

T. C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



GIDALARDAN İZOLE EDİLEN ENTEROBACTERIACEAE SUŞLARINDA
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER
YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

DOKTORA TEZİ

İsmail Hakkı TEKİNER
(Y1113.640007)

Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı
Gıda Mühendisliği Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

MART-2016



15/03/2016

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DOKTORA TEZ ONAY BELGESİ

Enstitümüz Gıda Mühendisliği Ana Bilim Dalı, Gıda Mühendisliği Bütünleşik Doktora Programı Y1113.640007 numaralı öğrencisi İsmail Hakkı TEKİNER'in "GIDALARDAN İZOLE EDİLEN ENTEROBACTERİACEAE SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI" adlı doktora tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 12/02/2016 tarih ve 2016/05 sayılı kararı ile oluşturulan jüri tarafından ile Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

	Unvan- Ad-Soyad	İmza
Danışman	Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR	
Üye (TİK)	Prof. Dr. Şükrü KARATAŞ	
Üye (TİK)	Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK	
Üye	Prof. Dr. Kamil BOSTAN	
Üye	Prof. Dr. Beraat ÖZÇELİK	

Tezin Savunulduğu Tarih: 15/03/2016

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 30/03/2016 tarih ve 2016/09 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

Enstitü Müdürü

YEMİN METNİ

Doktora Tezi olarak sunduğum “**Gıdalardan İzole Edilen Enterobacteriaceae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Moleküler Yöntemle Araştırılması**” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadar ki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve etik geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. (15.03.2016)

İsmail Hakkı TEKİNER



ÖNSÖZ

Bu aşamaya kadar gelmemde çok sayıda kişinin destekleri bulunmaktadır. Başta, Üniversiteye girdiğimden itibaren her türlü desteği esirgemeyen, Doktora yapma konusunda beni destekleyen ve teşvik eden, Doktoramın tüm safhalarında maddi ve manevi olanakları sağlayan değerli Doktora yürütücüm ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü Sayın Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR'a tüm içtenliklerimle teşekkürü bir borç bilirim.

Tez İzleme Komitesi Üyesi Sayın Prof. Dr. Oğuz ÖZTÜRK'e destekleri, tenkitleri ve yönlendirmeleri için teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince yardımlarını gördüğüm Prof. Dr. Kamil BOSTAN, Prof. Dr. Güner ARKUN, Prof. Dr. Gökhan AYGÜN, Doç. Dr. Ömer AKINEDEN, Selçuk Ahmet ALGINGİL, Mehmet Zeki ÖÇLÜ, Açelya Yalçıntaş OĞUZ, Nida KÜÇÜK, tüm Aile yakınlarım ile varlığımı borçlu olduğum Ülkem ve Aziz Milletime şükranlarımı sunarım.

15 Mart 2016

İsmail Hakkı TEKİNER





Filiz, Aslı Duru ve Ada Göktürk'e...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ.....	vii
İÇİNDEKİLER	xi
KISALTMALAR	xiii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xv
ÇİZELGE LİSTESİ.....	xvii
ÖZET.....	xix
ABSTRACT	xxi
1 GİRİŞ ve AMAÇ	1
2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Enterobacteriaceae.....	3
2.1.1 GSBL-üreten Enterobacteriaceae.....	3
2.2 Antibiyotik Ajanlar.....	4
2.2.1 Beta-laktam antibiyotikler.....	4
2.2.2 Beta-laktam antibiyotiklerin etki mekanizması	5
2.3 Direnç Tipleri	8
2.3.1 Doğal direnç	8
2.3.2 Kazanılmış direnç.....	9
2.4 Direnç Mekanizmaları	9
2.5 Direnç Genetiği	13
2.5.1 İntegron	14
2.5.2 İnsersiyon sekansı	14
2.5.3 Transpozon.....	15
2.5.4 Plazmid.....	15
2.5.5 Bakteriyofaj.....	16
2.6 Direnç Aktarımı Modları.....	16
2.6.1 Transformasyon.....	16
2.6.2 Transdüksiyon	17
2.6.3 Konjugasyon	17
2.7 Beta-Laktamazlar (<i>bla</i>).....	19
2.7.1 Genişlemiş-spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL).....	21
2.7.1.1 A Sınıfı GSBL.....	22
2.7.1.2 Diğer GSBL tipleri.....	24
2.7.2 C Sınıfı AmpC-tipi beta-laktamazlar	24
2.7.3 B Sınıfı Metallo-tipi beta-laktamazlar	25
2.8 GSBL-Üreten Enterobacteriaceae Epidemiyolojisi.....	25
2.8.1 Hastane kaynaklı GSBL-üreten Enterobacteriaceae	25
2.8.2 Toplumsal kaynaklı GSBL-üreten Enterobacteriaceae.....	28
2.8.3 Gıda kaynaklı GSBL-üreten Enterobacteriaceae	31
2.9 GSBL Tespit Yöntemleri.....	34
2.9.1 Fenotipik yöntemler	35
2.9.2 Genotipik yöntemler.....	36

2.9.2.1	DNA sekanslama ve BLAST analizi.....	37
3	GEREÇ ve YÖNTEM.....	43
3.1	Gereç.....	43
3.1.1	Kontrol suşları.....	43
3.1.2	GSBL-pozitif Enterobacteriaceae suşlar.....	43
3.2	Yöntem.....	44
3.2.1	DNA izolasyonu.....	44
3.2.2	PCR primer setleri seçimi.....	44
3.2.3	PCR amplifikasyonu.....	45
3.2.4	Agaroz jel hazırlama.....	49
3.2.5	Agaroz jel yürütme ve görüntüleme.....	50
3.2.6	DNA sekanslama.....	51
3.2.7	İstatistik değerlendirme.....	51
4	BULGULAR.....	53
4.1	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} ve <i>bla</i> _{CTX-M} Bulguları.....	53
4.2	<i>bla</i> _{CTX-M} altgrup Bulguları.....	56
4.3	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} ve <i>bla</i> _{CTX-M} Genleri Kombinasyonları Bulguları.....	57
4.4	DNA Sekanslama ve BLAST Analizi Bulguları.....	58
4.5	İstatistik Bulgular.....	65
5	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	67
5.1	Gıda Kaynaklı GSBL-Pozitif Enterobacteriaceae Genel Durumu.....	68
5.2	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} ve <i>bla</i> _{CTX-M} Genel Durumu.....	70
5.3	<i>bla</i> _{CTX-M} Altgruplarının Durumu.....	73
5.4	Gıda Bilimi ve Halk Sağlığı Açılılarından Bulguların Önemi ve Öneriler ...	76
	KAYNAKLAR.....	81
	ÖZGEÇMİŞ.....	101

KISALTMALAR

A	: Adenin
AB	: Avrupa Birliği
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
AMP-C	: Aminopenisilin İnaktive Eden Sefalosporinaz
BAE	: Birleşik Arap Emirlikleri
BES	: Brazilian Extended-Resistance
bla	: Beta-Laktamaz
BLAST	: Basic Local Aligment Search Tool
bp	: Baz Çifti
BSAC	: British Society for Antimicrobial Chemotherapy
C	: Sitozin
CAC	: Kodeks Alimentarius Komisyonu
CA-SFM	: Comite de l'Antibiogramme de la Societe Française deMicrobiologie
CAZ	: Seftazidim
CDC	: Centres for Disease Control and Prevention
CDC	: Calibrated Dichotomous Sensitivity Test
CED	: Avrupa Diş Hekimleri Konseyi
CEP	: Sefepim
CLA	: Klavulanik Asit
CLSI	: Clinical and Laboratory Standards Institute
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu
CMC	: Sefepim/Klavulanik Asitli
COX	: Sefoksitin
CPCM	: Avrupa Doktorlar Komitesi
CPD	: Sefpodoksim
CPO	: Sefpirom
CTX	: Sefotaksim
CTX-M	: Sefotaksimaz
DDJB	: Japonya Veri Tabanı
ddNTP	: Dideoksinükleotid trifosfat
DIN	: Deutsches Institut für Normung
dk	: Dakika
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
dNTP	: Deoksinükleotid trifosfat
ECDC	: European Centre for Disease Prevention and Control
EARSS	: European Antimicrobial Resistance Surveillance System
EE	: Enterobacteriaceae Ön Zenginleştirme
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi
EMBL	: Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı
ERT	: Ertapenem
ESBL	: Extended Spectrum beta-Lactamase
EU	: European Union
EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
FUTI	: Gıda Kaynaklı Üriner Sistem İnfeksiyonu
FVE	: Avrupa Veteriner Hekimler Federasyonu
G	: Guanin
GES	: Guyana Extended-Resistance
GN	: Gram negatif
GP	: Gram pozitif
GSBL	: Genişlemiş Spektrumlu beta-Laktamaz
HÜS	: Hemolitik Üremik Sendrom
I	: Orta Duyarlı
IFT	: Gıda Teknologları Enstitüsü
INSDC	: International Sequence Database Colloboration
Int	: İntegron
İS	: İnsersiyon Sekansları
lt	: Litre
KOB	: Koloni Oluşturan Birim
KPC	: <i>K. pneumoniae</i> Sefalosporinaz
MBL	: Metallo-beta-Laktamaz
MER	: Meropenem
MHA	: Muller Hinton Agar
MİK	: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu
MS	: Kütle Spektrometresi
NCBI	: Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi
OECD	: Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü
µl	: Mikrolitre
µg	: Mikrogram
ml	: Mililitre
OIE	: Office International des Èpizooties
ORF	: Açık Okuma Çerçevesi
OXA	: Oksasilin
PBP	: Penisilin Bağlayan Protein
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PER	: Pseudomonas Extended-Resistance
R	: Dirençli
Real-time PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S	: Duyarlı
SMART	: Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends
SRGA	: Swedish Reference Group for Antibiotics
Std	: Standart
SVH	: Sülfidril Hiper Variabil
T	: Timin
TBE	: Tris-Borat-EDTA
TEM	: Temoniera
Tn	: Transpozon
ÜSE	: Üriner Sistem İnfeksiyonu
V	: Volt
VEB	: Vietnamese Extended-Resistance
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

Şekil 2.1: Beta-laktam halkası ve farklı beta-laktam antibiyotikler	5
Şekil 2.2: Penisilin ve sefalosporin.....	5
Şekil 2.3: GSBL-üreten Enterobacteriaceae kaynakları	6
Şekil 2.5: Kazanılmış direnç.....	11
Şekil 2.6: Bakteriyel direnç stratejileri	13
Şekil 2.7: Mobil genetik elemanların hiyerarşisi.....	16
Şekil 2.8: Direnç aktarımı modları	17
Şekil 2.9: Transformasyon mekanizması.....	18
Şekil 2.11: Konjugasyon mekanizması	19
Şekil 2.12: Beta-laktamazların sınıflandırılması	20
Şekil 2.13: Beta-laktamazların etki mekanizması	21
Şekil 2.14: TEM-1 aminoasit farklılaşması ve yeni TEM-52 oluşumu.....	22
Şekil 2.15:CTX-M-tipi beta-laktamaz üreten Enterobacteriaceae dağılımı	24
Şekil 2.16: GSBL üreten <i>E. coli</i> izolatların 2001 yılı itibariyle bulunma sıklığı	26
Şekil 2.17: GSBL üreten <i>E. coli</i> izolatların 2012 yılı itibariyle bulunma sıklığı	26
Şekil 2.18: Toplumsal kaynaklı GSBL pozitif Enterobacteriaceae taşıyıcı sayısı	30
Şekil 2.19: Nükleotidler.....	38
Şekil 2.20: Nükleotidlerin DNA sarmalı oluşturması	39
Şekil 2.21: Floresan işaretli terminatör döngüsel sekanslama aşamaları	39
Şekil 2.22: Döngüsel sekanslama aşamaları.....	40
Şekil 2.23: Dört renkli floresans ve tek renkli radyoaktif sekanslama	40
Şekil 2.24: DNA sarmalların sekanslaması	41
Şekil 2.25: DNA sekansların kıyaslaması	41
Şekil 2.26: Sekanslama kromatogram sonuçları.....	42
Şekil 4.1: <i>bla</i> _{SHV} gen bölgesi jel elektroforez görüntüsü.....	53
Şekil 4.2: <i>bla</i> _{TEM} gen bölgesi jel elektroforez görüntüsü.....	54
Şekil 4.3: <i>bla</i> _{CTX-M} gen bölgesi jel elektroforez görüntüsü.....	54
Şekil 4.4: <i>bla</i> genlerin enterobakteri tipine göre dağılımı (%)	55
Şekil 4.5: <i>bla</i> _{CTX-M-1} ve <i>bla</i> _{CTX-M-8} jel elektroforez görüntüsü.....	56
Şekil 4.6: <i>bla</i> _{CTX-M} altgrupların enterobakteri tipine göre dağılımı (n).....	57
Şekil 4.7: <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} ve <i>bla</i> _{CTX-M} genlerin kombinasyonları dağılımı (%)	57
Şekil 4.8: <i>bla</i> genlerin enterobakteri tipine göre çoklu bulunma durumu (n)	58
Şekil 4.9: <i>bla</i> _{TEM} sekanslama kromatogram baz dizilimi	59
Şekil 4.10: <i>bla</i> _{TEM} BLAST analizi benzeşme sonuçları	60
Şekil 4.11: <i>bla</i> _{SHV} sekanslama kromatogram baz dizilimi.....	61
Şekil 4.12: <i>bla</i> _{SHV} BLAST analizi benzeşme sonuçları.....	62
Şekil 4.13: <i>bla</i> _{CTX-M} sekanslama kromatogram baz dizilimi	63
Şekil 4.14: <i>bla</i> _{CTX-M} BLAST analizi benzeşme sonuçları	64



ÇİZELGE LİSTESİ

SAYFA

Çizelge 2.1: Veteriner ve beşeri tıpta kullanılan beta-laktam antibiyotikler	7
Çizelge 2.2: Beta-laktam ajanlara karşı direnç mekanizmaları	12
Çizelge 3.1: GSBL-pozitif suşların dağılımı	43
Çizelge 3.2: <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} ve <i>bla</i> _{CTX-M} primer dizilimleri	44
Çizelge 3.3: <i>bla</i> _{CTX-M} altgrupları primer dizilimleri	45
Çizelge 3.4: <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} ve <i>bla</i> _{CTX-M} solüsyon içerikleri	46
Çizelge 3.5: <i>bla</i> _{TEM} PCR Koşulları	47
Çizelge 3.6: <i>bla</i> _{SHV} PCR Koşulları	47
Çizelge 3.7: <i>bla</i> _{CTX-M} PCR Koşulları	47
Çizelge 3.8: <i>bla</i> _{CTX-M} altgrupları PCR solüsyonu içeriği	48
Çizelge 3.9: <i>bla</i> _{CTX-M} altgrupları PCR koşulları	49
Çizelge 3.10: <i>bla</i> -genleri ampikon büyüklükleri	50
Çizelge 4.1: Bakteri tiplerine göre <i>bla</i> genlerin dağılımı	55



GIDALARDAN İZOLE EDİLEN ENTEROBACTERIACEAE SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Günümüzde hastane ve toplumsal kaynaklı olarak dirençli bakterilere artan şekilde rastlanmaktadır. Bu yeni tür biyolojik tehlike tüm Dünya’da insan sağlığını ciddi şekilde tehdit eder seviyelere gelmiştir. Bu nedenle WHO, FAO ve EFSA gibi otoriteler araştırmacıları bu konu üzerinde araştırma yapmaları için teşvik etmektedirler. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) plazmid-aracılı *bla*-genleri tarafından kodlanan, beta-laktam antibiyotikleri enzimatik inaktivasyon direnç mekanizması yoluyla etkisizleştiren ve infeksiyon tedavilerini başarısız kılan enzimlerdir. GSBL-kodlayan *bla*-genlerin farklı ve/veya türdeş bakteriler arasında aktarılabılır olmaları risk doğurmaktadır. Bakterilerde direnç gelişimi ve yayılmasında hastane ve toplumsal kaynaklı etmenler dışında gıdaların da potansiyel rolleri oldukları düşünülmektedir. Türkiye’de GSBL-kodlayan *bla*-genlerin varlıklarını tespiti dönük hastane ve toplumsal kaynaklı araştırmalar yapılmış olmakla birlikte, gıda kaynaklı bulgular üzerinde ciddi şekilde durulmamıştır. Bu çalışmada hayvansal kaynaklı gıda maddelerinden izole edilen ve kütle spektrometresi ile tiplendirilen toplam 55 adet GSBL-üreten Enterobacteriaceae suşlarında *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genleri ile *bla*_{CTX-M} altgruplarının karakterizasyonu amaçlanmıştır. GSBL-pozitif izolatlardan elde edilen DNA materyaller Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) ile amplifiye edilmiş ve amplikonları jel elektroforez tekniği ile görüntülenmiştir. Görüntülenen 1 adet *bla*_{TEM} pozitif, 1 adet *bla*_{SHV} pozitif ve 1 adet *bla*_{CTX-M} pozitif amplikonlar saflaştırılmış, sekanslanmış ve BLAST Programı kullanılarak benzeşme doğrulamaları yapılmıştır. İstatistik analiz için SPSS 19 programı kullanılmıştır. GSBL-kodlayan *bla* genlerin gıda grupları bazında bulunma sıklıklarının niteliksel kıyaslaması Kruskal-Wallis H-testi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar P<0,05 seviyesinde anlamlı kabul edilmiştir. Moleküler incelemeler *bla*-genlerin dağılımını %96,4 *bla*_{TEM}, %65,5 *bla*_{CTX-M} ve %34,5 *bla*_{SHV} olarak vermiştir. İzolatların %81,8’inin birden fazla *bla*-geni taşıdıkları tespit edilmiştir. *bla*-genlerin kombinasyonları %57,8 *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}, %22,2 *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV}, %17,8 *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV}+*bla*_{CTX-M} ve %2,2 *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M} olarak tayin edilmiştir. CTX-M-pozitif amplikonlar ileri analize alınmış ve alt grupları %97,2 *bla*_{CTX-M-1} ve %2,8 *bla*_{CTX-M-8} olarak karakterize edilmiştir. Sekanslama ve BLAST analizi sonuçları üç adet GSBL-pozitif amplikonların taşıdıkları *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genleri doğrulamıştır. İstatistik değerlendirme GSBL-kodlayan *bla*-genler için hayvansal kaynaklı gıdaların türüne bakılmaksızın potansiyel kaynak olduklarını göstermiştir. Sonuç olarak, hayvansal kaynaklı gıdalardan izole edilen Enterobacteriaceae suşlarının GSBL-kodlayan *bla*-genleri taşıdıkları, çoklu direnç özellikleri gösterdikleri ve tüketicilerin bu genetik materyaller ile kolonize olma riski taşıdıkları tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, Enterobacteriaceae, GSBL, PCR, BLAST.



CHARACTERIZATION OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES IN ENTEROBACTERIACEAE FROM FOODS USING MOLECULAR METHOD

ABSTRACT

Clinical and community-related resistant bacteria are widely found in the present time. This new type of biohazard is a growing health concern of Global significance for human health. That's why, international authorities, including WHO, FAO and EFSA, are enhancing the researchers to focus on this issue. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) are the enzymes that are encoded by plasmid-mediated *bla*-genes. inactivate beta-lactam antibiotics through a mechanism of resistance, so-called enzymatic inactivation, and lead to failure of treatment of bacterial infections. The *bla*-genes are easily transferable among the same and/or different bacterial species. Not only clinical and community settings, foods are also under suspicion for development and transmission of antibiotic resistance in bacteria. In Turkey, clinical and community-related ESBL-producers were examined well, whereas foodborne dissemination was not questioned seriously. The objective of this study was to characterize *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes and *bla*_{CTX-M} subtypes in 55 ESBL-producing Enterobacteriaceae isolated from foods of animal origin after identification by mass spectrometer. DNA materials from each ESBL-positive isolate were initially amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR), and subsequently visualised by gel-electrophoresis. Within them, 1 *bla*_{TEM} positive amplicon, 1 *bla*_{SHV} positive amplicon and 1 *bla*_{CTX-M} positive amplicon were purified, sequenced, and confirmed using BLAST Program. SPSS 19 was used for statistical analysis. Kruskal-Wallis H-test was performed for qualitative-comparison of frequency rate of each *bla*-genes with respect to their sampling groups. P<0.05 was considered to be significant. Genotypic results showed that frequency rates of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} were determined to be 96.4%, 65.5%, and 34.5%, respectively. The co-existence of *bla*-genes were found as 57.8% *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}, 22.2% *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV}, 17.8% *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}+*bla*_{SHV}, and 2.2% *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}. Subtyping CTX-M-positive amplicons revealed that the most common subtype of *bla*_{CTX-M} was 97.2% *bla*_{CTX-M-1}, followed by 2.8% *bla*_{CTX-M-8}. Sequencing and BLAST analysis also confirmed *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes. The statistical evaluation provided that foods of animal-origin were potential sources for ESBL-encoding *bla*-genes regardless type of food. To conclude, we found that Enterobacteriaceae from foods of animal origin harboured ESBL-encoding *bla*-genes in some foods of animal origin, indicated a multiresistance pattern, and led to the colonization of the consumers with these spreadable genetic materials.

Keywords: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, Enterobacteriaceae, ESBL, PCR, BLAST



1 GİRİŞ ve AMAÇ

Antibiyotikler, insanlar ve hayvanlarda infeksiyon tedavisinde kullanılan kimyasal maddelerdir (Wang ve ark. 2012). Son yıllara kadar beşeri tıp bilimlerinin en büyük antibiyotik tüketicisi grup olduğu şeklinde yaygın bir inanış bulunmaktaydı. Ancak, Dünya üzerinde üretilen antibiyotikler ve anabolik maddelerin 2/3'ünden fazlasının ziraat ve hayvancılık alanlarında tüketildikleri ve bu durumun 60 yıldır kesintisiz devam ettiği belirtilmektedir (Laxminarayan ve ark. 2013).

Aşırı ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı mikroorganizmalarda direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır (Seiffert ve ark. 2013). Antibiyotiklere dirençli bakteri türleri arasındaki ilişkiler anlaşılmaya çalışılmaktadır (Sharmah ve ark. 2006). Bu nedenle, WHO, FAO ve EFSA gibi Uluslararası otoriteler antibiyotiklere direnci “Biyolojik Tehlike” sınıfına alarak, yayılış yollarının anlaşılması ve önleyici tedbirlerin belirlenmesi için epidemiyolojik araştırmaları teşvik etmektedir (EFSA 2011; WHO 2013).

Antibiyotiklere direnç gelişiminin son 70 yıl içinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Ancak, Bering Boğazında 30.000 yıldır donmuş halde duran toprak tabakalarından izole edilen bakterilerde yapılan genomik analizler antibiyotiklere karşı direnç kodlayan farklı genlerin ataları hakkında şaşırtıcı bilgiler vermiştir (D'Costa ve ark. 2011).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) Enterobacteriaceae familyasına bağlı türler arasında en yaygın görülen enzimlerdir (Cherkaoui ve ark. 2014). Bu tip enzimler, penisilinler, 1., 2. ve 3. nesil sefalosporinler ve aztreonamı hidrolize ederek etkisizleştirmekte ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörleri tarafından baskılanmaktadırlar (Rupp ve Fey, 2003).

Bu tip enzimleri üreten enterobakterlerin sebep oldukları infeksiyonların tedavilerinde başarısız sonuçlar alınmakta; morbidite, mortalite ve sağlık giderlerinde artış görülmektedir (EFSA 2011).

Başlıca GSBL'ler "Temoniera; TEM", "Sülfidril Hiper Variabil; SHV" ve "Sefotaksimaz; CTX-M" tipi enzimlerdir. Bu tip enzimler *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} gibi genler tarafından kodlanmaktadır (Giedraitienė ve ark. 2011; Habeeb ve ark. 2013). Üçüncü nesil sefalosporinler ve aztreonamın veteriner tıp ve beşeri tıp alanlarında yoğun kullanımı bu tip enzimleri üreten bakteriler ve *bla*-genlerin yayılmalarında başlıca rol oynamaktadır (Rice 2009).

GSBL-kodlayan *bla*-genlerin farklı ve/veya türdeş bakteriler arasında aktarılabılır olmaları, insan barsak mikroflorasının GSBL-pozitif Enterobacteriaceae ve *bla*-genler ile kolonize olma riskini doğurmaktadır. Bu olumsuz durum infeksiyon tedavilerinin başarısını sınırlandırmakta ve gittikçe karmaşık hal almaktadır (García-Tello ve ark. 2014).

Hastane ve toplumsal kaynaklı sebeplerin dışında, gıdaların da antibiyotiklere dirençli suşlar ve direnç kodlayan genetik materyallerin yayılmalarında etkin rolleri oldukları düşünülmektedir (Tängdén ve ark. 2010).

Türkiye'de özellikle enterobakterilerde GSBL-kodlayan *bla*-genlerin varlıklarını tespitte dönük hastane ve toplumsal kaynaklı araştırmalara yoğun şekilde rastlanmaktadır (Zaniani ve ark. 2012; Sharma ve ark. 2013). Ancak, gıda kaynaklı bulgular Dünya'da ve Türkiye'de henüz yeterli şekilde sorgulanmamıştır (FAO 2015). Türk hayvancılık sektöründe antibiyotik kullanımının yeterli şekilde kontrol edilmemesi ve etkin takip sistemi olmaması *bla*-genlerin gıdalar yoluyla hızla yayılmalarının temel sebebini teşkil etmektedir (OECD 2015).

Direnç kodlayan genlerin benzer ve farklı türler arasında aktarılabilmeleri beta-laktamaz üreten enterobakterilerin yayılmalarını önlemede en ciddi engeldir. Gıda teknolojileri fırsatçı veya patojen mikroorganizmaların gıdalarda varlıklarını ortadan kaldırmaya dönük işlemler uygulamaktadır. Ancak, bu teknolojiler dirençten sorumlu genetik materyali ortadan kaldırmamaktadır. Bu sebeple, gıda teknolojilerinde ileri mühendislik çalışmaları yapılması gerekmektedir.

