T.C.
RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOORDİNASYON BİRİMİ

PROJE BAŞLIĞI
Doğu Karadeniz Sahilinde Yaşayan *Pelophylax* sp. Türlerinden Sağlanan Enterik Bakterilerdeki Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi ve Moleküler Analizi

Proje No: TSA-2016-526

Proje Türü
N. Araştırma

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:
Adı Soyadı: Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
Birimi/Bölümü: Tıbbi Mikrobiyoloji AbD

Araştırmacının Adı Soyadı:
Birimi/Bölümü:

Doç. Dr. Kazım ŞAHİN Tıbbi Mikrobiyoloji AbD

Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK Biyoloji Bölümü

Öğr. Gör. Erva ESMER Tıbbi Mikrobiyoloji AbD

Ocak 2019

RİZE

ÖNSÖZ

"Doğu Karadeniz Sahilinde Yaşayan *Pelophylax* sp. Türlerinden Sağlanan Enterik Bakterilerdeki Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi ve Moleküler Analizi" adlı bu çalışma Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'nün TSA-2016-526 kodlu projesinden sağlanan destekle tamamlanmıştır. Üniversitemiz Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü'ne çalışmaya sağladığı desteklerinden dolayı proje ekibi olarak teşekkürlerimizi sunarız.

Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ
Doç. Dr. Kazım ŞAHİN
Doç. Dr. Abdullah ALTUNIŞIK
Öğr. Gör. Erva ESMER

Rize, 2019

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET	6
ABSTRACT	7
1. GİRİŞ	8
2. GENEL BİLGİLER	9
3. GEREÇ VE YÖNTEM	13
3.1. Arazi Çalışması	13
3.2. Bakteri İzolasyonu	15
3.3. Biyokimyasal Testler	16
3.3.1. İndol Testi	16
3.3.2. Metil Kırmızısı Testi	16
3.3.3. Voges Proskauer (VP) Testi	17
3.3.4. Sitrat Kullanım Testi	17
3.3.5. Triple Sugar Iron (TSI) Agarda Üreme Özellikleri	17
3.4 VITEK-2 Otomatize Sistemi İle Tanımlama	18
3.5. MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of flight Mass Spectrometer) Analizi ile Tanımlama	18
3.6. Antimikrobiyal Hassasiyet Deneyleri	18
3.7. Toplam DNA İzolasyonu	19
3.8. İntegron Gen Kasetlerinin PZR İle Taranması	19
3.9. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme	21
3.10. Pulsed-Field Jel Elektroforezi (PFGE)	21
4. BULGULAR	23
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	31
6. REFERANSLAR	34
7. EKLER	40

TABLO, ŞEKİL ve FOTOĞRAF LİSTELERİ

TABLOLAR

Tablo 1. Şehir ve lokasyonlar. Örnek isimlendirmesinde a, erkek; b, dişi; c, juvenil bireyleri temsil etmektedir. r, *Rana* cinsine ait kurbağaları temsil etmektedir.

Tablo 2. PZR reaksiyonunda kullanılan master mix bileşenleri ve miktarları

Tablo 3. Primerler ve nükleotid dizileri

Tablo 4. PZR reaksiyon koşulları

ŞEKİLLER

Şekil 1. (A) Sınıf 1 integronun genel yapısı (Lévesque ve ark. 1995); (B) Sınıf 2 integronun genel yapısı (Byrne-Bailey ve ark. 2011).

Şekil 2. Örneklemenin yapıldığı şehirler.

Şekil 3. Bakteri gruplarının %direnç dağılımı.

Şekil 4. *Citrobacter*'lerin antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

Şekil 5. *Enterobacter*'lerin antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

Şekil 6. *E. coli*'lerin antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

Şekil 7. *Roultella* 'ların antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

Şekil 8. *Klebsiella*'ların antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

Şekil 9. *Citrobacter, Enterobacter, E. coli, Roultella ve Klebsiella*'nın karşılaştırmalı antibiyotik direnç oranları.

Şekil 10. Agaroz jel elektroforez analizi.

Şekil 11. PFGE görüntülerinin dendogram üzerinde suşların gösterimi ve örneklerin toplandığı yerlerin gösterimi.

FOTOĞRAFLAR

Fotoğraf 1 Yakalanmış *Pelophylax* sp.

Fotoğraf 2 *Pelophylax* sp.'den rektal sürüntü örneğinin alınması.

ÖZET

Çevre kirliliği açısından indikatör organizmalar olarak bilinen *Pelophylax cinsine ait* kurbağalar edilen, rektal orijinli enterik bakterilerde antimikrobiyal direnç prevalansının belirlenmesi amaçlanmıştır. Antimikrobiyal direncin altında yatan mobil genetik elemanlardan sınıf 1 ve/veya sınıf 2 integron gen kasetleri taranmıştır. Doğu Karadeniz bölgesindeki altı ilin, farklı ekolojik koşullara sahip üç istasyonundan yakalanan genç, erkek ve dişi bireylerin rektumundan sürüntü örneği alınarak, enterik bakteriler izole edilmiştir. Biyokimyasal testlerle, VITEK-2 otomatize sistemi ve matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spektrometre ile tür tayini yapıldıktan sonra, disk difüzyon yöntemiyle 12 farklı antibiyotiğe karşı antimikrobiyal hassasiyet testleri yapılmıştır. Kaynatma yöntemi ile DNA elde edilerek, polimeraz zincir reaksiyonu ile sınıf 1 ve sınıf 2 integronlar taranmıştır. Toplamda 160 suşta 15 farklı cinse ait bireyler saptandı. Genel olarak en yüksek direnç ampisilin ve sefazoline, en düşük direnç ise kloramfenikol ve tetrasikline karşı tespit edilmiştir. Suşların birinde (*E. coli*, S1c2) PZR ile boş bir sınıf 1 integron tespit edilmiştir. Pulsed-field gel elektroforezi ile fekal koliform (*E. coli)* suşlarının klonal yakınlıkları belirlenmiştir. *Pelophylax* gibi kozmopolit bir türün barsak mikrobiyotasındaki bir suşta dahi integron varlığının tespit edilmesi ve bu genetik elemanın boş olması, bu bakterilerin 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 potansiyelinde olduklarını düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Kurbağa, *Pelophylax*, enterik bakteri, antibiyotik direnci, integron

ABSTACT

The aim of this study was to determine the prevalence of antimicrobial resistance in enteric bacteria with rectal origin, isolated from *Pelophylax*, which are regarded as indicator organisms for environmental pollution. Enteric bacteria were isolated from the rectum of the young, male and female *Pelophlax* which were captured from three stations with different ecological conditions in six provinces of the Eastern Black Sea Region. The bacteria were screened for class 1 and/or class 2 integron gene cassettes, mobile genetic elements that underlie antimicrobial resistance. After biochemical tests, the VITEK-2 automated system and matrix-assisted laser desorption/ionization- time of flight mass spectrometer were used for the determination of species. Antimicrobial susceptibility tests were performed by 12 different antibiotics by disk diffusion method. DNA was obtained by the boiling method and class 1 and class 2 integrons were screened by polymerase chain reaction. A total of 160 strains, from 15 different genera, were isolated. The highest rate of resistance was to ampicillin and cefazoline, while the lowest resistance rate was against chloramphenicol and tetracycline. In one of the strains (*E. coli*, S1c2) an empty class 1 integron was detected by PCR. The clonal similarity of fecal coliform (*E. coli*) strains was determined by the pulsed-field gel electrophoresis. The presence of an empty integron in a common strain of intestinal microbiota in a cosmopolitan indicator species such as *Pelophylax* has the potential to become multidrug resistant. This could occur by catching antibiotic resistance genes from bacteria in different environments and their lateral transfer to other bacteria present in land and water ecosystems.

Keywords: Frog, *Pelophlax*, enteric bacteria, antibiotic resistance, integron

GİRİŞ

Antibiyotiklerin gereksiz kullanımı dünyada önemli bir problemdir. Son yirmi yılda aşırı antibiyotik kullanımının hızlı bir direnç gelişimine yol açtığı düşünülmektedir. Antibiyotik direncini kontrol edebilmek için klinik ve pre-klinik değerlendirme ve araştırmaların çok disiplinli bir yaklaşımı şarttır (Hoşoğlu 2011). Antibiyotik direnci sadece hastalık oluşturan bakterilerde bulunmaz. Karasal ve sucul çevrelerde yaşayan çevre mikroorganizmalarında da gösterilmiştir (Ozgumus ve ark. 2007; Ozgumus ve ark. 2009). Antimikrobiyal ajanların insan ve hayvanlarda yoğun kullanımı bakteriyel genetik transfer için birçok mekanizma ile birlikte seçici bir baskı oluşturmaktadır. Bu da dirençli bakterilerin seçilip yayılmasına neden olmaktadır (Schwarz ve ark. 2001). Kommensal bakterilerin direnç genlerinin bir rezervuarı olabileceği ve bu genleri diğer kommensal veya patojenik bakterilere aktarabileceği düşünülmektedir (Gonçalves ve ark. 2012; Silva ve ark. 2010). Doğal ortamlardaki antimikrobiyallere dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve yayılması insan ve hayvan sağlığı açısından önemli bir husustur ve bu antimikrobiyallere karşı direnç kodlayan genlere sahip bakterilere farklı habitatlarda yaşayan birçok yaban hayatı türünde rastlanmaktadır (Carroll ve ark. 2015). Dirençli mikrobiyotanın yaban hayatında ve uzak yerlerde yaşayan insanlarda artan bir sıklıkta bulunduğuna dair raporlar mevcuttur (Benavides ve ark. 2012; Pallecchi ve ark. 2012).

Dünya Sağlık Örgütü Nisan 2015'te antimikrobiyal direncin dünyanın her yerinde ortaya çıktığını, yeni direnç mekanizmalarının küresel çapta yayıldığını, artan bir küresel halk sağlığı problemi olduğunu ve bütün devlet sektörlerinin ve bilimsel topluluklarının bu konuda harekete geçmesi gerektiğini belirtti (WHO 2015b). Mayıs 2015'te ise antimikrobiyal direnç ile mücadele etmek için küresel bir eylem planı taslağı hazırlayarak 68. Dünya Sağlık Asamblesi'ne sundu. Bu taslakta antimikrobiyal direncin sürveyanında bölgesel, ulusal ve küresel bilgilerin güçlendirilmesi gerekliliği dikkati çekmektedir (WHO 2015a). Ülkemiz bölgesel antimikrobiyal direnç sürveyan ağlarından birine üyedir ve özellikle ülke çaplı klinik orijinli bakteriyel direnç bilgileri düzenli olarak rapor edilmektedir. Fakat raporlarda çevre orijinli direnç ile ilgili çok sınırlı bilgiler mevcuttur veya hiç bilgi bulunmamaktadır.

