

← DEFNE GÜMÜŞ

Tez kabul edildikten sonra yapılan **sabit ciltte sırt yazısı** bu şablona göre yazılacak. Yazılar tek satır olacak  
Cilt sırtı yazıların yönü yukarıdan aşağıya  
(sol yandaki gibi) olacak .



← DOKTORA TEZİ

← Tez Sınavının yapılacağı yılı yazınız

**T.C.  
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**( DOKTORA TEZİ )**

**KULLANMA VE İÇME SULARINDA EHEC, EPEC VE ETEC  
SUŞLARININ VARLIĞININ VE ANTİBİYOTİKLERE  
DUYARLILIKLARININ ARAŞTIRILMASI**

**DEFNE GÜMÜŞ**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. MİNE ANÇ KÜÇÜKER**

**MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ  
ANABİLİM DALI  
MİKROBİYOLOJİ PROGRAMI**


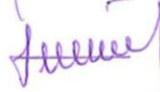

**İSTANBUL-2011**

**TEZ ONAYI**

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programında Defne Gümüş tarafından hazırlanan "Kullanma ve İçme Sularında EHEC, EPEC ve ETEC Suşlarının Varlığının ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Araştırılması" başlıklı Doktora tezi, yapılan tez sınavında Jürimiz tarafından başarılı bulunarak kabul edilmiştir.

18 / 01 / 2011

Tez Sınav Jürisi

<u>Ünvanı Adı Soyadı (Üniversitesi, Fakültesi, Anabilim Dalı)</u>	<u>İmzası</u>
1.Prof Dr Bülent Gürler	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. 
2.Prof Dr Mine Anğ Küçükler (Danışmanı)	İstanbul Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD. 
3.Prof Dr Dilek İnanç Yaylalı	İ.Ü.Diş Hekimliği Fakültesi 
4.Prof Dr Günay Güngör	İstanbul Tıp Fak. Halk Sağlığı AD. 
5.Doç Dr Ümran Soyoğul Gürer	Marmara Üniv. Ecz.Fak. Farmasötik Mikr.AD. 

**BEYAN**

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Defne GÜMÜŞ (İmza)



## İTHAF

Aileme ithaf ediyorum

## TEŞEKKÜR

Gerek tez konumun seçimi ve yürütülmesinde, gerekse doktora eğitimim süresince desteğini ve teşviklerini esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocam Prof. Dr. Mine Anđ Küçüker'e,

İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Bülent Gürler'e,

Yakın ilgi ve desteğini gördüğüm değerli hocalarım Prof. Dr. Emel Bozkaya, Prof. Dr. Şengül Derbentli, Prof. Dr. O. Şadi Yenen, Prof. Dr. Meltem Uzun'a,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Selim Badur, Prof. Dr. Nezahat Gürler, Prof. Dr. Yıldız Yeğenoğlu, Prof. Dr. Ali Ađaçfidan, Prof. Dr. Çiğdem Kayacan, Prof. Dr. Betigül Öngen, Prof. Dr. Salih Türkođlu, Prof. Dr. M. Derya Aydın, Prof. Dr. Ali Öner, Prof. Dr. Zayre Erturan, Doç. Dr. Özden Büyükbaba Boral'a,

Doktora eğitimim boyunca laboratuvar bilgi ve deneyimlerini her zaman paylaşan Doç. Dr. Zerrin Aktaş, Uzm. Dr. Yaşar Nakipoğlu, Dr. Dilek Şatana, Dr. Lütfiye Öksüz, Dr. Handan Katrancı ve ilgi ve yardımlarını esirgemeyen, birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım değerli arkadaşlarım Araş. Gör. Gonca Erköse Genç, MSc. Özlem Güven, MSc. Seyda İğnak, MSc. Mehmet İlkaç, MSc. Deniz Sertel Şelale, Biyo. Başak Er'e,

Tez çalışmamda kullandığım standart bakteri suşunu sağlayan Kore Üniversitesinden Dr. Saehun Kim'e,

Su örneklerinin toplanmasında yardımlarını esirgemeyen Cansever Kutlu, Ayşe Yıldız ve babam Mustafa Gümüş'e,

Eğitimim süresince ilgi ve desteğini bir an olsun eksik etmeyen sevgili anne ve babama,

Ve birlikte çalıştığım tüm arkadaşlarıma TEŞEKKÜRLERİMİ sunarım.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3329

## İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI .....	İİ
BEYAN.....	İİİ
İTHAF.....	İV
TEŞEKKÜR.....	V
İÇİNDEKİLER .....	VI
TABLolar LİSTESİ.....	Vİİİ
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	İX
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ .....	X
ÖZET .....	XİV
ABSTRACT.....	XV
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	4
2.1. Besinlerle ve Sularla Bulaşan İnfeksiyon Hastalıkları ve Etkenleri .....	4
2.2. Besinlerle ve Sularla Bulaşan Etkenlerde Antibiyotiklere Direnç .....	9
2.2.1. Tetrasiklin Direnci.....	10
2.2.2. Aminoglikozid Direnci .....	10
2.2.3. Makrolit-Linkozamid-Streptogramin (MLS), Kloramfenikol Direnci.....	10
2.2.4. Beta-Laktam Direnci .....	11
2.3. Besin ve sularla bulaşan infeksiyonların ortaya çıkışında rol oynayan faktörler ...	11
2.3.1. İnsan Yaşama Biçimleri ve Alışkanlıklarındaki Değişiklikler.....	11
2.3.2. Mikropların Uyumu (Adaptasyon) .....	12
2.3.3. Halk Sağlığı Önlemlerinin Yıkılması .....	12
2.3.4. Zirai Uygulamalarda ve Hayvancılıkta Değişiklikler .....	13
2.4. <i>Escherichia coli</i> .....	13
2.4.1. İnsanlarda Görülen <i>Escherichia coli</i> İnfeksiyonları.....	15
2.4.2. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC) Suşları .....	16
2.4.3. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC) Suşları .....	18
2.4.4. Enterohemorajik <i>E. coli</i> (EHEC) Suşları .....	21
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1. Örneklerin Toplanması .....	25

3.2. Bakterilerin İzolasyonu .....	28
3.3. Bakterilerin İdentifikasyonu .....	28
3.4. Shiga-Benzeri Toksinlerin (Stx) Saptanması .....	30
3.5. <i>E. coli</i> Suşlarında Özgün Virülans Genlerinin Saptanması .....	30
3.6. DNA Dizi Analizi Deneyleri.....	33
3.7. Suşların Antibiyotiklere Duyarlılıkları .....	33
4. BULGULAR .....	35
4.1. İzole Edilen Suşlar .....	35
4.2. Shiga-Benzeri Toksinlerin (Stx) Saptanması .....	39
4.3. <i>E. coli</i> Suşlarında Özgün Virülans Genlerinin Saptanması .....	39
4.4. Suşların Antibiyotiklere Duyarlılıkları .....	41
5. TARTIŞMA .....	48
KAYNAKLAR .....	622
ÖZGEÇMİŞ .....	76



## TABLolar LİSTESİ

Tablo 3-1: Hastanelerden alınan su örneklerinin dağılımı. Syf: 25

Tablo 3-2: İstanbul Tıp Fakültesi'nden toplanan 66 direkt şehir şebeke (musluk) suyu örneğinin dağılımı. Syf: 26

Tablo 3-3: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nden toplanan 59 direkt şehir şebeke (musluk) suyu örneğinin dağılımı. Syf: 27

Tablo 3-4: PCR deneylerinde kullanılan primerlerin baz dizileri ve büyüklükleri. Syf: 31

Tablo 4-1: 50 içme suyu örneğinden izole edilen suşlar. Syf: 36

Tablo 4-2: Hastanelere ait toplam 9 su deposundan toplanan su örneklerinden izole edilen suşlar. Syf: 37

Tablo 4-3: Hastanelere ait tüm kullanma suyu (musluk+depo) örneklerinden izole edilen suşlar. Syf: 38

Tablo 4-4: Çalışmada toplanan tüm su örneklerinden (184 örnek) izole edilen suşlar. Syf: 38

Tablo 4-5: Tüm su örneklerinden izole edilen suşlar. Syf: 39

Tablo 4-6: Antibiyotiklere dirençli ve orta duyarlı suşlar (*E. coli* suşları hariç). Syf: 42

Tablo 4-7: *E. coli* hariç izole edilen suşlar arasında bir veya çoklu antibiyotik direncine sahip olanların sayısı. Syf: 45

Tablo 4-8: *E. coli* suşlarında antibiyotiklere duyarlılık paternleri. Syf: 46

Tablo 4-9: İBL pozitif suşlar. Syf: 47

## ŞEKİLLER LİSTESİ

Resim 4-1: PCR deneylerinde kullanılan kontrol suşa ait genlerin agaroz jel görüntüsü. Syf: 40

Resim 4-2: *lt* geninin pozitif bulunduğu 10 *E. coli* suşunun agaroz jel görüntüsü. Syf: 41

Grafik 4-1: Antibiyotiklerin direnç yüzdeleri. Syf: 44

**SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ**

- μ: mikro
- A/E: Yapışma-Bozma Lezyonu
- aac: Asetil transferaz
- ABD: Amerika Birleşik Devletleri
- ADG: Antibiyotik direnç genleri
- ADP: Adenozin Difosfat
- AK: Amikasin
- AMC: Amoksisilin/klavulonat
- AMP: Ampisilin
- ant: Nükleotidil transferaz
- aph: Fosfotransferaz
- ATCC: American Type Culture Collection
- Bfp: Küme oluşturan fimbriya
- bla: Beta-laktamaz direnci
- C: Kloramfenikol
- cAMP: siklik adenozin mono fosfat
- CAZ: Seftazidim
- CFA: Kolonizasyon Fakör Antijenleri
- cGMP: siklik guanozin mono fosfat
- CIP: Ciprofloksasin
- Cl: Klor
- CLSI: Clinical Laboratory and Standarts Institute
- cm: santimetre
- CRO: Seftriakson
- CSs: coli yüzey antijenleri
- CTF: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
- CZ: Sefalotin
- DAEC: Diffüz adherent *E. coli*

dak: dakika  
DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü  
eaeA: İntimin geni  
EAEC: Enteroagregatif *E. coli*  
EAF: EPEC adhezyon faktörü  
EHEC: Enterohemorajik *E. coli*  
EIEC: Enteroinvazif *E. coli*  
ELISA: Enzim linked immun sorbent assay  
EPEC: Enteropatojenik *E. coli*  
esc: TÜSS kodlayan genler  
Esp: Sekretuar proteinler  
ETEC: Enterotoksijenik *E. coli*  
ExPEC: Barsak dışı infeksiyon etkeni olan *E. coli* suşları  
FEP: Sefepim  
FOX: Sefoksitin  
GN: Gentamisin  
GSBL: Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz  
H antijeni: Kirpik antijeni  
H<sub>2</sub>S: Sülfirik asit  
HIV: İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü  
hlyA: Hemolizin  
HUS: Hemolitik Üremik Sendrom  
I: Orta duyarlı  
IMP: İmipenem  
İBL: İndüklenebilir beta laktamaz  
İTF: İstanbul Tıp Fakültesi  
İYİ: İdrar Yolu İnfeksiyonu  
K antijeni: Kapsül antijeni  
KatP: Katalaz peroksidaz  
kb: kilo baz

kDa: kilo dalton  
LA: Lokalize adhezyon  
LEE: lokus of enterosit effacement  
LPS: Lipopolisakkarit  
Lt: litre  
Lt: Sıcaklığa duyarlı (labil) toksin  
MEM: Meropenem  
MIO: Hareket-İndol-Ornitin besiyeri  
mL: mili litre  
MLS: Makrolit-Linkozamid-Streptogramin  
N: Normal  
Na: Sodyum  
NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotit  
O antijeni: Somatik antijen  
ODC: Ornitin dekarboksilaz  
PCR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu  
PİP: Piperasillin  
R: Dirençli  
S: Duyarlı  
san: saniye  
St: Shiga Benzeri Toksin  
St: Sıcaklığa dirençli (stabil) toksin  
STEC: Shiga toksin üreten *E. coli*  
Stx: Shiga Toksin  
SXT: Trimetoprim/sulfametoksazol  
TE: Tetrasiklin  
tet: Tetrasiklin direnç geni  
Tir: Transloke intimin reseptörü  
TSA: Triptik Soy Agar  
TSB: Triptik Soy Buyyon

TSI: Üç şekerli demirli besiyeri

TÜSS: Tip üç sekresyon sistemi

TZP: Piperasillin tazobaktam

VP: Voges-Proskauer

VTEC: Vero toksin üreten *E. coli*

## ÖZET

Gümüş D. Kullanma ve içme sularında EHEC, EPEC ve ETEC suşlarının varlığının ve antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul. 2011.

Besin ve su kaynaklı infeksiyon hastalıkları önemli mortalite ve morbidite nedeni olarak tüm dünyada en önde gelen halk sağlığı problemlerindedir. Su kaynaklı infeksiyonlar az gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde, çoğunluğu çocuk olmak üzere, yılda yaklaşık 3,4 milyon ölümlerle sonuçlanmaktadır.

Bu çalışmada farklı markalara ait 50 doğal kaynak içme suyu örneğinde ve iki hastaneye ait musluk ve depolardan toplanan 134 su örneğinde EHEC, EPEC ve ETEC suşlarının varlığının ve antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır. Patojen *E. coli* suşlarının tanımlanması için EHEC (stx-1, stx-2, eaeA), EPEC (eaeA, bfp) ve ETEC (lt, st) suşlarına özgü virülans genleri PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Yüz seksen dört su örneğinin beşinden (%2,7) *E. coli* izole edilmiştir. Beş örnekten izole edilen 36 *E. coli* suşunun birinin GSBL pozitif olduğu gösterilmiştir. PCR deneyleri sonucunda bir içme suyundan izole edilen on *E. coli* suşunda lt geni pozitif bulunmuş ve bu suşlar ETEC olarak tanımlanmıştır. İncelenen su örneklerinde *E. coli* suşlarının yanı sıra *Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Serratia* spp. ve *L. adocarboxylata* suşları da izole edilmiştir. *E. coli* haricinde izole edilen bu 74 suşun 60'ının (%81,1) çoğul dirençli olduğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak, doğal kanak içme sularının zannedilen aksine musluk sularından daha yüksek oranda fekal bakterileri içerebildiği gösterilmiştir. Patojenik *E. coli* suşlarının ve antibiyotiklere dirençli Gram negatif çomakların özellikle içme sularında varlığı bu konuda yapılan sürveyans çalışmalarının önemini ortaya koymaktadır.

Anahtar Kelimeler: EHEC, EPEC, ETEC, su, virülans faktörleri

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 3329

## ABSTRACT

Gümüş D. Investigation of the presece of EHEC, EPEC and ETEC strains and their antibiotic resistance in drinking and tap water samples. İstanbul University, Institute of Health Science, Microbiology and Clinical Microbiology Department. Doctorate Thesis. İstanbul. 2011.

Food borne and waterborne infectious illnesses are leading global public health problems accounting for high morbidity and mortality rates. Water related infections result in an estimated 3.4 million deaths per year, mostly children in developing and under developed countries.

The aim of this study is to investigate the presence of EHEC, ETEC, EPEC strains and their antibiotic resistance in 50 different trade marked natural spring water samples and 134 tap water samples from two hospitals. *stx-1*, *stx-2*, *eaeA* genes spesific for EHEC strains, *eaeA*, *bfp* genes spesific for EPEC strains and *lt*, *st* genes spesific for ETEC strains were investigated by PCR method. *E. coli* strains isolated only five out of (%2.7) 184 water samples. Of the 36 *E. coli* strains isolated from these five water samples only one ESBL positive *E. coli* was found. According to PCR experiments ten *E. coli* strains isolated from one drinking water sample were shown to be *lt* gene positive and these strains were identified as ETEC. In addition to pathogenic *E. coli* strains, *Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Acinetobacter* spp., *Aeromonas* spp., *Serratia* spp. ve *L. adocarboxylata* strains were also determined from water samples. It was shown that 60 (%81.1) of these 74 strains isolated other than *E. coli*, were multiple resistant.

As a conclusion contrary to our expectations natural spring waters can be much more contaminated with faecal bacteria when compared with tap water samples. The presence of pathogenic *E. coli* strains and antibiotic resistant Gram negative bacteria especially in drinking water samples emphasize the importance of this kind surveillance studies.

Key Words: EHEC, EPEC, ETEC, water, virulence factors

The present work was supported by the Research Fund of İstanbul University. Project No. 3329



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Dünyada 1,1 milyardan fazla insanın güvenli olmayan koşullarda içme suyu kullandığı bildirilmektedir. Yapılan birçok çalışmada içme sularının koliform ve fekal koliform bakterilerle kontamine olduğu gösterilmiştir (1, 2). İçme sularının 100 mL'sinde *E. coli* veya termotolerant bakteri miktarının sıfır olması gerekmektedir (3). Ancak bazı standartlara göre içme ve birinci kalitede kullanma sularında 100 mL'de 10 koliform bakteri bulunabileceği bildirilmektedir (4). Koliform çomaklar arasında *E. coli* başta olmak üzere Enterobacteriaceae ailesi üyesi bakteriler yer almaktadır (5). Bunlar hem suları tüketen kişiler için infeksiyon etkeni olarak hem de suyun muhtemel dışkı kontaminasyonunu gösteren parametre olarak rol oynamaktadır (6, 7).

En sık rastlanan hastane infeksiyonu etkenleri arasında da yer alan *E. coli* suşları özgün virülans faktörleriyle barsakta yerleşerek hastalık yapanlar ve birincil yerleşim yerleri barsak olmakla birlikte barsak dışı infeksiyon yapanlar olmak üzere iki grupta incelenirler. Barsak dışı infeksiyon etkeni olan *E. coli* suşları ExPEC olarak adlandırılırken, barsakta infeksiyon oluşturan *E. coli* suşları patojenite mekanizmalarına göre ayırt edilen 6 patogrup içinde yer alırlar. Bunlar: ETEC (enterotoksijenik *E. coli*), EPEC (enteropatojenik *E. coli*), EHEC (enterohemorajik *E. coli*), EAEC (enteroagregatif *E. coli*), DAEC (diffüz adherent *E. coli*) ve EIEC (enteroinvazif *E. coli*) olarak adlandırılmaktadır. Diyare etkeni tüm *E. coli* suşları dışkı-ağız yolu ile bulaşır; ancak farklı epidemiyolojik özellikler sergilerler (1, 5, 8, 9).

EHEC suşları ilk olarak 1982 yılında ABD'de az pişmiş hamburgerlerin yenmesiyle ortaya çıkan ve bu patogruptan O157:H7 serotipinin etken olduğu iki ayrı hemorajik kolit salgını sonrasında insan patojeni olarak tanımlanmıştır (10, 11). Verotoksin üreten *E. coli* (VTEC) veya Shiga toksin (Stx) üreten *E. coli* (STEC) suşları olarak da adlandırılan EHEC suşları, son 20 yılda özellikle sanayileşmiş ülkelerde en çok önem kazanan besin kaynaklı patojenlerden biri olup önemli bir sağlık problemi haline almıştır. EHEC genellikle kanlı ishalle seyreden gastroenterit etkenidir, ancak olguların %10-20'sinde (genellikle çocuklar ve yaşlılarda) yaşamı tehdit eden HUS (hemolitik üremik sendrom), trombotik trombositopenik purpura (kanda platelet sayısında azalma) ve böbrek yetmezliği gibi komplikasyonlara yol açabilir (12, 13,14).

İnsandan 100'den fazla EHEC serotipi izole edilmiştir (13). Bunlar içinde en sık rastlanan EHEC O157:H7 serotipidir. O157 dışındaki EHEC suşlarının ise insan

patojeni olarak önemlerinin daha az olduğu düşünülürse de klasik yöntemlerin yanı sıra geliştirilen moleküler teknikler ile Stx genlerinin veya immünolojik yöntemlerle direkt olarak toksinin belirlenmesiyle non-O157 EHEC serotiplerinin etken olduğu salgınların ve sporadik infeksiyonların saptanmasında artış olmuştur (13, 15, 16). EHEC infeksiyonlarının şiddeti ve tüm dünyada görülme sıklığındaki artış O157:H7 ve non O157 suşların halk sağlığı açısından önemini ortaya koymaktadır (13).

EHEC suşları için karakteristik olan en önemli virülans faktörleri **Shiga toksin** (Stx), A/E (yapışma/bozma) lezyonlarının oluşturulmasından sorumlu **intimin** ve ilgili proteinler ve **hemolizindir**. Stx oluşturup, A/E ve hemolizin bulundurmayan EHEC suşları atipik olarak tanımlanmaktadır (12). STEC suşları için en önemli rezervuarlar, başta sığırlar olmak üzere, koyun ve keçiler gibi evcil otçul hayvanlardır. *E. coli* O157:H7 koyunlar, keçiler, atlar, köpekler, geyikler, domuzlar ve martılardan izole edilmiştir (13). Sığırlar asemptomatik EHEC taşıyıcısı olduğundan çeşitli besin ürünleri (özellikle hamburger, marul, lahana, elma suyu, salam, yoğurt pastörize edilmemiş sütler) ve sular *E. coli* O157:H7'nin en yaygın bulaşma kaynağıdır (17). EHEC O157:H7'nin hayvan dışıklarında 20 aydan fazla canlı kalabildiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır (18). Bu bakterinin asit ve kuruluğa dirençli olması yiyecekler üzerinde de uzun süre canlı kalmasına neden olmaktadır (13, 16).

EPEC suşları dünyada süt çocuklarında görülen diyarelerin en önemli etkenidir ve gelişmekte olan ülkelerde altı aylıktan küçük çocuklarda önemli endemik sağlık problemlerindedir. Tüm dünya genelinde EPEC suşları her yıl yüz binlerce çocuğun ölümüne yol açmaktadır Ayrıca bakım evlerinde, pediatri servislerinde ve gelişmiş ülkelerde yetişkinler arasında da ortaya çıkan salgınlar bildirilmiştir (12). EPEC suşlarının kendine özgü en önemli virülans faktörleri **adheranstan sorumlu küme oluşturan fimbriya (BFP)** ve **intimin proteindir**. BFP adherans faktörüne sahip suşlar tipik suşlardır, bu virülans faktörünün bulunmadığı suşlara atipik suşlar olarak adlandırılmaktadır. Tipik EPEC suşlarının gelişmekte olan ülkelere sıkça izole edildiği ancak sanayileşmiş ülkelere bu oranın düşük olduğu bildirilmiştir. Atipik EPEC suşları ise sanayileşmiş ülkelere diyare etkenleri arasında daha fazla önem taşımaktadır. (19). Tipik EPEC serotiplerinin hayvanlarda bulunmadığı, bu organizmalar için tek canlı rezervuarın insanlar olduğu bilinmektedir. Ancak atipik EPEC serotiplerinin çoğu köpek ve sığır gibi farklı hayvan türlerinden izole edilmiştir (20).

ETEC suşları sıklıkla gelişmekte olan ülkelere seyahat edenlerde görülen ve turist diyaresi olarak adlandırılan hastalığın etkenidir. ETEC suşlarının etken olduğu infeksiyonların şiddeti ılımlı formdan ciddi kolera benzeri diyareye kadar değişebilir. Çoğunluğu gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere ETEC suşlarının sorumlu olduğu, her yıl 5 yaş altı çocuklarda 700 bin-800 bin ölümlle sonuçlanan 650 milyon diyare olgusu bildirilmektedir (12). ETEC suşlarının en önemli virulans faktörleri **toksinleri** ve **adhezinleridir**. ETEC suşlarının ince barsağı kolonize etmelerinde önem taşıyan adhezinleri genel olarak kolonizasyon faktörleri (CFA = kolonizasyon faktör antijenleri) ve coli yüzey antijenleri (CSs) olarak adlandırılmaktadır. (12, 21). ETEC suşlarında iki tip toksin bulunur. Toksinlerden biri sıcaklığa duyarlı (termolabil), diğeri sıcaklığa dirençli (termostabil) dir. Suşların yaklaşık %30'u termolabil toksin (LT), %35'i termostabil toksin (ST), diğeri ise her ikisini de üretirler. (12, 21, 22).

Sularda patojen bakterilerin varlığı sadece sporadik ya da salgınlar şeklindeki infeksiyonların ortaya çıkması açısından değil aynı zamanda virulan ve dirençli suşların yayılması ve virulans genleri ile direnç genlerinin bakteriler arasında nakli açısından da önemlidir. Yapılan araştırmalarda insanlardan izole edilen klinik suşlarda olduğu gibi, sığırlardan ve çevreden izole edilen suşlar arasında da çoğul antibiyotik direncinin yaygın olduğunu vurgulanmış ve bu direnç genlerinin duyarlı suşlara horizontal gen transferi ile aktarılabildiğini gösterilmiştir (1, 23). Bu nedenle su gibi çevre örneklerinden izole edilen bakterilerde antibiyotiklere direnç özelliklerinin belirlenmesi epidemiyolojik bilgilerin tamamlanması açısından önem taşımaktadır.