Bu çalışmada, hayvansal kaynaklı gıda maddelerinden izole edilmiş ve kütle spektrometresi ile tiplendirilen toplam 55 adet GSBL-üreten Enterobacteriaceae suşlarında bu tip beta-laktamazları kodlayan *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genleri ile *bla*_{CTX-M} altgruplarının karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Enterobacteriaceae

Enterobacteriaceae familyası üyeleri Gram-negatif (GN), basil, fakültatif anaerob, sporsuz, glukoz ve diğer şekerleri fermente eden, nitratı nitrite indirgeyen, oksidaz negatif, katalaz pozitif ve insan ve hayvan barsak mikroflorasının önemli bileşeni olan bakterilerdir (Doğan ve ark. 1996).

Başlıca üyeleri arasında *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Kluyvera* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. ve *Eschericia (E.) coli* gibi türler bulunmaktadır (Torlak 2011).

Bu bakterilerin fırsatçı ve patojen olanları septisemi, üriner sistem enfeksiyonları, pnömoni, kolesistit, kolanjit, peritonit, yara enfeksiyonları, menenjit, gastroenterit gibi birçok ciddi enfeksiyona sebep olmaktadır (Tham ve ark. 2012).

Dünya’da her yıl ortalama 130 ila 175 milyon kişinin enterobakter kaynaklı üriner sistem enfeksiyonuna yakalandıkları ve tedavi giderlerinin yıllık 1,5 milyar \$’ı bulunduğu bildirilmektedir (Foxman 2003).

2.1.1 GSBL-üreten Enterobacteriaceae

Araştırmalar GSBL üreten enterobakterilerin ilk identifiye edildikleri 1983 yılından bu yana farklı coğrafi bölgelerde geniş şekilde yayılma göstermişlerdir (Mesa ve ark. 2006). EFSA 25 üye ülkenin verilerine dayanarak antibiyotiklere karşı en çok direnç geliştiren türlerin enterobakteriler olduğunu bildirmiştir (EFSA 2010).

Bu durumu tetikleyen başlıca etmenler arasında enterobakterlerin klonal genişlemeleri, direnç genlerini transfer edilebilmeleri ve *novo* ortaya çıkışlar gelmektedir (WHO 2013).

GSBL üreten Enterobacteriaceae familyasına ait suşlar üçüncü nesil sefalosporin ve aztreonamı hidrolize ederek etkinliklerini yitirmelerine ve tedavilerin başarısız olmasına sebep olmaktadır (Paterson ve Bonomo 2005).

Enterobacteriaceae üyelerinde antibiyotiklere direncin en önemli mekanizması beta-laktamaz enzimleri üretilmesidir. GSBL üreten enterobakterilere hastane, toplumsal ve gıda kaynaklı rastlanmaktadır (EFSA 2011). Son yıllarda çok sayıda araştırmacı GSBL-üreten enterobakterilerin ekonomik ve sağlık boyutları, gelişimi, yayılımı ve etki mekanizmalarını irdeleyen araştırmalara ilgi göstermektedirler (Capita ve Alonso-Calleja, 2013). GSBL-üreten *E. coli* hakkında duyulan kaygılar gittikçe artmaktadır. Dirençli *E. coli* kaynaklı infeksiyonlardan ölüm oranı GSBL-üretmeyen *E. coli* kaynaklı infeksiyonlardan ölüm oranına göre üç katı daha yüksek oranda gerçekleşmektedir. Ayrıca, 2000'li yıllardan itibaren dirençli *E. coli* bulunma sıklığı dikkat çekici şekilde artış göstermektedir (Rao ve ark. 2014).

2.2 Antibiyotik Ajanlar

Antibiyotik ajanlar inflamasyonla seyreden hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (Ayhan ve Taş 2013). Bir antibiyotik ilacın geliştirme süreci yaklaşık 10 yıl almaktadır (Barker 1999). İnsanlık tarihinde bilinen en eski antimikrobik ajan *Penicillium chrysogenum*'dur. Benzer şekilde Milattan önce (M.Ö.) 3000'de Çin'de küflenmiş soya fasülyesi, M.Ö. 1500'de Mısır'da bozulmuş arpa ekmeği, Milattan Sonra (M.S.) 2.yüzyılda Srilanka'da küflü yağlı tohum küspesi ve M.S. 16.yüzyılda Yunanistan'da peynir küfü infeksiyon tedavisinde kullanılmıştır (Page 2012).

Modern antibiyotik ajanlar bakterilere hücre duvarı sentezinin inhibe edilmesi (vankomisin, sefalosporinler, penisilinler, karbapenemler), 50S ve 30S ribozomal yapı protein sentezinin inhibe edilmesi (kloramfenikol, eritromisin, kanamisin, tetrasikline) ve DNA giraz ile RNA sentez metabolizmalarının inhibe edilmesi (kinolonlar, rifampisin) gibi farklı mekanizmalar aracılığıyla etki etmektedirler (Durupınar 2001).

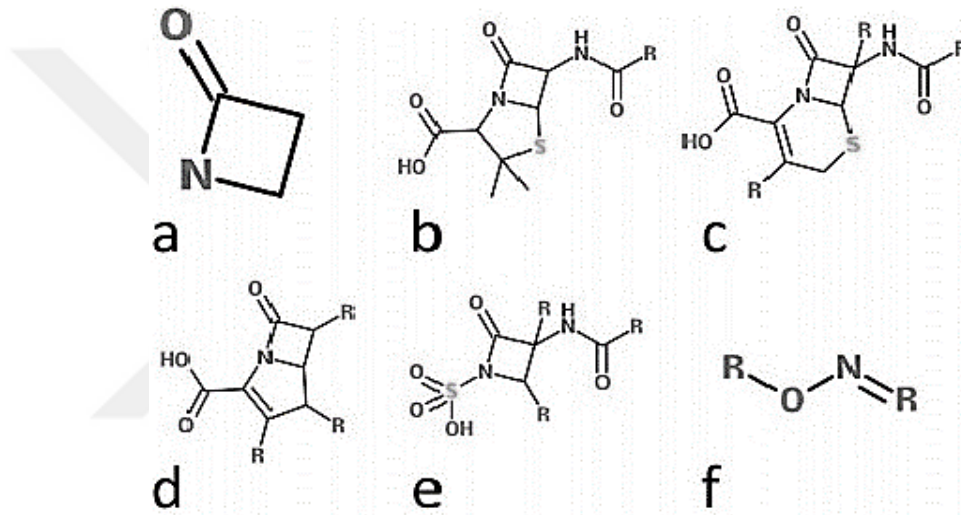
2.2.1 Beta-laktam antibiyotikler

Beta-laktam antibiyotikler molekül yapısında beta-laktam halkası bulunan, etki mekanizmaları kendilerine özgü olan, kimyasal yapıları ve farmakokinetik özellikleri birbirlerinden farklı kimyasalların bulunduğu çok geniş bir gruptur (Ulusoy 2004). Başlıca beta-laktam antibiyotik grupları penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemlerdir (Şadan 2003).

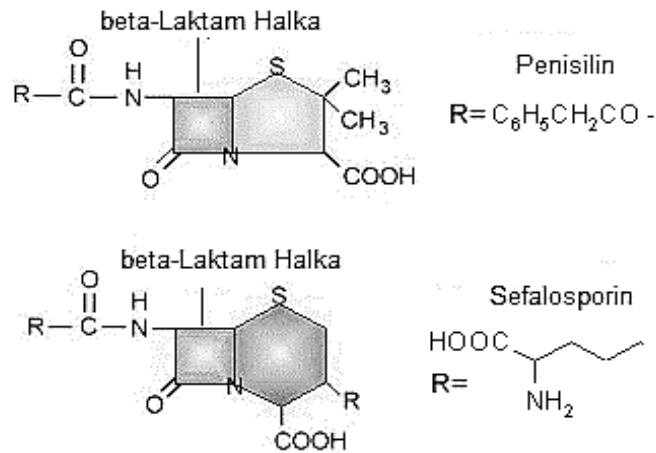
2.2.2 Beta-laktam antibiyotiklerin etki mekanizması

Antibiyotikler hedef bakterinin belli bir fonksiyonunu inhibe ederek etkilerini gösterirler. Başlıca hedefleri bakteri hücre duvarı, hücre membranı, bakteriyel protein sentezi, biyokimyasal ve metabolik yollar, replikasyon ve diğer fonksiyonlardır. (Durupınar 2001).

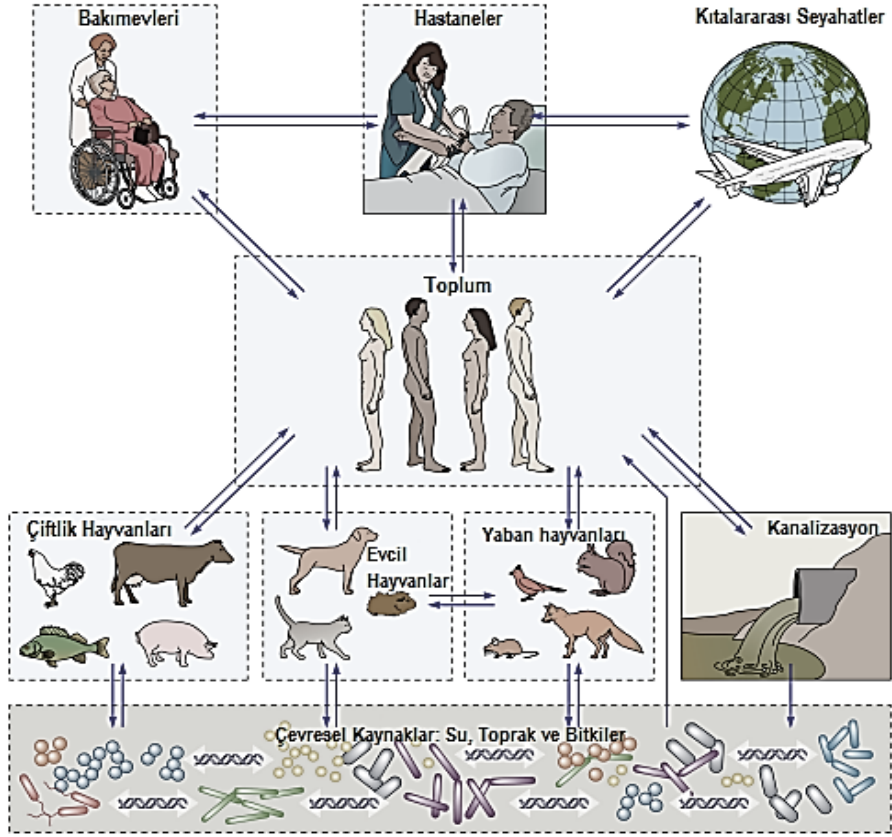
Beta-laktam antibiyotikler bakterilerde hücre duvarı sentezinden sorumlu penisilin bağlayan proteinlerin (PBP) transpeptidaz aktivitesini bloke etmekte, bu şekilde peptidoglikan sentezini engelleyerek hücre duvarını onaramayan bakterinin inaktif olmasına yol açmaktadırlar (Cho ve ark. 2014).



Şekil 2.1: Beta-laktam halkası ve farklı beta-laktam antibiyotikler (a: beta-laktam halkası, b:penisilin, c:sefalosporin, d:karbapenem, e:monobaktam, f:oksimino grubu) (Tärnberg 2012)



Şekil 2.2: Penisilin ve sefalosporin (Tärnberg 2012)



Şekil 2.3: GSBL-üreten Enterobacteriaceae kaynakları (Woerther ve ark. 2013)

Çizelge 2.1: Veteriner ve beşeri tıpta kullanılan beta-laktam antibiyotikler (Smet ve ark. 2009)

Beta-Laktam	Spektrumu	Veteriner Hekimlik	Beşeri Hekimlik
Penisilinler	GP bakteriler ve aminopenisilinler aynı zamanda GN bakterilere karşı etki gösterirler.	Ampisilin, amoksisilin, benzilpenisilin, kloksasilin, hetasilin	Penisilin, ampisilin, amoksisilin
Penisilin/beta-laktamaz inhibitörü kombinasyonları	İhmal edilebilir antimikrobiyal etkileri vardır. Genel olarak, penisilinlerle birlikte beta-laktam antibiyotiklerin etkisizleştirilmelerini önlemek amacıyla kullanılırlar.	Amoksisilin-klavulanat	Amoksisilin-klavulanat, piperasilin-tazobaktan
1. nesil sefalosporinler	Orta spektrumlu antibiyotiklerdir. Stafilokokal ve streptokokal infeksiyonlara karşı etkilidirler.	Sepadroksil, sefapirin, sefaleksil	Sefalozin
2. nesil sefalosporinler	GN bakterilere karşı daha geniş etki gösterirler. Bazı GP bakterilerin faaliyetleri geciktirirler.	Sefaklor, sefamandol, sefonisid, seforanid, sefuroksim	Sefuroksim, sefoksitin
3. nesil sefalosporinler	GN bakterilere karşı geniş spektrumlu etki gösterirler.	Sefovesin, sefpodoksim , seftiofur	Seftriakson, sefotaksim , seftazidim
4. nesil sefalosporinler	GP ve GN bakterilere karşı geniş spektrumlu etki gösterirler.	Sefkuinom	Sefepim
Monobaktamlar	Duyarlı GN bakterilere karşı güçlü etkileri vardır. GP ve anaerob organizmalara karşı tesir etmezler.	Kullanılmamaktadır	Aztreonam
Karbapenemler	Aerob ve anerob GP ve GN bakterilere karşı etki ederler.	İmipenem, meropenem	İmipenem, meropenem

2.3 Direnç Tipleri

Genetik yapıları ve metabolik fonksiyonları bilinen bakteriler farklı ortam koşullarıyla başa çıkabilmek için başkalaşım geçirerek direnç mekanizmaları geliştirmektedirler (Newell ve ark. 2010).

Başlangıçta gelişmekte olan ülkelere özgü vakalar olarak algılanan antibiyotiklere karşı direnç olgusu, günümüzde yeni türlerin katılımı ile karmaşıklaşarak sürmektedir (Fischbach ve Walsh 2009).

Bakteriler koşullara kolay adapte olurlar. Bu kabiliyetleri sahip oldukları genetik materyal ile başarılmaktadır. Bir kısım bakteriler antibiyotiklere doğal dirençlidirler. Örneğin hücre duvarı geçirgenliğinde azalma ve efluks pompası gibi mekanizmaları sayesinde antibiyotiklerden etkilenmezler (Arslan 2014). Bazıları ise mutasyon geçirerek veya direnç kodlayan genetik materyali kazanarak kazanılmış direnç özellikleri gösterirler (Aygül 2015).

2.3.1 Doğal direnç

Doğal (İntrinsik) dirençlilik bakterinin kendi yapısına bağlı ve nesiller arasında aktardıkları kalıtsal bir özelliktir (Gomez ve Neyfakh 2006). Antibiyotiklerin hayatımıza girmesinden çok öncesi dönemlere ait Antartika buzullarında ve denizinde doğal dirençli enterobakteriler tespit edilmiştir (Barker 1999).

Bu tür bakterilerde antibiyotik etki edeceği hedef bölge bakterinin yapısında bulunmamakta, antibiyotiğe karşı beta-laktamazlar gibi özgün enzimler salgılamakta veya hücre duvarı geçirgenliğini ayarlayarak mücadele etmektedirler (Çiftçi ve Aşık 2011; Sharma ve ark. 2014). Örneğin, vankomisin molekülü *E. coli*'nin hücre duvarı porinlerinden geçemeyecek kadar büyüktür (Webber ve Piddock 2003).

Enterobakteriler genel olarak makrolid ajanlara, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter* spp., *Achromobacter xylosoxidans*, *Serratia marcescens* ve *Aeromonas* türleri penisilinlere ve beta-laktam ajanlara karşı doğal dirençlidirler (Walsh ve Duffy 2013).

2.3.2 Kazanılmış direnç

Antibiyotikler kullanıma ilk sunulduklarında, bakterilerde direnç gelişimi öngörülmemiştir. Ancak, gelişmeler beklentilerin tam tersi şekilde gerçekleşmiştir. Çünkü bakterilerin mutasyon dışında farklı mekanizmalar yoluyla antibiyotikleri etkisizleştirecek enzimler üretecekleri ve/veya dirençten sorumlu genetik materyalleri aralarında aktarabilecekleri tahmin edilmemiştir (van Hoek ve ark. 2011).

Antibiyotik ajanın bakteri üzerinde yarattığı baskı dış ortam kaynaklı bir etkidir. Bakteri popülasyonu antibiyotik ile ilk karşılaştığında ilaç etkili olmaktadır. İlacın kullanım sıklığı arttıkça bazı bakteri türleri canlılıklarını sürdürmek için direnç geliştirmektedirler. Bu durum özellikle mutasyon geçirmiş olan türlerde kolaylıkla gerçekleşmektedir. Sonuç olarak yeni dirençli türler ortaya çıkmaktadır (Verraes ve ark. 2013).

Mutasyonlar genomda bulunan birçok bölgede genetik değişikliklere neden olabilirler. Ancak, direnç gelişiminde küçük bir rol oynarlar (Howden ve ark., 2006; Sharma ve ark., 2014).

Kazanılmış direnç antibiyotiklere duyarlı bir bakterinin mutasyon veya plazmid, transpozon, integron ve serbest DNA gibi aktarılabılır genetik materyalleri kazanarak dirençli duruma gelmesidir. Enzimatik inaktivasyon, hücre duvarı geçirgenliğinde ve bakterinin hedef bölgesinde değişimler başlıca kazanılmış direnç mekanizmalarıdır. Mutasyon, konjugasyon ve transdüksiyon gibi modlar yardımıyla direnç özelliği nesiller arasında aktarılmakta ya da farklı ve/veya türdeşler arasında transfer edilmektedir (Meral ve Korukluoğlu 2014). Kazanılmış direnç konusunda genetik etkileşimler detaylı incelenmiş olmakla birlikte, biyokimyasal süreçler henüz anlaşılabilmiş değildir (Culyba ve ark. 2015).

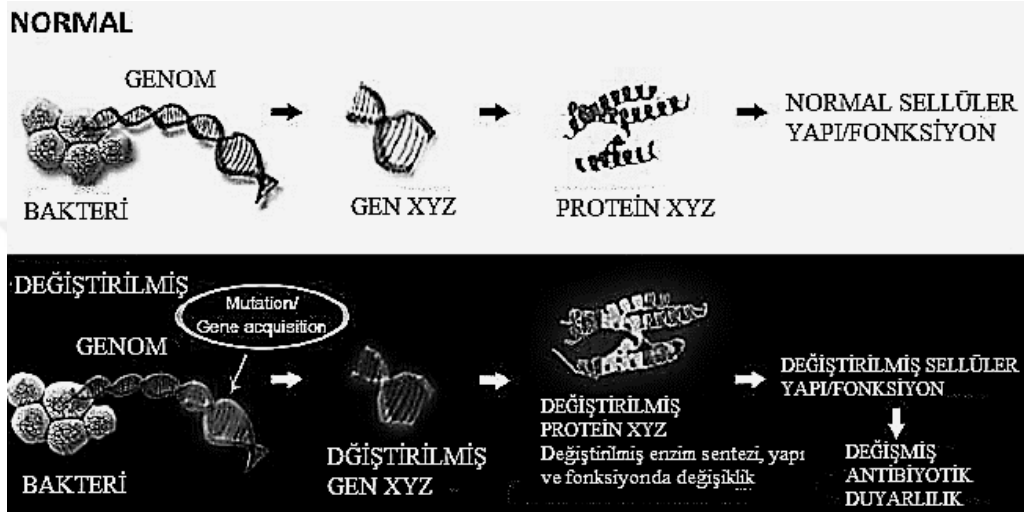
2.4 Direnç Mekanizmaları

Bakteri genetiğinin bir ifadesi olan antibiyotik direncinin gelişmesi ve yayılmasında pek çok etmenlerin etkisi bulunmaktadır (Somer 2010).

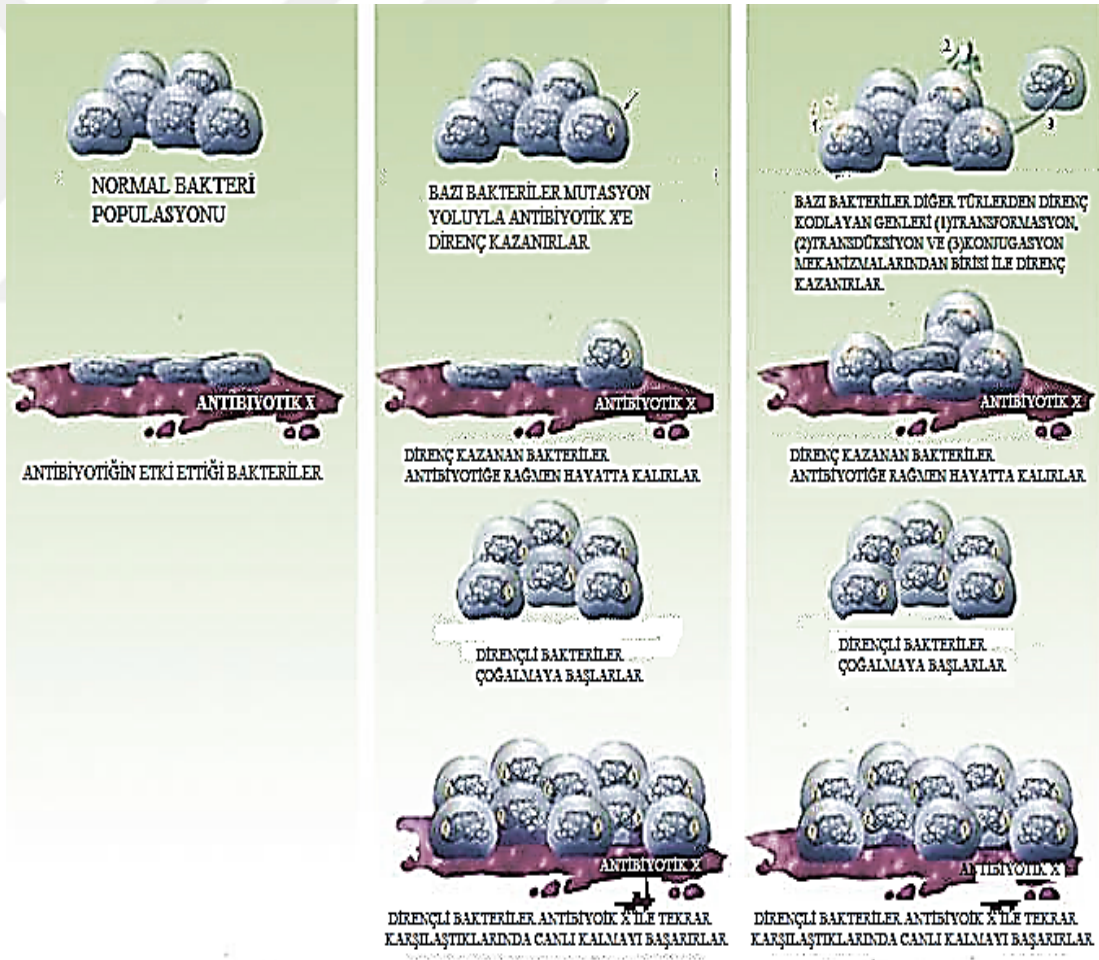
Antibiyotikler hedef bakteri türüne beş farklı mekanizma ile etki gösterirler. Bu mekanizmalar; hücre duvarı sentezini durdurma, hücre zarı işlevini bozma,

mikroorganizmanın protein sentezini bozma, mikroorganizmanın nükleik asit sentezini inhibe etme ve antimetabolik etkilerdir (Taham ve ark. 2012).

Bakteriler antibiyotiklere karşı enzimatik inaktivasyon, aktif pompa sistemi, hücre duvarı geçirgenliğinde ve bakterinin hedef bölgesinde değişimler ile hücre içi metabolik düzenleme gibi mekanizmalardan biri ya da birkaçını kullanarak kullanarak mücadele ederler (Durupınar 2001; Taham ve ark. 2012).



Şekil 2.4: Mutasyon mekanizması (Alekhshun ve Levy, 2007)



Şekil 2.5: Kazanılmış direnç (Alekhun ve Levy, 2007)

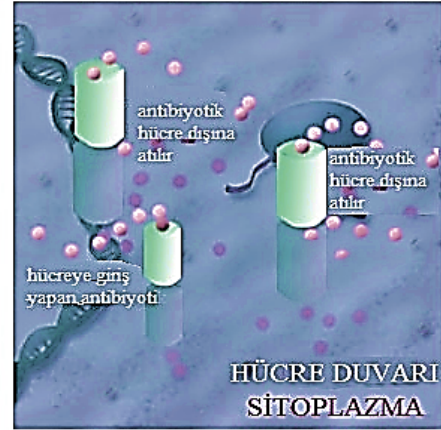
Çizelge 2.2: Beta-laktam ajanlara karşı direnç mekanizmaları (Aleksun ve Levy, 2007)

Beta-laktam ajan	Direnç mekanizması	Mekanizma aracı	Örnekler
	Enzimatik inaktivasyon	Bakteri salgıladığı genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz enzimi yardımıyla antibiyotiğin beta-laktam halkasını etkisizleştirmektedir. Beta-laktam halkasının yapısının bozulmasıyla antibiyotiğin dış duvardaki PBP'lere bağlanamamaktadır.	Enterobacteriaceae familyasına ait türlerin penisilinler ve sefalosporinlere karşı gösterdikleri dirençlilik
Penisilin, ampisilin, mezlosilin, peperasilin, sefazolin, sefotaksim, seftazidim, aztreonam, imipenem	Bakterinin hedef bölgesinde değişim	Bakteri orijinal PBP'lerde mutasyonal ya da yatay transfer ile kazandığı yapılsa değişiklikler sayesinde antibiyotik ajanın hücre duvarına bağlanmasını engellemektedir.	Stafilokokların metisilin ve oksasilin ajanlara karşı gösterdikleri dirençlilik
	Dış membran geçirgenliğinde değişim	Bakteri hücre duvarı porin kanalı çapını azaltarak dış membran geçirgenliğinde değişime yol açmaktadır. Bu durumda beta-laktam ajan daralan porinlerden geçememektedir.	<i>E. aerogenes</i> , <i>K. pneumoniae</i> ve <i>P. aeruginosa</i> suşlarının imipeneme karşı gösterdikleri dirençlilik

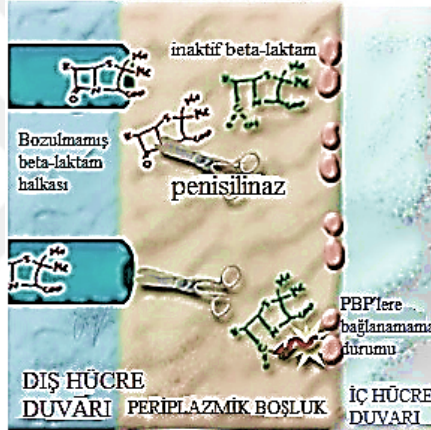
- 1.** Dış membran proteinlerinde gerçekleştirdiği değişiklikler sayesinde ilacın hücre içine girişini engeller.



