 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | R | I | R | I | R | S | S | S |
| **53.** | A1A1 | %99 *Citrobacter braakii* | S | I | S | S | R | S | R | R | R | S | S | S |
| **54.** | A1A2 | %99 *Citrobacter braakii* | S | I | S | S | R | I | R | R | R | S | S | S |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **55.** | A1A3 | %99 *Klebsiella oxytoca* | S | I | S | S | S | S | R | S | R | S | S | S |
| **56.** | A1B1 | %85 *Klebsiella pneumoniae* | S | I | R | R | S | R | R | R | R | R | S | S |
| **57.** | A1B2 | %97 *Citrobacter freundii* | S | R | R | I | R | R | R | R | R | R | S | S |
| **58.** | A1B3 | %93 *Serratia liquefaciens group* | S | I | I | S | S | I | R | R | R | R | S | S |
| **59.** | A1C1 | %99 *Hafnia alvei* | S | S | S | S | R | S | R | S | R | R | S | S |
| **60.** | A1C2 | %98 *Serratia fonticola* | S | S | S | S | S | S | R | S | R | S | S | S |
| **61.** | A1C3 | %99 *Hafnia alvei* | S | I | S | S | S | R | R | S | I | S | S | S |
| **62.** | A2A1 | *Citrobacter* spp | S | I | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S |
| **63.** | A2A2 | *Citrobacter* spp | S | R | I | S | R | R | R | I | I | S | S | S |
| **64.** | A2A3 | *Citrobacter* spp | S | I | S | S | R | I | R | S | I | S | S | S |
| **65.** | A2B1 | %99 *Citrobacter freundii* | S | I | S | S | S | S | I | I | I | S | S | S |
| **66.** | A2B2 | %99 *Citrobacter freundii* | S | R | S | I | S | S | S | I | I | S | S | S |
| **67.** | A2B3 | %95 *Citrobacter koseri* | S | I | S | R | R | R | R | R | R | S | S | S |
| **68.** | A2B4 | %91 *Klebsiella oxytoca* | S | S | S | S | R | S | R | S | R | S | S | S |
| **69.** | A2B5 | %99 *Enterobacter amnigenus* | S | S | S | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **70.** | A2B6 | %99 *Klebsiella oxytoca* | S | I | S | S | R | S | R | S | I | S | S | S |
| **71.** | A3B1 | *Pseudomonas* spp | R | S | S | S | R | I | R | R | R | R | S | R |
| **72.** | A3B2 | %99 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | R | R | R | S | I | S | S | S |
| **73.** | A3B3 | %87 *Sphingomonas paucimobilis* | S | I | S | I | R | R | R | S | R | R | S | S |
| **74.** | A3B4 | %94 *Kluyvera cryocrescens* | S | I | I | I | S | I | R | S | R | R | S | S |
| **75.** | A3B5 | %99 *Raoultella ornitnolytica* | S | I | I | S | R | R | R | S | R | R | S | S |
| **76.** | A3B6 | %97 *Citrobacter braakii* | S | R | S | S | R | I | R | I | R | S | S | S |
| **77.** | A3C1 | %99 *Citrobacter braakii* | S | R | S | S | S | I | R | S | R | S | S | S |
| **78.** | A3C2 | %98 *Leclercia adecarboxylata* | S | I | S | S | S | I | I | S | I | S | S | S |
| **79.** | A3C3 | %99 *Klebsiella oxytoca* | S | S | S | S | R | I | R | S | I | S | S | S |
| **80.** | G1A1 | %99 *Enterobacter cloacae complex* | S | S | S | S | R | I | R | S | R | S | S | S |
| **81.** | G1A2 | *Citrobacter* spp | S | R | I | S | R | I | R | R | R | R | S | S |
| **82.** | G1A3 | *Enterobacter* ssp | S | S | S | S | R | R | R | S | R | R | S | S |
| **83.** | G1B1 | %98 *Enterobacter cloacae complex* | S | I | S | S | R | R | R | S | R | S | S | S |
| **84.** | G1B2 | %98 *Enterobacter cloacae complex* | S | I | I | S | R | R | R | R | R | R | S | S |
| **85.** | G1B3 | *Enterobacter* ssp | S | S | S | S | R | R | R | R | R | R | S | S |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **86.** | G1C1 | %97 *Citrobacter braakii* | S | S | S | S | R | I | R | S | I | S | S | S |
| **87.** | G1C2 | %95 *Enterobacter cloacae complex* | S | I | I | I | R | R | R | R | R | I | S | S |
| **88.** | G1C3 | %95 *Klebsiella oxytoca* | S | I | I | R | S | I | R | I | R | S | S | S |
| **89.** | G2A1 | %98 *Enterobacter cloacae complex* | S | S | S | S | R | R | R | I | R | R | S | S |
| **90.** | G2A2 | %88 *Enterobacter cloacae complex* | S | S | S | S | R | R | R | S | R | R | S | S |
| **91.** | G2A3 | %91 *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* | S | S | S | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **92.** | G2B1 | %96 *Citrobacter freundii* | S | I | I | S | R | R | R | R | R | R | S | S |
| **93.** | G2B2 | %97 *Citrobacter freundii* | S | R | S | S | R | R | R | I | R | S | S | S |
| **94.** | G2B3 | %97 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | R | I | R | R | R | R | S | S |
| **95.** | G2C1 | %93 *Citrobacter freundii* | S | I | S | S | R | R | R | I | I | S | S | S |
| **96.** | G2C2 | *Citrobacter* spp | S | R | I | S | R | I | R | R | R | S | S | S |
| **97.** | G2C3 | *Citrobacter* spp | S | R | I | S | R | R | R | S | R | S | S | S |
| **98.** | G3A1 | %99 *Citrobacter braakii* | S | I | I | S | S | R | R | I | R | S | S | S |
| **99.** | G3A2 | *Citrobacter braakii* (MALDI-TOF-MS) | S | I | S | I | R | I | R | I | I | S | S | S |
| **100.** | G3A3 | %97 *Citrobacter braakii* | S | I | S | S | R | R | R | R | R | R | S | S |
| **101.** | G3AR1 | %99 *Hafnia alvei* | S | S | S | S | R | I | R | R | R | S | S | S |
| **102.** | G3AR2 | %99 *Hafnia alvei* | S | S | S | S | R | I | R | I | R | R | S | S |
| **103.** | G3AR3 | *Morganella morgani* ssp. *sibonii* | S | I | S | S | R | S | R | I | R | R | R | R |
| **104.** | G3C1 | %93 *Escherichia coli* | S | I | S | S | I | S | R | S | R | S | S | S |
| **105.** | G3C2 | %97 *Escherichia coli* | S | I | S | S | R | I | R | R | R | R | S | S |
| **106.** | G3C3 | %99 *Escherichia coli* | S | I | I | S | R | S | R | S | R | S | S | S |
| **107.** | O1A1 | %96 *Enterobacter cloacae complex* | S | S | S | S | R | R | R | S | R | S | S | S |
| **108.** | O1A2 | %94 *Raoultella ornitnolytica* | S | R | S | S | R | R | R | R | R | S | S | S |
| **109.** | O1A3 | %95 *Raoultella ornitnolytica* | S | I | S | S | S | I | R | S | I | I | S | S |
| **110.** | O1B1 | %92 *Pantoea* sp. | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| **111.** | O1B2 | *Escherichia coli* (MALDI-TOF-MS) | S | S | I | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **112.** | O1B3 | *Escherichia coli* (MALDI-TOF-MS) | S | I | S | S | R | I | R | S | R | S | S | S |
| **113.** | O1C1 | %99 *Raoultella planticola* | R | S | S | S | S | I | R | I | I | S | S | S |
| **114.** | O1C2 | %92 *Kluyvera cryocrscens* | S | I | S | S | S | R | R | I | R | R | S | S |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **115.** | O1C3 | %95 *Raoultella planticola* | S | S | S | S | S | S | R | S | S | S | S | S |
| **116.** | O2A1 | %95 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | S | R | R | S | I | R | S | S |
| **117.** | O2A2 | %95 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | R | R | R | I | R | R | S | S |
| **118.** | O2A3 | %95 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | S | I | R | S | R | S | S | S |
| **119.** | O2B1 | %93 *Klebsiella oxytoca* | R | S | S | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **120.** | O2B2 | %89 *Citrobacter freundii* | S | S | S | S | R | S | R | S | I | S | S | S |
| **121.** | O2B3 | %86 *Citrobacter amalonaticus* | S | S | S | I | R | S | R | S | R | S | S | S |
| **122.** | O2C1 | %94 *Citrobacter freundii* | S | R | I | S | R | I | R | S | I | R | S | S |
| **123.** | O2C2 | %94 *Citrobacter freundii* | S | R | S | S | R | R | R | S | S | S | S | S |
| **124.** | O2C3 | %94 *Citrobacter freundii* | S | R | I | S | R | R | R | S | R | R | S | S |
| **125.** | O3C2 | *Citrobacter* spp | S | R | S | S | R | I | R | S | R | S | S | S |
| **126.** | O3C3 | *Citrobacter* spp | S | I | S | S | R | R | R | S | I | S | S | S |
| **127.** | O3C5 | *Klebsiella* spp | S | I | S | S | S | S | R | S | S | S | R | S |
| **128.** | O3C6 | *Citrobacter* spp | S | I | S | S | R | R | R | R | R | R | S | S |
| **129.** | O3C7 | %99 *Raoultella planticola* | S | S | S | S | S | I | R | S | R | I | S | S |
| **130.** | O3C8 | %94 *Kluyvera cryocrscens* | R | I | S | S | S | S | R | I | R | I | S | S |
| **131.** | O3C9 | *Citrobacter* spp | R | R | S | S | R | R | R | S | I | S | S | S |
| **132.** | O3C10 | %99 *Raoultella planticola* | S | S | S | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **133.** | O3C12 | %97 *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* | S | I | S | S | S | R | R | S | I | S | S | S |
| **134.** | S1A1 | %95 *Citrobacter freundii* | S | I | S | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **135.** | S1A2 | %99 *Citrobacter freundii* | S | I | S | S | S | I | R | S | I | S | S | S |
| **136.** | S1A3 | %99 *Citrobacter freundii* | S | I | S | S | R | I | R | R | R | R | S | S |
| **137.** | S1B1 | %98 *Aeromonas hydrophila/caviae* | S | S | S | S | R | R | R | S | R | R | S | S |
| **138.** | S1B2 | %94 *Aeromonas veronii* | S | S | S | S | R | R | R | S | R | S | S | S |
| **139.** | S1B3 | %93 *Aeromonas veronii* | S | I | S | S | R | R | R | S | R | S | S | S |
| **140.** | S1C1 | %99 *Escherichia coli* | S | I | S | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **141.** | S1C2 | %99 *Escherichia coli* | R | R | S | S | I | I | R | R | R | I | R | S |
| **142.** | S1C3 | %99 *Escherichia coli* | S | I | S | S | S | I | R | S | I | S | S | S |
| **143.** | S2A1 | %99 *Escherichia coli* | S | R | S | I | S | I | I | I | R | I | S | S |
| **144.** | S2A2 | %99 *Escherichia coli* | S | I | S | S | S | R | I | S | R | I | S | S |

| | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **145.** | S2A3 | %89 *Klebsiella pneumoniae ssp. pneumoniae* | S | R | S | I | S | I | R | I | R | I | S | S |
| **146.** | S2B1 | %99 *Enterobacter cloacae complex* | S | I | S | S | R | R | R | S | R | R | S | S |
| **147.** | S2B2 | %85 *Enterobacter cloacae complex* | S | R | S | S | R | R | R | R | R | R | S | S |
| **148.** | S2B3 | %99 *Stenotrophomonas maltophilia* | S | R | R | S | R | R | R | R | R | R | I | S |
| **149.** | S2C1 | %87 *Sphingomonas paucimobilis* | S | R | R | S | R | R | R | R | R | R | I | S |
| **150.** | S2C2 | %99 *Klebsiella oxytoca* | S | I | S | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **151.** | S2C3 | %99 *Klebsiella oxytoca* | S | R | I | S | S | I | R | S | I | S | S | S |
| **152.** | S3B1 | %95 *Escherichia coli* | S | I | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S |
| **153.** | S3B2 | %99 *Pseudomonas putida* | R | I | S | S | R | S | R | I | R | R | S | R |
| **154.** | S3B3 | %95 *Escherichia coli* | S | I | S | S | R | I | R | S | R | R | S | S |
| **155.** | S3C1 | %99 *Enterobacter amnigenus1* | S | S | S | S | S | S | R | S | I | S | S | S |
| **156.** | S3C2 | %91 *Raoultella ornitnolytica* | S | I | S | S | R | I | R | R | R | I | S | S |
| **157.** | S3C3 | %99 *Enterobacter cloacae complex* | S | I | S | S | R | I | R | I | R | S | S | S |
| **158.** | S3C5 | *Citrobacter* spp | S | R | S | S | R | R | R | R | R | R | S | S |
| **159.** | S3C6 | %99 *Serratia liquefaciens group* | S | S | S | S | S | S | I | S | I | I | S | S |
| **160.** | S3C8 | %86 *Citrobacter braakii* | S | R | S | S | R | I | R | S | R | R | S | S |
| | Kontrol | *Escherichia coli* ATCC25922 | S | S | S | S | S | S | I | S | S | S | S | S |

*Suşların kodu; izolasyon yerinin adı: birinci harf. izolasyon yerinin türü: birinci sayı (1-yerleşim, 2-ekolojik habitat 3-sanayi bölgesi). konakçının cinsiyeti/yaşı: ikinci harf (A- erkek, B-dişi, C-juvenil) ve aynı noktadaki izolatın seri numarası: ikinci numara. R: *Rana* sp. cinsine ait kurbağaları temsil etmektedir. **VITEK 2/MALDI-TOF-MS sonuç oranlarına göre tanımlama sütununda yüzde değeri verilmeyen bakteri suşları düşük ayrım nedeniyle cins ismiyle ifade edilmiştir.*** SXT: trimetoprim / sulfametoksazol. S: streptomisin. GN: gentamisin. CIP: siprofloksasin. SAM: sulbaktam / ampisilin. IMP: imipenem. AMP: ampisilin. CAZ: seftazidim. CZ: sefazolin. CXM: sefuroksim.TE: tetrasiklin. C: kloramfenikol.