Bu tez çalışmasında su ve besinlerle bulaşma özelliği açısından en çok incelenen üç *E. coli* patogrubunun (EHEC, ETEC ve EPEC) kullanma ve içme sularında varlığının PCR yöntemi ile saptanması ve izole edilen suşların antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Besinlerle ve Sularla Bulaşan İnfeksiyon Hastalıkları ve Etkenleri

Her yıl tüm dünyada, besin kaynaklı infeksiyonlar milyonlarca hastalığa, binlerce ölüme yol açmakta, infeksiyonların çoğu tanımlanamamakta ve rapor edilememektedir. Besin kaynaklı hastalıklar çok faktörlü oluşumlardır, basit ve evrensel çözümleri bulunmamaktadır. Birçok besin kaynaklı patojen için aşı bulunmamaktadır. Besin güvenliğinin temel prensipleri konusundaki eğitimler önlem almak açısından önemli olsa da tek başına etkili olamamaktadır. Yiyecekler tüketiciye ulaşana kadar birçok aşamadan geçer ki bu da kontaminasyona olanak sağlar. Önlem almada uygulanacak temel strateji, kontaminasyonun ve hastalığın bulaşma mekanizmasının iyi anlaşılmasıdır. Bir salgın araştırmasında veya epidemiyolojik çalışmalarda, şüpheli olan besin tanımlanmalı ve hastalığa yol açacak kadar çok sayıda mikroorganizma ile kontaminasyona olanak veren olaylar zinciri ortaya çıkarılmalıdır (24, 25).

Besin zincirinde yer alması muhtemel mikroplar bakteriler, viruslar ve parazitlerdir. Hollanda gibi bazı Avrupa Birliği ülkelerinde yapılan sürveyans çalışmalarında bakterilerin etken olduğu barsak hastalıklarında olgu sayılarının son zamanlarda düştüğü gösterilse de bu ülkelerde bile hastalık sıklığı halen azımsanmayacak düzeydedir (26, 27).

Ağız yoluyla alındığında hastalığa yol açabildiği bilinen 200'den fazla mikrobik, kimyasal veya fiziksel etken bulunmaktadır (28). Sanayileşmiş ülkelerde son 20 yıldır bakteri, virus, parazit ve prionların sebep olduğu besin kaynaklı hastalıklar siyasi gündemde de önemli yer tutmuş ve medyanın da ilgi odağı olmuştur. Halkta oluşan endişeler göz önüne alınarak halk sağlığı araştırmaları çoğunlukla iyi bilinen besin kaynaklı hastalıklara ve besin zincirinde yer alan patojenlere yönelmiştir (26).

Barsak hastalıklarına yol açan mikropların üzerinde önemle durulsa da, bildiklerimiz hala sınırlıdır. Gastrointestinal hastalıklar üzerine yapılan geniş kapsamlı tanı çalışmaları olası etkenlerin %50-60'ının tanımlanamadığını göstermiştir. Ancak yeni mikroorganizmaların tanımlanması ve yiyecek hazırlama alışkanlıklarının değişmesi ile infeksiyöz barsak hastalıklarının listesi artmaktadır. 1960'lardan önce gastrointestinal hastalıkların en önemli etkenleri *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *Clostridium botulinum* ve *Staphylococcus aureus* iken 1960'larda *Clostridium*

*perfringens* ve *B. cereus*; 1970'lerde Rota virus ve Noro virus eklenmiştir. 1980-1990'larda *Campylobacter*, *Yersinia*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Cryptosporidia* ve *Cyclospora* gibi birçok yeni etken ilave olmuştur (26, 29).

Besin ve su kaynaklı hastalıklar halen sorun olmaya devam etse de geçmiş dönemlerden günümüze kadar özellikle alt yapıların gelişmişliği ile bağlantılı olarak sularla bulaşan infeksiyon hastalıklarını önlemede çok önemli aşamalar kaydedilmiştir. Örneğin 20. yüzyılın başında çok yaygın bir hastalık olan tifo gelişmiş ülkelerde şu anda unutulmuştur. Antibiyotiklerin henüz kullanılmadığı dönemlerde içme sularının dezenfeksiyonu, kanalizasyon yapıları, sütün pastörizasyonu ve sterilizasyonu gibi uygulamalar ile alınan önlemler başarılı olmuştur. Benzer şekilde kolera ve trişineloz da yine gelişmiş ülkelerde kontrol altına alınmıştır. Bu tür hastalıkların önlenmesinde başarılı olunmasına rağmen daha önce de belirtildiği üzere yeni bazı besin kaynaklı patojenler önem kazanmaya başlamıştır (24).

Besin kaynaklı patojenler bazı ortak özelliklere sahiptir. En önemlisi hemen çoğunun bir hayvan rezervuarının olması ve bu sayede insanlara bulaşmasıdır. Dolayısı ile bu infeksiyonlar aynı zamanda besin kaynaklı zoonozlardır. İnfekte olan hayvan konağında genellikle hastalığa yol açmazlar. Örneğin, *Salmonella* serotip Enteritidis ile infekte olan tavuklar, *E. coli* O157:H7 taşıyan sığırlar, Norwalk virusu yada *V. vulnificus* taşıyan deniz kabukluları sağlıklıdır; bu durum sağlıklı hayvanlarında halk sağlığının inceleme alanında yer alması ve hayvanlar için kullanılan yiyecek ve suların da güvenliğinden emin olunması gerektiğini göstermiştir. Bunun başarısız olduğu durumlarda farklı ekolojik gruplar arasında bu patojenler tüm dünya genelinde yayılabilmektedir (24).

Yeni patojenlerin tanımlanmalarının bu denli hızlı oluşu hala tanımlanamamış birçoklarının da varlığını göstermektedir. Gelecekte birçok besin kaynaklı infeksiyonun hayvan rezervuarından insanların yiyecek kaynaklarına geçmesi sonucu artış yapacağı düşünülmektedir.

Besin kaynaklı hastalıkların global olarak yaygınlığı hakkında DSÖ tarafından yayınlanan bildirimler sayesinde daha güncel ve net bilgilere ulaşılabilmektedir (30). 2005 yılında 1,8 milyon insanın diyareli hastalıklardan öldüğü, çoğunlunun kontamine besin ve içme suyu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir. Bu durum sanıldığı gibi sadece gelişmemiş ülkelerin problemi değildir. Sadece ABD'nde her yıl 325 bini hastaneye

yatış ve 5000'i ölümlle sonlanan yaklaşık 76 milyon besin kaynaklı hastalık olgusu bildirilmektedir (26, 29, 31).

Elli yıldan fazla zamandır antimikrobik maddeler, hem insan hem de hayvanlardaki infeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılmaktadır. Bunun ötesinde bu maddelerden bazıları daha hızlı büyümelerinin sağlanması amacıyla hayvancılıkta subklinik dozlarında verilmektedir. Çoğu çevresel kaynaklı olduğu bilinen direnç genlerinin seçilimine ve buna bağlı olarak dirençli bakterilerin yayılımına neden olmakla kalmayıp gelişen dirençli mikropların neden olduğu hastalıkların tedavisinde başarısızlık ve hastalığın süresinin uzaması, hastaneye yatış ve mortalite artışına yol açar (32, 33). Bunun sonucunda çiftlikler, atık suların karıştığı nehirler ve toprak gibi ekosistemlerin antibiyotiklerle kontaminasyonu artmaktadır. Dolayısı ile antimikrobik maddelerin insanlarda tedavi amacıyla kullanımında olduğu kadar zirai alanda kullanımında da belirli parametrelere göre ayarlama ve sınırlama yapılması gerekmektedir (26).

Besinler hem antimikrobik maddelere dirençli bakteriler hem de direnç genleri için kaynak olabilmektedir. Direnç genleri taşıyan hareketli genetik elemanlar kara hayvanları, balıklar ve insan kaynaklı bakteriler arasında horizontal olarak transfer edilebilir; ayrıca böyle aktarımlar mutfak gibi doğal ortamlarda da gerçekleşebilir (34). Buna ek olarak yiyeceklerdeki antimikrobik maddelerin kalıntıları ile tesadüfi olarak temas eden bakterilerde de antimikrobik direnç gelişebilir (26).

Besin kaynaklı hastalıkların gelişiminde ve yayılımında su çok önem taşıyan bir ortam hazırlamaktadır. Sular içme suyu olarak tüketilmesinin yanı sıra sebze ve meyvelerin sulanması, ayrıca yemeklerin mutfakta pişirilip hazırlanması gibi pek çok aşamada infeksiyöz etkenlerinin bulaşmasına olanak sağlamaktadır. Su ile ilişkili infeksiyöz hastalıklar, dört farklı epidemiyolojik kategoride değerlendirilmektedir. 1) Su kaynaklı infeksiyonlarda, infeksiyöz etkenlerin yayılmasında su pasif taşıyıcı olarak görev yapmaktadır. Suların ağız yolundan alınması ile etkenler bulaşmaktadır. 2) Sanitasyon koşullarının uygun olmadığı ortamlarda, kirli sularla vücut yüzeyinin yıkanması sonucunda ortaya çıkan infeksiyonlardır. 3) İnfeksiyöz etkenin yaşam döngüsünde konak olarak görev yapan canlının suda yaşayan bir canlı olduğu infeksiyonlardır (şistozomiyazis, filaryazis). 4) İnfeksiyöz etkenin vektörünün su ile ilişkili olduğu infeksiyonlardır (Deng ateşi, sıtma) (35, 36).

Bu tezin kapsamında incelenen etkenler birinci grupta yer almaktadır ve bu tür infeksiyon salgınlarında yiyeceklerin hazırlanması sırasında kullanılan kontamine sular kaynak olabilmektedir. İçme suyunda az sayıda bulunan patojenler yiyecekler ile temas ettiklerinde hızlıca çoğalarak infeksiyöz doza ulaşabilir. Birçok ülkede mikrobiyolojik olarak güvenli içme suyu kullanımı temel insan hakkı olarak kabul edilmektedir; ancak mikrobiyolojik olarak güvenli olma tanımı açık değildir; sağlıklı birine zarar vermeyecek bir etken immün süprese ve yaşlı popülasyon için ölümcül olabilmektedir (37).

Çoğunluğu fekal kaynaklı olan su kaynaklı hastalıklar, kontamine suların yutulması sonucu bulaşır; ayrıca su ortamı infeksiyon etkeninin pasif taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır. Dışkı ile atılan çok çeşitli bakteri, virus ve protozoonlar su kaynaklı infeksiyon oluşturma yeteneğindedir. 1850’de İngiliz doktor John Snow tarafından koleranın su kaynaklı olduğunun gösterilmesinden sonra diyare ve diğer hastalıklara yol açan birçok patojenin de içme suyuyla insana bulaştığı anlaşılmıştır (35). Su kaynaklı infeksiyonların yayılımı, patojenin suda canlı ve latent kalma, çevre ortamlarında çoğalabilme ve duyarlı kişilerde infeksiyon oluşturmak için gerekli dozu gibi bazı faktörlere bağlıdır (35).

Suyun işlenmesine yönelik çalışmaların temeli Yunanlıların içme suyu kalitesini yükseltmek için kor kömür filtreleri, kaynatma ve güneş ışığına maruz bırakma gibi işlemlerin uygulandığı 6000 yıl öncesi döneme kadar dayanmaktadır (38). Alman mikrobiyolog Robert Koch ilk olarak *Vibrio cholerae*’yı izole edip 1892 yılında Almanya’da ortaya çıkan kolera salgının etkeni olarak tanımladığında Avrupa’nın gelişmekte olan bölgelerinde, İngiltere ve Kuzey Amerika’da borulardaki kullanma sularının klor ile dezenfeksiyonu, filtrasyonu gibi uygulamaların başlaması açısından dönüm noktası olmuştur. 19. yüzyılın sonlarında başlatılan bu işlemler sayesinde tüm dünyada hastalığın oranlarında çok önemli düşüşler görülmüştür (35). ABD’inde modern su işleme teknikleri kullanımı sayesinde büyük şehirlerde tifo ve diğer su ilişkili hastalıkların da oranlarında aynı şekilde azalmalar saptanmıştır. Bu durum su kaynaklı epidemilerin sonlandığını düşündürmüştür (39).

Ancak alınan her türlü önleme rağmen DSÖ, dünya genelinde yaklaşık 1,1 milyar insanın güvenilir olmayan içme suyu kullandığını (40), tüm diyareli hastalıkların büyük çoğunluğunun (%88), yıllık ölümlerin %3’ünün (1,7 milyon) güvenli olmayan su kullanımı, sanitasyon ve hijyen eksikliğine bağlı olduğu bildirilmektedir (30, 35).

Bunun en önemli sebebi rezervuar hayvanların ve asemptomatik infekte bireylerin kontrol edilememesidir.

Kuzey Amerika'da görülen gastrointestinal hastalıkların %15-30'unun su ile bulaştığı düşünülmektedir (41); gelişmiş bölgelerle ilgili yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar da Payment'in bildirdiği sonuçları desteklemektedir. Gelişmekte olan bölgelerde ise atık sularda bulunan patojenlerin konsantrasyonu ve endemik gastrointestinal hastalık oranları daha yüksektir (35, 42). Ayrıca gelişmekte olan ülkelerde belirtilen olumsuz koşullar yüzünden saptanan ölümlerin %90'ı çocuklara aittir ve sağlık problemleri açısından risk teşkil eden en önemli 20 faktör arasında beslenme yetersizliği ve güvenli olmayan cinsel temastan sonra üçüncü sırada yer almaktadır (30).

Su kaynaklı infeksiyon hastalıkları, tüm dünya genelinde ölümlerin önde gelen sebeplerinden biri olmasının yanı sıra hastalık spektrumu da gittikçe genişlemekte ve birçok su kaynaklı infeksiyon hastalığı insidansı artmaktadır (37, 43, 44). Yüzey ve içme suyu olarak kullanılması düşünülen kontamine yeraltı suları ile bu infeksiyonlar taşınmakta ve böylece tüm toplum için risk oluşturmaktadır (43).

Son 20 yılda dünya genelinde gerçekleşmiş ve ölümcül derecede tehlikeli olan salgınlardan elde edilen veriler incelendiğinde su kaynaklı gelişen infeksiyonların önemi daha net şekilde anlaşılmaktadır. Bu salgınlardan en önemlileri aşağıda özetlenmiştir:

- 1983 yılında Kanada'da saptanan viral bir salgın 3000 olgu ve 2 ölüm ile sonuçlanmıştır.
- 1989 Aralık-1990 Ocak döneminde, ABD Missouri'de yer altı sularının kaynak olduğu bir *E. coli* O157:H7 salgını görülmüş, 243 olgunun 4'ü ölümlerle sonuçlanmıştır.
- 1993 yılında ABD Wisconsin'de Michigan gölünden kaynaklanan bir *C. parvum* salgını görülmüş 400000 olgudan 50'si ölümlerle sonuçlanmıştır.
- 1993 yılında ABD Missouri'de yeraltı sularından kaynaklanan ve *S. typhimurium* etken olarak belirlendiği diğer bir salgında ise 650 olgu ve 7 ölüm ile sonuçlanmıştır.
- 1999 ABD New York'da yeraltı sularından kaynaklanan *C. jejuni* ve *E. coli* O157:H7 salgınında 2800-5000 olgudan 2'si ölümlerle sonuçlanmıştır.



- 2000 yılında Kanada'da yeraltı sularından kaynaklanan *E. coli* O157:H7 ve *C. jejuni* salgınında toplam 2300 olgudan 27'sinde HUS gelişmiş ve 7'si ölümlü sonuçlanmıştır (45).

En sık görülen su kaynaklı mikrobik hastalık şiddetli olmayan, akut gastroenterittir. Gelişmiş ülkelerde toplumun çoğunluğu için hafif gastroenterit birkaç saat süren bir rahatsızlıkken, gelişmekte olan ülkelerde kontamine suların kullanımına bağlı olarak her yıl 13 milyon kişinin ölümü anlamına gelmektedir (43).

Kişisel su kaynaklarının klor eklenerek dezenfekte edilmesi sağlanmış ve bu uygulama koliform grubu gibi Gram negatif barsak bakterileri üzerinde etkili olmuştur. Ayrıca filtrasyon yöntemi protozoa ve enterovirusların sayısını önemli ölçüde azaltmaktadır; ancak bu yöntemler ile içme suyundan mikrobik kontaminantları tamamıyla uzaklaştırılmaz. Bu tür sistemlerin tam olarak başarı sağlayamamasından dolayı su kaynaklı salgınlar ortaya çıkmaya devam etmektedir (43, 46).

Sularla bulaşan bakteriler barsak ve çevre (su) bakterilerini kapsamaktadır. *Salmonella spp.*, *Shigella spp.* ve *E. coli* gibi barsak bakterilerinin akuatik ortamlarda bulunması birçok farklı parametreye bağlıdır; ancak özellikle ortamda bulunan besinlerin ve sıcaklığın etkisi vardır. Enterik bakteriler çoğunlukla oldukça zor şartlar altında varlığını sürdürebilirken, bazılarının taze sularda çoğalabildiğini gösteren çalışmalar vardır. İçme sularında canlı kalıp çoğalabilen diğer bakteriler arasında *Legionella spp.*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Mycobacterium avium* sayılabilir. Enterik bakterilerin infeksiyöz dozları yaklaşık olarak  $10^7$ - $10^8$  hücre iken *Shigella spp.*, *Campylobacter spp.* ve EHEC O157:H7 gibi bazı etkenlerinki çok daha düşük olabilir (36).

## 2.2. Besinlerle ve Sularla Bulaşan Etkenlerde Antibiyotiklere Direnç

Akuatik habitatlar gibi doğal ekosistemlerde çok çeşitli mikroplar bir arada yaşarlar. Mikropların oluşturduğu bu toplulukta hem çevre (non-patojenik) mikroplar hem de hayvan veya insan (hasta/taşıyıcı) dışkılarıyla suya katılan patojenler bir arada bulunmaktadır. Çevre (non-patojenik) bakterileri, diğer suşlara aktarıldığında önemli virulans özellikleri kazandıran genler için bir depo görevi görürler; bu konuda özellikle antibiyotik direnç genleri (ADG) üzerine yapılan çok sayıda çalışma bulunmaktadır (33, 47).

Antibiyotiklerin çoğu değişime uğramadan çevreye yayılmaktadır. Dolayısı ile akuatik ortamlardaki antibiyotik kalıntılarının yaratacağı etki endişe yaratmaktadır. Hatta on metreden fazla derinliklerdeki yer altı sularında bile bazı antibiyotiklerin saptandığı bildirilmiştir (48). Yapılan çalışmalar sonucunda çeşitli su örneklerinde yüzlerce ADG varlığı belirtilmiştir. Çevresel kaynaklı direnç genleri 1) antibiyotiğin hedefine ulaşamaması, 2) dışa atım pompası (efluks), 3) antibiyotiğin inaktivasyonu ve 4) hedefin modifikasyonu gibi çeşitli mekanizmalara yol açmaktadır (48). Su örneklerinde saptanan antimikrobiklere direnç durumu aşağıda özetlenmiştir.

### **2.2.1. Tetrasiklin Direnci**

Günümüze kadar bildirilmiş en az 38 farklı tetrasiklin direnç geni (*tet*) bulunmaktadır (49). Bunların 23'ü dışa atım pompası, 11'i hedefin modifikasyonu, 3'ü inaktive edici enzim sentezi ve biri bilinmeyen bir mekanizma ile dirence yol açar (49). Bunlar arasında 22'den fazla *tet* geni sulardan izole edilen bakterilerde saptanmıştır. Çevresel kaynaklı *tet* genlerinin çoğu transport proteinlerini kodlar (50).

### **2.2.2. Aminoglikozid Direnci**

Aminoglikozid direncine yol açan mekanizmaların çoğu enzimatik modifikasyon yoluyla gerçekleşmektedir (51). Günümüze kadar 50'den fazla modifiye edici enzim tanımlanmıştır (52). Bunlar: 1) asetiltransferaz (*aac*), 2) fosfotransferaz (*aph*) ve 3) nükleotidiltransferaz (*ant*) olarak gruplandırılmaktadır (48). *aac*, *aph* ve *ant* genleri kirli veya doğal sulardan izole edilen *Aeromonas*, *Escherichia*, *Vibrio*, *Salmonella* ve *Listeria* türlerinde saptanmıştır (53).

### **2.2.3. Makrolit-Linkozamid-Streptogramin (MLS), Kloramfenikol Direnci**

MLS, yapısal olarak benzer olmadığı halde makrolit direncini kodlayan *erm* genleri bu antibiyotiklerin ikisine veya üçüne karşı gelişen dirençten sorumludur (54). Altmıştan fazla genin MLS antibiyotiklerin bir veya daha fazlasına karşı rRNA metilasyonu, dışa atım ve inaktivasyon mekanizmaları dirence yol açtığı gösterilmiştir (50).

Kloramfenikol direncinden sorumlu olan *cat* ve *clm* genlerinin birçok tipinin çevresel kaynaklı olduğu bildirilmiştir (55).

### 2.2.4. Beta-laktam Direnci

Beta-laktam grubu antibiyotik direncinden, antibiyotiğin hedefe ulaşamaması, hedef enzimin modifikasyonu ve/veya antibiyotiğin beta laktamazlarla direkt inaktivasyon mekanizmaları sorumludur (56). Gram negatif bakterilerde oluşan dirençten esas sorumlu olan mekanizma beta laktam halkasının bakteri tarafından salgılanan beta laktamaz ile yıkılması sonucu inaktive olmasıdır. Günümüze kadar 400'den fazla beta laktamaz (*bla* genleri tarafından kodlanan) tanımlanmıştır (56).

*bla* genlerinin çoğu *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Salmonella* gibi hayvan kaynaklı patojenlerde sıklıkla saptanmaktadır. *ampC* kodlayan beta laktamazlar da atık sularda, yüzey ve içme sularından izole edilen patojenlerde saptanmıştır (48).

Özellikle belirli ülkelerde ve bölgelerde içme sularında bulunan direnç genlerinin sürveyans çalışmaları ile belirlenmesi halk sağlığını koruyabilmek açısından önem taşımaktadır. ADG'lerinin atık, yüzey suları, hayvan çiftlikleri gibi ortamlardan içme suları ve besin zincirine horizontal geçişinde farklı genetik mekanizmalar rol oynamaktadır. Bunlar: 1) plazmit, transpozon, integronlar gibi hareketli genetik elementlerin konjugasyon yoluyla transferi, 2) doğal olarak kompetans özelliğe sahip bazı bakteriler veya ortamda bulunan kalsiyum gibi bazı faktörlerin kompetans özelliği indüklemesi sonucu çıplak DNA'nın transformasyonu yolu ile transferi, 3) bakteriyofaj aracılığı ile transdüksiyon sonucunda transferi olarak sıralanmaktadır (48, 57).

### 2.3. Besin ve Sularla Bulaşan İnfeksiyonların Ortaya Çıkışında Rol Oynayan Faktörler

Besin ve sularla bulaşan infeksiyon etkenlerinin halk sağlığı açısından önemi hiç azalmamıştır; bu infeksiyonların ortaya çıkışı birçok faktöre bağlıdır. Bu etkenlerin rezervuarları ve asemptomatik infekte bireylerin sıklığı nedeniyle tamamen eradike edilmesi mümkün olmamıştır. Kontrol altına alındıkları düşünülmüşse de yakın zamanlarda yeniden önem kazanan patojenler olarak ortaya çıkmışlardır. Bunun sebepleri şu şekilde özetlenebilir:

#### 2.3.1. İnsan Yaşama Biçimleri ve Alışkanlıklarındaki Değişiklikler

Sosyal ve çevresel değişiklikler sonucunda yeni veya önem kazanan su kaynaklı patojenlerle ilgili problemler devam etmektedir İklim değişiklikleri (küresel ısınma), şehirleşmenin hızla artması ve dünya üzerinde insanların farklı bölgelere hareketleri en

önemli faktörler arasındadır (35, 47). Bunun yanı sıra giderek artan uluslar arası yiyecek ve personel ticareti bazı ekzotik bölgelerde görülen patojenlerin, onlara karşı duyarlılığı olmayan popülasyonun yaşadığı bölgelere taşınmasına yol açmaktadır (47).

Ayrıca bu etkenlere karşı duyarlı olan insanların sayısı gitgide artmaktadır. HIV ile infekte kişiler, kronik romatolojik hastalığı olanlar, kanser ve solid organ transplantasyonu hastaları gibi immünsupresif tedavi alan kişiler, ayrıca immün sistemi yeteri kadar aktif olmayan yaşlı bireyler bu gruba girmektedir. Bu kişiler, sağlıklı olanlarda görülmeyen veya görülse bile çok daha hafif atlatılan infeksiyonlara maruz kalırlar; ayrıca diyareli hastalıklara bağlı morbidite ve mortalite açısından yüksek risk teşkil ederler (58, 59).

Buna ilave olarak küçük çocuklar, evsizler, bakım evinde kalanlar, göçmen çiftçiler ve sosyoekonomik düzeyi düşük bireylerde bu yeni önem kazanan hastalıklardan etkilenenler arasındadır (43).

### **2.3.2. Mikropların Uyumu (Adaptasyon)**

Mikropların evrimleşme süreci devam etmektedir. Virülans ve toksin üretimini içeren değişiklikler göstermektedir. Ayrıca bu yeni kazanılan virülans özellikle sayesinde patojenler yeni konaklarda yaşamak için uyumlu hale gelebilmektedir (26, 37). Buna en iyi örnek potansiyel yeni patojenin oluşumuna yol açan horizontal gen transferi yoluyla virülans genlerini alabilen patojenik *E. coli* suşlarıdır. Uygun olmayan ve yaygın antimikrobik maddelerin kullanımı ile indüklenen antibiyotiklere dirençli bakterilerin ve ilaçlara dirençli protozoaların seçilimi de sık gerçekleşmektedir. Sıklıkla non-patojenik suşlar çevreden, patojenler ise diğer bakterilerden yeni antibiyotik direnç genleri kazanabilirler. Böyle bir adaptasyon sonucu insanlar, yeni ve daha öldürücü suşlar ile karşılaşabilmektedir (43, 60, 61).