Bu eylem planı dirençli bakterilerin ve genlerin insanlar arasında, hayvanlar arasında ve insan, hayvan ve çevre arasında yayılabildiğini düşündürmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

Antimikrobiyal direnç, bir mikroorganizmanın tedavide kullanılan ilaçların etkilerine direnme yeteneğidir. Bu terim, sadece bakterilere uygulanan antibiyotiklere karşı "antibiyotik direnci" olarak ifade edilir. Dirençli mikroorganizmaların tedavisi zordur, alternatif ilaçlar veya daha yüksek dozlar gerektirir, her ikisi de pahalı veya toksiktir. (Review Antimicrobial Resistance 2016; Antimicrobial Resistance-CDC 2017)

Antibiyotiklerin gereksiz kullanımı dünyada önemli bir problemdir. Son yirmi yılda aşırı antibiyotik kullanımının hızlı bir direnç gelişimine yol açtığı düşünülmektedir. Antibiyotik direncini kontrol edebilmek için klinik ve pre-klinik değerlendirme ve araştırmaların multidisipliner bir yaklaşımı şarttır (Hoşoğlu 2011). Antibiyotik direnci sadece hastalık oluşturan bakterilerde bulunmaz. Karasal ve sucul çevrelerde yaşayan çevre mikroorganizmalarında da gösterilmiştir (Ozgumus ve ark. 2007; Ozgumus ve ark. 2009). Antimikrobiyal ajanların insan ve hayvanlarda yoğun kullanımı bakteriyel genetik transfer için birçok mekanizma ile beraber seçici bir baskı oluşturmaktadır. Bu da dirençli bakterilerin seçilip yayılmasına neden olmaktadır (Schwarz ve ark. 2001). Kommensal bakteriler direnç genlerinin bir rezervuarı olabilirler ve bu genleri diğer kommensal veya patojenik bakterilere aktarabilirler (Gonçalves ve ark. 2012; Silva ve ark. 2010). Doğal ortamlardaki antimikrobiyallere dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve yayılması insan ve hayvan sağlığı açısından önemli bir husustur ve bu antimikrobiyallere karşı direnç kodlayan genlere sahip bakterilere farklı habitatlarda yaşayan birçok yaban hayatı türünde rastlanmaktadır (Carroll ve ark. 2015)

Amfibi türlerinin biyo-değişkenliğin ve çevresel değişikliklerin indikatör canlıları olabileceği belirtilmektedir (Sewell ve Griffiths 2009). Amfibiler, dünyada açık okyanuslar, uzak okyanus adaları ve güney ve kuzey kutbunun donmuş bölgeleri hariç habitatın uygun olduğu her yerde bulunurlar (Wells 2007). Şu an dünyada yaşayan yedi binin üzerinde amfibi türü olduğu düşünülmektedir (Amphibiaweb, 2015). Bu çalışmada kullanılan *Pelophylax sp.* (Ova kurbağası) 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).*

Amfibiler hayat döngülerinin ergin fazında karasal habitatlarda yaşasalar da, suya daima bağımlıdırlar. Beslenme, üreme, larval gelişme ve kış uykusu esnasında sucul

habitatlardan yararlanırlar. Dolayısıyla hem karasal hem de sucul habitatları kullandıklarından, bu alanlarda meydana gelen herhangi bir değişiklik onları direkt olarak etkilemektedir (Mahaney 1994; Watt ve Oldham 1995; Hecnar 1995; Shi 2000). Bu fizyolojik özellikleri amfibileri su ve toprak kirliliğinin etkilerine karşı daha duyarlı hale getirmektedir ve bu yüzden biyolojik indikatör olarak kullanılmaktadırlar (Blaustein ve Wake 1990, Wyman 1990; Lips 1998, Pollet ve Young 2000). Amfibilerin biyoindikatör olarak olarak kullanılması amfibi popülasyon azalmasının yoğun bir şekilde arttığı 1980 sonlarına kadar uzanmaktadır (Sewel ve Griffiths 2009).

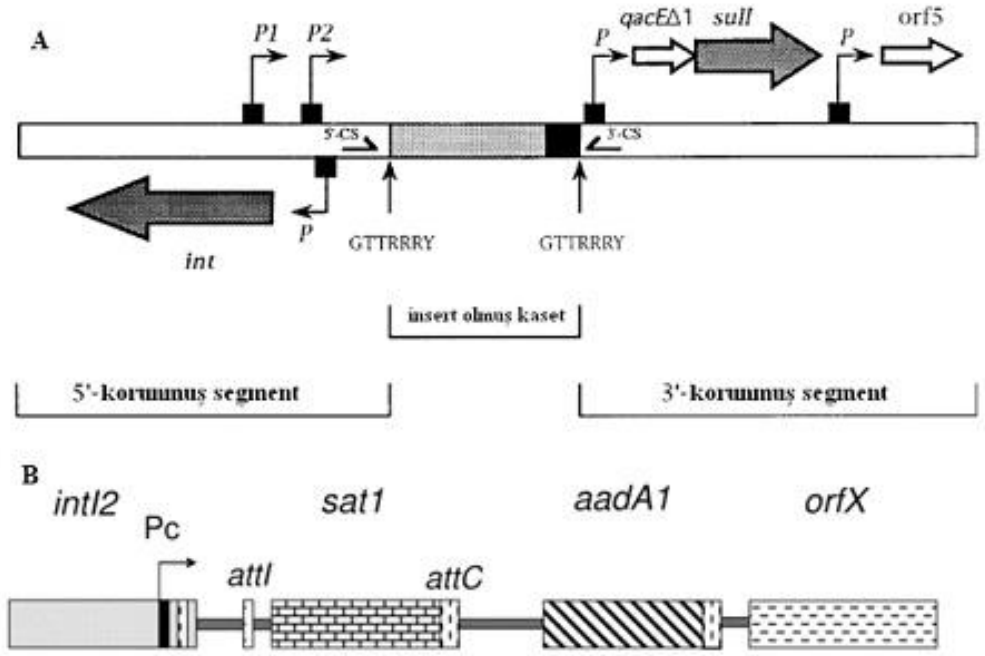
Özellikle kurbağalar olmak üzere, amfibiler mikroorganizmalarca zengin olan çamur ve topraklardaki su birikintilerinde ve havuzlarda yaşarlar. Hird ve ark. (1983) kurbağa ve iribaşlardan *E. coli* ve *Salmonella arizonae* türleri başta olmaz üzere 29 *Enterobacteriaceae* türü izole etmişlerdir. Bunun 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.

Enterik bakteriler, *Salmonella* ve *Escherichia coli* gibi hastalık etkenlerini de içeren büyük bir bakteri ailesidir. Gram-negatif, spor oluşturmayan, basil şeklinde bakterilerdir. Kolay kültürlenebilirler. Oksidaz negatif ve genelde katalaz pozitiftirler. Nitrat redüktaz pozitiftirler. Fakültatif anaeropturlar. Glukoz fermantasyonu yapabilirler. Çoğu bütün hücre yüzeyine yayılmış flagellaya sahip olmaları sonucu hareketlidirler. Birkaç cins ise hareketsizdir. Bu familyanın içinde enfeksiyon hastalıklarına yol açan zararlı cinslere rastlandığı gibi gıda ve ilaç endüstrilerinde kullanılan yararlı cinsler de vardır, birçoğu ise insan ve diğer hayvanların normal bağırsak florasını oluşturur (Pathogenic Microbiology, 2000).

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 ve ark. 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 ve ark. 1994). Bu direnç genlerinin kazanımı ve transferi bazı konjugatif plazmitler, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genetik elemanlar vasıtasıyla gerçekleşir.

İntegronlar, gene dışarıdan gen kasetlerinin eklenip orada ifade olmasına izin veren genetik elemanlardır (ASM Science, 2014). Bu gen kasetlerinin eklenişi bölgeye spesifik rekombinasyonlarla gerçekleşir. Gen kasetleri bir çeşit hareketli elementlerdir ve üzerinde rekombinasyon bölgeleri bulundurur. Genellikle antibiyotik direnç genleri taşır. Bu kasetler integronlar üzerinde birleşerek ya da halkasal DNA olarak serbest halde bulunabilirler.

Sınıf 1 integronun (Şekil 1A) yapısında bir 5'- ve 3'- korunmuş segment (5'-CS ve 3'-CS) ve bir de değişken (variable) bölge vardır. 5'-korunmuş segment *intI* geni (integraz) ve insert olan gen/genlerin ekspresyonu için kullanılan bir promoter bölgeden oluşur (Lévesque ve ark. 1995; Bennett 1999). 3'-korunmuş segment defektif kuaterner amonyum direnç geni *qacEΔ1* ve sülfonamide direnç sağlayan *sulI* geni içerir. İki korunmuş bölge arasında bulunan değişken bölge antibiyotik direnç gen kasetlerinin girmesi için rekombinasyon yeridir. Bu yüzden rekombinasyon mekanizmasına katılan ve 59-bp eleman olarak bilinen *attC* geni içerir. Sınıf 1 integronlar Tn*21* gibi transpozonlar üzerinde tespit edilmişlerdir ve prototip sayılırlar. Sınıf 2 integronlar (Şekil 1B) ise Tn*7*'de bulunmuş olup, 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 1. (A) Sınıf 1 integronun genel yapısı (Lévesque ve ark. 1995); **(B)** Sınıf 2 integronun genel yapısı (Byrne-Bailey ve ark. 2011).

İntegronlar antibiyotik direnci ile ilişkilendirilmişlerdir. Özellikle Gram negatif patojenlerin antibiyotik 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.

Antibiyotik direncinin bakteriler tarafından kazanım yolları, bu direncin bir bakteriden diğer bir bakteriye aktarımının nasıl gerçekleştiği, çevrede bu direncin yayılımı ve bütün bu olayların genetik mekanizmalarının aydınlatılması giderek önemli hale gelmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Arazi Çalışması:

Bu projede *Pelophylax* sp. türleri Şekil 2'deki haritada gösterilen altı ilin (Samsun, Ordu, Giresun, Trabzon, Rize ve Artvin) her birinden farklı ekolojik koşullara sahip üç istasyondan örnekleme yapılmıştır.



Şekil 2. Örneklemenin yapıldığı şehirler.

Arazi çalışmaları ile ziyaret edilen habitatların koşullarına göre, *Pelophylax sp*. populasyonlarına ait bireyler elle veya atrapla yakalanmıştır (Foto. 1).



Foto. 1. Yakalanmış *Pelophylax* sp.

Her bir örnekleme yerinde (Tablo 1) üç farklı ortamda (yerleşim yeri, temiz bölge ve sanayi bölgesi) bulunan *Pelophylax sp.* türlerinin genç (juvenil) , erkek ve dişi bireylerin rektumundan, anüs kısmı saf temiz su ile yıkandıktan sonra, steril pamuklu ve ince uçlu eküvyonlar vasıtasıyla 1-1,5 cm girilerek sürüntü örneği alınmıştır (Foto. 2).



Foto. 2. *Pelophylax* sp.'den rektal sürüntü örneğinin alınması.

Her bir bireyin cinsiyet tayini dış ses kesesinin ve başparmakta yastık şeklinde çıkıntının olup olmamasına göre belirlenmiştir. 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) olarak değerlendirilmiştir.

ŞEHİR	NO	ÖRNEKLEME YERİ	ÖRNEKLER	TARİH
RİZE	1	Rize yaylacılar köyü dere mevki (yerleşim)	R1a R1b R1c	13.05.2016
RİZE	2	Rize İkizdere yolu (temiz)	R2a R2b R2c	13.05.2016
RİZE	3	Rize Engindere mah (sanayi)	R3b R3b R3b	26.07.2017
TRABZON	1	Trabzon Beşikdüzü Kurbağalı dere (yerleşim)	T1a T1b T1b	27.07.2017
TRABZON	2	Trabzon Yomra (sanayi)	T2a T2b T2b T2c	29.10.2017
TRABZON	3	Trabzon düzköy yolu,Of (temiz)	T3c T3c T3c	29.10.2017
ARTVİN	1	Artvin Borçka Karagöl (temiz)	A1a A1b A1c A1cr	28.07.2017
ARTVİN	2	Artvin Hopa sundura mah. (yerleşim)	A2a A2b A2b	28.07.2017
ARTVİN	3	Artvin Hopa nahşeni mah. (sanayi)	A3b A3b A3c	28.07.2017
GİRESUN	1	Giresun Tirebolu kıyı (yerleşim)	G1a G1b G1c	25.07.2017
GİRESUN	2	Giresun Espiye oto sanayi	G2a G2b G2c	25.07.2017
GİRESUN	3	Giresun Göbel yaylası (temiz)	G3ar G3a G3c	25.07.2017
ORDU	1	Ordu Fatsa (yerleşim)	O1a O1b O1c	26.07.2017
ORDU	2	Ordu Turnasuyu deresi (temiz)	O2a O2b O2c	26.07.2017
ORDU	3	Ordu Katı atık Tesisi (sanayi)	O3c O3c O3c	26.07.2017
SAMSUN	1	Samsun yeniköseli köyü (yerleşim)	S1a S1b S1c	25.07.2017
SAMSUN	2	Samsun sanayi	S2a S2b S2c	25.07.2017
SAMSUN	3	Samsun Kızılırmak Deltası Kuş Cenneti (temiz)	S3b S3c-S3c-S3c	26.07.2017

Tablo 1. Şehir ve örnekleme ortamları. Örnek isimlendirmesinde a, erkek; b, dişi; c, juvenil bireyleri temsil etmektedir. r, *Rana* sp. cinsine ait kurbağaları temsil etmektedir.