Bakterilerin identifikasyonu sonucunda en yüksek suş sayısına sahip olan beş gruba (*Citrobacter, Enterobacter, E. coli, Raoultella ve Klebsiella*) ait türlerinin antibiyotiklere direnç oranları belirlenmiştir. Antibiyotik duyarlılık testlerinde, 68 *Citrobacter*' den 1 tanesi trimetoprim/sulfametoksazole dirençli, 21 tanesi streptomisine dirençli, 3 tanesi gentamisine dirençli, 2 tanesi siprofloksasine dirençli, 42 tanesi sulbaktam/ampisiline dirençli, 25 tanesi imipeneme dirençli, 63 tanesi ampisiline dirençli, 23 tanesi seftazidime dirençli, 38 tanesi sefazoline dirençli, 25 tanesi sefuroksime dirençli olarak belirlenmiş, tetrasiklin ve kloramfenikole dirençli olan *Citrobacter* suşu belirlenememiştir. 25 *Enterobacter*' den 1 tanesi streptomisine dirençli, 17 tanesi sulbaktam/ampisiline dirençli, 11 tanesi imipeneme dirençli, 21 tanesi ampisiline dirençli, 5 tanesi seftazidime dirençli, 15 tanesi sefazoline dirençli, 11 tanesi sefuroksime dirençli olarak belirlenmiş, trimetoprim/sulfametoksazol, gentamisin, siprofloksasin, tetrasiklin ve kloramfenikole dirençli olan *Enterobacter* suşu belirlenememiştir. 17 *E.coli*' den 1 tanesi trimetoprim/sulfametoksazole dirençli, 2 tanesi streptomisine dirençli, 5 tanesi sulbaktam/ampisiline dirençli, 1 tanesi imipeneme dirençli, 13 tanesi ampisiline dirençli, 2 tanesi seftazidime dirençli, 9 tanesi sefazoline dirençli, 3 tanesi sefuroksime dirençli, 1 tanesi tetrasikline dirençli olarak belirlenmiş, gentamisin, siprofloksasin, kloramfenikole dirençli olan *E. coli* suşu belirlenememiştir. 14 *Raoultella'* dan 1 tanesi trimetoprim/sulfametoksazole dirençli, 1 tanesi streptomisine dirençli, 5 tanesi sulbaktam/ampisiline dirençli, 2 tanesi imipeneme dirençli, 14 tanesi ampisiline dirençli, 3 tanesi seftazidime dirençli, 7 tanesi sefazoline dirençli, 2 tanesi sefuroksime dirençli olarak belirlenmiş, gentamisin, siprofloksasin, tetrasiklin, kloramfenikole dirençli olan *Roultella* suşu belirlenememiştir. 13 *Klebsiella*' dan 1 tanesi trimetoprim/sulfametoksazole dirençli, 2 tanesi streptomisine dirençli, 1 tanesi siprofloksasine dirençli, 4 tanesi sulbaktam/ampisiline dirençli, 1 tanesi imipeneme dirençli, 12 tanesi ampisiline dirençli, 1 tanesi seftazidime dirençli, 5 tanesi sefazoline dirençli, 1 tanesi sefuroksime, 1 tanesi tetrasikline dirençli olarak belirlenmiş, gentamisin ve kloramfenikole dirençli olan *Klebsiella* suşu belirlenememiştir.

**Tablo 7.** Bakterileri izolatlarının antibiyotiklere direnç oranları

| Bakteri Türleri (n)* | Antibiyotikler** | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | SXT | S | GN | CIP | SAM | IMP | AMP | CAZ | CZ | CXM | TE | C |
| *Citrobacter* spp (68) | 1(1.5%) | 21(30.9%) | 3(4.4%) | 2(2.9%) | 42(61.8%) | 25(36.8%) | 63(92.6%) | 23(33.8%) | 38(55.9%) | 25(36.8%) | 0 | 0 |
| *Enterobacter* spp (25) | 0 | 1(4%) | 0 | 0 | 17(68%) | 11(44%) | 22(88%) | 5(20%) | 15(60%) | 11(44%) | 0 | 0 |
| *Esherichia coli* (17) | 1(5.88%) | 2(11.8%) | 0 | 0 | 5(29.4%) | 1(5.9%) | 13(76.4%) | 2(11.8%) | 9(52.9%) | 3(17.6%) | 1(5.9%) | 0 |
| *Raountella* spp (14) | 1(7.1%) | 1(7.1%) | 0 | 0 | 5(35.7%) | 2(14.3%) | 14(100%) | 3(21.4%) | 7(50%) | 2(14.3%) | 0 | 0 |
| *Klebsiella* spp (13) | 1(7.7%) | 2(15.4%) | 0 | 1(7.7%) | 4(30.7%) | 1(7.7%) | 12(92.3%) | 1(7.7%) | 5(38.5%) | 1(7.7%) | 1(7.7%) | 0 |
| *Aeromonas* spp (4) | 0 | 0 | 0 | 0 | 4(100%) | 4(100%) | 4(100%) | 0 | 3(75%) | 1(25%) | 1(25%) | 0 |
| *Serratia* spp (4) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(25%) | 0 | 3(75%) | 2(50%) | 3(75%) | 1(25%) | 0 | 0 |

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Hafnia* spp (4) | 0 | 0 | 0 | 0 | 4(100%) | 1(25%) | 4(100%) | 1(25%) | 4(100%) | 3(75%) | 0 | 0 |
| *Kluyvera* spp (3) | 1(33.3%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(33.3%) | 3(100%) | 0 | 3(100%) | 2(66.6%) | 0 | 0 |
| *Pseudomonas* spp (2) | 2(100%) | 0 | 0 | 0 | 2(100%) | 0 | 2(100%) | 1(50%) | 2(100%) | 2(100%) | 0 | 2(100%) |
| *Sphingomonas* spp (2) | 0 | 1(50%) | 1(50%) | 0 | 2(100%) | 2(100%) | 2(100%) | 1(50%) | 2(100%) | 2(100%) | 0 | 0 |
| *Morganella* spp (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(100%) | 0 | 1(100%) | 0 | 1(100%) | 1(100%) | 1(100%) | 1(100%) |
| *Stenotrophomonas* spp (1) | 0 | 1(100%) | 1(100%) | 0 | 1(100%) | 1(100%) | 1(100%) | 1(100%) | 1(100%) | 1(100%) | 0 | 0 |
| *Pantoea* spp (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1(100%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| *Leclercia* spp (1) | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

*Suş sayısı. ** SXT: trimetoprim / sulfametoksazol. S: streptomisin. GN: gentamisin. CIP: siprofloksasin. SAM: sulbaktam / ampisilin. IMP: imipenem. AMP: ampisilin. CAZ: seftazidim. CZ: sefazolin. CXM: sefuroksim.TE: tetrasiklin. C: kloramfenikol.

Bakteri izolatlarının bir veya daha fazla antibiyotiğe direnç gösterip göstermediğinin değerlendirmesi yapılmış, hiçbir antibiyotiğe direnci olmayan suşlar, tek bir antibiyotiğe direnç gösteren suşlar, iki antibiyotiğe direnç gösteren suşlar ve üç veya daha fazla antibiyotiğe karşı direnç gösteren suşların oranları belirlenmiştir (Tablo 8).

**Tablo 8.** Tek, iki, üç veya daha fazla antimikrobiyal direnç gösteren bakteri izolatlarının sayısı/oranı

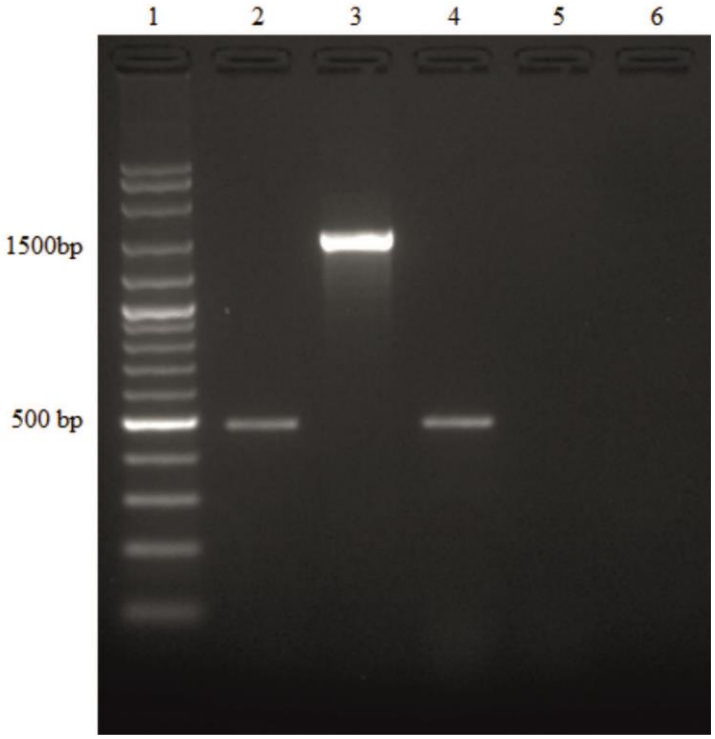
| Bakteri türleri | Antibiyotik Direnci/ n* | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Antibiyotik Direnci Yok | Tek Antibiyotik Direnci | İki Antibiyotik Direnci | Üç veya Daha Fazla Antibiyotik Direnci |
| *Citrobacter* spp | 4/68 | 9/68 | 6/68 | 49/68 |
| *Enterobacter* spp | 1/25 | 6/25 | 3/25 | 15/25 |
| *Escherichia coli* | 2/17 | 6/17 | 3/17 | 6/17 |
| *Raountella* spp | 0/14 | 5/14 | 4/14 | 5/14 |
| *Klebsiella* spp | 0/13 | 2/13 | 6/13 | 5/13 |
| *Aeromonas* spp | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 |
| *Serratia* spp | 1/4 | 0/4 | 1/4 | 2/4 |
| *Hafnia* spp | 0/4 | 0/4 | 0/4 | 4/4 |
| *Kluyvera* spp | 0/3 | 0/3 | 0/3 | 3/3 |
| *Pseudomonas* spp | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 2/2 |
| *Sphingomonas* spp | 0/2 | 0/2 | 0/2 | 2/2 |
| *Morganella* spp | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 |
| *Stenotrophomonas* spp | 0/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 |
| *Pantoea* spp | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 |
| *Leclercia* spp | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 0/1 |
| **Toplam** | **9/160** | **29/160** | **23/160** | **99/160** |

*n: Toplam izolat sayısı

## 4.3. PZR Testleri

### 4.3.1. İntegron Gen Kasetleri

Polimeraz zincir reaksiyonu ile 160 suştan, Samsun ili Yeniköseli köyünde (yerleşim yeri) yakalanan genç bir kurbağadan izole edilen bir *E. coli* suşunda (*E. coli*, S1C2), integraz geni (*intI1*) tespit edildi. Moleküler büyüklüğünün DNA ladder yardımı ile 500bp olduğu görüldü ve DNA dizi analizi gerçekleştirilerek kontrol edildi. Daha sonra değişken bölgenin belirlenmesi için 5'-CS, 3'-CS primerleri ile PZR reaksiyonu gerçekleştirildi ve bu integronun boş bir integron olduğu belirlendi (Şekil 5).




**Şekil 5.** İntegronların agaroz jel elektroforez analizi. 1: 100bp DNA ladder (Vivantis). 2: *E. coli* KD39'da integraz geninin (*intI1*) PZR amplikonu (Özgümüş vd., 2009). 3: *E. coli* KD39'da sınıf 1 integron'un değişken bölgesinin PZR amplikonu (Özgümüş vd., 2009). 4: *E. coli* S1C2'de integraz geninin (*intI1*) PZR amplikonu. 5: *E. coli* S1C2'de sınıf 1 integron' un değişken bölgesine spesifik PZR analizi (amplifikasyon yok). 6: bir integron-negatif kontrol suşunda (*E. coli* ATCC25922) integraz genine spesifik PZR analizi (amplifikasyon yok).

### 4.3.2. Beta Laktam ve Diğer Direnç Genleri

Ampisilin dirençli suşların *bla*$_{TEM}$, *bla*$_{SHV}$ ve *bla*$_{OXA}$ genlerine spesifik PZR reaksiyonları sonucu, sekiz suşta *bla*$_{TEM}$ geni pozitif belirlendi. Bu suşlardan dördü *Citrobacter* (*Citrobacter* spp T1B4 ve T1B5, *Citrobacter freundii* suşu T2C2, *Citrobacter braakii* suşu A1A1), ikisi *E. coli* (T3C2 ve S1C1), biri *Hafnia alvei* (A1C1) ve diğeri *Serratia liquefaciens* (A1B3) dir. Dört suş *bla*$_{SHV}$ geni pozitif belirlendi. Bu suşların dördü de *Citrobacter* türüne aittir (*Citrobacter freundii* R1B1, R1B4 ve T1A1, *Citrobacter* spp O3C3). *bla*$_{OXA}$ pozitif suşa rastlanmadı (Tablo 9).

Tetrasikline dirençli suşlarda *tet* genlerine spesifik PZR ile; dört suştan (*E. coli* suşu S1C2, *Klebsiella* spp O3C5, *Aeromonas sobria* T1A3 ve *Morganella morganii* G3AR3) iki tanesinin (*E. coli* suşu S1C2 ve *Klebsiella* spp O3C5) *tetA* geni taşıdığı belirlendi (Tablo 9).