### **2.3.3. Halk Sağlığı Önlemlerinin Yıkılması**

Klasik halk sağlığını korumaya yönelik önlemler su ile yayılan birçok patojene insanların temasını ve yayılımını minimuma indirmek için uzun dönemler kullanılmışsa da, patojenler halen rezervuar konaklarında veya çevrede az sayıda da olsa varlığını devam ettirmektedir (46). Dolayısıyla, korucu önlemlerde her hangi bir aksaklık olduğunda yeniden ortaya çıkmaları olasılığı her zaman vardır. Bunun için özellikle az gelişmiş ülkelerde aşılama programlarına ve sanitasyon uygulamalarına çok dikkat

edilmesi gerekmektedir (37). Sürveyans çalışmalarında ve uygun tanı testlerine ulaşılmasında karşılaşılan sınırlamalar, salgınların önlenmesini ve kontrolünü de engellemektedir (43). Hem az gelişmiş hem de gelişmiş ülkelerdeki risk durumunun belirlenebilmesi için patojene özgü yapılan epidemiyolojik çalışmalara gerekli önemin gösterilmesi gerekmektedir (37).

#### **2.3.4. Zirai Uygulamalarda ve Hayvancılıkta Değişiklikler**

Zirai üretim yöntemlerinde gelişen değişimler, önem kazanan patojenlerin artışı sağlamaktadır. Hayvan çiftliklerinin sayısı azaldıkça, çiftlikler yoğunlaştırılmış, birleşik bölümler haline gelmiştir. Bu durumda hayvan pislikleri daha yoğunlaşarak nehirlerin kirliliğinde artışa yol açmaktadır. İçme suları ile ilişkili olan birçok patojenin hayvan konağı olduğu bilindiği için bu patojenleri içeren ve hayvan pislikleri ile kontamine olan içme suyu kaynakları yoluyla direkt veya indirekt hayvan-insan geçişinin ihtimali artmaktadır (43).

Enterobacteriaceae ailesi üyesi olan fekal koliformlar ve streptokoklar gibi mikroorganizmalar sularda dışkı kirliliğinin indikatörü olarak kabul edilmişlerdir. Dağıtım sistemlerindeki içme sularının bakteriyolojik açıdan uygun olup olmadığının tespit edilmesi için koliformlar oldukça önemlidir. *Escherichia coli* dışkıda en yaygın bulunan koliform olması dolayısıyla halk sağlığının korunması açısından en güvenilir indikatör olarak görülmektedir (6, 7). Bu mikroorganizmaların varlığının gösterilmesi sularda atıkların karışması sonucu oluşan dışkı kontaminasyonunun tespit edilmesi için çok uygun bir yöntem olarak bilinmektedir (7).

#### **2.4. *Escherichia coli***

İlk kez Escherich tarafından yeni doğanların dışkisından izole edilerek tanımlanmış ve *Bacterium coli commune* olarak adlandırılmış olan *Escherichia coli* memelilerin normal barsak florasının üyesidir. (8, 62).

Enterobacteriaceae grubunun tipik bir üyesi olan *E. coli*, Gram negatif, çomak şeklinde, fakültatif anaerop bir bakteridir. Adi besiyerlerinde kolayca ürer. Diğer birçok karbon içeren maddelerde kullanılabilirken en çok tercih edilen glukozdur. Optimum üreme sıcaklığı 37°C ve pH 7-7,2 dir. *E. coli* suşlarının çoğu taşıdıkları laktozu glukoz ve galaktoza ayıran  $\beta$ -galaktosidaz enzimi ile laktozu ayrıca D- mannitol, D- sorbitol, L- arabinoz, L- ramnoz, maltoz, D- ksiloz, trehaloz, D- mannozu fermente eder. Katalaz, metil kırmızısı, lizin dekarboksilaz reaksiyonları pozitifdir; suşların çoğu ornitini

ve/veya arjinini dekarboksile eder. Oksidaz, Voges-Proskauer, fenilalanin deaminaz, lipaz, 25 °C de DNaz aktiviteleri negatiftir. Triptofandan indol oluşturur. H<sub>2</sub>S, üreaz oluşturmaz. Tek karbon kaynağı olarak sitratta üremez. Jelatini hidrolize etmez. (5, 8).

*E. coli* suşları yüzeylelerinde taşıdıkları lipopolisakkarit (LPS) veya somatik (O), kirpik (H) ve kapsül (K) antijenlerine göre serogruplandırılırlar. Şimdiye kadar 180'den fazla O grubu, 60'a yakın H grubu ve 90 K grubu bildirilmiştir. Serogruplandırmada öncelikle O ve H antijenleri kullanılmaktadır. Suşa ait O ve H antijenlerinin kombinasyonu serogrubu tanımlar (5, 63). Ayrıca plazmit profillerine, kolisin tiplerine, enzim polimorfizmlerine, bakteriyofajlara duyarlılıklarına göre tiplendirilmeleri mümkündür (63).

Farklı infeksiyonlardan etken olarak izole edilen *E. coli* suşlarının çeşitli antibiyotiklere duyarlılık oranları surveyans çalışmaları ile belirlenmiştir. Diyareli çocuk hastalardan izole edilen *E. coli* suşlarının, ampisilin ve tetrasikline direnç oranları yüksek bulunmuş; kloramfenikol ve kinolonlara direnç oranları değişkenlik göstermiştir (64, 65). Chomvarin ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada hazır gıda ürünlerinden izole edilen EPEC suşlarının yaklaşık %50'sinin en azından bir antibiyotiğe dirençli olduğu ve ampisilin (%76), tetrasiklin (%70), ko-trimoksazol (%69) ve nalidiksik aside (%44) yüksek oranda dirençli oldukları saptanmıştır (66).

İdrar yolu infeksiyonu (İYİ) etkeni olan *E. coli* suşlarının, ampisilin, ko-trimoksazol ve trimetoprim antibiyotiklerine direnç oranları yüksek bulunurken; nitrofurantoin ve siprofloksasin direnç oranları çok düşük olarak bildirilmiştir (67, 68). Ancak bu çalışmaların aksine Akram ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptığı çalışmada, semptomatik İYİ etkeni olan *E. coli* suşlarının %34,42'sinin GSBL ürettiği saptanmıştır. Ayrıca *E. coli* suşlarının yarısından fazlasının (%55-85) ikinci (sefoksitin), üçüncü ve dördüncü (sefepim) kuşak sefalosporinlere, %51-73'ünün aminoglikozidlere, %69'unun norfloksasine ve siprofloksasine, %80'inin nitrofurantoine ve %76'sının da ko-trimoksazole dirençli olduğu bulunmuştur (69).

Birçok Gram negatif bakteri cinsi doğal olarak kromozomda kodlanan beta laktamaz enzimini taşımaktadır. Bu enzimlerin, penisilin bağlayan proteinlerden evrimleştiği ve bu gelişmenin doğada bulunan mikroorganizmaların beta laktam üretmesi ve seçici baskı oluşturmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (70). *E. coli* suşlarında ilk beta laktamaz enzimi penisilinin tedavide kullanılmaya başlanmasından önce tanımlanmıştır (70).

Gram negatif bakterilerde plazmitte kodlanan beta laktamaz (TEM-1) enzimi ilk kez kan kültüründen izole edilen bir *E. coli* suşunda bulunmuştur (70). Plazmitte ve transpozonda kodlanması TEM-1 enziminin diğer bakteri türlerine geçişini kolaylaştırmıştır. İlk izolasyonunu takiben birkaç yıl içerisinde TEM-1 beta laktamaz dünya çapında yaygınlaşmıştır. *K. pneumoniae* ve *E. coli* suşlarında yaygın olarak bulunan diğer plazmitte kodlanan beta laktamaz SHV-1 ve CTX-M enzimidir (70).

Çeşitli ülkelerde yapılan çalışmalarda farklı örneklerden izole edilen *E. coli* suşlarında bildirilen genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) oranları İran'da %67, İspanya'da %1, Asya Pasifik bölgesi ve Güney Afrika'da yapılan SENTRY çalışmasında ise %7 olarak bildirilmiştir. (71, 72, 73).

Çoğul antibiyotiklere dirençli *E. coli* suşları ile gelişen infeksiyonlar önemli halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Kommensal *E. coli* suşları, patojenik *E. coli* suşları için direnç genlerinin kaynağını oluşturmaktadır. Direnç genlerinin hayvanlardan insanda bulunan *E. coli* suşlarına ve kommensal suşlardan patojenik Enterobacteriaceae suşlarına yayılımı gösterilmiştir. Yiyeceklerin böyle bir transferdeki rolünün tam olarak ortaya konması için daha fazla araştırma gerekmektedir. (26). Daha fazlası su, toprak, mutfak havluları, yiyeceklerin kesik kenarları ve yüzeylerindeki bakterilerde direnç genlerinin aktarımı deneysel olarak gösterilmiştir (26, 34, 74).

#### **2.4.1. İnsanlarda Görülen *Escherichia coli* İnfeksiyonları**

En sık rastlanan hastane infeksiyonu etkenleri arasında da yer alan *E. coli* suşları özgün virülans faktörleriyle barsak infeksiyonlarında ve barsak dışı infeksiyonlarda etkindirler. Barsak dışı infeksiyon etkeni olan *E. coli* suşları ExPEC olarak (idrar yolu infeksiyonu, sepsis, menenjit) adlandırılırken, barsakta infeksiyon oluşturan *E. coli* suşları patojenite mekanizmalarına göre ayırt edilen 6 patogrup içinde yer alırlar. Bunlar: ETEC (enterotoksijenik *E. coli*), EPEC (enteropatojenik *E. coli*), EHEC (enterohemorajik *E. coli*), EAEC (enteroagregatif *E. coli*), DAEC (diffüz adherent *E. coli*) ve EIEC (enteroinvazif *E. coli*) olarak adlandırılmaktadır (1, 5).

Farklı patogrupların virülans özellikleri, bakteri ile konak hücre arasındaki etkileşimlerin özelliklerini de belirler. Hastalık oluşumunda doku tropizmi önemli rol oynar. Hemen hemen tüm patojen *E. coli* suşlarının belirli bir konağı kolonize etmesi adheranstan sorumlu fimbriyalar (pili-çoğul pilus) gibi yapılar ile sağlanmaktadır (62). Bazı suşlar, adhezyonun çevredeki epitel hücrelerini veya uzak konak hücrelerini etkilemek üzere sistemik olarak yayılan özel toksinler salgırlar. Bazı suşlar, konak

hücre yüzeyleri ile daha sıkı etkileşime girer ve bu etkileşim sonucunda hastalık ortaya çıkar. Bazı suşlar ise konak hücrelerine girer (invazyon) ve hücre içi patojen olarak yaşamını sürdürür veya konak bariyerlerine penetre olur ve insan konağın içinde sistemik olarak yaşar ki sonuçta sepsis oluşur (12).

Tüm bakterilerde olduğu gibi *E. coli* suşlarında da çeşitli virulans faktörlerini kodlayan genlerin ekspresyonu sıklıkla sıcaklık, iyon konsantrasyonu, osmolarite, demir seviyesi, pH, karbon kaynağı varlığı, üreme fazı ve oksijen seviyesi gibi bir çok çevresel etken tarafından modüle edilir. Bu sayede bakteri hücrelerinin belirli bir hücre dışı veya hücre içi nişi tanıyabilmesi ve buralardaki biyokimyasal ve fiziksel koşullara uyum sağlanmış olur (12).

Bu tezin konusunu oluşturan ve en sık rastlanan patogruplar EPEC, ETEC, EHEC suşlarıdır.

#### **2.4.2. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC) Suşları**

EPEC suşları infantlarda ve çocuklarda sulu diyare etkenidir (75, 76). EPEC terimi 1955'de Neter tarafından önerilmiştir ve 1987'de DSÖ 12 *E. coli* serogrubunu (O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O128, O142, O158) EPEC olarak kabul etmiştir. Bu *E. coli* suşları barsak epiteline adhere olur ve hayvan modellerinde ve hasta insanlarda karakteristik histopatolojik lezyonlara yol açar (77).

##### **2.4.2.1. Epidemiyoloji**

EPEC ilk olarak İngiltere ve ABD'de yeni doğan diyare salgınlarında tanımlanmıştır. Olguların çoğu yaşamın ilk iki yılında görülür. Gelişmiş ülkelerde yeni doğan bakım evlerinde epidemiler oluşur. Gelişmekte olan ülkelere ise sporadik infant diyarelerinin insidansı yüksektir (63, 78).

EPEC infeksiyonlarının neden yaşamın ilk iki yılında ortaya çıktığı henüz netlik kazanmamıştır. Büyük çocuklarda ve erişkinlerde, gelişen bağışıklık ve özgül adhezinlerin kaybı ile bu infeksiyonlara direnç gelişmektedir (20). Günümüzde EPEC infeksiyonlarının sıklığı sanayileşmiş ülkelere düşmüş olsa da halen rastlanmaktadır. Buna zıt olarak gelişmekte olan ülkelerin çoğunda infantlarda görülen bakteri etkenli diyarelerin en sık etkenidir (20, 62). EPEC infeksiyonları mevsimsel farklılık gösterir ve sıcak mevsimlerde pik yapar. EPEC suşları gelişmekte olan ülkelere bazı durumlarda kalıcı diyare olguları ile ilişkili bulunmuştur (63).



Sığırlardan izole edilen SLT negatif, *eae* pozitif suşların atipik EPEC olarak tanımlanması gerektiği bildirilmiştir (20). Tipik EPEC suşlarının kanıtlanmış bir hayvan rezervuarı bulunmamaktadır, dolayısıyla insanların tek canlı rezervuar olduğu düşünülmektedir (35). Bu suşların bulaşması, infekte kişilerin dışkılarıyla kontamine olmuş besinler ve sularla gerçekleşir (47). Ancak atipik EPEC suşları farklı hayvan türlerinden izole edilmiştir (35). Örneğin O26:H11 serogrubunun sığırlarla ilişkisi kesinleşmiştir (20, 63).

#### 2.4.2.2. Patogenez

EPEC suşlarının virulans faktörleri:

- Küme oluşturan pilus (BFP-Bundle forming pilus),
- Hücre dışı membran proteini intimin,
- Konak hücrede intimin reseptörü olarak görev yapan Tir (Transloke intimin reseptörü) proteini,
- Bakteri tarafından sentezlenen Tir proteininin konak hücre membranına aktarılmasından sorumlu Tip üç sekresyon sistemi (TÜSS),
- Esp sekretuar proteinleri olarak belirlenmektedir (20, 75, 76, 79).

1970'lerin sonu 1980'lerin başında EPEC suşlarının ince ve kalın barsağa adhere olarak A/E lezyonlarına yol açabildikleri birçok çalışmada gösterilmiştir (62). İnfekte olan barsak dokusunda elektron mikroskobu ile yapılan görüntülemelerde mikrovillusların fırça kenarlarında lokalize yıkım, enterositlerin apikal membranlarında bakterilerin kuvvetli tutunması, adhere olan bakterilerin altındaki apikal sitoplazmada hücre iskeleti filamentlerinde yoğun plaka oluşumu gözlenmiştir (63, 75, 79). Diğer *E. coli* suşlarından farklı olarak EPEC suşları in vitro olarak da epitel hücrelerine adhere olabilmektedir (62).

Doku kültürü hücrelerinde EPEC suşlarının neden olduğu lokalize adhezyon (LA) ve A/E aktivitesi yüksek moleküler ağırlıkta (60 MDa, ~ 92 kb) EPEC adhezyon faktörü (EAF) olarak adlandırılan bir plazmitte bulunan *bfp* gen kaseti ve kromozomal genlerde kodlanır (75, 76, 79). EAF plazmidinin EPEC patogenezinde iki önemli fonksiyondan dolayı önemli olduğu düşünülmektedir. Bu plazmitte bulunan genler A/E aktivitesini kodlayan kromozomal genlerin ekspresyonunu arttırmaktadır. Ayrıca

LA'dan ve EPEC suşlarının in vivo fırça kenar adhezyonundan sorumlu küme oluşturan (Bundle forming pilus-BFP) adhezini EAF plazmitinde kodlanmaktadır (20, 63).

Bakterinin kromozomunda yer alan ~ 35 kb boyutunda enterosit yıkımı patjenite adası lokusunda (LEE PAI-locus of enterosit effacement) intimin, tip üç sekrsyon sistemi (TÜSS), sekretuar proteinler (Esp) ve transloke intimin reseptörünü (Tir) kodlayan genler bulunmaktadır (20, 79, 80).

*eaeA* gen ürünü olan 94kDa ağırlığında bir dış membran proteini olan intiminin konak epitel hücrelerindeki intimin reseptörlerine bağlanarak epitel hücre adhezyonu ve hücre iskeleti organizasyonunda görev yaptığı bilinmektedir (62). Bu proteinin N-terminal bölgesi bakterinin dış membranında yer alır ve yüksek oranda korunmuştur. Reseptör tanıma bölgesi olan C-terminal kısmı ise değişkendir. İntimin reseptörünün bir konak hücre membran proteini olduğu düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarla bu reseptörün LEE' de yer alan genlerde kodlanan Tir olarak adlandırılan bir ürün olduğu gösterilmiştir. Tir, konak hücreye TÜSS ile aktarıldıktan (81) sonra membrana geçişinin sağlanması için fosforlanmaktadır (62, 81, 82).

Daha önceki satırlarda bahsedildiği gibi EPEC suşları, patogeneizde önemli rol oynayan EAF plamitinin bulunup bulunmamasına göre tipik ve atipik EPEC suşları olarak iki gruba ayrılmaktadır (20, 77, 78). Tipik EPEC suşlarının gelişmekte olan ülkelerde gelişmiş ülkelere göre daha sık saptandığı, atipik suşlarda ise bu durumun tersinin geçerli olduğu bildirilmektedir (83). Ancak son dönemde yapılan çalışmalar her iki bölgede atipik EPEC suşlarının daha yaygın olduğunu göstermiştir (78). Bazı çalışmalar, atipik EPEC suşları ile gelişen infeksiyonların daha ılımlı, fazla su kaybının ve inflamasyonun görülmediği bir diyareye yol açtığı ve bu patojenler infekte hastalarda görülen diyarenin daha uzun süreli olduğu bildirilmiştir (83, 84).

### **2.4.3. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) Suşları**

Az gelişmiş ülkelerdeki infant ve iki yaş altındaki çocuklarda, sanayileşmiş ülkelerde yaşayan ama az gelişmiş ülkelere seyahat eden kişilerde ve domuzlar, kuzular ve sığırlar gibi yeni doğan hayvanlarda en önemli diyare etkenlerindendir (21).

#### **2.4.3.1. Epidemiyoloji**

Turist diyaresi etkenleri arasında *E. coli* suşları en sık izole edilen mikroorganizmalardır. Bunlar arasında özellikle ETEC ön plana çıkar (85). Turist

diyaresi, hijyenik sanayileşmiş ülkelerden daha az gelişmiş bölgelere seyahat eden kişilerde görülen akut diyareli hastalıktır (85); prevalansı sanitasyon koşullarına ve coğrafik dağılımına göre %13-60 arasında değişkenlik gösterir. Sanayileşmiş ülkelerde ETEC suşları, infantlarda veya çocuklarda nadiren diyareye yol açar (63).

Asemptomatik çocuklardan ETEC izolasyon oranlarının %0-20 arasında değiştiği bunun yanı sıra bu oranları diyareli çocuklar ile kıyaslandığında daha düşük olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (21). ETEC infeksiyonlarının insidansı gelişmekte olan ülkelerde beş yaşından sonra (5-15 yaş) düşüş göstermekte ancak 15 yaşın üstünde yine yükselmektedir; ETEC hastalıklarının %25'i yetişkinlerde görülür. ETEC ilişkili diyarelerin ve asemptomatik infeksiyonların sıcak periyotlarda daha sık görüldüğü çeşitli çalışmalarla bildirilmiştir (21, 86, 87).

ETEC ile ilişkili diyareler, sanitasyon koşullarının uygun olmadığı koşullarda kontamine besin ve sularla bulaşır. İnsandan insana bulaşma yaygın değildir (88). Gelişmekte olan ülkelerde, yüzey sularının bu bakterileri barındırdığı ve yıkanma ve/veya yiyecek hazırlanması için kullanılması sonucunda bulaştığı bilinmektedir. Yapılan araştırmalar kişisel hijyen, eğitim ve genel yaşam koşullarının zayıf olduğu toplumlarda infeksiyonun aile bireyleri arasında da yayılabildiğini göstermiştir (88, 89).

ETEC suşlarının hayvanlarda da şiddetli diyare oluşturduğu gösterilmiştir. Hayvanlardan izole edilen ETEC suşlarının da insanlardan izole edilen suşlara benzer olarak enterotoksinler ve türe özgü kolonizasyon faktörleri ürettiği bilinmektedir. Bu adhezinlerin özgüllüğünden dolayı hayvanlarda bulunan ETEC suşlarının normal koşullarda insanları infekte etmeyeceği düşünülmektedir (21).

#### **2.4.3.2. Patogenez**

ETEC suşları, ince barsak lümenini kolonize eden adhezinler ve diyare oluşumundan sorumlu sıcaklığa duyarlı (labil toksin-LT) ve sıcaklığa dirençli (stabil toksin-ST) enterotoksinleri üretirler (21, 22). *E. coli* suşlarına özgü enterotoksinler ilk olarak 1960'ların sonlarında Calcutta'da tanımlanmıştır (21). ETEC suşlarının yaklaşık %30'u termolabil toksin (LT), %35'i termostabil toksin (ST), diğerleri ise her ikisini de eksprese ederler (12, 21).

LT, yapı, fonksiyon ve aktivasyon mekanizması açısından kolera toksine benzeyen yüksek moleküler ağırlıkta (84 kDa), 25kDa'luk bir A alt birimi ve her biri 11

kDa ağırlığında olan beş B alt biriminden oluşan AB<sub>5</sub> yapısında periplazmik bir protein olup, esas toksin etkisini A alt birimi gerçekleştirir (22).

LT, B alt birim pentameri ise toksinin konak hücreye bağlanmasından sorumlu olup, hücre membranındaki glikosid GM<sub>1</sub>'in laktoz taşıyan oligosakkarit bölgesine bağlanır (12). Bağlanma multivalent olarak gerçekleşir. Yani her molekül beş GM<sub>1</sub> molekülüne bağlanabilme yeteneğindedir. (63).

LT, adenosin-difosfo-ribosil transferaz aktivitesi olarak bilinen kolera toksini ile aynı enzimatik fonksiyonu gerçekleştirir. LT, NAD'den bir ADP-ribozu ayırır. ADP ribozilasyonu ortamda cAMP artışına sebep olur (12, 22). Villuslardaki hücrelerden Na<sup>+</sup> ve Cl<sup>-</sup> absorpsiyonu sağlanamaz. Elektrolitleri izleyerek ozmotik basınç sonucunda su kaybı gerçekleşir ve sonuçta sulu diyare oluşur (12, 21).

LT'i kodlayan genler plazmitler üzerinde yer alır ancak kromozomdaki bazı genler plazmitte kodlanan genlerin ekspresyon seviyesini etkileyebilir. Ayrıca bakterinin üremesinde değişiklik olmadan ortamda bulunan 10<sup>-6</sup>M veya 10<sup>-5</sup>M çinko konsantrasyonu LT üretimini önemli oranda arttırır. Linkomisin ve tetrasiklinin üreme ortamında varlığında hücre dışına salınan LT miktarında artış görülür (63). LT kodlayan plazmitlerin ayrıca antibakteriyel ilaçlara direnç genlerini de taşıdıkları gösterilmiştir (90)

ST, enterik patojenlerin çoğunda bulunan düşük molekül ağırlıklı, antijenik olmayan, enterotoksinlerdir (21). İki farklı ST tipi olduğu belirlendikten sonra bu toksinler STa ve STb olarak adlandırılmış, 1980'de ise STa ve STb'ine sinonim olarak STI ve STII terimleri kullanılmaya başlanmıştır. 1983 yılında STI'in iki tipi olduğu belirlenmiş ve STIa (18 aminoasit içerir) ve STIb (19 aminoasit içerir) olarak adlandırılmıştır (63). Başka araştırmacılar tarafından izole edildikleri canlılara göre STp (domuz) ve STh (insan) olarak adlandırılan, mekanizmaları aynı olan iki varyantının bulunduğu bildirilmektedir (21).

ST, geri dönüşümlü olarak guanilat siklaza bağlanarak cGMP seviyesinin artışına yol açmaktadır. LT'de olduğu gibi kript hücrelerinde klor sekresyonu artar ve sodyum klorür absorpsiyonunun inhibisyonu ile diyare ortaya çıkar. Bunun yanı sıra ST, hücre içi kalsiyum seviyesini arttırma yoluyla hücre proliferasyonu kontrolünde de rol oynar. ST'i kodlayan genler de plazmitlerde yer alır (21, 22).

#### 2.4.4. Enterohemorajik *E. coli* (EHEC) Suşları

Vero toksin (VT) olarak da adlandırılan Shiga benzeri toksin (SLT-Stx) üreten *E. coli* suşları epidemik ve endemik diyare, hemorajik kolit ve hemolitik üremik sendrom (HUS) ile ilişkilendirilmiştir. (17, 89, 91). Bazı araştırmacılar tarafından insanlarda diyare etkeni olan STEC (VTEC) suşları için EHEC teriminin kullanılması önerilmişse de (18, 92) bu adlandırmalar birbirleri yerine kullanılmaktadır. Son dönemlerde tüm dünyada görülen gıda kaynaklı salgınlar da, önemi gitgide artan bu bakteriye dikkat çekilmektedir (18).