Sonuçta 18 sürüntü örneği bakteriyal izolasyon için kullanılmıştır. Her bir sürüntü örneğinden üreyen en az 3 farklı koloni morfolojisi gösteren ve muhtemel koliform koloniler alınarak çalışmaya dahil edilmiştir. Rektal sürüntü örnekleri yarı-katı Luria-Bertani (LB) Agar (%1 tripton (Pronadisa), % 0,5 maya özütü (Pronadisa), % 0,5 NaCl (Sigma), % 0,7 Agar (Himedia), pH 7.4) içeren 1,5 ml'lik ependorf tüplere batırılarak alınmıştır (Bilgehan, 1995).

3.2. Bakteri izolasyonu:

Oda sıcaklığında laboratuvara transfer edilen rektal sürüntü örnekleri, laboratuar ortamında önce zenginleştirme ve saklama amaçlı sıvı LB besiyerine ekilmiş ve 1 gece 37°C'de çalkalamalı olarak inkübasyona bırakılmıştır. Sıvı kültür örnekleri %20 gliserollü (Merck), ortamda -80°C'lik derin dondurucuda (New Brunswick Scientific Ultra Low Temperature Freezer U570) daha sonraki bakteriyolojik çalışmalar için stoklanmıştır. Sıvı örnekler Eosine Methylen Blue (EMB) agara (RTA Lab) tek koloni yöntemiyle ekim yapılmıştır 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 agara ekilmiştir. Besiyerleri 37°C'de 18-24 saat inkübasyon sonrasında değerlendirmeye alınmıştır. Koloni morfolojisi, Gram boyama yöntemiyle boyanma özelliği ve biyokimyasal testler (sitratı kullanma testi, üre hidrolizi, Three Sugar Iron (TSI) agarda üreme özellikleri, metil kırmızısı testi, Voges-Proskauer testi ve indol üretme özelliği) kullanılarak koliform tanımlanması klasik mikrobiyolojik yöntemlerle yapılmıştır (Bilgehan, 1995). 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 edilmiştir. Tanımlanan suşlar diğer testleri yapmak üzere %20 gliserol içeren sıvı LB besiyerinde -20°C'de stoklanmıştır.

3.3. Biyokimyasal Testler:

3.3.1. İndol Testi

İndol besiyeri hazırlandı; İndol besiyeri içerisinde pepton, sodyum klorür ve su olduğundan aynı içerikteki LB besiyeri kullanıldı, tüplere dağıtıldı ve otoklavlandı (Daihan, WiseClave). İndikatör olarak Kovac's ayıracı (50ml için; 5g p-dimethylaminobenzaldehyde (Himedia) 75ml amyl-alkol (Merck), 25ml konsantre HCl (Merck) kullanıldı (Bilgehan, 1995). Mikroorganizmalar sıvı besi yerine ekildikten sonra 37 °C de 1 gün inkubasyona bırakıldı. Kültürlerin üzerine Kovac's ayıracından 4-5 damla ilave edildi ve iyice karıştırıldı. Tüplerin üst kısmında bir iki dakika içinde koyu pembe (Çingene pembesi) renginde bir halka oluşanlar pozitif olarak, sarımsı halka negatif olarak değerlendirildi.

3.3.2. Metil Kırmızısı Testi

Metil kırmızısı besiyeri (Clark-Lubs besiyeri 1 lt için; 7g polypepton (Pronadisa), 5g glukoz (Riedel-de Haen), 5g K_2HPO_4 (Himedia) distile su içerisinde çözüldü, pH:6.9'a ayarlandı) hazırlandı ve 3'er ml tüplere dağıtılarak otoklavlandı. Metil kırmızısı ayracı (80 ml için; 0,01g metil kırmızısı (Himedia), 30ml etil alkol (Merck), 50 ml distile su) (Bilgehan, 1995). Besiyerlerine ekimler yapıldı ve tüpler 37 °C de 1 gün inkubasyona bırakıldı. Metil kırmızısı solusyonunundan 4-5 damla damlatıldı ve iyice karıştırıldı. Metil red, besiyerine

damlatıldıktan sonra besiyerinin rengi kırmızı renge dönmesi pozitif, sarı renkte görülmesi ise negatif reaksiyon olarak değerlendirildi.

3.3.3. Voges Proskauer (VP) testi

Voges Proskauer testi için metil kırmızısı testinde kullanılan besiyeri (Clark-Lubs, pH 6.9) kullanıldı (Bilgehan, 1995). %5 α-naphtol (Himedia) ve %40 KOH (Himedia) ayıracı hazırlandı. Besiyerine kültürlerden ekildi ve 37°C de bir gece inkübe edildi. Bu sürenin sonunda kültürlere α-naphtol ayıracından birkaç damla ilave edilerek hafifçe çalkalandı ve su banyosunda (37°C de) 4 saat tutuldu. Aralıklı olarak hafifçe çalkalandı. Beyaz, süt şeklinde bir görüntü gözlemlendi. Daha sonra ikinci ayıraç olan %40 KOH 3-4 damla damlatıldı. Birkaç saat sonra kırmızı rengin gözlendiği tüpler pozitif, diğerleri negatif kabul edildi.

3.3.4. Sitrat Kullanım Testi

Simon's sitrat besiyeri hazırlandı ya da hazır besiyerleri (Or-Bak Lab) firmalardan temin edildi. Sitrat besiyeri ısıtılarak çözüldü hazırlandı ve 4ml olacak şekilde tüplere dağıtıldı ve otoklavlandı. Otoklavdan çıktıktan sonra bir yere yaslanarak eğik bir şekilde donması sağlandı. İğne öze ile yüzeye ekim yapıldı ve dibe 1-2 kez batırıldı. 37 °C de 1 gün inkubasyona bırakıldı. Renk değişimi gözlemlendi; mavi renk pozitif, yeşil renk negatif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

3.3.5. Triple Sugar Iron (TSI) Agarda Üreme Özellikleri

TSI agarda *Enterobacteriaceae* üyelerinin glukoz ve laktoz veya sükrozu fermentatif olarak kullanıp kullanamadığı ve hidrojen sülfür ve karbondioksit gazı oluşturup oluşturamadığı incelenmesi amacıyla gerçekleştirildi. Yatık bir şekilde hazırlanmış TSI agar besiyerine (Or-Bak Lab) iğne öze ile yüzeye ekim yapıldı ve dibe 1-2 kez batırıldı. 37 °C de 1 gün inkubasyona bırakıldı. 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. Hava kabarcıklarının varlığı ise gaz oluşumunun pozitif olarak değerlendirildi. Ayrıca besiyerinin

renginin siyaha dönmesi ve dip kısma çökmesi H_2S pozitif olarak değerlendirildi (Bilgehan, 1995).

3.4. VITEK-2 Otomatize Sistemi İle Tanımlama

Biyokimyasal testlerle tiplendirme yanında VITEK-2 otomatize sistemi (Biomerieux, Vitek 2) ile tekrar tiplendirme yapıldı. 160 suşun 154 tanesi tiplendirildi.

3.5. MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/İonization- Time of flight Mass Spectrometer) Analizi ile Tanımlama

160 adet suşun, biyokimyasal ve VİTEK-2 ile tiplendirilemeyen 6 suş, Acıbadem Üniversitesi (İstanbul), Acıbadem Labmed Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuarında MALDI-TOF analizi ile tiplendirildi.

3.6. Antimikrobiyal Hassasiyet Deneyleri:

Antimikrobiyal hassasiyet deneyleri *Clinical and Laboratory Standarts Institute Guidelines* (CLSI) rehberine uygun olarak standart disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır (CLSI, 2014). Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT), streptomisin (STR), gentamisin (GN), siprofloksasin (CİP), sulbaktam/ampisilin (SAM), imipenem (İPM), ampisilin (AMP), seftazidim (CAZ), sefazolin (KF), sefuroksim (CFX) ve tetrasiklin (TE), kloramfenikol (C) olmak üzere toplamda 12 antibiyotiğe (Bioanalyse) duyarlılıkları (CLSI) önerileri doğrultusunda araştırılmıştır. Antibiyogramların kalite kontrollerinde *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır. Bakteriler nutrient agarda canlandırılıp, titresi 0.5 MacFarland bulanıklığına (yaklaşık 1,5 x 10^8 CFU/mL) ayarlandıktan sonra, dört milimetre kalınlığındaki Mueller-Hinton agar besiyeri (RTA Lab) plaklarına yüzeysel yayma ekimleri yapıldı. Diskler yerleştirildikten sonra plaklar 35ºC'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı ve inkübasyondan sonra inhibisyon zon çapları ölçülerek bu antibiyotiklere karşı hassasiyetleri (CLSI, 2014) kriterlere göre hassas (S), orta hassas (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirildi. Direnç sıklığı hesaplamalarında orta hassas izolatlar hassas olarak kabul edildi. Testlerde kalite kontrol olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

3.7. Toplam DNA izolasyonu:

Kanlı agarda (RTA) üretilen suşlardan bir öze dolusu alınarak, 1ml su içerisinde homojen bir şekilde çözüldü, vortekslendi. 13.000 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atılarak yeniden 1ml su eklendi. Bu yıkama işlemi 3 kez tekrarlandı. Üçüncü kez vorteks yapıldıktan sonra daha önce 95°C'ye ayarlanmış olan ısıtıcı bloğa yerleştirildi ve 10dk bekletildi. Son olarak 4°C'de 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edildi. Süpernatant kısmı (kalıp DNA) temiz bir ependorfa alınarak sonraki kullanımlar için alikotlar halinde derin dondurucuda saklandı. Kaynatma DNA PZR reaksiyonlarında kullanıldı (Ausubel ve ark., 1995).

3.8. İntegron Gen Kasetlerinin PZR İle Taranması:

PZR reaksiyonu suşların kaynatma metodu ile elde edilen DNA'ları kullanıldı. Pozitif kontrol olarak *E. coli* KD39 (sınıf 1 integron pozitif), *E. coli* KD36 (sınıf 1 ve sınıf 2 integron pozitif), *E. coli* KD8 (sınıf 1 integron değişken bölge pozitif) (Özgümüş ve ark. 2009), *E. coli* ACC172 (sınıf 2 integron pozitif) (Çopur Çiçek ve ark. 2014) kullanıldı. Master mix hazırlama aşamasında bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Tablo 2'de belirtilen bileşenler -20°C'den çıkartılıp buz üzerinde çözünmeleri sağlandı.

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

Tablo 2: PZR reaksiyonunda kullanılan master mix bileşenleri ve miktarları

Çözündükten sonra tüpler kısa bir süre vortekslenerek master mix bileşenleri 1.5 mL'lik ependorf tüpe transfer edildi. Hazırlanan master mix karışımı 30 sn vortekslendikten sonra santrifüj işlemi yapıldı. Her bir PZR tüpüne (0.2 mL'lik) master mix karışımdan 48 µL ve 2'şer µL DNA eklendi. Negatif kontrol olarak master mix hazırlanırken kullanılan su, pozitif kontrol olarak ise daha önceden her gen için pozitif olan bakteri DNA'sı kullanıldı. Örnekler termal döngü cihazına yerleştirildi ve uygun programda çalıştırıldı.

İzolatlardaki integron varlığının belirlenmesinde sınıf 1 integraz (*intI*1) gen bölgesi ve sınıf 2 integraz (*intI*2) gen bölgesi için primerler kullanıldı. İntegraz genleri pozitif çıkan örneklerde integronların değişken bölgelerinin çoğaltılması için sınıf 1 integron ve sınıf 2 integronların değişken bölgelerini çoğaltan primerleri kullanıldı (Tablo 3).

