



TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**ANKARA’DA Kİ ÇOCUK PARKLARINDAN İZOLE  
EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARINDA  
ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

**Dilara ÇALIŞKAN**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE**

**ANKARA  
2020**

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**ANKARA ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ANKARA’DA Kİ ÇOCUK PARKLARINDAN İZOLE  
EDİLEN *ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARINDA  
ANTİBİYOTİK DİRENCİNİN BELİRLENMESİ**

**Dilara ÇALIŞKAN**

**FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**  
**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**  
**Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE**

**ANKARA**  
**2020**

## ETİK BEYAN

Ankara Üniversitesi  
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “Ankara’da ki Çocuk Parklarından İzole Edilen *Escherichia coli* İzolatlarında Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Dilara ÇALIŞKAN

Tarih:

İmza:

# İÇİNDEKİLER

|                                                                   |           |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| Etik Beyan                                                        | ii        |
| Kabul ve Onay                                                     | iii       |
| İçindekiler                                                       | iv        |
| Önsöz                                                             | vi        |
| Simgeler ve Kısaltmalar                                           | vii       |
| Şekiller                                                          | ix        |
| Çizelgeler                                                        | x         |
| <b>1. GİRİŞ</b>                                                   | <b>1</b>  |
| 1.1. <i>Escherichia coli</i>                                      | 7         |
| 1.1.1. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri                          | 8         |
| 1.1.2. Antijen Yapıları ve Tiplendirilmeleri                      | 8         |
| 1.1.3. Virulans ve Patojenite Faktörleri                          | 9         |
| 1.1.4. Epidemiyoloji                                              | 10        |
| 1.1.4.1. ETEC                                                     | 12        |
| 1.1.4.2. EIEC                                                     | 12        |
| 1.1.4.3. EPEC                                                     | 14        |
| 1.1.4.4. EHEC                                                     | 14        |
| 1.1.4.5. EAEC                                                     | 15        |
| 1.1.4.6. DAEC                                                     | 16        |
| 1.1.4.7 <i>E. coli</i> 'nin Direnç Geliştirme Mekanizmaları       | 17        |
| 1.2. Aminoglikozid Antibiyotikler                                 | 18        |
| 1.2.1. Antimikrobiyal Aktivite Mekanizması                        | 18        |
| 1.2.2. Aminoglikozidlere Karşı Direnç Geliştirme Mekanizmaları    | 19        |
| 1.2.2.1. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimlere Bağlı Direnç      | 19        |
| 1.2.2.2. Ribozomal Direnç                                         | 21        |
| 1.2.2.3. Dış Zar Geçirgenliğinin Azalması ve Aktif Akım Pompaları | 22        |
| 1.2.3. Aminoglikozidlerin Farmakolojik Özellikleri                | 23        |
| 1.2.4. Aminoglikozidlerin Klinik Kullanımları                     | 23        |
| <b>2. GEREÇ VE YÖNTEMLER</b>                                      | <b>25</b> |
| 2.1. Gereç                                                        | 25        |
| 2.1.1. Kullanılan Cihazlar                                        | 25        |
| 2.1.2. Besiyerleri                                                | 25        |
| 2.1.3. Kullanılan Boyalar ve Kimyasal Çözeltiler                  | 28        |
| 2.1.3.1. Boyalar                                                  | 28        |
| 2.1.3.2. Kimyasal Malzemeler                                      | 29        |
| 2.1.4. Referans Antibiyotikler                                    | 30        |
| 2.2. Yöntem                                                       | 30        |
| 2.2.1. <i>E. coli</i> 'nin İzolasyonu ve Saklanması               | 30        |
| 2.2.2. <i>E. coli</i> İzolatlarının Tanımlanması                  | 31        |
| 2.2.2.1. Gram Boyama                                              | 32        |
| 2.2.2.2. İndol Testi                                              | 32        |
| 2.2.2.3. Metil Kırmızısı Testi (Metil Red Test)                   | 33        |

|                                                                                          |           |
|------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 2.2.2.4. Voges-Proskauer Testi                                                           | 34        |
| 2.2.2.5. Sitrat Testi (Citrat Test)                                                      | 35        |
| 2.2.2.6. Üç Şekerli Demirli Besiyeri (Triple Sugar Iron Agar)                            | 35        |
| 2.2.2.7. MALDI-TOF                                                                       | 36        |
| 2.2.3. <i>E. coli</i> İzolatlarında İn Vitro Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması | 37        |
| 2.2.4. <i>E. coli</i> 'lerin Genotiplendirilmesi                                         | 38        |
| 2.2.4.1 Kaynatma-Patlama Yöntemi ile DNA Ekstraksiyonu                                   | 38        |
| 2.2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)                                               | 39        |
| 2.2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi                                                        | 40        |
| <b>3. BULGULAR</b>                                                                       | <b>41</b> |
| 3.1. İzolatların İdentifikasyonu                                                         | 41        |
| 3.2. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi                                          | 42        |
| 3.3. Genotipik Test Sonuçları                                                            | 48        |
| <b>4. TARTIŞMA</b>                                                                       | <b>51</b> |
| <b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>                                                              | <b>58</b> |
| <b>ÖZET</b>                                                                              | <b>60</b> |
| <b>SUMMARY</b>                                                                           | <b>61</b> |
| <b>KAYNAKLAR</b>                                                                         | <b>62</b> |
| <b>ÖZGEÇMİŞ</b>                                                                          | <b>69</b> |

## ÖNSÖZ

Son yıllarda küresel bir sağlık sorunu haline gelen antibiyotik direnci, antibiyotik kullanımına bağlı olarak artan bir ivmede seyretmektedir. Ayrıca dirençli suşlar insan, hayvan ve çevre arayüzünde eskisine oranla çok daha yüksek bir hareketlilikle yayılmaktadır. Bu nedenle Tek Sağlık yaklaşımını benimsemek bulaşıcı hastalıklardan kaynaklanan küresel sağlığa yönelik tehditleri azaltmak için büyük bir öneme sahiptir.

Araştırmada, Ankara ilindeki çocuk parklarından izole edilen ve identifikasyonu yapılan *Escherichia coli* suşlarının antibiyotiklere karşı direnç durumlarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Çalışmamın her aşamasında sahip olduğu bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, araştırmalarım sırasında bana yol gösteren, anlayış ve sevgi dolu yaklaşımlarıyla beni her zaman motive eden, sevgili hocam ve danışmanım Sayın Doç. Dr. Banu KAŞKATEPE'ye, tüm Anabilim Dalı personeline,

T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarları Daire Başkanlığı'na, çalışmalarım esnasında her zaman yanımda olan arkadaşım Pınar KUL'a

Yaşamımın her döneminde bana her konuda destek olan canım annem, babam ve kardeşime teşekkür ederim.

## SİMGELER ve KISALTMALAR

|        |                                                         |
|--------|---------------------------------------------------------|
| AAC    | Asetiltransferaz                                        |
| AB     | Avrupa Birliği                                          |
| ABD    | Amerika Birleşik Devletleri                             |
| AME    | Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim                      |
| AMR    | Antimikrobiyal Direnç                                   |
| ANT    | Nükleotidiltransferazlar                                |
| APEC   | Avian Patojenik <i>Escherichia coli</i>                 |
| APH    | Fosfotransferaz                                         |
| ATCC   | Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu                         |
| BM     | Birleşmiş Milletler                                     |
| CLSI   | Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü            |
| DAEC   | Diffuz Adheziv <i>Escherichia coli</i>                  |
| DNA    | Deoksiribonükleik Asit                                  |
| EAEC   | Enteroagregatif <i>Escherichia coli</i>                 |
| EHEC   | Enterohemorajik <i>Escherichia coli</i>                 |
| EIEC   | Enteroinvaziv <i>Escherichia coli</i>                   |
| EUCAST | Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi      |
| EPEC   | Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>                |
| ETEC   | Enterotoksijenik <i>Escherichia coli</i>                |
| ExPEC  | Ekstraintestinal <i>Escherichia coli</i>                |
| FAO    | Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü                |
| HC     | Hemorajik Kolit                                         |
| HIV    | İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü                            |
| HUS    | Hemolitik Üremik Sendrom                                |
| IMF    | Uluslararası Para Fonu                                  |
| mL     | Mililitre                                               |
| MRSA   | Metisilin Dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>         |
| NMEC   | Yenidoğan Menenjitte neden olan <i>Escherichia coli</i> |
| OIE    | Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü                             |

|      |                                      |
|------|--------------------------------------|
| RNA  | Ribonükleik Asit                     |
| StX  | Shiga Toksini                        |
| UPEC |  ropatojenik <i>Escherichia coli</i> |
| WHO  | Dünya Sağlık  rg t                   |



## ŞEKİLLER

|                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 2.1. <i>E.coli</i> ' nin EMB Agardaki Görünümü                    | 31 |
| Şekil 2.2. <i>E.coli</i> ' nin Gram Boyama Sonrası Mikroskopta Görünümü | 32 |
| Şekil 2.3. Negatif ve Pozitif İndol Testi                               | 33 |
| Şekil 2.4. Negatif ve Pozitif Metil Kırmızısı Testi                     | 34 |
| Şekil 2.5. Negatif ve Pozitif TSI Testi                                 | 36 |
| Şekil 2.6. Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi                            | 38 |
| Şekil 2.7. <i>ant(3')-I</i> geni PCR Sonuçlarına Örnekler               | 49 |

## ÇİZELGELER

|                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Çizelge 1.1. <i>E. coli</i> 'nin Patojenik Türleri                                 | 12 |
| Çizelge 1.2. Aminoglikozidlerin Direnç Fenotipleri                                 | 20 |
| Çizelge 2.1. Eozin Metilen Mavisi Agmuar (EMB) Besiyeri Kimyasal İçeriği           | 25 |
| Çizelge 2.2. Mueller Hinton Agar (MHA) Besiyeri Kimyasal İçeriği                   | 26 |
| Çizelge 2.3. Mueller Hinton Broth (MHB) Besiyeri Kimyasal İçeriği                  | 26 |
| Çizelge 2.4. İndol Besiyeri Kimyasal İçeriği                                       | 27 |
| Çizelge 2.5. MR-VP Besiyeri Kimyasal İçeriği                                       | 27 |
| Çizelge 2.6. Simmons Sitrat Agar Besiyeri Kimyasal İçeriği                         | 27 |
| Çizelge 2.7. Üç Demirli Şekerli Besiyeri Kimyasal İçeriği                          | 28 |
| Çizelge 2.8. PCR İçin Kullanılan Primerler                                         | 39 |
| Çizelge 2.9. PCR Karışımı                                                          | 39 |
| Çizelge 2.10. PCR Döngü ve Parametreleri                                           | 40 |
| Çizelge 3.1. MALDI TOF MS Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar                         | 41 |
| Çizelge 3.2. Tüm İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları                      | 43 |
| Çizelge 3.3. Tüm İzolatların Zon Çapları                                           | 44 |
| Çizelge 3.4. Toprakta Elde Edilen İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları     | 47 |
| Çizelge 3.5 Sürüntülerden Elde Edilen İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları | 47 |
| Çizelge 3.6. <i>E. coli</i> Kökenlerinde AME Genlerinin Dağılımı                   | 48 |
| Çizelge 3.7. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzim Genleri Oranı                      | 49 |
| Çizelge 3.8 Aminoglikozidlerin Direnç Durumu ve AME Genleri Dağılımı               | 50 |

## 1. GİRİŞ

Antimikrobiyal direnç, bakteriyel enfeksiyonları tedavi etme yeteneğimizi tehdit eden küresel bir halk sağlığı sorunudur. Ciddi enfeksiyonlara neden olan ve bir zamanlar birkaç farklı antibiyotik sınıfıyla başarılı bir şekilde tedavi edilebilen çoğu bakteri, günümüzde çoğu antibiyotiğe karşı direnç kazanmıştır. Bazı bölgelerde ise çoğu bakteride bu ilaçların neredeyse hepsine direnç gelişmiştir (Collignon ve McEwen, 2019).

Enfeksiyon hastalıkları, dünya çapında savaşlardan sonra ikinci ölüm nedenidir. Dünya çapında ölüme neden olan bu bulaşıcı hastalıklar arasında akut alt solunum yolu enfeksiyonları, HIV/AIDS, ishal, tüberküloz ve sıtma baskındır. 21. yüzyılın ilk on yılında, pnömokok, enterokok, stafilokok, *Plasmodium falciparum* ve *Mycobacterium tuberculosis* de dahil olmak üzere bir dizi önemli mikroorganizmanın dirençli suşlarının ortaya çıkmasıyla, daha önce hiç olmadığı kadar geniş ölçekli bir tehditle karşı karşıya kalınmıştır (Fauci, 2001).

Antimikrobiyal ilaçların doğru olmayan kullanımı, direncin ortaya çıkmasında önemli bir itici güçtür. Doğru olmayan enfeksiyon kontrolü, çevresel kontaminasyon ve enfekte insan ve hayvanların coğrafi hareketi dirençli bakterilerin ve genlerinin lokal ve global olarak yayılmasını artıran faktörlerdir (McEwen ve Collignon, 2017). Antimikrobiyal direnç ile ilgili temel endişe, ortamdaki direncin, bulaşıcı hastalıklara yol açan tedavi edilemez klinik patojenlere (örneğin, yatay gen transferi yoluyla) dönüşeceği korkusudur (Tamhankar ve Lundborg, 2019). Dünya çapında, yılda yaklaşık 700.000 ölüm doğrudan antibiyotiğe dirençli bakteriyel enfeksiyonlara atfedilmektedir. Kesin rakamlar tam olarak öngörülemez de, 2050 yılına kadar yılda 10 milyon ölüme yükseleceği öne sürülmektedir (Cabrera-Pardo ve ark., 2019).

Antimikrobiyal direnç (AMR); Uluslararası Para Fonu (IMF), G8 zirvesi, Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Bankası da dahil olmak üzere tüm önemli ekonomik ve politik organlar tarafından 21. yüzyılın en büyük Küresel Sağlık sorunlarından biri olarak kabul edilmektedir. Hepsi, antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasına, kazanılmasına ve yayılmasına katkıda bulunan bütün parametrelerin ele alınması gerektiğini desteklemektedir (Hernando-Amado ve ark., 2019).

Birleşmiş Milletler Antimikrobiyal Direnç Genel Kurulu Yüksek Düzeyli Toplantısının 2016 Siyasi Beyanı, dünyanın antimikrobiyal direnç ile mücadelesinde bir dönüm noktası olmuş ve küresel anlamda acil eylem çağrısında bulunulmuştur. Küresel Eylem Planının başlatılmasından bu yana, en az 100 ülke Ulusal Antimikrobiyal Direnç Eylem Planlarını geliştirmiştir. Bu planların uygulanmasında Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE), Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), ve Kodeks Alimentarius destek vermektedir (Bryan-Wilson, 2016).

Hayvansal kökenli bakterilerde antimikrobiyal direncin ortaya çıkmasının ve yayılmasının doğrudan etkisi, hayvanların tedavisinde kullanılan antimikrobiyallerin etkinliğinin kaybidir ancak direncin yayılması, halk sağlığı üzerinde olumsuz etkileri olan yerel bir gıda güvenliği sorununa yol açabilmektedir (Laxminarayan ve ark.,2013).

Antibiyotiklerin kullanıldığı her yerde dirençli bakteri rezervleri ve direnç genleri vardır. Bunlar arasında toplum ve hastaneler ayrıca hayvanlar, çiftlikler ve su ürünleri yetiştirme ortamları bulunmaktadır. Su, toprak, vahşi yaşam ve diğer birçok ekolojik ortamda büyük direnç rezervleri antimikrobiyallerin fazla sayıda ve yanlış kullanımı yüzünden meydana gelmektedir. Bu direnç rezervleri kanalizasyon, ilaç endüstrisi atıkları ve çiftliklerden gelen gübre akışı nedeniyle global olarak yayılmaktadır (Collignon ve McEwen, 2019). Hastaneler antibiyotik kullanımı için “sıcak nokta”dır ve sadece antibiyotik yayılmasında değil, aynı zamanda antibiyotiğe dirençli bakterilerin çevreye salınmasında da önemli bir rol oynamaktadır (Lien ve ark., 2017).

Küresel çaptaki çevresel değişiklikler, nüfus artışı ve uluslararası ticaretin artması, insanların, patojenlerin ve hayvansal ürünlerin geniş çapta ve çok hızlı hareket etmesine neden olmuştur. Bu hareket, insan ve hayvan sağlığını tehdit eden dirençli enfeksiyon ajanlarını izlemek ve kontrol etmek konusunda zorluklar yaratmaktadır (Conrad ve ark., 2009). Tek Sağlık; insanların, hayvanların ve ekosistemlerin sağlığının bağlantılı olduğunu kabul ederek, disiplinler arası ve sektörler arası işbirliğini savunmaktadır (Häsler ve ark., 2014). Tek Sağlık, bulaşıcı hastalık ajanlarının ortaya çıkmasına ve tekrarlanmasına yol açan süreçler hakkında bilgi veren ayrıca insan, biyolojik çeşitlilik ve ekosistem sağlığını kapsayan, antimikrobiyal direnç dinamikleri ve epidemiyolojinin incelenmesi ve yorumlanmasıdır (Tamhankar ve Lundborg, 2019).

Enfeksiyon ajanlarının yayılmasını kolaylaştıran faktörler arasında ulusal ve uluslararası seyahat ve ticaret, yoksulluk, yetersiz konut, kontrolsüz şehirleşme, doğru olmayan enfeksiyon kontrolü, kötü su kaynakları, yetersiz temizlik, tarımda kullanılan kimyasal atıklar, çevresel kirlenme ve iklim değişikliği bulunmaktadır. Direnç sorununun karmaşıklığı ve ekolojik yapı dikkate alınarak Tek Sağlık gibi disiplinlerarası bir yaklaşımı uygulamak gerekmektedir.

Antimikrobiyal direnç tüm ülkeleri etkilemesine rağmen, dirence yanıt konusunda ülkeler eşit donanımına sahip değildir. Dolayısıyla ulusal planların her ülkenin kendi ihtiyaçları ve kapasitelerine göre ayarlanması gerekmektedir. Daha yüksek bir hastalık yükü ve antimikrobiyal direnç riski ile karşı karşıya olan birçok düşük ve orta gelirli ülkenin sağlık tesisleri, çiftlikler, okullar, haneler ve toplum ortamlarında temel su, sanitasyon ve hijyen iyileştirmesi gerekmektedir. Sağlık tesislerinde, çiftliklerde, gıda ve yem üretiminde enfeksiyon önleme ve kontrolünü artırmak; atık yönetimi ve çevre korumasını iyileştirmek alınacak önlemlerden bazılarıdır (Bryan-Wilson, 2016).