**Tablo 9.** PZR ile direnç geni tespit edilen suşlar ve antibiyotik direnç fenotipleri

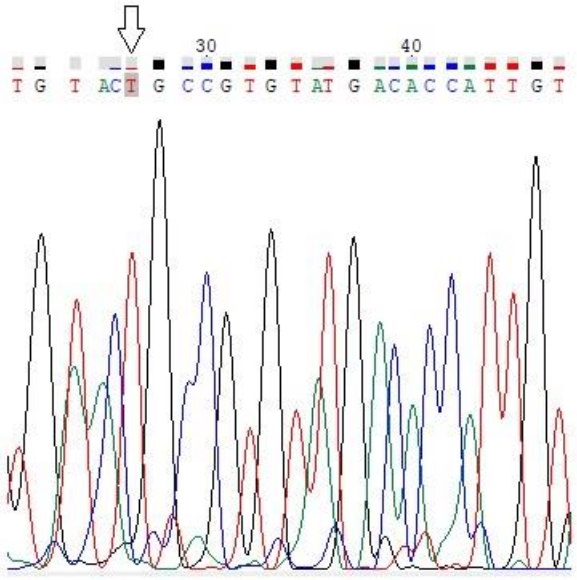
| Bakteri Suşu* | Antibiotik Direnç Fenotipi** | Direnç Geni |
|---|---|---|
| *Citrobacter* spp T1B4 | AMP | *bla*$_{TEM}$ |
| *Citrobacter* spp T1B5 | AMP | *bla*$_{TEM}$ |
| *Citrobacter freundii* T2C2 | S, SAM,IMP,AMP,CXM | *bla*$_{TEM}$ |
| *Esherichia coli* T3C2 | AMP | *bla*$_{TEM}$ |
| *Citrobacter braakii* A1A1 | SAM, AMP,CAZ,CZ | *bla*$_{TEM}$ |
| *Serratia liquefaciens* group A1B3 | AMP, CZ | *bla*$_{TEM}$ |
| *Hafnia alvei* A1C1 | SAM, AMP, CZ, CXM | *bla*$_{TEM}$ |
| *Esherichia coli* S1C1 | AMP | *bla*$_{TEM}$ |
| *Citrobacter freundii* R1B1 | AMP, CAZ, CZ, CXM | *bla*$_{SHV}$ |

| | | |
|---|---|---|
| *Citrobacter freundii* R1B4 | SAM, AMP,CAZ,CXM | *bla*$_{SHV}$ |
| *Citrobacter freundii* T1A1 | SAM,IMP,AMP | *bla*$_{SHV}$ |
| *Citrobacter* spp O3C3 | SAM,IMP,AMP | *bla*$_{SHV}$ |
| *Klebsiella* spp O3C5 | AMP, TE | *tetA* |
| *Esherichia coli* S1C2 | SXT, S, AMP, CAZ, CZ, TE | *tetA* |

*Suş kodu; izolasyon yerinin adı: birinci harf. izolasyon yerinin türü: birinci sayı (1-yerleşim, 2-ekolojik habitat 3-sanayi bölgesi). konakçının cinsiyeti/yaşı: ikinci harf (A-erkek, B-dişi, C-juvenil) ve aynı noktadaki izolatın seri numarası: ikinci numara. R: *Rana* sp. cinsine ait kurbağaları temsil etmektedir.** SXT: trimetoprim / sulfametoksazol. S: streptomisin. GN: gentamisin. CIP: siprofloksasin. SAM: sulbaktam / ampisilin. IMP: imipenem. AMP: ampisilin. CAZ: seftazidim. CZ: sefazolin. CXM: sefuroksim.TE: tetrasiklin. C: kloramfenikol.

Kinolon dirençli üç suşta *gyrA* ve *parC* genleri (Tablo 3) PZR ile çoğaltıldı. Bu genlerdeki mutasyonları belirlemek amacıyla gerçekleştirilen DNA dizi analizi işlemleri sonrasında; *Klebsiella pneumoniae* A1B1 (Artvin ili Borçka Karagöl Gölü'den yakalanan dişi kurbağada izole edildi) *gyrA* genlerinde 83. pozisyondaki serin amino asitinin treonine (Ser83➔Thr) değişimi belirlendi (Şekil 6a, Şekil 5b). Ayrıca *Klebsiella pneumoniae* A1B1 (Artvin ili Borçka Karagöl Gölü'den yakalanan dişi kurbağada izole edildi) ve *K. oxytoca* G1C3 (Giresun ili Tirebolu sahil şeridinde yakalanan genç kurbağadan izole edildi) *parC* genlerinde 84. pozisyondaki glutamik asit amino asitinin valine (Glu84➔Val) değişimi belirlendi (Tablo 10).

**a)**




**b)**

```
CLUSTAL 2.1 multiple sequence alignment

                                                                                247. nt
                         194. nt
                         aatctgcccgtgtcgttggtgacgtaatcggtaaatataccaccctcatggtgatactgccgtgtatgacaccattgtacgtatgg
MW119567                 K  S  A  R  V  V  G  D  V  I  G  K  Y  H  P  H  G  D  T  A  V  Y  D  T  I  V  R  M
                         65. aa                                                 83. aa

                         194. nt                                                247. nt      259. nt
CABEEL010000003          aatcagcccgtgtcgttggtgacgtaatcggtaaatataccacccgcacggcgactccgcggtatacgacaccatcgtgcgtatgg
                         K  S  A  R  V  V  G  D  V  I  G  K  Y  H  P  H  G  D  S  A  V  Y  D  T  I  V  R  M
                         *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  *  :  *  *  *  *  *  *  *  *
                         65. aa                                                 83. aa
```

**Şekil 6.** a) *Klebsiella pneumoniae* A1B1 suşunda *gyr*A genindeki (GenBank no: MW119567) nükleotit değişiminin gözlendiği DNA dizileme kromatogramı. b) *Klebsiella pneumoni* A1B1 *gyrA* (GenBank no: MW119567) ve *K. pneumoniae* NCTC8464 suşunun *gyrA* genlerinin (GenBank no: CABEEL010000003) 248. nükleotitleri ve 83. amino asitlerinin karşılaştırmalı analizi

Bu çalışmada *gyrA* için belirlenen nükleotit sekans verileri, Pubmed / NCBI / GenBank nükleotit sekans veri tabanında (MW119566 ve MW119567) erişim numaraları ile kaydedilmiştir. Kinolona dirençli *Citrobacter koseri* suşunda A2B3 (Artvin ili Hopa Sundura bölgesinde yakalanan bir dişi kurbağadan izole edildi) *gyrA* ve *parC* genlerinde farklı bir mutasyon belirlenememiştir.

**Tablo 10.** Kinolon dirençli suşlarda *gyrA* ve *parC* genlerindeki nükleotit değişimleriyle birlikte kodladığı amino asitlerdeki değişiklikler

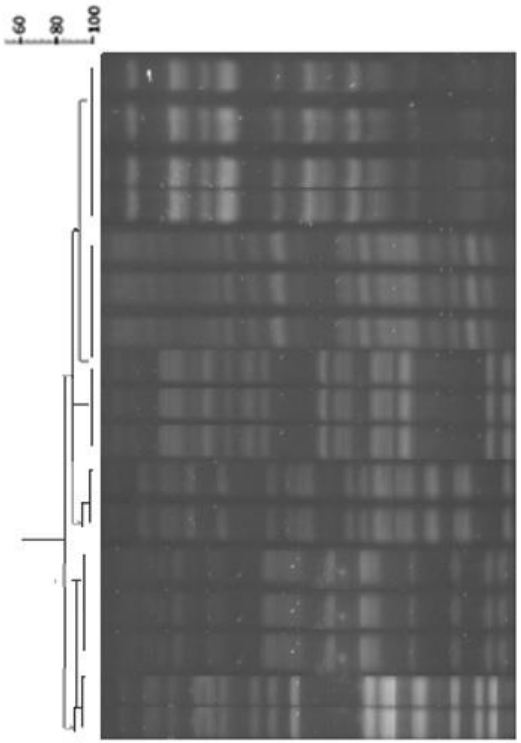
| Bakteri Suşu* | Antibiyotik Direnç Fenotipi** | Nükleotit değişimleriyle gerçekleşen aminoasit değişimleri | |
|---|---|---|---|
| | | *gyrA* | *parC* |
| *Klebsiella pneumoniae* A1B1 | GN, CIP, IMP, AMP, CAZ, CZ, CXM | Ser83→Thr | Glu84→Val |
| *Klebsiella oxytoca* G1C3 | CIP, AMP, CZ | | Glu84→Val |

*Suş kodu; izolasyon yerinin adı: birinci harf. izolasyon yerinin türü: birinci sayı (1-yerleşim, 2-ekolojik habitat 3-sanayi bölgesi). konakçının cinsiyeti/yaşı: ikinci harf (A-erkek, B-dişi, C-juvenil) ve aynı noktadaki izolatın seri numarası: ikinci numara. R: *Rana* sp. cinsine ait kurbağaları temsil etmektedir.** SXT: trimetoprim / sulfametoksazol. S: streptomisin. GN: gentamisin. CIP: siprofloksasin. SAM: sulbaktam / ampisilin. IMP: imipenem. AMP: ampisilin. CAZ: seftazidim. CZ: sefazolin. CXM: sefuroksim.TE: tetrasiklin. C: kloramfenikol.

### 4.4. Pulsed Field Jel Elektroforezi

Yüz altmış suş içerisindeki 17 adet *E. coli* suşunun PFGE metodu ile klonal farklılıkları araştırılmış, toplam 17 suş Tenover kriterlerine göre % 92 ilişkili bulunmuştur. Bu suşlar kendi içerisinde iki küme olup, 1. küme (12 suş) 4 pulsotipe; 2. küme (5 suş) ise 2 pulsotipe ayrılmıştır (Şekil 7).

Birinci kümede 4 ayrı pulsotipe göre; Trabzon ekolojik habitata ait 3 örnek (T3C1, T3C2, T3C3) ve Rize sanayi bölgesine ait örnek (R3B12) yakın ilişkili, Giresun ekolojik habitata ait 2 örnek (G3C1 ve G3C2) ve Samsun sanayi bölgesine ait örnek (S2A2) yakın ilişkili, Rize ekolojik habitata ait örnek (R2C3) ve Ordu yerleşim yerine ait 2 örnek (O1B2 ve O1B3) yakın ilişkili, Samsun sanayi bölgesine ait örnek (S2A1) ve Samsun yerleşim yerine ait örnek (S1C1) yakın ilişkili bulunmuştur. İkinci kümede ise 2 ayrı pulsotipte; Samsun yerleşim yerine ait örnek (S1C2), Samsun ekolojik habitata ait örnek (S3B1) ve Giresun ekolojik habitata ait (G3C3) örnekler yakın ilişkili, Samsun yerleşim yerine ait örnek (S1C3) ve Samsun ekolojik habitata ait örnek S3B3) yakın ilişkili bulunmuştur.




| Suşlar | Antibiyotik direnç profilleri | Örnekleme yeri |
|---|---|---|
| T3C1 | AMP | Trabzon Düzköy way, Of (ekolojik habitat) |
| T3C2 | AMP | Trabzon Düzköy way, Of (ekolojik habitat) |
| T3C3 | AMP | Trabzon Düzköy way, Of (ekolojik habitat) |
| R3B12 | - | Rize Engindere mah. (sanayi bölgesi) |
| G3C1 | SAM, AMP, CAZ, CZ, CXM | Giresun Göbel yaylası (ekolojik habitat) |
| G3C2 | SAM, AMP, CZ | Giresun Göbel yaylası (ekolojik habitat) |
| S2A2 | IMP, CZ | Samsun Sanayi (sanayi bölgesi) |
| R2C3 | SAM, AMP, CZ, CXM | Rize İkizdere yolu (ekolojik habitat) |
| O1B2 | AMP | Ordu Fatsa (yerleşim yeri) |
| O1B3 | SAM, AMP, CZ | Ordu Fatsa (yerleşim yeri) |
| S2A1 | S, CZ | Samsun Sanayi (sanayi bölgesi) |
| S1C1 | AMP | Samsun Yeniköseli köyü (yerleşim yeri) |
| S1C2 | SXT, S, AMP, CAZ, CZ, TE | Samsun Yeniköseli köyü (yerleşim yeri) |
| S3B1 | - | Samsun Kızılırmak Delta Kuş Cenneti (ekolojik habitat) |
| G3C3 | SAM, AMP, CZ | Giresun Göbel yaylası (ekolojik habitat) |
| S1C3 | AMP | Samsun Yeniköseli köyü (yerleşim yeri) |
| S3B3 | SAM, AMP, CZ, CXM | Samsun Kızılırmak Delta Kuş Cenneti (ekolojik habitat) |

**Şekil 7.** *Escherichia coli* suşlarının antibiyotik direnç fenotipleri ve pulsed field jel elektroforezi profilleri. 1. küme (T3C1'den S1C1'e); 1. Pulsotip (dört suş), 2. Pulsotip (üç suş), 3. Pulsotip (üç suş), 4. Pulsotip (iki suş). 2. küme (S1C2'den S3B3'e); 1. Pulsotip (üç suş), 2. Pulsotip (iki suş). *Suşların kodu; izolasyon yerinin adı: birinci harf. izolasyon yerinin türü: birinci sayı (1-yerleşim, 2-ekolojik habitat 3-sanayi bölgesi). konakçının cinsiyeti/yaşı: ikinci harf (A- erkek, B-dişi, C-juvenil) ve aynı noktadaki izolatın seri numarası: ikinci numara. R: *Rana* sp. cinsine ait kurbağaları temsil etmektedir.** SXT: trimetoprim / sulfametoksazol. S: streptomisin. GN: gentamisin. CIP: siprofloksasin. SAM: sulbaktam / ampisilin. IMP: imipenem. AMP: ampisilin. CAZ: seftazidim. CZ: sefazolin. CXM: sefuroksim.TE: tetrasiklin. C: kloramfenikol.

### 4.5. Çift Disk Sinerji Testi

Daha önce antibiyogram sonuçlarında seftazidim dirençli olarak belirlenen 40 suşun GSBL üretimi ÇDST yöntemi ile araştırıldı. Suşlardan hiç birinde GSBL üretimine rastlanmadı.

### 4.6. Konjugasyon Deneyi

Ampisiline dirençli suşlarda TEM-tipi ve SHV-tipi beta laktamaz genleri taşıyan 12 bakteride konjugatif direnç plazmiti varlığının araştırılması için yapılan sıvıda konjugasyon deneyinde konjugatif plazmite rastlanmadı.

# 5. TARTIŞMA

Antibiyotik direnci dünya çapında önemli bir halk sağlığı problemi olmasına rağmen, bu olgu çevreyle ilgili çalışmalarda büyük ölçüde gözden kaçmıştır. Sucul çevrelerin, antropojenik aktivitelerden dolayı antibiyotik direncinin kazanılması ve yayılması açısından ideal çevreler olabileceği öngörülmektedir (Marti vd., 2014). Antibiyotiklerin antibiyotik direncinin uyaranları olarak rol aldığı şimdi eskisinden daha açık bir gerçektir ve bunların hareketli genetik elemanların kazanılmasına katkı sağlayabileceği düşünülmektedir (Rodriguez-Rojaz vd., 2013). Antibiyotik ve diğer kirleticilerin karışımı, dirençli bakteriler ve onların metabolitleri, işlenmiş ve işlenmemiş lağım suları, hastane atıkları, akvakültür atıkları ve tarım deşarjları vasıtasıyla sucul ortamlara ulaşmaktadır. Böylece su ve çökeltilerinin antibiyotik direnç genlerinin transferinde, ekolojisinde ve evriminde direksiyon bir role sahip olduğu düşünülmektedir (Taylor vd., 2011). Çevrenin sadece su ve topraktan değil, aynı zamanda bitkiler, hayvanlar ve onların ilişkili olduğu mikroplardan oluştuğu bilinmektedir. Birçok çalışma antibiyotiklere dirençli bakterilerin yaban domuzu (Poeta vd., 2007), kemirgenler (Poeta vd., 2009) gibi memelilerden, kuşlardan (Gilliver, 1999), balıklardan (Poeta vd., 2008; Bonnedahl vd., 2009) ve böceklerden (Kadavy vd., 2000) soyutlandığını göstermiştir. Bu bakteriler insan atıklarından veya insanla ilişkili materyallere maruz kalarak kazanılabilir veya bu hayvanların normal kommensal flora elemanları da olabilir.