Primer	**Nükleotid dizisi (5'→ 3')**	**Hedef Gen Bölgesi**	**Amplikon (bp)**	**Referans**
IntI-1F IntI-1R	GGTCAAGGATCTGGATTTGG ACATGCGTGTAAATCATCGTC	Sınıf 1 integron integraz geni (*intI*1)	500	Machado ve ark. 2005
IntI-2F IntI-2R	CACGGATATGCGACAAAAAGGT GTAGCAAACGAGTGACGAAATG	Sınıf 2 integron integraz geni (*intI*2)	740	Machado ve ark. 2005
5'-CS 3'-CS	GGCATCCAAGCAGCAAG AAGCAGACTTGACCTGA	Sınıf 1 integron değişken bölge	Değişken	Levesque ve ark. 1995
hep51 hep74	GATGCCATCGCAAGTACGAG CGGGATCCCGGACGGATGCACGATTTGTA	Sınıf 2 integron değişken bölge	Değişken	White ve ark. 2001

Tablo 3: Oligonükleotid primerler ve özellikleri

PZR reaksiyonu için termal döngü cihazında (Applied Biosystems) kullanılan reaksiyon koşulları Tablo 4'de belirtildi (Levesque ve ark. 1995, White ve ark. 2001 ve Machado ve ark. 2005).

Aşama	**Sıcaklık (°C)**	**Süre (dk)**	**Döngü sayısı**
İlk denatürasyon	94	5	1
Denatürasyon	94	1	30
Bağlanma	57-58	1	
Uzama	72	1	
Son uzama	72	10	1

Tablo 4: PZR reaksiyon koşulları

3.9. Agaroz Jel Elektroforezi ve Görüntüleme:

Çalışmada PZR ürünlerinin yürütülmesinde %2 agaroz ve elektrolit olarak Tris (Merck)-EDTA (Merck)-Asetik (Sigma) asit tamponu (pH 8,4) kullanıldı. Jele son konsantrasyonu 0.5 µg/mL olacak şekilde etidyum bromür (Amresco) eklendi. DNA'nın jel üzerinde izlenebilmesi için yükleme tamponu olarak (Orange G (Himedia) bileşeni kullanıldı. Örneklerin jelde dağılmaması için ilk etapta jel düşük voltta yürütüldükten sonra elektroforez tankının hızı 80-100 volt aralığına çıkartıldı (Ausubel ve ark., 1995). Bantların büyüklüklerinin belirlenmesi için moleküler ağırlık standardı (100bp DNA ladder, Vivantis) kullanıldı. Oluşan bantlar UV transilluminatörde (Firma) gözlendi ve jelin fotoğrafı jel görüntüleme cihazında (DNr Bio-Imaging Systems) çekildi ve değerlendirildi.

3.10. Pulsed-Field Gel Elektroforezi (PFGE)

160 suş içerisindeki 17 adet koliform *E. coli* suşunun PFGE metodu ile klonal yakınlıklarının araştırıldı. PFGE uygulamasında Durmaz ve ark. (2009) optimize ettikleri protokol izlendi. Standart suş olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanıldı.

Tek koloni şeklinde ekilerek saf kültürleri elde edilen suşlar, plastik öze ile toplanarak 4 ml HST (Hücre süspansiyon Tamponu:100mM Tris-HCL, 100mM EDTA pH:8.0) içinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu 11.200 rpm'de 4^{o}C'de, 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üstteki HST atıldı. Pelletin üzerine tekrar 1 ml soğuk HST eklenerek kısa süreli vorteks yapıldı. Bakteri yoğunluğu, spektrofotometre (Perkin Elmer Lambda 25) yardımıyla 590 nm'de 1 absorbans olarak ayarlandı. HST içerisinde % 2'lik düşük erime ısılı agaroz hazırlandı. Hazırlanan agaroz 50^{o}C'lik ısı bloğuna (HLC) konuldu ve % 10'luk sodyum dodesil sülfat (SDS)'den 1 ml eklenerek karıştırıldı. . Hücrelerin agaroz içinde homojen dağılması sağlanarak bekletilmeden Hücre-Agaroz-SDS karışımından hava kabarcığı olmayacak şekilde agaroz kalıbına 100 µl dağıtıldı. Kalıplar, +4^{o}C'de agaroz katılaşıncaya kadar bekletildi. Hücrelerin parçalanması için, HLS-1 [Hücre Liziz Solüsyonu; 50 mM Tris-HCL (pH 8.0), 50 mM EDTA, 2.5 mg/ml lizozim, 1.5mg/ml proteinaz K] solüsyonunda 37^{o}C'de 1 saat ve daha sonra HLS-2 [HLS–2; 0.5 M EDTA, % 1 sarkozil, 400 µg/ml proteinaz K] 55^{o}C'de 2 saat çalkamalı su banyosunda bekletildi. Parçalanma solüsyonun uzaklaştırmak için 3 kere su 3 kere de 4ml'lik TE tamponu ile 50°C çalkamalı su banyosunda 15 dakika yıkamaları yapıldı. Bir lam üzerine alınan agaroz kalıbı bistüri

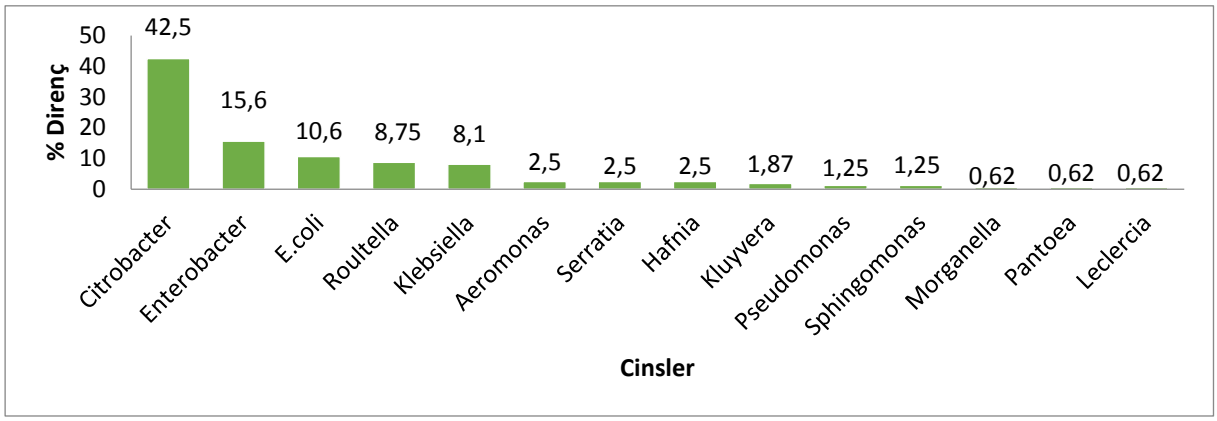
yardımıyla ¼ oranında kesilerek *Xba*I enzimi ile kesildi. 0.5X 100 ml TBE % 1'lik agaroz içerisine, tarak üzerine yerleştirilen kalıpların yerleştirilerek dondurulması ile hazırlanan jel, PFGE sisteminde (BioRad CHEF-DRII) elektroforez koşulları protokolde belirtilen şekilde yürütüldü.

- Başlangıç vuruş süresi 5 sn
- Bitiş vuruş süresi 30 sn
- Vuruş açısı 120^{o}
- Akım $6V/cm^{2}$
- Sıcaklık $14^{o}C$
- Süre 20saat

Elektroforezden sonra jel, etidyum bromür içeren ultra saf su içine alındı. 20 dakika boyanarak UV ışığı altında görüntülendi. Jel görüntüleme sistemi (DNr Bio-Imaging Systems) kullanılarak DNA bant görüntülerinin fotoğrafı çekildi. Resimler TIFF formatında kaydedildi. PFGE'den sonra Bionumerics (Applied Maths, Inc., Belçika, 6.01 versiyon) programı kullanılarak bant profillerinin dendogram analizi yapıldı. Klonal ilişkilerin değerlendirilmesinde, Tenover ve ark. (1995) optimize ettikleri prosedür kullanıldı.

4. BULGULAR

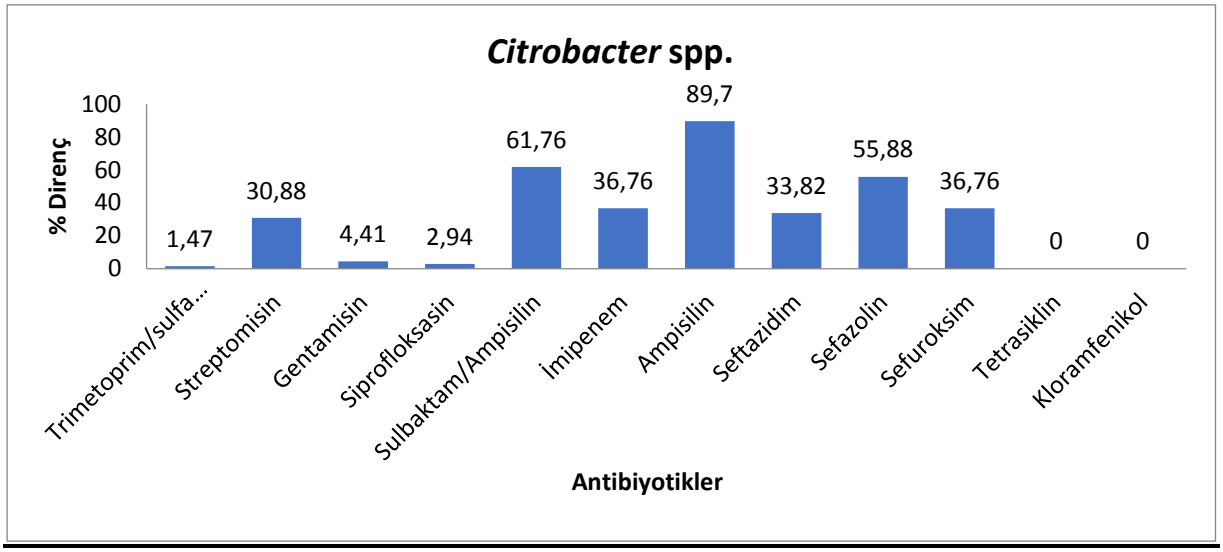
Toplamda 160 suşun, 68'i *Citrobacter*, 25'i *Enterobacter*, 17'si *E. coli*, 14'ü *Raoultella*, 13'ü *Klebsiella*, 4' *Aeromonas*, 4'ü *Serratia*, 4'ü *Hafnia*, 3'ü *Kluyvera*, 2'si *Pseudomonas*, 2'si *Sphingomonas*, 1'i *Morganella*, 1'i *Stenotrophomonas*, 1'i *Pantoea*, 1'i *Leclercia* olarak belirlenmiştir. Bakterilerin direnç oranları *%42, 5 Citrobacter, %15,6 Enterobacter, %10,6 E. coli, %8.75 Raoultella, %8.1 Klebsiella, %2.5 Aeromonas, Serratia, Hafnia, %1,87 Kluyvera, %1.25 Pseuomonas, Sphingomonas, %0.62 Morganella, Stenotrophomonas, Pantoea, Leclecia* olarak Şekil 3'de gösterilmiştir.



Şekil 3: Bakteri gruplarının dağılımı.