Sağlık kelimesi insanlar, hayvanlar ve ekosistemin uyumlu bir şekilde bir arada yaşamasını ifade etmektedir. Tek Sağlık kavramı ise; insanların, hayvanların ve ekosistemin sağlığının, sektörler ve disiplinler arası olarak kabul edilmesi ve paylaşılması gerektiği üzerinde durur. Bu nedenle, Tek Sağlık kritik açıdan önemli bazı enfeksiyon hastalıklarından ve zoonotik hastalıktan daha fazlası olarak görülmelidir. Tek Sağlık, gıda güvenliği, biyoçeşitlilik, ekonomik refah ile fiziksel ve zihinsel iyi olma durumunu tam olarak kapsayan; ekosistem ile hayvanlar ve insanlar arasında sebep ve sonucun kapsamlı şekilde bağlantılı olduğunu vurgulayan bir sağlık paradigmasıdır (Evans ve Leighton, 2014). Tek Sağlık, insan ve hayvan sağlığını, gıda güvenliğini ve güvenilirliğini, yoksulluğu ve hastalıkların geliştiği çevreleri tehdit eden komplike zorlukları vurgulamak için bütünsel bir vizyonu temsil etmektedir (Hiçcan, 2017).

Tek Sağlık sinerjiktir. Çünkü odağı hastalıklar değil; insan ve hayvan sağlığı sistemlerini güçlendirmektir. Bu sinerjinin sağlanabilmesi için, işbirliğini ve işbirliğini geliştirmekle ilgili her disiplinin farklı hedeflerini ve yönetim ilkelerini desteklemektedir (Barrett ve Osofsky, 2013).

Tek Sağlık, 2015 yılında yapılan G7 Sağlık Bakanları Toplantısı, 2016 BM Genel Kurulu, ve 2016 Milletler Topluluğu Sağlık Bakanları Toplantısı da dahil olmak üzere önemli üst düzey siyasi toplantılarda konu olmuştur. Dünyanın birçok ülkesinde Kanada, Kenya, Bangladeş, Ruanda, Pakistan ve Hindistan dahil olmak üzere ulusal Tek Sağlık programları oluşturulmuştur. Doğu Afrika, Orta Doğu, Güney Asya ve Avrupa gibi bölgelerde Bölgesel Tek Sağlık platformları da kurulmuştur (Khan ve ark., 2018). Tek Sağlık programları ve platformları sektörler arasındaki iletişimi teşvik etmekte ve koordinasyonu artırmaktadır. Birçok ülkede antimikrobiyal direnç ve antimikrobiyal kullanım izleme sistemleri kurularak; antimikrobiyallerin veterinerlik alanında kullanımının düzenlenmesi, büyüme destekçileri olarak kullanımı konusunda bilinçlenme, veterinerlik alanında tıbbi açıdan önemli antimikrobiyallerin kullanımının azalması ve antimikrobiyal direnç konularının açık bir şekilde değerlendirilmesine katkı sağlamıştır (McEwen ve Collignon, 2017). DSÖ, büyümeyi teşvik etmek amacıyla antimikrobiyal

kullanımının sona ermesi gerektiğini savunmaktadır. Uygulama Avrupa'da yasaklanmış ayrıca ABD (Amerika Birleşik Devletleri) ve Kanada'da kullanımdan kaldırılmıştır. Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE) verilerine göre, hayvanlarda antimikrobiyal kullanım bildiren 146 ülkenin %41'inin antimikrobiyal büyüme destekleyicilerinin kullanımına izin verdiği görülmektedir. Bu oran 2012'de 151 ülkenin %51'i olarak bildirilmiştir. İzin verilen ilaçlar arasında DSÖ tarafından insanlar için kritik öneme sahip olan (kolistin, florokinolonlar ve makrolidler) çeşitli maddeler bulunmaktadır (McEwen ve Collignon, 2017).

Zoonozların ortaya çıkma oranları 20. yüzyılın ortalarından bu yana önemli ölçüde artmıştır. 1940'tan beri insanlarda ortaya çıkan 335 enfeksiyöz hastalığın %60'ından fazlası zoonotiktir. Ortaya çıkan bu zoonozlardan neredeyse dörtte üçü yaban hayatından kaynaklanmıştır (Barrett ve Osofsky, 2013). Bu nedenle, evcil hayvanlar, yaban hayatı ve eklembacaklılar toplum için şu anda önemli olan bulaşıcı hastalıkların çoğunun önemli bir parçasıdır. Hızla artan insan nüfusunu için ihtiyaç duyulan sanayi, tarım ve ticaret ile birlikte kırsal ve kentsel arayüz önemli ölçüde genişlemiştir. Böylece patojenlerin ve kirleticilerin insanlar ve hayvanlar arasındaki hareketi hızlanmıştır. Ayrıca, insan kaynaklı toksinlerin ve kimyasalların artışı hayvan popülasyonlarını ve topluluklarını ciddi şekilde etkilemiştir (Conrad ve ark., 2009).

İnsanlarda antibiyotik kullanımını azaltmakla kalmayıp aynı zamanda gıda hayvanları ve su ürünleri yetiştiriciliğinde kullanılan antibiyotik miktarları kontrol altına alınıp önemli ölçüde düşürülürse, bu insan sağlığı sektöründe önemli bir etki yaratacaktır. Ayrıca, hayvanların ve kişilerin tükettikleri suya ve atıklarına da bakılmalıdır, çünkü su kaçınılmaz olarak dirençli bakterilerle kontamine olacak ve bu su insanlar ve hayvanlar tarafından tüketilecektir (Hiçcan, 2017). Bununla birlikte çevresel örneklerden bakteri izolasyonu ve direnç durumlarının belirlenmesi direncin öngörülmesi konusunda katkı sağlayacaktır.

Tek Sağlık yaklaşımı, sadece bulaşıcı hastalık salgınlarına yanıt süresini azaltmakla kalmaz, aynı zamanda bu tür hastalıkların ortaya çıkmasını öngörme ve

önleme konusunda da önemlidir. Ayrıca hastalık gözetimi ve yanıtını iyileştirebilir, sağlık sistemlerini güçlendirebilir, halk sağlığı müdahalelerini iyileştirebilir, sağlık ve çevre anlayışımızı geliştirmek için yeni araştırma yollarını yönlendirebilir, aşı gelişimini iyileştirebilir, koruma çabalarını güçlendirebilir, eğitim sistemlerini canlandırabilir ve önlenemez felaketlerin büyük ekonomik sonuçlarından kaçınılmasında önemli bir yol gösterici olabilir (Barrett ve Osofsky, 2013).

Çocuklar, ergen ve yetişkinlerden daha savunmasızdır bu nedenle çocuk ölümlerinin en az üçte ikisi enfeksiyonlarla ilgilidir. Çocukluk çağı enfeksiyonlarına neden olan bakteriler arasındaki dirençli suşların sayısındaki artış, klinik sonuçları daha da kötüleştirebilir ve antibiyotikleri etkisiz hale getirebilir. Gelişmekte olan ülkelere alınan hastane verileri, yenidoğan enfeksiyonlarına neden olan patojenlerde (yaşamın ilk 28 gününde) Dünya Sağlık Örgütü tarafından önerilen ampicilin ve gentamisin rejimine direncin yaygın olduğunu göstermektedir. *Escherichia coli*'nin %50'si gentamisine, %60-70'i ampiciline dirençlidir. Direnç ayrıca, gelişmekte olan ülkelere hastane serilerinden bildirilen erken başlangıçlı, muhtemelen anne tarafından edinilmiş yenidoğan enfeksiyonlarında da bir sorundur (Laxminarayan ve ark., 2013).

Çocuklar oyun parklarında toprakla ve oyun aletleriyle oldukça temas halindedirler. Bu temas sonucu dirençli bakterilere maruz kalabilmektedir. Yapılan literatür taramasında Türkiye'de çocuk parklarındaki toprak ve oyun aletlerinden izole edilen antibiyotik dirençli *E. coli* suşları üzerine bir çalışma olmadığı görülmüştür.

Bu çalışma kapsamında; Ankara'nın çeşitli çocuk parklarından alınan örneklerden izole edilen *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal direncinin belirlenmesi ve bazı direnç genlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır. Böylece oyun parklarındaki mevcut antimikrobiyal direnç durumu, patojenlerin sahip olduğu direnç genlerinin ortaya konması ve direncin yorumlanması açısından önemli bir çalışma olacaktır.

### 1.1. *Escherichia coli*

1884'te Alman mikrobiyolog ve çocuk doktoru Theodor Escherich, bebek bağırsak mikropları, sindirim ve hastalıktaki rolleri üzerine bir çalışma başlatmış ve bu çalışma sırasında, *Bakterium coli* komünü adını verdiği, ancak şimdi *E. coli* olarak bilinen hızlı büyüyen bir bakteri keşfetmiştir (Blount, 2015).

*E. coli*, *Enterobacterales* takımı üyelerinden biri olup çoğunlukla hareketli, spor oluşturmeyen, yaklaşık olarak 1,0-3,0 µm uzunluğunda ve 0,5 µm çapında Gram negatif bir basildir. İnsan kolon florasındaki baskın fakültatif anaeroptur. Organizma tipik olarak bebek gastro-intestinal kanalında doğumdan sonraki saatler içinde kolonize olur ve konakçının yaşamının geri kalanında karşılıklı yarar sağlar. Bununla birlikte, bazı *E. coli* suşları spesifik virülans faktörleri edinerek yeni ortamlara uyum sağlama ve hastalık oluşturma yetenekleri edinmişlerdir (Stenutz ve ark., 2006; Welch, 2006).

Zayıflatılmış ya da bağışıklığı baskılanmış konakçıda veya gastrointestinal bariyerler ihlal edildiğinde, *E. coli*'nin normal "patojenik olmayan" suşları bile enfeksiyona neden olabilmektedir. Sağlıklı bireyler bile, hastalık oluşturma yeteneğini geliştiren, iyi adapte olmuş bazı *E. coli* suşları tarafından enfeksiyona duyarlı olabilir. Patojenik *E. coli*'ye bağlı enfeksiyonlar mukozal yüzeylerle sınırlı olabilmekte veya vücutta yayılabilmektedir. Patojenik *E. coli*; (i) idrar yolu enfeksiyonu, (ii) sepsis / menenjit ve (iii) enterit olmak üzere 3 tip enfeksiyona sebep olmaktadır (Nataro ve Kaper, 1998).

Doğada, *E. coli* esas olarak memeli bağırsak mikrobiyomunun bir bileşeni olmakla birlikte; kuşların, sürüngenlerin ve balıkların bağırsak mikrobiyomlarında da bulunmaktadır. Ayrıca toprak, su, bitkiler ve gıdalarda da bulunmaktadır (Collignon ve McEwen, 2019).

Birçok *E. coli*, hayvanların ve insanların bağırsağında kommensaller gibi görülür. Ancak bunlar fırsatçı patojenler olabilirler ya da diğer bakteri türlerine direnç oluşturan genetik elemanları aktarabilirler. Antimikrobiyal direnç, hem hayvanlar hem de insanlarda enfeksiyon etkeni olarak izole edilen *E. coli* izolatlarında hızla artan bir sorun olsa da, özellikle gelişmekte olan ülkelerde insanlardaki enfeksiyonlardan elde edilen izolatlar ile ilgili daha çok veriye ulaşılabilmektedir. İnsanlar genellikle gıdalar ve yetersiz arıtılmış içme suyu yoluyla *E. coli*'ye maruz kalmaktadır (Collignon ve McEwen, 2019). Bu nedenle, gıda işleme ve çevre koşullarında bilinen başlıca patojenleri izlemek ve kontrol etmek önemlidir (Ding ve ark., 2017).

#### **1.1.1. Üreme ve Biyokimyasal Özellikleri**

Çoğu *E. coli* suşu, 15-48 °C sıcaklık aralığında gelişebilmekle birlikte optimal sıcaklık aralığı 37-42 °C ve optimal pH 5.5-8.0 aralığındadır (Welch, 2006). Glikoz ya da diğer karbonhidratları kullanarak fermantasyon yoluyla asit ve gaz üretebilirler. Ayrıca nitratları nitritlere indirgeyebilir ve *E. coli*'nin indol ve metil kırmızı testi pozitifdir. Suşların çoğu hidrojen sülfür, sitrat, üreaz ve oksidaz negatiftir. *E. coli*, Salmonella ve Shigella'dan esas olarak laktozu fermente etme yeteneği ile ayrılır. Kommensal suşların metabolik yeteneklerinde patojenik suşlardan farklı olduğu bazı durumlar vardır. Kommensal *E. coli* suşları genellikle sorbitolü kullanma özelliği gösterirken, patojenik *E. coli* O157: H7 suşu sorbitol kullanmaz (Welch, 2006).

#### **1.1.2. Antijen Yapıları ve Tiplendirilmeleri**

*E. coli*'nin sınıflandırılması, bakterilerin yüzeyinde bulunan antijenik yapıların çeşitliliğinden kaynaklanmaktadır. Kaufmann, serotiplendirme için ilk şemayı geliştiren kişidir ve bu serotiplendirme *E. coli*'nin somatik (O), flagella (H) ve kapsül (K) antijen türlerine göre yapılmaktadır. O antijeni lipopolisakkarit yapıdadır ve ısıya dirençli yüzey antijenidir. 1945 yılında Kauffmann ve Vahlne kapsül antijenini

belirtmek için K antijeni kavramını ortaya atmıştır. K antijeni, N-asetil neuramik asit yapısındadır ve toplamda 60 farklı K antijeninin varlığı belirtilmiştir. Hareket özelliği bulunan *E. coli* suşlarında H antijenleri bulunmaktadır. Bugüne kadar toplamda 56 H antijeni saptanmıştır. Fimbrial (F) antijenler, proteinöz moleküler yapıları tam olarak bilinmeden önce K antijenleri olarak kabul edilmiş; daha sonraki yıllarda kendi yapılarının ortaya çıkmasıyla F antijeni olarak isimlendirilmişlerdir (Omerovic ve ark., 2017).

### 1.1.3. Virulans ve Patojenite Faktörleri

*E. coli*'nin doğal yaşam alanı, sıcakkanlı hayvanların ve insanların gastrointestinal sistemidir. Çoğu suş zararsız simbiyot olarak var olmasına rağmen, hayvanlarda ve insanlarda çeşitli hastalıklara neden olabilecek birçok patojenik *E. coli* suşu bulunmaktadır. Patojenik *E. coli* suşları, sağlıklı bireylerin enterik florasında baskın olanlardan farklıdır, çünkü virülans faktörlerini eksprese etme olasılıkları daha yüksektir. Bu virülans faktörleri normal konakçı fizyolojisini bozmakta ve hastalığı ortaya çıkarmaktadır (Donnenberg ve Whittam, 2001).

**Lipopolisakkarit:** Lipopolisakkarit (LPS), tüm Gram negatif bakterilerde bulunan dış zarının önemli bir bileşenidir. Farklı organizmalarda bulunan LPS molekülleri farklı kimyasal bileşimlere, biyolojik aktivitelere ve potansiyele sahip olduğu için LPS'nin konakçı üzerindeki etkileri, kaynağına ve kimyasal bileşimine bağlı olarak değişir. Ayrıca, LPS'nin oldukça değişken O-antijen bileşeni, virülansı da etkileyebilecek biyolojik özelliklere sahiptir (Donnenberg, 2014).

**Kapsüller:** Kapsüller, *Enterobacterales* takımı arasında yaygındır. Bazı kapsüllerin, bakterilere fagositozdan ve serumun öldürücü etkisinden kaçma yeteneği kazandırdığı bilinmektedir. Örneğin, yenidoğan sepsisli ve menenjitli hastalardan izole edilen birçok *E. coli* suşu tarafından üretilen K1 kapsülü, kan-beyin bariyerinden geçerken bakteriyel hayatta kalma ile ilişkilendirilmiştir. *E. coli*'nin K2

ve K15 kapsülleri idrar yolunun kolonizasyonu için önemlidir ve *E. coli*'nin K54 kapsülü sistemik enfeksiyonlar için önemlidir (Donnenberg, 2014).

**Adezinler:** Mikrobiyal patojen oluşumunda kabul gören görüşlerden birisi de, patojenin konakçı hücrelere ilk yapışmasının hastalık için gerekli bir şart olduğudur. Ayrıca, yapışma spesifik olmayan "yapışkanlığın" bir sonucu değildir. Her iki hücre negatif yükten kaynaklanan elektrostatik itme kuvvetinin üstesinden gelmek için mikrobiyal adezinlere ihtiyaç duyar ve pili ve dış zar proteinleri de dahil olmak üzere çeşitli adezinler üretirler. Bazı durumlarda, yüzeyde bulunan karbonhidratlar da yapışkan özelliklere sahip olabilir. Bakteriler, rastgele faz varyasyonlarına yanıt olarak aynı anda birçok farklı adezin üretebilmektedir (Donnenberg, 2014).

*E. coli*'nin Tip 1 fimbriaları, canlı ve cansız yüzeylere bakteriyel yapışmaya aracılık eden, enfekte olmuş konakçılarda biyofilm oluşumuna ve kolonizasyona yol açan filamentli yüzey organelleridir. Patojenlerin konakçı hücrelere yapışması enfeksiyon oluşturmak için ilk adımdır; bu nedenle tip 1 fimbriaların *E. coli* kaynaklı enfeksiyonlara katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2014).

**Ekzotoksinler:** Toksinler, enfeksiyon sırasında bakterilerin dokulara yayılmasına katkıda bulunduğu, sitotoksisiteyi ve nötrofillere duyarsızlığı arttırdığı için enfeksiyon sırasında çok önemli bir rol oynarlar (Sarowska ve ark., 2019).

#### 1.1.4. Epidemiyoloji

Patojenik *E. coli* suşları enfeksiyon durumunda genellikle üç klinik sendrom gösterir: (i) enterit; (ii) idrar yolu enfeksiyonu; (iii) sepsis/menenjit. Bu bakteriler, virülans faktörlerini kodlayan genetik faktörler edinmedikçe, komensal olarak kalırlar. Enterotoksinleri kodlayan bakteriyofaj ya da plazmid DNA'sı alan suşlar virülen hale gelir. Bağırsak hastalıklarına neden olan *E. coli* arasında, iyi tanımlanmış altı patotip vardır: enteropatojenik *E. coli* (EPEC), diffuzadheziv *E. coli*

(DAEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enteroinvaziv *E. coli* (EIEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC). Bu patotipler, bakterilerin farklı mekanizmalarla hastalık oluşturmasına neden olan virölans özelliklerine sahiptir (Stenutz ve ark., 2006).

Ekstraintestinal patojenik *E. coli* (ExPEC) suşları; idrar yolu, kan dolaşımı, prostat ve bağırsak dışı bölgelerde enfeksiyonlara neden olabilecek çok yönlü bakterilerdir. Genellikle insanların (ve diğerk hayvanların) bağırsak mikrobiyotasında bir bölge işgal ederek ekstraintestinal enfeksiyonlara neden olmak için ortaya çıkarlar (Manges ve ark., 2019). NMEC (Yenidoğan Menenjitte neden olan *E. coli*), Gram negatif bakteriyel menenjitin ana nedenidir. Son yıllarda, çoklu ilaca dirençli NMEC suşlarında önemli bir artış gözlenmiştir. Sağılıklı kuşların bağırsak mikroflorasında bulunan ek bir hayvan patotipi olan APEC (Avian Patojenik *E. coli*), birkaç kuş türündeki ekstraintestinal hastalıklardan sorumludur. Son çalışmalar APEC ve ExPEC'in serogruplarında benzerlikler ve gıda kaynaklı hastalıklara neden olan virölans faktörlerinin olduğunu göstermektedir. Fakat, APEC'in insanlarda hastalığa neden olma kapasitesi henüz doğrulanamamıştır (Allocati ve ark., 2013).