Amfibilerden özellikle kurbağalar su birikintilerinde ve mikroorganizmalarca zengin toprak ve çamur içinde yaşarlar. Hird vd. (1983) kurbağa ve iribaşlardan *E. coli*, *Salmonella, Citrobacter, Klebsiella, Proteus, Aeromonas, Enterobacter, Serratia, Hafnia, Providencia, Morganella* ve *Yersinia* türleri izole etmişlerdir. Mevcut çalışmada 14 farklı tür izole edildi fakat *Salmonella* ve *Proteus* türlerine rastlanmadı. Çalışmada tanımlanan *Citrobacter* (Ferranti vd., 2018), *Enterobacter* (Sheng vd., 2012), *E. coli* (Kaper vd., 2004), *Raoutella* (Chun vd., 2014), *Klebsiella* (Sheng vd., 2012), *Aeromonas* (Spadaro vd., 2014), *Serratia* (Aljorayid vd., 2016), *Hafnia* (Michalski vd., 2015), *Kluyvera* (Koroglu vd., 2010), *Pseudomonas* (Hurley, 2019), *Sphingomonas* (Tai ve Velayuthan, 2014), *Morganella* (Li vd., 2019), *Stenotrophomonas* (Thet vd., 2019), *Pantoea* (Asai vd., 2019) ve *Leclercia* (Anuradha, 2014) türlerinin insan hastalıklarından izole edildiği literatürde gösterilmiştir. Bu tez çalışmasında elde edilen suşların çoğu *Citrobacter* cinsine aitti. Çünkü *Citrobacter* sp. genellikle çevrede bulunur, su kirliğinin göstergesi olarak

potansiyel bir indikatör görevi görür. Ayrıca memeliler, kuşlar, sürüngenler ve amfibiler de dahil olmak üzere hastalıklı hayvanın farklı organlarında bulunabilir (Wang vd., 2000).

Hacıoğlu ve Tosunoğlu (2014) Türkiye'de Kavak Deltası'nda (Çanakkale) yakaladıkları amfibi (semender ve kurbağa) ve sürüngen (kaplumbağa ve yılan) türlerinden *Aeromonas, Plesiomonas, Vibrio, Citrobacter, Enterobacter, E. coli, Klebsiella, Edwardsiella, Hafnia, Proteus, Providencia* ve *Pseudomonas* türleri izole etmişlerdir. Bakteriler %7-46 oranlarında kullanılan antibiyotiklere karşı dirençli bulunmuşlardır. Bu verilerin halk sağlığı mikrobiyolojisi açısından kayda değer olduğu düşünülebilir. Boman (2000) yaptığı çalışmada kurbağalardan nalidiksik asit, rifampisin ve streptomisine dirençli koliform bakteriler izole etmişlerdir. Bu tez çalışmasındaki bakteri türlerinin bir çoğunun ikiden fazla antibiyotik grubuna dirençli olması, yani çoğul direnç fenotipi göstermesinin yanında, seftazidim, imipenem, siprofloksasin, sulbaktam/ampisilin ve gentamisin gibi klinik kullanımda olan antibiyotiklere %1-70 oranında direnç gösterdiğinin tespit edilmesi bulundukları çevrede insan kaynaklı kirliliğin bir göstergesi olabilir.

Antibiyotik duyarlılık deneylerinde sulbaktam ampisilin dirençli suşlardan üç tanesinde TEM geni pozitif olarak belirlenmiştir. İnhibitör direncinin varlığı inhibitör dirençli TEM (IRT) beta laktamaz üretimini akla getirmektedir. Çünkü hastanelerde ve günlük kullanımda klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörü kullanımı ile inhibitör dirençli TEM-tipi enzimlerin ilişkili olduğu görülmüştür ( Chaibi vb., 1999).

Her ne kadar istasyonlarda örnekleme yapılan kurbağalardan izole edilen bakterilerin direnç oranlarının istatistikî bir karşılaştırması yapılmasa da, kurbağa ve iribaşların barsak florasının sucul çevrelerden antimikrobiyal direnç genlerini kazanabileceği belirtilmektedir (McDiarmid and Altig, 1999; Minette, 1984). Bu araştırmacılar doğada, kurbağa ve iribaşların koprofajik (feçes yiyen) olarak yaşadıklarını ve dışkı arttıkça, yiyeceklerin bağırsak kanalında kalarak mikrobiyal sindirimin oluşmasına izin verdiğini belirtmişlerdir.

Bu çalışma için, üç farklı lokasyondaki dişi, erkek ve genç bireylerin kloakal sürüntülerinden bakteri izole edilerek, "homojen" örnekleme elde edilmesi amaçlanmıştır. Antimikrobiyal duyarlılık testleri yapıldıktan sonra, erkek bireylerden elde edilen suşların % 80.9' unun, dişi bireylerden elde edilen suşların % 70.6' sının ve genç bireylerden sağlanan suşların % 78.3' ünün iki veya daha fazla antibiyotik grubuna karşı dirençli

olduğu belirlendi. En yüksek direnç oranı erkeklerden izole edilen suşlardaydı. Bununla birlikte, direnç fenotipleri ve direnç genleri incelendiğinde genç kurbağalardan izole edilen suşların daha fazla direnç geni taşıdığı belirlendi. Bunun nedeninin, kurbağa florasındaki bakterilerin yaşamın erken evresinde çevresel adaptasyon için daha fazla direnç geni taşımaya ihtiyaç gösterirken, kurbağa erişkin forma geldiğinde floranın tam olarak yerleşmesiyle bu genlere ihtiyaç duymayarak genleri yitirmesi olarak düşünülebilir. Bu konunun daha fazla birey ve flora bakterisinin incelenmesiyle genişletilmesi gerektiği kanısına varıldı.

Sınıf 1 integronlar Tn*21* transpozonlarda tespit edilmiştir (Grinsted vd., 1990). Sınıf 2 integronlar Tn*7* transpozon üzerinde yer alır, genellikle dihidrofolat redüktaz (*dhfr*) gen kasetleri taşır ve sırasıyla *dfrA1, sat2* ve *aadA1* gibi trimetoprim, streptomisin ve streptomisin/spectinomisine direnç sağlayan üç klasik gen kaseti taşır (Byrne-Bailey vd., 2011). Cissell (2006) yüksek lisans çalışmasında sığırların erişebileceği göletlerden elde edilen *E. coli*' de düşük prevalansta sınıf 1 integron tespit etmiştir. Bu havuzlarda yakalanan amfibilerden izole edilen *E. coli*' de integron tespit edilmemiştir. Bununla birlikte, sığır içermeyen alanlardan olanlar da dahil olmak üzere, tüm izolatlarda tetrasiklin, kloramfenikol ve sülfizoksazole direnç gösterilmiştir. Bu çalışmadan, *E. coli*' de antibiyotik direncinin büyükbaş hayvan üretim sistemlerinin içindeki ve bitişiğindeki ortamlarda yaygın olduğu sonucuna varmışlar, ancak bu direncin sınıf 1 integronları ile ilişkili olmadığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada bir suşta (*E. coli* S1C2), boş olsa da (antibiyotik direnç gen kasetleri içermeyen) integron varlığının tespit edilmesi; bu bakterilerin çevredeki diğer yakın ve akraba tür bakterilerden antibiyotik direnç genleri yakalayarak çoğul dirençli hale gelme ve bu genetik elemanları kara ve su ekosistemlerinde var olan diğer flora ve çevre orijinli bakterilere de aktarabilme potansiyelinde olduklarını akla getirmektedir.

Farklı *Enterobacteriaceae* türlerinde tetrasikline dirençli genler *tetA* ve/veya *tetB*'nın iyi ifade edildiği ve dolayısıyla tetrasikline direnç sağladığı gösterilmiştir (Özgümüş vd., 2009). Bu çalışmada yapılan PZR sonuçlarıyla iki suşun (*Klebsiella* sp. O3C5 ve *E. coli* S1C2) *tetA* genine sahip olduğu belirlendi. Su kökenli *Enterobacteriaceae* familyasındaki *tet* genlerinin ekspresyonu, tetrasikline karşı yüksek düzeyde dirençle sonuçlanabilir. Daha önceki çalışmalar (Özgümüş vd., 2007), içme suyundan izole edilen tetrasikline dirençli *E. coli* suşlarında *tetA* aracılı tetrasiklin direncinin yaygın olduğunu

göstermiştir. Balık çiftliklerinden izole edilen bakterilerle yapılan başka bir çalışmada, oksitetrasikline dirençli *Yersinia ruckeri* suşlarında *tetA* ve *tetB* genleri belirlenmiştir (Balta vd., 2010). Koliform patojenler, çeşitli antibiyotik gruplarını nötralize etmek için, direnç plazmitlerinin yatay gen transferi ile su ortamlarındaki bakteri popülasyonlarından direnç genleri elde edebildiği rapor edilmektedir (Sandallı vd., 2010). Bu nedenle, su kökenli mikroorganizmalar insanlar için patojenik hale gelip antimikrobiyal tedavinin başarısını engelleyebilir.

Kinolon direnci üç yolla meydana gelir: i) DNA replikasyon hedef enzimlerinde mutasyon (DNA giraz, topoizomeraz IV), ii) plazmit aracılı kinolon direnci (PMQR) (*qnr* gen ailesi), iii) membrana bağlı porin kaybı, ilacın eflüks pompası ile atılması (enzimatik modifikasyon geni *acc- (6 ') - Ib-cr* ve eflüks pompası geni (*qep*A) (Jacoby, 2005; Hopkins vd., 2005). Florokinolon direnci, genellikle DNA giraz ve topoizomeraz IV değişiklikleri ile ilişkilidir. Yapısal topoizomeraz değişiklikleri ile bu enzimin florokinolonlara afinitesinin azalması, *gyrA* ve *parC* genlerinin kinolon direnç belirleme bölgelerindeki (QRDR) mutasyonlardan kaynaklandığı gösterilmiştir (Moon vd., 2010; Ruiz, 2003). Önceki çalışmalar, *gyrA* ve *parC* genlerinde gerçekleşen QRDR mutasyonlarının 248 ve 259/260 nükleotit pozisyonundaki Ser83 ile Asp87 değişimi sonuçlanan *gyrA* mutasyonu ve 238/239 ve 250/251 nükleotit pozisyonundaki Ser80 veya Glu84 değişikliği sonuçlanan *par*C mutasyonu esas olarak florokinolon direncinden sorumlu olduğu bildirilmiştir (Cullen vd., 1989; Villa vd., 1996). Bu çalışmada, üç suşun (Tablo 10) siprofloksasine dirençli olduğu bulundu. Türkiye'nin kuzeyindeki nehirlerden alınan su örnekleriyle yapılan başka bir çalışmada, Türkiye'de çevresel kaynaklı plazmit aracılı kinolon direncinin ilk raporu olan *Klebsiella pneumoniae* suşunda (KD100) *qnrS* geni rapor edilmiştir (Özgümüş vd., 2009). Fakat bu çalışmada *qnr* genine rastlanmadı. Bunun nedeni olarak, kurbağaların yakalandığı çevrelerin antimikrobiyallerle daha az kontamine olduğu düşünülebilir. Bu üç kinolona dirençli suşta, yeni amino asit değişiklikleri belirlenmedi. Bu üç kinolon dirençli suştan bir *Klebsiella* suşunda *(Klebsiella pneumoniae* A1B1) *gyrA* genlerinde 83. pozisyondaki serin amino asitinin treonine değişimi belirlendi (Şekil 6a, Şekil 6b), iki *Klebsiella* suşunda (*Klebsiella pneumoniae* A1B1 ve *K. oxytoca* G1C3) *parC* genlerinde 84. pozisyondaki glutamik asit amino asitinin valine (Glu84➔Val) değişimi belirlendi. Diğer bir suş olan *Citrobacter* suşunda (*Citrobacter koseri* A2B3) *gyrA* ve *parC* genlerinde herhangi bir aminoasit değişikliğine rastlanmadı. Bu suşun g*yrA*'ya göre oranla daha az sıklıkla görülen *gyrB* genindeki mutasyondan kaynaklanan dirence sahip olma

olasılığı vardır. Bu veriler, *gyrA* ve *par*C genlerindeki mutasyonların birikimi ile daha önce bildirilen florokinolonlara dirençteki artışlar arasındaki güçlü korelasyonu desteklemektedir (Webber ve Piddock, 2001).