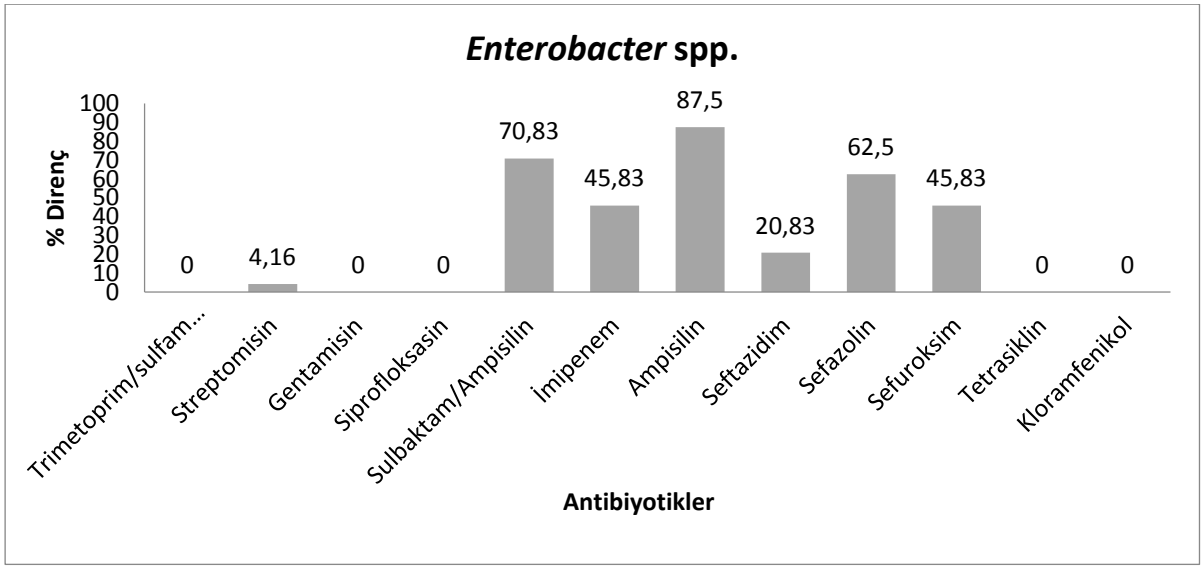
Bu bakteri gruplarından en yüksek oran gösteren *Citrobacter, Enterobacter, E.coli, Roultella ve Klebsiella*'nın antibiyotiklere dirençleri tek tek hesaplanmıştır. (Şekil 4, Şekil 5, Şekil 6, Şekil 7, Şekil 8).

Antibiyotik duyarlılık testlerinde, 68 *Citrobacter*'den 1 tanesi trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) dirençli, 21 tanesi streptomisin (STR) dirençli, 3 tanesi gentamisin (GN) dirençli, 2 tanesi siprofloksasin (CİP) dirençli, 42 tanesi sulbaktam/ampisilin (SAM) dirençli, 25 tanesi imipenem (İPM) dirençli, 61 tanesi ampisilin (AMP) dirençli, 23 tanesi seftazidim (CAZ) dirençli, 38 tanesi sefazolin (KF) dirençli, 25 tanesi sefuroksim (CFX) dirençli olarak belirlenmiş, tetrasiklin (TE) ve kloramfenikol (C) dirençli olan *Citrobacter* suşu belirlenememiştir.



Şekil 4: *Citrobacter*'lerin antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

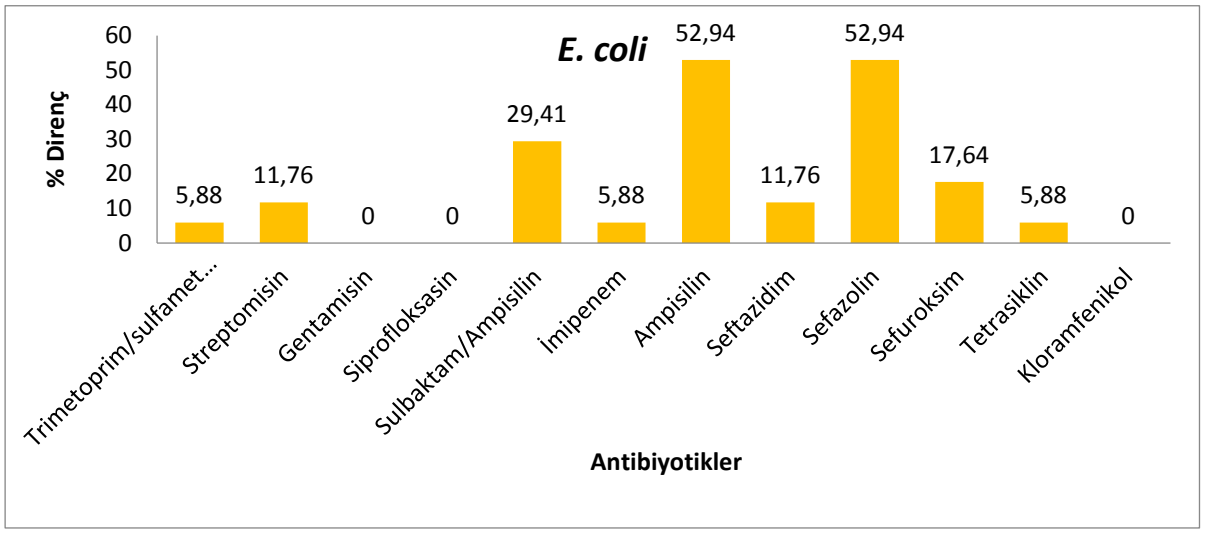
Antibiyotik duyarlılık testlerinde, 25 *Enterobacter*'den 1 tanesi streptomisin (STR) dirençli, 17 tanesi sulbaktam/ampisilin (SAM) dirençli, 11 tanesi imipenem (İPM) dirençli, 21 tanesi ampisilin (AMP) dirençli, 5 tanesi seftazidim (CAZ) dirençli, 15 tanesi sefazolin (KF) dirençli, 11 tanesi sefuroksim (CFX) dirençli olarak belirlenmiş, Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT), gentamisin (GN), siprofloksasin (CİP), tetrasiklin (TE) ve kloramfenikol (C) dirençli olan *Enterobacter* suşu belirlenememiştir.



Şekil 5: *Enterobacter*'lerin antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

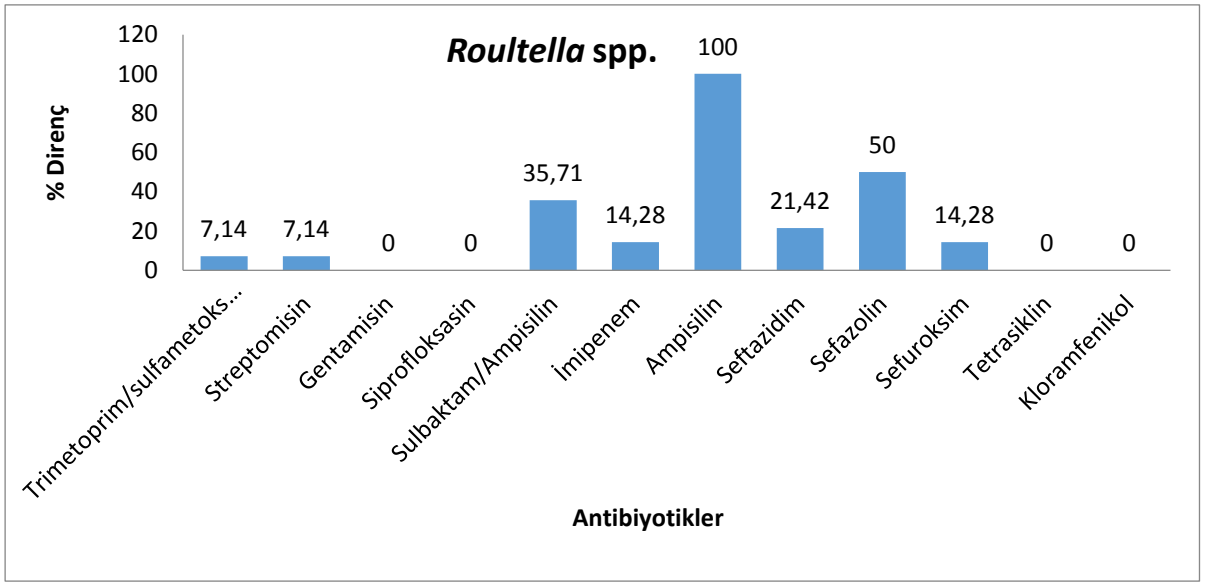
Antibiyotik duyarlılık testlerinde, 17 *E.coli*'den 1 tanesi Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) dirençli, 2 tanesi streptomisin (STR) dirençli, , 5 tanesi sulbaktam/ampisilin (SAM) dirençli, 1 tanesi imipenem (İPM) dirençli, 9 tanesi ampisilin (AMP) dirençli, 2 tanesi

seftazidim (CAZ) dirençli, 9 tanesi sefazolin (KF) dirençli, 3 tanesi sefuroksim (CFX) dirençli, 1 tanesi tetrasiklin (TE) dirençli olarak belirlenmiş, gentamisin (GN), siprofloksasin (CİP), kloramfenikol (C) dirençli olan *E. coli* suşu belirlenememiştir.



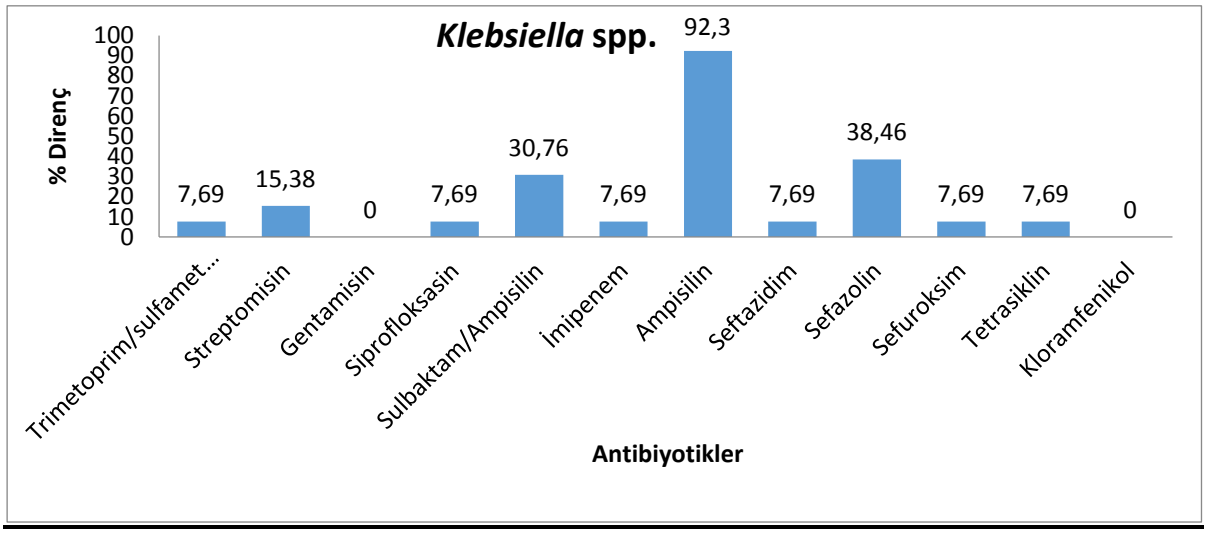
Şekil 6: *E. coli*'lerin antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

Antibiyotik duyarlılık testlerinde, 14 *Roultella*'dan 1 tanesi Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) dirençli, 1 tanesi streptomisin (STR) dirençli, 5 tanesi sulbaktam/ampisilin (SAM) dirençli, 2 tanesi imipenem (İPM) dirençli, 14 tanesi ampisilin (AMP) dirençli, 3 tanesi seftazidim (CAZ) dirençli, 7 tanesi sefazolin (KF) dirençli, 2 tanesi sefuroksim (CFX) dirençli olarak belirlenmiş, gentamisin (GN), siprofloksasin (CİP), tetrasiklin (TE), kloramfenikol (C) dirençli olan *Roultella* suşu belirlenememiştir.