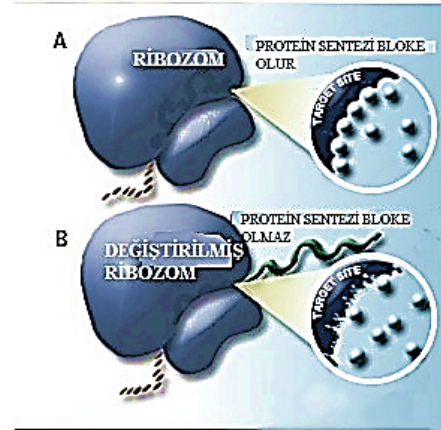
- 2.** Aktif pompa sistemi ile antibiyotik ajan hücre dışına atılır.



- 3.** Enzimatik İnaktivasyon veya antibiyotik ilacın hedefi olan bölgede modifikasyon yapılır.



- 4.** Antibiyotik ilacın hedefi olan bölgede modifikasyon gerçekleşir.



Şekil 2.6: Bakteriyel direnç stratejileri (Aleksun ve Levy, 2007)

2.5 Direnç Genetiği

Yüz yıl önce Paul Ehrlich adlı bilimadamı parazitlere karşı tedavide çoklu ilaç kokteyli yöntemini önermiştir. Bu yaklaşım günümüzde geçerliliğini halen korumaktadır. Charles Darwin Paul Ehrlich döneminde yaşamış olsaydı, antibiyotiklerin sebep oldukları selektif baskı yoluyla bakterilerde gelişen direncin ardıl nesillere aktarıldığına tanık olacak ve ünlü eseri “Türlerin Kökeni” giriş bölümü başlığını “insan-aracılı seleksiyon mekanizması” şeklinde belirleyecekti (Levin ve ark. 2014).

Bakteriler genetik farklılıklarını yalnız mutasyon yoluyla değil, türdeş ve/veya diğer bakteri türlerinden de kazanırlar. Kromozomal veya kromozom dışı materyallere

bağlı direnç bu şekilde gelişmektedir. Kromozomal direnç bakteri kromozomunda 10^8 replikasyonda 1 yatay gen transferi ile ya da mutasyonlar sonucu oluşmaktadır. Sonuç olarak ortaya çok daha fazla başkalaşım geçirmiş suşlar çıkmaktadır (Thomas ve Nielsen, 2005).

Yatay gen aktarımı mekanizması içinde kromozoma aktarılan veya kromozomdan alınan dinamik genomlar (plazmidler, transpozonlar, integronlar, bakteriyofajlar) üretilmektedir. Bu karşılıklı genetik materyal alışverişi bakterinin patojen özelliklerini tayin etmektedir (Ochman ve ark. 2000; Eraksoy 2008). Örneğin, *E. coli* K-12 genomunda açık okuma çerçevelerinin %17'sinden fazlası son 100 milyon yıl içinde sitozin ve guanin oranı ile kodon kullanım paterni Enterobacteriaceae familyasına yakın farklı mikroorganizmalardan kazanılmıştır (Levin ve Bergstrom 2000).

Gen kaseti integron (İnt) üzerinde bulunmaktadır. İntegron her iki ucunda insersiyon sekanslamaları (İS) olan transpozona (Tn) yerleşiktir. Transpozon ise plazmid üzerinde yer almaktadır. Plazmid bu nedenle genetik bilgi taşıyan bir tür nakil aracı görevi görmektedir (Norman ve ark. 2009).

2.5.1 İntegron

İntegron (*Int*) ortamda serbest halde bulunan direnç genini yakalayan ve diğer bakteriye entegre olarak transdüksiyon modu ile direnç geninin yatay transferine olanak sağlayan DNA dizisidir (Tenover 2006; Chen ve ark. 2013).

Bugüne kadar beş integron sınıfı tanımlanmıştır. GSBL-üreten Enterobacteriaceae arasında bu sınıflardan en sık Sınıf 1'e (*Int1*) rastlanılmaktadır (Machado ve ark. 2007). *Int1* geni prevalansının GSBL-pozitif *E. coli* suşlarında %11-%42 arasında değiştiği tespit edilmiştir (Sepp ve ark. 2009). Son yıllarda *bla*_{CTX-M} geninde integrona benzer yapılara rastlanılmakla birlikte, *bla*_{TEM} veya *bla*_{SHV} genlerin genellikle plazmidler üzerinde buldukları bilinmektedir (Chen ve ark. 2013).

2.5.2 İnsersiyon sekansı

İnsersiyon sekansı (İS-elemanı) transpozondan daha basit yapısı olan ve 2.500 bp'dan küçük genetik materyaldir. Günümüze kadar 500'ü aşkın İS-elemanı tanımlanmıştır. İS-elemanı kompozit transpozonların sonlarını belirlemektedir. Transpozondan farklı olarak kendi yer değiştirme ve düzenlenmesinde sorumlu genetik bilgiyi taşımakla görevlidir (Schneider ve Lenski 2004).

İS-elemanı prokaryotik hücrelerde bol miktarda bulunana en küçük intrasellüler mobil genetik elemandır. Genetik çeşitlilik markörü olarak kabul edilmekte ve bakterinin yaşamını sürdürmesini sağlayacak mutasyonlara katkı sağlamaktadır (De Visser ve ark. 2004).

İS-elemanının iki ucunda 10-40 bp kadar tersine tekrarlanan sekanslar ile bu sekansları dışından kuşatan ve yeni girdiği alıcıya ait hedef bölge ve aynı yönde 5-12 bp uzunlukta direkt tekrarlanan nükleotid sekansları bulunmaktadır. İS-elemanının iki ucunda DNA üzerinde yer değiştirmesini sağlayan, sınırını belirleyen ve transpozisyon enzimi kodlayan gen bulunmaktadır (Eraclio ve ark. 2015).

2.5.3 Transpozon

Transpozonlar (Sıçrayıcı Genler) bakteri genlerinin değişik yerlerine yerleşebilen veya kromozomdan plazmide, plazmidden plazmide, plazmidden DNA veya bakteriyofaja yer değiştirerek, kodladıkları fonksiyonları (antibiyotik direnci, laktoz fermentasyonu, ısıya direnç, toksin oluşturma) aktarabilen DNA dizileridir (Bağlan 2003; Cengiz 2010).

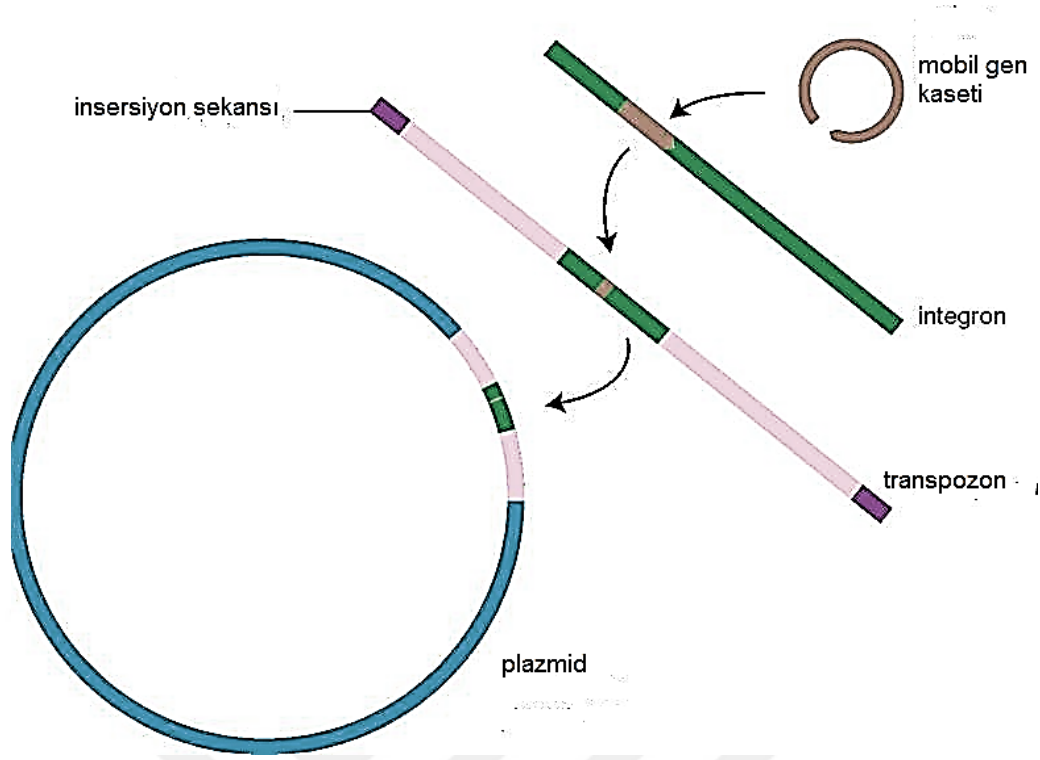
Transpozonlar 2-20 bp büyüklüğünde olup, kendi kendilerine değil, ancak kromozom veya plazmidle birlikte replike olabilirler (Kuyucu 2007). Konjügasyon sürecinde kazanılmış direnç geninin konağın genomuna veya plazmide transferi ile birleşmesinde rol oynarlar (Yüce 2001).

Enterobacteriaceae türleri arasında kazanılmış dirençlilik insersiyon dizileri transpozonlar aracılığıyla kolaylıkla aktarılmaktadır (Çöleri ve Çökmüş 2008).

2.5.4 Plazmid

Plazmidler 4-400 bp büyüklüğünde olan ve kromozomdan bağımsız replike olabilen ekstrakromozomal genetik materyallerdir (Kuyucu 2007).

R-faktörü adı verilen direnç plazmidleri genellikle antibiyotikleri parçalayan enzimlerin üretilmesinden ve çoklu antibiyotik direncinden sorumludurlar (Gür 1989; Demirtürk ve Demirkal 2004).



Şekil 2.7: Mobil genetik elemanların hiyerarşisi (Norman ve ark. 2009)

2.5.5 Bakteriyofaj

Bakteriyofajlar (faj) hayvanların barsak mikroflorasının doğal üyesidirler. Bakteriler arasında direnç genlerinin yatay transferi genel olarak konjüгатif plazmidler ve transpozonlar aracılığı ile gerçekleşmekle birlikte, çok az bir kısmının transdüksiyon modu sayesinde bakteriyofajlar tarafından yapıldı bilinmektedir (Shousha ve ark. 2015). Direnç plazmidi bakteriyofaj tarafından taşınarak diğer bakteriye aktarılmaktadır (van Hoek ve ark. 2011).

2.6 Direnç aktarımı modları

Bakterilerde antibiyotik ilaçlara direnç geliştikten sonra, dirençten sorumlu genler konjugasyon, transdüksiyon ve transformasyon modlarının bir veya birkaçı yoluyla diğer bakteri türlerine aktarılır (Kuyucu 2007).

2.6.1 Transformasyon

Transformasyon yalnızca tek bir DNA'nın ortaya salını ve bu serbest genetik materyalin başka bir tür tarafından kabulü ve rekombinasyonu mekanizmasıdır (Thomas ve Nielsen 2005) (Şekil 2.9).

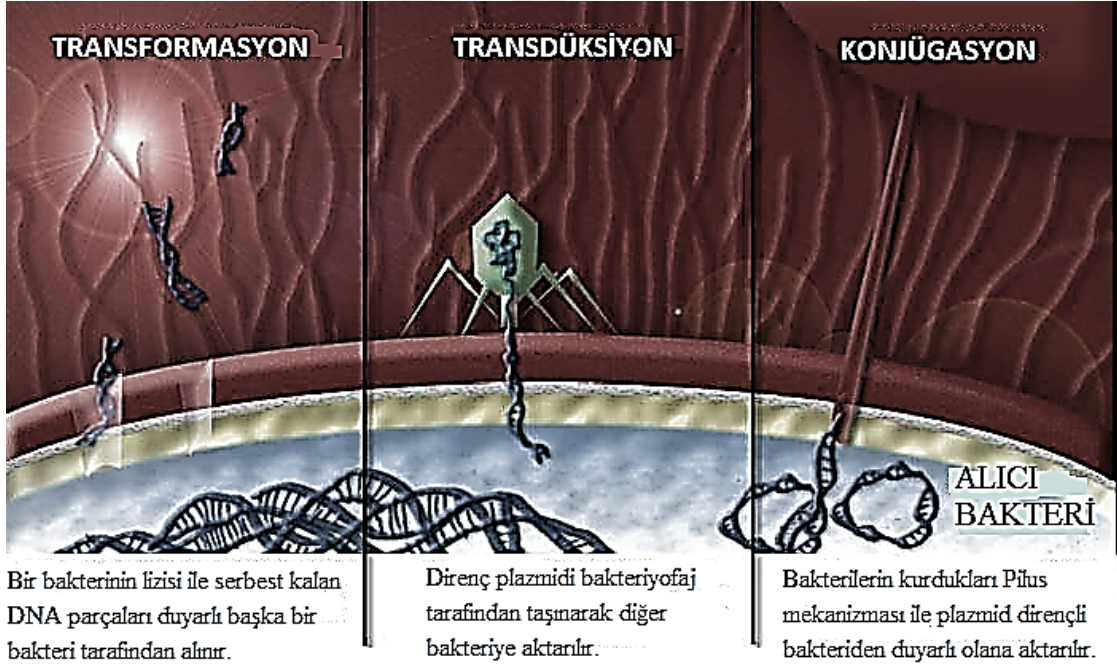
Transformasyon bakteri hücre duvarının liziz olup, ortama serbest kalan dirençten sorumlu genetik materyalin başka bir bakteri tarafından kazanımını sağlamaktadır (Tenover 2006).

2.6.2 Transdüksiyon

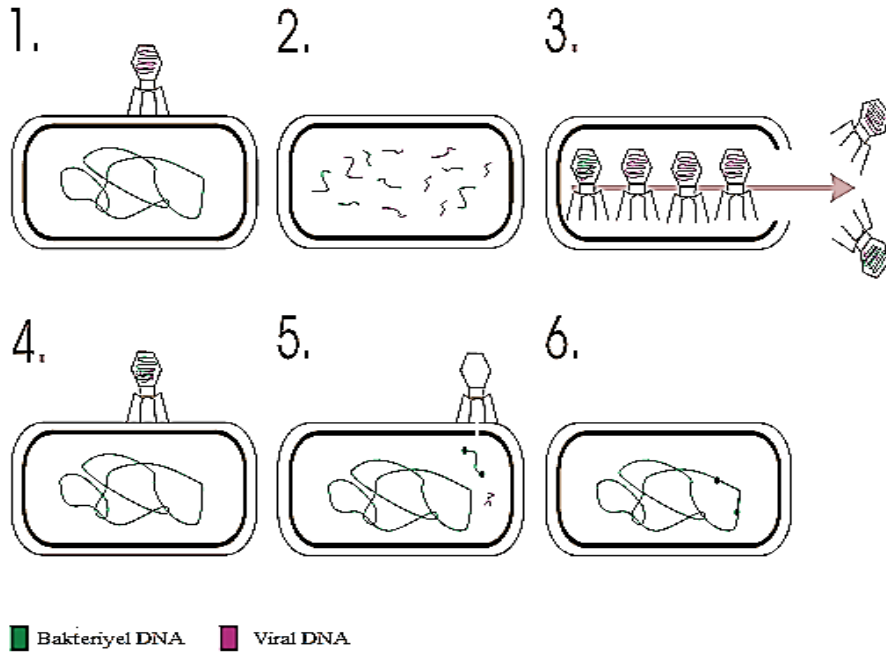
Transdüksiyon bakteri fajları aracılığıyla gen rekombinasyonunun sağlandığı işlemdir (Thenmozhi ve ark. 2014) (Şekil 2.10).

2.6.3 Konjugasyon

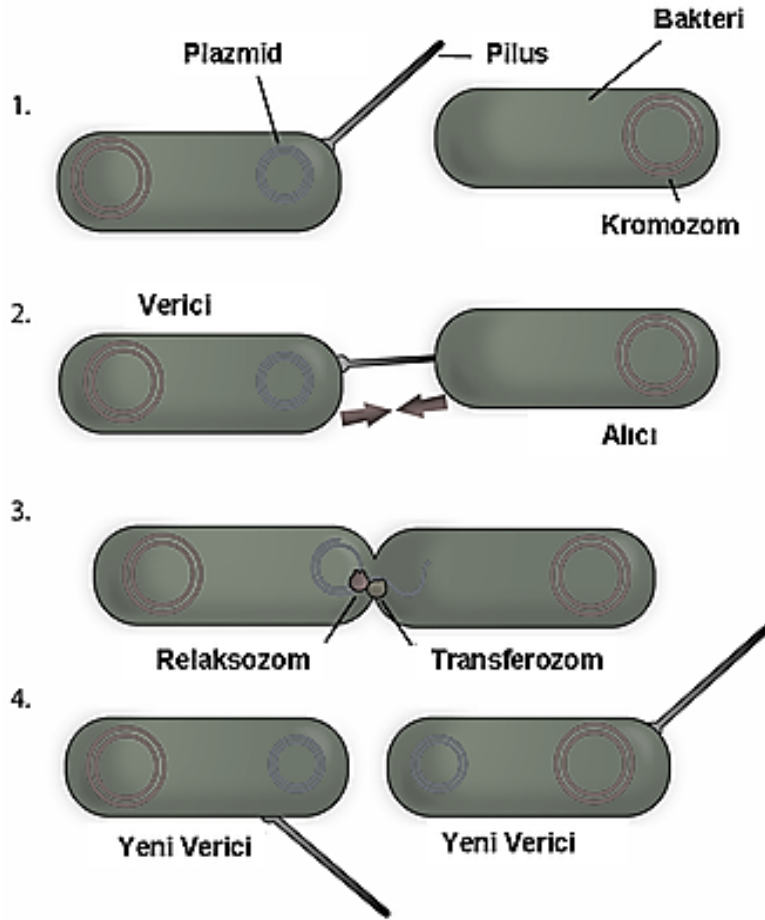
Konjugasyon sürecinde enterobakteri plazmid içeren direnç genini diğer bakteriye transfer eder. Bu gen transferi pilus adı verilen ve iki hücrenin sitoplazmalarını birbirlerine bağlayarak köprü görevi gören bir mekanizma sayesinde yapılır. Bu şekilde plazmid bir bakteriden diğerine kolaylıkla aktarılır (Tenover 2006) (Şekil 2.11). Enterobacteriaceae türleri arasında Tn7 transpozon vektörlerini kullanarak yapılan kromozomal tamamlama konjugasyon moduna iyi bir örnektir (Crepin ve ark.2012)



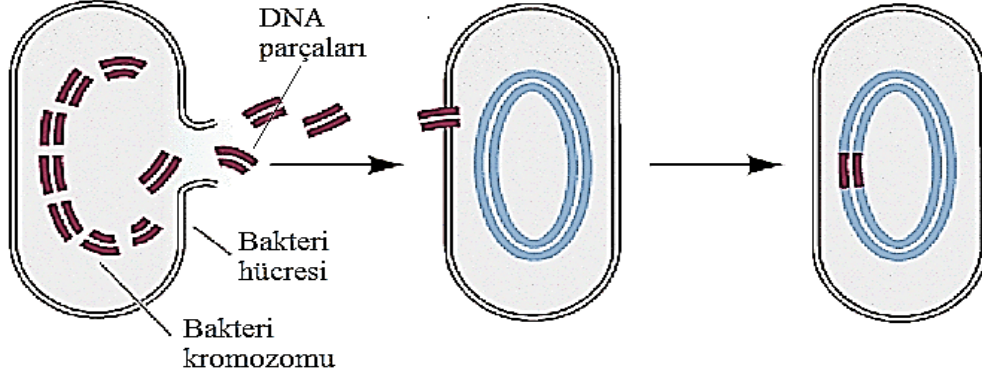
Şekil 2.8: Direnç aktarımı modları (Alekhun ve Levy, 2007)



Şekil 2.9: Transformasyon mekanizması (Torrence ve Isaacson, 2003)



Şekil 2.10: Transdüksiyon mekanizması (Torrence ve Isaacson, 2003)



Şekil 2.11: Konjugasyon mekanizması (Torrence ve Isaacson, 2003)

2.7 Beta-laktamazlar (*bla*)

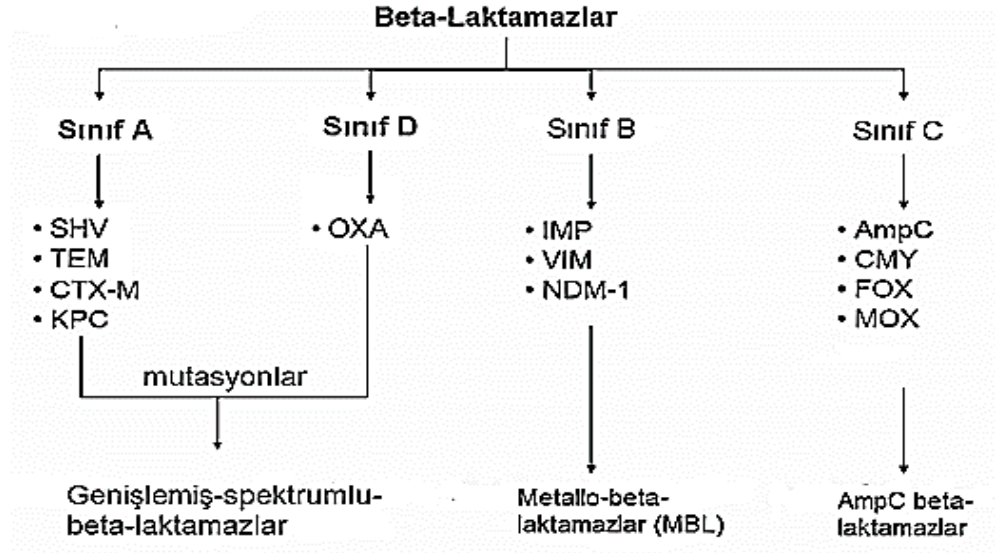
Beta-laktam antibiyotiklerin çoğu Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin sentezlediği beta-laktamaz (*bla*) enzimleri tarafından inaktive edilirler (Aktaş 2004). Günümüzde beta-laktam antibiyotiklere karşı özellikle enterobakterilerde direnç gelişimi yayılma ve karmaşıklaşan ciddi bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır (Akalin 2004).

Beta-laktamazlar beta-laktam antibiyotiklerde beta-laktam halkasının amid bağı parçalayarak etkisiz hale getiren enzimlerdir. Bu tip enzimler kromozom, plazmid veya transpozon adı verilen aktarılabılır genetik elemanlar aracılığı ile sentezlenirler (Sun ve ark. 2009).

Beta-laktamazlar etkiledikleri substratlara, biyokimyasal özelliklerine, ilk izole edildikleri bakterilere, ilk izole edildikleri suşlara, ilk izole edildikleri hasta isimlerine, ilk izole edildikleri coğrafi bölgelere, ilk izole edildikleri hastaneye, sentezlendikleri genlere ve ilk defa bulan kişiye göre isimlendirilirler (Orak 2005).

Beta-laktamazlar nükleotid ve aminoasit dizilimlerine göre A, B, C ve D olmak üzere başlıca 4 moleküler sınıf altında toplanmışlardır. A, C ve D gruplarına ait beta-laktamazlar beta-tam antibiyotikleri serin ester aracılığı ile hidrolize ederek etkisiz hale getirirler. Enzim ilk olarak antibiyotiğe nonkovalent bağ ile tutunur. Ortaya çıkan yeni metabolit nonkovalent bir yapıdır ve Michaelis kompleksi olarak adlandırılır. Enzimin aktif ucundaki serin kısmın yan zinciri üzerinde yer alan serbest hidroksil, kovalent açıl-ester oluşturmak için beta-laktam halkasına doğru hareket

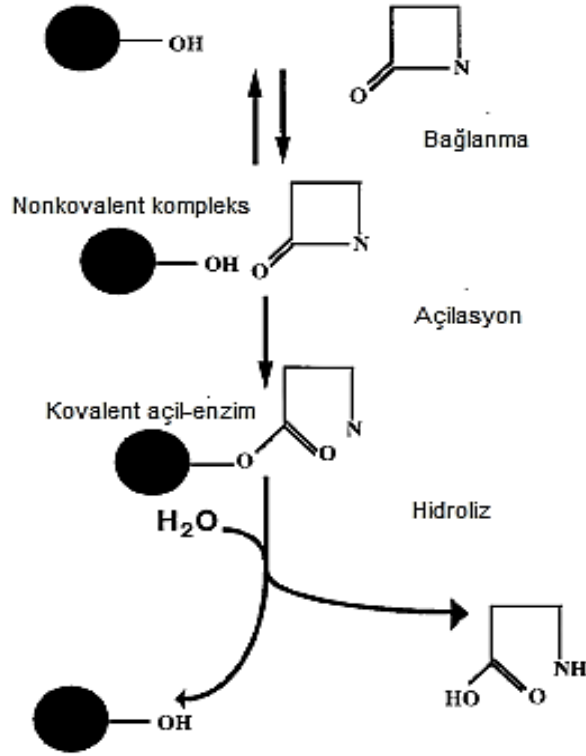
geçer. Aktif enzim serin yapının hidrolizi ile serbest kalarak, antibiyotiğin etkisizleşmesini sağlar (Livermore 1995).