Su kaynaklarının dışkı ile kirlenmesi, insanların patojenlere maruz kalmasına neden olduğu için önemli bir halk sağlığı sorunudur (Napier vd., 2017). Bu nedenle sular sürekli mikrobiyolojik açıdan izlenmeli ve uygun koruma önlemleri alınmalıdır. Dışkı indikatör bakterileri, çevre sularındaki kirliliği izlemek ve halk sağlığı risklerini belirlemek için kullanılır (Griffith vd., 2009). *Escherichia coli* uzun süredir dışkı kirliliğinin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır (Geldreich, 1966). Bu çalışmada PFGE analizi ile 17 *E. coli* suşu değerlendirildi. Klonal afiniteleri belirlendi ve suşların kaynakları izlendi. Bu analizlerde, her biri birden farklı pulsotipler içeren iki farklı küme tanımlandı. İlk kümede; ilk pulsotip, Trabzon Düzköy yolu (ekolojik habitat) ve Rize Engindere ilçesinde (sanayi bölgesi) kurbağalardan alınan suşları içermektedir; ikinci pulsotip, Giresun Göbel yaylasındaki (ekolojik habitat) ve Samsun sanayisindeki (sanayi bölgesi) kurbağalardan alınan suşları içermektedir; üçüncü pulsotip, Rize İkizdere yolunda (ekolojik habitat) ve Ordu Fatsa'da (yerleşim) kurbağalardan alınan suşları; dördüncü pulsotip, Samsun sanayisindeki (sanayi bölgesi) ve Samsun Yeniköseli köyündeki kurbağalardan alınan suşları içermektedir. İkinci kümede; ilk pulsotip, Samsun Yeniköseli köyü (yerleşim yeri), Samsun Kızılırmak Deltası Kuş Cenneti (ekolojik habitat) ve Giresun Göbel platosundaki (ekolojik habitat) kurbağalardan alınan suşları içermektedir; ikinci pulsotip, Samsun Yeniköseli köyünde (yerleşim yeri) ve Samsun Kızılırmak Deltası Kuş Cenneti'nde (ekolojik habitat) bulunan kurbağalardan alınan suşları içermektedir. PFGE analizine göre, çok farklı kökenlere sahip *E. coli* suşları arasındaki benzerlik oldukça yüksek bulundu. Farklı bölgelerden toplanan örnekler klonal afinite gösterdi. Örneklerin hem toplandıkları şehirlerin farklı olması hem de örnek yeri olarak yerleşim, ekolojik habitat veya sanayi olarak farklı derecelerde insan kirliliğine sahip alanlara ait olmasına rağmen, klonal yakınlık göstermiş olması dikkat çekicidir. Wang vd. (2019) Çin kaplanı kurbağalarından ve tatlısu balıklarından izole ettikleri *Laribacter hongkongensis* suşlarında yüksek düzeyde trimetoprim/sulfametoksazol, tetrasiklin, siprofloksasin, levofloksasin ve streptomisin direnci tespit etmişlerdir ve ayrıca suşların %26'sında sınıf 1 integron varlığı göstermişlerdir. PFGE analizi ile kurbağa ve balık izolatları arasında karşılıklı genotipik ilişki tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, ülkemizde kozmopolit bir tür olarak bilinen *Pelophylax* türünden izole edilen Gram-negatif basillerin (fermentatif ve/veya nonfermentatif) genel olarak antibiyotiklere yüksek oranda dirençli oldukları görüldü. Kurbağalardan elde edilen bakteri türlerinin test edilen antibiyotik gruplarına oldukça dirençli olduğu tespit edilmesine rağmen, konjugatif plazmitler (Örneğin, PMQR) ve/veya integron gen kasetleri (örn. kaset dizileri) bu tür dirençli suşlarda tespit edilmedi. Bu tür bakterilerde antibiyotik direnç gelişimi uzun vadede izlenmeli ve kozmopolit kurbağa türlerindeki mikroflora değişiklikleri ve antimikrobiyallere direnci kodlayan hareketli genetik element içeriği açısından incelenmelidir. Böylece, hayvan mikroflorasındaki mikrobiyal populasyonlardaki evrimsel değişiklikleri ve klinik olarak önemli antimikrobiyallere direnci kodlayan genetik elementler açısından insan mikroflorasıyla etkileşimi takip edilmelidir.

Örneklenen tüm ortamlarda yaşayan erkek, dişi ve genç kurbağa bireylerinde dirençli bakteriler mevcuttur. İndikatör bir tür olan bu kurbağalardaki dirençli bakterilerin varlığının insan kaynaklı kirliliğin önemli bir göstergesi olduğu kanısına varıldı. Bu direnç oranı moleküler temelinde integron gen kasetleriyle paralellik gösterdiği tespit edilmese de bir suşta (*E. coli* S1C2) gösterilmiş olması ve daha önemlisi; genotipik analizlerde birçok *E. coli* (fekal koliform) suşunun farklı yerlerde yaşayan kurbağalardan izole edilmelerine rağmen ilişkili bulunması, belki de direnç ve direncin altında yatan diğer faktörlerin, bakteri türlerinin hayatta kalma yeteneğini arttırdığı; çevrede, özellikle bu suşların generasyonlarının dolaştığı düşünülebilir. Özellikle *E. coli* gibi daha çok insan ve hayvan orijinli fekal koliformların hastalandırıcı özelliklerini kodlayan genler ve filogenetik sınıflamasının daha fazla çalışmayla aydınlatılması gerektiği söylenebilir. Bunun için direncin altta yatan genetik mekanizmalarının, mobil genetik elemanlarının ve bu elemanları taşıyan suşların moleküler epidemiyolojilerinin yapılması ve analiz edilmesi, amfibi örneklemelerinin ülke ve hatta küresel çerçevede yaygınlaştırılarak, sürveyan çalışmaları halinde değerlendirilmesi önerilebilir. Bu çalışmadaki tüm bakteri gruplarının da *E. coli* gibi genotipik yakınlıkların ve hatta potansiyel virülans faktörlerinin belirlenmesi ve yayılma yollarının aydınlatılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu açık bir gerçektir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

**1.** 10.05.2016-30.07.2017 tarihleri arasında Doğu Karadeniz Bölgesindeki 6 ilden (Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin) farklı ekolojik koşullara sahip üç istasyondan (yerleşim yeri, ekolojik habitat ve sanayi bölgesi) örnekleme yapılarak, 162 suş izole edildi, bunların; 68' i *Citrobacter*, 25' i *Enterobacter*, 17' si *E. coli*, 14' ü *Raoultella*, 13' ü *Klebsiella*, 4' ü *Aeromonas*, 4' ü *Serratia*, 4' ü *Hafnia*, 3' ü *Kluyvera*, 2' si *Pseudomonas*, 2' si *Sphingomonas*, 1' i *Morganella*, 1' i *Stenotrophomonas*, 1' i *Pantoea*, 1' i *Leclercia* olarak belirlendi. Kurbağa rektal florasında *Citrobacter* gibi çevre şartlarına daha dirençli bakterinin hakim olduğu, diğer enterik bakterilerin de onu takip ettiği görüldü.

**2.** İzole edilen suşların antimikrobiyal duyarlılık testlerine göre, erkek kurbağalardan elde edilen 42 suşun 34'ünün (% 80,9), dişi kurbağalardan elde edilen 58 suşun 41'inin (% 70,6) ve genç kurbağalardan alınan 60 suşun 47'sinin (% 78,3) çoklu ilaca (2 veya daha fazla antibiyotik grubuna karşı dirençli) dirençli olduğu belirlendi. İnsan kaynaklı kirlenme ile meydana gelen antibiyotik direncinin su ve kara ortamındaki canlıları nasıl etkilediğine dair daha fazla veri elde edilmelidir.

**3.** Antibiyotik direncine neden olan bazı direnç genlerinin integronlar üzerinde olup olmadığı araştırıldı. Samsun ili Yeniköseli köyünde (yerleşim yeri) yakalanan genç bir kurbağadan izole edilen bir *E. coli* suşunda (*E. coli*, S1C2), integraz geni (*intI*) olduğu tespit edildi. İntegron taşıdığı belirlenen bu suşun, integron değişken bölgesinin boş olduğu belirlendi. Boş da olsa integron varlığı direnç genlerinin yakalanarak çevredeki diğer bakterilere aktarabilme potansiyelini göstermektedir.

**4.** Beta laktam dirençli suşların sekizinde *bla*$_{\text{TEM}}$ geni, dört suşta *bla*$_{\text{SHV}}$ geni olduğu belirlendi. Suşlarda *bla*$_{\text{OXA}}$ geni tespit edilmedi.

**5.** Tetrasikline dirençli suşların (n=4) iki tanesinin tet*A* geni taşıdığı belirlendi.

**6.** Kinolon dirençli suşlardan üç suşun her birinde kromozomal mutasyonları belirlemek amacıyla *gyrA* ve *parC* genlerinde kısmi DNA dizi analizi gerçekleştirildi. *Klebsiella pneumoniae* A1B1 (Artvin ili Borçka Karagöl Gölü'den yakalanan dişi kurbağada izole edildi) *gyrA* genlerinde 83. pozisyondaki serin amino asitinin treonine (Ser83➔Thr) değişimi belirlendi. Ayrıca *Klebsiella pneumoniae* A1B1 (Artvin ili Borçka Karagöl Gölü'den yakalanan dişi kurbağada

izole edildi) ve *K. oxytoca* G1C3 (Giresun ili Tirebolu sahil şeridinde yakalanan genç kurbağadan izole edildi) *parC* genlerinde 84. pozisyondaki glutamik asit amino asitinin valine (Glu84➔Val) değişimi belirlendi.

**7.** On yedi *E. coli* suşunun PFGE metodu ile klonal farklılıkları araştırıldı ve % 92 ilişkili bulundu. Bu suşlar kendi içerisinde iki küme olup, 1. küme (12 suş) 4 pulsotipe; 2. küme (5 suş) ise 2 pulsotipe ayrıldı. Su kaynaklarının dışkı ile kirlenmesi halk sağlığı için önem arz etmesi nedeniyle, fekal koliformların klonal benzerlik analizinin halk sağlığı açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

**8.** Seftazidime dirençli 40 suşta GSBL üretimine rastlanmadı.

**9.** TEM ve SHV-tipi beta laktamaz genleri içeren 12 suşta konjugasyon deneyleri ile konjugatif plazmit varlığı tarandı. Bakterilerin hiç birinde konjugatif plazmit belirlenmedi.

**10.** Ülkemizde kozmopolit bir tür olarak bilinen *Pelophylax'* tan izole edilen Gram-negatif basillerin genel olarak antibiyotiklere yüksek oranda dirençli oldukları saptandı. Bu çalışmanın arazi çalışması kısmı genişletilerek sadece Doğu Karadeniz değil tüm Türkiye hatta küresel bir çalışma planlanması yapılabilir. Amfibilerden yapılan örneklemeler ile çevredeki antibiyotik direncini gösteren sürvayan çalışmaları önerilebilir.

**11.** Bu tür örnekleme çalışmaları ile, hayvan mikrobiotasındaki bakteriler uzun vadeli izlenebilir, taşıdıkları direnç genlerindeki değişimler ve hatta potansiyel virülans faktörleri değerlendirilebilir, klinik ve çevrenin etkileşimini aydınlatacak daha geniş çalışmalar planlanarak veriler genişletilebilir.

**12.** Bu tez çalışmasında elde edilen farklı bakteri gruplarına ait suşlarda antibiyotik direnç genleri yanı sıra virülans genleri taraması da yapılarak, insanlarda da hastalıklara neden olabilen bu bakteri türlerinin, "Tek Sağlık" kavramı çerçevesinde çevrede ve insanlar arasındaki yayılma yolları ve hastalığa neden olan faktörleri aydınlatılabilir.

## 7. KAYNAKLAR


Abbasoğlu U, Çevikbaş A (2011). Farmasötik Mikrobiyoloji. 1. baskı. Efil Yayınevi, Ankara; Sayfa: 527-531.

Agostino MD, Cook N (2016). Food Pathogens. Encyclopedia of Food and Health. Reference Module in Food Science, Pages: 83-86.

Agren JA, Clark AG (2018*). Selfish genetic elements.* PLoS genetics. *14*(11): e1007700.

Akkan AG (1997). Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları, İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, İstanbul; Sayfa: 53-62.

Aktuğlu Y (1997). Giriş ve Genel Bilgiler Ed: Aktuğlu Y. Pratikte Antibiyotik Kullanımı. Sempozyum Dizisi No: 1; Sayfa:11-53.

Alder AC, McArdell CS, Golet EM, Ibric S, Molnar E, Nipales NS, Giger W (2001). Occurrence and Fate of Flouroquinolone, Macrolide and Sulfanamide Antibiotics, During Wastewater Treatment and in Ambient Waters in Switzerland. Symposium Series 791, pp. 56–69, American Chemical Society, Washington.

Aljorayid A, Viau R, Castellino L, Jump RLP (2016). *Serratia fonticola*, pathogen or bystander. A case series and review of the literature. ID Cases 5: 6–8.

Aminov, RI (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. Front Microbiol 1:134.

Amphibiaweb. Available from: http://amphibiaweb.org/ . [Accessed 23 September 2021].

Anuradha M (2014). *Leclercia Adecarboxylata* isolation: case report and review. J Clin Diagn Res 8: 12.

Arakawa Y, Murakami M, Suzuki K, Ito H, Wacharotayankun R, Ohsuka S, Kato N, Ohta M (1995). A novel integron-like element carrying the metallo-β-lactamase gene *bla*IMP. Antimicrob Agents Chemother 39: 1612–1615.

Arlet G, Brami G, Decre D, Flippo A, Gaillot O, Lagrange PH, Philippon A (1995). Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM beta-lactamases. FEMS Microb Lett 134: 203-208.

Arlet G, Rouveau M, Philippon A (1997). Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended spectrum beta lactamase. FEMS Microb Lett 152: 163-167.

Asai N, Koizumi Y, Yamada A, Sakanashi D, Watanabe H, Kato H, Shiota A, Hagihara M, Suematsu H, Yamagishi Y, Mikamo H (2019). *Pantoea dispersa* bacteremia in an immunocompetent patient: a case report and review of the literature. J Med Case Rep 13: 33.

Ausubel FM, Brient R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K (1995). Short protocols in molecular biology. 2nd ed. John Willey & Sons, New York, Pages: 2355-2363.

Balcazar JL (2014). Bacteriophages as vehicles for antibiotic resistance genes in the environment. PLoS Pathog. 10(7): 1004219.

Balta F, Sandalli C, Kayis S, Özgümüş OB (2010). Molecular analysis of antimicrobial resistance in *Yersinia ruckeri* strains isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) grown in commercial fish farms in Turkey. Bull Eur Ass Fish Pathol 30: 212.

BanIt NCBI NIH National Library of Medicine National Center for Biotechnology İnformation Submit new sequences to Genbank. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/WebSub/. [Accessed 8 September 2021].

Baran İ, Atatür MK (2021). Türkiye Herpetofaunası (Kurbağa ve Sürüngenler). TC Çevre Bakanlığı, Ankara; Sayfa: 214.

Barlow RS, Gobius KS (2006). Diverse class 2 integrons in bacteria from beef cattle sources. J Antimicrob Chemother 58: 1133-1138.

Başoğlu M, Özeti N, Yılmaz G (1994). Türkiye Amphibileri. Kitaplar Serisi No:151. Fen Fakültesi, Ege Üniversitesi, Bornova, İzmir; Sayfa: 221.

Benavides JA, Godreuil S, Bodenham R, Ratiarison S, Devos C, Petretto MO, Raymond M, Escobar-Páramo P (2012). No evidence for transmission of antibiotic-resistant Escherichia coli strains from humans to wild western lowland gorillas in Lopé National Park, Gabon. Appl Environ Microbiol 78(12): 4281-4287.

Bennett PM (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. Br J Pharmacol 153: 347-357.

Bilgehan H (1992). Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları: *Enterobacteriaceae*. 7th ed. Barış yayınları, İzmir; Sayfa: 1-81.

Bilgehan H (1995). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. 2.baskı. Fakülteler Kitabevi, Barış Yayınları, İzmir; Sayfa: 425-455.