Şekil 7: *Roultella* 'ların antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

Antibiyotik duyarlılık testlerinde, 13 *Klebsiella*'dan 1 tanesi Trimetoprim-sulfametoksazol (SXT) dirençli, 2 tanesi streptomisin (STR) dirençli, , 1 tanesi siprofloksasin (CİP) dirençli, 4 tanesi sulbaktam/ampisilin (SAM) dirençli, 1 tanesi imipenem (İPM) dirençli, 12 tanesi ampisilin (AMP) dirençli, 1 tanesi seftazidim (CAZ) dirençli, 5 tanesi sefazolin (KF) dirençli, 1 tanesi sefuroksim (CFX), 1 tanesi tetrasiklin (TE) dirençli olarak belirlenmiş, gentamisin (GN) ve kloramfenikol (C) dirençli olan *Klebsiella* suşu belirlenememiştir.



Şekil 8: *Klebsiella*'ların antibiyotiklere direncinin % değerlendirmesi.

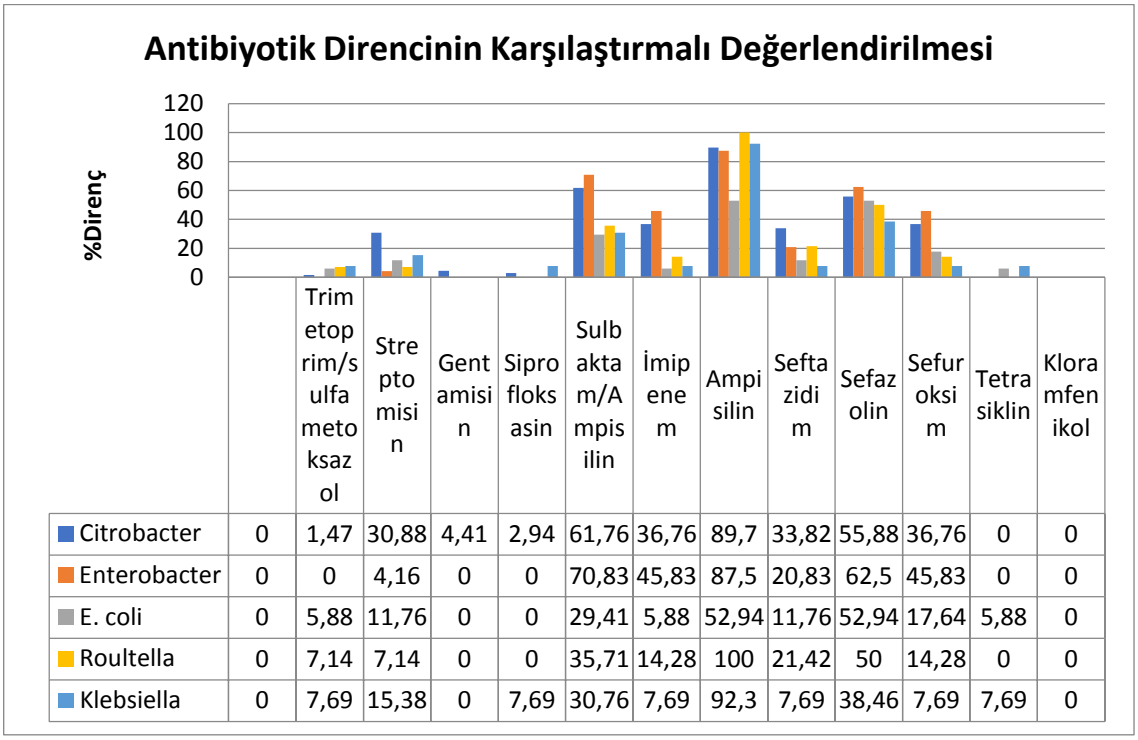
Toplam suşlar içerisinde sayıca daha az olan diğer bakteri gruplarının antibiyotik dirençleri oransal olarak ifade edilmiştir. Bu oranlar Tablo 5'de gösterilmiştir.

Bakteri Türü (n)*	Antibiyotik**											
	SXT	**S**	**CN**	**CIP**	**SAM**	**IMP**	**AMP**	**CAZ**	**CZ**	**CXM**	**TE**	**C**
***Aeromonas* (n=4)**	0	0	0	0	4/4	4/4	4/4	0	3/4	1/4	1/4	0
***Serratia* (n=4)**	0	0	0	0	1/4	0	3/4	2/4	3/4	1/4	0	0
***Hafnia* (n=4)**	0	0	0	0	4/4	1/4	4/4	1/4	4/4	3/4	0	0
***Kluyvera* (n=3)**	1/3	0	0	0	0	1/3	3/3	0	3/3	2/3	0	0
***Pseudomonas* (n=2)**	2/2	0	0	0	2/2	0	2/2	1/2	2/2	2/2	0	2/2
***Sphingomonas* (n=2)**	0	1/2	1/2	0	2/2	2/2	2/2	1/2	2/2	2/2	0	0
***Morganella* (n=1)**	0	0	0	0	1/1	0	1/1	0	1/1	1/1	1/1	1/1
***Stenotrophomonas* (n=1)**	0	1/1	1/1	0	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0	0
***Pantea* (n=1)**	0	0	0	0	0	0	1/1	0	0	0	0	0
***Leclecia* (n=1)**	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

*n, izole edilen suş sayısı; ** SXT, trimetoprim/sulfametoksazol; S, streptomisin; CN, gentamisin; CİP, siprofloksasin; SAM, sulbaktam/ampisilin; İMP, imipenem; AMP, ampisilin; CAZ, seftazidim; CZ, sefazolin; CXM, sefuroksim; TE, tetrasiklin; C, kloramfenikol

Tablo 5: Diğer bakteri gruplarının antibiyotik direnç oranları.

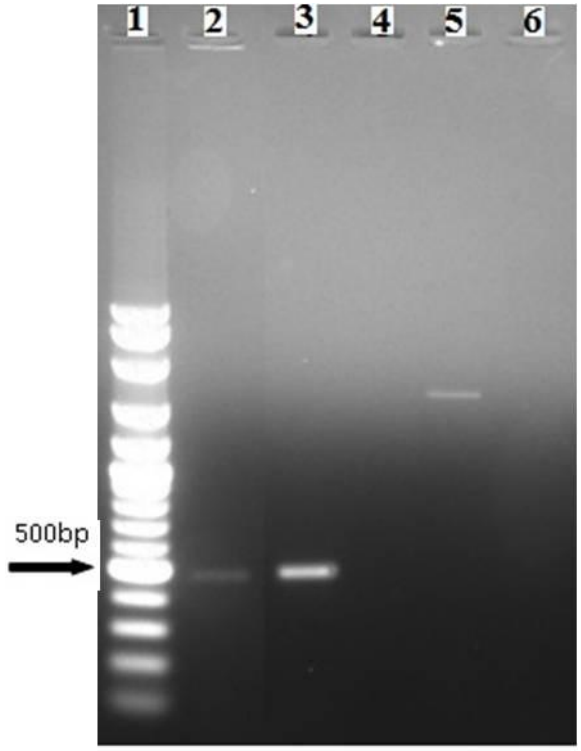
Yüksek oran gösteren *Citrobacter, Enterobacter, E.coli, Roultella ve Klebsiella*'nın antibiyotiklere dirençleri bir grafikle karşılaştırmalı olarak gösterilmiş ve karşılaştırılmıştır (Şekil 9).



		Trimetoprim/sulfametoksazol	Streptomisin	Gentamisin	Siprofloksasin	Sulbaktam/Ampisilin	İmipenem	Ampisilin	Seftazidim	Sefazolin	Sefuroksim	Tetrasiklin	Kloramfenikol
Citrobacter	0	1,47	30,88	4,41	2,94	61,76	36,76	89,7	33,82	55,88	36,76	0	0
Enterobacter	0	0	4,16	0	0	70,83	45,83	87,5	20,83	62,5	45,83	0	0
E. coli	0	5,88	11,76	0	0	29,41	5,88	52,94	11,76	52,94	17,64	5,88	0
Roultella	0	7,14	7,14	0	0	35,71	14,28	100	21,42	50	14,28	0	0
Klebsiella	0	7,69	15,38	0	7,69	30,76	7,69	92,3	7,69	38,46	7,69	7,69	0

Şekil 9: *Citrobacter*, *Enterobacter*, *E. coli*, *Roultella ve Klebsiella*'nın karşılaştırmalı antibiyotik direnç oranları.

160 suştan bir *E. coli* suşunda (*E. coli*, S1c2) PZR ile boş bir sınıf 1 integron tespit edildi (Şekil 10). Moleküler büyüklüğü DNA ladder yardımı ile kontrol edildi.



Şekil 10: Agaroz jel elektroforez analizi. 1, Moleküler ağırlık markeri (100bp DNA ladder, Vivantis); 2, *E. coli* KD39 (sınıf 1 integron); 3, *E. coli* S1c2 (sınıf 1 integron); 4, Negatif kontrol; 5, KD36 (Sınıf1 ve Sınıf2 pozitif); 6, *E. coli* S1c2

160 suş içerisindeki 17 adet fekal koliform (*E. coli)* suşunun PFGE metodu ile klonal yakınlıklarının araştırılmış, Toplam 17 Suş Tennover 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 11).

1. küme (T3C1-S1C1)

1.pulsotip (4 suş)

2. pulsotip (3 suş)

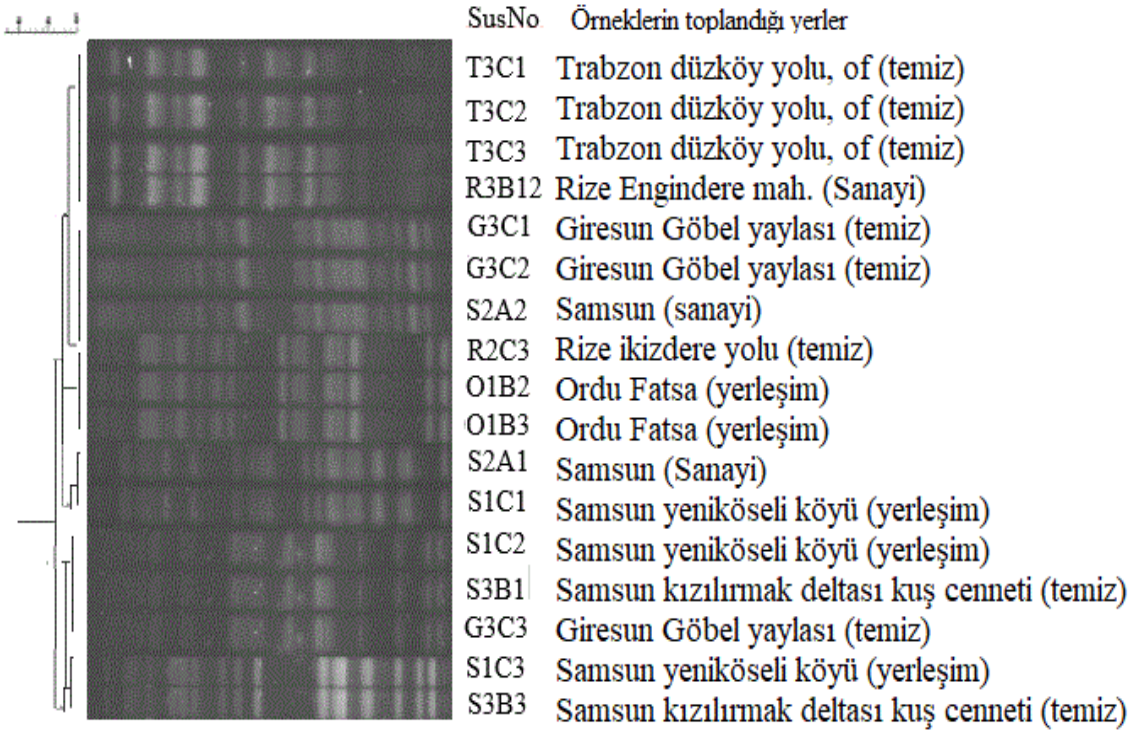
3. pulsotip (3 suş)

4. pulsotip (2 suş)

2.küme (S1C2-S3B3)

1. pulsotip (3 suş)

2. pulsotip (2 suş)



Şekil 11: PFGE görüntülerinin dendogram analizi.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

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 ve ark. 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 ve ark. 2013). Antibiyotik ve diğer kirleticilerin karışımı, dirençli bakteriler ve onların metabolitleri, işlenmiş ve işlenmemiş lağım suları, hastane atıkları, akva kültür 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 ve ark. 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 ve ark. 2007), kemirgenler (Poeta ve ark. 2009) gibi memelilerden, kuşlardan (Gilliver, 1999), balıklardan (Poeta ve ark. 2008; Bonnedahl ve ark. 2009) ve böceklerden (Kadavy ve ark. 2000) soyutlandığını göstermiştir. Bu bakteriler insan atıklarından veya insanla ilişkili materyallere maruz kalarak kazanılabilir ya da bu hayvanların normal kommensal flora elemanları da olabilir.