Şekil 2.12: Beta-laktamazların sınıflandırılması (Ghafourian ve ark. 2014)

B sınıfı metallo beta-laktamazlar çinko mineralini kullanarak etki gösterirler (Thenmozhi ve ark. 2014).

Beta-laktamaz üretimi anaerobik Gram negatif bakteriler arasında bilinen en önemli direnç mekanizmasıdır. Günümüze kadar 200'ü aşkın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bu tür enzimlerin çeşit sayısı fazladır ve plazmid aracılı sentezlenmeleri sayesinde kısa sürede yayılış göstermişlerdir (Fernández-Canigia ve ark. 2015).



Şekil 2.13: Beta-laktamazların etki mekanizması (Livermore 1995)

2.7.1 Genişlemiş-spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)

Antibiyotiklere sık maruz kalmak bakterilerin sentezledikleri beta-laktamaz enzimlerinde mutasyona yol açmış ve yeni nesil antibiyotiklere karşı etki alanlarını genişletmeleri ile sonuçlanmıştır. Genişlemiş-spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) aslında beta-laktamazların başkalaşım geçirmiş türlerdir (Shaikh ve ark. 2015).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar 1980’li yılların başında ilk olarak Almanya’da tanımlanmıştır (EFSA 2011).

Son yirmi yıl zarfında, GSBL-üreten Enterobacteriaceae görülme sıklığı dikkat çekici şekilde artış göstermiştir (von Salviati ve ark. 2015). GSBL-üreten bakteriler genellikle antimikrobiyal maddelere kromozomal ya da plazmid aracılı mekanizmalar yardımıyla çoklu direnç sergilemektedirler (EFSA 2011). Bu çeşit enzimler üçüncü nesil sefalosporinler ve aztreonamı etkisizleştirmektedirler (Akçam ve ark. 2004).

GSBL’ler TEM ve SHV türevi GSBL’ler ve TEM ve SHV dışı GSBL’ler olmak üzere 2 gruba ayrılırlar (Livermore 1997). En yaygın GSBL çeşitleri TEM, SHV ve CTX-M varyantlarıdır (Liebana ve ark. 2013). CTX-M varyantları CTX-M-1, CTX-

M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 olmak üzere başlıca 5 alt grupta toplanırlar (Bonnet 2004). CTX-M varyantları 2000’li yıllardan bu yana öncüleri TEM ve SHV çeşitlerine göre Dünya’da bilinen en yaygın GSBL türü olmuştur (Fernandes ve ark. 2014).

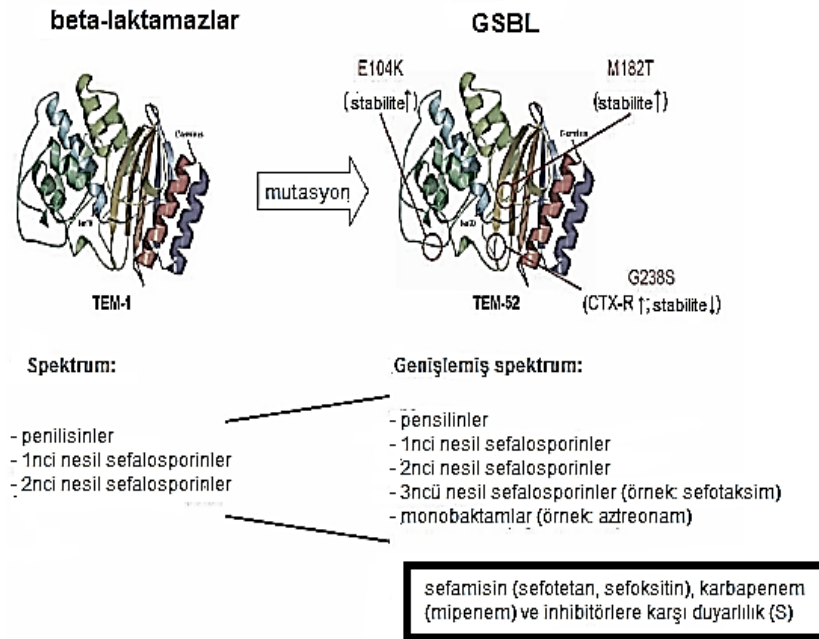
TEM, SHV ve CTX-M enzim ailelerinin yanında OXA, PER, VEB, GES ve başka GSBL tipleri de tanımlanmıştır (Tükenmez-Tigen ve Mülazımoğlu 2012).

2.7.1.1 A Sınıfı GSBL

TEM-tipi

Temoneira (TEM) tipi GSBL ilk olarak 1965 yılında Yunanistan’ da izole edilen *E. coli*’de saptanmıştır (Fazeli ve ark. 2015). TEM ailesi günümüzde TEM-1 ve TEM-2 türevleri olarak devam etmektedir. Bu tür enzimler penisiline ve birinci nesil sefalosporinlere etkili iken, oksimino-sefalosporinlere karşı olumsuz tesir göstermemektedirler (Colodner 2005).

TEM tipi GSBL’ler, hızla *Klebsiella (K.) oxytoca*, *Citrobacter (C.) freundii* ve *Acinetobacter* spp. gibi diğer enterobakterilere sıçramış ve hızlı yayılma göstermişlerdir (Al-Jasser 2006). Günümüzde 140 kadar TEM tipi enzim tanımlanmıştır (Thenmozhi ve ark. 2014).



Şekil. 2.14: TEM-1 aminoasit farklılaşması ve yeni TEM-52 oluşumu (Ghafourian ve ark. 2014)

SHV-tipi

Sülfidril Hiper Variabil (SHV) tipi GSBL sülfidril değişken aktif noktaya göre adlandırılır. Çoğunlukla *K. pneumoniae* suşlarında yaygın şekilde görülürler (Samaha- Kfoury ve Araj, 2003). SHV tipi enzimlerin aminoasit yapıları %68 oranında birbirleri ile yakın benzerlik gösterirler (Fazeli ve ark. 2015).

Bu tür enzimler ampisilin, tigesiklin ve piperasilin gibi geniş spektrumlu penilisinlere karşı dirençli, diğer taraftan oksinomino-sefalosporinlere karşı etkisizdirler. Günümüzde *Klebsiella* türlerinin %20'si SHV-1 tipi beta-laktamaz pozitif olup, plazmid-aracılı ampisilin direncinden sorumludurlar (Shaikh ve ark. 2015).

Son çalışmalara göre 60'dan fazla SHV tipi enzim tanımlanmıştır (Thenmozhi ve ark. 2014).

CTX-M-tipi

Sefotaksimaz (CTX-M) tipi beta-laktamazlar ilk olarak *Kluyvera* familyasında saptanmıştır (Ibrahimagić ve ark. 2014). Bu tip enzimlerin geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etme özellikleri intrinsik niteliktedir (Bayraktar ve ark. 2010).

CTX-tipi enzimler sefotaksime karşı güçlü hidrolitik aktivite gösterirler. Günümüzde 80'i aşkın CTX-M tipi enzim belirlenmiştir (Thenmozhi ve ark. 2014). Aminoasit dizi benzerliklerine göre CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 olmak üzere 5 alt grupta toplanırlar (Tzouvelekis ve ark. 2000).

Daha çok *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşları ile yayıldıkları bilinmektedir (Ehlers ve ark. 2009). Son yıllarda CTX-M tipi enzimlerin bulunma sıklıklarının özellikle İsviçre, Türkiye ve Endonezya'da artış gösterdiği rapor edilmiştir (Ibrahimagić ve ark. 2014).



Şekil 2.15:CTX-M-tipi beta-laktamaz üreten Enterobacteriaceae dağılımı (Rossolini ve ark. 2008)

D Sınıfı OXA-tipi GSBL

Oksasilin (OXA) tipi enzimler çoğunlukla *Pseudomonas (P.) aeruginosa*'da rastlanan, OXA-1'den OXA-10'a kadar altgrupları olan ve oksimino-sefalosporinleri hidrolize eden geniş spektrumlu enzimlerdir (Aktaş ve ark. 2012).

2.7.1.2 Diğer GSBL tipleri

Diğer GSBL-tipi enzimler arasında başlıcaları Guyana Extended-Resistance (GES)-tipi, Brazilian Extended-Resistance (BES)-tipi, Vietnamese Extended-Resistance (VEB)-tipi ve *Pseudomonas* Extended-Resistance (PER)-tipi beta-laktamazlardır (Fazeli ve ark. 2015). PER-tipi enzim ilk defa Paris'te bir Türk hastanın idrarından izole edilen *P.aeruginosa*'da tespit edilmiştir. *P.aeruginosa* ve *Acinetobacter* spp. türlerinde bulunma sıklıkları yüksektir (Atilla ve ark. 2012).

2.7.2 C Sınıfı AmpC-tipi beta-laktamazlar

Aminopenisilin inaktive eden sefalosporinaz (AmpC)-tipi enzimler özellikle *Enterobacter (E.) cloacae* suşlarında sıklıkla görülen ve tüm sefalosporinlere, aztreonama ve penisilinlere karşı direnç gösteren beta-laktamazlardır. Plazmid kaynaklı AmpC tipi enzimler ilk olarak 1989'da tanımlanmıştır. Kromozomal kaynaklı enzimler indüklenebilir özelliğe sahipken, plazmid kaynaklı AmpC tipi

enzimler indüklenebilir değildir. Bu tip enzimi üreten bakterinin aynı zamanda GSBL pozitif olduğu bilinmektedir (Atilla ve ark. 2012).

Plazmid aracılı AmpC tipi beta-laktamaz aktarılabılır olduğundan kolayca yayılmakta ve yoğun bakım ünitelerinde salgınlara yol açmaktadır. Bu tür enzimler çoğunlukla geniş spektrumlu sefalosporine dirençli Gram negatif bakterilerden izole edilmektedir (Thenmozhi ve ark. 2014). En sık *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Salmonella* türleri, *K. oxytoca*, *P. mirabilis*, *E. aerogenes* ve *C. freundii* türlerinde görülmektedir (Koldaş ve ark. 2011). Amp-C tipi beta-laktamazlar klavulanik asit tarafından inhibe edilmemektedir. Ancak, oksasilin inhibe edici etki göstermektedir (Medeiros 1997; Tham ve ark. 2012).

2.7.3 B Sınıfı Metallo-tipi beta-laktamazlar

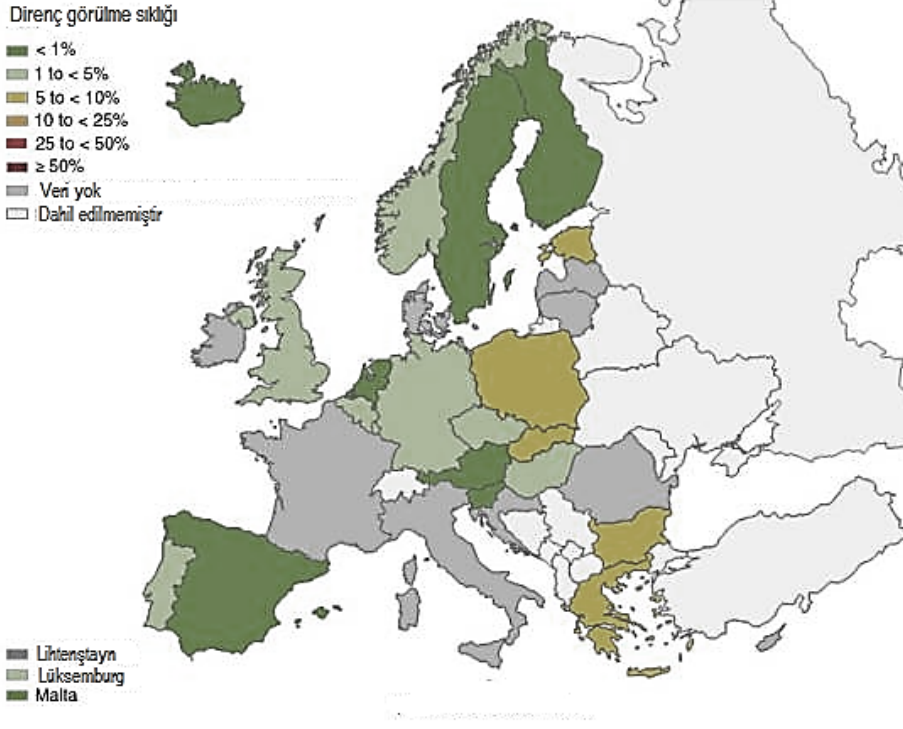
Metallo-beta-laktamazlar (MBL) ilk olarak 1991'de Japonya'da *P. aeruginosa* suşunda tespit edilmiştir. Daha sonra Asya ve Avrupa ülkelerinde Gram negatif *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* suşlarında yeni MBL-tipi beta-laktamazlar bildirilmiştir. Son yıllarda Dünya çapında hızlı yayılış göstermektedirler (Bulut ve Çağlar, 2013). MBL-tipi enzimler beta-laktam antibiyotikleri çinko iyonu kullanarak etkisizleştirirler (Güçlü ve ark. 2013).

2.8 GSBL-üreten Enterobacteriaceae epidemiyolojisi

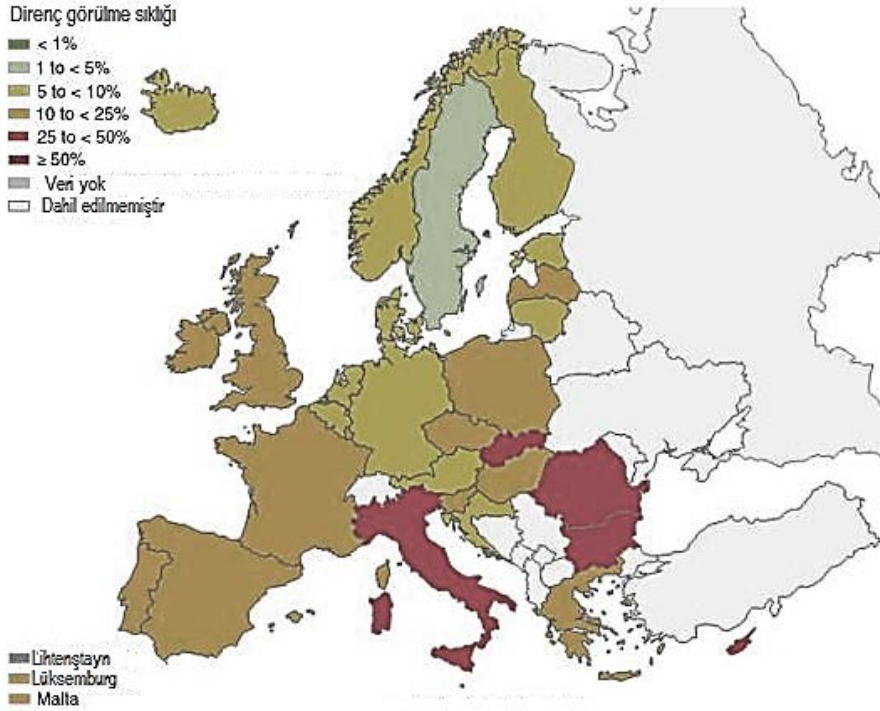
2.8.1 Hastane kaynaklı GSBL-üreten Enterobacteriaceae

Dünya'da Durum

İlk olarak 1983 yılında tespit edilen hastane kaynaklı GSBL'ler oksimino-sefalosporinler ve monobaktamları hidrolize edebilmekte; sefamisin ve karbapenemlere karşı etki etmemektedirler. Hastane kaynaklı izolatlarda en sıklıkla görülen GSBL'ler SHV ve TEM tipleridir. İlk kez *Kluyvera* spp.'de belirlenenn çıkan ve son yıllarda Enterobacteriaceae familyası içinde yükselişe geçen CTX-M tipi beta-laktamaz türlerine Avrupa, Asya, Güney Amerika ve Kuzey Amerika'da rastlanmaktadır (Pitout ve ark. 2005).



Şekil 2.16: GSBL üreten *E. coli* izolatların 2001 yılı itibariyle bulunma sıklığı (Brolund 2014)



Şekil 2.17: GSBL üreten *E. coli* izolatların 2012 yılı itibariyle bulunma sıklığı (Brolund 2014)

Hastane kaynaklı GSBL'lerin toplam infeksiyonların %7'sine yol açtıkları bilinmektedir. A.B.D'de *K. pneumoniae* suşlarının %20'sinin 3.nesil sefalosporinlere karşı dirençli oldukları rapor edilmiştir. Ayrıca, GSBL üreten Enterobacteriaceae türlerinin yalnızca beta-laktam ajanlara değil, farklı tip antibiyotiklere karşı da direnç gösterdikleri tespit edilmiştir (Schwaber ve Carmeli 2007).

En çok rapor edilen hastane kaynaklı GSBL üreten enterobakteriler *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* ve *E. coli*'dir. Bu türlerin yanından daha az rastlanmakla birlikte *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *M. morgani*, *P. mirabilis*, *S. marcescens* ve *P. aeruginosa*'da bulunmaktadır (Bhattacharjee ve ark. 2008).

GSBL pozitif enterobakterilerin yol açtıkları infeksiyonlar sebebiyle Avrupa'da her yıl 2.800'ü aşkın kişi hayatını kaybetmekte ve ek tedavi giderleri 18 milyon Euro'yu aşmaktadır (Brolund 2014).

Hastane kaynaklı GSBL pozitif enterobakterilerin bulunma sıklıkları Avrupa'da %17,6-38,9, Kuzey Amerika'da %8,5-8,8, Asya'da %5, Yeni Zelanda'da %61-67, Çin'de %13,8-56,5, Cezayir'de %16,4-31,4, Mısır'da %11-42,9, Tunus'ta %11,7-77,8, Fas'ta %1,3-7,5 ve Güney Afrika'da %8,8-13,1 olarak bildirilmiştir (Storberg 2014)

Avrupa ve Amerika ülkelerinde hastane kaynaklı en sık tespit edilen *bla* geni CTX-M-1 alt grubu altında yer alan CTX-M-15'dir. CTX-M kodlayan gen, *E. coli* izolatların %90'ından fazlasında ve *K. pneumoniae* suşlarının %35-65,5'unda görülmektedir. SHV ve TEM-tipi genlerin prevalansı %1,7-42,9 arasında değişmekte olup, çoğunlukla *K. pneumoniae* suşlarında bulunmaktadır. Asya ülkelerinde CTX-M-tipi genlerin bulunma oranları %38,2-55,5 arasında değişirken, en baskın *bla* genler SHV ve TEM olarak (%34,3-85,3) rapor edilmektedir (Storberg 2014).

Türkiye'de Durum

Türkiye'de hastane kaynaklı GSBL pozitif Enterobacteriaceae türlerinin görülme sıklığında düzenli artış olduğu belirlenmiştir. GSBL-üreten *E. coli* prevalansı 2008 yılında %33,2, 2013 yılında %48,8 ve 2014 yılı itibariyle %58,8'e yükselmiştir. Benzer şekilde, *K. pneumoniae* 2008 yılında %40, 2013 yılında %49,6 ve 2014 yılı itibariyle %62,8 olarak rapor edilmiştir (www.uhes.saglik.gov.tr).

Aralarında Türkiye'nin de bulunduğu Uluslararası MYSTIC projesi bulgularına göre hastane kaynaklı GSBL pozitif enterobakterilerin %13,9'unun eş zamanlı AmpC-tipi beta-laktamaz da ürettikleri anlaşılmıştır (Korten, 2007).

Araştırmalar hastane kaynaklı GSBL pozitif enterobakterilerde en baskın *bla*-tipi genin CTX-M tipi olduğu ve bu gen grubunu TEM ve SHV tiplerinin izlediğini ortaya koymaktadır (Zaniani ve ark. 2012; Sharma ve ark. 2013).

2.8.2 Toplumsal kaynaklı GSBL-üreten Enterobacteriaceae

Dünya'da Durum

Toplumsal kaynaklı GSBL-pozitif enterobakterilerin başlıca yayılış yolları fekal bulaşma ve uluslararası seyahat ağlarıdır (Woerther ve ark. 2013).

Araştırmalara göre toplumsal kaynaklı GSBL'lerin bulunma sıklıkları 2008 yılı öncesi %10'un altında iken, sonraki dönemlerde başta Tayland gibi ülkeler olmak üzere sert bir yükselişle %60 mertebelerine ulaştığını göstermektedir (Marcade ve ark. 2009).

CTX-M-1 altgrubu üyesi CTX-M-15-tipi enzimi üreten *E. coli* suşların tüm Dünya'da en çok bulunan toplumsal kaynaklı GSBL taşıyıcı tür oldukları ve son yıllarda evcil ve gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda da görüldükleri rapor edilmektedir (Lahlaoui ve ark. 2014). Toplumsal kaynaklı GSBL pozitif enterobakterilerin hızlı yayılmalarında etken sebebin hastanelerde tedavi gören, bu esnada GSBL-üreten *K. pneumoniae* ile kolonize olan ve tedavi sonunda taburcu edilen kişiler oldukları düşünülmektedir (Chong 2011).

Toplumsal kaynaklı GSBL pozitif Enterobacteriaceae türlerinde TEM, SHV ve CTX-M- altgruplarına ait *bla*-genlerine farklı kombinasyonlar şeklinde bir arada buldukları tespit edilmiştir (Chong ve ark. 2013).

Türkiye'de Durum

Toplumsal kaynaklı üriner sistem infeksiyonu (ÜSE) vakalarının artışında GSBL pozitif *E.coli* suşların önemli rolleri oldukları belirlenmiştir. Ancak, farklı coğrafi bölgeler için yeterli ve doyurucu epidemiyolojik bulgular bulunmamaktadır (Duman ve ark. 2014).

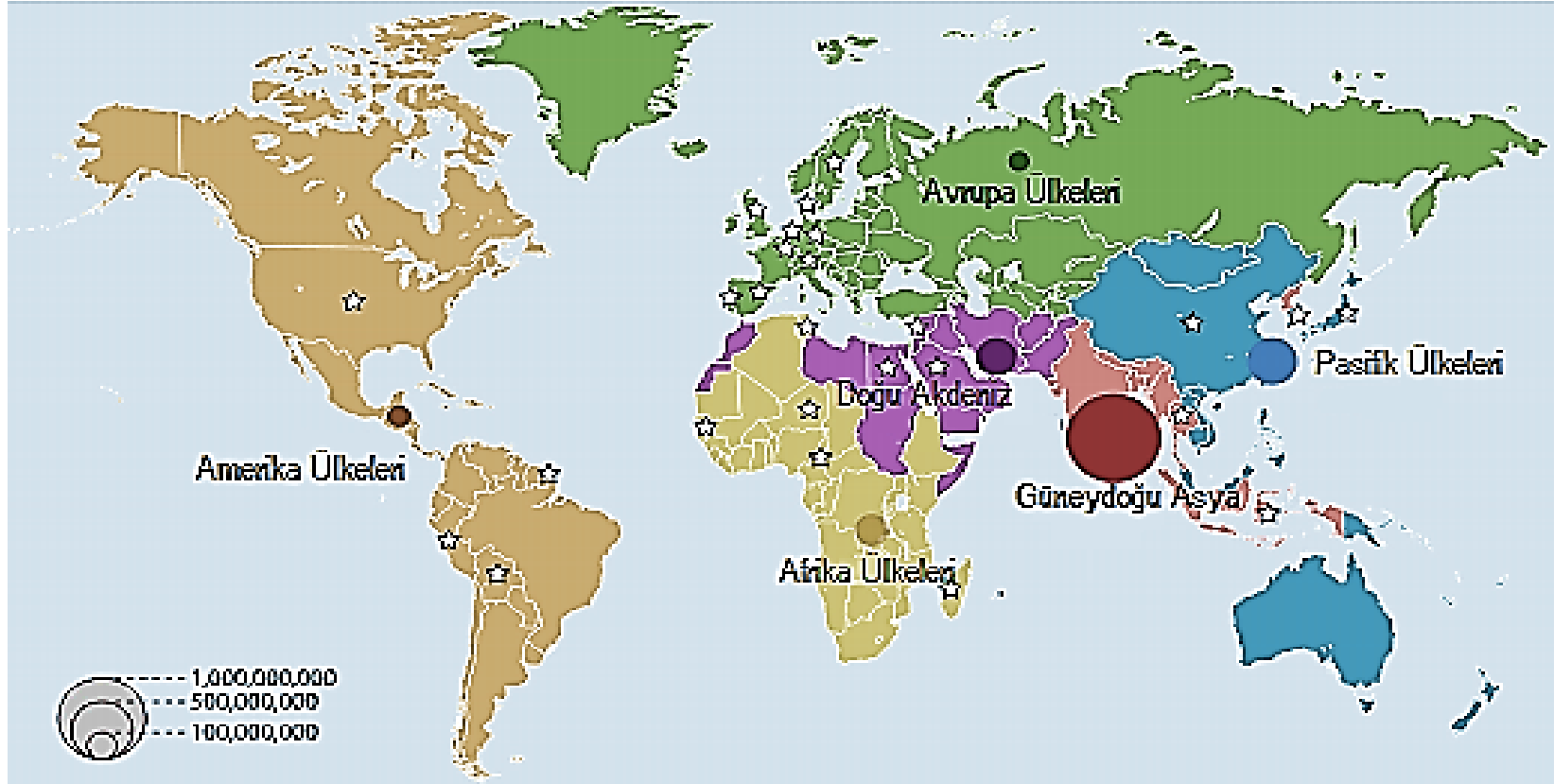
İsveç'te yapılan bir araştırma aralarında Türkiye olmak üzere Asya ve Orta Doğu Ülkelerine seyahat edecek kişiler için üriner infeksiyon ve/veya septisemi riski olduğunu, dirençli *Klebsiella* suşlarının küresel dağılımına bakıldığında en yüksek bulunma oranına Türkiye'de rastlandığını raporlamıştır (Taham 2012).