##### 2.4.4.1. Epidemiyoloji

EHEC suşları, bir insan patojeni olarak ilk defa 1982'de az pişmiş kıyma ile ilişkili ortaya çıkan iki hemorajik kolit salgını sonucunda tanımlanmıştır (13). O zamandan günümüze kadar çeşitli hayvanlardan, gıdalardan ve çevreden 200'den fazla STEC serotipi tanımlanmıştır (93). EHEC O157:H7 insanlarda görülen hastalıklarda en sık izole edilen serotiptir. Patojen olarak ilk tanımlanmasının ardından düşük infeksiyöz dozu (<100 hücre) ve şiddetli hastalık semptomları ile en önemli gıda kaynaklı patojenlerden biri olmuştur (13).

EHEC infeksiyonlarının epidemiyolojisi üzerine yapılan çalışmaların çoğu ölümcül HUS olguları ile ilişkili olarak hem pediatrik hem de yetişkin popülasyonda görülen salgınlarla ilişkilidir. Salgınlarda EHEC kolitlerine eşlik edilen HUS olgularının sıklığı %15-20 oranlarında değişkenlik gösterir. (13, 94). Hastalarda bu komplikasyonların oluşmasına yol açan predizpozan faktörler bilinmemektedir. Ekstrem yaşlar önceden yaşanan gastrektomi, antibiyotik kullanımı, ateş, lökositoz gibi etkenlerin HUS gelişimde rol oynadığı bildirilmektedir (63).

Sığır ve diğer otçul hayvanların *E. coli* O157:H7 için en önemli rezervuar oldukları bilinmektedir; bunun yanı sıra köpekler, atlar, domuzlar, kediler gibi diğer birçok hayvandan da izole edilmiştir. Ayrıca non-O157 serogrupları da koyun ve keçilerde daha sık olmakla birlikte domuz, kedi ve köpek gibi hayvanların dışkılarından izole edilmektedir (13). Et ürünlerinin EHEC serotipleri ile mezbahada işlenmesi sırasında kontamine olması, bu patojenlerin insana bulaşması açısından birincil öneme sahiptir. *E. coli* O157:H7 infeksiyonları ile gelişen salgınların çoğu az pişmiş kıyma ve sığır kaynaklı diğer besinler (biftek, salam) ile ilişkilendirilmiştir (14). Bunun yanı sıra pastörize veya pastörize olmayan süt, yoğurt, marul ve diğer yeşil sebzeler, pastörize

olmayan elma suyu veya püresi, kavun, patates gibi birçok yiyecek, *E. coli* O157:H7 suşunun etken olduğu hastalıklarda kaynak olarak belirlenmiştir (13).

EHEC suşları ayrıca sularla ve infekte insanlardan da bulaşabilir (13) ve bu bakterilerin sulardaki varlığı üzerine çok araştırma yapılmıştır. *E. coli* O157:H7 işlenmemiş yüzey sularından izole edilmiştir ve sularda özellikle soğukta (5<sup>0</sup>C'de) 12 hafta boyunca canlı kalabilmektedir. Aquatik ortamlarda besinler için yarışma ve diğer mikroorganizmaların antagonistik etkileri *E. coli* O157:H7 suşlarının canlılığını etkilese de organizmanın canlı kalmak için minimum seviyede besinlere gereksinimi vardır (36, 95).

1982-1994 yılları arasında ABD'de *E. coli* O157:H7'nin etken olduğu dört su kaynaklı salgın bildirilmiştir. Bunların ikisi yüzme suyu, ikisi içme suyu ile ilişkili olarak gelişmiştir. Salgın araştırması sonucunda göl suyunun yutulması risk faktörü olarak belirlenmiştir. Illinois'te son dönemde görülen salgında aşları 2-12 arasında değişen 12 çocuğu etkileyen bir salgın bildirilmiştir. Su kaynaklı *E. coli* O157:H7 infeksiyonları dünyada diğer bölgelerinden de bildirilmiştir. İskoçya'da ve Güney Afrika'da ki salgınlarda sığır dışkısı ile kontamine olması muhtemel içme suyu sorumlu tutulmuştur. Japonya'da kontamine kuyu suyu ile ilişkili bir salgın bulunmuştur (63). Dolayısı ile genellikle gelişmiş ülkelerde problem olarak görülse de son zamanlarda gelişmekte olan ülkelere de izole edilmesi bu bölgelerde de önemli olduğunu göstermektedir. Non O157 EHEC suşları da su ile bulaşabilmektedir ve daha detaylı inceleme gerekmektedir (47, 96).

EHEC suşlarının önemli fizyolojik özelliklerinden olan asit toleransının da gıda kaynaklı hastalıklarda kilit rol oynadığı düşünülmektedir. EHEC suşlarının asit toleransı patojenleri inaktive eden asidik koşullarda olan yiyeceklerde canlı kalmasını artırır ve asiditesi düşük bir yiyeceğin infeksiyon kaynağı olduğu durumlarda infeksiyöz dozu düşürmektedir (97). Örneğin bu bakteriler, pH 2,5 tan düşük ortamlarda iki saatten fazla canlılığını sürdürebilmektedir.

Yüksek oranlarda *E. coli* O157:H7, mayoneze (pH:3,6-3,9) inoküle edildiğinde 50<sup>0</sup>C'de 5-7 hafta ve 20<sup>0</sup>C'de 1-3 hafta boyunca; ayrıca elma püresinde (pH: 3,6-4) 8<sup>0</sup>C'de 31 güne kadar canlı kalmıştır. Yoğurtlarla ilgili yapılan bir çalışmada organizmanın fermentasyon işlemi 42<sup>0</sup>C'de 5 saat ve depolama sürecinde 4<sup>0</sup>C'de 1 hafta canlı kaldığı bildirilmiştir. *E. coli* O157:H7 suşunun ekstrem tuz

konsantrasyonlarına toleransı olmadığı bilinmektedir; Triptik Soy Buyyon besiyerinde ancak tuz oranı  $< \%6,5$  olduğunda üreyebilir (63).

#### 2.4.4.2. Patogenez

EHEC suşlarında patogenezden sorumlu olduğu belirlenen en önemli virülans faktörleri:

- Shiga benzeri toksin 1 ve 2 (SLT-1, SLT-2),
- Konak hücreye bağlanmadan sorumlu, dış membran proteini intimin,
- İntiminin konak hücreye bağlanmasından sorumlu reseptörü olan Tir proteini,
- Bakteri tarafından salgılanan Tir proteininin konak hücreye aktarımından sorumlu TÜSS (12, 17, 18) olarak belirlenmiştir .

SLT terimi, ilk olarak 1977’de literatüre geçmiş ve Vero hücreleri (Afrika yeşil maymun böbrek hücreleri) için toksik anlamında kullanılmıştır. Bu *E. coli* sitotoksini Shiga toksin ile ortak bir çok özelliklere sahiptir; HeLa hücrelerinde protein sentezini inhibe etmesi ve fareler için letal özellikte olmasından dolayı Shiga-benzeri toksin (SLT) olarak adlandırılmıştır (63).

Serolojik olarak farklı iki SLT serogrubu (SLT-1, SLT-2) tanımlanmıştır. Verotoksinler, A-B alt birimlerinden oluşur. Tüm VT’ler ortalama 33 kDa bir A alt birimi ve her biri yaklaşık 7,5 kDa olan beş B alt biriminden (AB<sub>5</sub>) oluşur. A alt birimi biyolojik aktiviteden sorumlu moleküldür. Proteoliz sonucunda büyük N-terminal A<sub>1</sub> (enzimatik aktiviteyi gerçekleştiren) ve C-terminal A<sub>2</sub> fragmentlerine ayrılır. Toksinin B alt birimi konak hücre membranında ki glikoreseptörlere (globotriasil seramid-Gb<sub>3</sub>) bağlanmadan sorumludur. Toksinin hücre içine alınması reseptör aracılı endositoz ile gerçekleşmektedir (12).

SLT’ ler ökaryotik hücrelerde RNA N-glikosidaz aktivitesi sonucunda protein sentezini inhibe eder. Toksin 60 S ribozomal alt birimlerinden 28 S ribozomal RNA’ya bağlı özgül bir N-glikosid bağımlı amino açıl – tRNA’nın ribozomlara bağlanmasını önler. Elongasyon faktör-1 bağımlı amino açıl – tRNA’nın ribozomlara bağlanmasını önler. Mekanizması bir bitki toksini olan risin ile aynıdır (12).

VT1 ve VT2 kodlayan genler ılımlı bakteriyofajlarda (profaj) taşınır. VT2e kodlayan genler ise kromozomda kodlanmaktadır; başka bir *E. coli* suşuna aktarılabilir. (12, 63).

Gonotobiyotik domuzlar, infant tavşanlar, tavuklar gibi birçok hayvanda ve ayrıca in vitro memeli hücre kültürü modellerinde EHEC suşlarının yapışma ve bozma (A/E) aktivitesi gösterilmiştir. İnce barsağın proksimal kısmını ve kalın barsağı kolonize eden EPEC suşlarının aksine EHEC suşları kolon ve terminal ileumdaki yüzey ve glandüler epitel hücrelerinde tipik lezyonlar oluştururlar (63).

A/E histopatogenitesinden sorumlu olan bakteri genleri kromozomunda lokalizedir. İntimin kodlayan *eae* geni ve intimin reseptörü kodlayan *tir* geni, epitel hücre sinyal transdüksiyonu indükleyen salgısal proteinleri kodlayan *esp* genleri, Tip 3 sekresyon sistemini kodlayan *esc* (*sep*) genleri enterosit yıkımı patjenite adası lokusunda (LEE) lokusunda yer alır. EPEC suşlarında görülen LEE G+C oranı (%38) bakteri kromozomundan farklılık gösterdiğinden (%51) patjenite adasının başka bir bakteri türünden horizontal geçiş yaptığı düşünülmektedir. (98, 99).

Ayrıca, EHEC suşlarında, 60 MDa pO157 plazmidi bulunmaktadır. Bu plazmit tarafından hemolizin (HlyA), katalaz peroksidaz (Kat P), bir serin proteaz (Esp P) ve bir Tip 2 sekresyon sistemi gibi çeşitli potansiyel virülans faktörleri kodlanmaktadır (12).

Bu bilgilerden yola çıkarak bu tez çalışmasında kullanma ve içme sularında bulunan halk sağlığı açısından risk teşkil etmesi muhtemel *E. coli* patogruplarının varlığının araştırılması ve antibiyotiklere duyarlılıklarının saptanması amaçlanmıştır. Ayrıca, bu incelemeler sırasında *E. coli* suşları ile birlikte izole edilen diğer dışkı kaynaklı koliformlar (*Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Citrobacter spp.*) ve *Pseudomonas aeruginosa* gibi potansiyel patojen suşlar da göz ardı edilmemiş ve identifikasyonlarını izleyerek antibiyotiklere duyarlılıkları açısından incelenmişlerdir.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında hastanelerdeki şehir şebeke (musluk) suları ve su kesintisinin yaşandığı durumlarda kullanılmak üzere belirli süreler şehir şebeke sularının bekletildiği depolardan toplanan sular ile ticari olarak satılan doğal kaynak içme sularında halk sağlığı açısından risk teşkil etmesi muhtemel EHEC, ETEC ve EPEC suşlarının varlığının ve antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılması planlanmıştır.

#### 3.1. Örneklerin Toplanması

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanelerinin çeşitli servislerinin musluk, duş başlıkları ve depoları ile İstanbul civarında ticari olarak satılmakta olan damacana (19 lt'lik) içme sularından en az 300 ml olmak üzere steril şartlarda su örnekleri toplanmıştır.

İstanbul'da satılan farklı firmalara ait damacana sularından toplam 50 örnek değerlendirilmiş; hastanelerden alınan kullanma sularının dağılımı ise Tablo 3-1'de gösterilmiştir. Bu tabloda hemşire ve doktorlara ait dinlenme odaları, personel ve hastalara ait servislerde bulunan ortak tuvalet ve banyolar, mutfak, pansuman odaları, hemşire bankolarının muslukları gibi bölümler ortak kullanım alanları olarak belirtilmiştir.

**Tablo 3-1: Hastanelerden alınan su örneklerinin dağılımı.**

	İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi			Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi		
	Depolar	Musluk (direkt şehir şebeke suyu)		Depolar	Musluk (direkt şehir şebeke suyu)	
		Hasta odaları	Ortak kullanım alanları		Hasta odaları	Ortak kullanım alanları
<b>Örnek Sayısı</b>	<b>6*</b>	<b>29</b>	<b>37</b>	<b>3</b>	<b>17</b>	<b>42</b>

\*Bu depolardan biri İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine aittir.

İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesinden 72, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi hastanesinden ise 62 örnek toplanmıştır.

- Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesine ait üç deponun su dağıtımını yaptığı bölümler:
  - Ortopedi, Acil Servis binaları
  - Kadın Doğum binası ve Çocuk Hastalıkları binası
  - Temel Bilimler binası, Dahiliye Binası ve Genel Cerrahi binasıdır.
- İstanbul Tıp Fakültesi'ne ait altı deponun su dağıtımını yaptığı bölümler:
  - Temel Bilimler binası
  - Dekanlık binası
  - Ortopedi binası
  - Acil Dahiliye binası
  - Göz Hastalıkları binası
  - Diş Hekimliği Fakültesi'dir.

İstanbul Tıp Fakültesi (12 farklı servis) ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesinin (19 farklı servis) musluklarından toplanan şehir şebeke suyu örneklerine ait dağılımı Tablo 3-2'de ve Tablo 3-3'de gösterilmiştir.

**Tablo 3-2: İstanbul Tıp Fakültesi'nden toplanan 66 direkt şehir şebeke (musluk) suyu örneğinin dağılımı.**

Servisler	Hasta Odaları	Ortak kullanım alanları
Yanık Servisi	3	3
Genel Cerrahi Özel Servis	4	2
Çocuk Cerrahisi Servisi	2	3
Göğüs Cerrahisi Servisi	2	4
Üroloji Servisi	2	4
Reanimasyon Servisi	2	4
Göğüs Hastalıkları Servisi	1	3
Tüberküloz Servisi	-	3
Endokrinoloji Servisi	4	2
Romatoloji Servisi	3	3
Gastroenterohepatoloji Servisi	3	3
Göz Hastalıkları Servisi	3	3
<b>Toplam</b>	<b>29</b>	<b>37</b>

**Tablo 3-3: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi'nden toplanan 59 direkt şehir şebeke (musluk) suyu örneğinin dağılımı.**

Servisler	Hasta Odaları	Ortak kullanım alanları
Acil Dahiliye Servisi	1	4
Ameliyathaneler	-	6
Topuzlu Servisi	1	2
Gorbon Servisi	2	1
Gürkan Servisi	1	2
Kardiyoloji Servisi	-	3
Gastroenteroloji Servisi	2	1
Nefroloji Servisi	1	1
Kadın Doğum Servisi	-	4
Acil Cerrahi Servisi	1	1
Göğüs Hastalıkları Servisi	1	2
Radyasyon Onkolojisi	2	1
Fizik Tedavi Rehabilitasyon	1	2
Nöroloji Servisi	-	2
Üroloji Servisi	1	2
Kulak Burun Boğaz Servisi	1	1
Dermatoloji Servisi	1	2
Psikiyatri Servisi	-	3
Çocuk Hastalıkları Binası	1	2
<b>Toplam</b>	<b>17</b>	<b>42</b>

Tüm su örnekleri otoklavda 121<sup>0</sup>C'de 15 dakika steril edilen metal kapaklı cam şişelere alınmış ve aynı gün içinde İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD. laboratuvarına getirilmiş ve bakteriyolojik açıdan incelemeye alınmıştır.

### 3.2. Bakterilerin İzolasyonu

Toplanan su örnekleri Sartorius Stedim Biotech (Goettingen, Almanya) marka 0,45 µm'lik por çaplı steril membran filtreler kullanılarak filtrasyon işlemine tabi tutulmuştur. Bunun için laboratuvarımızda bulunan cam su filtrasyon düzeneği (Millipore, Billerica, MA, ABD) kullanılmıştır. Literatürde belirtilen yöntemler uyarınca filtrasyonda kullanılan membranlar az sayıda bulunan bakterilerin atlanmaması için ön zenginleştirme işlemi uygulanarak ekim yapılmıştır. Bunun için üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanan ve steril edilen Mac Conkey Buyyon ve Triptik Soy Buyyon (TSB) besiyerleri kullanılmıştır.

Mac Conkey Buyyon ve TSB besiyerleri steril cam tüplere 10'ar ml olacak şekilde hazırlanmıştır. Filtrasyon işlemi tamamlandıktan sonra filtreler aseptik şartlarda steril petri kutularına alınmış ve steril pensler yardımıyla dört parçaya ayrılmıştır. Parçalanan bu filtreler eşit miktarlarda olacak şekilde her iki besiyerine konmuştur. Ekim yapılan buyyon besiyerleri 24 saat 37<sup>0</sup>C'de inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda bulanıklık oluşan tüplerden ölçülü özeler yardımıyla 10 µl hacimlerde alınarak azaltma yöntemi ile ikişer adet Mac Conkey Agar ve Triptik soy agar (TSA) besiyerlerine ekimler yapılmıştır. Bulanıklık oluşmayan tüplerin, 48 saat boyunca 37<sup>0</sup>C'de inkübasyonu devam etmiştir. Bu süre sonunda birer Mac Conkey Agar ve TSA besiyerine aynı yöntemle ekim yapılmış ve üreme olup olmadığı kontrol edilmiştir.

### 3.3. Bakterilerin İdentifikasyonu

Ekim yapılan Mac Conkey Agar ve TSA besiyerleri 24 saat 37<sup>0</sup>C'de inkübe edilmiş üreme olmayan besiyerleri 48. saate kadar inkübe edilmeye devam edilmiştir. Üreyen Gram negatif çomaklar biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri incelenerek identifiye edilmişlerdir.

Bu amaçla, suşların laktozu fermente etme özellikleri üç şekerli demirli (TSI) besiyerinde incelenmiştir. Laktozu fermente etmeyen kolonilerde oksidaz enzimi varlığı incelenmiştir. Oksidaz pozitif olan suşlar non-fermentatif olarak değerlendirilirken, oksidaz negatif olup şekerleri fermente eden suşlar Enterobacteriaceae ailesi üyesi olarak değerlendirilmiştir.

Enterobacteriaceae grubundan olduğu belirlendikten sonra suşların cins düzeyinde identifiye edilebilmesi için:

- Voges-Proskauer (VP) deneyi,
- Sitrati karbon kaynağı olarak kullanıp kullanmaması,
- Triptofandan indol oluşturma yeteneği,
- Hareketli olup olmaması,
- Ornitin dekarboksilaz (ODC) enzimi varlığı,
- H<sub>2</sub>S oluşturup oluşturmaması ve
- PYR enzimi varlığı incelemiştir (5).

Bunun için;

- Üç şekerli demirli (TSI),
- MIO (motility indol ornitin- hareket indol ornitin),
- Clark-Lubs ve
- Simon's sitrat besiyerleri üretici firma önerileri doğrultusunda hazırlanmış, steril edilerek kullanılmıştır.

İzole ve identifiye edilen tüm Gram negatif çomak morfolojisindeki suşlar antibiyotiklere duyarlılıkların saptanması ve *E. coli* suşlarında yapılacak PCR deneyleri için -20<sup>0</sup>C'de %15 oranında gliserol içeren Brucella besiyerinde saklanmıştır. Örneklerden izole edilen *E. coli* suşları virülans genlerinin saptama ihtimalini arttırmak için on farklı koloniden saf kültür olarak ekim yapılarak saklamaya alınmıştır. *E. coli* dışındaki diğer Gram negatif çomak bakteriler ise farklı antibiyotik direnç paternlerinin saptanabilmesi için her suştan iki farklı koloni olacak şekilde aynı yöntemlerle saklamaya alınmıştır.

### **3.3.1. Analytical Profile Index (API) (bioMerieux Marcy-L'Etoile, Fransa)**

#### **ID 32 GN panelinde yapılan deneyler**

- Bakterilerin panele dağıtımı:

Tüm bahsedilen biyokimyasal deneylerle *E. coli* olduğu belirlenen bakterilerin identifikasyonlarının doğrulanması için yapılan bu deneylerde suşların 24 saatlik kültürlerinden 0,5 Mc Farland bulanıklığında süspansiyonlar hazırlandıktan sonra bu süspansiyonlardan 200 µl Aux medium içine ekim yapılmıştır. Hazırlanan bu

süspansiyonlar kit panelinde yer alan her kuyucuğa 135 µl olacak şekilde ekilmiştir. Hazırlanan paneller 24 saat 37<sup>0</sup>C’de inkübe edilmiştir.

- Sonuçların değerlendirilmesi otomatize sistemde oluşan bulanıklıkların ölçülmesi ile sağlanmıştır.

### **3.4. Shiga-Benzeri Toksinlerin (Stx) Saptanması**

Suşların shiga toksin üretilip üretmedikleri enzim linked immun sorbent assay (ELISA) yöntemi ile çalışan hazır kit (Remel-ProSpecT Shiga Toxin *E. coli*) kullanılarak incelenmiştir. Kit, Shiga toksin I ve Shiga toksin II’yi birlikte saptamaya yönelik olarak hazırlanmıştır. Bu kitede kuyucuklar tavşandan elde edilen poliklonal anti stx-1 ve anti stx-2 ile kaplıdır. Toksin varlığı araştırılacak suşların saf kültürleri TSA besiyerinde hazırlanmış ve sonrasında Mac Conkey Buyyon besiyerine pasajları yapılmıştır. Bu besiyerleri 24 saat 37<sup>0</sup>C’de inkübe edildikten sonra elde edilen pasajlar üretici firma önerileri doğrultusunda incelenmiş ve değerlendirilmiştir (92).

### **3.5. *E. coli* Suşlarında Özgün Virülans Genlerinin Saptanması**

*E. coli* olarak tanımlanan tüm suşlar EHEC suşlarına özgü stx1, stx2, eaeA genleri, ETEC suşlarına özgü lt ve st genleri, EPEC suşlarına özgü eaeA ve bfp genleri açısından polimeraz zincir reaksiyonu yöntemi (PCR) ile incelenmiştir (19, 23, 100).

#### **3.5.1. Suşların DNA Ekstraksiyonu**

Daha önceden -20<sup>0</sup>C’de saklanmış olan *E. coli* suşlarından hazırlanan 24 saatlik taze kültürlerden pH: 7 fosfat tamponu ile hazırlanan süspansiyonlar kullanılmıştır. Ekstraksiyonların hazırlanması için hazır kit (Roche-high pure DNA extraction kit) üretici firma önerileri doğrultusunda kullanılmıştır.

#### **3.5.2. PCR Deneylerinde Kullanılan Primerler**

PCR deneylerinde kullanılan primerler Tablo 3-4’de belirtilmiştir (19, 23, 100).

**Tablo 3-4: PCR deneylerinde kullanılan primerlerin baz dizileri ve büyüklükleri.**

Gen	Primer dizisi (5'-3')	Amplikonun büyüklüğü
<i>stx-1</i>	F CTGCCGGACACATAGAAGGAAACT	267 bp
	R AGAGGGGATTCGTACAACACTGG	
<i>stx-2</i>	F GGAGTTCAGTGGTAATAACAATG	149 bp
	R GCGTCATCGTATACACAGG	
<i>Lt</i>	F TCTCTATGTGCATACGGAGC	322 bp
	R CCATACTGATTGCCGCAAT	
<i>St</i>	F CTTTCCCCTCTTTTAGTCAG	175 bp
	R TAACATGGAGCACAGGCAGG	
<i>eaeA</i>	F GAAGCCAAAGCGCACAAGACT	413 bp
	R CTCCGCGGTTTTAGCAGACAC	
<i>Bfp</i>	F TTCTTGGTGCTTGCGTGTCTTTT	367 bp
	R TTTTGTGTTGTATCTTTGTAA	

### 3.5.3. Hazırlanan PCR Reaktiflerinin Karışımı

PCR deneylerinde master miks kit (Roche) kullanılmıştır. Üretici firma önerileri doğrultusunda,

- 12,5 µl master miks,
- 2 µl DNA ekstraksiyonu,
- 2 µl her primerden (10 pmol konstrasyondan 1 µl)
- 8,5 µl nükleazsız su içeren reaksiyon tüpleri toplam hacim 25 µl olacak şekilde hazırlanmıştır.

### 3.5.4. PCR Amplifikasyon Koşulları

Her gen bölgesi için uygulanan PCR programları belirtilmiştir.

#### *stx-1:*

- 94 °C 1 dak., 48 °C 1 dak., 72 °C 1 dak.;

#### *stx-2:*

- 94 °C 1 dak., 45 °C 1 dak., 72 °C 1 dak.;

#### *eaeA:*

- 94 °C 1 dak., 44 °C 1 dak., 72 °C 1 dak.;

#### *lt1 ve st1:*

- 94 °C 1 dak., 49 °C 1 dak., 72 °C 1 dak.;
  - PCR programları 35 siklus olarak uygulanmıştır.
  - Her gen bölgesi için başlangıç denatürasyonu 94 °C 4 dak., final uzatma aşaması 72 °C 7 dak. olarak uygulanmıştır (23, 100).