Amfibilerden özellikle kurbağalar su birikintilerinde ve mikroplarca zengin toprak ve çamur içinde yaşarlar. Hird ve ark (1983) kurbağa ve iribaşlardan *E. coli*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Hafnia*, *Providencia*, *Morganella* ve *Yersinia* türleri izole etmişlerdir. Bizim çalışmada 14 farklı tür (Şekil 3) izole edildi fakat *Salmonella*'lara ve *Proteus*'a rastlanmadı. Çalışmamızda tanımladığımız *Citrobacter* (Ferranti ve ark. 2018), *Enterobacter* (Sheng ve ark. 2012), *E. coli* (Kaper ve ark. 2004), *Raoutella* (Chun ve ark 2014), *Klebsiella* (Sheng ve ark. 2012), *Aeromonas* (Spadaro ve ark. 2014), *Serratia* (Aljorayid ve ark. 2016), *Hafnia* (Michalski ve ark. 2015), *Kluyvera* (Koroglu ve ark. 2010), *Pseudomonas* (Hurley 2019), *Sphingomonas* (Tai ve Velayuthan 2014), *Morganella* (Li ve ark. 2019), *Stenotrophomonas* (Thet ve ark. 2019), *Pantoea* (Asai ve ark. 2019) ve *Leclercia* (Anuradha 2014) türlerinin insan hastalıklarından izole edildiği literatürde gösterilmiştir. Hacıoğlu ve Tosunoğlu (2014) Türkiye'de Kavak Deltası'nda

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 kanısındayız. Boman (2000) yaptığı çalışmada kurbağalardan nalidiksik asit, rifampisin ve streptomisine dirençli koliform bakteriler izole etmişlerdir. Bizim çalışmamızdaki bakteri türlerinin ikiden fazla antibiyotiğe dirençli olması, yani çoğul direnç fenotipi göstermesinin yanında, seftazidim, imipenem, siprofloksasin, sulbaktam/ampisilin ve gentamisin gibi klinik kullanımda olan antibiyotiklere %1-70 oranda direnç gösterdiğinin tespit edilmesi antropojenik kirliliğin bir göstergesi olabilir. Her ne kadar istasyonlarda örnekleme yapılan kurbağalardan izole ettiğimiz bakterilerin direnç oranlarının istatistikî bir karşılaştırması yapılmasa da, kurbağa ve iribaşların barsak floralarının 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.

Cissell (2006) yüksek lisans çalışmasında sığırların erişebileceği göletlerden elde edilen *E. coli*'de düşük prevalansta sınıf 1 integron kaydetmiştir. 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, florfenikol 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 görmüşlerdir. Bizim çalışmamızda 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 bakterilere de aktarabilme potansiyelinde olduklarını akla getirmektedir. Samsun'da bir yerleşim yerindeki kurbağada bulunan bu *E. coli* (s1c2), PFGE sonuçlarına göre Samsundaki temiz bir bölgede (Kızılırmak deltası kuş cenneti) yakalanan bir kurbağadan ve Giresun'da temiz bir bölgede (Göbel yaylası) yakalan kurbağadan izole edilen *E. coli*'lerle (sırasıyla s3b1, g3c3) genotipik olarak benzer bulundu. Yaptığımız PFGE analizlerine göre, çok farklı kaynaklı koliform *E.coli*

suşları arasında benzerlik oranı oldukça yüksek olarak belirlendi. Örneklerin hem toplandıkları şehirlerin farklı olması hem de örnek yeri olarak yerleşim, temiz ya da sanayi olarak farklı kaynaklara ait olmasına rağmen, klonal yakınlık göstermiş olması dikkat çekici bulundu (Şekil 11). Wang ve ark (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 kurbağa ve balık izolatları arasında karşılıklı genotipik ilişki tespit etmişlerdir.

Sonuç olarak, ülkemizde kozmopolit bir tür olarak bilinen *Pelophylax* (Ova kurbağası) türünden izole edilen Gram-negatif basillerin (fermentatif ve/veya nonfermentatif) genel olarak antibiyotiklere yüksek oranda dirençli olduklarını gördük. Dirençli bakteriler örnekleme yapılan her ortamda (temiz, yerleşim ve sanayi) yaşayan kurbağalardan izole edildi. İndikatör bir tür olan bu kurbağalardaki dirençli bakterilerin varlığının insan kaynaklı kirliliğin önemli bir göstergesi olduğu kanısındayız. 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 arttırdığını çevrede özellikle bu suşların generasyonlarının dolaştığı hipotezini kurabiliriz. Özellikle *E. coli* gibi daha çok insan ve hayvan orijinli fekal koliformların hastalandırıcı özellikleri ve filogenetik sınıflamasının ileri çalışmalarla aydınlatılması gerektiğini söyleyebiliriz. Bunun için direncin altta yatan genetik mekanizmalarının, mobil genetik elemanlarının ve bu elemanları taşıyan suşların moleküler epidemiyolojilerinin aydınlatılması ve analiz edilmesi, amfibi örneklemelerinin ülke ve hatta küresel çerçevede yaygınlaştırılarak, sürveyan çalışmaları halinde değerlendirilmesini önerebiliriz. *Escherichia coli* haricinde izole edilen diğer bakteri türlerinin hepsinin literatürde insan hastalıklarının bazılarının sebepleri olabileceği yukarıda açıklanmıştı. Bu bakterileri de *E. coli* gibi potansiyel virülans faktörlerinin ve genotipik yakınlıkların belirlenmesi ve yayılma yollarının aydınlatılması için ileri çalışmalara ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

6. REFERANSLAR

About Antimicrobial Resistance-Antibiotic/Antimicrobial Resistance - CDC". www.cdc.gov. 19 September 2017.

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

Amphibiaweb, http://amphibiaweb.org/ Son Erişim Tarihi: 15.01.2019.

Antibiotic Resistance Questions "Answers. Get Smart: Know When Antibiotics Work. Centers for Disease Control and Prevention, USA. 30 June 2009. Retrieved 20 March 2013. Antimicrobial resistance Fact sheet N°194." who.int. April (2014).

Anuradha M. 2014. "*Leclercia adecarboxylata* isolation: Case reports and review." *Journal of Clinical and Diagnostic Research* 8(12): DD03-DD04.

Asai N, Koizumi Y, Yamada A, Sakanashi D, Watanabe H, Kato H, Shiota A, Hagihara M, Suematsu H, Yamagishi Y and Mikamo H. 2019. "*Pantoea dispersa* bacteremia in an immunocompetent patient: a case report and review of the literature." *Journal of Medical Case Reports* 13(33): 1-5.

ASM Science. The Integron: Adaptation On Demand". doi:10.1128/microbiolspec.mdna3-0019-2014.

Ausubel FM, Brient R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. 1995. *Short Protocols in Molecular Biology* (2nd ed), New York, John Willey & Sons.

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." *Applied and Environmental Microbiology* 78(12): 4281-4287.

Bennett PM. 2008. "Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria." *British Journal of Pharmacology* 153: 347-357.

Bennett PM. 1999. "Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 43(1): 1-4.

Bilgehan H, *Klinik Mikrobiyolojik Tanı*. 1995.

Blaustein AR, Wake DB. 1990. "Declining amphibian populations: a global phenomenon." *Trends in Ecology and Evolution* 5(7): 203-204.

Boman HG. 2000. "Innate immunity and the normal microflora." *Immunological Reviews* 173(1): 5-16.

Bonnedahl J, Drobni M, Gauthier-Clerc M, Hernandez J, Granholm S, Kayser Y, Melhus A, Kahlmeter G, Waldenstrom J, Johansson A et al. 2009. "Dissemination of *Escherichia coli* with CTXM type ESBL between humans and yellow-legged gulls in the south of France." *PLoS One* 4:e5958.

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

Carroll D, Wang J, Fanning S, McMahon BJ. 2015. "Antimicrobial resistance in wildlife: Implications for public health." *Zoonoses and Public Health* 62(7): 534-542.

Chun S, Yun J W, Huh HJ, Lee NY. 2014. "Low virulence? Clinical characteristics of *Raoultella planticola* bacteremia." *Infection* 42: 899-904.

Cissell, Robin Lynn, "Occurrence of antibiotic resistance in environmental and amphibian *E. coli* isolates associated with cattle and aquatic environments." Master's Thesis, University of Tennessee, 2006. https://trace.tennessee.edu/utk_gradthes/1526.

CLSI, 2014. Clinical and Laboratory Standards Institute antimicrobial susceptibility testing standards, January. https://clsi.org/

Çopur Çiçek A, Özgümüş OB, Saral A, Sandalli C. 2014."Antimicrobial resistance patterns and integron carriage of *Escherichia coli* isolates causing community-acquired infections in Turkey." *Annals of Laboratory Medicine* 34: 139-144.

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." *Japanese Journal of Infectious Diseases* 62:372–377.

Ferranti M, Tadiotto Cicogna G, Sattin A, et al. 2018. "*Citrobacter freundii* sepsis in an immunosuppressed patient with pemphigus vulgaris." *BMJ Case Reports* 11:e227091, doi:10.1136/bcr-2018- 227091.

Gilliver MA, Bennett M, Begon M, Hazel SM, Hart CA. 1999. "Antibiotic resistance found in wild rodents." *Nature* 401:233-234.

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." *Letters in Applied Microbiology* 54(1): 73-77.

Hacioglu N, Tosunoglu, M 2014. "Determination of antimicrobial and heavy metal resistance profiles of some bacteria isolated from aquatic amphibian and reptile species". *Environmental monitoring and assessment* 186(1): 407-413

Hecnar SJ. 1995. "Acute and chronic toxicity of ammonium nitrate fertilizer to amphibians from Southern Ontorio." *Environmental Toxicology and Chemistry* 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*)." *Applied and Environmental Microbiolology* 46(6): 1423-1425.

Hoşoğlu S. 2011. "Antibiyotik tüketiminde kısıtlayıcı politikalar." *Ankem Dergisi* 25(Ek-2): 114-118.

Hurley JC. 2019. "Worldwide variation in *Pseudomonas* associated ventilator associated pneumonia. A meta-regression." *Journal of Critical Care* 51:88-93.

Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. 1994. "Virulence of enterococci." *Clinical Microbiological Reviews* 7(4): 462-478.

Kadavy DR, Hornby JM, Haverkost T, Nickerson KW. 2000. "Natural antibiotic resistance of bacteria isolated from larvae of the oil fly, *Helaeomyia petrolei*." *Applied and Environmental Microbiology* 66:4615-4619.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. "Pathogenic *Escherichia coli*." *Nature Reviwes Microbiology* 2(2): 123-140.

Kim PW, Harris AD, Roghmann MClaire, Morris JG Jr, Strinivasan A, and Perencevich EN. 2003. "Epidemiological risk factors for isolation of ceftriaxone-resistant versus -susceptible *Citrobacter freundii* in hospitalized patients." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47(9): 2882-2887.

Koroglu OA, Yalaz M, Ozalkaya E, Polat DC, Akısu M, and Kültürsay N. 2010. "*Kluyvera cryocrescens* sepsis in a preterm infant." *Japanese Journal of Infectious Diseases* 63:195-196.

Lévesque C, Piche L, Larose C, Roy PH. 1995. "PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 39(1): 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: A case report." *Medicine (Baltimore)* 98(2):e14002. doi: 10.1097/MD.0000000000014002.