Başka bir araştırma Türkiye, Bahreyn, Irak, İsrail, Yemen, Ürdün, Katar, Lübnan, Umman, Filistin, Suudi Arabistan, Suriye, Birleşik Arap Emirlikleri (BAE) ve Kıbrıs'a seyahat eden Federal Almanya Cumhuriyeti vatandaşlarının %11'inin GSBL-üreten *E. coli* ile infekte ve %5'inin ise bu dirençli bakteri tipi ile kolonize oldukları saptanmıştır (Leistner ve ark. 2013).

EARSS Türkiye'de en yaygın toplumsal kaynaklı GSBL üreten türlerin *E. coli-K. pneumoniae* ve bu türlerde en baskın beta-laktamaz tiplerinin SHV ve CTX-M olduklarını rapor etmiştir (Coque ve ark. 2008).

İzmir ilinde 2004-2005 yılları arasında toplam 3.108 adet üriner sistem infeksiyonu vakalarının %2,6'sının toplumsal kaynaklı *E. coli* kaynaklı oldukları, *E. coli* suşlarının %21'inin GSBL ürettikleri ve en yaygın *bla*-genin %53 ile CTX-M-1 alt grubu olduğu bildirilmiştir (Yumuk ve ark. 2008).

Türkiye genelinde 2011-2013 yılları arasında yürütülen bir başka araştırma toplum kaynaklı üriner sistem infeksiyonlarına yol açan *E. coli* suşlarının %15'inin GSBL pozitif olduklarını tespit etmiştir (Duman ve ark. 2014).



Şekil 2.18: Toplumsal kaynaklı GSBL pozitif Enterobacteriaceae taşıyıcı sayısı (Woerther ve ark. 2013)

2.8.3 Gıda kaynaklı GSBL-üreten Enterobacteriaceae

Hayvan gübresi ve atıkları dirençli Enterobacteriaceae türlerinin insan, diğer hayvanlar ve çevreye bulaşmasında önemli roller oynamaktadırlar (Cengiz 2010). Ancak, Gıda Teknolojileri Enstitüsü (IFT) gıda zinciri yoluyla yayılan dirençli bakteriler ve direnç genleri hakkında kamuoyunun ve farklı disiplinlerden araştırmacıların dikkatlerini gıda kaynaklı dirençli bakterilerin üzerine çekmiştir (Doyle ve ark. 2013).

Gıda teknolojileri patojen ve fırsatçı mikroorganizmaların gıdalarda varlıklarını etkisizleştirmektedir. Hayvansal gıda kaynaklı bakteriler ham maddenin elde edilmişinden itibaren, işlenmesi süresince bilinçli olarak uygulanan koruyucu faktörler ve süreçler ile karşılaşabilmektedir (Dikici 2009). Bu nedenle örneğin ısı işlemi görünen gıda ürünleri mikrobiyolojik bakımdan güvenilir kabul edilmektedir (Li ve ark. 2011). İnaktivasyon işlemi bakterinin hücre duvarına zarar da verecektir. İşlem sonunda direnç aktarabilen genetik materyaller ortamda serbest kalacak ve türdeş veya farklı bakterilere gen aktarımı olasılığı yükselecektir (Verraes ve ark. 2013). Diğer taraftan, dirençten sorumlu bu tip hareketli genetik sindirim kanalında kolonize olduklarına dair net bulgu bulunmamaktadır (Meral ve Korukluoğlu 2014).

Gıda kaynaklı enterik bakteriler arasında dirençten sorumlu genetik materyallerin aktarıldıkları *in vitro* çalışmalar ile kanıtlanmıştır (Walsh ve ark. 2008). Gıda güvenliği açısından bakıldığında GSBL kodlayan *bla*-genlerin gıdalar yoluyla alındıklarında türdeş ya da farklı tür bakteriler arasında aktarılmaları olası görünmektedir (Ganter ve Stelling 2011).

Gıda endüstrisinde starter, fermentasyon ve probiyotik amaçlı yoğun şekilde kullanılan laktik asit bakterilerinin taşıdıkları direnç genlerini patojen bakterilere aktardıkları kanıtlanmıştır (Yamaguchi ve ark. 2013). Bu nedenle, dirençli starter kültürler ve probiyotik bakterilerin hayvan yemlerine konulması ve insanlar tarafından tüketilen fermente gıdalarda bulunması kesinlikle yasaklanmıştır (EFSA 2007). Bu nedenle, ziraat, hayvancılık ve kültür balıkçılığı sektörlerinde dirençli bakteriler ve dirençten sorumlu genetik materyallerin varlıklarını ortadan kaldıracak tedbirlerin gerekliliği açık şekilde görülmektedir (Sørum ve L'Abée-Lund 2002).

Gıda kaynaklı dirençli bakteriler ve direnç genlerini hastane ve toplumsal kaynaklı olanlardan ayırt etmeye dönük çalışmalar sürekli artış göstermektedir (Mor-Mur ve

Yuste 2010). Üriner sistem infeksiyonu olan bazı kişilerden izole edilen *E. coli* serotipinin hayvansal gıda kaynaklı olduğu belirlenmiştir. Bu saptama Gıda Kaynaklı Üriner Sistem İnfeksiyonu (FUTI) denilen yeni bir tanımı ortaya çıkarmıştır (Nordstrom ve ark. 2013). Ulusal ve uluslararası kaynaklar GSBL üreten enterik bakteriler ve direnç genlerinin gıdalarda epidemiyolojik durumu hakkında net bulgular sunamadıkları için, bu hassas konunun gıda zinciri içinde varlığı ve sebeplerinin anlaşılması ayrıca önem taşımaktadır (Durso ve ark. 2012).

Dünya’da Durum

Dünya’da yoğun şekilde üretimi yapılan ve tüketilen hayvansal kaynaklı gıdalardan tavuk eti, çiğ süt ve peynirlerde dirençli enterobakteriler tespit edilmiştir (Hasman ve ark. 2005). Literatürde en çok rapor edilen GSBL pozitif enterobakteriler *E. coli*, *E. cloacae*, *Salmonella* spp., *K. pneumoniae* ve *Citrobacter* spp.’dir (Stefani ve ark. 2014). Özellikle *E. coli* bulunma sıklığı en yüksek tür olarak bildirilmiştir (Valentin ve ark. 2014; Su ve ark. 2014).

Tavuk etlerinde GSBL-üreten Enterobacteriaceae suşların bulunma oranları Belçika’da %27,2 (Smet ve ark. 2008), Almanya’da %75 (Schwaiger ve ark. 2012), Çin’de %13,9 (Zheng ve ark. 2012), Hollanda’da %94 (Stuart ve ark. 2012), İspanya’da %93,3% (Aidara ve ark. 2013), Avusturya’da %24 (Peternel ve ark. 2014), Polonya’da %64,7 (Makaa ve ark. 2014) ve Danimarka’da %1,3 (Garcia-Migura ve ark. 2014) olarak tespit edilmiştir.

Tavuk etlerinde tespit edilen *bla*-genleri Doğu Avrupa ve Yakın Doğu ülkelerinde CTX-M (Bonnet 2004), Brezilya, Şili ve Arjantin’de CTX-M ve SHV (Bonelli ve ark. 2014; Ferreira ve ark. 2014), Tunus’ta TEM ve CTX-M (Chouchani ve ark. 2011), Kuzey Avrupa Ülkelerinde CTX-M (Aidara ve ark. 2013), Japonya’da SHV ve CTX-M (Hiroi ve ark. 2012, Kawamura ve ark. 2014), Almanya’da TEM, SHV ve CTX-M (Reich ve ark. 2013), Çin’de CTX-M (Rao ve ark. 2014), Avusturya’da SHV ve CTX-M (Zarfel ve ark. 2014) ile Hindistan’da TEM, CTX-M ve SHV’dir (Kar ve ark. 2015).

Süt ve süt ürünlerinde durum tavuk etlerinden pek farklı değildir (Kumar ve ark. 2010). Özellikle ısıl işlem görmeden direk çiğ süttten üretilen taze peynirlerin yoğun tüketildikleri Hollanda ve Fransa için riskler vardır (Dahmen ve ark. 2013). Bu gıda grubu ürünlerde GSBL-üreten enterobakteriler arasında *E. coli* ve *Enterococcus*

türleri ilk sıraları almaktadır (Wang ve ark. 2006). Özellikle GSBL-pozitif *E. coli* insidansı en yüksek suştur. Bu suşun bulunma sıklığı Portekiz’de %80,9 (Amador ve ark. 2009), Fransa’da %5,8 (Dahmen ve ark. 2013), Hindistan’da %1,5 (Kar ve ark. 2015), Tayvan’da %10,5 (Su ve ark. 2014), İran’da %38 (Khoshbakht ve ark. 2014) ve Mısır’da %58,6 (Ahmed ve Shimamoto 2015) olarak bildirilmiştir.

Çiğ sütlerde en yaygın görülen *bla*-genler İspanya’da CTX-M (Geser ve ark. 2012), İngiltere ve Galler’de CTX-M (Randall ve ark. 2014), Tayvan’da TEM, CTX-M ve SHV (Su ve ark. 2014) ile Endonezya’da TEM ve CTX-M’dir (Sudarwanto ve ark. 2015). Taze peynirlerde ise Portekiz’de TEM (Amador ve ark. 2009), İran’da CTX-M (Khoshbakht ve ark. 2014) ve Mısır’da TEM, CTX-M ve SHV (Ahmed ve Shimamoto 2015) gelmektedir.

Sebzeler ve salatalar (Corpet 1988; Blaak ve ark. 2014), domuz eti (Makaa ve ark. 2014), meyveler, tahıllar, kök ve soğansı bitkiler (Schwaiger ve ark. 2011), kanatlı yemleri (Oyinloye ve Ezekiel 2011) ile perakende et ve et ürünlerinde (Sjölund-Karlsson ve ark. 2013) GSBL-pozitif enterobakteriler rapor edilmiştir.

Türkiye’de Durum

GSBL üreten Enterobacteriaceae ve *bla*-genlerin gıdalarda varlıklarını tespitte dönük çalışmalara Türkiye’de yeterli şekilde rastlanmamaktadır. İncelemeler çoğunlukla gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlardan alınan fekal örneklerde ve hayvansal kaynaklı gıdalarda antibiyotik kalıntıları ile izolatlarda disk yaklaşımli yöntemler aracılığıyla antibiyotik duyarlılık taramalardan ibaret kalmaktadır.

Bu bağlamda tavuk eti ve sakatatlarda *Salmonella* ve *S. typhimurium* (Ata ve ark. 2013; Göncüoğlu ve ark. 2013), süt ve süt ürünlerinde *L. monocytogenes* ve *Brucella* (Dümen ve ark. 2011; Gürler ve ark. 2013), kırmızı etlerde enterokoklar (Bayram ve ark. 2011), mezelerde *L. Monocytogenes* ve *Salmonella* (Terzi ve ark. 2013; Gürler ve ark. 2013) türleri gibi antibiyotiklere duyarlı veya dirençli izolatlar tespit edilmiştir.

Türkiye’de gıda kaynaklı antibiyotiklere dirençli bakterilerin durumu belirlemeye dönük araştırmalar yapılmıştır (Sarıcı 2015; Gökalp 2015; Öndeş 2015; Sökmen ve ark. 2015; Özadam 2016). Bu çalışmalar GSBL- ve diğer tip beta-laktamazları disk yaklaşımli yöntemler ile tarayan ve antibiyogram doğrulaması ile kesin şekilde tespit

eden incelemelerdir. Bu incelemelere göre GSBL-pozitif enterobakteri frekansı tavuk etlerinde %27,5 (Sarıcı 2015), sütlerde %21,5 (Gökalp 2015) kırmızı etlerde %20,9 (Öndeş 2015), sebzelerde %20,4 (Sökmen ve ark. 2015) ve peynirlerde %21,6 (Özadam 2016) ve izolatlar arasında en baskın tipin *E. coli* olduğu rapor edilmiştir. Ancak, bu araştırmalar genotipik yöntemler kullanarak *bla*- karakterize etmeyen incelemelerdir. Türkiye’de tek bulgu Pehlivanlar-Önen ve ark. (2015) tarafından yürütülen ve tavuk etlerinden izole edilen GSBL-pozitif *E. coli* suşlarında *bla*_{CTX-M-1} alt grubunun belirlendiği çalışmadır.

2.9 GSBL tespit yöntemleri

Uluslararası otoriteler antibiyotiklere dirençli mikroorganizmaların tespiti ve yayılış yollarının anlaşılması için epidemiyolojik çalışmalar yapılmasını, hızlı, kesin ve güvenilir tespit yöntemleri geliştirilmesini ve takip ağları kurulmasını öncelikli politikaları olarak belirlemiştir (EFSA 2011; WHO 2013).

Dünya’da antibiyotiklere duyarlılık tespit yöntemlerini belirleyen ve düzenli şekilde güncelleyen Uluslararası örgütler bulunmaktadır. Bu örgütler aşağıda sunulmaktadır (Aleksun ve Levy, 2007):

- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, A.B.D)
- European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, AB)
- Office International des Èpizooties (OIE, AB)
- British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC, İngiltere)
- Deutsches Institut für Normung (DIN, Almanya)
- Comite de l’Antibiogramme de la Societe Française de Microbiologie (CA-SFM, Fransa)
- Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA, İsveç)
- Calibrated Dichotomous Sensitivity Test (CDS, Avustralya)

Yöntemlerin ayırım gücü, tekrarlanırlık, tiplendirebilirlik, stabilite, kullanım kolaylığı, maliyet, hız ve bilgisayar analizine uygunluk gibi birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları vardır (Aleksun ve Levy, 2007).

Uluslararası otoritelerden CLSI ve EUCAST *E. coli*, *P. mirabilis* ve *Klebsiella* spp. ve plazmid aracılı Amp-C beta-laktamazlar dışında, diğer Enterobacteriaceae türlerinde GSBL- tespiti için standart yöntemler önermemektedirler (Orak 2005).

GSBL üreten Enterobacteriaceae suşlarının otoanalizör cihazlar ile tespiti fenotipik yöntemleri doğrulamak için tercih edilmektedir. Bu nedenle daha ileri moleküler (genotipik) yöntemlere gereksinim duyulmaktadır (Shi ve ark. 2015).

2.9.1 Fenotipik yöntemler

Fenotipik yöntemler antibiyotiklerin bakteri türlerine karşı *in-vitro* etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Başlıcaları duyarlılık testleri (katı ve sıvı besiyerlerinde seyreltme ve disk difüzyonu yaklaşımı), gradiyent difüzyon (E-test) ve otoanalizör (Vitek 1, Vitek 2 ve BD Phoenix) sistemlerdir (EUCAST 2013).

Antibiyotik duyarlılık testlerinde "difüzyon" ve "dilüsyon" olmak üzere iki yöntem kullanılmakta, disk difüzyon testinde elde edilen bulgular dilüsyon testi ile doğrulanmaktadır (Yıldırım 2010). GSBL- tarama testinde duyarlılık ve özgüllüğünü tayin eden en önemli faktör kullanılan sefalosporin grubu antibiyotiktir (Polsfuss ve ark. 2012).

Disk difüzyon testi GSBL tarama amaçlı en çok tercih edilen yöntemdir. GSBL pozitif olduğu düşünülen enterobakterinin sefpodoksim (CPD), seftazidim (CAZ) ve sefotaksim (CTX) antibiyotiklere karşı duyarlılığı belirlenir. Üç tip antibiyotikten en az birisine ait inhibisyon zonu çapının (CAZ için ≤ 22 mm, CTX için ≤ 27 mm ve CPD için ≤ 7 mm) referans değerinin altında kalması durumunda izolatın şüpheli GSBL-pozitif olduğu düşünülür (CLSI 2013). Ancak, disk difüzyon testi bazı sessiz direnç mekanizmalarını gözden kaçırmaktadır. Bu da testin özgüllük gücünü zayıflatan bir dezavantajdır. Bu nedenle Uluslararası otoriteler zon ölçümü sınır değerlerini gerekli koşullarda revize ederler (Wang ve ark. 2011).

Disk difüzyon testin duyarlılığının azaldığı durumlarda doğrulama yapılması gerekir. Doğrulama testleri klavulanik asit ve sefalosporin ajan arasındaki etkileşimi göstermektedir. Bu amaçla klavulanik asit (CLA) içeren ve içermeyen türdeş diskler etrafında oluşan zonların differansiyel ölçüm farkı ≥ 5 mm ise, izolat GSBL-pozitif kabul edilir.

Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerin belirlendiği dilüsyon yöntemi, hedef bakteri ile antibiyotik ajanı bir araya getirerek, aralarındaki etkileşimin göstergesi bir minimum ilaç miktarı belirlemeye dayanır. Benzer şekilde gradiyent difüzyon (E-testi) yöntemi katı besiyerinde difüzyon yoluyla MİK değerlerinin saptanmasına mümkün kılan ve kullanımı kolay bir tekniktir (Pfaller ve Segreti 2006; Mohanty ve ark. 2009; Soltani ve ark. 2014).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar rutin duyarlılık testleri ile her zaman kesin tespit edilemezler. Bu durumda otomatize sistemlere başvurulmaktadır. Bu amaçla Dünya’da kullanılan (i) VİTEK 1 (bioMérieux, Fransa), (ii) VITEK 2 (bioMérieux) ve (iii) Phoenix (Becton Dickinson Biosciences, ABD) sistemleri vardır (Singh ve Singh 2014).

Araştırmacılar fenotipik yöntemlerin birbirlerinden farklı duyarlılık ve özgüllük göstermeleri sebebiyle, daha kesin ve hızlı sonuçlar verecek yeni yöntemler geliştirilmesini tavsiye etmektedirler (Bastos ve ark. 2015).

2.9.2 Genotipik yöntemler

Dirençli bakteri türlerinin sürekli artışı ve yeni direnç mekanizmalarının gelişimi nedeniyle fenotipik testlerin duyarlılık ve özgüllüklerini daha yüksek seviyelere çıkaracak araştırmalara devam edilmektedir (Tomlin ve ark. 2001).

Gen ifadesi sonucu ortaya çıkan ürünleri inceleyen fenotipik yöntemler yeteri kadar ayırt edici güce sahip değildirler. Zaman alıcı olmaları, düşük tekrarlanabilirlik özellikleri, yorum güçlükleri ve bakteride biyolojik özellikleri değiştiren random mutasyonlar ve gen ifadelerinde varyasyonlardan dolayı zayıf ayırım yapmaları başlıca dezavantajlarıdır (EUCAST 2013). Araştırmalar fenotipik yöntemlerin GSBL-üreten bakterilerin %40’ının sefotaksim ve/veya seftriaksona duyarlılıklarını hatalı tespit ettiklerini, GSBL ve AmpC eş zamanlı üreten türlerin %32’sini kaçırdıklarını bildirmiştir (Pfaller ve Segreti 2006).

Standart fenotipik yöntemleri kullanarak tespiti mümkün olmayan durumlarda genotipik yöntemler tavsiye edilmektedir (Marshall ve Levy 2011). Genotipik yöntemler zaman kazandırması, yüksek duyarlılık ve özgüllükleri ile öne çıkmaktadırlar (Waldeisen ve ark. 2011). Fenotipik ve genotipik yöntemler birlikte kullanıldıklarında son derece yararlı bilgiler sağlamaktadır (Morrissey ve ark. 2014).

İzoelektrik nokta, PCR, *real-time* PCR, PCR-RFLP, DNA-mikroarray ve sekanslama bu alanda son yıllarda artan şekilde kullanılmaya başlayan genotipik yöntemlerden başlıcalarıdır (Willemsen ve ark. 2011).

İzoelektrik odaklanma ya da diğer adıyla elektroforez, farklı yük, büyüklük veya biçimde olan proteinler ve nükleik asitler gibi makromoleküllerin bir elektrik alanın etkisi altında göç ettirilerek ayrılması ve saflaştırılması amacıyla tercih edilen bir elektrokinetik yöntemdir. (Yalçın-tepe-Güneş-tutar ve Cantürk-Rodop 2009). İzoelektrik odaklanma (Elektroforez) bir bakıma PCR tekniğinin öncüsü kabul edilmektedir (Özgen-Arun ve Uğur 1999).

PCR belli bir gen bölgesinin tespiti üzerine dayalı çalışmakta, yüksek duyarlılık ve özgüllük ile genetik materyalin hızlı ve güvenilir şekilde tespitini mümkün kılmakta ve enzimin bağlı olduğu aile saptanabilmektedir (Zankari ve ark. 2012).

Real-time PCR hızlı oluşu, yüksek duyarlılık ve özgüllüğü, nicel çalışmaya uygunluğu ve otomatize edilebilmesi gibi avantajları olan DNA'ya dayalı bir yöntemdir. Amplifikasyon sonrası elektroforetik işleme gerek kalmamaktadır. *Real-time* PCR eş ve gerçek zamanlı olarak birden fazla bakterinin tek seferde taranmasını mümkün kılmaktadır (Shi ve ark. 2010).

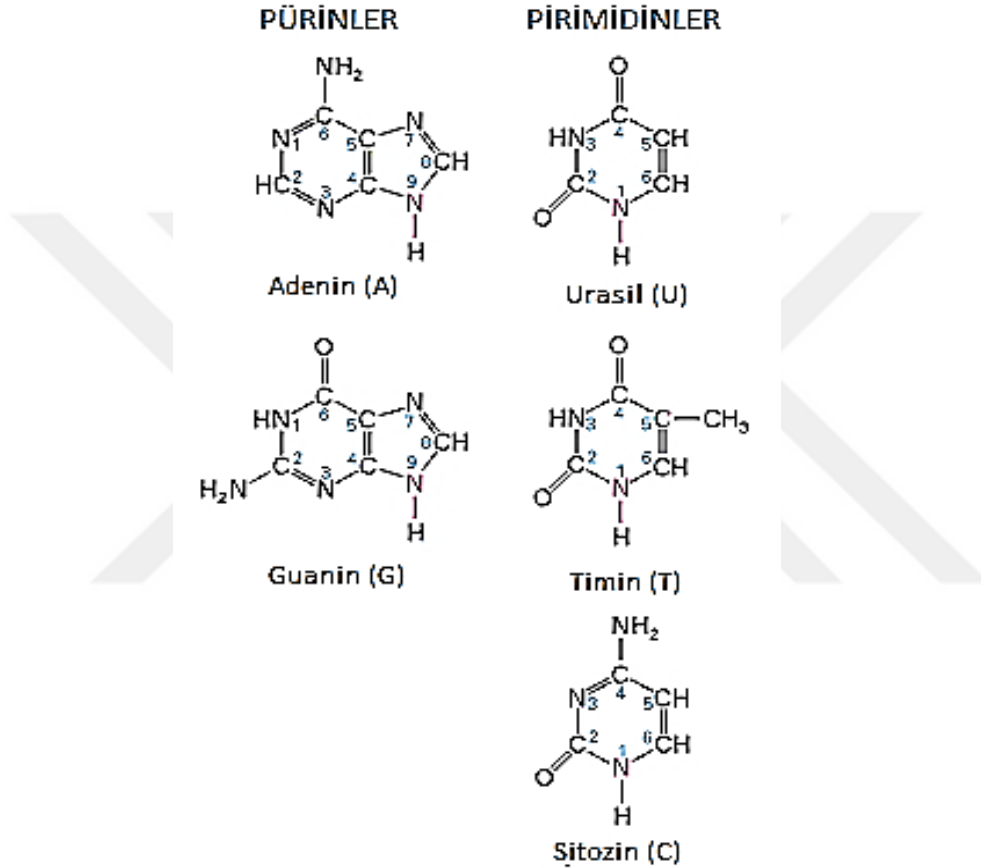
PCR-RFLP yöntemi DNA'nın bakterilerin bakteriyofajlara karşı savunma amaçlı ürettikleri farklı restriksiyon enzimlerinden bir veya bir kaç ile kesime uğratıldıktan sonra, agaroz jel elektroforezi işlemine tabi tutularak etidyum bromür ile boyanmış jelde bantlarının yerleri ve sayılarının kıyaslanarak çeşitlendirilmesi ilkesi üzerine kuruludur (Söbeli ve Kayaardı 2014).

DNA mikroarray yüzlerce oligonükleotid probun üzerinde immobilize edildiği cam mikroskop slaytlar veya çiplere dayalı otomatik ve minyatür bir teknolojidir. Bu sayede birçok gen aktivitesi eşzamanlı olarak takip edilebilmektedir (Law ve ark. 2014).

2.9.2.1 DNA sekanslama ve BLAST analizi

DNA organizmalarda kalıtsal bilgi taşıyıcısı olan çift zincirli sarmal bir yapıdır. Bu yapı nükleotid adı verilen birimlerin birbirlerine fosfodiester bağı ile bağlanmasıyla oluşmaktadır. Bir nükleotid, şeker, fosfat ve adenin (A), sitozin (C), guanin (G) timin (T) denilen dört bazın birinden oluşmaktadır (Birben 2006).

DNA sekanslaması DNA molekülündeki A,S,G ve T nükleotid bazların sırasının belirlenmesi işlemidir. Bu teknoloji sayesinde bakteri, maya, mantar, virüs gibi farklı organizmaların genomlarının hızh ve yüksek doğrulukla dizilenmesi, genetik/epigenetik ağları kurmak ve genom varyasyonları (çeşitliliği) hakkında detaylı bilgiler edinmek mümkün olmaktadır (Üstek ve ark. 2011).