#### *bfp:*

- 94°C 20 san., 55°C 20 san., 72°C 10 san.
  - Bu gen için PCR programları 30 siklus olarak uygulanmıştır.
  - Başlangıç denatürasyonu 96°C 4 dak., final uzatma aşaması 72°C 7 dak. olarak uygulanmıştır (19).

### 3.5.5. Amplikonların Görüntülenmesi:

Amplikonlar 0,5 mg/mL oranında hazırlanan %7 hacminde ethidyum bromid içeren %1,5 agaroz jelde UV ışık altında görüntülenmiştir.

### 3.5.6. Marker

Oluşan bantların büyüklüklerini görüntüleyebilmek için 100 bp'lik Roche marka 50-1000 bp arasında işaretli DNA ladder kullanılmıştır.

### 3.5.7. Kontrol Suşları

Çalışmamızda PCR deneylerinde kontrol suş olarak **EHEC ATCC 43894** (*stx-1*, *stx-2*, *eaeA* genleri pozitif) kullanılmıştır. Uluslararası biyogüvenlik koşulları gereğince deneylerimizde kullanmayı planladığımız ETEC ATCC 35401 (lt ve st genleri pozitif)



ve EPEC ATCC 43887 (*eaeA* ve *bfp* genleri pozitif) suşlarına çalışmalarımızı sürdürdüğümüz dönem boyunca ilgili araştırmacılardan veya üretici firmalardan ulaşılamamıştır. Dolayısı ile *lt*, *st* ve *bfp* genlerinin araştırıldığı PCR deneylerinde pozitif kontrolü sağlayabilmek için araştırılan bu üç genin amplifikasyon koşulları literatürde belirtildiği şekilde uygulanmış ve pozitif kontrol tüpünde *stx-1* genine ait primerler ve EHEC ATCC 43894 suşu kullanılmıştır. PCR deneylerinin tamamında, *stx-1* geninin uygulanan tüm amplifikasyon koşullarında sorunsuz olarak pozitif sonuç vermesine özellikle dikkat edilmiştir.

### **3.6. DNA Dizi Analizi Deneyleri**

PCR deneyleri sonucunda saptanan labil toksin geninin doğrulanması için DNA dizi analizi yapılmıştır. DNA dizi analizinde DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing (ABD) marka kit ve ABI PRISM 310 Genetic Analyzer cihazı (Applied Biosystems, ABD) kullanılmıştır.

### **3.7. Suşların Antibiyotiklere Duyarlılıkları**

#### **3.7.1. Disk Difüzyon Deneyleri**

İzole edilen tüm Gram negatif çomak suşların antibiyotiklere duyarlılıkları Clinical Laboratory and Standarts Institute (CLSI) (101) önerileri doğrultusunda disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. Deneylerde kullanılan antibiyotik diskleri: amikasin (30µg), gentamisin (10µg), piperasillin (100µg), ampisilin (10µg), amoksisilin/klavulonat (20/10µg), seftazidim (30µg), sefalotin (30µg), seftriakson (30µg), trimetoprim/sulfametoksazol (25µg), ciprofloksasin (5µg), kloramfenikol (30µg), tetrasiklin (30µg), sefoksitin (30µg), meropenem (10µg), imipenem (10µg), sefepim (30µg), piperasillin/ tazobaktam (100/10µg) olarak belirlenmiştir.

Çevre kaynaklı örnekler birçok farklı kaynağın yol açtığı kirliliğe maruz kalabilmektedirler. Dolayısı ile bu örneklerden elde edilen üremeleri saf kültür olarak düşünmek doğru bir yaklaşım olmamaktadır. Bu çalışmada da su örneklerinden izole edilen bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıkları incelenirken farklı direnç paternleri gösteren aynı türe ait farklı suşların saptanabilmesi amacıyla izole edilen tüm bakterilerin duyarlılık deneyleri, iki farklı koloniden üretilen saf kültürlerden yapılmıştır.

Duyarlılık deneylerinde ayrıca İBL (İndüklenebilir beta laktamaz) ve GSBL (Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz) üretimi de araştırılmıştır.

### **3.7.2. İBL Üretiminin Araştırılması**

Duyarlılık deneylerinde sefoksitin veya imipenem gibi güçlü bir beta-laktamaz indükleyicisinin yanına merkezden merkeze 2 cm uzaklıkta olacak şekilde aztreonam veya 3. kuşak bir sefalosporin (zayıf indükleyici) diski yerleştirilerek zayıf olanın inhibisyon zonunun güçlü indükleyici tarafından kesintiye uğratılmasına göre İBL varlığı gösterilmiştir. Zayıf indükleyici etrafındaki zonun güçlü indükleyici tarafındaki yarıçapının karşı taraf yarıçapına göre en az 4 mm küçülmüş olması pozitif sonuç olarak değerlendirilmiştir (102).

### **3.7.3. GSBL Üretiminin Araştırılması**

GSBL saptanması için ön tarama olarak duyarlılık deneylerinde seftazidim ve/veya aztreonam direnci ve sefoksitin duyarlılığının görülmesiyle GSBL varlığını düşündüren suşlarda GSBL varlığı çift disk sinerji deneyi ile doğrulanmıştır. Bu deneyin prensibi, bu enzimlerin klavulonik asit varlığında inhibe olma ve dolayısıyla zon çapında genişleme görülmesine dayanmaktadır. Çift disk sinerji deneyinde amoksisilin klavulonik asit (AMC) diskinin etrafına merkezden merkeze 2,5 cm uzaklıkta olacak şekilde aztreonam veya 3. kuşak sefalosporinlerden biri yerleştirilmiştir. Bu antibiyotik disklerine ait inhibisyon zonunun AMC yönünde genişleme göstermesi veya diskler arası bölgede bir inhibisyon alanının görülmesi GSBL varlığını göstermiştir (102).

## 4. BULGULAR

Kullanma ve içme sularında EHEC, ETEC ve EPEC suşlarının varlığının ve antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırılmasının planlandığı bu tez çalışmasında Ekim 2009-Nisan 2010 tarihleri arasında İstanbul Tıp Fakültesi Hastanesi (72 su örneği), Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Hastanesi (62 su örneği) depoları ve musluklarından toplanan 134 kullanma suyu ile 50 içme suyu örneği değerlendirilmiştir.

### 4.1. İzole Edilen Suşlar

#### 4.1.1. İçme Sularından İzole Edilen Suşlar

Tek kullanımlık olmayan damacana içme sularından 50 farklı firmaya ait örnekler bakteriyolojik olarak değerlendirilmiştir. Elli örneğin 16'sında (%32) Gram negatif çomak üremesi saptanmazken örneklerin 34'ünde (%68) üreme saptanmıştır. Üreme saptanan örneklerin 15'inde tek tip Gram negatif çomak üremesi saptanırken, 16'sında iki farklı tip, 3'ünde ise üç farklı tip Gram negatif çomak izole edilmiştir.

Üreme saptanan örneklerin üçünden (%8,8) *E. coli* izole edilmiştir. İçme sularından izole edilen *E. coli* suşları yoğun olarak ürediği için 10 farklı koloni ayrı ayrı değerlendirilerek identifikasyonları doğrulanmıştır. Bu sayede araştırılacak virülans genlerinin saptanma olasılığının artırılması amaçlanmıştır. Dolayısı ile içme suyu örneklerinden toplam 30 *E. coli* suşu izole edilmiştir. Ayrıca antibiyotiklere duyarlılık deneylerinin iki farklı koloniden elde edilen saf kültürler ayrı ayrı değerlendirilerek yapılması sayesinde *Pseudomonas* ve *K. pneumoniae* izole edilen birer örnekte her iki türe ait iki farklı suş ürediği belirlenmiştir. İzole edilen suşlar ve sayıları Tablo 4-1'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-1: 50 içme suyu örneğinden izole edilen suşlar.**

<b>Bakteriler</b>	<b>İzole edilen suş sayısı</b>
<i>Enterobacter spp.</i>	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	*7
<i>Pseudomonas spp.</i>	*17
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4
<i>E. coli</i>	30
<i>Acinetobacter spp.</i>	3
<i>Aeromonas spp.</i>	4
<i>Citrobacter spp.</i>	2
<i>Serratia spp.</i>	2
<i>Leclercia adocarboxylata</i>	1
<b>Toplam</b>	<b>85</b>

\* Örneklerin birinden iki farklı suş izole edilmiştir.

İki veya üç farklı bakteri cinsine ait suşun izole edildiği 19 örneğin 11'inde suşların her birinin fermentatif gruptan olduğu; 7'sinde fermentatif ve non-fermentatif suşların bir arada bulunduğu; sadece birinde ise *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının bir arada üretildiği saptanmıştır.

#### **4.1.2. Kullanma Sularından İzole Edilen Suşlar**

İstanbul Tıp Fakültesi (İTF) ve Cerrahpaşa Tıp Fakültesi (CTF) hastanelerinin depolarından toplanan su örneklerinden izole edilen suşlar Tablo 4-2'de gösterilmiştir. CTF hastanesine ait iki (%3,2) farklı su deposundan *E. coli* suşu izole edilmiştir. İçme sularından olduğu gibi depo örneklerinde de virülans genlerinin saptanma ihtimalini arttırmak için farklı *E. coli* kolonileri saf kültür olarak üretilip saklanmıştır. Ancak depolardan saptanan üremeler karışık olduğu için örneklerin birinden beş, diğerinden sadece bir koloni izole edilmiştir.

**Tablo 4-2: Hastanelere ait toplam 9 su deposundan toplanan su örneklerinden izole edilen suşlar.**

Depolar	Suşlar	
	İstanbul Tıp Fakültesi	Cerrahpaşa Tıp Fakültesi
Depo 1	<i>Citrobacter spp.</i>	<i>E. coli</i> <i>Pseudomonas spp.</i> <i>Aeromonas spp.</i>
Depo 2	<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Citrobacter spp.</i> <i>Pseudomonas spp.</i>
Depo 3	<i>Aeromonas spp.</i>	<i>Citrobacter spp.</i> <i>K. pneumoniae</i> <i>Aeromonas spp.</i> <i>E. coli</i>
Depo 4	<i>Enterobacter spp.</i> <i>Citrobacter spp.</i>	-
Depo 5	<i>Citrobacter spp.</i> <i>Serratia spp.</i>	-
Depo 6	<i>Aeromonas spp.</i>	-

İTF Hastanesi servislerindeki musluklardan toplanan şehir şebeke suyuna ait 66 su örneğinin sadece dördünde (% 6) (Göğüs Cerrahisi, Üroloji, Tüberküloz ve Reanimasyon servislerinden) Gram negatif çomak (*Pseudomonas spp.*) izole edilmiştir. CTF hastanesi servislerinden toplanan 59 örneğin hiçbirinde Gram negatif çomak izole edilmemiştir.

İTF hastanesi ve CTF hastanesindeki depo ve musluklara ait kullanma suları örneklerinden izole edilen Gram negatif çomakların sayıları Tablo 4-3'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-3: Hastanelere ait tüm kullanma suyu (musluk+depo) örneklerinden izole edilen suşlar.**

<b>Bakteriler</b>	<b>İzole edilen suş sayısı</b>
<i>Pseudomonas spp.</i>	7
<i>Enterobacter spp.</i>	1
<i>Citrobacter spp.</i>	5
<i>Aeromonas spp.</i>	4
<i>E. coli</i>	6
<i>K. pneumoniae</i>	1
<i>Serratia spp.</i>	1
<b>Toplam</b>	<b>25</b>

İncelenen tüm örneklerden izole edilen suşların toplam sayısı Tablo 4-4'de gösterilmiştir. Sonuç olarak incelenen 184 su örneğinin 47'sinde (34'ü içme suyu ve 13'ü kullanma suyu - % 25,5) Gram negatif çomak izole edilmiştir.

**Tablo 4-4: Çalışmada toplanan tüm su örneklerinden (184 örnek) izole edilen suşlar.**

<b>Bakteriler</b>	<b>İzole edilen suş sayısı</b>
<i>Enterobacter spp.</i>	15
<i>Enterobacter cloacae</i>	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8
<i>Pseudomonas spp.</i>	24
<i>Klebsiella oxytoca</i>	4
<i>E. coli</i>	36
<i>Acinetobacter spp.</i>	3
<i>Aeromonas spp.</i>	8
<i>Citrobacter spp.</i>	7
<i>Serratia spp.</i>	3
<i>Leclercia adocarboxylata</i>	1
<b>Toplam</b>	<b>110</b>

Tablo 4-4’de toplu olarak gösterilen suş sayılarının örneklerin çeşidine göre dağılımı Tablo 4-5’de gösterilmiştir. Çalışmamızda izole edilen suşların 83’ünün (%75,5) Enterobacteriaceae grubundan, 27’sinin (%24,5) ise non-Enterobacteriaceae grubundan oldukları belirlenmiştir.

**Tablo 4-5: Tüm su örneklerinden izole edilen suşlar.**

İzole Edilen Suşlar	Suş Sayıları		
	Depolar n*: 9	Şehir şebeke suları n: 125	İçme suları n: 50
<i>Enterobacter spp.</i>	1	-	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	-	-	1
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1	-	7
<i>Pseudomonas spp.</i>	3	4	17
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	4
<i>E. coli</i>	6	-	30
<i>Acinetobacter spp.</i>	-	-	3
<i>Aeromonas spp.</i>	4	-	4
<i>Citrobacter spp.</i>	5	-	2
<i>Serratia spp.</i>	1	-	2
<i>Leclercia adocarboxylata</i>	-	-	1
<b>Toplam</b>	<b>21</b>	<b>4</b>	<b>85</b>

n\*: örnek sayısı

#### 4.2. Shiga-Benzeri Toksinlerin (Stx) Saptanması

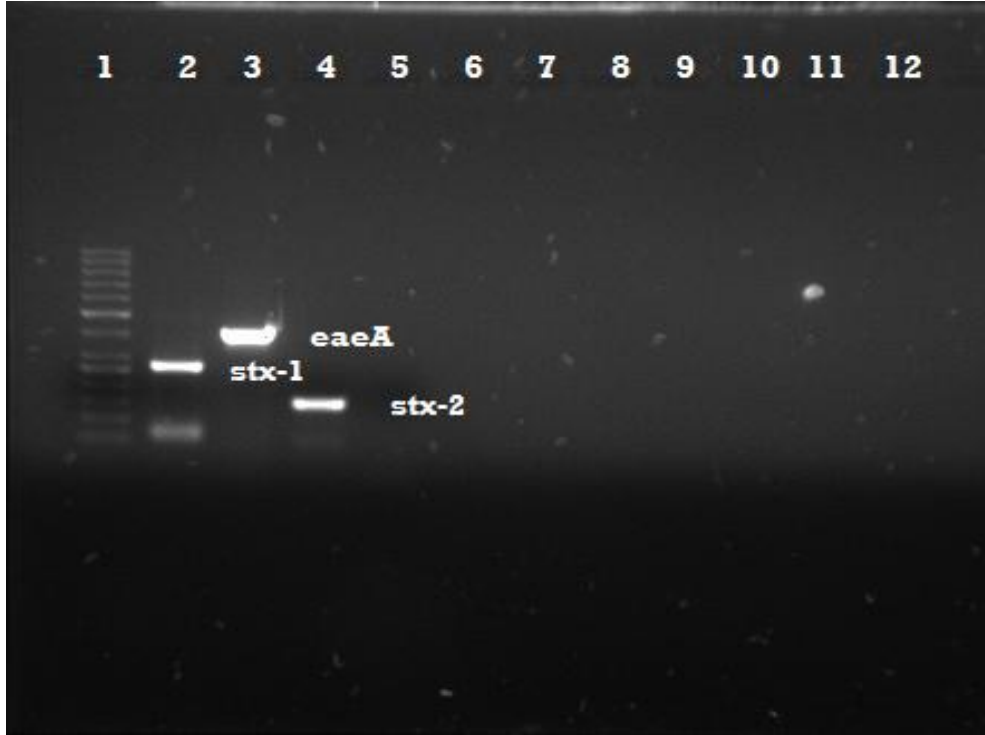
Çalışmamızda izole edilen 36 *E. coli* suşunun hiçbirinde eksprese edilen *stx-1* ve/veya *stx-2*’nin varlığı saptanmamıştır.

#### 4.3. *E. coli* Suşlarında Özgün Virülans Genlerinin Saptanması

Çalışmamızda beş su örneğinden izole edilen 36 *E. coli* suşu, ETEC suşlarına özgü *lt* ve *st* genleri, EHEC suşlarına özgü *stx-1*, *stx-2* ve *eaeA* genleri ve EPEC suşlarına özgü *eaeA* ve *bfp* genleri varlığı açısından PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

İçme sularının birinden izole edilen 10 *E. coli* suşunda (%27,7) labil toksin (*lt*) geni pozitif bulunmuştur; bu suşların antibiyotik duyarlılığı da aynı olduğundan suşların bir tanesi DNA dizi analizi ile incelenmiştir. Bu inceleme sonucunda labil toksin geninin varlığı doğrulanmış ve **%98 oranında** dizi benzerliğine dayanarak bu suşların birer ETEC suşu olduğu belirlenmiştir. *E. coli* suşlarında araştırılan diğer virülans genleri saptanmamıştır.

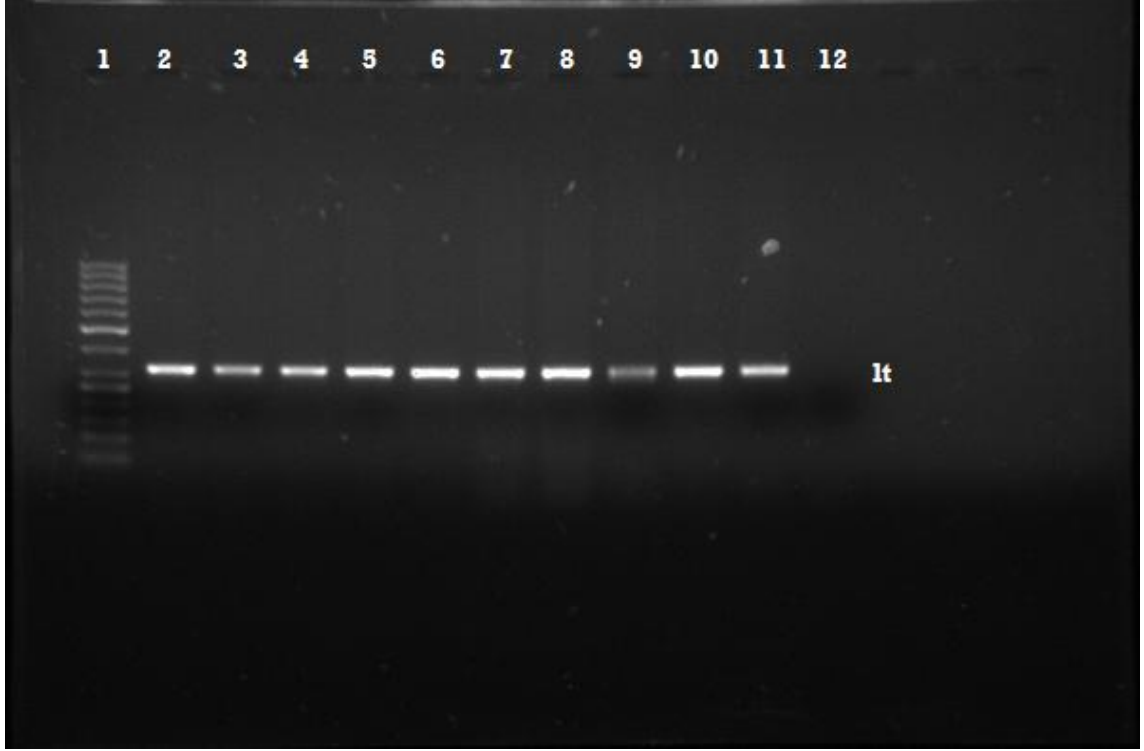
Resim 4-1'de görülen agaroz jelde birinci kuyucukta DNA marker, ikinci, üçüncü ve dördüncü kuyucuklarda ise pozitif kontrol olarak kullanılan ATCC EHEC 43894 suşuna ait virülans genleri (sırasıyla *stx-1*, *eaeA* ve *stx-2* olmak üzere) görülmektedir. Beşinci kuyucukta ise negatif kontrol olarak kullanılan DNAz içermeyen distile su örneğinin görüntüsü görülmektedir.



**Resim 4-1:** PCR deneylerinde kullanılan kontrol suşa ait genlerin agaroz jel görüntüsü.



Resim 4-2’de görülen agaroz jelde birinci kuyucukta DNA marker, 2-11. kuyucuklarda ise labil toksin pozitif saptanan *E. coli* suşlarının görüntüsü görülmektedir. 12. kuyucuk ise negatif kontroldür.



**Resim 4-2: *lt* geninin pozitif bulunduğu 10 *E. coli* suşunun agaroz jel görüntüsü.**

#### **4.4. Suşların Antibiyotiklere Duyarlılıkları**

##### **4.4.1. *E. coli* Dışındaki Gram Negatif Çomakların Duyarlılık Sonuçları**

İzole edilen tüm suşların antibiyotiklere duyarlılıkları Tablo 4-6’da gösterilmiştir. Bu tabloda bir örnekten izole edilen *E. cloacae* suşuna ait sonuçlar diğer Enterobacter suşları ile birlikte verilmiştir. Bu tabloda denenen antibiyotiklere dirençli ve orta duyarlı suşların sayıları gösterilmiştir.

Tablo 4-6: Antibiyotiklere dirençli ve orta duyarlı suşlar (*E. coli* suşları hariç).

Suşlar (n)	<i>K. oxytoca</i> (4)	<i>K. pneumoniae</i> (8)	<i>Citrobacter</i> <i>spp.</i> (7)	<i>Acinetobacter</i> <i>spp.</i> (3)	<i>Enterobacter</i> <i>spp.</i> (16)	<i>Aeromonas</i> <i>spp.</i> (8)	<i>Pseudomonas</i> <i>spp.</i> (24)
AMC	-	-	6 R	1 R	13 R	4 R 1 I	17 R 3 I
CAZ	-	-	-	-	-	-	1 R
CRO	-	-	-	1 R 1 I	1 R	-	3 R 2 I
IMP	-	-	-	-	-	-	1 R
MEM	-	-	-	-	-	-	-
FOX	-	-	6 R	2 R 1 I	13 R	1 R 1 I	21 R
FEP	-	-	-	-	-	-	-
CZ	-	-	6 R 1 I	3 R	14 R	8 R	24 R
AK	-	-	-	-	-	-	-
AMP	4 R	6 R 1 I	6 R 1 I	2 R	14 R	8 R	22 R 1 I
GN	-	-	-	-	-	-	1 R
TE	-	1 R	-	1 R	1 I	-	4 R
PIP	-	-	-	-	1 R	-	1 R
TZP	-	-	-	-	-	-	-
SXT	-	-	-	2 R	-	-	9 R
CIP	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	-	2 R	-	-	18 R

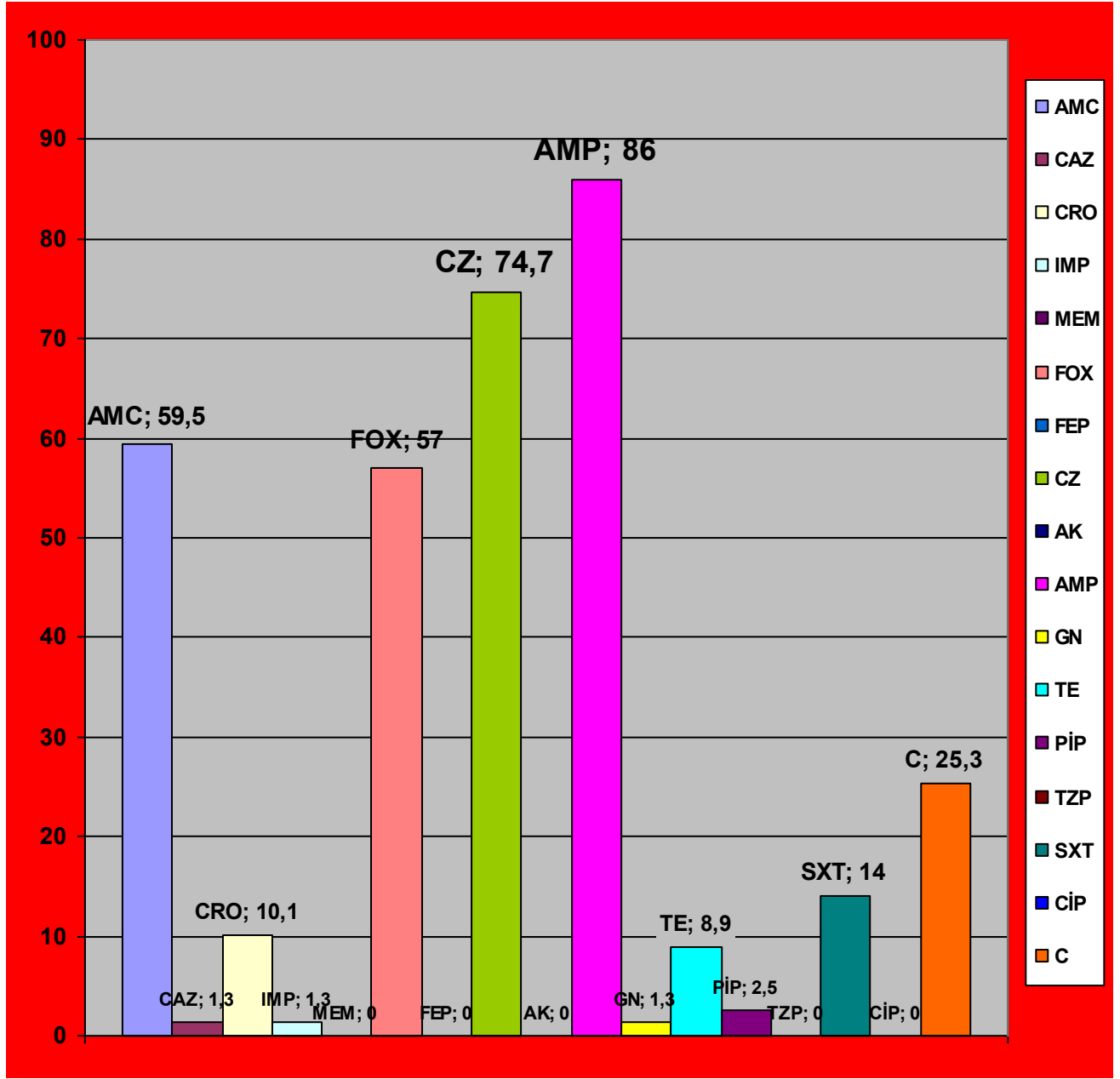
AK: amikasin, GN: gentamisin, PIP: piperasillin, AMP: ampisilin, AMC: amoksisilin/klavulonat, CAZ: seftazidim, CZ: sefalotin, CRO: seftriakson, SXT: trimetoprim/sulfametoksazol, CIP: ciprofloksasin, C: kloramfenikol, TE: tetrasiklin, FOX: sefoksitin, MEM: meropenem, IMP: imipenem, FEP: sefepim, TZP: piperasillin tazobaktam, R: dirençli, I: orta duyarlı,-: duyarlı.