**Çizelge 1.1** *E. coli*'nin patojenik türleri (Allocati ve ark., 2013).

| Patotip                                        | Hastalıklar                         | Semptomlar                  | Virülans faktörleri                            |
|------------------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| <b><i>Enterik E.coli</i></b>                   |                                     |                             |                                                |
| <b>EPEC</b>                                    | Çocuklarda ishal                    | Kusma, sulu ishal           | Bfp, Intimin, LEE                              |
| <b>EHEC</b>                                    | Hemorajik kolit, HUS                | Kanlı ishal                 | Shiga toksinleri, Intimin, Bfp                 |
| <b>ETEC</b>                                    | Turist diyaresi                     | Kusma, sulu ishal           | LT ve ST toksinler, CFA'lar                    |
| <b>EAEC</b>                                    | Çocuklarda ishal                    | Mukuslu ishal ve kusma      | AAF'ler, sitotoksinler                         |
| <b>DAEC</b>                                    | Çocuklarda akut ishal               | Sulu ishal, tekrarlayan İYE | Daa, AIDA                                      |
| <b>EIEC</b>                                    | Şigelloz benzeri                    | Sulu ishal; dizanteri       | Shiga toksini, hemolizin, Hücrel invazyon, Ipa |
| <b>AIEC</b>                                    | Crohn hastalığı ile ilişkili        | Kalıcı bağırsak iltihabı    | Tip 1 fimbria                                  |
| <b><i>Ekstraintestinal E. coli (ExPEC)</i></b> |                                     |                             |                                                |
| <b>UPEC</b>                                    | Düşük İYE ve sistemik enfeksiyonlar | Piyelonefrit, sistit        | Tip 1 ve P fimbriaları; AAF'ler, hemolizin     |
| <b>NMEC</b>                                    | Yenidoğan menenjit                  | Akut menenjit, sepsis       | S fimbria; K1 kapsülü                          |
| <b>APEC</b>                                    | Gıda kaynaklı hastalık kaynağı      | -                           | Tip 1 ve P fimbriaları; K1 kapsülü             |

Bfp: demet oluşturan pili

CFA: kolonizasyon faktörü antijeni

İYE: idrar yolları enfeksiyonu

LT: labil toksin

LEE: enterosit etkinliğinin odağı

AAF: agregatif yapışma fimbria

AIDA: dağınık yapışma ile ilişkili adezin

ST: stabil toksin

HUS: hemolitik üremik sendrom

Daa: diffüz adezin

Ipa: İnvazyon plazmid antijeni

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

ETEC suşları ilk olarak domuz yavrularında diyare hastalığının nedeni olarak kabul edilmiştir. Hastalık halen yenidoğan hayvanlarda ölümcül enfeksiyona neden olmaya devam etmektedir. ETEC çalışmaları ilk olarak domuz yavrularından alınan örnekler ile yapılmıştır. Böylece hastalık mekanizması açıklığa kavuşmuştur (Nataro ve Kaper, 1998)

Gelişmekte olan ülkelerdeki 5 yaşın altındaki çocuklarda ETEC ölüm nedenlerinden biridir. Bağışıklık kazanmayan bireylerde, bazen mide bulantısı, kusma ve karın ağrıları ile birlikte kısa dışkı atakları olarak ortaya çıkan ve turist diyaresi olarak bilinen bir durum geliştirebilir. Seyahat edenlerde görülen diyare olması tropik ülkelere giden insanların %60'ını etkiler ve bunların %20-40'ı ETEC nedeni ile oluşmaktadır (Percival ve Williams, 2013).

ETEC'nin konakçı üzerindeki patojen etkilerini başlatabilmesi için, bakterilerin önce ince bağırsakta epitel hücrelerinin mukozal yüzeyine yapışması gerekmektedir. ETEC için çok sayıda kolonizasyon faktörü tanımlanmıştır. Bu yapışma sürecinin oldukça karmaşık olduğunu düşündürmektedir. Yapışma süreci fimbrialar ve spesifik bağlayıcı reseptörler aracılığıyla meydana gelmektedir. ETEC hücreye yapıştıktan sonra salınan toksinler hücre hasarını tetikleyebilir. ETEC suşları ısıya dayanıklı toksin (ST) adı verilen kısa bir polipeptit zincirli toksin ve ısıya dayanıksız toksin (LT) adı verilen büyük bir oligometrik, enterotoksin üretir. Hem ST (STa ve STb ) hem de LT (LT-I ve LT-II) toksinleri iki antijenik tipe sahiptir (Percival ve Williams, 2013).

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

EIEC suşlarının ince ve kalın bağırsak mukoz membranına tutunabilmek için, enterositlere penetre olmaları gerekir. Kan ve lenf sisteminde endotoksin oluşturarak koliseptisemiye neden olmaktadır. Komplement sistem ve fagositozdan kapsülleri yardımıyla kurtularak patojen özellik gösterirler. EIEC suşları hareketsiz, laktoz ve lizin dekarboksilaz negatif özellik gösterirler (Omerovic ve ark., 2017). Shigella'dan temel olarak EIEC'in glikoz ve ksiloz fermente etmesiyle ayırt edilebilirler. Shigella gibi, EIEC de şiddetli karın krampları, ateş, tenesmus, mukus ve kan içerebilen küçük hacimli dışkıların sık sık geçişi ile dizanteriye ilerleyebilen sulu diyareye neden olabilmektedir (Donnenberg, 2014).

#### 1.1.4.3. EPEC (Enteropathogenic *E. coli*)

Diyareye neden olan en eski *E. coli* türü olarak bilinmektedir. EPEC türünün en önemli virülans faktörü adherens özelliğine sahip olmasıdır. Shiga toksin üretmezler. Gelişmekte olan ülkelerde yeni doğanlarda şiddetli ishale sebep olmaktadır. EPEC enfeksiyonunda düşük ateş, sulu diyare ve kusma görülmektedir. Salgınlar bebek bakım ünitelerinde ortaya çıkmaktadır. İnsan, sığır ve domuzlar bu bakteriyle enfekte olmaktadır. EPEC, başlıca insandan insana bulaşarak yayılmakta, fakat çok az olarak kontamine su ve gıdalarla da bulaşabilmektedir (Uçar ve Yörük, 2015).

EPEC enfeksiyonlarının ayırt edici özelliği, hastalardan veya enfekte hayvanlardan alınan bağırsak örneklerinde görülebilen ve hücre kültüründe çoğaltılabilen bağlanma efekti (the attaching-and-effacing (A/E)) histopatolojisidir. Bu fenotip, membran mikrovilluslarında epitel hücrelere yapışarak bağırsakta hasara neden olmaktadır (Nataro ve Kaper, 1998). EPEC'de A/E lezyonu oluşumu, tip III salgılama sistemi T3SS'yi kodlayan LEE genlerine bağlıdır. LEE genleri bakteriler ile konakçı hücre arasında yakın bir bağlanmaya izin vermektedir. Konakçı hücresel süreçleri bozan ve gastrointestinal semptomları indükleyen efektör proteinler, LEE patojenite adasında bulunan genler tarafından kodlanmaktadır (Smith ve Fratamico, 2017).

#### 1.1.4.4. EHEC (Enterohemorajik *E. coli*)

EHEC, dünya çapında birçok büyük gıda kaynaklı salgın sonucu ortaya çıkan bir patojendir. Tüm yaş gruplarında kanlı ve kanlı olmayan ishale ve hemolitik üremik sendroma (HUS) neden olabilmektedir. EHEC ile ilişkili en kötü şöhretli *E. coli* serotipi, Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'da birkaç büyük hastalık salgınına neden olan O157: H7'dir. Shiga toksini veya verositoksin (VT) olarak da bilinen güçlü sitotoksin EHEC'nin en önemli virülans faktörüdür. Bu toksin daha önce Shiga

benzeri toksin (SLT) olarak biliniyordu, ancak çok sayıda raporlandıktan sonra artık Shiga toksin isimlendirmesi kullanılmaktadır (Kaper, 1998)

*E. coli* O157: H7 enfeksiyonlarının toplam vaka sayısı, *Salmonella* veya *Campylobacter spp.* gibi diğer enterik patojenlerden daha düşüktür fakat *E. coli* O157: H7'nin sebep olduğu hastalıklar daha yüksek hastanede yatış süresi ve ölüm oranlarına neden olmuştur. Çoğu vaka, kanlı olmayan ishal ile başlar ve daha fazla komplikasyon olmadan kendi kendine düzelir. Bununla birlikte, bazı hastalar 1-3 gün içinde kanlı ishale veya HC (hemorajik kolit)'ye ilerler. HC hastalarının %5-10'unda hastalık yaşamı tehdit eden doku bozukluğu, HUS veya trombositopenik purpuraya (TTP) ilerleyebilmektedir. *E. coli* O157: H7, Amerika Birleşik Devletleri'nde HUS'un en yaygın nedeni olarak bilinmektedir. Çocuklar ve yaşlılar yüksek risk altındadır. Enfeksiyonda kullanılan spesifik bir tedavi yoktur ve antibiyotik kullanımı kontrendike olabilir. Esas olarak tedavi, semptomların süresini sınırlamak ve sistemik komplikasyonları önlemek için destekleyicidir (Lim ve ark., 2010).

Shiga toksin 1 (stx1), Shiga toksin 2 (stx2), intimin ve plasmid kaplı enterohemolizin *E. coli* O157:H7'nin patojenitesinde etkili olan virülans faktörleridir. Shiga-1 toksinler, HUS ve HC'nin patogeneğinde en etkili olan faktördür. Shiga toksin insan kolonu ve duodenumu için sitotoksik etki göstermektedir (Ertaş ve ark., 2013)

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

EAEC, 1987 yılında tanımlanmıştır. ABD'de, Nataro ve arkadaşları *E. coli*'nin Hep-2 (human epitelyal tip 2) hücrelerine yapışma özelliğini inceleyerek yapışmayı agregatif ve diffuz (gerçek) yapışma olarak iki kategoriye ayırmışlardır. EAEC, genleri plazmid kaynaklı olan agregatif yapışma fimbrialarının (AAF) varlığı ile kalın bağırsaktaki enterositlere yapışabilir. Patojenitenin son aşamasında mukozal astarın zarar görmesinden sorumlu olan sitotoksin salgılanır. Agregatif özelliği

bulunan *E. coli*'leri tanımlamak amacı ile araştırmacılar EAEC şeklinde isimlendirmişlerdir (Omerovic ve ark., 2017; Percival ve Williams, 2013)

EAEC, akut ve kronik sulu ishal, ateş, bulantı, kusma, karın ağrısı ve kanlı ishal gibi çeşitli klinik özellikler gösterir. EAEC özellikle kalıcı çocukluk dönemi ishali ile ilişkilidir (Estrada-Garcia ve ark., 2013). Brezilya ve Afrika'da yapılan araştırmalar, EAEC ile ilişkili kalıcı ishali yetersiz beslenmeyle bağlantılı olduğunu göstermektedir. EAEC, çocuklarda diyare olmadığında bile bağırsak iltihabı ile büyüme eksikliklerinin ve entelektüel gelişimin azalmasının bir nedeni olarak görülmektedir. Bu gözlemler, patojenik EAEC'nin bağırsaktan sitokin salınımını indüklediği gerçeği ile uyumludur. Bu tür sürekli mukozal yaralanma, bağırsak geçirgenliğini artırabilir ve yetersiz besin asimilasyonuna neden olabilir. Buna karşılık, yetersiz beslenme enfeksiyonu daha da kolaylaştırır ve EAEC'nin neden olduğu hastalık yükünü artırarak enfeksiyon, yetersiz beslenme ve gelişimsel bozukluk döngüsünü devam ettirir (Estrada-Garcia ve ark., 2013).

#### **1.1.4.6. DAEC (Diffuz Adheziv *E. coli*)**

DAEC grubunun tipik özelliği Hep-2 hücrelerine yapışmasıdır, ancak EAEC'de görüldüğünden daha dağınık bir yapıdadır. DAEC için patojenik mekanizmalar belirsizdir. DAEC, ince bağırsağın enterositlerinde dağınık bağlanma örneği oluşturur ve buna, bozulmayı hızlandıran faktöre ve karsinoembriyonik antijenle ilgili hücre yapışması molekülüne ait reseptörlere bağlanan afimbrial ve fimbrial adezyonlar aracılık eder. Sat olarak bilinen bir toksin, geçirgenliği artırarak sıkı kavşaklarda DEAC lezyonlarında rol oynar (Percival ve Williams, 2013). Birçok DAEC, serogrup O1, O2, O21 ve O75'e aittir. DAEC serotipleri 1-5 yaşındaki çocuklarda inatçı diyareye sebep olur (Uçar ve Yörük, 2015).

#### 1.1.4.7. *E. coli*'nin Direnç Geliştirme Mekanizmaları

**Beta-laktamlar antibiyotikler:** Beta-laktam direncinin ana mekanizması antibiyotik modifiye edici beta-laktamazlardır. Kromozomal beta-laktamazlar *E. coli*'ye özgüdür. Diğer beta-laktamazlar, genetik elementler yoluyla bir bakteriden diğerine aktarılabilir ve yüksek seviyede ilaç direnci sağlayabilir. Beta-laktamazlar için iki sınıflandırma şeması vardır. Ambler sistemi, amino asit sekanslarına dayanan enzimleri dört ana gruba ayırır. Bush-Jacoby sistemi, enzimleri işlevselliklerine göre üç ana grup ve birden fazla alt grupta sınıflandırır (Fleece ve ark., 2018).

Beta-laktamazlar, penisilinlere ve sefalosporinlere direnç kazandırmaktadırlar. Ayrıca Gram negatif bakterilerde çoklu ilaç direncinin önemli bir nedenidir. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinler ve monobaktamlar dahil olmak üzere birçok antibiyotiğe direnç kazandırmaktadırlar. CTX-M-1 dünyada tanımlanan en yaygın türüdür. Ayrıca CTX-M-15 en çok tanımlanan varyanttır. Avrupa'da, CTX-M-14 ve CTX-M-15 tipleri insanlar arasında yaygın olarak dağılmıştır. Buna karşılık, CTX-M-1 varyantı hayvanlar arasında en yaygın olanıdır (Allocati ve ark., 2013)

**Karbapenem antibiyotikler:** Antimikrobiyal spektrumlarının geniş olması ayrıca AmpC ve GSBL enzimlerine dayanıklı olmaları nedeni ile çok ilaca dirençli Gram negatif bakteri enfeksiyonlarında ilk sırada kullanılmaktadırlar. Son yıllarda karbapenem kullanımına paralel olarak artan GSBL ve AmpC oranları sonucunda, karbapenemleri hidrolize eden beta-laktamazların sayısının da arttığı gözlemlenmiştir (Öcal, 2012).

**Florokinolon antibiyotikler:** Florokinolonlara direnç mekanizmaları; (i) ilaç hedeflerinde meydana gelen değişiklikler, (ii) akış pompaları yoluyla ilaç birikimindeki azalma, (iii) antibiyotik modifikasyonu ve ilaç hedefine erişimin kısıtlanması olarak 4 türdür. Genel olarak, üst düzey florokinolon direnci, birkaç gende birden fazla mutasyon olduğunda ortaya çıkar. En yaygın ve klinik olarak

anlamalı direnç mekanizması, hedef enzimler DNA girazı ve topoizomeraz IV'teki tek nokta mutasyonlarıdır (Fleece ve ark., 2018).

## **1.2. Aminoglikozid Antibiyotikler**

Aminoglikozidler ilk olarak 1944'te *Streptomyces griseus*'tan Waksman ve arkadaşları tarafından keşfedilmiştir. Çoğu aminoglikozid, *Streptomyces* veya *Micromonospora* cinsinin aktinomisetleri tarafından üretilen doğal ya da semisentetik antibiyotiklerdir. *Streptomyces* cinsinden yarı sentetik türevler olan amikasin, netilmisin, dibekasin, isepamisin ve arbekasin '-micin' olarak adlandırılırken, *Micromonospora* (neomisin, tobramisin, paramomisin) cinsinden gelenler '-mycin' olarak isimlendirilmektedir (Jana ve Deb, 2006). İlk aminoglikozid streptomisin, tüberküloz tedavisinde ve daha sonra Gram negatif bakterilerle beraber enfeksiyon tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır (Doi ve ark., 2016).

Aminoglikozid antibiyotikler; katyonik, bazik, güçlü polar özellik gösteren bileşiklerdir. Suda iyi çözünürler, lipidlerde nispeten çözünmezler ve asidik ortamlardan ziyade bazik ortamlarda antimikrobiyal aktiviteye sahiptirler. Aminoglikozidler bağırsaktan oldukça az absorbe olurlar ve kan beyin bariyerine zayıf nüfuz etmektedirler. Aminoglikozidlerin katyonik olması antimikrobiyal aktivitelerine katkıda bulunmaktadır. Pozitif yükleri nedeniyle, bakteri hücre duvarının negatif yüklü lipopolisakaritini ve DNA, RNA ve fosfolipitler gibi çeşitli hücre içi ve hücre zarı anyonik moleküllerini bağlayabilirler. Fakat, fizyolojik pH'daki pozitif yükleri aynı zamanda toksisitelerine (nefrotoksisite, ototoksisite ve nöromusküler blokaj) katkıda bulunmaktadır (Jana ve Deb, 2006)

### **1.2.1. Antimikrobiyal Aktivite Mekanizması**

Aminoglikozidler, bakterilerin 30S ribozomal alt birimini oluşturan 16S rRNA'nın aminoasit-tRNA tanıma bölgesine (A-bölgesi) bağlanır. Bu bağlanma,

protein sentezinin inhibisyonuna ve ardından hücre ölümüne yol açmaktadır (Doi ve ark., 2016). Özellikle aerobik, Gram negatif bakterilere karşı aktiftirler ve bazı Gram pozitif organizmalara karşı sinerjik etki göstermektedirler (Hu ve ark., 2013). Ayrıca aminoglikozidler, Gram negatif bakterilerin hücre duvarında geçici deliklerin oluşması ve normal geçirgenlik fonksiyonunun bozulmasına yol açmaktadır (Leggett, 2014).

### **1.2.2. Aminoglikozidlere Karşı Direnç Geliştirme Mekanizmaları**

Aminoglikozid antibiyotiklere karşı direnç geliştirme mekanizmaları 3 türdür;

- i) Asetiltransferazlar, fosfotransferazlar ve adenililtransferazlar gibi modifiye edici enzimlerin üretilmesi,
- ii) Ribozomal proteinlerde ya da 16S rRNA'da mutasyon ve 16S rRNA metiltransferaz ile hedefin modifikasyonu,
- iii) Dış zar geçirgenliğinin azalması ya da aktif akım pompasının aktivasyonu şeklindedir (Hu ve ark., 2013).

#### **1.2.2.1. Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimlere Bağlı Direnç**

Aminoglikozid modifiye edici enzimler (AME) genellikle çoklu direnç elementleri içeren plazmidlerde bulunmaktadır. Aminoglikozidlerin üretiminden sorumlu olan aktinomisetler, yatay gen transferi yoluyla bu enzimlerin yayılmasını sağlayabilir. 100'den fazla AME tanımlanmıştır ve aminoglikozid çekirdek iskeletinin etrafındaki farklı pozisyonlarda bulunan asetilat, fosforilat veya adenilat amino ya da hidroksil gruplarına göre üç gruba ayrılmıştır. Bu modifikasyonlar, ilacın hedefi için bağlanma afinitesini azaltır ve antibakteriyel potens kaybına yol açar. Bu üç AME ailesi arasında aminoglikozid N-asetiltransferazlar (AAC), aminoglikozid O-nükleotidiltransferazlar (ANT) ve aminoglikozid O-fosfotransferazlar (APH) bulunur (Krause ve ark., 2016).