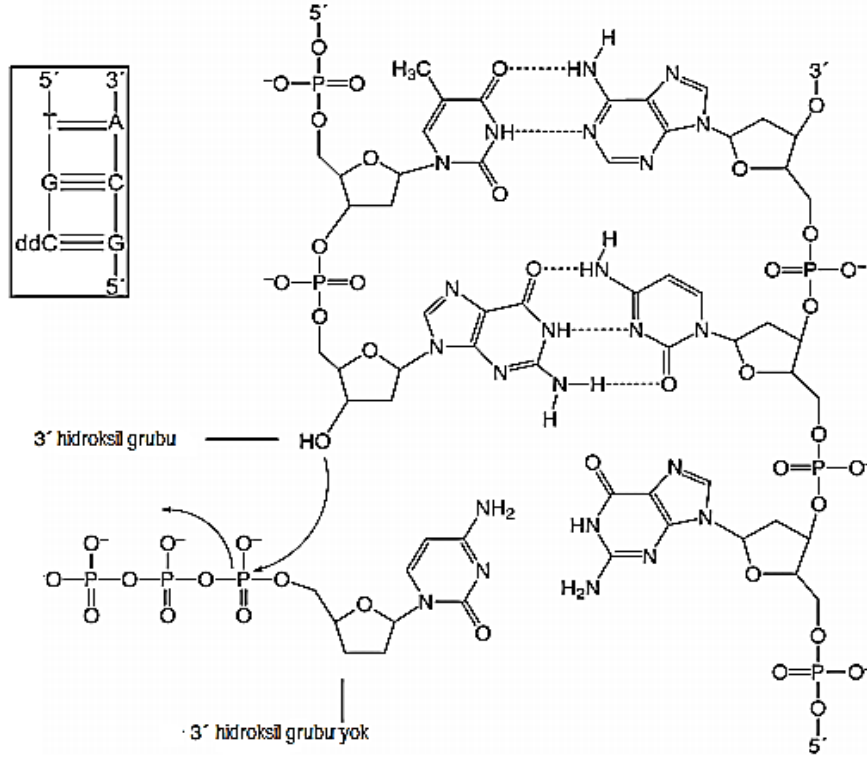


Şekil 2.19: Nükleotidler

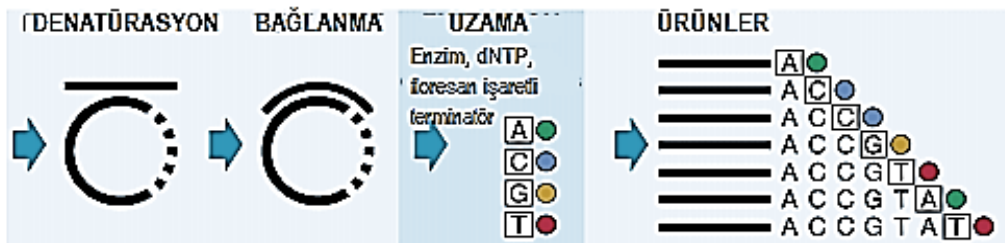
DNA sekanslama işlemine PCR ürününün saflaştırılması ile başlanır. Saflaştırması tamamlanan DNA ve primer setlerin derişimleri belli bir değere ayarlanır. Termal Döndürücü yardımıyla döngüsel sekanslama yapılır.

Döngüsel sekanslama denatürasyon, bağlanma ve uzama adı verilen ardışık üç işlemin belli bir sıklıkta tekrar edilmesi prensibine dayanmaktadır.

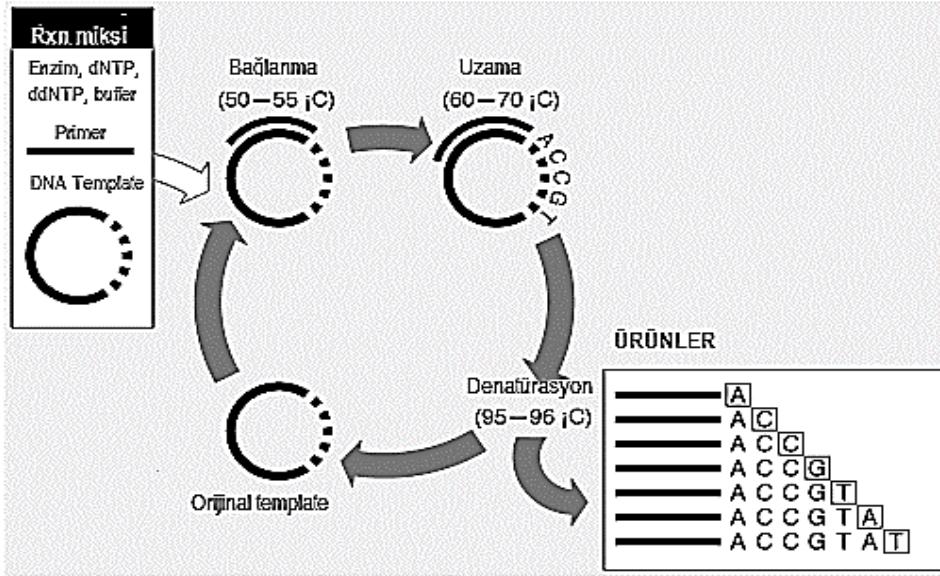
Elde edilen ürünler jel veya kapiler elektroforez ile görüntülenirler. DNA sekanslama kitleri döngüsel sekanslama prensibine dayalı tasarlanmaktadır. Ticari sekanslama kitleri PCR için gerekli tüm kimyasalları, floresan boyalı ddNTP'ler ile Taq DNA Polimeraz enzimini "Big Dye Ready Reaction Mix" adı verilen tek bir karışım şeklinde hazır bulundurmaktadır.



Şekil 2.20: Nükleotidlerin DNA sarmalı oluşturması (Appliedbiosystems)



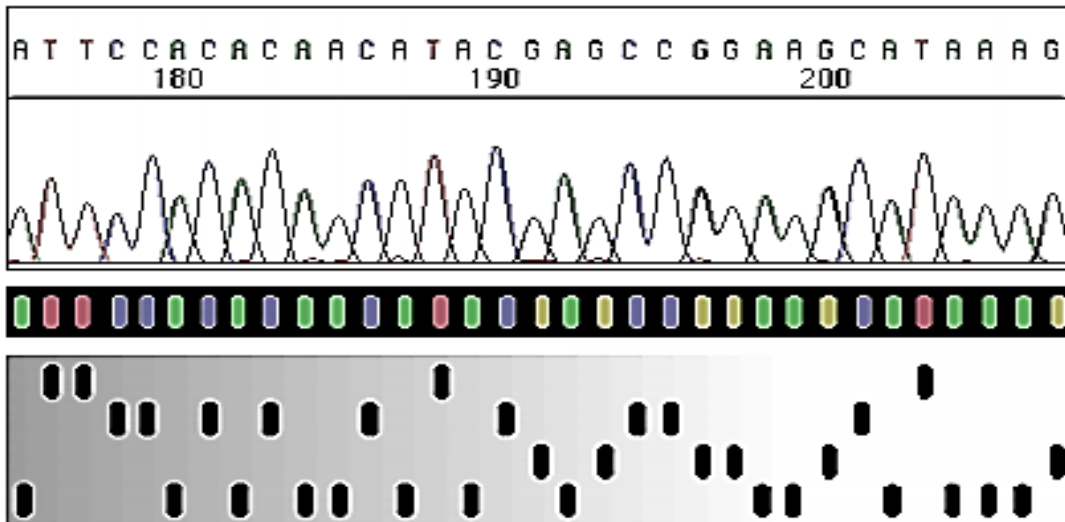
Şekil 2.21: Floresan işaretli terminatör döngüsel sekanslama aşamaları (Appliedbiosystems)



dNTP: deoksinükleotid trifosfat (dATP, dGTP, dCTP ve dTTP temsilen ksalınmadır).
ddNTP: dideoksinükleozit trifosfat

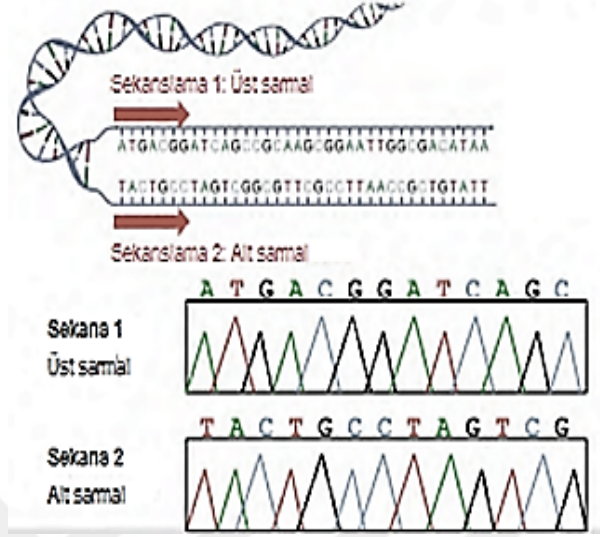
Şekil 2.22: Döngüsel sekanslama aşamaları (Appliedbiosystems)

Bu karışma yalnızca primer ve saflaştırılmış kalıp (template) DNA eklenerek, PCR uygulamasına geçilmektedir. Bu işlemin sonunda çift yönlü ham DNA sekansları elde edilir. PCR ürünü için elde edilen iki dizi karşılaştırılarak tek dizi haline getirilir. Elde edilen nükleotid ya da aminoasit dizileri (tiplendirme amaçlı) gen bankasından (GenBank) alınan referans diziler ile karşılaştırılarak analiz edilir (Taşlı ve Bahar 2010).



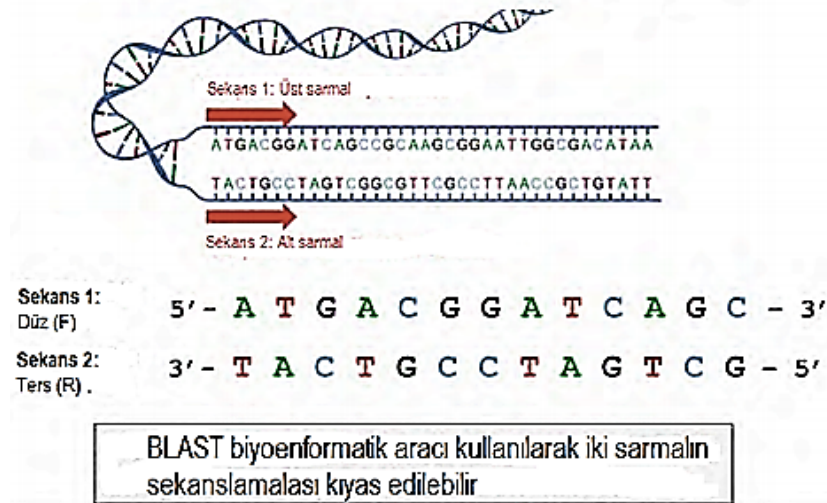
Şekil 2.23: Dört renkli floresans ve tek renkli radyoaktif sekanslama (Appliedbiosystems)

Günümüzde kullanılan yeni sekanslama (dizileme) sistemleri arasında Roche 454 FLX, Illumina/Solexa Genome Analyzer, Applied BioSystem SOLiD™ System, Helios Heliscope™ ve Pacific Biosciences SMRT gelmektedir (Mardis 2008).

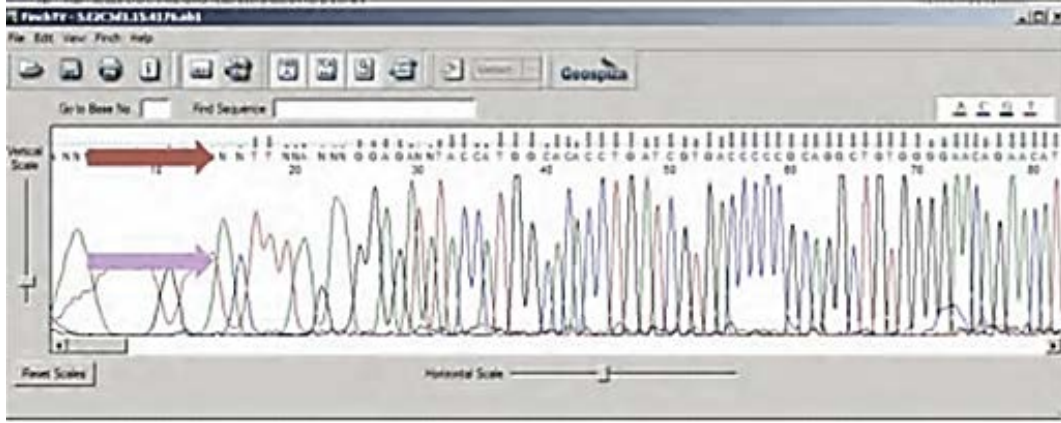


Şekil 2.24: DNA sarmalların sekanslaması (NWABR.ORG 2015)

Yeni sekanslama teknolojileri sayesinde uzunluğu 35 ila 700 bp arasında değişen genetik materyalde yüksek verim ve düşük maliyetle milyonlarca okuma alınabilmektedir. Yeni nesil sekanslama teknolojisi tüm gen içeriğini elektroforez, PCR ve Southern blot gibi konvansiyonel plazmid-tiplendirme yöntemlerine göre yüksek ayırım özelliği ile ortaya koymaktadır (Brolund ve ark. 2013).



Şekil 2.25: DNA sekansların kıyaslaması (NWABR.ORG 2015)



Şekil 2.26: Sekanslama kromatogram sonuçları (NWABR.ORG 2015)

Yeni nesil sekanslama teknolojisi CTX-M, TEM ve SHV-tipi *bla* genleri yüksek hassasiyet ile tespit edebilmektedir (Veenemans ve ark. 2014).

Moleküler biyoloji ve DNA sekanslama teknolojilerindeki hızlı gelişim yüzünden çok büyük miktarlarda veri üretilmektedir. Dünya’da canlı organizmalara ait nükleotid dizi bilgilerinin depolama işlemi üç veri tabanı tarafından üstlenilmiştir (Kalaycıoğlu 2013).

Bu veri tabanları aşağıda sunulmuştur:

- Amerikan Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI-GenBank; ABD)
- Avrupa Moleküler Biyoloji Laboratuvarı (EMBL; İngiltere)
- Japonya Veri Tabanı (DDJB; Japonya)

Bu üç temel veri tabanı “International Sequence Database Collaboration (INSDC)” kuruluşu altında erişime açık hale getirilmesine olanak sağlamaktadırlar.

Veritabanlarında araştırma yapabilmek için tasarlanmış biyoenformatik araçlar olan FAST ALL (FASTA) formatı ve Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) yazılımları bulunmaktadır (Albayrak ve Yörük 2013).

3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Kontrol suşları

Moleküler incelemelerde pozitif ve negatif kontrol amaçlı *K. pneumoniae* ATCC 700603 (GSBL pozitif; Oxoid CL3074, İngiltere) ve *E. coli* ATCC 25922 (GSBL negatif; Oxoid CL7050, İngiltere) suşları kullanılmıştır.

3.1.2 GSBL-pozitif Enterobacteriaceae suşlar

*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genleri ve *bla*_{CTX-M} altgruplarının genotipik karakterizasyonu için mikrobiyolojik ve CLSI (2013) yöntemleri uygulanarak tavuk etlerinden 29 adet (Sarıcı 2015), çiğ inek sütlerinden 24 adet (Gökalp 2015) ve taze peynirlerden 2 adet (Özadam 2016) olmak üzere elde edilen toplam 55 adet kesin GSBL-pozitif Enterobacteriaceae suşları kullanılmıştır. Suşların dağılımı Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: GSBL-pozitif suşların dağılımı

Orijini	Suş Sayısı (n)	Türü (n)				
		<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>C. brakii</i>	<i>C. werkmanii</i>
Tavuk Eti	29	24	2	2	-	1
İnek Sütü	24	18	3	-	3	-
Taze Peynir	2	2	-	-	-	-
Toplam	55	44	5	2	3	1

3.2 Yöntem

Çizelge 3.1’de verilen toplam 55 adet GSBL-pozitif Enterobacteriaceae suşlarda bu tür beta-laktamazları kodlayan *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genleri ve *bla*_{CTX-M} altgruplarının karakterizasyonu aşamasına geçilmiştir.

3.2.1 DNA izolasyonu

Suşlardan GENESpin DNA izolasyonu kiti (Eurofins GeneScan, Almanya) talimatları takip edilerek DNA izolatları elde edilmiştir. Elde edilen izolatlar ileri analizler için -20⁰C’de saklamaya alınmıştır.

3.2.2 PCR primer setleri seçimi

*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} primer setleri seçimi

*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genlerini tespit edecek primerler Ojdana ve ark. (2014) çalışması ve www.lahey.org/studies’deki koşullara bağlı kalınarak düz (F)/ters (R) olacak şekilde Fullgen Ltd. ve İontek Ltd. (İstanbul, Türkiye) şirketlerine tasarlatılmıştır. Primer dizilimleri Çizelge 3.2’de sunulmuştur.

Çizelge 3.2: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} primer dizilimleri (Ojdana ve ark. 2014)

<i>bla</i> _{TEM} F	5’-GCTCACCCAGAAACGCTGGT-3’
<i>bla</i> _{TEM} R	5’-CCATCTGGCC CCAGTGCTGC-3’
<i>bla</i> _{SHV} F	5’-CCCGCAGCCGCTTGAGCAAA-3’
<i>bla</i> _{SHV} R	5’-CATGCTCGCCGGCGTATCCC-3’
<i>bla</i> _{CTX-M} F	5’-SCSATGTGCAGYACCAGTAA-3’
<i>bla</i> _{CTX-M} R	5’-ACCAGAA YVAGCGGBGC-3’

***bla*_{CTX-M} altgrupları primer setleri seçimi**

*bla*_{CTX-M} altgruplarını tespit edecek primerler Woodford ve ark. (2006) çalışması ve www.lahey.org/studies'deki koşullara bağlı kalınarak düz (F)/ters (R) olacak şekilde Fullgen Ltd. ve İontek Ltd. (İstanbul, Türkiye) Şirketlerine tasarlatılmıştır. Primer dizilimleri Çizelge 3.3'te sunulmuştur.

Çizelge 3.3: *bla*_{CTX-M} altgrupları primer dizilimleri (Woodford ve ark. 2006)

<i>bla</i> _{CTX-M1} F	5'-AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC
<i>bla</i> _{CTX-M1} R	5'-AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT
<i>bla</i> _{CTX-M2} F	5'-CGA CGC TAC CCC TGC TAT T
<i>bla</i> _{CTX-M2} R	5'-CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG
<i>bla</i> _{CTX-M8} F	5'-TCG CGT TAA GCG GAT GAT GC
<i>bla</i> _{CTX-M8} R	5'-AAC CCA CGA TGT GGG TAG C
<i>bla</i> _{CTX-M9} F	5'-CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG
<i>bla</i> _{CTX-M9} R	5'-ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC
<i>bla</i> _{CTX-M25} F	5'-GCA CGA TGA CAT TCG GG
<i>bla</i> _{CTX-M25} R	5'-AAC CCA CGA TGT GGG TAG C

3.2.3 PCR amplifikasyonu

Madde 3.2.1.1'de elde edilen DNA izolatlarında *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genlerin karakterizasyonu Madde 3.2.1.2'de tasarlatılan primerler, kontrol suşları GSBL pozitif *K. pneumoniae* ATCC®700603, GSBL negatif *E. coli* ATCC®25922 kullanılarak amplifiye edilmiştir. PCR cihazı olarak Thermal Cycler PTC-0200G DNA Engine (BioRad, Türkiye) kullanılmıştır.

Çizelge 3.4: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} solüsyon içerikleri (Ojdana ve ark. 2014)

İçerik	Miktar (µl)
PCR Miks	12,5
<i>bla</i> _{TEM_F} (10µM)	1
<i>bla</i> _{TEM_R} (10µM)	1
Distile Su	7,5
Örnek DNA	3
Toplam Hacim	25

***bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} PCR protokolü**

Ojdana ve ark. (2014) yayınında verilen PCR amplifikasyon koşulları gradyent PCR uygulanarak optimize edilmiştir. Her primerden (F/R) 10 µM olacak şekilde 1 µl düz primer ve 1 µl ters primer, 12,5 µl 2xPCR Master miks, 3 µl DNA izolatı ve 7,5 µl ultra saf distile su olmak üzere toplam 25 µl olacak şekilde PCR solüsyonu hazırlanmıştır. *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} solüsyon içerikleri Çizelge 3.4'te sunulmuştur.

*bla*_{TEM} için 95⁰C'de 15 dk; toplam 35 döngü olmak kaydıyla 95⁰C'de 1 dk, 63⁰C'de 1 dk ve 72⁰C'de 1 dk ve son olarak 72⁰C'de 10 dk olacak şekilde PCR uygulanmıştır.

*bla*_{SHV} için 95⁰C'de 15 dk; toplam 30 döngü olmak kaydıyla 94⁰C'de 30 sn, 58,5⁰C'de 30 sn ve 72⁰C'de 45 sn ve son olarak 72⁰C'de 10 dk olacak şekilde PCR uygulanmıştır.

*bla*_{CTX-M} için 95⁰C'de 15 dk, toplam 30 döngü olmak kaydıyla 94⁰C'de 30 sn, 55⁰C'de 30 sn ve 72⁰C'de 45 sn ve son olarak 72⁰C'de 10 dk PCR uygulanmıştır.

Optimizasyon öncesi ve sonrası PCR koşulları Çizelge 3.5, Çizelge 3.6 ve Çizelge 3.7'de verilmiştir.

Elde edilen ampikonlar 0,5XTBE (Tris-Borat-EDTA; 89 mM Tris, 89 mM borik asit, 2 mM EDTA) (Merck, Almanya) tamponu içinde jel elektroforezi yapılıncaya kadar 4⁰C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.5: *bla*_{TEM} PCR Koşulları

	Optimizasyon Öncesi	Optimizasyon Sonrası
İlk denatürasyon	95 ⁰ C, 5 dk, 1 döngü	95 ⁰ C, 15 dk, 1 döngü
Denatürasyon	94 ⁰ C, 1 dk	95 ⁰ C, 1 dk
Primer bağlanması	58 ⁰ C, 1dk	63 ⁰ C, 1dk
Sentez	72 ⁰ C, 1dk	72 ⁰ C, 1dk
Son	72 ⁰ C, 10 dk	72 ⁰ C, 10 dk

35 döngü

35 döngü

Çizelge 3.6: *bla*_{SHV} PCR Koşulları

	Optimizasyon Öncesi	Optimizasyon Sonrası
İlk denatürasyon	95 ⁰ C, 5 dk, 1 döngü	95 ⁰ C, 15 dk, 1 döngü
Denatürasyon	94 ⁰ C, 1 dk	94 ⁰ C, 30 sn
Primer bağlanması	58 ⁰ C, 1dk	58,5 ⁰ C, 30 s
Sentez	72 ⁰ C, 1dk	72 ⁰ C, 45 sn
Son	72 ⁰ C, 10 dk	72 ⁰ C, 10 dk

35 döngü

30 döngü

Çizelge 3.7: *bla*_{CTX-M} PCR Koşulları

	Optimizasyon Öncesi	Optimizasyon Sonrası
İlk denatürasyon	94 ⁰ C, 3 dk, 1 döngü	95 ⁰ C, 15 dk, 1 döngü
Denatürasyon	94 ⁰ C, 20 sn	94 ⁰ C, 30 sn
Primer bağlanması	55 ⁰ C, 30 sn	55 ⁰ C, 30 sn
Sentez	72 ⁰ C, 45 sn	72 ⁰ C, 45 sn
Son	72 ⁰ C, 10 dk	72 ⁰ C, 10 dk

35 döngü

30 döngü

***bla*_{CTX-M} altgrupları PCR protokolü**

Woodford ve ark. (2006) yayınında verilen PCR amplifikasyon koşulları gradyent PCR uygulanarak optimize edilmiştir. Her primer çiftinden (F/R) 20 µM olacak şekilde 0,75 µl düz primer ve 0,75 µl ters primer (*bla*_{CTX-M-8} ve *bla*_{CTX-M-25} ters primerler 1,5 µl), 12,5 µl 2xPCR Master miks ve 5 µl DNA izolatu olmak üzere toplam 25 µl olacak şekilde PCR solüsyonu hazırlanmıştır. PCR solüsyonu Çizelge 3.8'de verilmiştir.

Çizelge 3.8: *bla*_{CTX-M} altgrupları PCR solüsyonu içeriği

İçerik	Miktar (µl)
PCR Miks	12,5 µl
Grup1_F (20µM)	0,75 µl
Grup1_R (20µM)	0,75 µl
Grup2_F (20µM)	0,75 µl
Grup2_R (20µM)	0,75 µl
Grup8_F (20µM)	0,75 µl
Grup9_F (20µM)	0,75 µl
Grup9_R (20µM)	0,75 µl
Grup25_F (20µM)	0,75 µl
grup18-25_R (20µM)	1,5 µl
Örnek DNA	5 µl
Toplam Hacim	25,0 µl

Optimizasyon koşulları 95⁰Cde 15 dk; 94⁰Cde 25 sn, 52⁰Cde 40 sn ve 72⁰C'de 50 sn olmak kaydıyla toplam 5 döngü; devamında 94⁰C'de 25 sn, 54⁰C'de 40 sn ve 72⁰C'de 50 sn olmak kaydıyla toplam 22 döngü ve son olarak 72⁰C'de 6 dk şeklinde uygulanmıştır (Çizelge 3.9). Elde edilen PCR Ürünleri, 0,5xTBE tamponu icinde jel elektroforezi yapılıncaya kadar 4°C'de saklanmıştır.