Tabloda görüldüğü üzere su örneklerinden izole edilen suşlarda en sık AMC, FOX, CZ ve AMP'e direnç olduğu saptanmıştır. Yirmi dört *Pseudomonas* suşunun 20'sinde AMC, 21'inde FOX, 23'ünde AMP ve tamamında CZ direnci; 16 *Enterobacter* suşunun 13'ünde AMC, 13'ünde FOX, 14'ünde CZ ve 14'ünde AMP direnci; 7 *Citrobacter* suşunun 6'sında AMC, 6'sında FOX, 7'sinde CZ ve 7'sinde AMP direnci; 8 *Aeromonas* suşunun 5'inde AMC, 2'sinde FOX, tamamında CZ ve AMP direnci olduğu saptanmıştır.

İzole edilen toplam 74 Gram negatif çomak bakterilerden (*E. coli* suşları hariç) sadece *Pseudomonas* cinsinden olan farklı birer suşta CAZ, IMP ve GN direnci olduğu belirlenmiştir. Ayrıca SXT ve C direnci sadece non-fermentatif Gram negatif çomaklarda (*Pseudomonas* ve *Acinetobacter*) gösterilirken; çalışmamızda izole edilen suşların hiç birinde MEM, FEP, AK, TZP ve CİP direnci saptanmamıştır.

Bu tabloda yer almayan ve bir içme suyundan izole edilen *L. adocarboxylata* suşunun ise denenen tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu belirlenmiştir.

*E. coli* dışındaki diğer 74 bakterinin denenen tüm antibiyotiklere ait direnç yüzdeleri aşağıdaki Grafik 4-1'de gösterilmiştir.



**Grafik 4-1: Antibiyotiklerin direnç yüzdeleri.**

Duyarlılık deneyleri sonuçlarına göre izole edilen suşların dirençli buldukları antibiyotiklerin sayıları Tablo 4-7'de gösterilmiştir.

**Tablo 4-7: *E. coli* hariç izole edilen suşlar arasında bir veya çoklu antibiyotik direncine sahip olanların sayısı.**

Suşlar	Dirençli Suşlar			
	Bir Antibiyotiğe	İki Antibiyotiğe	Üç Antibiyotiğe	Dört ve Daha Fazla Antibiyotiğe
<i>Pseudomonas spp.</i> (24*)	-	-	1	23
<i>Aeromonas spp.</i> (8)	-	3	3	2
<i>Enterobacter spp.</i> (16)	-	-	-	14
<i>Acinetobacter spp.</i> (3)	-	-	1	2
<i>Citrobacter spp.</i> (7)	-	1	-	6
<i>Klebsiella spp.</i> (12)	10	1	-	-
<i>Serratia spp.</i> (3)	-	1	2	-

\* suş sayısı

Genel olarak izole edilen 74 suşun 47'si dört ve daha fazla antibiyotiğe, 7'si üç antibiyotiğe, 6'sı iki antibiyotiğe ve 10'u sadece bir antibiyotiğe dirençli olarak belirlenmiştir. Suşlarının 4'ünün (*L. adocarboxylata*, iki *Enterobacter* ve bir *K. pneumoniae* olmak üzere) ise denenen tüm antibiyotiklere duyarlı oldukları gösterilmiştir.

#### 4.4.2. *E. coli* Suşlarının Duyarlılık Sonuçları

İçme sularından 30, depo sularında altı olmak üzere toplam olarak 36 *E. coli* suşu değerlendirilmeye alınmıştır.

İçme suyu örneklerinin birinden izole edilen 10 *E. coli* suşunun dört farklı duyarlılık paterni gösterdiği saptanırken, diğer iki içme suyu örneğinden izole edilen *E. coli* suşlarının aynı duyarlılık paterni gösterdiği bulunmuştur. Sonuç olarak tüm su örneklerinden izole edilen 36 *E. coli* suşunda beş farklı duyarlılık paterni belirlenmiştir (Tablo 4-8).

Tablo 4-8: *E. coli* suşlarında antibiyotiklere duyarlılık paternleri.

Duyarlılık paternleri (n: suş sayısı)	1.Grup (n: 21)	2.Grup (n: 4)	3.Grup (n: 6)	4.Grup (n: 4)	5.Grup (GSBL +) (n: 1)
C	S	S	S	S	S
CIP	S	S	S	S	S
SXT	S	S	S	S	S
TZP	S	S	S	S	S
PIP	S	S	S	S	R
TE	S	S	S	S	S
GN	S	S	S	S	S
AMP	S	I	S	R	R
AK	S	S	S	S	S
CZ	S	S	I	I	R
FEP	S	S	S	S	S
FOX	S	S	S	S	S
MEM	S	S	S	S	S
IMP	S	S	S	S	S
CRO	S	S	S	S	R
CAZ	S	S	S	S	S
AMC	S	S	S	S	S

S: duyarlı, I: orta duyarlı, R: dirençli.

Genel olarak değerlendirildiğinde 36 *E. coli* suşundan 10'unun sefalotine orta duyarlı, birinin dirençli; birinin seftriaksona dirençli; dördünün ampisiline orta duyarlı, beşinin dirençli; birinin ise piperasiline dirençli olduğu belirlenmiştir.

Labil toksin pozitif saptanan 10 *E. coli* suşu denenen tüm antibiyotiklere duyarlı bulunmuştur (1. patern).

#### 4.4.3. İzole edilen suşlarda saptanan İBL ve GSBL oranları

Çalışmamızda izole edilen suşların antibiyotiklere duyarlılıkları değerlendirilirken aynı zamanda suşların İBL ve GSBL enzimi üretilip üretilmediği de fenotipik yöntemlerle araştırılmıştır.

*E. coli* dışında izole edilen diğer suşlarda GSBL üretimi saptanmazken, bir depo suyundan izole edilen *E. coli* suşu GSBL pozitif olarak bulunmuştur (5. patern). *E. coli* hariç diğer Gram negatif çomaklarda İBL oluşturan suşların oranları Tablo 4-9'da gösterilmiştir. Toplam olarak izole edilen 110 suşun 42'sinin (% 38,2) İBL pozitif olduğu belirlenmiştir.

**Tablo 4-9: İBL pozitif suşlar.**

Suşlar	İBL Oluşturan Suş Sayısı (%)
<i>Pseudomonas spp.</i>	19 (% 79)
<i>Aeromonas spp.</i>	3 (% 37,5)
<i>Enterobacter spp.</i>	13 (% 81,3)
<i>Citrobacter spp.</i>	6 (% 86)
<i>Acinetobacter spp.</i>	1 (% 33,3)
<b>Toplam</b>	<b>42 (% 38,2)</b>

## 5. TARTIŞMA

Hastane atık suları, içerdikleri birçok kirletici nedeniyle (radyoaktif, kimyasal ve patojenik mikroorganizmalar) halk sağlığı ve ekolojik denge açısından risk teşkil etmektedir. Antibiyotiklere dirençli bakteriler ve direnç genleri hastane ve evsel atık suları ile bu atık sularının karıştığı nehirlerden alınan su örnekleri gibi birçok çevresel örnekte saptanmaktadır. Özellikle hastane ortamları yüksek oranlarda antibiyotik kullanımına bağlı olarak dirençli bakterileri barındıran ve seçilimine yol açan en ideal çevrelerdir (103). Bu dirençli mikroorganizmalarla kontamine olan hastane suları özellikle immün süpresyonu olan hastalar açısından büyük risk teşkil etmektedir. Ayrıca kontamine hastane atıklarının etkili şekilde dekontamine edilmeden atılması da çevresel kirliliği arttırmakta ve korunma yöntemleri uygulanmadıkça bu döngü devam etmektedir.

Şişelenmiş doğal kaynak suları tüm dünya genelinde çok büyük bir ticari kazanç alanı haline gelmiştir. Bu ürünler özellikle yeni doğanlar, yaşlılar ve immün süprese hastaların içme suyu olarak kullanımı ve besinlerin hazırlanması için uygun şekilde satışa sunulmaktadır. Ölümcül sonuçlara yol açmaması için bu yüksek risk grubundaki bireylerin potansiyel patojenleri içermeyen hazır şişelenmiş suları tüketmesi önerilmektedir. Ancak ideal koşullarda hazırlanması ve tüketicilere ulaşması gereken bu su ürünlerinin kimi zaman mikrobiyolojik kalitesinin yeterli olmadığını gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Kontaminasyona yol açan bakteriler, suların doğal kaynağından (intrinsik olarak) veya işleme aşamasında dış ortamlardan sulara karışabilmektedir. Bu bakterilerin sayısı depolanma sırasında artmakta ve infektif doza ulaşabilmektedir. *E. coli*, *Pseudomonas spp.* ve *Salmonella spp.* gibi patojenlerin şişelenmiş içme sularında canlılığını sürdürüp, çoğalabildiği ve onları tüketen duyarlı kişilerde salgınlara yol açabildiği bildirilmektedir (104).

İki farklı üniversite hastanesinden toplanan kullanma suları (şehir şebeke suyu ve depolar) ve farklı firmalara ait içme suyu örneklerinde Gram negatif çomakların (Enterobacteriaceae ve non-Enterobacteriaceae) varlığının ve antibiyotiklere duyarlılıklarının araştırıldığı bu çalışmada içerdikleri mikroorganizmalar, bunların



virülans ve direnç özellikleri bağlamında halk sağlığı açısından suların taşıdıkları risk potansiyelinin ortaya konması amaçlanmıştır.

Özellikle akuatik ekosistemler, çok çeşitli cins ve türde mikroorganizmaların (indikatör mikroorganizmalar, fekal koliformlar, patojenler, hayvan ve insanlarda kommensal olan mikroorganizmalar ve çevresel bakteriler) yaşaması için ideal ortamlardır (105). Dolayısıyla gerek çeşitli nehirler ve göllerden toplanan yüzey sularında gerekse özellikle hastaneler gibi ortamlara ait şehir şebeke suyu örneklerindeki mikrop kirliliğinin araştırılmasına yönelik çok sayıda araştırma bulunmaktadır.

Ayrıca su sistemlerinden izole edilen Gram negatif çomaklar taşıdıkları antibiyotiklere direnç genleri nedeniyle klinik açıdan daha yüksek bir risk taşımaktadırlar (105). Bu bakteriler çok geniş bir antibiyotik direnç geni havuzu oluşturmakta ve bu genler hareketli genetik elemanlarda ve/veya kromozomda taşındığı için hayvanlar ve insanlar için patojen olan bakterilere aktarılabilir. Ayrıca DNA materyali ölü ve canlı hücreler arasında da geçiş yapabilmektedir. Birçok canlı hücrenin liziz olmadan da dış ortama DNA'sını aktardığı ve akuatik ortamlarda DNA'nın yarı ömrünün karasal ortamlara göre ( 9-28,2 saat) daha uzun olduğu ( 0,017-235 saat) bildirilmektedir (106). Direncin çevresel yayılımının ve ekolojisinin ortaya konması için kommensal ve patojen bakterilerle çevre bakterilerindeki antibiyotik direnç genlerinin araştırılması çok büyük önem taşımaktadır (105, 107).

Nijerya'da Olaoye OA. ve Onilude AA.'ın ticari olarak sokaklarda satılan paketli içme sularında yaptıkları çalışmalarında fekal koliform ve metal kirliliği araştırılmıştır. Toplam 92 su örneği toplanmış ve bu örneklerden *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. aerogenes*, *Klebsiella spp.*, *Aeromonas spp.*, *P. vulgaris*, *Alcaligenes faecalis* suşları izole edilmiştir. Bu suşlar arasında en az sıklıkla saptanan *E. coli* (bir örnek-%2,2) olmuştur. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde %2,7 izolasyon oranı ile *E. coli* en az sıklıkla saptanan suşlardan olmuştur. Sonuç olarak *E. coli*, *E. aerogenes* ve *Klebsiella spp.* suşlarının içme sularından izole edilmesi dışkı kontaminasyonunun göstergesi olarak kabul edildiğinden bu kontamine sular tüketim için uygun bulunmamaktadır (108).

Bharath J. ve arkadaşlarının Trinidad ve Tobago adasında toplam 344 şişelenmiş içme suyu ile yaptıkları araştırmalarında örneklerin %5,2'sinde (örneklerin 18'inde) fekal koliform bakteriler, %1,5 oranında (örneklerin 5'inde) *E. coli* ve %7,6 oranında (örneklerin 26'sında) *Pseudomonas spp.* izole edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca şişelerde bekletilen suların depolama sıcaklıklarının aerobik bakteri sayısını etkilemediği gösterilmiştir (104).

Liguori G. ve arkadaşlarının İtalya'da otomatik makinelerde satılan içme suları ve aynı satış birimlerinin soğutucu sistemlerine su sağlayan musluklardan toplanan su örneklerinin incelendiği çalışmalarında örneklerin hiçbirinde fekal kontaminasyon göstergesi olan *Enterococcus spp.* ve/veya *E. coli* suşları saptanmamıştır. Musluk sularının sadece birinde, içme sularının ise %23,7'sinde *P. aeruginosa* suşu saptanmıştır. Bunların yanı sıra Liguori G ve arkalarının çalışmasında da Bharath J ve arkalarının çalışmasında belirtildiği gibi ortamın sıcaklığının izolasyon oranını değiştirmedeği bildirilmiştir (109).

Suthar S. ve arkadaşlarının çalışmalarında Hindistan Rajasthan bölgesinde topladıkları içme suyu örneklerinde bakteri kontaminasyonu araştırılmıştır. İncelenen 86 su örneğinde en yüksek oranda Enterobacteriaceae üyesi bakteriler saptanmış ve bunlar arasında en sık *E. coli*, *P. vulgaris*, *Klebsilla spp.* suşları izole edilmiştir (110). Bizim çalışmamızda içme sularının %68'inde Gram negatif çomak izole edilmiş ve bu oran Suthar S. ve arkadaşlarının çalışmaları ile benzer (%78) bulunmuştur.

Yüz mL'sinde koliform bakteri izole edilen suların içilebilir kriterde olmadığı göz önüne alındığında bu tür çalışmaların önemi daha iyi anlaşılmaktadır.

Stojek NM. ve arkadaşlarının 2008'de yaptıkları çalışmalarında Polonya Lublin'de bulunan altı hastanenin duş ve musluklarından toplanan kullanma sularında Gram negatif çomakların varlığı araştırılmıştır. Toplam 67 örnek değerlendirilmiş ve hiçbirinde Enterobacteriaceae grubundan bakteri izole edilmemiştir. Tüm hastanelerden alınan örneklerden izole edilen non-Enterobacteriaceae üyesi bakterilerin izolasyon oranlarının ortalaması %79 olarak bulunmuştur. Araştırma yapılan hastanelerin su sistemlerinde Enterobacteriaceae grubu bakteriler izole edilmemiş olsa da non-fermentatif bakterilerin izolasyon oranların çok yüksek bulunmuş, bu da potansiyel patojen türlerin yaratacağı risk açısından önemli olarak değerlendirilmiştir (111).

Rutter M. ve arkadaşlarının çalışmalarında İngiltere’de 2911 farklı su kaynaklarından toplanan 6551 örnek mikrobiyolojik açıdan incelenmiştir. Bu su kaynaklarının 949’unda (%33) ve örneklerin 1342’sinde (%21) *E. coli* suşları izole edilmiştir (112).

Reinthal FF. ve arkadaşlarının 2010’da Avusturya’da atık su birikintilerinde GSBL pozitif *E. coli* varlığını araştırdıkları çalışmalarında toplam 72 örnek incelenmiştir. Bu örneklerin 44’ünde (%61,1) GSBL pozitif *E. coli* suşu izole edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca GSBL enzimlerinin tiplendirilmesi de yapılmıştır. Araştırmacılar hem hastane hem de çevresel ortamlarda tüm dünya genelinde hızla artan GSBL direncinin dikkate değer olduğunu ve atık su birikintilerinin GSBL pozitif *E. coli* suşları için önemli bir kaynak olma ihtimaline karşı dekontaminasyon işlemlerinin halk sağlığı açısından önemli olduğunu vurgulamışlardır (113).

Bu direnç artışında rol oynayan en önemli risk faktörleri, hastanede ve yoğun bakım ünitesinde uzun süre kalış, üriner ve vasküler kataterizasyonu ve özellikle 3. ve 4. kuşak sefalosporin gibi antibiyotiklerin kullanımının tekrarlanması olarak bilinmektedir. Günümüzde klinik örneklerinin yanı sıra çevresel örneklerden izole edilen GSBL üreten Enterobacteriaceae grubu bakterilerin saptanmasında da artış olduğu, özellikle de su ortamlarının GSBL direnci için kalıcı bir rezervuar görevi yaptığı bildirilmektedir (48, 114).

Çalışmamızdan izlenilen 184 su örneğinin beşinden (%2,7) olmak üzere toplam 36 *E. coli* suşu izole edilmiştir. Bu suşların sadece birinde (%2,7) GSBL pozitifliği saptanmış ve elde edilen bu sonuç literatürde bildirilen oranların çok altında olmuştur.

Yapılan çalışmalar sonucunda su örneklerinde fekal koliform bakteriler ve *E. coli* suşlarının izolasyon oranlarının suların alındığı kaynaklara göre farklılık gösterdiği anlaşılmıştır. İçme suları ve belirli bir dezenfeksiyon işlemine tabi tutulan kullanma sularında *E. coli* suşlarının izolasyon oranları bizim çalışmamızda elde ettiğimiz orana (%2,7) benzer şekilde çok düşük bulunmaktadır veya hiç Enterobacteriaceae grubundan bakteriler izole edilmemektedir. Bunun aksine yüzey veya atık sularından yapılan incelemelerde izolasyon oranları çok yüksek bulunmakta ve bunun yanı sıra dirençli suşlara da rastlanma sıklığı artmaktadır.

Lin J. ve Biyela PT.'nin 2005'te yaptıkları bir çalışmada Güney Afrika'da Mhlathuze nehrinin beş farklı bölgesinden toplanan su örneklerinde 113 Enterobacteriaceae ailesi üyesi bakteri izole edilmiştir. Bunların 43'ü dört farklı gruptan antibiyotiğe dirençli bulunmuştur. Bu çalışmadan izole edilen suşlar Enterobacteriaceae, *Pseudomonas spp.* ve *Aeromonas hydrophila* olarak gruplandırılmış; *Vibrio cholerae* ve *Salmonella* gibi su kaynaklı patojenler ise izole edilmemiştir. *Aeromonas hydrophila* gastroenterit etkeni bir bakteridir; *P. aeruginosa* ise çoğunlukla immünsüprese hastalar veya metabolik ya da hematolojik rahatsızlığı olanlar için risk teşkil etmektedir. Ayrıca *Klebsiella spp.* gibi fırsatçı patojenlerin özellikle çocuklar, yaşlılar ve HIV ile enfekte kişilerde önem taşıdığı bilinmektedir. Dolayısıyla her üç gruptan mikroorganizmaların nehir sularında varlığının bu özelliklerinden dolayı önem taşıdığı araştırmacılar tarafından vurgulanmıştır (105).

Bizim çalışmamızda tüm su örneklerinden Enterobacteriaceae üyesi cinslere ait 83 suş izole edilmiştir. Bu suşların %27,7'si dört ve daha fazla antibiyotiğe dirençli bulunmuştur.

Lima-Bittencourt CI. ve arkadaşlarının 2007'de yaptıkları bir çalışmada Brezilya'da Serra do Cipo Doğal Parkı'nda Doce Nehri'nin iki kolu olan İndaia ve Peixe Nehrinden toplanan su örneklerinden izole edilen 111 Enterobacteriaceae üyesi suşlardaki çoğul antibiyotik direnç oranları araştırılmıştır. Bunların ikisi *Citrobacter*, dokuzu *Enterobacter*, dördü *Edwardsiella*, sekizi *Escherichia*, 52'si *Klebsiella*, biri *Kluyvera*, 16'sı *Morganella*, beşi *Proteus*, 2'si *Providentia* ve 12'si *Serratia* olarak tanımlanmıştır. Suşların %93'ünde en az bir, %61'inde ise çoğul antibiyotik direnci olduğu belirlenmiştir. *Proteus* en dirençli suş olarak bulunurken, *Escherichia* suşları %12,5 oranında çoğul antibiyotik direnci ile en duyarlı cins olarak belirlenmiştir. Suşlar en yüksek oranda (%84) ampisiline dirençli bulunurken en düşük direnç oranlarının aminoglikozidlere (%3-17) ait olduğu gösterilmiştir (115).

Bizim çalışmamızdan izole edilen koliform grubu bakterilerin 16'sı (%19,3) *Enterobacter spp.*, 12'si (%14,5) *Klebsiella spp.*, sekizi (%9,6) *Aeromonas spp.*, yedisi (%8,4) *Citrobacter spp.*, 36'sı (%43) *E. coli*, üçü (%3,6) *Serratia spp.* ve *L. adocarboxylata* (%1,2) olarak tanımlanmıştır. Bu suşlar arasında en yüksek direnç oranları *Enterobacter spp.* ve *Citrobacter spp.* suşlarında saptanmıştır. Toplamda suşların 59'u (%71,1) en az bir, 23'ü (%27,7) ise dört ve daha fazla antibiyotiğe dirençli

bulunmuştur. Enterobacteriaceae grubu bakterilerde en yüksek direnç oranlarının ampisilin (52 suş-%62,6) ve sefalotin (43 suş-%52,3) için olduğu saptanmış; bu antibiyotikleri sefoksitin (21 suş-%25,3) ve amoksisilin-klavulonat (26 suş-%31,3) izlemiştir.

Ülkemizde Toroğlu S. ve arkadaşları Kahramanmaraş Aksu nehrinden izole edilen Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnci araştırılmıştır. Bu çalışmadan izole edilen 67 suşun 45'i (%67,2) *E. coli*, 20'si (% 30) *Klebsiella spp.*, biri (%1,5) *Citrobacter spp.* ve bir diğeri *Pseudomonas spp.* (%1,5) olarak tanımlanmıştır. Ayrıca suşlarının 33'ünün (%49,3) beta-laktamaz pozitif olduğu bulunmuştur. Suşların tamamında en yüksek direnç oranları aztreonam, penisilin, sefaperozon-sulbaktam ve ampisilin-sulbaktam antibiyotiklerinde saptanmıştır. Antimikrobik maddelere yüksek oranda direnç saptanmasının sebebinin yanlış ve gereksiz ilaç kullanıma bağlı olduğu ve bu direnç oranlarının önemli ekolojik ve halk sağlığı problemlerine yol açabileceği vurgulanmıştır (116).

Bizim çalışmamızda elde edilen izolasyon oranları özellikle *Pseudomonas spp.* (%21,8) ve *Citrobacter spp.* suşlarının (%8,4) oranları Toroğlu ve arklarının çalışmalarında belirtilen oranlardan çok yüksek bulunmuştur. Toplamda bizim su örneklerinden izole ettiğimiz 110 suşun, en yüksek oranda ampisilin (%70), amoksisilin-klavulonat (%42,7), sefalotin (%63,6) ve sefoksitin (%40,9) antibiyotiklerine dirençli olduğu bulunmuştur. Ayrıca çalışmamızdan izole edilen suşların %38,2'inde (42 suş) İBL saptanmıştır. Toroğlu ve arklarının çalışmalarında belirtilen beta-laktamaz oranları (%49,3) ile yakın bulunmuştur.

Ülkemizden yapılan diğer bir çalışmada ise Rize bölgesinde içme suyu kaynağı olarak kullanılan 36 musluk suyu ve 15 yeraltı kaynak suyundan toplanan 457 su örneği koliform bakteri kontaminasyonu derecesinin saptanması amacıyla incelenmiştir. Örneklerin 199'unun (%43,5) koliform, 41'inin (%8,9) ise koliform dışı bakteriler ile kontamine olduğu belirlenmiştir. 199 örneğin 117'sinden *E. coli* izole edilmiş ve musluk suları ile yer altı sularından izole edilen koliform bakteri izolasyon oranları sırasıyla %30 ve %81 olarak belirlenmiştir. İzole edilen *E. coli* suşlarının tümü en az bir antibiyotiğe ve 49'unun (%41,8) üç veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olduğu bulunmuştur. Suşlarda en yüksek oranda ampisilin (%47), trimetoprim-sulfametoksazol (% 19,6) ve amikasin (%17,9) direnci saptanmıştır (57).