**Çizelge 1.2 Aminoglikozidlerin direnç fenotipleri (Cohen ve ark. 2017)**

| <b>Direnç Mekanizması</b>          | <b>İsim</b>  | <b>Direnç Fenotipi</b>        |
|------------------------------------|--------------|-------------------------------|
| <b>N-Asetiltransferazlar</b>       | AAC(3'')     | <b>Gentamisin, Tobramisin</b> |
|                                    | AAC(6')-I    | <b>Amikasin, Tobramisin</b>   |
|                                    | AAC(6')-II   | <b>Gentamisin, Tobramisin</b> |
| <b>O-Nükleotidil transferazlar</b> | ANT(2'')-I   | <b>Gentamisin, Tobramisin</b> |
|                                    | ANT(3'')-I   | <b>Streptomisin</b>           |
| <b>O-Fosfotransferazlar</b>        | APH(3'')-III | <b>Amikasin</b>               |
|                                    | APH(3'')-IV  | <b>Amikasin</b>               |

#### **a. Asetiltransferazlar (AAC)**

AAC enzim ailesi, aminoglikozid asetiltransferin bölgesel özgüllüğüne dayanan dört ana alt sınıftan oluşmaktadır: *aac(1')*, *aac(2')*, *aac(3')* ve *aac(6')*. Bu enzimler hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerde bulunmaktadır. Genellikle geniş bir aminoglikozid direnç profili göstermektedir. AAC'ler, en büyük aminoglikozid direnç enzimleri ailesini oluşturmaktadır ve birçoğu kromozom olarak kodlanmış çok sayıda *aac(6')* homologuna sahiptir (Shakya ve Wright, 2007).

AAC enzim ailesi bulunduğundan beri, ailenin 70 üyesi tanımlanmıştır. Gram negatif bakteriler arasında sıklıkla görülen *aac(6')-1* enzimi amikasin, netilmisin ve tobramisin direncine, *aac(3)-IIa* gentamisin, tobramisin ve netilmisin direncine neden olmaktadır ayrıca *aac(3)-I* enzimi gentamisini modifiye etmektedir (Krause ve ark., 2016).

#### **b. Fosfotransferazlar (APH)**

AME'lerin en büyük ikinci grubu fosfotransferazlardır. Bu enzim grubu, aminoglikozidlerde bulunan hidroksil gruplarının ATP'ye bağlı fosforilasyonunu katalize ettikleri için kinazlar gibi davranırlar. APH enzimleri fonksiyonel ve yapısal olarak ökaryotlarda bulunan serin, treonin ve tirozin kinazlara benzemektedir (Krause ve ark., 2016). Ailenin tüm üyeleri kanamisin ve neomisin direncine yol

açmaktadır, ayrıca ailenin çeşitli üyeleri amikasin ve gentamisin B dahil olmak üzere çeşitli diğer aminoglikozid antibiyotikler üzerinde etkili olabilmektedir (Krause ve ark., 2016).

### c. Nükleotidil transferazlar (ANT)

ANT'ler aminoglikozid inaktive edici enzimlerin en küçük sınıfını temsil etmektedir. Gentamisin ve tobramisin gibi klinik olarak önemli aminoglikozidlerin her ikisi de ANT(") ile modifiye edilir. Bu enzimi kodlayan gen, patojenik bakteriler arasında yaygın bir şekilde dağılır ve lokal prevalansı, farklı klinik ortamlarda aminoglikozid kullanımı ile açıkça görülebilmektedir. Bugüne kadar 10 ANT türü belirlenmiştir. Bunlar hem kromozomal olarak hem de plazmidle kodlanmış enzimlerdir. Adenililtransferazları kodlayan *ant(2'')* ve *ant(3'')* genleri, dirençli Gram negatif organizmalardaki genetik elemanlarda sıklıkla tanımlanmaktadır. *ant(4')*, *ant(6)* ve *ant(9)* genleri ayrıca plazmidlerde bulunmaktadır (Jana ve Deb, 2006)

#### 1.2.2.2. Ribozomal Direnç

Aminoglikozid direncine yol açan hedef bölge modifikasyonu, 16S rRNA metiltransferazların etkisi ile meydana gelmektedir. Bu enzimler, spesifik rRNA nükleotid kalıntıları, aminoglikozidlerin hedeflerine etkili bir şekilde bağlanmasını engelleyecek şekilde modifiye ederler (Krause ve ark., 2016). 2003 yılında 16S rRNA metilazları üreten *Pseudomonas aeruginosa* ve *Klebsiella pneumoniae*'nin klinik suşları rapor edilmiştir. Bu enzimlerin, amikasin, tobramisin ve gentamisin gibi klinik olarak etkili aminoglikozidlere karşı yüksek derecede direnç sağladığı bulunmuştur (Doi ve Arakawa, 2007).

### 1.2.2.3. Dış Zar Geçirgenliğinin Azalması ve Aktif Akım Pompaları

Aminoglikozidler, bakterilerin dış zarı ile etkileşime girerek ve hücre zarı permeabilitesini bozarak etki göstermektedirler. Gram negatif bakterilerde hücre zarı, peptidoglikan içeren periplazma ve dış zardan oluşan ikinci bir fosfolipid çift katmanı içerir. Bu çok katmanlı hücre zarı bir bariyer görevi görür ve Gram negatif bakteriler için aminoglikozidlere karşı doğal bir direnç mekanizması sağlar. Katyonik, hidrofilik yapılarından ötürü aminoglikozidlerin fosfolipid çift-katmanından doğrudan difüzyon yerine porin kanalları yoluyla bakteri içine girdiği düşünülmektedir. Bakteriler en dıştaki lipopolisakkaritlerinin değiştirilmesi veya porin kanallarının geçirgenliğinin azalması yoluyla aminoglikozidlere dirençli hale gelebilir. Dış zar, aminoglikozidler gibi yabancı moleküllerden Gram negatif bakterilere karşı koruma sağlayan bir savunma hattı görevi görür. Dış zarın dışa bakan yarısı negatif yük taşır ve katyonik aminoglikozidleri çeken şeker ile fonksiyonel hale getirilmiş fosfolipitlerden oluşur (Garneau-Tsodikova ve Labby, 2016).

Kimyasal bir bileşiği hücre dışına çıkarabilen kompleks bakteriyel aktif akım pompaları antimikrobiyal dirence neden olabilir. Kromozomda kodlanan pompalar, bazı bakteri türlerinin belirli bir antibiyotiğe karşı doğal direncini açıklayabilir. 5 büyük aktif akım pompa ailesi vardır: The Major Facilitator Süper Ailesi (MFS), The Resistance-Nodulation-Celldivision Ailesi (RND), The Small Multidrug Resistance Aile (SMR), The ATP-Binding Cassette Ailesi (ABC) ve The Multidrug And Toxic Compound Extrusion Ailesi (MATE) (Munita ve ark., 2016).

Bu beş sınıf içinde RND ailesi baskın sınıftır. RND ailesi içinde aktif akım pompaları Gram negatif organizmalarla sınırlıdır ve üç ana bileşenden oluşur: RND pompası, bir dış membran faktörü (OMF) ve bir periplazmik membran füzyon proteini (MFP). Bu üç protein birlikte sistemle ilişkili RND pompası çeşitli antibiyotik, boya ve iyonları etkili bir şekilde pompalayabilir (Shakya ve Wright, 2007).

### 1.2.3. Aminoglikozidlerin Farmakolojik Özellikleri

Aminoglikozidler genellikle 30-60 dakikalık bir süre boyunca intravenöz olarak uygulanmaktadır. Kas içine tam emilim ile verilebilir; ancak polar yapıları nedeniyle gastrointestinal sistem emilimi minimaldir. Streptomisin hariç plazma proteinlerine çok az bağlanmaktadır. Çoğu vücut sıvısında yeterli aminoglikozid konsantrasyonları elde edilebilir, ancak epitel doku sıvısına penetrasyon, serum konsantrasyonlarının %32-54'ü arasında değişkenlik göstermektedir. Aminoglikozidler, göz dokuları dahil olmak üzere kan-BOS ve kan-beyin bariyerlerini zayıf bir şekilde geçerler. Öte yandan, aminoglikozidler öncelikle glomerüler filtrasyon yoluyla değişmeden elimine edildiğinden, idrar konsantrasyonları ilaç uygulamasını takiben 1 saat içinde pik plazma seviyelerini 25-100 kat aşmaktadır. Yarılanma ömürleri 2-4 saat arasında değişmektedir. Obezite, yaş, renal fonksiyon bozukluğu gibi parametreler ile ilişkili olarak yarı ömürleri değişmektedir (Leggett, 2014; Mısıktık, 2000).

### 1.2.4. Aminoglikozidlerin Klinik Kullanımları

Aminoglikozidler, öncelikle aerobik, Gram negatif bakterilerin neden olduğu karın, idrar yolu, cilt ve yumuşak doku, kemik, serviks, kan, akciğerler ve kalbin ciddi enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan güçlü bir antibiyotik grubudur. Genel olarak, gentamisin, tobramisin ve amikasin benzer durumlarda birbirinin yerine kullanılabilir. Bunlardan gentamisin, Gram negatif aeroblara karşı düşük maliyeti ve güvenilir aktivitesi nedeniyle en sık kullanılan aminoglikozid antibiyotiktir. Amikasin, diğer aminoglikozidlere dirençli bakterilere karşı kullanıldığında özellikle etkilidir, çünkü kimyasal yapısı onu inaktive edici enzimlere daha az duyarlı hale getirmektedir (Towne, 2014; Jana ve Deb, 2006).

Aminoglikozidler enfektif endokardit durumunda Gram pozitif bakterilere karşı bakterisidal etkiyi arttırmak için  $\beta$ -laktam antibiyotiklerle sinerjik olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, aminoglikozidlerin bazıları, bağırsakların ameliyat için

hazırlanması ve hepatik ensefalopatinin ileri aşamasının tedavisine ek kullanılmaktadır (Towne, 2014).

Yapılan çalışma kapsamında; Ankara'nın çeşitli çocuk parklarından alınan toprak ve sürüntü örneklerinden izole edilen *E. coli* izolatlarının antimikrobiyal direncinin belirlenmesi ve bazı direnç genlerinin moleküler yöntemlerle belirlenmesi amaçlanmıştır.



## 2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

### 2.1. Gereç

#### 2.1.1. Kullanılan Cihazlar

Hassas Terazı (Sartorius)

Vorteks

Otoklav (Hirayama)

Etüv (Heraus)

Mikroskop (Leica)

Derin Dondurucu (Esco)

Santrifüj

Mikrodalga fırın

Termal döngü cihazı (Geneamp PCR System 9700, Thermo Fisher)

Elektroforez tankı (EC300XL, Thermo Fisher)

Jel görüntüleme cihazı (ChemiDoc MP, BİO RAD)

#### 2.1.2. Besiyerleri

**Çizelge 2.1.** Eozin Metilen Mavisi Agar (EMB) (Clarkson Lab) Besiyeri Kimyasal İçeriği.

| Bileşen                            | Miktar (g/L) |
|------------------------------------|--------------|
| Enzymatic Digest of Gelatin        | 10,0         |
| Lactose                            | 10,0         |
| Beef Extract Dipotassium Phosphate | 2,0          |
| Lactose Eosin Y                    | 0,4          |
| Peptone Methylene Blue             | 0,065        |
| Agar                               | 15,0         |

Son pH: 7.1 ± 0.2

1000 mL saf su içinde 37,5 g besiyeri içeriği süspanse edilmiştir. Besiyerinin tamamen çözünmesi için sık sık çalkalayarak kaynatılmış ve 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. 45 °C’ ye soğutulduktan sonra petri kaplarına 25 mL dökülmüştür. Petrilere dökülen besiyerleri donduktan sonra etüvde bekletilmiş ve sterilite kontrolleri yapılmıştır.

**Çizelge 2.2.** Mueller Hinton Agar (MHA) (VWR) Besiyeri Kimyasal İçeriği.

| Bileşen                    | Miktar (g/L) |
|----------------------------|--------------|
| Beef extract               | 2,0          |
| Acid hydrolysate of casein | 17,5         |
| Starch                     | 1,5          |
| Agar                       | 17,0         |

Son pH: 7,3±0,2

1000 mL distile su içerisinde besiyeri karışımından 38 g tartılıp kaynatılmış ve pH ayarlandıktan sonra 121 °C’ de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir. 45 °C’ ye soğutulduktan sonra petrilere 25 mL dökülmüştür. Petrilere dökülen besiyerleri donduktan sonra 37 °C sıcaklıkta etüvde bekletilmiş ve sterilite kontrolleri yapılmıştır.

**Çizelge 2.3.** Mueller Hinton Broth (MHB) (MERCK) Besiyeri Kimyasal İçeriği.

| Bileşen            | Miktar (g/L) |
|--------------------|--------------|
| Infusion from meat | 2,0          |
| Casein hydrolysate | 17,5         |
| Starch             | 1,5          |

Son pH: 7,4±0,2

1000 mL distile su içine besiyeri karışımından 21 g tartılıp kaynatılmış ve pH ayarlandıktan sonra 121 °C’de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

**Çizelge 2.4.** İndol Besiyeri kimyasal içeriği.

| Bileşen    | Miktar (g/L) |
|------------|--------------|
| Tryptophan | 1,0          |
| NaCl       | 5,0          |
| Broth      | 8,0          |
| Distile su | 1000 ml      |

Son pH: 7,2

Hassas terazide tartımları alınan maddelerin 1000 mL distile su içerisinde çözünmesi sağlanmış ve pH ayarlandıktan sonra tüplere 3'er mL dağıtılarak 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

**Çizelge 2.5.** MR-VP Besiyeri Kimyasal İçeriği.

| Bileşen                         | Miktar (g/L) |
|---------------------------------|--------------|
| Peptone                         | 5,0          |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 5,0          |
| Distilled water                 | 1000 mL      |

Son pH:7,5

Tartımları alınan maddeler 1000 mL distile suda hafifçe ısıtılarak eritilmiş, pH'ı 7.5' e ayarlandıktan sonra 5 g glikoz ilave edilerek karıştırılmış ve tüplere 1,5'er mL dağıtılarak 121 °C' de otoklavda steril edilmiştir.

**Çizelge 2.6.** Simmons Sitrat Agar (OXOID) Besiyeri Kimyasal İçeriği.

| Bileşen                       | Miktar (g/L) |
|-------------------------------|--------------|
| Magnesium sulphate            | 0,2          |
| Ammonium dihydrogen phosphate | 0,2          |
| Sodium ammonium phosphate     | 0,8          |
| Sodium citrate, tribasic      | 2,0          |
| Sodium chloride               | 5,0          |
| Bromothymol blue              | 0,08         |
| Agar                          | 15,0         |

Son pH 7,0 ± 0,2

Besiyeri karışımından 23 g tartılıp 1000 mL distile suda çözünmesi sağlanmış, pH ayarlandıktan sonra tüplere 5 mL ilave edilerek otoklavda 121 °C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra yatık olacak biçimde dondurulmuştur.

**Çizelge 2.7. Üç Demirli Şekerli Besiyeri (OXOID) Besiyeri Kimyasal İçeriği.**

| <b>Bileşen</b>      | <b>Miktar (g/L)</b> |
|---------------------|---------------------|
| Lab-Lemco’ powder   | 3,0                 |
| Yeast extract       | 3,0                 |
| Peptone             | 20,0                |
| Sodium chloride     | 5,0                 |
| Lactose             | 10,0                |
| Sucrose             | 10,0                |
| Glucose             | 1,0                 |
| Ferric citrate      | 0,3                 |
| Sodium thiosulphate | 0,3                 |
| Phenol red          | 0,024               |
| Agar                | 12,0                |

Son pH 7,4 ± 0,2

Besiyeri karışımından 65 g tartılarak ve 1000 mL distile suda çözünmesi sağlanmıştır. pH ayarlandıktan sonra tüplere 5 mL ilave edilmiş otoklavda 121 °C’ de 15 dakika steril edilmiştir. Otoklavdan çıktıktan sonra yarı yatık olacak biçimde dondurulmuştur.

### **2.1.3. Kullanılan Boyalar ve Kimyasal Çözeltiler**

#### **2.1.3.1. Boyalar**

Kristal Viyole Solüsyonu (Bilgehan, 2002)

Safranin Solüsyonu (Bilgehan, 2002)

### 2.1.3.2. Kimyasal Malzemeler

#### **\*Fizyolojik Tuzlu Su Çözeltisi (%0.85)**

|            |         |
|------------|---------|
| NaCl       | 8,5 g   |
| Distile su | 1000 mL |

8,5 g sodyum klorür tartılarak 1000 mL distile suda çözüldü. 121 °C’ de otoklavda steril edilmiştir.

#### **\*Kovacs Ayıracı (Merck)**

##### **\*%15’ lik gliserin**

##### **\*Metil Red**

|            |        |
|------------|--------|
| Metil Red  | 0,04 g |
| Etanol     | 40 mL  |
| Distile su | 100 mL |

##### **\*Alfa Naftol**

|                |        |
|----------------|--------|
| Alfa naftol    | 5 g    |
| Saf etil alkol | 100 mL |

##### **\*KOH**

|            |        |
|------------|--------|
| KOH        | 40 g   |
| Distile su | 100 mL |

##### **\*Dimetil sülfoksit, DMSO**

##### **\*PCR Master Miks (2X)**

|                         |
|-------------------------|
| 10x PCR buffer          |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> |
| 2,5 mM dNTP             |
| Taq DNA polimeraz       |
| Distile su              |

##### **\*6 x Yükleme boyası (Loading Dye)**

##### **\*100 kb DNA Ladder**

##### **\*Primer çiftleri**

##### **\*Enjeksiyonluk su (DNaz- RNaz içermeyen distile su)**

**\*TBE Tampon (Tris, EDTA, Borik asit)**

**\*Agaroz (SeaKem Lonza)**

**\*Etidyum bromid**

#### **2.1.4. Referans Antibiyotikler**

Siprofloksasin (Oxoid)

Ampisilin (Oxoid)

Aztreonam (Oxoid)

Trimetoprim/Sulfametoksazol (Oxoid)

Piperasilin/Tazobaktam (Oxoid)

Amikasin (Oxoid)

Streptomisin (Bioanalyse)

Tobramisin (Oxoid)

Gentamisin (Oxoid)

Sefotaksim (Oxoid)

Seftazidim (Oxoid)

Ertapenem (Oxoid)

İmipenem (Oxoid)

Meropenem (Oxoid)

## **2.2. Yöntem**

### **2.2.1. *E. coli*'nin İzolasyonu ve Saklanması**

Çalışmada kullanılmak üzere, Ankara' daki farklı çocuk parklarından toprak ve sürüntü örnekleri alınmıştır. 140 farklı parktan toprak örnekleri ve 176 farklı parktan kaydırak, salıncak, dönme dolap, tahterevallı ve diğer oyuncaklarından toplam 414 sürüntü örneği MHB besiyeri içerisine alınmıştır. Toprak ve sürüntü olarak alınan toplam 554 örnek laboratuvara getirilerek 24 saat inkübe edilmiştir.