Blaustein AR, Wake DB (1990). Declining amphibian populations: A global phenomenon. Trends Ecol Evol 5(7): 203-204.

Boman HG (2000). Innate immunity and the normal microflora. Immun Rev 173: 5-16.

Bonnedahl J, Drobni M, Clerc MG, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, Melhus A, Kahlmeter G, Waldenstro J, Johansson A, Olsen B (2009). Dissemination of *Escherichia coli* with CTX-M type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the South of France. Plos One 4: 5958.

Boucher Y, Labbate M, Koenig JE, Stokes HW (2007). Integrons: mobilizable platforms that promote genetic diversity in bacteria. Trends Microbiol 15: 301–9.

Brenner DJ (1986). Facultatively anaerobic gram-negative rods *In*: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Krieg NR and Holt JG ed. Williams & Wilkins, Baltimore; vol 1 Pages: 408-516.

Bryne-Bailey KG, Gaze WH, Zhang L, Kay P, Boxall A, Hawkey PM, Wellington EM (2011). Integron prevalence and diversity in manured soil. App Environ Microb 77: 684-687.

Budak A, Göçmen B (2008). Herpetoloji, Ege Üniversitesi Yayınları, Fen Fakültesi, No:194. Sayfa: 34.

Caprioli A, Busani L, Martel JL, Helmuth R (2000). Monitoring of antibiotic resistance in bacteria of animal origin: epidemiological and microbiological methodologies. International J Antimicrob Agents 14(4): 295-301.

Carey C, Bryant J (1995). Possible interrelations among enviromental toxicants, amphibian development, and decline of amphibian populations. Environ Health Perspec 103(4): 13-17.

Carroll D, Wang J, Fanning S, McMahon BJ (2015). Antimicrobial resistance in wildlife: Implications for public health. Zoonoses Public Health. 62: 534-542.

Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P (2007). Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. J Antimicrob Chemother 60: 394–397.

CDC (2020). Antibiotics/Antimicrobial resistance. Available from: https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html. [Accessed 13 October 2021].

Chaibi EB, Sirot D, Paul G, Labia R (1999). Inhibitor resistant TEM β-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characterictics. J Antimicrob Chemother 43: 447-458.

Chun S, Yun JW, Huh HJ, Lee NY (2014). Clinical characteristics of *Raoutella ornithinolytica* bacteremia. Infection 43: 59-64.

Cissell RL (2006). Occurrence of antibiotic resistance in environmental and amphibian *E. coli* isolates associated with cattle and aquatic environments. Master's Thesis, University of Tennessee, Knoxville, USA.

Clark CA, Purins L, Kaewrakon P, Focareta T, Manning PA (2000). The *Vibrio cholerae* O1 chromosomal integron. Microbiol 146:2605–2612.

Clark DP, Pazdernik NJ, MCgehee MR (2019). Plasmids. Moleculer Biology. Third edition. Pages 712-748.

CLUSTALW Multiple Sequence Alignment by Clustalw. Available from: https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw. [Accessed 8 September 2021].

Cole D, Drum DJ, Stalknecht DE, White DG, Lee MD, Ayers S, Sobsey M, Maurer J ( 2005). “Freeliving Canada geese and antimicrobial resistance”, Emerg Infect Dis 11(6): 935-938.

Collis CM, Hall RM (1992). Gene cassettes from the insert region of integrons are excised as covalently closed circles. Mol Microbiol 6: 2875–85.

Copur Cicek A, Özgümüş OB, Saral A, Sandalli C (2014). Antimicrobial Resistance Patterns and Integron Carriage of *Escherichia coli* Isolates Causing Community-Acquired Infections in Turkey. Ann Lab Med 34: 139-144.

Coyne S, Courvalin P, Pe´richon B (2011). Efflux-Mediated Antibiotic Resistance in *Acinetobacter* spp. Antimic Agents and Chemher 55(3): 947-953.

Cullen ME, Wyke AW, Kuroda R, Fisher LM (1989). Cloning and characterization of a DNA gyrase A gene from *Escherichia coli* that confers clinical resistance to 4-quinolones. Antimicrob Agents Chemother 33: 886-94.

Çalık N, Akova M (2007). Tigesiklin. ANKEM Dergisi 21(2): 29-33.

Çiftci Hİ, Aşık G (2011). *Acinetobacter baumannii*'nin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. ANKEM Dergisi 25(3): 196-207.

Dahlberg C, Hermansson M (1995). Abundance of Tn3, Tn21, and Tn501 transposase (tnpA) sequences in bacterial community DNA from marine environments. Appl Environ Microbiol 61: 3051–6.

Dale WJ, Park SF (2004). Moleculer Genetics of Bacteria. 4th edition. University of Surreyi UK. Pages: 141-154.

Daughton CG, Ternes TA (1999). Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change?, Environ Health Perspect 107(56): 907–938.

Deng Y, Bao X, Ji L, Chen L, Liu J, Miao J, Chen D, Bian H, Li Y, Yu G (2015). Resistance integrons: Class 1, 2 and 3 integrons. Ann Clin Microbiol Antimicrob 14: 45.

Dinc MB, Karabiber N, Arca AE (2009). Klinik Örneklerden İzole Edilen Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) İzolatlarında Makrolid-Linkozamid-Streptogramin B Direnci ve Fusidik Asit Duyarlılığı. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi 66(3): 89-94.

Domingues S, Silva GJ, Nielsen KM (2012). Integrons. Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bacteria. Mob Genet Elements 2(5): 211-223.

Drouin F, Melonçon J, Roy PH (2002). The IntI-Like Tyrosine Recombinase of *Shewanella oneidensis* Is Active as an Integron Integrase. J Bacteriol Res 184(6): 1811-5.

Durmaz R, Otlu B, Koksal F (2009). The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii, Escherichia coli* and *Klebsiella* spp Jpn J Infect Dis 62: 372–377.

Durmaz S, Kıraz A, Ozer TT, Perçin D (2014). Macrolide-Lincosamide Streptogramin B Resistance Phenotypes in *Staphylococcus Aureus*. Eur J Gen Med 11(4): 217-220.

Erbay A (2009). Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde Hastaneden Edinilmiş *Acinetobacter baumannii* Bakteriyemilerinde Fatalite Hızı ve İlgili Risk Etmenleri, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi.

Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, Doron S, Stokar-Avihail A, Peleg Y, Melamed S, Leavitt A, Savidor A, Albeck S, Amitai G, Sorek S (2017). Communication between viruses guides lysis–lysogeny decisions. Nature 541: 488-493.

Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D (2015). The Integron: Adaptation on demand. ASM 3(2).

EUCAST (2016). The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 6.0. Available from: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_6.0_Breakpoint_table.pdf. [Accessed 8 September 2021].

Fedesa (2001). Antibiotic Use in Farm Animals does not Threaten Human Health. Press release. Visby, Sweden.

Ferranti M, Cicogna GT, Sattin A, Alaibac M (2018). *Citrobacter freundii* sepsis in an immune suppressed patient with pemphigus vulgaris. BMJ Case Rep 11: 227091.

Fluit AC, Schmitz FJ (2004). Resistance integrons and super-integrons. Clin Microbiol Infect 10: 272–288.

Frost LS (2009). Conjugation, Bacterial. Encyclopedia of Microbiologyi third edition. Sayfa: 517-531.

Geldreich EE (1966). Sanitary significance of faecal coliform in the environment. Federal Water Pollution Control Administration. Water Pollution Control Research Series. Cincinnati, Ohio.

GenomeNet Network of database and computational services for genome research and related research areas in biomedical sciences. Available from: https://www.genome.jp/. [Accessed 8 September 2021].

Gillings MR (2014). Integrons: Past, Present, and Future. MMBR. 78(2): 257-277.

Gillliver MA, Bennet M, Begon M, Hazel SM, Hart CA (1999). Antibiotic resistance found in wild rodents. Nature 401: 233-234.

Gomez-Lus R (1998). Evolution of bacterial resistance to antibiotics during the last three decades. Int Microbiol 1: 279–84.

Gonçalves A, Igrejas G, Radhouani H, Estepa V, Alcaide E, Zorrilla I, Serra R, Torres C, Poeta P (2012). Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of Iberian lynx. Lett App Microbiol 54: 73-77.

Goryshin IY, Miller JA, Kil YV, Lanzov VA (1998). Tn5/IS50 target recognition. Proc Natl Acad Sci USA 95: 10716–21.

Graham JP, Price LB, Evans SL, Graczyk TK (2009). Antibiotic resistant *enterococci* and *staphylococci* isolated from flies collected near confined poultry feeding operations. Sci Total Environ 407: 2701–10.

Griffiths A JF, Miller JH, Suzuki DT (2000). Modern Genetic Analysis, 7th Edition. Freeman WH, New York.

Griffith JF, Cao Y, Mcgee CD, Weisberg SB (2009). Evaluation of rapid methods and novel indicators for assessing microbiological beach water quality. Water Res 43: 4900–4907.

Grinsted JF, Cruz DL, Schmitt R (1990). The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. Plasmid 24: 163-189.

Guardabassi L, Dijkshoorn, L, Collard JM, Olsen J E, Dalsgaard A (2000). Distribution and in-vitro transfer of tetracycline resistance determinants in clinical and aquatic *Acinetobacter* strains. J Med Microbiol 49: 929–36.

Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. J Antimic Chemother 52: 489-492.

Gülbudak H, Aslan G, Tezcan S, Ersöz G, Ülger M, Otağ F (2014). Hastane Enfeksiyonu Etkeni Olan *Acinetobacter baumannii* İzolatları Arasındaki Klonal İlişkinin Rep-PCR ile Araştırılması. Mikrobiyol Bul 48(2): 316-24.

Hacioglu N, Tosunoglu M (2014). Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species. Environ Monit Assess 86: 407–413.

Hall RM, Collis CM, Kim MJ, Partridge SR, Recchia GD, Stokes HW (1999). Mobile gene cassettes and integrons in evolution. Ann N Y Acad Sci 870: 68–80.

Halling-Sorensen B, Nors Nielsen S, Lanzky PF, Ingerslev F, Holten Lützhoft HC and Jorgensen SE (1998). Occurence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environmentA review, Chemosphere 36(2): 357-393.

Harbottle H, Thakur S, Zhao S, White DG (2006). Genetics of antimicrobial resistance. Animal Biotechnology 17: 111-124.

Hart CA, Kariuki S (1998). Antimicrobial Resistance in Developing Countries. BMJ 317: 647-650.

Hecnar SJ (1995). Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from Southern Ontorio. Environ Toxicol Chem 14(12): 2131-2137.

Hird DW, Diesch SL, McKinnell RG, Gorham E, Martin FB, Meadows CA, Gasiorowski M (1983). *Enterobacteriaceae* and *Aeromonas hydrophila* in Minnesota frogs and tadpoles (*Rana pipiens*). Appl Enviro Microbiol 46: 1423-1425.

Hopkins KL, Davies RH, Threlfall EJ (2005). Mechanisms of quinolones resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella*: Recent developments. Int J Antimicrob Agents 25: 358-373.

Hosoglu S, Esen S, Ozturk, R, Altındis M, Ertek M, Kaygusuz S, Caylan R, Demirdag K, Sencan I, Ertem GT, Aslan S, Bosnak V, Aygun P, Erol S, Celen MK (2005). The effect of a restriction policy on the antibiotic consumption in Turkey: a country-wide study. Eur J Clin Pharmacol 61: 727-731.

Houlahan JE, Findlay CS (2000). Quantitative evidence for global amphibian populations declines. Nat 404: 752-755.

Hurley JC (2019). Worldwide variation in Pseudomonas associated ventilator associated pneumonia. A meta-regression. J Crit Care 51: 88-93.

Işık Y (2008). *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinde Kinolon Direncinin Moleküler Olarak Saptanması, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.

Iyer A, Barbour E, Azhar E, Salabi AAE (2013). Transposable elements in *Escherichia coli* antimicrobial resistance. Adv Biosci Biotechnol 4: 415–23.

Jacoby GA (2005). Mechanisms of resistance to quinolones. Clin Infec Dis 41: 120-126.

Jahansson C (1999). Bakterlerin sınıflandırılması. Ustaçelebi Ş (Ed.), Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. 1st Ed. Güneş Kitabevi, Ankara, Sayfa: 23-33.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A (1988). Extended broad- spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer *ß*-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis 10: 867-878.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS (1994). Virulence of *Enterococci*. Clin Microbiol Rev 7(4): 462-478.

Jove T, Re S, Tabesse A, Sow AG (2017). Gene expression in class 2 integrons is SOS independent and involves in two Pc promoters. Front Microbiol 8: 1499.

Kadavy DR, Hornby JM, Haverkost T, Nickerson KW (2000). Natural antibiotic resistance of bacteria isolated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei*. Appl Environ Microbiol 66: 4615– 4619.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol 2: 123- 480.

Kargar M, Mohammadalipour Z, Doosti A, Lorzadeh S, Japoni-Nejad A (2014). High Prevalence of Class 1 to 3 Integrons Among Multidrug-Resistant Diarrheagenic *Escherichia coli* in Southwest of Iran. Osong Public Health Res Perspect 5(4): 193-198.

Kaushik M, Kumar S, Kapoor RJ, Virdi JS, Gulati P (2017). Integrons in *Enterobacteriaceae*: diversity, distribution and epidemiology. Int J Antimicrob Agents 51(2):167-176.

Kemper N (2008). Veterinary Antibiotics in the Aquatic and Terrestrial Environment. Ecol Indic 8: 1-13.

Keyik Ş (2013). *Acinetobacter baumannii* Suşlarında OXA–23 ve OXA–58 Tipi Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması ve PFGE Yöntemiyle Klonal Yakınlığının İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya.

Kim HB, Park CH, Kim CJ, Kim EC, Jacoby GA, Hooper DC (2009). Prevalence of plasmid mediated quinolone resistance determinants over a 9-year period. Antimicrob Agents Chemother 53: 639–645.

Koroglu OA, Yalaz M, Ozalkaya E, Polar DC, Akisu M, Kultursay N (2010). *Kluyvera cryocrescens* sepsis in preterm infant. Jpn J Infect Dis 63: 195-196.

Kulis J, McQuillan D, Chapman T, Mawhinney D, Meyerhein R (2003). Antibotics in New Mexico wastewater and ground water, Reporting Status or Progress, New Mexico.

Kümmerer K (2009). Antibiotics in the aquatic environment. A Review Part I. Chemosphere 75: 417-434.