Çizelge 3.9: *bla*_{CTX-M} altgrupları PCR koşulları

	Optimizasyon Öncesi	Optimizasyon Sonrası
İlk denatürasyon	94 ⁰ C, 5 dk, 1 döngü	95 ⁰ C, 15 dk, 1 döngü
Denatürasyon	94 ⁰ C, 25 sn	94 ⁰ C, 25 sn
Primer bağlanması	52 ⁰ C, 40 sn	52 ⁰ C, 40 sn
Sentez	72 ⁰ C, 50 sn	72 ⁰ C, 50 sn
	Denatürasyon	94 ⁰ C, 25 sn
	Primer bağlanması	54 ⁰ C, 40 sn
	Sentez	72 ⁰ C, 50 sn
Son	72 ⁰ C, 6 dk	72 ⁰ C, 6 dk

30 döngü (Optimizasyon Öncesi)
5 döngü (Optimizasyon Sonrası)
22 döngü (Optimizasyon Sonrası)

3.2.4 Agaroz jel hazırlama

Hazırlanacak %2 agaroz jel için 2 gr agaroz tozu (BioRad 161-3103, Türkiye) 100 ml 0.5xTBE tampon çözeltisine (Merck) ilave edilmiştir. Solüsyon ısıtıcılı manyetik karıştırıcı (Stuart CB162, İngiltere) yardımıyla 100-150⁰C sıcaklıkta agaroz tozu tanecikleri tümüyle eriyinceye kadar 30 ila 40 dk karıştırılmıştır. Homojen hale gelen solüsyon el yakmayacak sıcaklığa gelinceye kadar oda koşullarında 5-10 dk soğumaya bırakılmıştır. Bekleme sırasında çökelti oluşmaması için bir kaç kez sallanarak karıştırılmıştır. Taraklar ve bantlar dikkatlice çıkarılarak temizlenmiş, tabağa yerleştirilmiş ve jel dökme aparatı hazırlanmıştır. Solüsyon jel hava kabarcığı oluşturmayacak şekilde, sabit boşaltma hızında 30 ml seviyesi çizgisine kadar tabağa dökülmüştür. Hava kabarcığı oluşması durumunda mikro pipet ucu ile patlatılmıştır. Jel dökümü tamamlanan aparat 10 dk kıpırdatılmadan jelin donması için bekletilmiştir. Taraklar jel tabağıyla birlikte elektroforez tankına yerleştirilmiştir. Jelin kurumaması için üzerini kaplayacak kadar 0.5XTBE Tamponu konulmuştur (Ojdana ve ark. 2014).

3.2.5 Agaroz jel yürütme ve görüntüleme

bla-genlerin agaroz jel yürütme ve görüntülemesi Ojdana ve (2014) ve Woodford ve ark. (2006) yayınlarında bildirilen talimatlar takip edilerek yapılmıştır.

Parafilm üzerine sırasıyla; 1,5 µl DNA Loading tamponu (Fisher Scientific Fermentas, İngiltere), 3 µl PCR ürünü, 1,5 µl DNA ladder (Fisher Scientific Fermentas Gene Ruler) ve markör üzerine 1,5 µl SYBRGreen Tip-I (Sigma G7654, ABD) pipetlenmiştir. Solüsyon mikro pipet ile 1-2 defa karıştırıldıktan sonra jele yüklenmiştir. Cihaz 5 V/cm potansiyel fark ile voltaj 170 V'a ayarlanmıştır. Kontrol suşları >200 bp'den daha uzun olduğu için 20 dk yürütülmüştür. Çalışmada elektroforetik olarak GEL DOC 2000 (BioRad, Türkiye) cihazı kullanılmıştır.

Çizelge 3.10: *bla*-genleri ampikon büyüklükleri

Primer (F/R)	Ampikon büyüklüğü (bp)
<i>bla</i> _{TEM}	686
<i>bla</i> _{SHV}	733
<i>bla</i> _{CTX-M}	585
<i>bla</i> _{CTX-M-1}	415
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	552
<i>bla</i> _{CTX-M-8}	666
<i>bla</i> _{CTX-M-9}	205
<i>bla</i> _{CTX-M-25}	327

Jelde oluşan *bla*-genleri bant görüntüleri “*bla*_{TEM} 686 bp, *bla*_{SHV} 733 bp ve *bla*_{CTX-M} için 585 bp (Ojdana ve ark. 2014) ile *bla*_{CTX-M} altgrupları *bla*_{CTX-M-1} 415 bp, *bla*_{CTX-M-2} 552 bp, *bla*_{CTX-M-8} 666 bp, *bla*_{CTX-M-9} 205 bp ve *bla*_{CTX-M-25} 327 bp (Woodford ve ark. 2006) UV ışık altında PowerPac™ Imaging System (Bio-Rad, Türkiye) ile görüntülenmiş ve Quantity One 4.6.3 Gel Doc XR Software (Bio-Rad, Türkiye) programı ile analiz edilmiştir (Çizelge 3.10).

3.2.6 DNA sekanslama

Madde 3.2.5’de bant görüntüleri alınan 1 adet *bla*_{TEM}, 1 adet *bla*_{SHV} ve 1 adet *bla*_{CTX-M} ampikonların sırasıyla saflaştırma ve sekanslama (dizileme) işlemine geçilmiştir.

bla-gen PCR ürünleri High Pure PCR Product Purification Kiti (Roche, Türkiye) kullanım talimatları takip edilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırması tamamlanan 1 adet *bla*_{TEM}, 1 adet *bla*_{SHV} ve 1 adet *bla*_{CTX-M} *bla*-genleri sekanslama reaksiyonuna alınmıştır.

Sekanslama hazırlıkları ABI PRISM® BigDye Terminator Cycle Sequencing Kiti (AB Applied Biosystems, Türkiye) talimatları takip edilerek yapılmıştır. Sekanslama işlemine hazır hale getirilen ürünler ABI Prism® 310 Genetic Analyzer (AB Applied Biosystems) cihazına yüklenerek, sekanslama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Tamamlanmış *bla*-genlerin sekansları GenBank veritabanına ait BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) Programı kullanılarak kontrol edilmiştir (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sekanslar benzerlik oranlarına göre erişim numaraları ile listelenmiş ve listelenmiş her bir sekansın açıklaması, E-değeri ve benzeme yüzdesi (%) gösterilmiştir.

3.2.7 İstatistik değerlendirme

İstatistik analiz için SPSS 19 (SPSS Inc., ABD) paket programı kullanılmıştır. GSBL-kodlayan *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genlerin incelenen enterobakteri suşlarının elde edildikleri gıda örnekleri bazında bulunma oranlarının niteliksel kıyaslaması Kruskal-Wallis H-testi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar P<0,05 seviyesinde anlamlı kabul edilmiştir. Kruskal-Wallis testi normal dağılım göstermeyen en az üç grubun ortalamaları arasındaki farklılığın anlamlılığını test etmek için kullanılan ve ANOVA’nın parametrik olmayan alternatifi bir yöntemdir. Bu yöntemde varsayım aranmadığı için, varsayım bozulursa, teste etkisi olmamaktadır. Bu yöntem çabuk ve kolay yapılmaktadır (www.sbu.saglik.gov.tr).

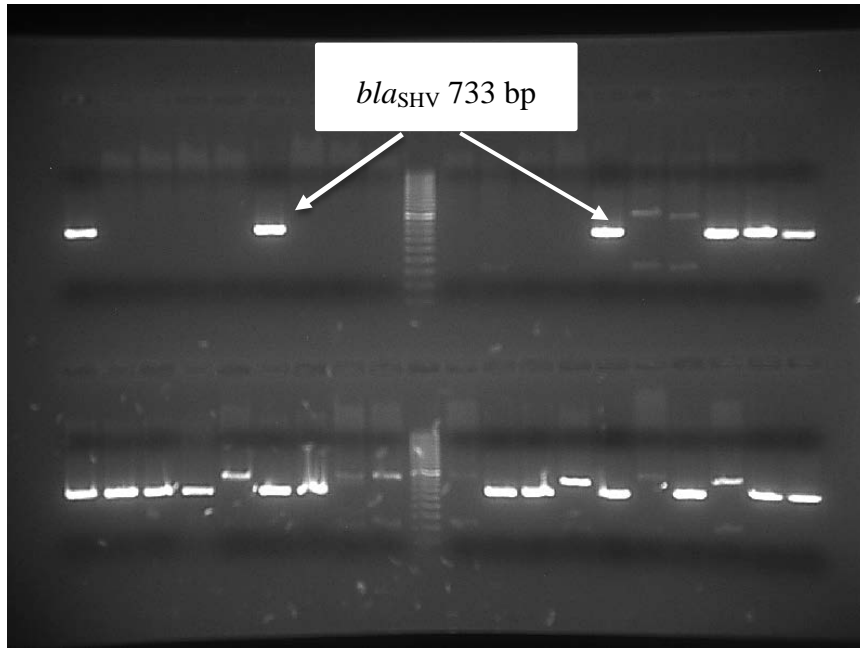


4 BULGULAR

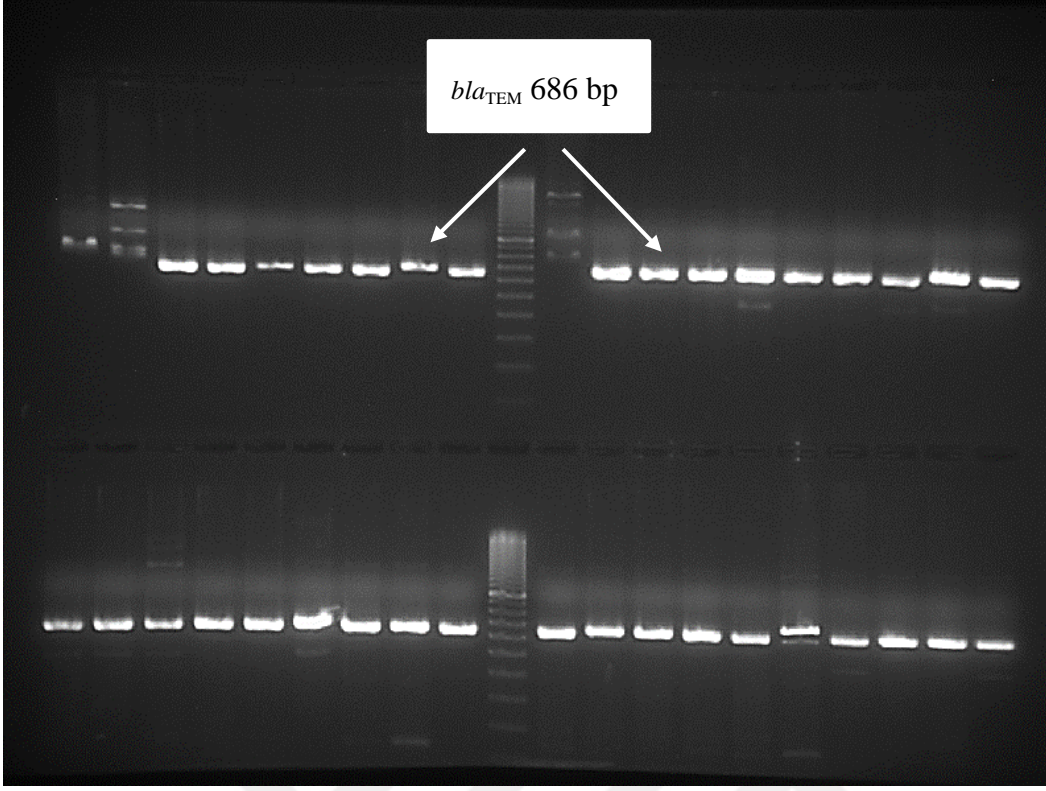
Üç araştırmada (Sarıcı 2015; Gökalp 2015 ve Özadam 2016) tavuk eti, çiğ inek sütü ve taze peynirlerden mikrobiyolojik yöntemle elde edilen ve CLSI (2013) talimatları takip edilerek GSBL varlığı bakımından incelenen kesin GSBL-pozitif toplam 55 adet Enterobacteriaceae suşlarında bu tür enzimleri kodlayan *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* ve *bla_{CTX-M}* ile *bla_{CTX-M}* altgrup genlerinin karakterizasyonu yapılmıştır.

4.1 *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* ve *bla_{CTX-M}* genlerin bulguları

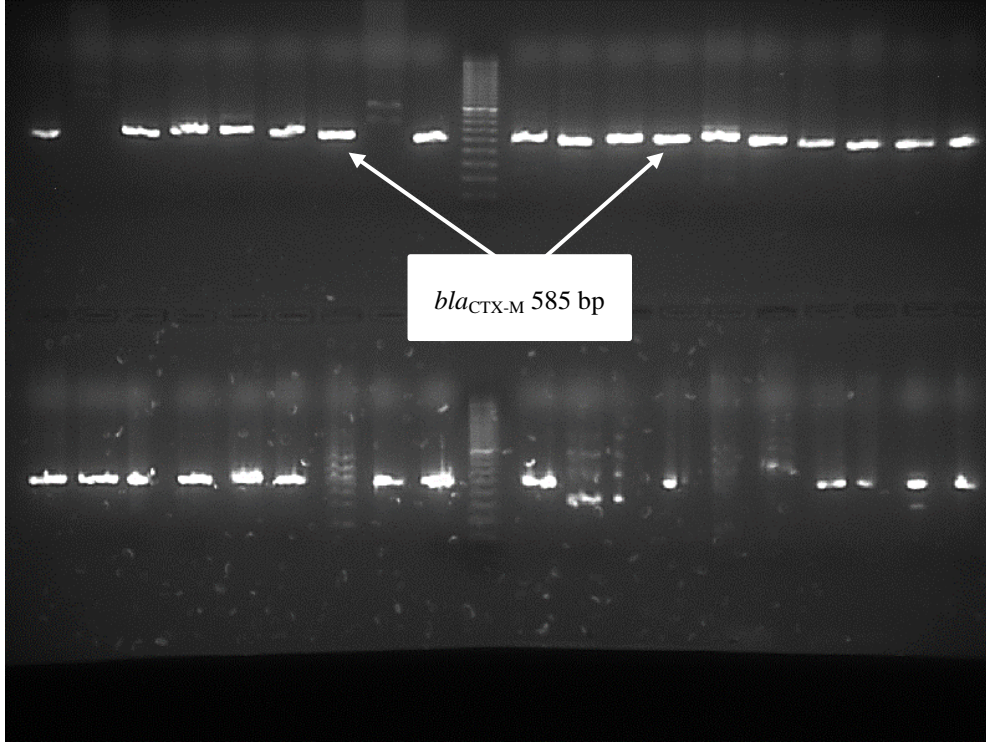
GSBL pozitif suşlardan elde edilen DNA materyallerinde yapılan PCR uygulaması ve jel elektroforezi sonuçlarına göre en baskın *bla* geni %96,4 (n=53) *bla_{TEM}*-tipi olarak tespit edilmiştir. Bu oranı %65,5 (n=36) ile *bla_{CTX-M}*-tipi ve %34,5 ile (n=19) *bla_{SHV}*-tipi takip etmiştir. GSBL pozitif suşlardan elde edilen DNA materyallerinde *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* ve *bla_{CTX-M}* gen bölgeleri jel elektroforez görüntüleri Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te sunulmuştur.



Şekil 4.1: *bla_{SHV}* gen bölgesi jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.2: *bla*_{TEM} gen bölgesi jel elektroforez görüntüsü

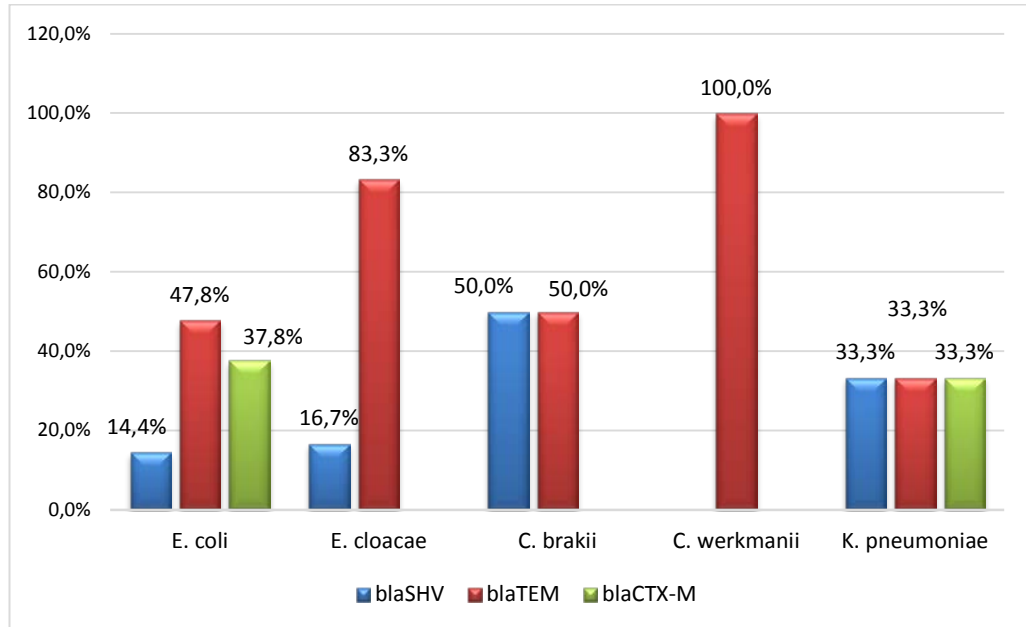


Şekil 4.3: *bla*_{CTX-M} gen bölgesi jel elektroforez görüntüsü

bla genlerin enterobakteri tipi bazında dağılımı *E. coli* suşlarında %47,8 *bla*_{TEM}, %37,8 *bla*_{CTX-M} ve %14,4 *bla*_{SHV}; *E. cloacae* suşlarında %83,3 *bla*_{TEM} ve %16,7 *bla*_{SHV}; *Citrobacter* suşlarında %57,1 *bla*_{TEM} ve %42,9 *bla*_{SHV} ve *K. pneumoniae* suşlarında %33,3 *bla*_{TEM}, %33,3 *bla*_{CTX-M} ve %33,3 *bla*_{SHV} olarak tespit edilmiştir. Bulgular Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1:Bakteri tiplerine göre *bla* genlerin dağılımı

Gıda cinsi	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}
<i>E. coli</i>	13	43	34
<i>E. cloacae</i>	1	5	-
<i>C. brakii</i>	3	3	-
<i>C. werkamanii</i>	-	1	-
<i>K. pneumoniae</i>	2	2	2
Toplam	19	54	36

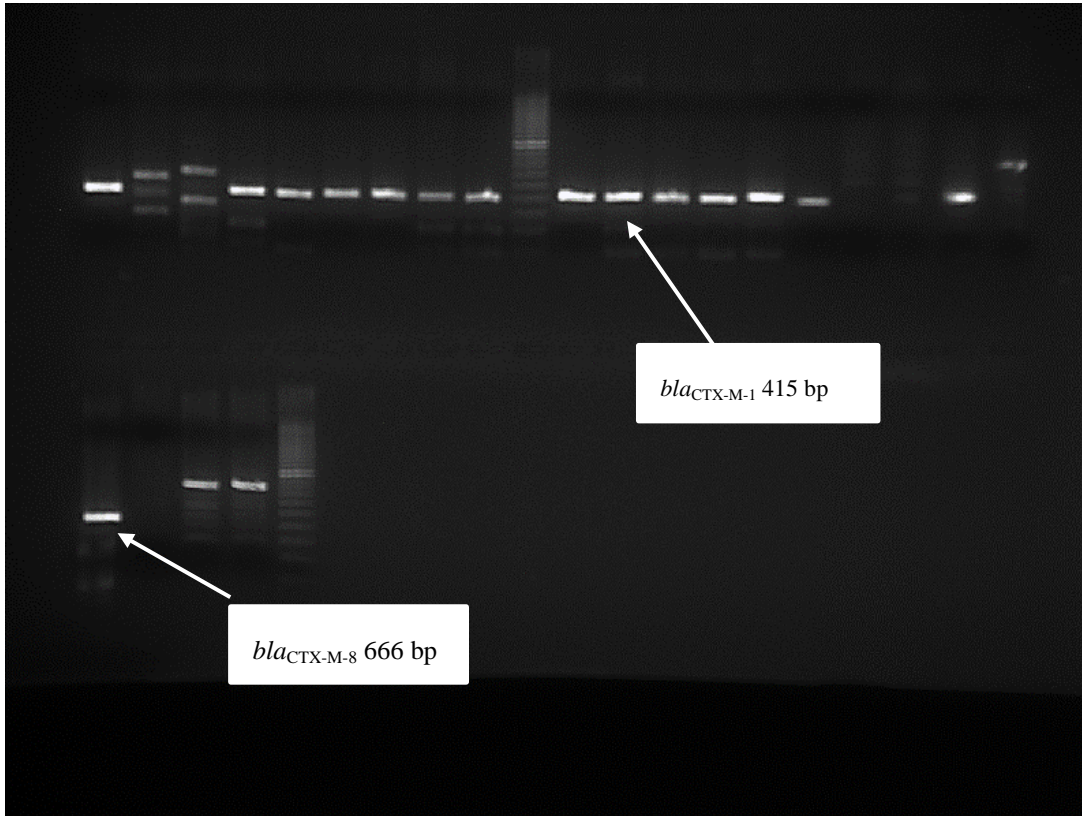


Şekil 4.4: *bla* genlerin enterobakteri tipine göre dağılımı (%)

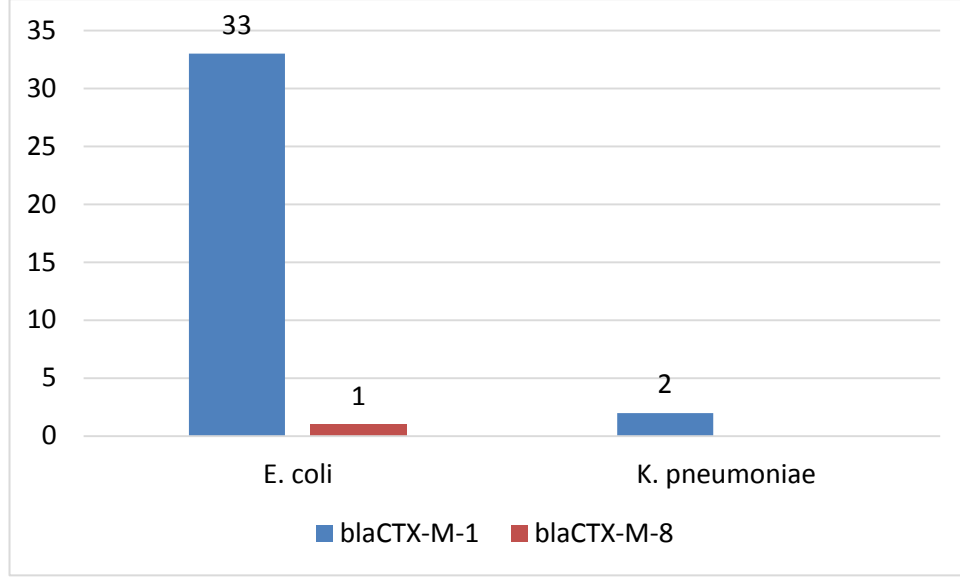
4.2 *bla*_{CTX-M} altgrup bulguları

Toplam 36 adet *bla*_{CTX-M} pozitif ampliconlar arasında; en baskın altgrup %97,2 *bla*_{CTX-M-1} (n=35) olarak bulunurken; yalnızca %2,8 *bla*_{CTX-M-8} (n=1) altgrubu karakterize edilmiştir.

Enterobakteri tipi bazında *bla*_{CTX-M-1} altgrubu 33 adet *E. coli* ve 2 adet *K. pneumoniae* şuşlarında görülürken, 1 adet *E. coli* şuşunda *bla*_{CTX-M-8} altgrubu karakterize edilmiştir.



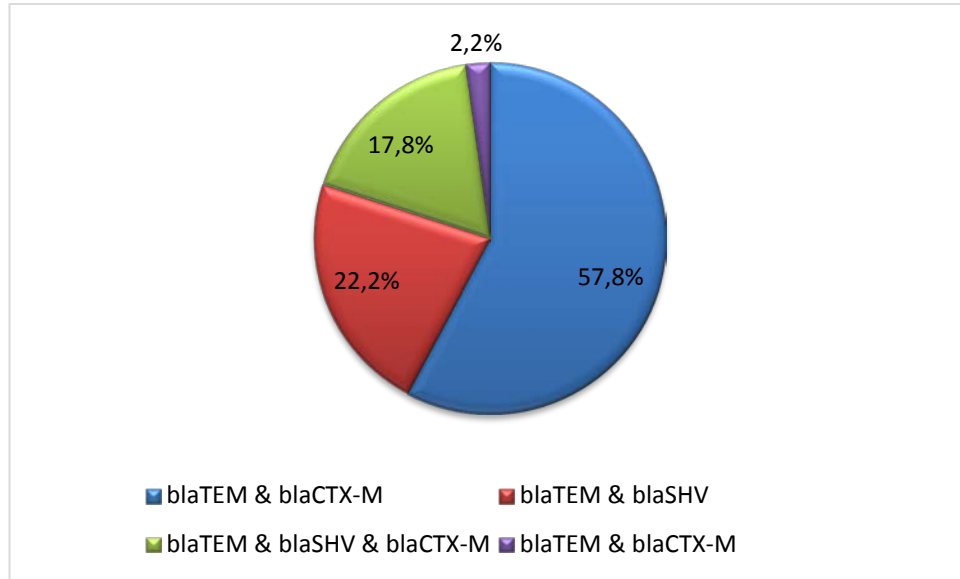
Şekil 4.5: *bla*_{CTX-M-1} ve *bla*_{CTX-M-8} jel elektroforez görüntüsü



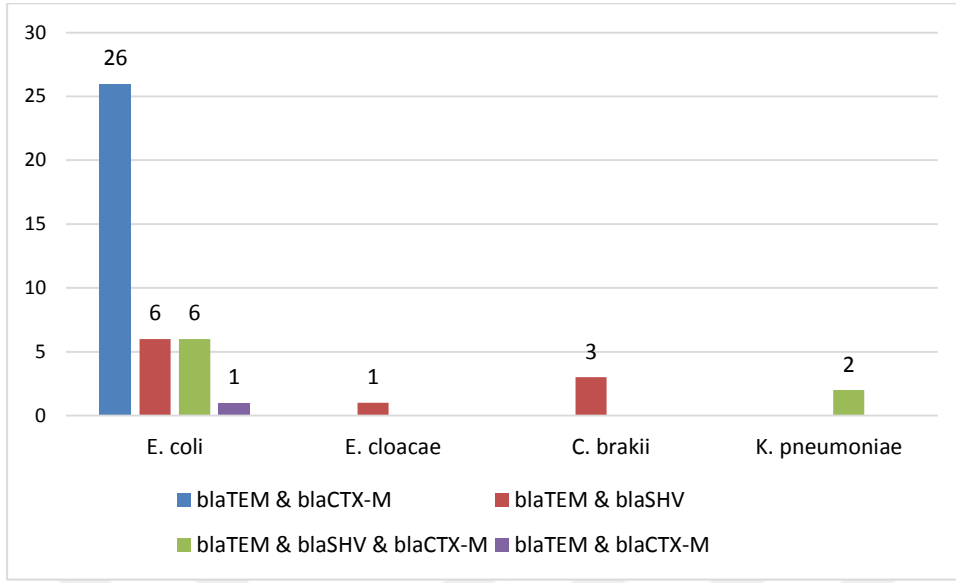
Şekil 4.6: bla_{CTX-M} altgrupların enterobakteri tipine göre dağılımı (n)

4.3 bla_{SHV} , bla_{TEM} ve bla_{CTX-M} genlerin kombinasyonları bulguları

GSBL pozitif enterobakteri İzolatlarının %83,6'sinde (n=46) bla -genlerin bir arada kombinasyonlar şeklinde buldukları tespit edilmiştir. bla genlerin yaptıkları kombinasyon dağılımı %56,5 (n=26) bla_{TEM} ve bla_{CTX-M} , %23,9 (n=11) bla_{SHV} ve bla_{TEM} , %19,6 (n=9) bla_{SHV} , bla_{TEM} ve bla_{CTX-M} olarak belirlenmiştir. Bla genlerin çoklu bulunma durumu ve enterobakteri tipine göre dağılımı Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de sunulmuştur.