#### **2.2.2.5. Sitrat Testi (Citrat Test)**

Sitratları karbon kaynağı olarak kullanan bakterilerin incelenmesinde kullanılan bu test için Simmons Citrate Agar besiyeri kullanılmıştır (Bilgehan 2002).

Bakteri kültüründen Simmons Citrate Agar besiyerine ekim yapılarak 37°C’de 24 saat inkübe edilmiştir. Sitrata kullanma yeteneğine sahip bakteriler besiyerinde mavi renk oluşturmaktadır. Renk değişiminin olmaması test sonucunun negatif olduğunu göstermektedir (Bilgehan 2002).

#### **2.2.2.6. Üç Şekerli Demirli Besiyeri (Triple Sugar Iron Agar)**

Gram negatif bakterilerin glikoz, laktoz ve sükroz üzerindeki etkilerini belirleme ayrıca H<sub>2</sub>S oluşturup oluşturmadıklarını araştırma temeline dayanır (Bilgehan, 2002).

Saf kültürden alınan koloninin TSI agara ekimi yapılarak ve 37 °C’ de 24 saat inkübe edilmiştir. Laktoz ve sükrozu parçalamayan fakat glikozu fermente eden bakteriler dipte sarı renk ve yatıkta kırmızı renk oluştururlar. Laktozu, sükrozu veya her iki şekerini de fermente edebilen bakteriler dipte ve yatıkta sarı renk oluştururlar. Sarı renk oluşumu gözlenen tüplerde bulunan bakteriler laktoz, sükroz ve glikoz pozitif kabul edilmiştir. Şeker fermentasyonu sonucu gaz oluşumu meydana geldiyse besiyerinin yukarı doğru itilmesi ve besiyerinin yer yer parçalanması gözlemlenir.

HCCA (%50 ACN ve % 2.5 TFA karışımında 12.5 mg/mL HCCA) matris çözeltisi ilave edilmiş ve oda sıcaklığında tamamen kurumaya bırakılmıştır. MALDI çelik plakası MALDI TOF MS'ye yüklenmiş ve sistem, lineer pozitif iyon moduyla ve 2.000-20.000 Da kütle aralığında mikroorganizmaların tanımlanması için optimize edilmiş yöntemle çalıştırılmıştır. İyon kaynağı olarak 337 nm'de 60 Hz azot lazeri kullanılmıştır. Spektrumları elde etmek için, her numunenin ölçümünde 40 paket 240'dan oluşan lazer darbeleri gerçekleştirilmiştir. Her örnek için üç çalışma yapılmış ve en yüksek puana sahip okuma dikkate alınmıştır.

### **2.2.3. *E. coli* İzolatlarında İn Vitro Antibiyotik Duyarlılıklarının Araştırılması**

Elde edilen tüm izolatların antibiyotik duyarlılık testleri, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) önerileri doğrultusunda, Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile yapılmıştır. Bakteri kolonileri öze yardımıyla alınarak steril 2 mL fizyolojik su içeren tüplerde 0.5 McFarland bulanıklığına ayarlanmıştır. McFarland 0.5 bulanıklığına ayarlanan bakteri süspansiyonundan steril eküvyon ile Mueller Hinton Agar besiyerinin yüzeyine uygun şekilde yayılmıştır. Tüm plaklar 37°C'de 18 saat inkübe edildikten sonra plaklardaki zon çapları kumpas ile ölçülmüştür. Zon çapı sonuçları EUCAST'ın önerdiği yorumlama kriterlerine uygun olarak değerlendirilmiştir. Streptomisin için CLSI'n önerdiği yorumlama kriterleri dikkate alınmıştır. Kalite kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır.

Suşların antibiyotik duyarlılığını belirlemek için; Siprofloksasin (CIP;5µg), Ampisilin (AMP;10µg), Aztreonam (ATM;30µg) Trimetoprim/Sulfametoksazol (SXT;25µg), Piperasilin/Tazobaktam (TPZ;36µg), Amikasin (AK;30µg), Streptomisin (STR;10µg), Tobramisin (TOB;10µg), Gentamisin (CN;10µg), Sefotaksim (CTX;5µg), Seftazidim (CAZ;10µg), İmipenem (IPM;10µg), Ertapenem (ETP;10µg), Meropenem (MEM;10 µg) diskleri kullanılmıştır.

#### 2.2.4.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Elde edilen bakteri DNA'sından 2 µl DNA alınmış, 15 µl PCR karışımı ile karıştırılarak ısı döngü cihazına yüklenmiştir. PCR için kullanılan primerler dizileri ve amplifikasyon ürün büyüklükleri Çizelge 2.8 'de, reaksiyon karışımı ve miktarları Çizelge 2.9 'de ve ısı döngü koşulları Çizelge 2.10 'da verilmiştir.

**Çizelge 2.8. PCR İçin Kullanılan Primerler.**

| Gen                | Primer ismi | Primer                      | Bç  | Referans                       |
|--------------------|-------------|-----------------------------|-----|--------------------------------|
| <i>aac(6')-Ib</i>  | AAC(6')-IF  | TATGAGTGGCTAAATCGAT         | 395 | (Ploy ve ark., 1994)           |
|                    | AAC(6')-IR  | CCCGCTTTCTCGTAGCA           |     |                                |
| <i>aac(3')-IIa</i> | AAC(3')-IIF | GCCGACTGGCACTGTGATGGGATAC   | 359 | (Aggen ve ark., 2010)          |
|                    | AAC(3')-IIR | TGCAATGCGGTAACGGAGTTTAGC    |     |                                |
| <i>aac(3')-IV</i>  | AAC(3')-IVF | CTCGAAGATGGGCCACTTGGACTGATC | 367 | (Aggen ve ark., 2010)          |
|                    | AAC(3')-IVR | AACTCGGCAAGATGCAGCGTCGTG    |     |                                |
| <i>aph(3')-VI</i>  | APH(3')-VIF | CGGAAACAGCGTTTTAGA          | 716 | (Noppe-Leclercq ve ark., 1999) |
|                    | APH(3')-VIR | TTCCTTTTGTGTCAGGTC          |     |                                |
| <i>ant(3')-I</i>   | ANT(3')-IF  | GTGGATGGCGGCCTGAAGCC        | 526 | (Sandvang ve ark., 1997)       |
|                    | ANT(3')-IR  | ATTGCCAGTCGGCAGCG           |     |                                |
| <i>ant(2')-Ia</i>  | ANT(2')-IF  | ATGCGCTCACGCAACTGGTC        | 749 | (Dubois ve ark., 2008)         |
|                    | ANT(2')-IR  | GCATATCGCGACCTGAAAGC        |     |                                |

**Çizelge 2.9 PCR Karışımı.**

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| 10x PCR buffer          | 2,5 |
| 25 mM MgCl <sub>2</sub> | 2,5 |
| 2,5 mM dNTP             | 2   |
| Taq DNA polimeraz       | 0,5 |
| Primer F (10pmol/µl)    | 1   |
| Primer R (10pmol/µl)    | 1   |
| Kalıp DNA               | 2   |
| Distile su              | 3,5 |
| Toplam hacim            | 15  |

Her bir gen bölgesinin amplifikasyonunda pozitif kontrol olarak daha önce DNA dizi analizi ile varlığı doğrulanmış DNA örnekleri kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak ise steril distile su kullanılmıştır.

**Çizelge 2.10.** PCR Döngü ve Parametreleri.

| <b>Basamak</b>   | <b>Sıcaklık</b> | <b>Süre</b> | <b>Döngü sayısı</b> |
|------------------|-----------------|-------------|---------------------|
| İlk denatürasyon | 94 °C           | 5 dakika    | 1                   |
| Denatürasyon     | 94 °C           | 30 saniye   | 35                  |
| Bağlanma         | 52 °C           | 30 saniye   |                     |
| Uzama            | 72 °C           | 45 saniye   |                     |
| Son uzama        | 72 °C           | 7 dakika    | 1                   |

#### 2.2.4.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PCR işlemi sonrası oluşan ürünler, agaroz jel elektroforezi yöntemi ile değerlendirilmiştir. 100 mL 1X TBE tamponu içerisine 2 g agaroz eklenerek mikrodalga fırında iyice eritilmiştir. Jel sıcaklığı 60°C'ye geldiğinde etidyum bromür çözeltisi 0.5 mg/L olacak şekilde eklenip, iyice karıştırıldıktan sonra jel kabına dökülerek donması beklenmiştir. Jel, elektroforez tankına yerleştirilerek yüzeyini geçinceye kadar 1 X TBE çözeltisiyle doldurulmuştur. Baş ve sondaki kuyucuğa DNA ladder (marker), diğer kuyucuklara 5'er µl PCR ürünü yüklenmiştir. Bütün örnekler yüklendikten sonra elektroforez ünitesinin kapağı kapatılmış ve 90 dakika boyunca 120 V akıma tabi tutularak yürütme işlemi gerçekleştirilmiştir. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra jel görüntüleme cihazında jelin fotoğrafı çekilmiştir. İlgili genin varlığı, beklenen büyüklükte amplifikasyon ürünü bantının elde edilip edilmemesine göre değerlendirilmiştir.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. İzolatların İdentifikasyonu

Çalışmada Ankara ilindeki 140 farklı çocuk parkından toprak örnekleri ve 176 farklı çocuk parkından kaydırak, salıncak ve diğer oyuncaklarından toplam 414 sürüntü örneği alınmıştır. Alınan toplam 554 örnekten 40 tanesi EMB agarda tipik metalik parlaklık veren koloniler oluşmuştur. Bu kolonilere yapılan Gram boyama sonucunda mikroskopta Gram negatif basiller olduğu gözlenmiştir. Ayrıca IMVIC testleri +,+,+,- olan ve TSI besiyerinde laktoz pozitif olduğu belirlenen kolonilerin *E. coli* olduğu kabul edilmiştir. *E. coli* olduğu doğrulanan izolatlar MALDI-TOF yöntemiyle de doğrulanmıştır.

Çizelge 3.1. MALDI TOF MS Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar.

| Örnek Numarası | Organizma<br>(en iyi eşleşme) | Puan Değeri |
|----------------|-------------------------------|-------------|
| 1              | <i>E. coli</i>                | 2.208       |
| 2              | <i>E. coli</i>                | 2.270       |
| 3              | <i>E. coli</i>                | 2.083       |
| 4              | <i>E. coli</i>                | 2.479       |
| 5              | <i>E. coli</i>                | 2.476       |
| 6              | <i>E. coli</i>                | 2.171       |
| 7              | <i>E. coli</i>                | 2.169       |
| 8              | <i>E. coli</i>                | 2.353       |
| 9              | <i>E. coli</i>                | 2.381       |
| 10             | <i>E. coli</i>                | 2.238       |
| 11             | <i>E. coli</i>                | 2.350       |
| 12             | <i>E. coli</i>                | 2.396       |
| 13             | <i>E. coli</i>                | 2.322       |
| 14             | <i>E. coli</i>                | 2.223       |
| 15             | <i>E. coli</i>                | 2.162       |
| 16             | <i>E. coli</i>                | 2.165       |
| 17             | <i>E. coli</i>                | 1.997       |
| 18             | <i>E. coli</i>                | 2.215       |
| 19             | <i>E. coli</i>                | 2.472       |
| 20             | <i>E. coli</i>                | 2.246       |
| 21             | <i>E. coli</i>                | 2.481       |
| 22             | <i>E. coli</i>                | 2.319       |
| 23             | <i>E. coli</i>                | 2.287       |
| 24             | <i>E. coli</i>                | 2.457       |
| 25             | <i>E. coli</i>                | 2.475       |

**Çizelge 3.1. MALDI TOF MS Yöntemi ile Elde Edilen Sonuçlar (devam).**

| <b>Örnek Numarası</b> | <b>Organizma<br/>(en iyi eşleşme)</b> | <b>Puan Değeri</b> |
|-----------------------|---------------------------------------|--------------------|
| <b>26</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.232              |
| <b>27</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.215              |
| <b>28</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.103              |
| <b>29</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.096              |
| <b>30</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.320              |
| <b>31</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.437              |
| <b>32</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.287              |
| <b>33</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.290              |
| <b>34</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.183              |
| <b>35</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.491              |
| <b>36</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.548              |
| <b>37</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.172              |
| <b>38</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.330              |
| <b>39</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.309              |
| <b>40</b>             | <i>E. coli</i>                        | 2.282              |
| <b>Standart suş</b>   | <i>E. coli ATCC 25922</i>             | 2.330              |

### **3.2. Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi**

Çalışmadan elde edilen 40 tane *E. coli* izolatının antibiyotik duyarlılık sonuçları Çizelge 3.2’de verilmiştir. Buna göre siprofloksasin %87.5 (35), ampisilin %81 (32), aztreonam %97.5 (39), trimetoprim/sulfametoksazol %85 (34), piperasilin/tazobaktam %95 (38), amikasin %97.5 (39), streptomisin %17.5 (7), gentamisin %5 (2), sefotaksim %97.5 (39), seftazidim %97.5 (39), ertapenem %100 (40), imipenem %100 (40), meropenem %100 (40) olarak duyarlılık oranları bulunmuştur. Orta duyarlılık oranları incelendiğinde en yüksek orta duyarlılık oranları; streptomisin %70 (28), tobramisin %95 (38) ve gentamisin %90 (36) olarak bulunmuştur (Çizelge 3.2).

**Çizelge 3.2** Tüm İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

| <b>Antibiyotik</b>                      | <b>Dirençli (%)</b> | <b>Orta Duyarlı(%)</b> | <b>Duyarlı (%)</b> |
|-----------------------------------------|---------------------|------------------------|--------------------|
| <b>Siprofloksasin</b>                   | 2 (%5)              | 3 (%7.5)               | 35 (%87.5)         |
| <b>Ampisilin</b>                        | 7 (%17.5)           | 1 (%2.5)               | 32 (%81)           |
| <b>Aztreonam</b>                        | -                   | 1 (%2.5)               | 39 (%97.5)         |
| <b>Trimetoprim/Sulfametoksa<br/>zol</b> | 6 (%15)             | -                      | 34 (%85)           |
| <b>Piperasilin/Tazobaktam</b>           | -                   | 2 (%5)                 | 38 (%95)           |
| <b>Amikasin</b>                         | -                   | 1 (%2.5)               | 39 (%97.5)         |
| <b>Streptomisin</b>                     | 5 (%12.5)           | 28 (%70)               | 7 (%17.5)          |
| <b>Tobramisin</b>                       | 2 (%5)              | 38 (%95)               | -                  |
| <b>Gentamisin</b>                       | 2 (%5)              | 36 (%90)               | 2 (%5)             |
| <b>Sefotaksim</b>                       | 1 (%2.5)            | -                      | 39 (%97.5)         |
| <b>Seftazidim</b>                       | 1 (%2.5)            | -                      | 39 (%97.5)         |
| <b>Ertapenem</b>                        | -                   | -                      | 40 (%100)          |
| <b>İmipenem</b>                         | -                   | -                      | 40 (%100)          |
| <b>Meropenem</b>                        | -                   | -                      | 40 (%100)          |

S: duyarlı; I: Orta duyarlı; R: dirençli

Çizelge 3.3 Tüm İzolatların Zon Çapları

| Örnek<br>numarası<br>ve türü | CIP   | AMP   | ATM | STX  | TPZ   | AK    | STR   | TOB   | CN    | CTX | CAZ | ETP | IPM | MEM |
|------------------------------|-------|-------|-----|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1(TOP)                       | 30    | 16    | 30  | 20   | 22    | 19    | 15    | 16(I) | 17    | 28  | 25  | 28  | 27  | 31  |
| 2(TOP)                       | 31    | 18    | 31  | 23   | 23    | 18    | 14(I) | 15(I) | 15(I) | 27  | 26  | 26  | 29  | 31  |
| 3(TOP)                       | 27    | 15    | 29  | 23   | 22    | 18    | 13(I) | 15(I) | 16(I) | 27  | 25  | 28  | 27  | 28  |
| 4(TOP)                       | 23(I) | 19    | 30  | 6(R) | 22    | 18    | 13(I) | 15(I) | 16(I) | 26  | 25  | 27  | 25  | 30  |
| 5(TOP)                       | 27    | 17    | 30  | 23   | 20    | 18    | 15    | 15(I) | 17    | 25  | 25  | 26  | 25  | 28  |
| 6(TOP)                       | 30    | 15    | 28  | 20   | 23    | 18    | 14(I) | 15(I) | 16(I) | 27  | 26  | 28  | 25  | 30  |
| 7(TOP)                       | 33    | 14    | 28  | 20   | 20    | 18    | 13(I) | 15(I) | 16(I) | 24  | 25  | 27  | 25  | 25  |
| 8(TOP)                       | 29    | 18    | 30  | 23   | 26    | 18    | 14(I) | 16(I) | 16(I) | 26  | 26  | 28  | 27  | 29  |
| 9(TOP)                       | 30    | 16    | 30  | 21   | 22    | 17(I) | 11(R) | 14(I) | 14(I) | 27  | 24  | 26  | 25  | 28  |
| 10(TOP)                      | 30    | 16    | 30  | 21   | 20    | 19    | 14(I) | 15(I) | 16(I) | 26  | 25  | 28  | 28  | 29  |
| 11(TOP)                      | 28    | 15    | 30  | 24   | 22    | 19    | 13(I) | 15(I) | 16(I) | 25  | 25  | 28  | 26  | 28  |
| 12(TOP)                      | 38    | 13(R) | 30  | 23   | 22    | 19    | 14(I) | 16(I) | 16(I) | 25  | 25  | 28  | 25  | 29  |
| 13(TOP)                      | 33    | 15    | 30  | 24   | 20    | 18    | 15    | 15(I) | 16(I) | 27  | 25  | 28  | 27  | 28  |
| 14(TOP)                      | 30    | 20    | 30  | 20   | 24    | 18    | 11(R) | 15(I) | 16(I) | 28  | 27  | 30  | 26  | 30  |
| 15(TOP)                      | 36    | 16    | 30  | 25   | 27    | 20    | 14(I) | 16(I) | 16(I) | 25  | 25  | 28  | 27  | 30  |
| 16(TOP)                      | 30    | 18    | 30  | 24   | 23    | 19    | 13(I) | 16(I) | 16(I) | 25  | 25  | 25  | 29  | 31  |
| 17(TOP)                      | 31    | 11(R) | 29  | 18   | 21    | 18    | 6(R)  | 15(I) | 16(I) | 25  | 25  | 29  | 29  | 29  |
| 18(SAL)                      | 30    | 17    | 28  | 23   | 23    | 18    | 7(R)  | 16(I) | 16(I) | 26  | 25  | 29  | 29  | 31  |
| 19(SAL)                      | 9(R)  | 6(R)  | 29  | 6(R) | 21    | 19    | 14(I) | 9(R)  | 10(R) | 27  | 25  | 30  | 29  | 32  |
| 20(KAY)                      | 32    | 15    | 30  | 20   | 22    | 20    | 14(I) | 15(I) | 16(I) | 26  | 25  | 29  | 26  | 30  |
| 21(KAY)                      | 28    | 13(I) | 30  | 23   | 23    | 21    | 13(I) | 16(I) | 16(I) | 27  | 26  | 29  | 27  | 31  |
| 22(SAL)                      | 32    | 20    | 34  | 20   | 27    | 21    | 14(I) | 16(I) | 16(I) | 31  | 30  | 32  | 30  | 31  |
| 23(KAY)                      | 28    | 13(R) | 30  | 22   | 22    | 19    | 14(I) | 15(I) | 16(I) | 26  | 26  | 28  | 28  | 29  |
| 24(KAY)                      | 32    | 19    | 29  | 22   | 22    | 19    | 6(R)  | 15(I) | 16(I) | 26  | 25  | 29  | 27  | 30  |
| 25(KAY)                      | 31    | 16    | 30  | 23   | 22    | 18    | 14(I) | 15(I) | 15(I) | 27  | 26  | 27  | 26  | 28  |
| 26(KAY)                      | 21(R) | 6(R)  | 30  | 23   | 19(I) | 19    | 15    | 6(R)  | 9(R)  | 26  | 25  | 28  | 28  | 30  |
| 27(KAY)                      | 30    | 15    | 29  | 21   | 22    | 19    | 13(I) | 16(I) | 16(I) | 26  | 25  | 27  | 28  | 30  |