Kümmerer K (2010). Pharmaceuticals in the environment. Annu Rev Environ Resour 35: 57–75.

Lambert AP (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. Adv Drug Deliv Rev 57: 1471-1485.

Lévesque C, Piche L, Larose C, Roy PH (1995). PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes, Antimicrob Agents Chemother 39: 185-191.

Li D, Gao W, Niu Y, Zhao P, Zheng W, Li CJ (2019). Infection of finger caused by *Morganella morganii* leading to digital amputation. Medicine 98: 14002.

Liebert CA, Hall RM, Summers AO (1999). Transposon Tn21, flagship of the floating genome. Microbiol Mol Biol Rev 63: 507–22.

Lim KT, Yasin R, Yeo CC, Puthucheary S, Thong KL (2009). Characterization of multidrug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from hospitals in Malaysia. J Biomed Biotechnol 2009: 165637.

Lips KR (1998). Decline of a tropical montane amphibian fauna. Conserv Biol 12(1): 106-112.

Machado E, Canto R, Baquero F, Gala JC, Rolla A, Peixe L, Coque TM (2005). Integron content of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain. Antimicrob Agents Chemother 49: 1823-1829.

Mahaney PA (1994): Effects of fresh water petroleum contamination on amphibian hatching and metamorphosis. Environ Toxicol Chem 13: 259-235.

Manning M, Horton J (1982). RES structure and function of the amphibia. Cohens N. ed. Phylogeny and Ontogeny. Plenum press. Newyork. Pages:423-459.

Marshall B, Tachibana C, Levy SB (1983). Frequency of tetracycline resistance determinant classes among lactose fermenting coliforms. Antimicrob Agents Chemother 24: 835–840.

Marti E, Variatza E, Balcazar JL (2014). The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance. Trends Microbiol 22: 36-41.

Martín BS, Lapierre L, Cornejo J, Bucarey S (2008). Characterization of antibiotic resistance genes linked to class 1 and 2 integrons in strains of *Salmonella* spp. isolated from swine. Can J Microbiol 54: 569–576.

Mazel D (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. Nat Rev Microbiol. 4(8): 608–620.

McDiarmid RW, Altig R (1999). Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae. Press. Chicago, Univ. of Chicago.

Medigan MT, Martinko JM (2012). Brock Mikroorganizmaların Biyolojisi. Cumhur Çökmüş Ed. Palme Yayınları Biyoloji Dizisi. Ankara. Sayfa 270-282.

Michalskia M, Swierzkoa AS, Lukasiewiczc J, Kupisinskac AM, Karwaciakc I, Przygodzkaa P, Cedzynskia M (2015). Ficolin-3 activity towards the opportunistic pathogen, *Hafnia alvei*. Immunobiology 220: 117–123.

Minette HP (1984). Epidemiologic aspects of salmonellosis in reptiles, amphibians, mollusks and crustaceans, a review. Int J Zoonoses 11: 95-104.

Mohammadalipour Z, Kargar M, Doosti A (2017). High Frequency of Class 2 and 3 Integrons Related to Drug-Resistance in Clinical Isolates of Diarrheagenic *E. coli* in Iran. Novel Biomed 5(1): 30-6.

Moon DC, Seol SY, Gurung M, Jin JS, Choi CH, Kim J, Lee YC, Cho DT, Lee JC (2010). Emergence of a new mutation and its accumulation in the topoisomerase IV gene confers high levels of resistance to fluoroquinolone in *Escherichia coli* isolates. Int J Antimicrob Agents 35: 76-79.

Moura A, Soares M, Pereira C, Leitão N, Henriques I, Correia A (2009). Integrall: a database and search engine for integrons, integrases and gene cassettes. Bioinformatics 25: 1096–8.

Mölstad S, Lundborg CS, Karlsson AK, Car, O (2002). Antibiotic Prescription Rates Vary Markedly Between 13 European countries. Scand J Infect Dis 34: 366-371.

Munita JM, Arias CA (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. Microbiol Spectr 4(2). Napier MD, Haugland R, Poole C, Dufour AP, Stewart JR, Weber DJ (2017). Exposure to human associated faecal indicators and self-reported illness among swimmers at recreational beaches: a cohort study. Environ Health 16: 103.

NCBI BLAST National Center for Biotechnology İnformation Basic Local Alignment Search Tool. Available from: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi. [Accessed 8 September 2021].

Nield BS, Holmes AJ, Gillings MR, Recchia GD, Mabbutt BC, Nevalainen KM, Stoke HM (2001). Recovery of new integron classes from environmental DNA. FEMS Microbiol Lett 195: 59–65.

Oğuz KH (2013). Endodontide Sistemik İlaç Kullanımı, Bitirme Tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.

Öner M (1992). Genel Mikrobiyoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, Kitaplar Serisi No: 4. İzmir; Sayfa: 231-245.

Özgümüş OB (2001). Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen Enterik Bakterilerde Plazmitle Kodlanan TEM ve SHV-Tipi Beta-Laktamaz Genlerinin Moleküler Epidemiyolojisi. Doktora Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim dalı, Trabzon.

Özgümüş OB, Caylan R, Tosun I, Sandalli C, Aydin K, Koksal I (2007). Molecular epidemiology of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolates carrying the IMP-1 metallo-beta-lactamase gene in a university hospital in Turkey. Microb Drug Resist 13: 191-198.

Özgümüş OB, Sandalli C, Sevim A, Celik-Sevim E, Sivri N (2009). Class 1 and class 2 integrons and plasmid-mediated antibiotic resistance in coliforms isolated from ten rivers in northern Turkey. J Microbiol 47: 19-27.

Özturk R (2002). Antimikrobik İlaclara Karşı Direnç Geliştirme Mekanizmaları ve Günümüzde Direnç Durumu. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi 31(11): 83-100.

Pallecchi L, Bartoloni A, Riccobono E, Fernandez C, Mantila A, Mgnelli D, Mannini D, Strohmeyer M, Bartalesi F, Rodriguez H, Gotuzzo E, Rossolini GM (2012). Quinolone resistance in absence of selective pressure: The experience of a very remote community in the Amazon Forest. PLOS Negl Trop Dis 6(8): 1-7.

Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC (2006). Prevalence in the United States of aac(6)-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. Antimicrob Agents Chemother 50: 3953–3955.

Park S, Min Lee K, Sun Yoo Y, SikYoo J, Yoo J, Su Kim H (2011). Alterations of gyrA, gyrB, and parC and Activity of Efflux Pump in Fluoroquinolone-resistant *Acinetobacter baumannii*. Public Health Res Perspect 2(3): 164-170.

Partridge SR, Brown HJ, Stokes HW, Hall RM (2001). Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. Antimicrob Agents Chemother 45(4): 1263-70.

Parveen S, Lukasik TM, Scott ML, Tamplin KM, Portier S, Sheperd K, Farrah SR (2006). "Geographical variation in antibiotic resistance profiles of *Escherichia coli* isolated from swine, poultry, beef and dairy cattle farm water retention ponds in Florida", J Appl Microbiol 100(1): 50-57.

Paterson EM, Pezzlo MT, Shigei JT (2004). Color Atlas of Medical Bacteriology: introduction to *Enterobacteriaceae*. AMS press, Washington DC, Pages: 83-110.

Pazarlı O (2010). Kinolon Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. Suşlarında Direnç Genlerinin Araştırılması, Uzmanlık Tezi, Karaelmas Üniversitesi, Zonguldak.

Payer LM, Burns KH (2019*).* Transposable elements in human genetic disease. Nat Rev Genet 20**:** 760–772.

Poeta P, Costa D, Igrejas G, Rodrigues J, Torres C (2007). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in faecal *Enterococci* from wild boars (*Sus scrofa*). Vet Microbiol 125: 368-374.

Poeta P, Radhouani H, Pinto L, Martinho A, Rego V, Rodrigues R, Gonçalves A, Rodrigues J, Estepa V, Torres C, Igrejas G (2009). Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. J Basic Microbiol 49: 584–588.

Pollet I, Bendell-Young LI (2000). Amphibians as indicators of wetland quality in wetlands formed from oil sands effluent. Environ Toxicol Chem 19(10): 2589-2597.

Pray, L (2008). Transposons: The jumping genes. Nature Education 1(1): 32, 204.

Ravindran S. (2012). Barbara McClintock and the discovery of jumping genes. PNAS. 109 (50): 20198-20199.

Rice LB, Willey SH, Papanicolaou GA, Medeiros AA, Eliopoulos GM, Moellering JR, Jacoby GA (1990). Outbreak of ceftazidime resistance caused by extended-spectrum *ß*-lactamases at Massachusetts chronic care facility. Antimicrob Agents Chemother 34: 2193-2199.

Roberts AP, Mullany P (2011). Tn916-like genetic elements: a diverse group of modular mobile elements conferring antibiotic resistance. FEMS Microbiol Rev 35: 856–71.

Robicsek A, Strahilevitz J, Sahm DF, Jacoby GA, Hooper DC (2006). qnr prevalence in ceftazidime resistant *Enterobacteriaceae* isolates from the United States. Antimicrob Agents Chemother 50(8): 2872–2874.

Rodriguez-Rojas A, Rodriguez-Beltran J, Couce A, Blazquez J (2013). Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. Int J Med Microbiol 303: 293-297.

Rock C, Donnenberg MS (2014). Human Pathogenic *Enterobacteriaceae*. Reference Module in Biomedical Science.

Rowe-Magnus DA, Mazel D (2001). Integrons: natural tools for bacterial genome evolution. Current Opinion in Microbiol 4: 565-569.

Ruiz J (2003). Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. J Antimicrob Chemother 51: 1109-1117.

Sağlık Bakanlığı (2016). Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi Raporu. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/depo/birimler/Mikrobiyoloji_Referans_Laboratuvarlari_ve_Biyolojik_Urunler_DB/uamdss/yillik_raporlar/UAMDSS_2016_Rapor.pdf [Accessed 18 October 2021].

Sandalli C, Özgümüş OB, Sevim A (2010). Characterization of tetracycline resistance genes in tetracycline resistant *Enterobacteriaceae* obtained from a coliform collection. World J Microbiol Biotechnol 26: 2099–2103.

Saygı Ş, Battal D, Özlen ŞN (2012). Çevre ve İnsan Sağlığı Yönünden İlaç Atıklarının Önemi. Marmara Pharm J 16: 82-90.

Schmidt AS, Bruun MS, Dalsgaard I, Larsen JL(2001). Incidence, distribution, and spread of tetracycline resistance determinants and integron-associated antibiotic resistance genes among motile aeromonads from a fish farming environment. Appl Environ Microbiol 67: 5675–5682.

Schwabe U, Paffrath D (2001). Arzneiverordnungs. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, Pages: 982.

Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int J Antimicrob Agents 17(6): 431-437.

Senda K, Arakawa Y, Ichiyama S, Nakashima K, Ito H, Ohsuka S, Shimokata K, Kato N, Ohta M (1996) PCR detection of metallo-beta-lactamase gene *bla*$_{IMP}$ in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. J Clin Microbiol 34: 2909–2913.

Serrano PH (2005). Responsible Use of Antibiotics in Aquaculture. Fisheries Technical Paper, Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome.

Sewell D, Griffiths RA (2009): Can a single amphibian species be a good biodiversity indicator. Diversit 1: 102-117.

Sheng JF, Li JJ, Tu S, Sheng ZK, Bi S, Zhu MH, Shen XM, Li LJ (2012). *bla*$_{KPC}$ and rmtB on a single plasmid in *Enterobacter amnigenus* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the same patient. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 31: 1585–1591.

Shi Y. 2000. Amphibian Metamorphosis From Morphology to Molecular Biology. First Edition, United States of America.

Shibata N, Doi Y, Yamane K, Yagi T, Kurokawa H, Shibayama K, Kato H, Kai K, Arakawa Y (2003). PCR typing of genetic determinants for metallo-betalactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. J Clin Microbiol 41: 5407–5413.

Shintani M (2017). The behavior of mobile genetic elements (MGEs) in different environments. Biosci Biotechnol Biochem 81: 854–862.

Silva N, Igrejas G, Figueiredo N, Gonçalves A, Radhouani H, Rodrigues J, Poeta P (2010). Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). Sci Total Environ 408(20): 4871-4876.

Solar G, Giraldo R, Echevarri MJ, Espınosa M, Orejas RD (1998). Microbiology and Molecular Biology Reviews. Sayfa: 434–464.

Spadaro S, Berselli A, Marangoni E, Romanello A, Colamussi MV, Ragazzi R, Zardi S, Volta CA (2014). Aeromonas sobria necrotizing fasciitis and sepsis in an immunocompromised patient: a case report and review of the literature. J Med Case Rep 8(315): 1-6.

Stalder T, Barraud O, Casellas M, Dagot C, Ploy MC (2012). Integron involment in enviromental spread ofantibiotic resistance. Front Microbiol 9(3): 119.

Tai MLS, Velayuthan RD (2014). *Sphingomonas paucimobilis:* An unusual cause of meningitis-case report. Neurol Med Chir 54: 337–340.

Taylor NGH (2011). Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance. Trends Ecol Evol 26: 278–284.

Tennstedt T, Szczepanowski R, Braun S, Pühler A, Schlüter A (2003). Occurrence of integron-associated resistance gene cassettes located on antibiotic resistance plasmids isolated from a wastewater treatment plant. FEMS Microbiol Ecol 45(3): 239-52.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. J Clin Microbiol 33: 2233–2239.

Ternes TA (1998). Occurence of drugs in german sewage treatment plants and rivers, Water Res 32(11): 3245–3260.

Thet NT, Wallace L, Wibaux A, Boote N, Jenkins ATA (2019). Development of a mixed-species biofilm model and its virulence implications in device related infections. J Biomed Mater Res B Appl Biomater 107: 129-137.

Tunçtan B, Buharalıoğlu K (2005). Farmakoloji Terimleri Sözlüğü, Sendrom III Tıp Terimleri Sözlüğü, 3: 3-44.

Türkoğlu FK (2008). Pediatri Kliniğine Başvuran Annelerin Çocuklarda Antibiyotik Kullanımı Konusundaki Bilgi ve Tutumların Araştırılması. Uzmanlık tezi, Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği, İstanbul.

Türkdoğan FI, Yetilmezsoy K (2009). Appraisal of potential environmental risks associated with human antibiotic consumption in Turkey. J Hazard Mater 166: 297-308.

Tzelepi E, Giakkoupi P, Sofianou D, Loukova V, Kemeroglou A, Tsakris A (2000). Detection of extended-spectrum *ß*-lactamases in clinical isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. J Clin Microbiol 38: 542-546.