Bizim çalışmamızda değerlendirilen 184 su örneğinin 31'inde (%16,85) koliform çomaklar, 25'inde (%13,6) koliform dışı çomaklar, 9'unda (%4,9) ise koliform ve koliform dışı Gram negatif çomaklar birlikte izole edilmiştir. Çalışmamızdan izole edilen *E. coli* suşlarının 15'inin (%41,6) en az bir antibiyotiğe, sadece birinin (%2,7) dört antibiyotiğe dirençli olduğu bulunmuş; en yüksek direnç oranları ampisilin (%25) ve sefalotin (%30,5) antibiyotiklerinde saptanmıştır. Ayrıca *E. coli* suşlarında %2,7 (bire suş) oranında seftriakson ve piperasilin direnci saptanmıştır.

Pathak SP. ve Gopal K.'nin Hindistan'da içme sularında kontaminasyon ve direnç oranlarının araştırıldığı çalışmalarında şehrin içme suyu kaynağı olan Gomti Nehrine ait bir koldan ve klorlama yöntemi ile dezenfeksiyon işlemi yapılmış toplam 100 içme suyu örneği toplanmıştır. Suların %20'sinden koliform bakteriler izole edilmiştir. İzole edilen suşların 10'u (%26) *E. coli*, dokuzu (%26), *Klebsiella spp.*, sekizi (%24) *Enterobacter spp* ve beşi (%15) *Citrobacter spp.* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen tüm koliform çomakların en az dört antibiyotiğe dirençli olduğu bulunmuştur. Dezenfeksiyon işlemi yapılmış su örneklerinde fekal kirlilik göstergesi bakterilerin saptanmasının klorlamanın uygun yapılmadığı ve/veya rekontaminasyona bağlı olabileceği, ayrıca çeşitli akuatik bakterilerin klora karşı tolerans geliştirebileceği vurgulanmıştır (7).

Bizim çalışmamızdan elde edilen koliform bakterilerin izolasyon oranları (%16,85) Pathak SP.'nin bildirdiği oranlar ile benzer; Özgümüş OB. ve arkadaşlarının elde ettiği oranlardan (%43,5) daha düşük bulunmuştur.

Servais P. ve Passerat J.'nin çalışmalarında Seine nehrinin 11 farklı bölgesinden ve bu nehrin su taşıdığı bölgede bulunan çeşitli hastanelerin atık sularından toplanan su örneklerinde fekal kontaminasyon göstergesi olan *E. coli* ve *Enterococcus spp.* cinsi bakterilerin varlığı çeşitli antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Nehirden alınan örneklerden izole edilen 214 *E. coli* suşunun %42'si en az bir antibiyotiğe dirençli bulunmuştur. En yüksek direnç oranları amoksislin (%33), tetrasiklin (%27), trimetoprim-sulfametoksazol (%16) ve amoksislin-klavulonat (%16) antibiyotiklerinde saptanmıştır. Levofloksasin ve amikasine dirençli suşa saptanmamıştır. Hastane atık sularından toplanan örneklerden izole edilen suşlarda ise direnç oranları (en az bir antibiyotiğe dirençli suş oranı %72) daha yüksek bulunmuştur. Suşların %35'i en az beş

antibiyotiğe dirençli bulunmuştur. Nehir sularından elde edilen direnç oranları (%2) ile kıyaslanınca yine çok yüksek olduğu görülmüştür (117).

Bu çalışmada fekal kontaminasyona yol açan kaynağın (insan, evcil çiftlik hayvanları veya vahşi hayvanlar) ve bakterilerin antibiyotiklere temasının nehir gibi ortamlarda oluşan kirliliğin derecesinde belirleyici olduğu vurgulanmıştır (117).

Fuentefria DB. ve arkadaşları Brezilya'da yaptıkları çalışmalarında iki farklı hastaneye ait atık suları ve bu atık sularının karıştığı su kaynaklarına ait yüzey sularından toplanan örnekler dirençli *P. aeruginosa* suşlarının varlığı açısından incelenmiştir. İzole edilen 396 *P. aeruginosa* suşunun direnç paternleri ve çoğul dirençli suşların sıklığı incelendiğinde çoğul dirençli suşların hastane atık sularında daha yüksek oranlarda bulunduğu gösterilmiştir. Sonuçta diğer çalışmalara benzer şekilde infeksiyonların tedavisinde etkili ve uygun ilaç kullanımının bu dirençli bakterilerin seçimini ve yayılımını önleyebileceği ve ekolojik dengenin duyarlı bakterilerin yararına olacak şekilde düzenlenebilmesi için gerekli koşulları sağlayacağı vurgulanmıştır (103).

Bizim çalışmamızda izole edilen koliform dışı bakterilerin oranı %24,5 (27 suş) olarak saptanmıştır. Bu suşların 24'ü *Pseudomonas spp.*, üçü *Acinetobacter spp.* olarak tanımlanmıştır. İzole edilen koliform dışı bakterilerde en yüksek direnç oranlarının sefazolin (%100), ampisilin (%92,6), sefoksitin (%88,8) ve amoksisilin-klavulonat (%77,7) antibiyotiklerinde olduğu saptanmıştır.

Özellikle yüksek mortalite oranına sahip hastane kaynaklı infeksiyonların en önemli etkeni olmasının yanısıra toprak, su ve bitkilerde yaygın olarak bulunan (118) *P. aeruginosa* suşları, birçok farklı sınıf antibiyotiğe intrinsik dirençlidir ve diğer etkili antibiyotiklere de direnç kazanabilme yeteneğindedir. Ayrıca yapılan araştırmalarda içme suyu, aerosollerin inhalasyonu ve direkt deri teması gibi yollarla gelişen su kaynaklı infeksiyonların da en önemli etkeni arasında sayılmaktadır (111, 119).

Yapılan birçok çalışmada belirtildiği üzere besinler ve sular infeksiyon hastalıklarının gelişiminde çok önemli rezervuar rolü oynamaktadır. Dünyanın birçok farklı bölgesinden özellikle sulardaki kirlilik durumunun araştırıldığı çok sayıda çalışmalara rastlanmaktadır. Bu çalışmaların çoğunda fekal koliform ve fekal streptokok grubu bakterilerin oraları ve izole edilen bu bakterilerdeki çeşitli antibiyotiklere direnç

oranları saptanmaktadır. Yapılan çalışmalarda direnç oranları çoğunlukla disk difüzyon yöntemi ile belirlenmektedir; ancak bunların beraberinde dirence yol açan genlerin PCR yöntemi ile araştırıldığı çalışmalara da rastlanmaktadır. Fakat özellikle bu tez çalışmasında konu edinilen, sulardan izole edilen çeşitli halk sağlığı açısından önem arz eden çeşitli *E. coli* patogruplarının virülans gen profilleri-direnç paternleri gibi özelliklerinin birlikte araştırıldığı yurt dışından yapılan sınırlı sayıda çalışmalar bulunsa da ülkemizden yapılan bu kapsamdaki çalışmalara tarafımızdan rastlanmamıştır.

Hindistan'da Ram S. ve arkadaşlarının Saryu nehrinin üç farklı bölgesinden toplanan su örneklerinde EHEC ve ETEC suşlarının varlığı ve antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Suşların EHEC ve ETEC olarak tanımlanmaları için bu suşlara özgü virülans genleri PCR yöntemi ile araştırılmıştır. Toplam 42 *E. coli* suşu izole edilmiştir. EHEC olarak tanımlanan suşların 18'inde (%66,6) *stx-1* ve *stx-2* genleri birlikte saptanmış, dokuzunda ise (%33,3) sadece *stx-1* geni pozitif bulunmuştur. STEC suşlarının %94'ünde *eaeA* geni, %83,3'ünde *hlyA* geni saptanmıştır. Bu çalışmadan izole edilen ETEC suşlarının %75'inde *lt* ve *st* genleri birlikte saptanırken %25'inde sadece *st* geni pozitif bulunmuştur. İzole edilen *E. coli* suşlarının antibiyotiklere duyarlılıkları da araştırılmıştır. Suşların %76,7 oranında sefalotin, %50 oranında tetrasiklin ve %33 oranında neomisin direnci saptanmıştır. Ayrıca suşların %20'si denenen antibiyotiklerin birine, %30'u ikisine, %43,3'ü ise üç veya daha fazlasına dirençli bulunmuştur (23).

Ram S. ve arkadaşlarının 2008'de yaptıkları çalışmalarında aynı ülkeden Gomti nehrinden topladıkları su örneklerinde çoğul dirençli EHEC suşlarının varlığı araştırılmıştır. İzole edilen 60 *E. coli* suşunun 18'inde (%30) EHEC virülans genleri pozitif bulunmuştur. Bu suşların %33,3'ünde *stx-1* ve *stx-2* genleri, %55,6'sında *stx-2* geni, %11'inde *stx-1* geni, %23,3'ünde ise *hlyA* geni pozitif bulunmuştur. Ayrıca *stx-1* ve *stx-2* genlerini birlikte taşıyan suşların tümünde *eaeA* geni de pozitif bulunmuştur. Bu çalışmadan izole edilen EHEC suşlarının tümü en az bir antibiyotiğe dirençli bulunmuştur. Suşların %27'si beta-laktam grubu antibiyotiklere dirençli bulunurken; %61'i neomisine, %39'u streptomisine ve %11'i piperasiline orta duyarlı olarak bulunmuştur (100).

Yine aynı araştırmacıların Gomti nehrinden topladıkları su örneklerinde bu defa EHEC ve ETEC suşlarına ait virülans genlerini ve antibiyotiklere direnç paternlerini



araştırdıkları diğer bir çalışmada toplam 90 *E. coli* suşu izole edilmiştir. Bu suşların %61'inde virülans genlerinin bulunduğu gösterilmiştir. STEC şüpheli suşlarının %15,6'sında *stx-1* ve *stx-2* genleri birlikte saptanmış, sadece *stx-1* geni %17,8, sadece *stx-2* geni ise %6,7 oranında pozitif bulunmuştur. Ayrıca EHEC suşlarında *eaeA* ve *hlyA* genlerinin oranları sırasıyla %26,7 ve %33,3 olarak belirlenmiş; %5,6'sında dört gen birlikte pozitif bulunmuştur. *E. coli* suşlarının %21,2'sinde ise *lt* ve *st* genleri birlikte pozitif bulunmuştur. İzole edilen *E. coli* suşlarının %57,8'i üç veya daha fazla antibiyotiğe, %20'si iki antibiyotiğe, %16,7'si ise sadece bir antibiyotiğe dirençli bulunmuştur. Bu çalışmada STEC suşlarının tamamının 2-7 antibiyotiğe, ETEC suşlarının tamamının ise 1-6 antibiyotiğe dirençli olduğu gösterilmiştir (1).

Kanada'da yapılan çok kapsamlı bir çalışmada St Clair nehri ve Detroit nehri bölgelerinden toplanan yüzey suları, hem barsak patojenleri hem de barsak dışı *E. coli* patogruplarına (ExPEC) özgü virülans genleri varlığı açısından incelenmiştir. Çalışmada DNA mikroarray tekniği kullanılmıştır. Toplam 308 *E. coli* suşu izole edilmiş bunların 117'sinde araştırılan virülans genleri pozitif bulunmuştur. Pozitif bulunan 117 suşun 85'inde ExPEC patogruplarına özgü virülans faktörleri saptanmıştır. Bu çalışmadan barsak patojenleri olarak sadece atipik EPEC ve EAEC suşları izole edilmiş, ancak hiç EHEC suşu saptanmamıştır. İzole edilen suşlarda çeşitli antibiyotiklere direnç genleri de araştırılmış ve en yüksek oranda *bla<sub>TEM</sub>* (%6), *tetA* (%5,2), *tetB* (%3,2) ve *sull* (%4,5) genleri pozitif bulunmuştur. Bu çalışmadan elde edilen bulguların, akuatik çevrelerde ExPEC suşlarının sadece ABD'de yılda 40000 ölüme yol açtığı göz önüne alındığında halk sağlığı açısından potansiyel risk teşkil etmesine yönelik önemli bir veri sağladığı düşünülmüştür (119).

Alam M. ve arkadaşlarının Bangladeş'te yaptıkları bir çalışmalarında 13 farklı bölgeye ait nehir ve göllerden toplanan su örneklerinden izole edilen 160 *E. coli* suşu (her örnekten bir tane olmak üzere) serotiplendirme ile patogruplandırılmış, PCR yöntemi ile *stx-1*, *st* ve *lt* genleri varlığı açısından incelenmiş ve antibiyotiklere duyarlılıkları araştırılmıştır. Serotipleme sonuçlarına göre *E. coli* suşlarının %47'si EPEC, %30'u ETEC, %6'sı EHEC suşu olarak tanımlanmış, %11'i ise tanımlanamamıştır. İncelenen *E. coli* suşlarının %61'inde *st* geni, %1,25'inde (2 suş) *stx-1* geni pozitif bulunmuş, *lt* geni taşıyan suşa rastlanmamıştır. *stx-1* geni taşıyan iki suşun *st* genini de taşıyor olması ve serogruplama sonuçlarına göre EPEC kategorisinde

yer alan bazı suşlarda da *st* geni pozitif bulunması bu çalışmanın en önemli bulguları olarak değerlendirilmiştir. Yapılan antibiyotik duyarlılık deneylerinde suşlarda en yüksek direnç oranlarının penisilin-G (%94), tetrasiklin (%65), ampisilin (%75) ve trimetoprim-sulfametoksazol (%49) antibiyotiklerinde olduğu, ayrıca suşların %69'unun dörtten fazla antibiyotiğe dirençli olduğu gösterilmiştir (120). Bizim çalışmamızda, projemize ayrılan maddi kaynak yeterli olmadığı için serotiplendirme yapılamamıştır.

Bahsedilen benzer çalışmaların bulguları hem gelişmekte olan hem de gelişmiş ülkelerin yüzey sularında dirençli patojen *E. coli* suşlarının varlığının sürveyans çalışmaları ile belirlenmesinin halk sağlığını korumaya yönelik stratejilerin geliştirilmesinde yönlendirici olabileceğini göstermektedir.

Schetz FM. ve arkadaşlarının Hollanda'da yaptıkları çalışmalarında kamp bölgeleri, ofisler ve hastanelerde içme suyu kaynağı olarak kullanılan toplam 144 farklı kaynaktan alınan 147 su örneği *E. coli* O157:H7 varlığı açısından incelenmiştir. Suların %86,4'ünde enterokok, koliform grubu bakteriler veya *E. coli* suşları izole edilmemiştir. İzole edilen *E. coli* suşları *E. coli* O157:H7 suşlarına özgü *rfbE* geni varlığı açısından real-time PCR yöntemi ile incelenmiş ve örneklerin %2,7'si pozitif bulunmuştur. Araştırmacılar, incelenen su miktarı 100 mL'nin üstünde olduğunda *E. coli* O157:H7 suşunun izolasyon oranlarının artabileceğini bildirmişlerdir. Bu çalışmada antibiyotik duyarlılıkları yapılmamıştır (121).

Avusturya'da Halabi M. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada içme suyu örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarında EHEC suşlarına özgü *stx-1*, *stx-2*, *eaeA* ve *hlyA* genlerinin varlığı araştırılmıştır. Toplam 2633 su örneği incelenmiş ve 280'inde (%10,6) *E. coli* suşları izole edilmiştir. İki yüz seksen *E. coli* suşunun 11'inde (%3,9) araştırılan virülans genlerinin en az biri pozitif bulunmuştur. EHEC süpheli suşların birinde *stx-2*, yedisinde *eaeA* ve üçünde *hlyA* genleri pozitif saptanmıştır. *stx-1* geni suşların hiçbirinde bulunmamıştır. Bu çalışmada ayrıca serotiplendirme de yapılmıştır. Virülans genlerinin saptandığı 11 *E. coli* suşunun on farklı serotipten olduğu ve iki O26:H11 serotipi hariç diğer suşların tipik EHEC serotiplerine dahil olmadığı gösterilmiştir (122).

EHEC suşları ile infekte olan kişilerde kanlı diyare ve hatta HUS gelişimine kadar varabilen şiddetli hastalıklar ortaya çıkabilmektedir. Yapılan çalışmalar, HUS gelişme riskinin sadece infekte eden suşun virülans özelliklerine bağlı olmadığını, konağa ait ve çevresel birçok faktörün de rolü olduğunu göstermiştir. Bu bilgiler doğrultusunda EHEC suşlarının HUS oluşturma potansiyelinde olan gerçek EHEC ve şiddetli hastalık oluşturmayan, patojenitesi düşük (low pathogenic) STEC suşları (LP-STEC) olarak gruplandırılması uygun görülmüş ve EHEC suşlarının insanlarda ciddi bir hastalık semptomu oluşturmayan diğer STEC suşlarından ayrımının gerekli olduğu düşünülmüştür (123). Bu ayırmada en önemli kriteri *stx* genleri oluşturmaktadır; çünkü tüm STEC suşları arasında özellikle *stx* oluşturan bakterilerin HUS geliştirme yeteneğinde olduğu bildirilmektedir (123, 124). Hatta bakterilerin taşıdığı *stx* genotiplerinin de oluşan hastalığın şiddeti ve HUS gelişimi ile ilişkili olduğu, özellikle *stx-2* geni taşıyan EHEC suşlarının sadece *stx-1* veya *stx-1* ile *stx-2* genlerini taşıyan suşlara göre daha yüksek oranda HUS gelişimine neden olduğu bilinmektedir. Sonuç olarak bir suşun EHEC olarak tanımlanabilmesi için tercihen *stx-2* olmak üzere bir *stx* geni ile birlikte *eaeA* genini taşıması gerektiği bildirilmiştir (123).

Halabi M. ve arkadaşlarının çalışmalarında *stx* ve *eaeA* genlerini birlikte taşıyan gerçek EHEC suşu veya klinik bir olgu saptanmamış olsa da *eaeA* ve *hlyA* genlerinin *stx* genlerini taşıyan fajları da kazanabilme ihtimalinden dolayı su kaynaklarının kalitesinin düzenli şekilde kontrolünün çok önemli olduğu vurgulanmıştır (122).

Çeşitli su örneklerinde *E. coli* patogruplarına özgü virülans genlerinin araştırıldığı çalışmalarda da yine yüzey sularından elde edilen sonuçlar musluk ve/veya içme suyu örneklerinden elde edilen sonuçlar ile kıyaslandığında çok daha yüksek oranların saptandığı görülmektedir.

Bizim çalışmamızda içme sularının birinden izole edilen 10 *E. coli* suşunda (%27,7) labil toksin geni pozitif bulunmuş ve bu suşlar DNA dizi analizi sonuçlarına göre ETEC suşu olarak tanımlanmıştır. EPEC veya EHEC suşları izole edilmemiştir. ETEC olarak tanımlanan suşların denenen antibiyotiklerin tamamına duyarlı oldukları gösterilmiştir.

Çalışmamızın ilginç sonuçlarında biri de içme suyu örneklerinin birinden *L. adocarboxylata* izole edilmesidir. Enterobacteriaceae grubuna dahil olan bu bakteri

çoğu kez *E. coli* suşları ile karıştırılabilmektedir. Özellikle immün süprese kişilerde ciddi infeksiyonlara yol açtığı bildirilen ve literatürde nadiren olgularda etken olarak gösterilen (125, 126) bu bakterinin su örneklerinden izole edildiğini bildiren başka bir çalışmaya tarafımızdan rastlanmamıştır.

İzole edilen suşların tamamı göz önüne alınarak bir kıyaslama yapıldığında, zannedilenin aksine şehir şebeke sularının içme sularına göre mikrobiyolojik açıdan daha düşük bir risk taşıdığı anlaşılmıştır. Hastanelerden toplanan musluk sularından elde ettiğimiz sonuçlar, genel olarak şebeke dağıtım sistemlerinin dezenfeksiyon işlemlerinin sonucunda çok düşük bir kontaminasyon riski taşıdığını göstermiştir. Ancak bunun aksine özellikle İstanbul'da kullanılan damacana içme sularının, kişisel dikkatsizlik ve/veya tekrar kullanılmak üzere dağıtım sırasında rekontaminasyona açık bir ortam sağlamasından dolayı sularla bulaşan bakterilerin taşınmasında daha yüksek bir risk taşıdığı bu çalışmada ortaya konmuştur.

Bu konu üzerine tüm dünya genelinde yapılan araştırmaların sonuçları değerlendirildiğinde gerek yüzey gerekse içme ve kullanma sularında saptanan dışkı kontaminasyonunun halen çok büyük problemlere yol açtığı ve açmaya da devam edeceği açıkça görülmektedir. Bizim araştırmamızda *E. coli* saptanan örnek sayısı yüksek olmasa da özellikle steril şartlarda tüketicilere ulaşması gereken doğal kaynak sularında bu suşların ve diğer fekal koliformların saptanmış olması durumun ciddiyetini göstermektedir. Hatta içme suları da dahil olmak üzere birçok farklı su örneğinde hastalık gelişimi açısından çok büyük risk teşkil eden virülans genlerinin varlığı da çok sayıda araştırmada gösterilmiştir. Bizim elde ettiğimiz sonuçlar da bu araştırmaları destekler nitelikte olmuştur.

Ayrıca özellikle küçük çocuk ve yaşlı popülasyonu ile immünsüprese hastalarda mortalitesi yüksek hastane infeksiyonlarına yol açabilen etkenlerin kaynağı olması açısından su örnekleri çok büyük önem taşımaktadır. Bizim çalışmamızda da özellikle hastane ortamlarının araştırılmasının nedeni bu risk durumunu belirlemek olmuştur. Bizim sonuçlarımıza göre özellikle *E. coli* ve *Klebsiella spp.* gibi bakterilerde yüksek oranlarda antibiyotik direnci saptanmamış olsa da bir *E. coli* suşunda GSBL varlığının gösterilmesi bu direncin ve dirençli suşların yayılımının mümkün olabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca hastane infeksiyonlarının en önemli etkenleri olan

*Pseudomonas spp.*, *Citrobacter spp.* ve *Enterobacter spp.* suşlarında çok yüksek oranda antibiyotik direncinin saptanması da bu düşünceyi doğrulamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Ram S., Vajpayee P., Tripathi U., Singh RL., Seth PK, Shanker R. Determination of antimicrobial resistance and virulence gene signatures in surface water isolates of *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* 2008; **105** (6): 1899-1908.
2. WHO: Quantifying selected major risks to health. In: The World Health Report 2002: Reducing Risks, Promoting Healthy Life. Geneva: World Health Organization, 2002; 47-97. ([http://www.who.int/whr/2002/en/whr02\\_ch4.pdf](http://www.who.int/whr/2002/en/whr02_ch4.pdf))
3. İnsani Tüketim Amaçlı sular hakkında yönetmelik, Resmi Gazete 17 şubat 2005. Sayı : 25730
4. Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği, Yayınlandığı Resmi Gazete: Tarih 31 Aralık Cuma 2004 Sayı :25687. [www.cevreorman.gov.tr/yasa/y/25687.doc](http://www.cevreorman.gov.tr/yasa/y/25687.doc).
5. Winn W Jr., Allen S., Janda W., Koneman E., Procop G., Schreckenberger P., Woods G. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. New York: Lippincott Williams and Wilkins; 2006. pp 212-248
6. Edberg SC., Rice EW., Karlin RJ., Allen MJ. *Escherichia coli*: the best biological drinking water indicator for public health protection. *Symp Ser Soc Appl Microbiol* 2000; **29**: 106-116.
7. Pathak SP., Gopal K. Prevalence of bacterial contamination with antibiotic resistant and enterotoxigenic fecal coliforms in treated drinking water. *J Toxic Environ* 2008; **71**: 427-433.
8. Murray PR., Rosenthal KS., Pfaller MA. *Medical Microbiology.*, Pennsylvania: Elsevier Mosby; 2005. pp 323-339.
9. Hamelin K., Bruant G., El-Shaarawi A., Hill S., Edge TA., Fairrother J., Harel J. ve ark. Occurrence of virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli* isolates from different aquatic ecosystems within the St. Clair River and Detroit river areas. *App Environmental Microbiology* 2007; **73** (2): 477-484.

10. Riley LW., Remis RS., Helgerson SD., McGee HB., Wells JG., Davis BR., Hebert RJ., Olcott ES., Johnson LM., Hargrett NT., Blake PA., Cohen ML. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* 1983; **308**: 681–685.
11. Wells JG., Davis BR., Wachsmuth IK., Riley LW., Remis RS., Sokolow R., Morris GK. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J Clin Microbiol* 1983; **18**: 512–520.
12. Puente JL., Brettfinlay B. Pathogenic *E. coli*. İçinde Groisman EA, editör. *Principles of Bacterial Pathogenesis*. California: Academic Press; 2001. pp 388-428.
13. Karch H., Bielaszewska M., Bitzan M., Schmidt H. Epidemiology and Diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; **34**: 229-243.
14. Mead PS, Griffin PM. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 1998; **352**: 1207-1212.
15. Johnson R.P., Clarke R.C., Wilson J.B., et al: Growing concerns and recent outbreaks involving non-O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*. *J Food Prot* 1996; **59**: 1112–1122.
16. Paton A.W., Ratcliff R.M., Doyle R.M., Seymour Murray J., Davos D., Lanser J.A., Paton J.C. Molecular microbiological investigation of an outbreak of hemolyticuremic syndrome caused by dry fermented sausage contaminated with Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol.* 1996; **34**: 1622–1627.
17. Mora A., Blanco JE., Blanco M., Alonso MP., Dhahi G., Echeita A. ve ark. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin) – producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology* 2005; **156**: 793-806.
18. Beutin L. Emerging Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*, causes and effects of the rise of a human pathogen. *J Vet Med* 2006; **53**: 299-305.