Lips KR. 1998. "Decline of a tropical montane amphibian fauna." *Conservation Biology* 12(1): 106-112.

Machado E, Cantón R, Baquero F, Galán JC, Rollán A, Peixe L, Coque TM. 2005. "Integron content of extended-spectrum-*β*-lactamase-producing *Escherichia coli* strains over 12 years in a single hospital in Madrid, Spain." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49: 1823–1829.

Mahaney PA. 1994. "Effects of freshwater petroleum contamination on amphibian hatching and metamorphosis." *Environmental Toxicology and Chemistry* 13(2): 259-235.

Marti E, Variatza E, Balcazar JE. 2014. "The role of aquatic ecosystems as reservoirs of antibiotic resistance." *Trends in Microbiology* 22(1): 36-41.

Mazel "Integrons: agents of bacterial evolution". *Nature Reviews Microbiology*. **4**(8): 608–620. doi:10. 1038/nrmicro1462. 2006.

McDiarmid, R.W., Altig, R. 1999. Tadpoles: The Biology of Anuran Larvae. Chicago: Univ. of Chicago Press.
Michalski M, St. Swierzko A, Lukasiewicz J, Man-Kupisinska A, Karwaciak I, Przygodzka P, Cedzynski M. 2015. Ficolin-3 activity towards the opportunistic pathogen, *Hafnia alvei*. Immunobiology (220): 117-123.

Minette, H.P. 1984. "Epidemiologic aspects of salmonellosis in reptiles, amphibians, mollusks and crustaceans--a review", *The International Journal of Zoonoses*, 11(1), 95-104.

Ozgumus, O.B., Caylan, R., Tosun, I., Sandalli, C., Aydin, K., Koksal, I. 2007a. "Molecular epidemiology of clinical Pseudomonas aeruginosa isolates carrying the IMP-1 metallo-β-lactamase gene in a university hospital in Turkey", *Microbial Drug Resistance*, 13(3), 191-8.

Ozgumus, O.B., 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", *The Journal of Microbiology*, 47(1), 19-27.

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

Pathogenic Microbiology, http://www.life.umd.edu/classroom/bsci424/pathogendescriptions/Enterobacteriaceae.htm Son ErişimTarihi: 15.01.2019.

Poeta P, Costa D, Igrejas G, Rojo-Bezares B, Saenz Y, Zarazaga M, Ruiz-Larrea F, Rodrigues J, Torres C. 2007. Characterization of vanA-containing *Enterococcus faecium* isolates carrying Tn5397-like and Tn916/Tn1545-like transposons in wild boars (Sus Scrofa). *Microbial Drug Resistance*, 13:151-156.

Poeta P, Radhouani H, Igrejas G, Goncalves A, Carvalho C, Rodrigues J, Vinue L, Somalo S, Torres C. 2008. "Seagulls of the Berlengas natural reserve of Portugal as carriers of fecal *Escherichia coli* harboring CTX-M and TEM extended-spectrum beta-lactamases." *Applied and Environmental Microbiology* 74:7439-7441.

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

Pollet, I., Bendell-Young, L. I. 2000. "Amphibians as indicators of wetland quality in wetlands formed from oil sands effluent", *Environmental Toxicology and Chemistry*, 19(10), 2589-2597.

Review on Antimicrobial Resistance. amr-review.org. Retrieved 20 May 2016.

Rodriguez-Rojas, A. et al. 2013. "Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution." *International Journal of Medical Microbiology* 303: 293–297

Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. 2001. "Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production." *International Journal of Antimicrobial Agents* 17(6): 431-437.

Sewell D, Griffiths RA. 2009. "Can a single amphibian species be a good biodiversity indicator?" *Diversity* 1(2): 102-117.

Sheng J-F, Li J-J, Tu S, Sheng Z-K, Bi S, Zhu M-H, Shen X-M, Li L-J. 2012. "blaKPC and rmtB on a single plasmid in *Enterobacter amnigenus* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the same patient." *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 31: 1585-1591.

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

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*)." *The Science Of The Total Environment* 408(20): 4871-4876.

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

Tai M-L S and Velayuthan RD. 2014. *Sphingomonas paucimobilis*: an unusual cause of meningitis-case report. *Neurologia Medico-Chirurgica* 54: 337-340.

Taylor, N.G.H. et al. 2011. "Aquatic systems: maintaining, mixing and mobilising antimicrobial resistance?" *Trends in Ecology and Evolution*, 26: 278–284.

Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, Mickelsen PA, Murray BE, Persing DH, Swaminathan B. 1995. "Interpre-ting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing." *Journal of Clinical Microbiology*, 33:2233–2239.

Thet M K, Pelobello MLF, Das M, Alhaji MM, Chong VH, Khalil MAM, Chinniah T, Tan J. 2019. "Outbreak of nonfermentative Gram-negative bacteria (*Ralstonia pickettii* and *Stenotrophomonas maltophilia*) in a hemodialysis center." *Hemodialysis International* doi: 10.1111/hdi.12722. [Epub ahead of print].

Wang L, Fu L, Liu Z, Guo H, Wang Li, Feng M, He Y, Chen Q, and Hu J. 2019. "Comparative analysis of antimicrobial resistance, integrons, and virulence genes among

extended-spectrum beta-lactamase-positive *Laribacter hongkongensis* from edible rrogs and freshwater fish." *Microbial Drug Resistance*, 00(00): 1-10, DOI: 10.1089/mdr.2018.0366.

Watt, P.J., Oldham, R.S. 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", *Freshwater Biology*, 33(2), 319-324.

Wells, K. D. 2007. The Ecology and Behavior of Amphibians, The University of Chicago Press, 1162.

White, P.A., McIver, C.J., Rawlinson, W.D. 2001. "Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae", Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2658-6261.

WHO, Global Antimicrobial Resistance Surveillance System: Manual For Early Implementation. 2015a (http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/188783/1/9789241549400_eng.pdf) Son Erişim Tarihi: 15.01.2019.

WHO, Sixty-Eight Worl Health Assembly, Global Action Plan on Antimicrobial Resistance, A68/20, 2015b (http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA68/A68_20-en.pdf?ua=1) Son Erişim Tarihi: 15.01.2019.

Wyman, R.L. 1990. "What's happening to the amphibians?", *Conservation Biology*, 4(4), 350-352.

7. EKLER:

1. Etik Kurul Belgesi

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

BAŞVURU BİLGİLERİ (Application Information)	ETİK KURUL DOSYA NO(REFERENCE):			
	ÇALIŞMANIN ADI	Türkiye'nin Çeşitli Yerlerinde Yaşayan *Pelophylax*sp. Türlerinden Sağlanan Koliform Bakterilerdeki Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi ve Moleküler Analizi		
	Title	Determination and Molecular Analysis of Antibiotic Resistance in Coliforms Obtained from *Pelophylax* sp. Species Living in Various Locations in Turkey		
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (Director of Project)	Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ		
	DİĞER GÖREVLİLER (Researchers)	Kazım ŞAHİN, Abdullah ALTUNIŞIK		
	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):2015/ 35	Tarih (Date): 27.04.2015
	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden,Prof. Dr. Osman 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	Thestudyabovehas beenapprovedbytheLocalEthicsCommittee of R.T.E.University.	
	☒Accepted	☐Rejected

ÜYELER (Members)						
Ünvanı/ Adı/ Soyadı Ek Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Doç.Dr. Fikri BALTA (BAŞKAN)	Su Ürünleri	R.T.E. Üniversitesi Su Ürünleri Fak.	E	☐E ☒H	☒E ☐H	
Doç.Dr. Adnan YILMAZ (Başkan Vekili)	Tıbbi Biyokimya	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	☐E ☒H	☒E ☐H	
Doç.Dr. Nurhayat ÖZDEMİR (Üye)	Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Fen Edebiyat Fak.	K	☐E ☒H	☒E ☐H	
Doç.Dr. Levent TÜMKAYA (Üye)	Histoloji Embriyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	E	☐E ☒H	☒E ☐H	
Yrd.Doç.Dr. Saliha EKŞİ (Üye)	Tıbbi Mikrobiyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐E ☒H	☐E ☒H	----------
Yrd.Doç.Dr. Hatice SEVİM(Üye)	Tıbbi Biyoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☐E ☒H	☒E ☐H	
Yrd. Doç.Dr. Nihal ÇETİN (Üye)	Tıbbi Farmakoloji	R.T.E. Üniversitesi Tıp Fak.	K	☒E ☐H	☐E ☒H	----------
Barış KARA (Üye)	Sağlık Çalışanı	Sağlık Sen	E	☐E ☒H	☒E ☐H	
Eylem RAKICI EKŞİOĞLU (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**)

2. Bakanlık Araştırma İzni

T.C.
ORMAN VE SU İŞLERİ BAKANLIĞI
Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğü

Sayı : 72784983-488.04-**81100** 13.04.2016
Konu: Araştırma İzinleri

RECEP TAYYİP ERDOĞAN ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜNE
(TIP FAKÜLTESİ)
RİZE

İlgi : ÜNİVERSİTELER'İN 23.03.2016 tarihli ve 553 sayılı yazısı

Üniversiteniz Tıp Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Osman Birol ÖZGÜMÜŞ tarafından yürütülecek olan **"Doğu Karadeniz Sahilinde Yaşayan Paleoplylax sp. Türlerinden Sağlanan Esherichiacoli'lerdeki Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi ve Moleküler Analizi"** başlıklı proje kapsamında araştırmacı personelin yürütmesi planlanan arazi çalışmaları ile ilgili Bilimsel Araştırma İzin Başvurusu Genel Müdürlüğümüz yetki ve sorumlulukları çerçevesinde incelenmiş olup, buna göre;

· Çalışmaların sahada bulunan flora, fauna, doğal ve kültürel değerlerin yanı sıra ekosistem bütünlüğüne de zarar vermeyecek şekilde yapılması,
· Arazi çalışması öncesinde ve arazide yapılacak her türlü çalışma ile ilgili Orman ve Su İşleri Bakanlığının ilgili İl Şube Müdürlüklerine bilgi verilmesi, korunan alanlarda yapılacak çalışmalarda mihmandar bulundurulması
· Arazi çalışmalarının yapılacağı yerin il merkezlerinde Valiliğe, ilçelerde ise Kaymakamlığa bilgi verilmesi,
· Çalışmalar kapsamında toplanacak örneklerde temsil edici yeterlilikte miktarın aşılmaması ve bu örneklerin Genel Müdürlüğümüz onayı alınmadan yurtdışına çıkarılmaması,
· Araştırma ara ve sonuç raporlarının basılı ve dijital ortamda birer kopyasının Genel Müdürlüğümüze ve ilgili Bölge Müdürlüklerine gönderilmesi,
koşuluyla bahsc konu çalışmaların yapılması Genel Müdürlüğümüzce uygun görülmüş olup, izin belgesi ekte gönderilmektedir.
Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Mustafa AKINCIOĞLU
Bakan a.
Genel Müdür Yardımcısı

EKLER :
1- Bir Takım Araştırma İzni

DAĞITIM :
Gereği:
Recep Tayyip Erdoğan Üniversitesi
Rektörlüğüne

Bilgi:
XI. Bölge Müdürlüğü

XII. Bölge Müdürlüğü

Güvenli Elektronik İmzalı
Aslı İle Aynıdır
Şahıs Yetkili
Birim Personeli

Bu evrak 5070 sayılı Elektronik İmza Kanunu'na göre elektronik olarak imzalanmıştır.
Evrak doğrulama adresi: http://ebys.ormansu.gov.tr/Dogrulama.aspx?d=e31k

Adres : Alparslan Türkeş Cad. No:71 Beştepe 06560 Yenimahalle - ANKARA
Telefon : 03122075594
e-posta : ydagasan@cob.gov.tr

Ayrıntılı Bilgi : Yakup DAĞAŞAN Uzman
Fax :
Elektronik Ağ: www.ormansu.gov.tr