Van Hoek HAMA, Mevius D, Guerra B (2011). Acquired antibiotic resistance genes: an overview. Front Microbiol 2: 203.

Vershinin VL (2008). Morpha striata in the members of the genus Rana (Amphibia, Anura), the reasons of adaptability to enviromental changes. Zhurnal Obshchei Biologii 69: 65-71.

Villa J, Ruiz J, Goni P, Jimenes de Anta MT (1996). Detection of mutations of parC in quinolone resistance clinical isolates of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 40: 491-493.

Von Wintersdorff Christian JH, Penders J, vanNiekerk JM, D.Mills N, Majumder S, Van Alphen LB, Savelkoul PHM, Wolffs PFG (2016). Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. Front Microbiol 7(173): 1-10.

Wang JT, Chang SC, Chen YC, Luh KT (2000). Comparison of antimicrobial susceptibility of *Citrobacter freundii* isolates in two different time periods. J Microbiol Immunol Infect 33: 258-62.

Watt PJ, Oldham RS (1995). The effect of ammonium nitrate on the feeding and development of the Smooth newt, *Triturus vulgaris* (L.), and on the behavior of its food source, *Daphnia manga.* Freshw Biol 33(2): 319-324.

Webber M, Piddock LJV (2001). Quinolone resistance in *Escherichia coli*. Vet Res 32: 275-284.

Wegener HC (2003). "Antibiotics in animal feed and their role in resistance development", Cur Opin Microbiol 6(5): 439-445.

Wells KD (2007): The Ecology and Behavior of Amphibians, The University of Chicago Press; Pages: 1162.

White PA, McIver CJ, Rawlinson WD (2001). Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. Antimicrob Agents Chemother 5: 2658-6261.

WHO (2014). Antimicrobial Resistance Global Report On Surveillance. The World Health Organization. Available from: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/112642/9789241564748_eng.pdf. [Accessed 13 October 2021].

WHO, Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual For Early Implementation. 2015a. Available from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/188783/1/9789241549400_eng.pdf. [Accessed 8 September 2021].

WHO, Sixty-Eight Worl Health Assembly, Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, A68/20, 2015b. Available from: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_20-en.pdf?ua=1 [Accessed 8 September 2021].

Wyman RL (1990). What‘s happening to the amphibians? Conserv Biol 4(4): 350-352.

Xu Z, Li L, Shirtliff M, Alam M, Yamasaki S, Shi L (2009). Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China. J Clin Microbiol 47: 230–234.

Yu PKW, Washington JA (1985). Identification of aerobic and facultatively anaerobic bacteria. *In*: Washington JA Laboratory Procedures in Clinical Microbiology. 2nd. ed. Springer-Verlag. New York; Pages:131-250.

Yüce A (2001). Antimikrobik ilaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. Klimik Dergisi 2(11): 41-46.

Zinder ND, Lederberg J (1952). Genetic exchange in *Salmonella*. J Bacteriol Res 64 (5): 679–99.

**EKLER**

## EK 1. Hayvan Deneyleri Etik Kurul Belgesi

T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU BAŞKANLIĞI ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI
(Republic of Turkey Recep Tayyip Erdogan University Local Ethics Committee for Animal Experiments)

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| BAŞVURU BİLGİLERİ (Application Information) | ETİK KURUL DOSYA NO( REFERENCE):44 | | | |
| | ÇALIŞMANIN ADI | Doğu Karadeniz Bölgesi'nde Yaşayan Pelophylax sp. Türlerinden İzole Edilen Enterik Bakterilerdeki Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi Ve Moleküler Analizi | | |
| | Title | Determination And Moleculer Analysis Of Antibiotic Resistance İn Enteric Bacteria Provided Rom Pelophylax sp. İn Eastern Blacksea Region | | |
| | SORUMLU ARAŞTIRMACI (Director of Project) | Prof.Dr.Osman Birol ÖZGÜMÜŞ | | |
| | DİĞER GÖREVLİLER (Researchers) | Kazım ŞAHİN, Abdullah ALTUNIŞIK, Erva RAKICI | | |
| | BAŞVURULAN ETİK KURUL | Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu | | |
| | ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER | ☒Tek Merkez Ulusal | ☐Çok Merkezli Ulusal | ☐Çok Merkezli Uluslararası |

| | | |
|---|---|---|
| KARAR BİLGİLERİ | Karar No(Decision No):2020/41 | Tarih (Date): 26.11.2020 |
| | R.T.E. Üniversitesi Tıp Fakültesi' nden, Prof.Dr.Osman Birol ÖZGÜMÜŞ 'ün sorumluluğunda yürütülen ve yukarıda başvuru bilgileri verilen Hayvan Deneyleri Araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler, araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına katılan üyelerin oy birliğiyle karar verilmiştir. | |
| Decision Information | The study above has been approved by the Local Ethics Committee of R.T.E.University. | |
| | ☒Accepted | ☐Rejected |

ÜYELER (Members)

| Ünvanı/ Adı/ Soyadı Ek Üyeliği | Uzmanlık Dalı | Kurumu | Cinsiyeti | İlişki (*) | Katılım (**) | İmza |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Prof.Dr. Fikri BALTA (Başkan, Müdür) | Su Ürünleri (Veteriner Hekim) | R.T.E. Üniversitesi Su Ürünleri Fak. | E | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |
| Doç.Dr. Levent TÜMKAYA (Başkan Vekili) | Histoloji Embriyoloji | R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak. | E | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |
| Doç.Dr. Ayşe ERTÜRK (Üye) | Enfeksiyon Hast. Ve Klinik Mikr. | R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak. | K | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |
| Doç.Dr. Serkan GÜL (Üye) | Biyoloji | R.T.E. Üniversitesi Fen Edebiyat Fak. | E | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |
| Doç.Dr.Kazım ŞAHİN (Üye) | Tıbbi Mikrobiyoloji | R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak. | E | ☒E ☐H | ☒E ☐H | ---------- |
| Doç.Dr. Hülya KILIÇ YILMAZ (Üye) | Tıbbi Biyokimya | R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak. | K | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |
| Doç.Dr. Murat ALKURT ( Üye) | Protetik Diş Tedavisi | R.T.E. Üniversitesi Diş Hekimliği Fak. | E | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |
| Dr.Öğr.Üyesi Hatice SEVİM NALKIRAN (Üye) | Tıbbi Biyoloji | R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak. | K | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |
| Şenay ÇAKIROĞLU (Üye) | Veteriner Hekim | R.T.E. Üniversitesi Deney Hay.Uy.ve Arş. | K | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |
| Şevket ÇAKMAKÇI (Üye) | Sağlık Çalışanı | Sendika Üyesi | E | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |
| Rukiye ÜLGER (Üye) | Serbest Çalışan | Sivil Üye | K | ☐E ☒H | ☒E ☐H | |

*Araştırma ile ilişki(**Relationtotheproject, E: Yes, H: No**)

**Toplantıda Bulunma(**Attendance, E: Yes, H: No**)

# ÖZGEÇMİŞ

| **KİŞİSEL BİLGİLER** | |
|---|---|
| **Soyadı, Adı** | **:**RAKICI, Erva |
| **Uyruğu** | **:**TC |
| **Doğum Tarihi ve Yeri** | **:**24/09/1986 Trabzon |
| **Telefon (İş)** | **:**3168 |
| **E-Posta** | **:**erva.esmer@erdogan.edu.tr<br>erva.esmer@hotmail.com |
| **Yazışma Adresi (İş)** | **:**Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi<br>İslampaşa Mah. 2 nolu Şehitler Cad. Dekanlık Ek Bina 2. Kat Uzman Odası |
| | |

| **EĞİTİM BİLGİLERİ** | | |
|---|---|---|
| **Derece** | **Mezun Olduğu Kurumun Adı** | **Mezuniyet Yılı** |
| **Doktora/Uzmanlık** | Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Sağlık Bilimleri Tıbbi Mikrobiyoloji AD | - |
| **Doktora** | Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Moleküler Biyoloji AD | 2012-2015 |
| **Yüksek Lisans** | Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü-Moleküler Biyoloji AD | 2011 |
| **Yüksek Lisans (Tezsiz)** | Gazi Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü-Biyoloji Eğitimi | 2010 |
| **Lisans** | Gazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü | 2009 |
| **Lise** | Trabzon Lisesi (Süper) | 2004 |

| **AKADEMİK/MESLEKİ DENEYİMİ** | | | |
|---|---|---|---|
| **Görevi** | | **Kurum** | **Süre (Yıl -Yıl)** |
| 1. | Öğretim Görevlisi | Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi Tıp Fakültesi-Temel Bilimler | 2013- |
| | | | |
| **YABANCI DİL** | | İngilizce | |

| | |
|---|---|
| **UZMANLIK ALANI** | |
| | Mikrobiyoloji<br>Bakteriyoloji<br>Moleküler Biyoloji |
| **YAYINLAR** | |
| 1 | **RAKICI Erva**, ALTUNIŞIK Abdullah, ŞAHİN Kazım, ÖZGÜMÜŞ Osman Birol (2021). Determination and moleculer analysis of antibiotic resistance in Gram-negative enteric bacteria isolated from *Pelophylax* sp. in Eastern Black Sea Region. Acta Veterinaria Hungarica. 69(3): 223-233. doi:10.1556/004.2021.00039. |
| 2 | ÇOPUR ÇİÇEK Ayşegül, ERTÜRK Ayşe, EJDER Nebahat, **RAKICI Erva**, KOSTAKOĞLU Uğur, ESEN YILDIZ İlknur, ÖZYURT Songül, SÖNMEZ Emine (2021). Screening of Antimicrobial Resistance Genes and Epidemiological Features in Hospital and Community-Associated Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Infections. Infection and drug resistance.14(14): 1517-1526. doi: 10.2147/idr.s299742. |
| 3 | ÖZER Ayşegül, **RAKICI Erva**, İNAN BEKTAŞ Kadriye, ÇANAKÇI Sabriye, BELDÜZ Ali Osman (2020). Isolation of Lignin-Degrading Bacteria from Different Sources and Testing of Their Ligninolytic Activities. Journal of Apitherapy and Nature, 2:30-45. doi: 10.35206/jan.554729. |
| 4 | MERCANTEPE Tolga, TÜMKAYA Levent, GÖKÇE Fatih Mehmet, UZUNOK Barış, TOPAL SUZAN Zehra, ÇINAR Seda, **ESMER Erva** (2018). Prenatal Dönemde 900Mhz Elektromanyetik Alanın Sıçan Omurilik Dokusu Üzerine Etkilerinin Histopatolojik Olarak İncelenmesi. Acibadem Universitesi Saglik Bilimleri Dergisi 9(2) 137-141. doi: 10.31067/0.2018.4. |
| 5 | MERCANTEPE Tolga, TÜMKAYA Levent, GÖKÇE Fatih Mehmet, TOPAL SUZAN Zehra, **ESMER Erva** (2018). The effect of 900MHz Electromagnetic Field on the Cerebellum: A Histopathological Investigation. Sisli Etfal Hastan Tip Bul. 52(2): 129-134. doi: 10.14744/SEMB.2018.42275. |
| **BİLDİRİLER** | |
| 1. | **ESMER Erva**, ÖZER Ayşegül, ÇANAKÇI Sabriye, BELDÜZ Ali Osman (2012). Gübreli Toprak Örneklerinden Lignin Degrede Eden Bakterilerin İzolasyonu Ve Ligninolitik Aktivitelerinin Test Edilmesi. 2. Ulusal Moleküler Biyoloji ve |

| | |
|---|---|
| | Biyoteknoloji Kongresi, Antalya, Türkiye, 15 - 18 Kasım 2012. |
| 2. | KARACA Büşra, ERGÜL KALAYCI Tuğba, KALKAN Yıldıray**, ESMER Erva**, Köseoğlu Gülşah, ÖZDEMİR Nurhayat (2014). Amonyum Sülfat Gübresinin Rana macrocnemis Larvaları Üzerindeki Histopatolojik Etkileri. 22. Ulusal Biyoloji Kongresi, Eskişehir, Türkiye. |
| 3. | ERGÜL KALAYCI Tuğba, Köseoğlu Gülşah, ÖZDEMİR Nurhayat, KALKAN Yıldıray, **ESMER Erva,** TÜMKAYA Levent (2016). Histological Effects of Ammonıum Sulfate on the Common Toad, Bufo bufo. VIII International Agriculture Symposium "AGROSYM 2017", Jahorina, Bosna-Hersek. |
| 4. | ERGÜL KALAYCI Tuğba, ÖZDEMİR Nurhayat, Karaca Büşra, KALKAN Yıldıray, **ESMER Erva,** TÜMKAYA L (2016). Histopathological Effects of Ammonium Sulfate on the Pronephric Tubules of *Rana Macrocnemis*. International Symposium on Fisheries and Aquatic Sciences" (FABA), Antalya, Türkiye. |
| 5. | **RAKICI Erva**, ALTUNIŞIK Abdullah, ŞAHİN Kazım, ÖZGÜMÜŞ Osman Birol (2018). Doğu Karadeniz Sahilinde Yaşayan *Pelophylax* spp Türlerinden İzole Edilen Enterik Bakterilerdeki Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi ve Moleküler Analizi. 13. Antimikrobik Kemoterapi Günleri, İstanbul, Türkiye. |
| 6. | **RAKICI Erva,** ÜREYEN ESERTAŞ Ülkü Zeynep, EJDER Nebahat, ALTUNIŞIK Abdullah, ÖZGÜMÜŞ Osman Birol, EKŞİ Saliha (2019). Kestane Çiçeği Özütlerinin Ova Kurbağasından (*Pelophylax* sp.) İzole Edilen Karbapeneme Dirençli Bakteriler Üzerinde Antibakteriyal Etkisinin Araştırılması. 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye. |
| 7. | **RAKICI Erva**, ALTUNIŞIK Abdullah, ŞAHİN Kazım, ÖZGÜMÜŞ Osman Birol (2019). Doğu Karadeniz Sahilinde Yaşayan *Pelophylax* sp. Türlerinden İzole Edilen *E. coli* Suşlarının Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi ve Moleküler Epidemiyolojisi. 5. Ulusal Klinik Mikrobiyoloji Kongresi, İzmir, Türkiye. |
| **ÖDÜLLER/ TEŞVİKLER/ BURSLAR** | |
| 1. | Bilimsel Telif ve Çeviri Eser Ödülleri (TEÇEP) kapsamında Çeviri Eser Ödülü Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) Nisan 2015. |
| **HOBİLER** | |
| 1 | Kitap okumak |
| 2 | Film seyretmek |