19. Takahashi E., Sultan Z., Shimada S., Aung W.W., Nyein M.M., Oo K.N., Nair G.B., Takeda Y., Okamoto K. Studies on diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Myanmar. *Microbiol Immunol* 2008; **52**: 2–8.
20. Trabulsi L.R., Keller R., Tardelli Gomes T.A.: Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* 2002; **8 (5)**: 508-513.
21. Qadri F., Svennerholm A M., Faruque A S G., Sack R B. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in Developing Countries: Epidemiology, Microbiology, Clinical Features, Treatment, and Prevention. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18 (3)**: 465-483.
22. Fascano A. Toxins and the gut: role in human disease. *Gut* 2002; **50**: 9-14.
23. Ram S., Vajpayee P., Singh R.L., Shanker R.: Surface water of a perennial river exhibits multi-antimicrobial resistant shiga toxin and enterotoxin producing *Escherichia coli*. *Ecotoxicol Environ Safety*. 2009; **72**: 490–495.
24. Tauxe RV. Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. *Emerging Infectious Disease* 1997; **3(4)**: 425-434.
25. Besser J., Beebe J., Swainathan B. Investigation of Foodborne and Waterborne Disease Outbreaks. İçinde Murray PR., Baron EJ., Tenoer PF., Pfaller MA., Tenoer PF., White O. editörler. *Manual of Clinical Microbiology* Volume 1. Washington DC. : ASM Baskısı; 2003. pp. 162-181.
26. Newell DG., Koopmans M., Verhoef L., Duizer E., Aidara-Kane A., Sprong H., Opsteegh M., Langelaar M., Threlfall J., Scheutz F., van der Giessen J., Kruse H. Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge, *International J Food Microbiol* 2010: 3-15.
27. [www.rivm.nl/infectieziektenbulletin/bull1607/art\\_trends.html](http://www.rivm.nl/infectieziektenbulletin/bull1607/art_trends.html)
28. Acheson DW. Foodborne infections. *Current Opinion in Gastroenterology* 1999; **15**: 538–545.
29. Fleckenstein JM, Bartels SR, Drevets PD, Bronze MS, Drevets DA. Infectious agents of food- and water-borne illnesses. *Am J Med Sci* 2010; **340(3)**: 238-46.



30. WHO 2003a. Quantifying selected major risks to health. The World Health Report 2002. World Health Organization, Geneva (Chapter 4).
31. Mead PS., Slutsker L., Dietz V., Mc Caig LF., Bresee JS., Shapiro C., Griffin PM., Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerging Infectious Diseases* 1999; **5**: 607–625.
32. Martinez JL. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science* 2008; **321**: 365-367.
33. Martinez JL. The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B* 2009; **276**: 2521-2530.
34. Kruse H., Sorum H. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural micro environment. *Applied and Environmental Microbol* 1994; **60**: 4015-4021.
35. Ashbolt NJ. Microbial contamination of drinkin water and disease outcomes in developing regions. *Toxicology* 2004; **198**: 229-238.
36. Leclerc H., Schwartzbrod L., Dei-Cas E. Microbial Agents Associated with Waterborne Diseases. *Critical Reviews in Microbiology* 2002; **28(4)**: 371-409.
37. Ford TE. Microbiological safety of drinking water: United States and Global perspectives. *Environmental Health Perspectives* 1999; **107**: 191-206.
38. WHO 2003. Emerging Issues in Water and Infectious Disease. World Health Organization, Geneva.
39. Nwachcuku N., Gerba CP. Emerging waterborne pathogens: can we kill them all?, *Current Opin Biotechnology* 2004; **15**: 175-180.
40. Kindhauser MK. (2003). Global defence against the infectious disease threat, Communicable Disease 2002 World Health Organization, Geneva.
41. Payment P., Siemiatycki J., Richardson L., Renaud G., Franco E., Prevost M. A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to consumption of drinking water. *Int J Environ Health Res* 1997; **7**: 5-31.

42. Jimenes B., Maya C., Sanches E., Romero A., Lira L., Barrios JA. Comparison of the quantity and quality of the microbiological content of sludge in countries with low and high content of pathogens. *Water Sci Tech* 2002; **46(10)**: 17-24.
43. Theron J., Cloete TE. Emerging waterborne infections: Contributing factors, agents and detectin tools. *Critical Reviews in Microbiology* 2002; **28(1)**: 1-26.
44. Mc Ginnis MJ., Foege WH. Actual cases of death in the United States. *JAMA* 1993; **270**: 2207.
45. Hrudey SE., Hrudey EJ., Pollard SJT. Risk management for assuring safe drinking water. *Environment International* 2006; **32**: 948-957.
46. Morse SS. Factors in the emergence of infectious disease. *Emerg Infect Dis* 1995; **1**: 7-15.
47. Sharma S., Sachdeva P., Viridi JS. Emerging water-borne pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003; **61**: 424-428.
48. Zhang XX., Zhang T., Fang HHP. Antibiotic resistance genes in water environment. *Appl Microbiol Biotechnol* 2009; **82**: 397-414.
49. Roberts MC. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2005; **245**: 195-203.
50. Roberts MC. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamides-streptogramin, trimethoprim and sulfonamide drug classes. *Mol Biothechnol* 2002; **20**: 261-283.
51. Shakil S., Khan R., Zarrilli R., Khan AU. Aminoglycosides versus bacteria—a description of the action, resistance mechanism, and nosocomial battleground. *J Biomed Sci* 2008; **15**: 5–14.
52. Ramón-García S., Otal I., Martín C., Gómez-Lus R., Aínsa JA. Novel streptomycin resistance gene from *Mycobacterium fortuitum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3920–3922.
53. Heuer H., Krögerrecklenfort E., Wellington EMH., Egan S., van Elsas JD., van Overbeek L., Collard JM., Guillaume G., Karagouni AD., Nikolakopoulou TL.,

- Smalla K. Gentamicin resistance genes in environmental bacteria: prevalence and transfer. *FEMS Microbiol Ecol* 2002; **42**: 289–302.
54. Roberts MC., Sutcliffe J., Courvalin P., Jensen LB., Rood J., Seppala H. Nomenclature for macrolide and macrolide-lincosamide streptogramin B antibiotic resistance determinants. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; **43**: 2823–2830.
55. Schwartz T., Kohnen W., Jansen B., Obst U. Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol Ecol* 2003; **43**: 325–335.
56. Li XZ., Mehrotra M., Ghimire S., Adewoye L.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Vet Microbiol* 2007; **121**: 197–214.
57. Özgümüş OB., Çelik-Sevim E., Alpay-Karaoğlu Ş., Sandallı C., Sevim A. Molecular characterization of antibiotic resistant *Escherichia coli* strains isolated from tap and spring waters in a coastal region in Turkey. *J Microbiology* 2007; **45(5)**: 379-387.
58. Morris JG., Potter M. Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Emerg Infect Dis* 1997; **3(4)**: 435-441.
59. Prier R., Solnick JV. Postgrad Med. Foodborne and waterborne infectious diseases. Contributing factors and solutions to new and reemerging pathogens. *Postgrad Med* 2000; **107(4)**: 245-52, 255.
60. Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science* 1992; **257**: 1064-1073.
61. D'Costa VM., Griffiths E., Wright GD. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Current Opinion in Microbiology* 2007; **10**: 481-489.
62. Nougayrede JP., Fernandes PJ., Sonnenberg MS. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cellular Microbiology* 2003; **5**: 359-372.
63. Gyles CL., editor. *Escherichia coli in domestic animals and humans*. Wallingford UK: CAB International; 1994.

64. Vila J., Vargas M., Casals C., Urassa H., Mshinda H., Schelleberg D., Gascon J. Antimicrobial Resistance of Diarrheagenic *Escherichia coli* Isolated from Children under the Age of 5 Years from Ifakara, Tanzania. *Antimicrob Agents and Chemotherapy* 1999; **43(12)**: 3022-3024.
65. Sang WK., Oundo JO., Mwituria JK., Waiyaki PG., Yoh M., Iida T., Honda T. Multidrug-Resistant Enteroaggregative *Escherichia coli* Associated with Persistent Diarrhea in Kenyan Children. *Emerging Infectious Disease* 1997; **3(3)**: 373-374.
66. Chomvarin C., Ratchtrachenchai OA., Chantarasuk Y., Srigulbutr S., Chaicumpar K., Namwat W., Kotimanusvanij D. Characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from food in Khon Kaen, Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2005; **36(4)**: 931-9.
67. Kahlmeter G., An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogen from uncomplicated urinary tract infections: the ECO·SENS Project. *J Antimicrob Chemother* 2003; **51**: 69-76.
68. Stratchounski LS., Rafalski VV., Antimicrobial susceptibility of pathogens isolated from adult patients with uncomplicated community-acquired urinary tract infections in the Russian Federation: two multicentre studies, UTIAP-1 and UTIAP-2. *Int J Antimicrob Agents* 2006; **28**: 4-9.
69. Akram M., Shahid M., Khan AU., Etiology and antibiotic resistance patterns of community-acquired urinary tract infections J N M C Hospital Aligarh, India. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007; **6**: 4.
70. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; **14**: 933-951.
71. Mehrgan H., Rahbar M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in a tertiary care hospital in Tehran, Iran. *Int J Antimicrob Agents* 2008; **31(2)**: 147-51.

72. Romero ED., Padilla TP., Hernández AH., Grande RP., Vázquez MF., García IG., García-Rodríguez JA., Muñoz Bellido JL. Prevalence of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. producing multiple extended-spectrum beta-lactamases. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007; **59(4)**: 433-437.
73. Bell JM., Turnidge JD., Gales AC., Pfaller MA., Jones RN. ve Sentry APAC Study Group. Prevalence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region and South Africa: regional results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1998-99). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002; **42(3)**: 193-198.
74. Walsh C., Duffy G., Nally P., O'Mahony R., McDowell DA., Fanning S. Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella* Typhimurium DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. *Letters in Applied Microbiology* 2008; **46**: 210–215.
75. Clarke SC., Haigh RD., Freestone PPE., Williams PH. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clinical Microbiology Review* 2003; **16(3)**: 365-378.
76. Germani Y., Begaud E., Le Bouguenec C. Detection of the *Escherichia coli* attaching and effacing gene (eaeA) in enteropathogenic strains by polymerase chain reaction. *Res Microbiol* 1997; **148**: 177-181.
77. Ghilardi ACR., Gomes TAT., Elias WP., Trabulsi LR. Virulence factors of *Escherichia coli* strains belonging to serogroups O127 and O142. *Epidemiol Infect* 2003; **131**: 815-821.
78. Ochoa TJ., Barletta F., Contreas C., Mercado E. New insights into the epidemiology of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008; **102(9)**: 852-856.
79. Cleary J., Lai L-C., Shaw RK., Straatman-Iwanowska A., Donnenberg MS., Frankel G., Knutton S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 2004; **150**: 527-538.

80. Mc Daniel TK., Jarvis KG., Donnenberg MS., Kaper JB. A genetic locus enterocyte effacement can served among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 1664-1668.
81. Kenny B., DeVinney R., Stein M., Reinscheid DJ., Frey EA., Finlay BB. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 1997; **91**: 511–520.
82. Kenny B. Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* 1999; **31**: 1229–1241.
83. Afset JE, Bergh K, Bevanger L. High prevalence of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) in Norwegian children with diarrhoea. *J Med Microbiol* 2003; **52(11)**: 1015-1019.
84. Nguyen RN, Taylor LS, Tauschek M, Robins-Browne RM. Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* infection and prolonged diarrhea in children. *Emerg Infect Dis* 2006; **12(4)**: 597-603.
85. Gascon J. Epidemiology, Etiology and Pathophysiology of Traveler’s Diarrhea. *Digestion* 2006; **73**: 102-108.
86. Abu-Elyazeed R., Wierzba TF., Mourad AS., Peruski LF., Kay BA., Rao M., Churilla AM., Bourgeois AI., Mortagy AK., Kamal SM. ve ark. Epidemiology of enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea in a pediatric cohort in a periurban area of lower egypt. *J Infect Disease* 1999; **179(2)**: 382-389.
87. Albert MJ., Faruque SM., Faruque AS., Neogi PK., Ansaruzzaman M., Bhuiyan NA., Alam K., Akbar MS. Controlled study of *Escherichia coli* diarrheal infections in Bangladeshi children. *J Clinical Microbiology* 1995; **33(4)**: 973-977.
88. Daniels NA., Neimann J., Karpati A., Parashar UD., Greene KD., Wells JG. ve ark. Traveler’s diarrhea at sea: three outbreaks of waterborne enterotoxigenic *Escherichia coli* on cruise ships. *J Infect Dis* 2000; **181(4)**: 1491-1495.

89. Blanco M., Blanco JE., Mora A., Rey J., Alonso JM., Hermoso M., Hermoso J., Alonso MP., Dahbi G. Ve ark. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Sheep in Spain. *J Clinical Microbiology* 2003; **41(4)**: 1351-1356.
90. Gyles CL, Palchaudhuri S, Maas WK. Naturally occurring plasmid carrying genes for enterotoxin production and drug resistance. *Science* 1977; **14**:198-199.
91. Rey J., Blanco JE., Blanco M., Mora A., Dahbi G., Alonso JM., Hermonso M. ve ark. Serotypes, page types and virulence genes of Shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Veterinary Microbiology* 2003; **94**: 47-56.
92. Bettelheim KA., Beutin L. Rapid laboratory identification and characterization of verocytotoxinogenic (Shiga toxin producing) *Escherichia coli* (VTEC/STEC). *J Applied Microbiology* 2003; **95**: 205-217.
93. <http://www.microbionet.com.au/vtecable.htm>.
94. Griffin PM., Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol Rev* 1991; 13:60–98.
95. Wang G., Doyle MP. Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in water. *Journal of Food Protection* 1998; **61**: 662–667.
96. Chalmers RM., Aird H., Bolton FJ. (2000). Waterborne *Escherichia coli* O157, *J Appl Microbiol*; 88: 124–132.
97. Skovgaard N. New trends in emerging pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 2007; **120**: 217–224.
98. Kaper J.B., Gansheroff L.J., Wachtel M.R., O'Brien A.D.: Intimin-mediated adherence of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* and Attaching-and-Effacing Pathogens. İçinde: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxinproducing *E. coli* strains. Eds, Kaper J.B., O'Brien A.D Washington, D.C.: ASM, 2005; pp. 148-157.

99. Bentancor A. Shiga toxin-producing and attaching and effacing *Escherichia coli* in cats and dogs in a high hemolytic uremic syndrom incidence region in Argentina. *FEMS Microbiol Lett* 2007; **267**: 251-256.
100. Ram S., Vajpayee P., Shanker R. Contamination of potable water distribution systems by multiantimicrobial-resistant Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Environ Health Perspect* 2008; **4**: 448-451.
101. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing Eighteenth Informational Supplement. CLSI document M100-S18. Wayne, P.A: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
102. Gür D., Söyletir G., Bal Ç., Dündar V., Sümerkan B., Köksal İ., Çiftçi U. Antibiyotik duyarlılık testlerinin standardizasyonu toplantısı, 11-12 Nisan 1997; syf: 101-111.
103. Fuentefria DB., Ferreira AE., Corção G. Antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from hospital waste water and superficial water: Are they genetically related?. *J Environmental Management* 2011; **92**: 250-255.
104. Bharath J., Mosodeen M., Motilal S., Sandy S., Sharma S., Tessaro T., Thomas K ve ark. Microbial quality of domestic and imported brands of bottled water in Trinidad. *International J Food Microbiology* 2003; **81**: 53-62.
105. Lin J., Biyela PT. Convergent acquisition of antibiotic resistance determinants amongs the Enterobacteriaceae isolates of the Mhlathuze River, KwaZulu-Natal (RSA). *Water SA* 2005; **31(2)**: 257-260.
106. Yin X., Stotzky G. Gene transfer among bacteria in natural environments. *Adv Appl Microbiol* 1997; **45**: 153-212.
107. Aminov RI., Garrigues-Jeanjean N., Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: Development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *App. Environ Microbiol* 2001; **67 (1)**: 22-32.



108. Olaoye OA., Onilude AA. Assessment of microbiological quality of sachet-packaged drinking water in Western Nigeria and its public health significance. *Public Health* 2009; **123**: 729-734.
109. Liguori G., Cavallotti I., Arnese A., Amiranda C., Anastasi D., Angelillo IF. Microbiological quality of drinking water from dispensers in Italy. *BMC Microbiology* 2010; **10 (19)**: 1-5.
110. Suthar S., Chhimpa V., Singh S. Bacterial contamination in drinking water: a case study in rural areas of northern Rajasthan, India. *Environ Monit Assess* 2009; **159**: 43-50.
111. Stojek NM., Szymańska J., Dutkiewicz J. Gram-Negative Bacteria in Water Distribution Systems of Hospitals. *Ann Agric Environ Med* 2008; **15**: 135-142.
112. Rutter M., Nichols GL., Swan A., De Louvois J. A survey of the microbiological quality of private water supplies in England. *Epidemiol Infect* 2000; **124**: 417-425.
113. Reinthaler FF., Feierl G., Galler H., Haas D., Leitner E. ve ark. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Research* 2010; **44**: 1981-1985.
114. Prado T., pereira WC., Silva DM., Seki LM., Carvalho AP., Asensi MD. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. *Lett Appl Microbiol* 2008; **46 (1)**: 136-141.
115. Lima-Bittencourt CI., Cursino L., Gonçalves-Dornelas H., Pontes DS., Nardi RMD., Callisto M., Chartone-Souza E. Nascimento AMA. Multiple antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae isolates from pristine freshwater. *Genetics and Molecular Reseach* 2007; **6(3)**: 510-521.
116. Toroğlu S., Dinçer S., Korkmaz H. Antibiotic resistance in Gram negative bacteria isolated from Aksu River in (Kahramanmaraş) Turkey. *Annals of Microbiology* 2005; **55(3)**: 229-233.

117. Servais P., Passerat J. Antimicrobial resistance of fecal bacteria in waters of the Seine river watershed (France). *Science of the Total Environment* 2009; **408**: 365-372.
118. Gad GF., El-Domany RA., Zaki S., Ashour HM. Characterisation of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical and environmental samples in Minia, Egypt: prevalence, antibiogram and resistance mechanisms. *J Antimicrob Chemother* 2007; **60**: 1010-1017.
119. Hamelin K., Bruant G., El-Shaarawi A., Hill S., Edge TA., Fairbrother J., Harel J. Ve ark. Occurrence of Virulence and Antimicrobial Resistance Genes in *Escherichia coli* Isolates from Different Aquatic Ecosystems within the St. Clair River and Detroit River Areas. *Appl Environmental Microbiol* 2007; **73(2)**: 477-484.
120. Alam M., Hasan NA., Ahsan S., Pazhani GP., Tamura K., Ramamurthy T. Ve ark. Phenotypic and molecular characteristics of *Escherichia coli* isolated from aquatic environment of Bangladesh. *Microbiol Immunol* 2006; **50(5)**: 359-370.
121. Schets FM., Duringa M., Italiaandera R., Heijnen L., Rutjesa SA., van der Zwaluw WK., de Roda AM. Husman *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water from private water supplies in the Netherlands. *Water Research* 2005; **39**: 4485-4493.
122. Halabi M., Orth D., Grif K., Wiesholzer-Pittl M., Kainz M., Schöberl J., Dierich MP., Allerberger F., Würzner R. Prevalence of Shiga toxin-, intimin- and haemolysin genes in *Escherichia coli* isolates from drinking water supplies in a rural area of Austria. *Int J Hyg Environ Health* 2008; **211**: 454-457.
123. Orth D., Würzner R. What Makes an Enterohemorrhagic *Escherichia coli*?. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 1168-1169.
124. Mellmann A., Bielaszewska M., Zimmerhackl LB., ve ark. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in human infection: in vivo evolution of a bacterial pathogen. *Clin Infect Dis* 2005; **41**: 785-92.

125. Hess B., Burchett A., Huntington MK. *Leclercia adecarboxylata* in an immunocompetent patient. *Journal of Medical Microbiology* 2008; **57**: 896-898.
126. Mazzariol A., Zuliani J., Fontana R., Cornaglia G. Isolation from Blood Culture of a *Leclercia adecarboxylata* Strain Producing an SHV-12 Extended-Spectrum Beta-Lactamase. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; **41(4)**: 1738-1739.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Defne	<b>Soyadı</b>	Gümüş
<b>Doğ.Yeri</b>	İstanbul	<b>Doğ.Tar.</b>	10.07.1981
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>TC Kim No</b>	12616971070
<b>Email</b>	defne_gumus@yahoo.com	<b>Tel</b>	05327897180

### Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mez. Yılı
<b>Doktora</b>	İÜ, İstanbul Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD	2011
<b>Yük.Lis.</b>	İÜ, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji AD	2006
<b>Lisans</b>	İÜ, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü	2003
<b>Lise</b>	Vefa Anadolu Lisesi	1999

### İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1.	Araştırma Görevlisi	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	2004-2006
2.			-
3.			-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*	ÜDS Puanı	(Diğer) Puanı
İngilizce	Çok İyi	İyi	Çok iyi	87,50	

\*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
<b>LES Puanı</b>	70,590	73,837	76,108
<b>(Diğer) Puanı</b>			

### Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office Word	Çok iyi
Microsoft Office Powerpoint	Çok iyi
İnternet	Çok iyi

### Yayınlari/Tebligleri Sertifikalari/Ödülleri

- Aygün G., Mete B., Aşık L., **Gümüş D.**, Yılmaz M., Demirel A., Aybar Bilir Y., Yaşar H., Canberk M B., Utku T., Kardeşahin K., Özdemir E., Erol S., Bağdatlı Y., Altaş K., Dikmen Y., Öztürk R. ‘Vankomisine dirençli enterokok salgını ve çevresel kontaminasyon: terminal dezenfeksiyon gerekli mi?’ 21. *ANKEM Kongresi*, Antalya, 22-26 Mayıs 2005.
- Yaşar H., Gümüş D., Aşık L., Aysul N., Gargılı A., Atlas K., Kesmezacar F., Yıldırım M. İstanbul valiliği Şehit Adem Yavuz ilköğretim okulu öğrencilerinde bağırsak parazitlerinin yayılışı. 14. *Ulusal Parazitoloji Kongresi*, İzmir, 18-25 Eylül 2005.
- Yaşar H., Güven Ö., Aygün G., Ak K., Aşık L., **Gümüş D.**, Gargılı A. ‘İlkokul çocuklarında vankomisine dirençli enterokok araştırılması.’ 22. *ANKEM Kongresi*, Antalya, 29 Nisan-3 Mayıs 2007.
- Anđ Küçüker M., **Gümüş D.**, Sertel D., Gönüllü N., Anđ Ö., ‘Salmonella strains still alive since 1968.’ *IUMS Congress. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology*, İstanbul/Turkey, 5-9 August 2008.
- Nakipoğlu Y., Esen A. E., **Gumus D.**, Kekulluoğlu H., Derbentli Ş. ‘A pilot study on the bacteriological activity of a nanotechnological product ‘Bacoban™’’: Disinfection of inuse stethoscopes.’ *IUMS Congress. XII. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology*, İstanbul/Turkey, 5-9 August 2008.
- **Gümüş D.**, Sertel D., Nakipoğlu Y., Anđ Küçüker M. ‘VRE kolonizasyonun saptanmasında uygun besiyeri araştırılması.’ *XXXIII. Türk Mikrobiyoloji Kongresi*, Bodrum, 21-25 Ekim 2008.
- Nakipoğlu Y., **Gümüş D.**, Sertel Şelale D., Anđ Küçüker M. ‘Susceptibility of *Enterococcus* strains to high level aminoglycoside, and heavy metals’ *The 3rd Congress of European Microbiologist FEMS*, Gothenburg/Sweden, June 28-July 2. 2009.
- Sertel Şelale D., **Gümüş D.**, Anđ Küçüker M. ‘The Influence of Urine and Urine Containing Methylmalonate on the In Vitro Antimicrobial Activity of Various

Antibiotics', *The 3rd Congress of European Microbiologist FEMS*, Gothenburg/Sweden, June 28-July 2 2009.

- Nakiboglu Y, **Gümüş D**, Sertel Şelale D, Anđ Küçüker M. 'Enterokok suşlarının yüksek düzeyde aminoglikozidlere ve ağır metallere duyarlılıklarının araştırılması.' *Mikrobiyol Bul*, Cilt 43, No. 4, (2009).
- **Gümüş D**, Bağdatlı Y. 'A bacteriological examination of urine before and after urodynamic testing.' *Turk J Med Sci*, Cilt 40, No. 2, (2010).
- **Gümüş D.**, Küçüker Anđ M., Özdem Anđ. Influence of Bile Salts on Antibiotic Susceptibilities of *E. coli* Strains The power of microbes in industry and environment. *Central European Symposium on industrial microbiology and microbial ecology*. Malinska-Croatia Semptember 22-25, 2010.

**Özel İlgi Alanları (Hobileri):**

Tiyatro, Sinema, Edebiyat