Çizelge 3.3. (devam) Tüm İzolatların Zon Çapları

| Örnek<br>numarası<br>ve türü | CIP   | AMP  | ATM   | STX  | TPZ   | AK | STR   | TOB   | CN    | CTX   | CAZ   | ETP | IPM | MEM |
|------------------------------|-------|------|-------|------|-------|----|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
| 28(KAY)                      | 32    | 20   | 30    | 8(R) | 22    | 20 | 15    | 15(I) | 16(I) | 25    | 25    | 28  | 28  | 30  |
| 29(KAY)                      | 29    | 16   | 32    | 21   | 23    | 20 | 14(I) | 16(I) | 16(I) | 26    | 25    | 28  | 28  | 28  |
| 30(KAY)                      | 31    | 16   | 28    | 19   | 20    | 20 | 13(I) | 15(I) | 16(I) | 25    | 25    | 28  | 28  | 29  |
| 31(KAY)                      | 32    | 14   | 30    | 24   | 22    | 18 | 13(I) | 16(I) | 16(I) | 26    | 26    | 29  | 28  | 30  |
| 32(KAY)                      | 36    | 15   | 30    | 21   | 22    | 19 | 14(I) | 15(I) | 16(I) | 26    | 25    | 29  | 29  | 31  |
| 33(KAY)                      | 24(I) | 6(R) | 25(I) | 6(R) | 18(I) | 19 | 14(I) | 15(I) | 16(I) | 13(R) | 13(R) | 26  | 24  | 30  |
| 34(KAY)                      | 28    | 15   | 28    | 21   | 21    | 29 | 14(I) | 15(I) | 16(I) | 25    | 24    | 28  | 27  | 29  |
| 35(SAL)                      | 27    | 15   | 30    | 25   | 22    | 18 | 15    | 16(I) | 16(I) | 27    | 27    | 28  | 28  | 30  |
| 36(KAY)                      | 30    | 18   | 30    | 25   | 23    | 18 | 14(I) | 15(I) | 16(I) | 25    | 25    | 26  | 26  | 28  |
| 37(KAY)                      | 23(I) | 6(R) | 29    | 6(R) | 20    | 21 | 13(I) | 16(I) | 16(I) | 27    | 26    | 30  | 30  | 30  |
| 38(KAY)                      | 30    | 15   | 32    | 23   | 22    | 20 | 14(I) | 16(I) | 16(I) | 28    | 26    | 29  | 27  | 30  |
| 39(SAL)                      | 29    | 15   | 29    | 23   | 21    | 20 | 14(I) | 16(I) | 16(I) | 25    | 25    | 28  | 27  | 30  |
| 40(SAL)                      | 30    | 19   | 30    | 6(R) | 28    | 19 | 15    | 15(I) | 16(I) | 27    | 25    | 28  | 27  | 30  |

S: Duyarlı I: Orta duyarlı R: Dirençli KAY: Kaydırak  
 SAL: Salıncak CIP: Siprofloksasin AMP: Ampisilin TOP: Toprak SXT: Trimetoprim/Sulfametoksaz  
 CTX: Sefotaksim AK: Amikasin TOB: Tobramisin CN: Gentamisin TPZ: Piperasilin/Tazobaktam  
 CAZ: Seflazidim ETP: Ertapenem MEM: Meropenem STR: Streptomisin

Toplam 140 farklı parktan alınan toprak örneklerinden izole edilen 17 tane *E. coli* izolatının duyarlılık oranları Çizelge 3.4’de verilmiştir. Buna göre duyarlılık oranları sırasıyla; siprofloksasin %94.2 (16), ampisilin %88.3 (15), aztreonam %100 (17), trimetoprim/sulfametoksazol %94.2 (16), piperasilin/tazobaktam %100 (17), amikasin %94.2 (16), streptomisin %17.6 (3), gentamisin %11.7 (2), sefotaksim %100 (17), seftazidim %100 (17), ertapenem %100 (17), imipenem %100 (17), meropenem %100 (17) olarak saptanmıştır. Orta duyarlılık oranları incelendiğinde en yüksek orta duyarlılık oranları; streptomisin %64.7 (11), tobramisin %100 (17) ve gentamisin %88.3 (15) için belirlenmiştir (Çizelge 3.4).

178 farklı parktan kaydırak, salıncak ve diğer oyun aletlerinden alınan toplam 414 sürüntü örneği sonucu elde edilen 23 tane *E. coli* izolatının duyarlılık oranları Çizelge 3.5’de verilmiştir. Buna göre duyarlılık oranları sırası ile; siprofloksasin %82.6 (19), ampisilin %73.9 (17), aztreonam %95.7 (22), trimetoprim/sulfametoksazol %78.2 (18), piperasilin/tazobaktam %91.3 (21), amikasin %100 (23), streptomisin %17.4 (4), sefotaksim %95.7 (22), seftazidim %95.7 (22), ertapenem %100 (23), imipenem %100 (23), meropenem %100 (23) olarak bulunmuştur. Orta duyarlılık oranları ise sırasıyla; siprofloksasin %8.7 (2), ampisilin %4.3 (1), aztreonam %4.3 (1), piperasilin/tazobaktam %8.7 (2), streptomisin %73.9 (17), tobramisin %91.3 (21), gentamisin %91.3 (21) olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.5).

**Çizelge 3.4** Topraktan Elde Edilen İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

| Antibiyotik                 | Dirençli (%) | Orta Duyarlı(%) | Duyarlı (%) |
|-----------------------------|--------------|-----------------|-------------|
| Siprofloksasin              | -            | 1 (%5.8)        | 16 (%94.2)  |
| Ampisilin                   | 2 (%11.7)    | -               | 15 (%88.3)  |
| Aztreonam                   | -            | -               | 17 (%100)   |
| Trimetoprim/Sulfametoksazol | 1 (%5.8)     | -               | 16 (%94.2)  |
| Piperasilin/Tazobaktam      | -            | -               | 17 (%100)   |
| Amikasin                    | -            | 1 (%5.8)        | 16 (%94.2)  |
| Streptomisin                | 3 (%17.6)    | 11 (%64.7)      | 3 (%17.6)   |
| Tobramisin                  | -            | 17 (%100)       | -           |
| Gentamisin                  | -            | 15 (%88.3)      | 2 (%11.7)   |
| Sefotaksim                  | -            | -               | 17 (%100)   |
| Seftazidim                  | -            | -               | 17 (%100)   |
| Ertapenem                   | -            | -               | 17 (%100)   |
| İmipenem                    | -            | -               | 17 (%100)   |
| Meropenem                   | -            | -               | 17 (%100)   |

S: duyarlı, I: Orta duyarlı, R: dirençli

**Çizelge 3.5** Sürüntülerden Elde Edilen İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları

| Antibiyotik                 | R (n/%)   | I (n/%)    | S (n/%)    |
|-----------------------------|-----------|------------|------------|
| Siprofloksasin              | 2 (%8.7)  | 2 (%8.7)   | 19 (%82.6) |
| Ampisilin                   | 5 (%21.8) | 1 (%4.3)   | 17 (%73.9) |
| Aztreonam                   | -         | 1 (%4.3)   | 22 (%95.7) |
| Trimetoprim/Sulfametoksazol | 5 (%21.8) | -          | 18 (%78.2) |
| Piperasilin/Tazobaktam      | -         | 2 (%8.7)   | 21 (%91.3) |
| Amikasin                    | -         | -          | 23 (%100)  |
| Streptomisin                | 2 (%8.7)  | 17 (%73.9) | 4 (%17.4)  |
| Tobramisin                  | 2 (%8.7)  | 21 (%91.3) | -          |
| Gentamisin                  | 2 (%8.7)  | 21 (%91.3) | -          |
| Sefotaksim                  | 1 (%4.3)  | -          | 22 (%95.7) |
| Seftazidim                  | 1 (%4.3)  | -          | 22 (%95.7) |
| Ertapenem                   | -         | -          | 23 (%100)  |
| İmipenem                    | -         | -          | 23 (%100)  |
| Meropenem                   | -         | -          | 23 (%100)  |

S: duyarlı, I: Orta duyarlı, R: dirençli

Çalışmada izole edilen toplam 40 izolatın %35 (14)'i en az bir antibiyotiğe dirençli olarak belirlenirken, iki veya daha fazla antibiyotiğe direnç oranı ise %12.5 (5) olarak tespit edilmiştir.

### 3.3. Genotipik Test Sonuçları

Çalışmada elde edilen *E. coli* izolatlarının aminoglikozid antibiyotiklerden streptomisin, gentamisin ve tobramisine orta duyarlı bulunması ve amikisine duyarlılık zon çaplarının ise orta duyarlılık sınırında olması nedeni ile aminoglikozid direnci genotipik olarak da araştırılmıştır. Bu amaçla *aac (6')-Ib*, *aac(3')-IIa*, *aph(3')-VI*, *ant(3')-I*, *aac(3')-IV*, *ant(2')-Ia* genlerinin taraması yapılmıştır.

**Çizelge 3.6** *E. coli* kökenlerinde AME genlerinin dağılımı

| Örnek Numarası | Aminoglikozid modifiye edici enzim (AME) genlerinin dağılımı |                    |                   |                  |                   |                   |
|----------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|
|                | <i>aac (6')-Ib</i>                                           | <i>aac(3')-IIa</i> | <i>aph(3')-VI</i> | <i>ant(3')-I</i> | <i>aac(3')-IV</i> | <i>ant(2')-Ia</i> |
| 1              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 2              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 3              | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 4              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 5              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 6              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 7              | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 8              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 9              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 10             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 11             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 12             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 13             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 14             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 15             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 16             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 17             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 18             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 19             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | P                 |
| 20             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 21             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 22             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 23             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 24             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 25             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 26             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 27             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 28             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 29             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 30             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 31             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 32             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 33             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 34             | N                                                            | P                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 35             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 36             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 37             | N                                                            | P                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 38             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |
| 39             | P                                                            | N                  | N                 | N                | N                 | N                 |
| 40             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 |

N: Negatif , P: Pozitif

**Çizelge 3.8 Aminoglikozidlerin direnç durumu ve AME genleri dağılımı**

| Örnek Numarası | Aminoglikozid modifiye edici enzim (AME) genlerinin dağılımı |                    |                   |                  |                   |                   | Aminoglikozit Antibiyotikler |            |            |           |
|----------------|--------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------|------------------|-------------------|-------------------|------------------------------|------------|------------|-----------|
|                | <i>aac (6')-Ib</i>                                           | <i>aac(3')-IIa</i> | <i>aph(3')-VI</i> | <i>ant(3')-I</i> | <i>aac(3')-IV</i> | <i>ant(2')-Ia</i> | <i>AK</i>                    | <i>STR</i> | <i>TOB</i> | <i>GN</i> |
| 1              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | S          | I          | S         |
| 2              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 3              | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 4              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 5              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | S         |
| 6              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 7              | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 8              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 9              | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | I                            | R          | I          | I         |
| 10             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 11             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 12             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 13             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 14             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | R          | I          | I         |
| 15             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 16             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 17             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 18             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | R          | I          | I         |
| 19             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | R          | I          | I         |
| 20             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | R          | R         |
| 21             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 22             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 23             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 24             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | R          | I          | I         |
| 25             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 26             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | S          | R          | R         |
| 27             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 28             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 29             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 30             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 31             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | R          | I          | I         |
| 32             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | S          | R          | R         |
| 33             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 34             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 35             | N                                                            | P                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 36             | N                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 37             | N                                                            | P                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 38             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 39             | P                                                            | N                  | N                 | N                | N                 | N                 | S                            | I          | I          | I         |
| 40             | P                                                            | N                  | N                 | P                | N                 | N                 | S                            | S          | I          | I         |

S: Duyarlı, I: Orta duyarlı, R: Dirençli, N: Negatif, P: Pozitif, AK: Amikasin, STR: Streptomisin, TOB: Tobramisin, CN: Gentamisin

#### 4. TARTIŞMA

Penisilinin keşfinden bu yana çok sayıda bakteri, antibiyotik kullanımına antimikrobiyal direnç geliştirme ve bu direnç özelliklerini aktarma yetenekleri ile cevap vermiştir. Antimikrobiyallerin artan tüketimi ve uygunsuz kullanımları direnç gelişimini hızlandıran faktörler arasında gösterilmektedir. Ayrıca, çoklu ilaca dirençli türlerin ortaya çıkmasında ve yayılmasında, uluslararası turizm, ülkeler arası göç ve iş seyahati önemli rol oynamaktadır (Allocati ve ark., 2013).

Antibiyotik direnci, hastalar için artan morbidite ve mortaliteye neden olan ve ayrıca sağlık bakım sistemlerinin finansal maliyetlerinin artmasıyla sonuçlanan çok yönlü bir sağlık sorunudur. Antibiyotiğe dirençli bakteriler, insanlarda, çeşitli hayvan konakçılarında ve çevrede bulunmakta ve bu rezervuarların her biri antibiyotik direncinin epidemiyolojisine katkıda bulunmaktadır (Chatterjee ve ark., 2018). Çevre, antimikrobiyal direncin yayılmasında önemli bir rol oynayan antimikrobiyal direnç genlerinin sınırsız bir rezervuardır. *E. coli* çevresel bakterilerden diğer direnç genlerini alabilmekte ve tersine direnç genlerini farklı habitatlardaki potansiyel patojenlere yayma özelliği göstermektedir. Birçok çalışma, hastane atık sularında antibiyotik direnç genlerinin belediye kanalizasyon sistemlerine ve çevreye yayılmasına katkıda bulunan çok dirençli suşların varlığını bildirmiştir (Allocati ve ark., 2013). Çok çeşitli antibiyotiklere direnç sağlayan bir enzim olan ve ilk defa 2008'de Yeni Delhi'de bulunan NDM-1 geni tespit edildikten sonra medikal turizmin bir sonucu olarak önce İngiltere'de daha sonra uzak Norveç takım adalarında tanımlanmıştır (White ve Hughes, 2019). İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), şempanzelerde bulunan yakından ilişkili bir simian immün yetmezlik virüsünden (SIV) gelişmiştir. HIV, edinilmiş bağışıklık yetmezliği sendromuna (AIDS) neden olmaktadır ve ortaya çıkmasından bu yana insan popülasyonlarında pandemik oranlara dönüşmüştür (Barrett ve Osofsky, 2013).

Çalışmamızda Mayıs-Eylül 2019 tarihleri arasında Ankara ilindeki 140 farklı çocuk parkından toprak örnekleri ve 176 farklı çocuk parkından kaydırak, salıncak,

dönme dolap, tahterevalli ve diğer oyuncaklar olmak üzere 414 sürüntü örneği, toplamda 554 örnek alınmıştır. Bu örneklerle Gram boyama, indol, metil kırmızısı/Voges Proskauer, sitrat ve üç şekerli demirli besiyeri (TSI) testleri uygulanmış ve 40 (%14) tane *E. coli* izolatu elde edilmiştir. Ayrıca elde edilen izolatların *E. coli* olduğu MALDI TOF MS yöntemi ile doğrulanmıştır. Farklı kaynaklardan *E. coli* izolasyonu ile ilgili literatürde çeşitli çalışmalar bulunmaktadır. Belçika'da Holvoet ve arkadaşları (2013) marul üretim ortamlarından marul fideleri, toprak, sulama suyu ve marul yaprakları dahil olmak üzere 738 numune toplayarak 473 (%64) *E. coli* izolatu elde etmişlerdir. Umeh ve arkadaşları (2007) yaptıkları çalışmada, kağıt paralar üzerinde araştırma yapılmış ve %80 oranında *E. coli* varlığı tespit edilmiştir. Yılmaz ve arkadaşları (2014) Erzurum ilinde 11 ilköğretim okulunun tuvaletlerinde yaptıkları çalışmada alınan toplam 150 sürüntü örneklerinin 54'ünden (%36) *E. coli* izole etmişlerdir. Türkseven ve Erbaş (2019) ise İzmir ilindeki 4 farklı lise tuvaletlerinden alınan 147 sürüntü örneğinden 46 tane (%31.2) *E. coli* izolatu elde etmişlerdir.

Çalışmamızda elde edilen 40 tane *E. coli* izolatının direnç oranları: siprofloksasin %5 (2), ampisilin %17.5 (7), streptomisin %12.5 (5), trimetoprim/sülfametoksazol %15 (6), tobramisin %5 (2), gentamisin %5 (2), sefotaksim %2.5 (1), seftazidim %2.5 (1) olarak bulunmuştur. Aztreonam, piperasilin/tazobaktam, amikasin, ertapenem, imipenem, meropenem antibiyotiklerinde ise direnç saptanamamıştır. Ayrıca izolatların en yüksek orta duyarlılık oranları sırasıyla: tobramisin %95 (38), gentamisin %90 (36) ve streptomisin %70 (28) olarak belirlenmiştir. Sürüntü örneklerinden elde edilen izolatlardaki direnç oranları toprak örneklerinden elde edilen izolatlara göre daha yüksek bulunmuştur.

Ryu ve arkadaşlarının (2012) Seul, Kore'deki balık pazarlarından satın aldıkları 2663 deniz ürünü örneğinden toplam 179 (%6.7) *E. coli* izolatu elde edilmiştir. Direnç oranları; tetrasiklin %30.7, ampisilin %6.7, streptomisin %12.8 ve sefalotin %11.7 olarak bulunmuştur. Vietnam'da 2 hastanenin daha sonra doğadaki su kaynaklarına karışacak olan atık suları üzerine yapılan çalışmada hastanelerden

toplam 265 *E. coli* izole edilmiştir. İzolatların direnç oranları; ko-trimoksazol %70, seftriakson %45, gentamisin %37, seftazidim % 35, siprofloksasin %26 olarak bulunmuştur (Lien ve ark., 2017). İncelenen bu çalışmalarda; farklı ülkelerden elde edilen çevresel *E.coli* izolatlarının sahip olduğu antibiyotik direnç oranlarındaki farklılığın antibiyotiklerin O ülkedeki kullanım sıklığına bağlı olduğu düşünülmektedir.

Ülkemizde ise İstanbul'da deniz otobüsü, otobüs, vapur ve trenden yolcuların elle temas ettikleri çeşitli yüzeylerden alınan örneklerden 166 *E. coli* izole edilmiştir. İzolatların direnç yüzdeleri; ampisilin %61, tetrasiklin %50, siprofloksasin %38, trimetoprim/sulfametoksazol %27, gentamisin %27, amikasin %19, aztreonam %8, seftazidim %8, tobramisin %8 olarak saptanmıştır (Tiritoğlu, 2009). İzmit Körfezi'ndeki 9 istasyondan 23 deniz suyu örneği alınarak izole edilen 8 *E. coli* suşu trimetoprim/sulfametoksazole %62.5, tetrasikline %50, gentamisine %50, amikasına %12.5, kanamisine %37.5 oranında dirençli olarak bulunmuştur (Vural ve Akçin, 2011). Yapılan literatür taramasında çocuk parklarında yapılan bir çalışmaya rastlanmamasına rağmen, bulduğumuz sonuçlar ile kısmi paralel çalışmalar olan atık sular, toplu taşıma araçları, hayvan çiftlikleri, paralar, okul tuvaletlerinde yapılan çalışmalarda da *E. coli* bulunma durumu benzerlik göstermektedir. Ayrıca her ne kadar elde edilen direnç yüzdeleri farklı olsa da bu çalışmalarda da en yüksek direnç oranları çalışmamızla benzer şekilde ampisilin, siprofloksasin ve trimetoprim/sulfametoksazol için elde edilmiştir.

Çevresel izolatlardan farklı olarak gaita ya da sürüntü örneklerinden elde edilen *E. coli*'lerdeki direnç oranları ile ilgili yaptığımız literatür araştırmasında da yine en yüksek direnç elde edilen antibiyotiklerin ampisilin, siprofloksasin ve trimetoprim/sulfametoksazol olduğu ve benzer direnç oranları elde edildiği gözlemlenmiştir. Kırıkkale Yüksek İhtisas Hastanesinde yapılan çalışmada on ay boyunca başvuran hastaların gaita örneklerinden izole edilen 150 tane *E. coli* izolatının antibiyotik direnç oranları; ampisilin %46.67 (70), trimetoprim/sülfametoksazol %25.33 (38), siprofloksasin %15.33 (23), piperasilin/tazobaktam %8 (12), gentamisin %6.67 (10) olarak saptanmıştır (Süzük

ve ark., 2015). Hindistan, Ujjain'den rastgele seçilen 30 köyden 3-14 yaş arası çocukların dışkı örneklerinden (n = 529) *E. coli* izole edilmiştir. Çalışmada antibiyotik direnç oranları; tetrasiklin %37, ampisilin %37, piperasilin/tazobaktam %2, siprofloksasin %8, gentamisin %4, amikasin %5 olarak belirlenmiştir (Shakya ve ark., 2013). Çek Cumhuriyeti'nde farklı yaşlardaki çocuklardan rektal sürüntü örnekleri alınarak yapılan çalışmada 6 haftalık 275 çocuktan toplam 177 *E. coli*, 6-17 yaş arası 253 çocuktan toplam 205 *E. coli* izole edilmiştir. 6 haftalık ve 6-17 yaş arası çocuklarda direnç oranları sırası ile ampisilin %28 ve %17, tetrasiklin %18 ve %12, streptomisin %14 ve %10, sülfametoksazol/trimetoprim %7 ve %3, siprofloksasin %1 ve %0, gentamisin %1 ve %0 olarak saptanmıştır (Literak ve ark., 2011).

2000 ve 2004 yılları arasında yapılan çalışmada idrar yolu enfeksiyonu tanısı ile gönderilen idrar örneklerinden 457 *E. coli* suşu izole edilmiş ve gentamisin direncinin %3.8'den %16.5'e, tobramsin direncinin %5.8'den %31.2'ye, amikasin direncinin %0'dan %4.4'e, ampisilin direnci %50.5'den %63.4'e yükseldiği saptanmıştır (Kaya ve ark., 2006). Akçam ve arkadaşları (2004) idrar yolu enfeksiyonu tanısı ile gönderilen idrar örneklerinden izole edilen 129 toplum kökenli, 120 hastane kökenli *E. coli* izolatının antibiyotik duyarlılıkları araştırmışlardır. Toplum kökenli suşlarda gentamisin %3.1 oranında dirençli olarak; hastane kökenli suşlarda gentamisin %14.2 oranında dirençli olarak bulunmuştur. Gündüz ve arkadaşları (2008) idrar yolu enfeksiyonu teşhisi konan 1361 çocuğa ait idrar örneklerini incelemişler ve bunların 267 (%19.6) tanesinin *E. coli* olduğu belirlemişlerdir. Direnç oranları; gentamisine %11.3, ampisiline %66.9, trimetoprim/sülfametoksazole % 47.3 olarak bulunmuş ve amikasinine karşı direnç saptanamamıştır. Yapılan başka bir çalışmada klinik olarak idrar yolu enfeksiyonu tanısı alan hastalardan alınan 1947 idrar örneğinin 301'inde üreme saptanmış ve 255'inin *E. coli* (%84.17) olduğu tespit edilmiştir. *E. coli* izolatlarının gentamisin ve amikasin direnç oranı sırası ile %19.3 ve %0.3 ve trimetoprim/sülfametoksazole %25.9 olarak bulunmuştur (Sağlam ve ark., 2012).

Bu alışmalar incelendiğinde Türkiye’de ki hastanelerden izole edilen toplum kökenli *E. coli* izolatlarındaki antibiyotik direncinin çevreden izole edilen *E. coli* direncinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Yaptığımız çalışmada streptomisin gentamisin ve tobramisin için sırasıyla %70, %90 ve %95 orta duyarlılık oranı saptanırken, amikasinde bu oran %2.5 olarak bulunmuştur. Amikasinde direnç durumu saptanamamıştır ancak zon çaplarına bakıldığında duyarlılığın sınırda olduğu gözlenmektedir.

Aminoglikozid antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda, modifiye edici enzimler aracılığıyla direnç gelişmektedir ve tedavide başarısızlıklar meydana gelmektedir. Gram negatif bakterilerde aminoglikozidlere karşı gelişen direnç coğrafik bölgeye, hastaneden hastaneye ayrıca ülkeden ülkeye farklılık göstermektedir (Kkateş ve ark., 2007).

Çalışmamızda ocuk parklarından izole edilen *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç profillerine ek olarak bu dirence neden olan genlerin de araştırılması hedeflenmiştir. İzolatlarımızın büyük çoğunluğunda streptomisin, gentamisin ve tobramisin orta duyarlılık oranı belirlendiği için çalışmamızın genetik analiz bölümünde aminoglikozid antibiyotiklere karşı oluşan direnç genleri PCR metodu ile araştırılmıştır. *aac (6’)-Ib* (%27.5), *aac(3’)-IIa* (%5), *aph(3’)-VI* (%0), *ant(3’)-I* (%97.5), *aac(3’)-IV* (%0), *ant(2’)-Ia* (%2.5) genleri üzerine çalışma yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ocuk parklarından izole edilen suşlar arasında *ant(3’)-I* geni en yüksek oranda bulunmuştur. Bu sonuçlar, izolatlarımızdaki en yaygın aminoglikozid modifiye edici enzimlerin nkleotidil transferazlar olduklarını göstermektedir. En sık olarak *aac(6’)-Ib* ve *ant(3’)-I* birlikteliği görülmüştür. Bazı izolatlarımızda AME gözlenirse de bu izolatlarda aminoglikozid direncinin gözlenmemesi direnç geninin ifadenlenmediğini göstermektedir. Ancak bu izolatlardaki direnç geninin başka bakterilere de aktarılabileceği ya da bu genlerin ifadelenebileceği unutulmamalıdır.

Abdelgader ve arkadaşları'nın (2018) tavuk çiftliklerinde yaptığı çalışmada Hartum, Sudan’dan 250 adet (130 *E. coli* izolat) ve Nanjing, Çin’den 250 adet (120

*E. coli* izolat) rektal sürüntü örneği toplanmıştır. Çin'den elde edilen izolatların direnç oranları ampisilin %75.2, eritromisin %65.2, sefotaksim %46, tetrasiklin %80, siprofloksasin %46, gentamisin %41.6 olarak bulunmuştur. Sudan'da direnç oranları ampisilin %29.2, eritromisin %33.6, sefotaksim %33.6, tetrasiklin %54.4, siprofloksasin %50, gentamisin %33.6 olarak bulunmuştur. Çin'de yüksek miktarda antibiyotik kullanımı nedeni ile direnç oranının Sudan'a göre yüksek olduğu düşünülmektedir. Ayrıca gentamisine %34 ve %37 orta direnç oranları bulunmasına rağmen her iki ülkede de *aac3-III* geni tespit edilmemiştir.

Belaynehe ve arkadaşlarının (2017) yaptığı çalışmada dört farklı sığırcı çiftliğinden alınan 405 fekal örnekten 247 *E. coli* izolatı elde edilmiştir. Direnç oranları; %56.3 streptomisin, %12.15 tetrasiklin, %7 ampisilin, %5.7 kloramfenikol, ve % 0.8 trimetoprim/sülfametoksazol tespit edilmiştir. AME genleri *aph(3')-Ib* % 46, *aac(3')-IVa* % 34.5, *aac(3')-IIa* % 22.3, *aac(6')-Ib* % 15.1, *ant(3')-Ia* % 7.2 geni taşıdığı tespit edilmiştir.

Çin'in Hebei şehrinde, 46 büyük ölçekli çiftlikten toplam 111 *E. coli* izolatı toplanmıştır. Streptomisine %97.3, gentamisine %95.5, amikasin %46.0 ve spektinomisine %22.5 oranında direnç saptanmıştır. Genomik analizde %41.4 *ant(3'')-Ia*, %31.5 *aac(3)-IIa*, %26.1 *aac(6')-Ib*, 13.5% *aph(3')-IIa* sonucu elde edilmiştir (Zhang ve ark., 2014).

Leblebicioğlu ve arkadaşları (1998) yaptıkları çalışmada aminoglikozid (amikasin, netilmisin, gentamisin, tobramisin) antibiyotiklerden herhangi birine karşı dirençli olduğu saptanan Gram negatif 50 suşu direnç mekanizmaları açısından incelemişler ve en sık rastlanan enzimler olarak *ant(2'')-I* (%54) ve *aac(6')-I* (%72)'i saptamışlardır. Över ve arkadaşlarının (2001) yaptığı çalışmada 696 aminoglikozid dirençli Gram negatif basilin en yaygın aminoglikozid direnç mekanizmaları *aac(3)-II*, *aac(6')-I* ve *ant(2'')-I* olarak saptanmıştır. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde en yaygın AME' ler *ant(3'')-IV*, *ant(2'')-I* ve *aac(6')-I* olarak belirlenmiştir.

Gentamisinin fazla kullanıldığı ülkelerde *ant(2'')* ve *aac(3)* enzimleri sık gözlemlenmiştir. Amikasinin yaygın olarak kullanıldığı ülkelerde ise *aac(6')* enzimi sıklıkla bulunmaktadır (Gür, 1997).

Direnç yüzdeleri karşılaştırıldığında ise çevreden elde edilen *E. coli* izolatlarında aminoglikozid antibiyotiklere karşı direnç durumu tetrasiklin, ampisilin, trimetroprim/sulfametaksazol'e kıyasla düşük olmasına karşın gittikçe artan bir oranda seyrettiği saptanmaktadır.



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan bu çalışmada Tek Sağlık Kavramı göz önüne alınmış ve çevre-insan-hayvan ilişkisinin gün geçtikçe arttığı düşünülmüş; çocuk parklarından alınan örnekler üzerinde araştırma yapılmasının antibiyotik direncinin ve direnç genlerinin yayılımını izlemek ve insan sağlığı riskini analiz etmek açısından önemli olacağı düşünülmüştür. Ayrıca yapılan literatür taramasında çocuk parkları üzerinde direçli bakterilere yönelik çalışma yapılmadığı belirlenmiştir. Klinik olmayan ortamlarda antibiyotik direncinin ekolojik rolünün daha iyi anlaşılması, direncin ortaya çıkışını ve gelecekteki durumunu önceden belirleyerek önlemeye yardımcı olabilir.

Çalışmada çocuk parklarından toprak ve sürüntü örnekleri alınmış ve bu örnekler 24 saat inkübe edildikten sonra EMB agara ekimi yapılmıştır. İnkübasyon sonucu EMB agarda yeşil metalik röfle veren koloniler IMVIC ve TSI agar testine tabii tutulmuştur. IMVIC sonucu ++-- olan ve TSI agarda laktoz pozitif olarak belirlenen suşların *E. coli* olduğu belirlenmiştir. Ayrıca MALDI TOF MS ile izolatların *E. coli* olduğu doğrulanmıştır.

*E. coli* olduğu kanıtlanan örneklerle EUCAST kriterli doğrultusunda; siprofloksasin, ampisilin, aztreonam, trimetoprim/sulfametoksazol, piperasilin/tazobaktam, amikasin, streptomisin, tobramisin, gentamisin, sefotaksim, seftazidim, ertapenem, imipenem, meropenem antibiyotikleri kullanılarak disk difüzyon testi uygulanmıştır. En yüksek direnç oranları ampisilin (%17.5), trimetoprim-sulfametoksazol (%15) ve streptomisine (%12.5) e karşı belirlenmiştir. Ayrıca sürüntü örneklerinden elde edilen izolatlardaki direnç oranları toprak örneklerinden elde edilen izolatlara göre daha yüksek bulunmuştur. Tobramisin, gentamisin ve streptomisin antibiyotiklere karşı sırasıyla %95, %90, %70 orta duyarlılık tespit edilmiştir. Bu yüksek orta duyarlılık değerleri nedeniyle elde edilen *E. coli* izolatlarına *aac(6')-Ib*, *aac(3')-IIa*, *aph(3')-VI*, *ant(3')-I*, *aac(3')-IV*, *ant(2')-Ia* gen taraması yapılmıştır. Elde edilen sonuçlarda direnç yüzdeleri yüksek olmasa da bazı izolatlarda farklı aminoglikozid modifiye edici enzimler belirlenmiş ancak

fenotipik olarak direnç gözlenmemiştir. Her ne kadar fenotipik olarak bu bakterilerde direnç gözlenmese de bu genlerin var olduğu, ileride ifadelenebileceği ve en önemlisi doğada diğer bakterilere aktarılabileceği unutulmamalıdır.

Bir yandan, devam eden ve yeniden ortaya çıkan bulaşıcı hastalıklarla mücadele ederken diğer yandan antibiyotik direnci gibi sorunlara aranan çözümler, bilim ve teknolojinin olası tüm olanaklarını kapsayan sektörler arası işbirliği ve çalışmayı gerektirmektedir. Tek Sağlık, antibiyotik direnci konusunun mutlak bir parçası olmalıdır. Ayrıca antibiyotik kullanımı ve antibiyotik direncine karşı stratejilerin belirlenmesi ve bu stratejilerin doğru ve etkin bir şekilde uygulanması önemlidir.

## ÖZET

### Ankara’da ki Çocuk Parklarından İzole Edilen *Escherichia coli* İzolatlarında Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

Yapılan çalışmada Ankara’nın çeşitli çocuk parklarından alınan örneklerden izole edilen *E. coli* izolatlarının antibiyotik direncinin belirlenmesi ve direnç durumunun moleküler yöntemlerle doğrulanması amaçlanmıştır.

İzole edilen 40 *E. coli* izolatının antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST önerileri doğrultusunda yapılmıştır. Suşların antibiyotik duyarlılığını belirlemek için; Siprofloksasin, Ampisilin, Aztreonam, Trimetoprim/Sulfametoksazol, Piperasilin/Tazobaktam, Amikasin, Streptomisin, Tobramisin, Gentamisin, Sefotaksim, Seftazidim, Ertapenem, İmipenem, Meropenem antibiyotikleri kullanılmıştır.

Çalışmamızda *E. coli* izolatlarının direnç oranları; siprofloksasin %5, ampisilin %17, trimetoprim/sulfametoksazol %15, streptomisin %12.5, tobramisin %5, gentamisin %5, sefotaksim %2.5, seftazidim %2.5 olarak saptanmıştır. Orta duyarlılık oranları ise; %95 tobramisin, %90 gentamisin ve %70 streptomisin olarak bulunmuştur.

Orta duyarlılık oranlarının aminoglikozid antibiyotiklerde yüksek oranda olması nedeni ile aminoglikozid direnci genotipik olarak araştırılmıştır. Bu amaçla *aac (6’)-Ib*, *aac(3’)-IIa*, *aph(3’)-VI*, *ant(3’)-I*, *aac(3’)-IV*, *ant(2’)-Ia* genlerinin taraması yapılmıştır. İzolatlarımızın %27.5’inde *aac(6’)-Ib*, %’5inde *aac(3’)-IIa*, %97.5’inde *ant(3’)-I*, %2.5’inde *ant(2’)-Ia* geni tespit edilmiştir. Ayrıca *aph(3’)-VI* ve *aac(3’)-IV* genleri hiçbir izolatımızda tespit edilememiştir.

Bu çalışma ile Türkiye’de ilk kez çocuk parklarından *E. coli* varlığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda, çocuk parklarından izole edilen dirençli *E. coli* suşlarının halk sağlığı açısından potansiyel bir risk oluşturabileceği ortaya konmuştur.

**Anahtar Sözcükler:** Aminoglikozid Modifiye Edici Enzimler, Antibiyotik Direnci, *Escherichia coli*, Tek Sağlık.

## SUMMARY

### Determination of Antibiotic Resistance in *Escherichia coli* Isolates Isolated from Children Parks in Ankara

In this study, it was aimed to determine the antibiotic resistance of *E. coli* isolates isolated from samples taken from various children's parks of Ankara and to confirm the resistance status by molecular methods.

Antibiotic susceptibility tests of 40 isolated *E. coli* isolates were performed in accordance with EUCAST recommendations. To determine the antibiotic susceptibility of strains; Antibiotics of ciprofloxacin, Ampicillin, Aztreonam, Trimethoprim/Sulfamethoxazole, Piperacillin/Tazobactam, Amikacin, Streptomycin, Tobramycin, Gentamicin, Cefotaxime, Ceftazidime, Ertapenem, Imipenem, Meropenem.

In our study, the resistance rates of *E. coli* isolates; ciprofloxacin 5%, ampicillin 17%, trimethoprim / sulfamethoxazole 15%, streptomycin 12.5%, tobramycin 5%, gentamicin 5%, cefotaxime 2.5%, ceftazidime 2.5%. Medium sensitivity rates are; It was found as 95% tobramycin, 90% gentamicin and 70% streptomycin.

Aminoglycoside resistance has been genotypically investigated because of its high sensitivity in aminoglycoside antibiotics. For this purpose, *aac(6')-Ib*, *aac(3')-IIa*, *aph(3')-VI*, *ant(3')-I*, *aac(3')-IV*, *ant(2')-Ia* genes scanned. Gene was detected in 27.5% of our isolates *aac(6')-Ib*, 5% *aac(3')-IIa*, 97.5% *ant(3')-I*, 2.5% *ant(2')-Ia* gene. Also, *aph(3')-VI* and *aac(3')-IV* genes could not be detected in any of our isolates.

In this study, the presence of *E. coli* was detected for the first time in Turkey playground. As a result of the study, it has been revealed that resistant *E. coli* strains isolated from children's parks can pose a potential risk for public health.

**Keywords:** Aminoglycoside Modifying Enzymes, Antibiotic Resistance, *Escherichia coli*, One Health.

## KAYNAKLAR

- ABDELGADER S A, SHI D, CHEN M, ZHANG L, HEJAIR H M, MUHAMMAD U, ZHANG W (2018). Antibiotics Resistance Genes Screening and Comparative Genomics Analysis of Commensal *Escherichia coli* Isolated from Poultry Farms between China and Sudan. *BioMed Research International*, (2):1–9. <https://doi.org/10.1155/2018/5327450>
- AGGEN J B, ARMSTRONG E S, GOLDBLUM A A, DOZZO P, LINSELL M S, GLIEDT M J, MOSER, H. E. (2010). Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **54**(11):4636–4642. <https://doi.org/10.1128/AAC.00572-10>
- AKÇAM, F Z, KAYA O, GÖNEN İ, YAYLI G (2004). İdrar Örneklerinden İzole Edilen Toplum ve Hastane Kaynaklı *Escherichia coli* Suşlarında Antibiyotik Direnci. *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Dergisi*, **21**(1):23–27.
- ALLOCATI N, MASULLI M, ALEXEYEV M F, DI ILIO C (2013). *Escherichia coli* in Europe: An overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **10**(12): 6235–6254. <https://doi.org/10.3390/ijerph10126235>
- BARRETT M, OSOFSKY S (2013). One Health: Interdependence of People, Other Species, and the Planet. In *Jekel's Epidemiology, biostatistics, preventive medicine, and public health 4nd Ed*. Elsevier/Saunders, 364–377
- BELAYNEHE K M, SHIN S W, HONG-TAE P, YOO H S (2017). Occurrence of aminoglycoside-modifying enzymes among isolates of *Escherichia coli* exhibiting high levels of aminoglycoside resistance isolated from Korean cattle farms. *FEMS Microbiology Letters*, **364**(14): 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnx129>
- BILGEHAN H, (2002). Klinik mikrobiyolojik tanı. Fakülteler Kitapevi, Barış yayınları.
- BLOUNT Z D (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *ELife Sciences*, **4**:1–12. <https://doi.org/10.7554/eLife.05826>
- BRYAN-WILSON J (2016). No time to wait. In *Artforum International* (Vol. 54).
- CABRERA-PARDO J R, LOOD R, UDEKWU K, GONZALEZ-ROCHA G, MUNİTA J M, JÄRHULT J D, OPAZO-CAPURRO A (2019). A One Health – One World initiative to control antibiotic resistance: A Chile - Sweden collaboration. *One Health*. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2019.100100>
- CHATTERJEE A, MODARAI M, NAYLOR N R, BOYD S E, ATUN R, BARLOW J, ROBOTHAM J V (2018). Quantifying drivers of antibiotic resistance in humans: a systematic review. *The Lancet Infectious Diseases*, **18**(12):368–378. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30296-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30296-2)

- CHEN Y W, TENG C H, HO Y H, HO T Y, HUANG W C, HASHIMOTO M, CHEN C S (2014). Identification of bacterial factors involved in type 1 fimbria expression using an *Escherichia coli* K12 proteome chip. *Molecular and Cellular Proteomics*, **13**(6):1485–1494. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.035667>
- COHEN J, POWDERLY W G, OPAL S M (2017). Mechanisms of antibacterial resistance. Chapter 138 in Infectious disease book p:1181-1197. Elsevier. 4th edition
- COLLIGNON P J, MCEWEN S A (2019). One health-its importance in helping to better control antimicrobial resistance. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, **4**(1):1–21. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010022>
- CONRAD P A, MAZET J A, CLIFFORD D, SCOTT C, WILKES M (2009). Evolution of a transdisciplinary “One Medicine-One Health” approach to global health education at the University of California, Davis. *Preventive Veterinary Medicine*, **92**(4):268–274. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2009.09.002>
- DASHTI A A, JADAON M M, ABDULSAMAD A M, DASHTI H M (2009). Heat Treatment of Bacteria: A Simple Method of DNA Extraction for Molecular Techniques. *Kuwait Medical Journal*, **41**(2):117-122.
- DING T, SUO Y, XIANG Q, ZHAO X, CHEN S, YE X, LIU D (2017). Significance of viable but nonculturable *Escherichia coli*: Induction, detection, and control. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **27**(3):417–428. <https://doi.org/10.4014/jmb.1609.09063>
- DOI Y, ARAKAWA Y (2007). 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Clinical Infectious Diseases*, **45**(1):88–94. <https://doi.org/10.1086/518605>
- DOI Y, WACHINO J ICHI, ARAKAWA Y (2016). Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infectious Disease Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2016.02.011>
- DONNENBERG M S (2014). Enterobacteriaceae. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* 2:2503–2517. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00220-4>
- DONNENBERG M S, WHITTAM T S (2001). Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Investigation*, **107**(5):539–548. <https://doi.org/10.1172/JCI12404>
- DUBOIS V, ARPIN C, DUPART V, SCAVELLI A, COULANGE L, ANDRÉ C, FISCHER I, GROBOST F, BROCHET JP, LAGRANGE I, DUTILH B, JULLIN J, NOURY P, LARRIBET G, QUENTIN C (2008). Beta-lactam and aminoglycoside resistance rates and mechanisms among *Pseudomonas aeruginosa* in French general practice (community and private healthcare centres). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62**(2):316-323

- ERTAŞ N, YILDIRIM Y, KARADAL F, AL S (2013). Hayvansal Gıdalarda *Escherichia coli* O157:H7'nin Önemi. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine*, **1**(1):45–52.
- ESTRADA-GARCIA T, HODGES K, HECHT G A, TARR P I (2013). *Escherichia coli*. In *Foodborne Infections and Intoxications* (4nd Ed). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416041-5.00008-1>
- EVANS B R, LEIGHTON F A (2014). A history of One Health. *OIE Revue Scientifique et Technique*, **33**(2):413–420. <https://doi.org/10.20506/rst.33.2.2298>
- FAUCI A S (2001). Infectious Diseases: Considerations for the 21st Century. *Clinical Infectious Diseases*, **32**(5):675–685. <https://doi.org/10.1086/319235>
- FLEECE M E, PHOLWAT S, MATHERS A J, HOUPTE R (2018). Molecular diagnosis of antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, **18**(3):207–217.
- GARNEAU-TSODIKOVA S, LABBY K J (2016). Mechanisms of resistance to aminoglycoside antibiotics: Overview and perspectives. *MedChemComm*, **7**(1):11–27 <https://doi.org/10.1039/c5md00344j>
- GÜNDÜZ T, TOSUN S, DEMİREL M, ERTAN P (2008). Çocuklarda İdrar Yolu Enfeksiyonlarında Antibiyotik Direnci : Beş Yıllık Sonuçlar. *Pamukkale Tıp Dergisi*, **1**(2): 87–90.
- GUNNEMANN S, FALOUTSOS C (2013). Mixed membership subspace clustering. *Proceedings - IEEE International Conference on Data Mining, ICDM*, **1**(1):221–230. <https://doi.org/10.1109/ICDM.2013.109>
- GÜR D (1997). Hastane İnfeksiyonlarında Önem Kazanan Gram Negatif Bakterilerde Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi*, **1**(1), 38–45.
- HÄSLER B, CORNELSEN L, BENNANI H, RUSHTON J (2014). A review of the metrics for One Health benefits. *OIE Revue Scientifique et Technique*, **33**(2):453–464. <https://doi.org/10.20506/rst.33.2.2294>
- HERNANDO-AMADO S, COQUE T M, BAQUERO F, MARTÍNEZ J L (2019). Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives. *Nature Microbiology*, **4**(9):1432–1442. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>
- HİÇCAN Ö (2017). Hayvan ve İnsan Sağlığı Konusunda Bütüncül Bir Yaklaşım Tek Sağlık.
- HOLVOET K, SAMPERS I, CALLENS B, DEWULF J, UYTENDAELE M (2013). Moderate prevalence of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from lettuce, irrigation water, and soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **79**(21):6677–6683. <https://doi.org/10.1128/AEM.01995-13>

- HU X, XU B, YANG Y, LIU D, YANG M, WANG J, MA X (2013). A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycoside-resistance genes in Enterobacteriaceae. *BMC Microbiology*, **13**(1):1–9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-58>
- JANA S, DEB J K (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **70**(2):140–150. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0279-0>
- KAPER J B (1998). *Enterohemorrhagic Escherichia coli*. **1**(1), 103–108.
- KAYA O, AKÇAM F Z, UYAR C, DEMİR C, YAYLI G (2006). 2000-2004 yılları arasında izole edilen üropatojen *Escherichia coli* suşlarında artan antibiyotik direnci. *SDÜ Tıp Fakültesi Dergisi*, **13**(4), 22–26.
- KHAN M S, ROTHMAN-OSTROW P, SPENCER J, HASAN N, SABİROVIĆ M, RAHMAN-SHEPHERD A, DAR O (2018). The growth and strategic functioning of One Health networks: a systematic analysis. *The Lancet Planetary Health*, **2**(6):264–273. [https://doi.org/10.1016/S2542-5196\(18\)30084-6](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(18)30084-6)
- KRAUSE K M, SERIO A W, KANE T R, CONNOLLY L E (2016). Aminoglycosides : An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1–19.
- KÜÇÜKATEŞ E, KANSIZ E, GÜLTEKİN N (2007). Gram negatif Bakterilerde İsepamisin, Amikasin ve Gentamisine Karşı Direnç. *Turkish Journal of Infection*, **21**(1):21–25.
- LAXMINARAYAN R, DUSE A, WATTAL C, ZAIDI A K M, WERTHEIM H F L, SUMPRADIT N, CARS O (2013). Antibiotic resistance-the need for global solutions. *The Lancet Infectious Diseases*, **13**(12):1057–1098. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70318-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70318-9)
- LEBLEBİCİOĞLU H, ŞENCAN İ, EROĞLU C, SÜNBÜL M, ESEN Ş, GÜNAYDIN M (1998). Gram-Negatif Bakterilerde Aminoglikozid Direnç Mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, **11**(2):50-52.
- LEGGETT J E (2014). Aminoglycosides. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, 8th ed. Leggett, J. E. (2014). *Aminoglycosides*. In *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*.
- LIEN L T Q, LAN P T, CHUC N T K, HOA N Q, NHUNG P H, THOA N T M, LUNDBORG C S (2017). Antibiotic resistance and antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolates from hospital wastewater in Vietnam. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **14**(7), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijerph14070699>
- LIM J Y, YOON J W, HOVDE C J (2010). A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**(1):5–14. <https://doi.org/10.4014/jmb.0908.08007>

- LITERAK I, PETRO R, DOLEJSKA M, GRUBEROVA E, DOBIASOVA H, PETR J, CIZEK A (2011). Antimicrobial Resistance in Fecal *Escherichia coli* Isolates from Healthy Urban Children of Two Age Groups in Relation to Their Antibiotic Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(6):3005-3007
- MANGES A R, GEUM H M, GUO A, EDENS T J, FIBKE, C D, PITOUT J D D (2019). Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clinical Microbiology Reviews*, 32(3): 1–25.
- MCDEVITT, S. (2009). Methyl Red and Voges-Proskauer Test Protocols. *American Society for Microbiology*, 1–9.
- MCEWEN S A, COLLIGNON P J (2017). Antimicrobial Resistance: A One Health Colloquium. *Microbiology Spectrum*, 6(2):1–26. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017.Correspondence>
- MISTIK, R. (2000). Aminoglikozid Antibiyotikler ve Günde Tek Doz Kullanımları. *Klinik Dergisi*, 13(2), 43–45.
- MUNITA J M, ARIAS C A (2016). HHS Public Access Mechanisms of Antibiotic Resistance. *HHS Public Access*, 4(2):1–37. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.Mechanisms>
- NATARO J P, KAPER J B (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1):142–201. <https://doi.org/10.1128/cmr.11.2.403>
- NOPPE-LECLERCQ I, WALLET F, HAENTJENS S, COURCOL R, SIMONET M (1999). PCR detection of aminoglycoside resistance genes: A rapid molecular typing method for *Acinetobacter baumannii*. *Research in Microbiology*, 150(5):317–322. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(99\)80057-6](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(99)80057-6)
- OMEROVIĆ M, MUŠTAK H K, KAYA İ B (2017). *Escherichia coli* Patotiplerinin Virülens Faktörleri. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, 28(1): 1–6.
- ÖCAL D (2012). Gram Negatif Bakterilerde Antibakteriyal Direncin Fenotipik Yöntemler ile Tayin ve Bildirimi. *ANKEM Dergisi*, 26(3):154-164.
- ÖVER U, GÜR D, ÜNAL S, MILLER G H (2001). The changing nature of aminoglycoside resistance mechanisms and prevalence of newly recognized resistance mechanisms in Turkey. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7:470-478
- PERCIVAL S L, WILLIAMS D W (2013). *Escherichia coli*. In *Microbiology of Waterborne Diseases: Microbiological Aspects and Risks: Second Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415846-7.00006-8>
- PLOY M C, GIAMARELLOU H, BOURLIOUX P, COURVALIN P, LAMBERT T (1994). Detection of *aac(6')-I* genes in amikacin-resistant *Acinetobacter spp.* by PCR. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 38(12):2925–2928.

<https://doi.org/10.1128/AAC.38.12.2925>

- RYU S H, PARK S G, CHOI S M, HWANG Y O, HAM H J, KIM S U, CHAE Y Z (2012). Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *International Journal of Food Microbiology*, **152**(1–2):14–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.10.003>
- SAĞLAM H, ÖĞÜTLÜ A, DEMİRAY V, KARABAY O (2012). Üriner Enfeksiyonlarda Toplum Kökenli *Escherichia coli*'nin Yeri Ve Gelişen Antibiyotik Direnci. *NOBEL MEDICUS*, **8**(1), 67–71.
- SANDVANG D, AARESTRUP F M, JENSEN L B (1998). Characterisation of integrons and antibiotic resistance genes in Danish multiresistant *Salmonella enterica* Typhimurium DT104. *FEMS Microbiology Letters*, **160**(1):37–41. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(97\)00473-4](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(97)00473-4)
- SAROWSKA J, FUTOMA-KOLOCH B, JAMA-KMIECIK A, FREJ-MADRZAK M, KSIAZCZYK M, BUGLA-PLOSKONSKA G, CHOROSZY-KROL (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. *Gut Pathogens*, **11**(1):1–16. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>
- SHAKYA T, WRIGHT G D (2007). Mechanisms Of Aminoglycoside Antibiotic Resistance. In *Aminoglycoside Antibiotics: From Chemical Biology to Drug Discovery*, 119–140.
- SHAKYA P, BARRETT P, DIWAN V, MAROTHI Y, SHAH H, CHHARI N, TAMHANKAR A J, PATHAK A AND LUNDBORG C S (2013). Antibiotic resistance among *Escherichia coli* isolates from stool samples of children aged 3 to 14 years from Ujjain, India. *BMC Infectious Diseases* **13**(477):1-6
- SMITH J L, FRATAMICO P M (2017). *Escherichia coli* as a Pathogen. In *Foodborne Diseases: Third Edition*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385007-2.00007-3>
- STENUTZ R, WEINTRAUB A, WIDMALM G (2006). The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews*, **30**(3):382–403. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00016.x>
- SÜZÜK S, AVCIKÜÇÜK H, KAŞKATEPE B, AKSARAY S (2015). Antibiotic susceptibility of microbiota members *Escherichia coli* strains isolated from stool samples of patients attended Kırıkkale Yüksek İhtisas Hospital in ten months. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **72**(4): 289-96
- TAMHANKAR A J, LUNDBORG C S (2019). Antimicrobials and antimicrobial resistance in the environment and its remediation: A global one health perspective. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **16**(23):1–7. <https://doi.org/10.3390/ijerph16234614>
- TİRİTOĞLU Y (2009). Toplu Taşıma Araçlarında Epidemiyolojik Araştırma (İSTANBUL

- TOWNE T G (2014). Aminoglycosides. *Encyclopedia of Toxicology: Third Edition*, 1:191–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00234-7>
- TÜRKSEVEN B, ERBAŞ G (2019). Okul tuvaletlerindeki enterik bakteriyel kontaminasyonun araştırılması. *Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, 12(1):32–40. <https://doi.org/10.26559/mersinsbd.437562>
- UÇAR G, YÖRÜK N G, GÜNER A (2015). *Escherichia coli* Enfeksiyonları. *Türkiye Klinikleri*, 1(3):22–29.
- UMEH E U, JULUKU J U, ICHOR T (2007). Microbial Contamination of ‘Naira’ (Nigerian Currency) Notes in Circulation. *Research Journal of Enviromental Sciences*, 1(6): 336–339
- VURAL H C, AKÇİN A (2011). İzmit Körfezinden İzole Edilen *Escherichia coli*’lerde R Plazmidlerine Bağlı “Bulaşıcı Tipte Antibiyotik Direnç Özelliğinin” Belirlenmesi. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakultesi Dergisi*, 17:23–30. <https://doi.org/10.9775/kvfd.2010.3040>
- WELCH R A (2006). The Genus *Escherichia*. *The Prokaryotes*, 60–71. [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x\\_3](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-x_3)
- WHITE A, HUGHES J M (2019). Critical Importance of a One Health Approach to Antimicrobial Resistance. *EcoHealth*, 16(3):404–409. <https://doi.org/10.1007/s10393-019-01415-5>
- WINN W C, ALLEN S D, JANDA W M, KONEMAN E W, PROCOP G W, SCHRECKENBERGER P C, WOODS G L (2006). The Enterobacteriaceae. *Koneman’s Color Atlas And Textbook Of Diagnostic Microbiology*. 6nd Ed. 224-249
- YILMAZ A, USLU H, AYYILDIZ A (2014). Erzurum merkezindeki bazı okullardaki lavabo-tuvalet muslukları ve sularının mikrobiyolojik yönden incelenmesi. *Türk Hijyen ve Deneyisel Biyoloji Dergisi*, 71(2):75–80. <https://doi.org/10.5505/TurkHijyen.2014.76993>
- ZHANG F Y, HUO S Y, Lİ Y R, XİE R, WU X J, CHEN L G, GAO Y H (2014). A survey of the frequency of aminoglycoside antibiotic-resistant genotypes and phenotypes in *Escherichia coli* in broilers with septicaemia in Hebei, China. *British Poultry Science*, 55(3):305-310. <https://doi.org/10.1080/00071668.2014.891096>

## ÖZGEÇMİŞ

### I- Bireysel Bilgiler

Adı : Dilara  
Soyadı : ÇALIŞKAN  
Doğum yeri ve tarihi: Balıkesir, 28.09.1993  
Uyruğu : T.C.  
Medeni Durumu : Bekar  
E-posta : [dilara-cal@hotmail.com](mailto:dilara-cal@hotmail.com)

### II- Eğitimi

2017-2020 : Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Eczacılık  
Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Yüksek Lisans  
2011-2017 : Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi  
2007-2011 : Reha Alemdaroğlu Anadolu Lisesi  
Yabancı Dil : İngilizce

### III- Ünvanları

2017 : Eczacı

### IV- Mesleki Deneyimi

2019 : Araştırma Görevlisi, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi  
Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim  
Dalı