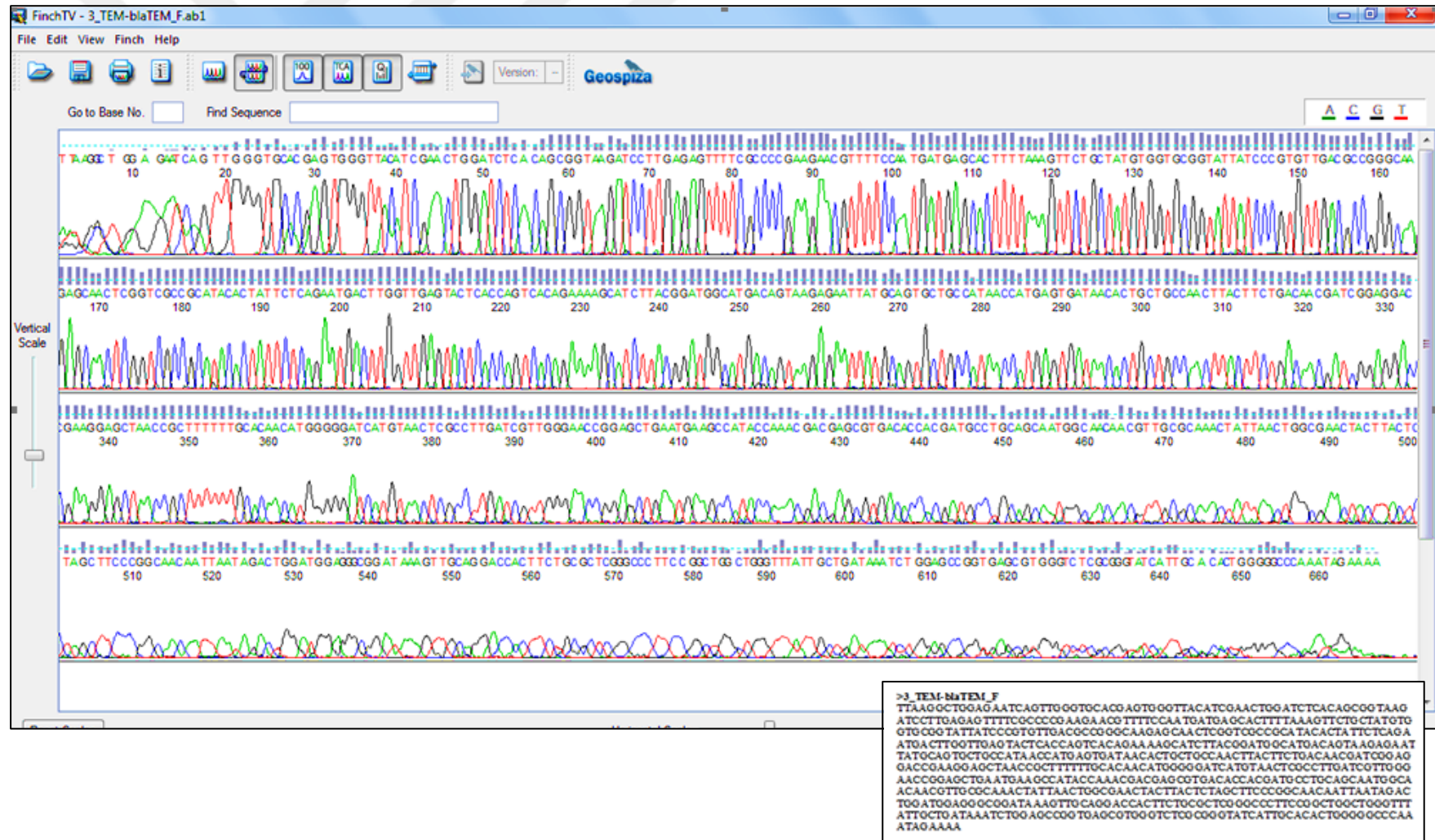
Şekil 4.7: bla_{SHV} , bla_{TEM} ve bla_{CTX-M} genlerin kombinasyonları dağılımı (%)



Şekil 4.8: *bla* genlerin enterobakteri tipine göre çoklu bulunma durumu (n)

4.4 DNA sekanslama ve BLAST analizi bulguları

Madde 3.2.3’de PCR uygulanan ve Madde 3.2.5’de *bla*-gen bant görüntüleri alınan 1 adet *bla*_{TEM} pozitif *E. coli*, 1 adet *bla*_{SHV} *K. pneumoniae* ve 1 adet *bla*_{CTX-M} *E. coli* amplikonların sırasıyla saflaştırma ve sekanslama (dizileme) işlemi yapılmıştır. Sekanslama bulguları BLAST Programı kullanılarak tamamlanmıştır. Sekanslanan izolatlar GSBL üreten türdeşlerine $\geq 99\%$ oranında benzerlik göstermiştir. Kromatogram baz dizilimleri ve benzeşme bulguları Şekil 4.9, Şekil 4.10, Şekil 4.11, Şekil 4.12, Şekil 4.13 ve Şekil 4.14’de sunulmuştur.



Şekil 4.9: bla_{TEM} sekanslama kromatogram baz dizilimi

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Inert	Accession
Escherichia coli plasmid pR15_43 strain 935, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	H326347.1
Escherichia coli plasmid pR14_88 strain 904, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	H326357.6
Escherichia coli O25b:H4-ST131 str. EC6161 plasmid pEC3958, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	H326473.8
Klebsiella pneumoniae Kp15 plasmid pEM6, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	H326180.1
<input type="checkbox"/> Escherichia sp. G5 UTI beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1059	1059	100%	0.0	99%	KJ544246.1
<input type="checkbox"/> Escherichia sp. G4 UTI beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1059	1059	100%	0.0	99%	KJ544246.1
Bacterium 571 UTI beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ544244.1
Bacterium 896 UTI beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ544242.1
Escherichia sp. F40 UTI beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ544241.1
Bacterium 520 CLW beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ544240.1
Bacterium 672 CLW beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ544239.1
Bacterium 645 CLW beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ544238.1
Escherichia sp. B57 CLW beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ544237.1
Escherichia sp. 412 CLW beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ544236.1
Klebsiella sp. 59 CLW beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ544235.1
Enterobacter cloacae bioTEM 217 gene for class A beta-lactamase, strain ST132, isolate NM2208/10, allele bioTEM 217	1144	1144	95%	0.0	95%	H326175.3
Klebsiella sp. 50/55/12/10 beta-lactamase (TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ127426.1
Klebsiella pneumoniae p-armid pR1083, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	KF76462.2
Escherichia coli strain 87640, complete genome	1144	1144	95%	0.0	95%	CP007381.1
Klebsiella pneumoniae strain K145 beta-lactamase (TEM)-1 gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KF100433.1
Escherichia coli strain 794850484EPPCK beta-lactamase (bla TEM) gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KF100263.1
Enterobacter sexogenus strain Ca 14 beta-lactamase (TEM)-1 gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KF113206.1
Pseudomonas sp. strain Em 15 beta-lactamase (TEM)-1 gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KF113201.1
Escherichia coli strain EC1783 plasmid pEC1980, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	KF114081.1
Klebsiella pneumoniae ATCC 3944-2145 plasmid p19, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	CP038366.1
Escherichia coli strain NM649811 plasmid pMG340, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	H326365.6
Klebsiella pneumoniae strain ST15 plasmid pKP1022, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	KF119272.1
Klebsiella pneumoniae strain ST48 plasmid pKP0905, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	KF119271.1
Klebsiella pneumoniae strain KP877 plasmid pKP877, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	KF351453.1
Escherichia coli 428070 plasmid p428070, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ285243.1
Escherichia coli B14V, sequence for TEM beta-lactamase, isolate M6527	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ279739.9
Escherichia coli strain 3498-3 beta-lactamase (TEM)-1 gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ265143.1
Escherichia coli strain 3036 beta-lactamase (TEM)-1 gene, partial cds	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ186143.1
Escherichia coli plasmid p026 CR1_125, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	KC140360.1
Escherichia coli plasmid p011-CR1_-15, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	KC140359.1
Klebsiella pneumoniae strain ST2 clonal group RH2 genomic sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	H2410236.1
Klebsiella pneumoniae strain U20 clonal group SCR genomic sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	H241022.1
Klebsiella pneumoniae strain 395, complete sequence	1144	1144	95%	0.0	95%	KJ131173.1

Şekil 4.10: *bla*_{TEM} BLAST analizi benzeşme sonuçları



Şekil 4.11: *bla_{SHV}* sekanslama kromatogram baz dizilimi

Description	Max score	Total score	Percent identity	Query	Hit
Klebsiella pneumoniae strain UAE04KP SHV-1 beta-lactamase (blaSHV-1) gene, partial cds	1086	1086	99%	0.0	99% GQ407121.1
Klebsiella pneumoniae strain HB 71 beta-lactamase blaSHV-1 (blaSHV) gene, complete cds	1086	1086	99%	0.0	99% GQ407119.1

Şekil 4.12: *bla_{SHV}* BLAST analizi benzeşme sonuçları



Şekil 4.13: *bla*_{CTX-M} sekanslama kromatogram baz dizilimi

The image shows a screenshot of a BLAST search results page for the *bla*_{CTX-M} gene. The browser address bar shows "blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi". The page displays a list of alignments with columns for Description, Max score, and Total score. The top results are from uncultured bacterium clones and various *Escherichia coli* strains. A small dialog box is visible in the top right corner.

Description	Max score	Total score
Uncultured bacterium clone TRE-1.73 extended spectrum beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M) gene, complete cds	931	931
Uncultured bacterium clone TRE-1.48 extended spectrum beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M) gene, complete cds	931	931
Uncultured bacterium clone SBI-3.68 extended spectrum beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M) gene, complete cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain 63743 plasmid pEQ2, complete sequence	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain T23 plasmid pEQ1, complete sequence	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain B3804 plasmid pFH13804, complete sequence	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain Uqd59 extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-138 (blaCTX-M-138) gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> plasmid pCTX2412 extended spectrum beta-lactamase gene (blaCTX-M-1) region, isolate 2412	931	931
<i>Escherichia coli</i> plasmid pCTX1261 extended spectrum beta-lactamase gene (blaCTX-M-1) region, isolate 1261	931	931
<i>Escherichia coli</i> plasmid pCTX4145 extended spectrum beta-lactamase gene (blaCTX-M-1) region, isolate 4145	931	931
<i>Escherichia coli</i> plasmid pCTX1956 extended spectrum beta-lactamase gene (blaCTX-M-1) region, isolate 1956	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain HH445 plasmid pHH445, complete sequence	931	931
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain AKH11C21 beta-lactamase CTX-M-1 (CTX-M-1) gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain AKH1142 beta-lactamase CTX-M-1 (CTX-M-1) gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain E15 insertion sequence ISEcp1 TnpA (tnpA) gene, partial cds; beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M-1) gene, complete cds; and hypothetical protein gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain E14 insertion sequence ISEcp1, partial sequence; beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M-1) gene, complete cds; and hypothetical protein gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain E13 insertion sequence ISEcp1, partial sequence; beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M-1) gene, complete cds; and hypothetical protein gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain 10/139 beta-lactamase CTX-M-1 (CTX-M-1) gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain 10/136a beta-lactamase CTX-M-1 (CTX-M-1) gene, partial cds	931	931
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain 09/139 beta-lactamase CTX-M-1 (CTX-M-1) gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> plasmid pCTX246 extended spectrum beta-lactamase gene (blaCTX-M-1) region, isolated from swine suffering from mastitis-metritis-agalactia syndrome, isolate 246	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain L4 plasmid beta-lactamase CTX-M-1 (blaCTX-M-1) gene, complete cds	931	931
<i>Klebsiella pneumoniae</i> strain K205 extended-spectrum beta-lactamase (blaCTX-M-1) gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain ST131 plasmid pKC394, complete sequence	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain 406/06 plasmid pKC406 insertion sequence IS1A, partial sequence; insertion sequence IS26 TnpA (tnpA) gene, complete cds; Mph(A) (mph(A)) gene, complete cds; Mxx-like and hypothetical protein-like genes, partial sequence; beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M-1) gene, complete cds; and insertion sequence ISEcp1, complete sequence	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain 399/06 plasmid pKC398 insertion sequence IS1A, partial sequence; insertion sequence IS26 TnpA (tnpA) gene, complete cds; Mph(A) (mph(A)) gene, complete cds; Mxx (mxx) and hypothetical protein genes, partial sequence; ES-beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M-1) gene, complete cds; and insertion sequence ISEcp1, complete sequence	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain 394/06 plasmid pKC394 insertion sequence IS1A, partial sequence; insertion sequence IS26 TnpA (tnpA) gene, complete cds; Mph(A) (mph(A)) gene, complete cds; Mxx-like and hypothetical protein-like genes, partial sequence; beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M-1) gene, complete cds; and insertion sequence ISEcp1, complete sequence	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain 409/06 plasmid pKC409 insertion sequence IS1A, partial sequence; insertion sequence IS26 TnpA (tnpA) gene, complete cds; Mph(A) (mph(A)) gene, complete cds; Mxx-like and hypothetical protein-like genes, partial sequence; beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M-1) gene, complete cds; and insertion sequence ISEcp1, complete sequence	931	931
<i>Klebsiella pneumoniae</i> plasmid porf10 invA (invA) gene, complete cds; orf10 gene, complete sequence; insertion sequence IS26 TnpA (tnpA) gene, complete cds; insertion sequence ISEcp1, complete sequence; and extended-spectrum class A beta-lactamase CTX-M (blaCTX-M-1) gene, complete cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> plasmid p1204/1463 insertion sequence IS26 TnpA (tnpA) gene, complete cds; insertion sequence ISEcp1, complete sequence; and extended-spectrum class A beta-lactamase CTX-M-1 (blaCTX-M-1) gene, complete cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain Z1157 class I integron, complete sequence	931	931
<i>Escherichia coli</i> strain SB3/1 beta-lactamase CTX-M1 gene, partial cds	931	931
<i>Salmonella typhimurium</i> beta-lactamase CTX-M-61 (blaCTX-M-61) gene, complete cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> plasmid beta-lactamase bla-CTX-M-1 gene, complete cds	931	931
<i>Klebsiella pneumoniae</i> isolate K2 extended-spectrum beta-lactamase (blaCTX-M-1) gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> isolate E1 extended-spectrum beta-lactamase (blaCTX-M-1) gene, partial cds	931	931
<i>Escherichia coli</i> plasmid pHSG-1 blaCTX-M-36 gene for beta-lactamase CTX-M-36, complete cds	931	931
<i>Proteus mirabilis</i> tnpA gene (partial), tnpA gene (partial) and blaCTX-M-1 gene	931	931
<i>E. coli</i> bla(CTX-M-1) gene	931	931
<i>Escherichia coli</i> tnpA gene, blaCTX-M-1 gene and ISEcp1 (partial) and insertion sequence ISEcp1	931	931

Şekil 4.14: *bla*_{CTX-M} BLAST analizi benzeşme sonuçları

4.5 İstatistik bulgular

GSBL-kodlayan bla_{TEM} , bla_{SHV} ve bla_{CTX-M} genlerin incelenen enterobakteri suşlarının elde edildikleri gıda örnekleri bazında bulunma oranlarının niteliksel kıyaslaması Kruskal-Wallis H-testi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar $P<0,05$ seviyesinde anlamlı kabul edilmiştir.

Kruskal-Wallis test istatistik değeri H, $P<0,05$ düzeyi için χ^2 anlamlılık tablosu sınır değeri olan 5,991 ile karşılaştırılmıştır. İstatistik analiz için SPSS 19 (SPSS Inc., ABD) paket programı kullanılmıştır. H değeri 5,935, $\chi^2=12,5291$ ve $P=0,001903$ ($P<0,01$) (CI 95%) olarak bulunmuştur. $5,935<5,991$ olduğundan 0,05 düzeyinde anlamlı kabul edilmemiştir.

Sonuç olarak, GSBL-kodlayan bla -genler için hayvansal kaynaklı gıdaların gıdanın türüne bağlı olmaksızın potansiyel kaynaklar oldukları görülmüştür.



5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Kontrolsüz, bilinçsiz ve aşırı antibiyotik kullanımı barsak mikroflorası üzerinde selektif baskı yaratarak türlerde direnç gelişiminde önemli roller oynamaktadır (Yıbar ve Soyutemiz 2013). Dirençli bakteriler ve dirençten sorumlu genetik materyallerin insanlara bulaşma kaynakları arasında hastaneler, bakım merkezleri, ev gibi ortak yaşam alanları, su kaynakları, uluslararası ticareti, insan göçü ve aşırı antibiyotik kullanımı gelmektedir (Reuland ve ark. 2014).

Hayvancılık sektöründe antibiyotik kullanımının miktarı beşeri alanda antibiyotik kullanımının en az iki katı daha yüksek olduğu bildirilmektedir. Bu durumda gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlar ve bu hayvanlardan elde edilen gıda maddeleri dirençli bakteriler ve dirençten sorumlu DNA materyallerin yayılmasında önemli roller oynamaktadır (Arslan ve Özdemir 2008). Bu gerekten yola çıkarak Uluslararası ve ulusal otoriteler büyüme amaçlı antibiyotik kullanımına ciddi kısıtlamalar getirmiştir. Ancak, bu gibi tedbirlere rağmen ABD’de üretilen antibiyotiklerin %40’ından fazlası hayvanlarda kullanılmaktadır (Levy 2002). Gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlar dışında meyve ve sebze yetiştiriciliğinde gübre amaçlı kullanılan dışkılar ve diğer antimikrobiyal ilaçlar yoluyla toprak ve su kaynakları dirençli bakteriler ve dirençten sorumlu genetik elemanlar ile kontamine olmaktadır (Levy ve Marshall, 2004).

Antibiyotiklere dirençli enterobakteriler önemli infeksiyon kaynaklarıdır (Lahlaouia ve ark. 2014). İnsan barsak mikroflorası bu türler için uygun kolonizasyon ortamı sağlamaktadır. Aynı zamanda direnç kodlayan genlerin türdeş ve/veya farklı bakteriler arasında aktarılabilir olmaları tedavileri güçleştirmektedir (Allen ve ark. 2010; Lupo ve ark. 2013). Antibiyotik kullanımında hatalardan geri dönmek mümkün olsa bile, doğa kuralları dirençli türlerin türdeş ve farklı bakteriler arasında yayılmaya devam edeceklerini göstermektedir (EFSA 2011).

Codex Alimentarius Komisyonu gıda kaynaklı GSBL-üreten enterobakteriler ve bu tip beta-laktamazları kodlayan *bla*-genlerin yayılma yollarının anlaşılması ve etkin şekilde mücadele etmek için bir Uluslararası koordinasyon birimi kurmuştur (Doyle

ve ark. 2013). Bu gelişmeyi takiben, Avrupa Doktorlar Komitesi (CPCM; <http://www.cpme.eu>), Avrupa Dış Hekimleri Konseyi (CED; <http://www.eudental.eu>) ve Avrupa Veteriner Hekimler Federasyonu (FVE; <http://www.fve.org>) 2014 yılında Brüksel’de GSBL-üreten Enterobacteriaceae türlerine karşı mücadele için bir ortak basın bildirisi yayımlamıştır (FVE 2014). Bu çiftliklerde çalışan ve antibiyotik kullanmamış kişilerde hayvansal kaynaklı dirençli izolatların genotipik benzerleri tespit edilmiştir. Sonuç olarak, bu bulgular otoriteleri harekete geçirmek ve ortak eylem planı çağrısı yapmak için yeterli olmuştur (Cogliani ve ark. 2011).

Hayvansal kaynaklı gıdalar kesim, işleme ve çevresel etmenler yüzünden dirençli bakteriler ile kontaminasyona maruz kalmaktadır (Kalter ve ark. 2010). Isıl işleme tutulmadan çiğ tüketilmeleri ve/veya direkt taze peynir üretiminde kullanılmaları insan sağlığı için risk oluşturmaktadır (Overdeest ve ark. 2011).

Bu çalışmada tavuk eti, çiğ inek sütü ve taze peynirlerden mikrobiyolojik ve CLSI (2013) yöntemleri uygulanarak elde edilen GSBL-pozitif toplam 55 adet Enterobacteriaceae suşlarında (Sarıcı 2015; Gökalp 2015 ve Özadam 2016) *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* ve *bla_{CTX-M}* ile *bla_{CTX-M}*. Moleküler sonuçlar hayvansal gıdalar kaynaklı GSBL-üreten Enterobacteriaceae suşlarının bu tip beta-laktamazları kodlayan *bla*-genleri ve *bla*-gen kombinasyonları için potansiyel rezervuar olduklarını ve halk sağlığı açısından öngörülemeyen potansiyel riskler oluşturduklarını göstermiştir.

5.1 Gıda kaynaklı GSBL-pozitif Enterobacteriaceae genel durumu

Ekonomik değeri olan ve gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda yoğun antibiyotik kullanımının bu sonucu üretmesi normal karşılanmalıdır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *E. coli* prevalansının yüksek olmasına yapılabilecek en iyi açıklamalardan birisi gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda büyümeye dönük antibiyotik kullanımının AB ülkelerinde 1999 yılı itibariyle yasaklanması olup, bu yasağın sonucu olarak terapötik amaçlı antibiyotik satışlarının dikkat çekici şekilde artış göstermesidir. Örneğin İngiltere’de terapötik amaçlı veteriner antibiyotik satışları 1999 yılında 383 ton iken, yasakla birlikte 2000 yılında 437 tona; Danimarka’da 1996 yılı satışları 48 ton iken, 2001 yılında 94 tona çıkmıştır (Casewell ve ark. 2003).

Türk hayvancılık sektöründe antibiyotik kullanımının kontrol edilememesi ve yeterli takip sistemi kurulmaması ise GSBL-üreten enterobakterler ile bu enzimleri kodlayan genlerin gıda zinciri aracılığıyla yayılış hızlarının öngörülememesine sebep olmaktadır (OECD 2015).

Büyüme teşvik edici antibiyotiklerin kullanımlarının yasaklanmasının esas nedeni dirençli bakteriler ve dirençten sorumlu genetik materyallerin insanlara bulaşmaları üzerine endişelerin artmasıdır (Castanon 2007). Araştırmalar bu endişeleri destekler nitelikte veriler sunmaktadır. Örneğin antibiyotik kullanımının diğer Avrupa ülkelerine göre nisbeten yüksek seviyelerde olduğu Hollanda kanatlı endüstrisi tarafından üretilen tavuk etlerinin %94'ünün GSBL-pozitif enterobakterler içerdikleri ve ileri moleküler incelemeler neticesinde insanlardan izole edilen GSBL-pozitif türdeşlerinin %35'inin tavuk eti kaynaklı oldukları rapor edilmiştir (HardyDiagnostics.Com).

Dünya'da hayvansal kaynaklı gıdalardan izole edilen başlıca GSBL-üreten bakteri türleri *E. coli*, *E. cloacae*, *Salmonella* spp. *K. pneumoniae*, *K. ozaenae*, *K. oxytoca*, *P. stuartii*, *M. morgani* ve *Citrobacter* türleridir (Stefani ve ark. 2014). Bu çalışmada tavuk eti, çiğ süt ve taze peynir örneklerinden izole edilen *E. coli* (n=44), *E. cloacae* (n=5), *Citrobacter* spp. (n=4) ve *K. pneumoniae* (n=2) suşları moleküler yöntemle direnç genleri karakterize edilmiştir. Bu çalışmada gereç olarak seçilen GSBL-pozitif enterobakteri türleri ile Uluslararası literatürde bildirilen türler familia ve tip bakımından birbirleriyle örtüşmüşlerdir (Kalter ve ark. 2010; Stefani ve ark. 2014).

Gıda kaynaklı direnç faktörlerinin yayılmasında en etkin olan enterobakteri türü *E. coli* suşlarıdır. GSBL-pozitif *E. coli* bulunma sıklığı 2000'li yıllardan sonra hızlı şekilde artış göstermiştir (Rao ve ark. 2014). Bu konudaki endişelerin esas sebebi GSBL-pozitif *E. coli* suşlarına bağlı infeksiyonlardan ölüm oranının dirençli olmayan *E. coli* kaynaklı infeksiyonlara göre üç kat yüksek oluşudur (Melzera ve Petersen 2007). Bu çalışmada, toplam 55 adet GSBL-pozitif Enterobacteriaceae tipleri arasında en yaygın tip %80 *E. coli*'dir. Uluslararası veriler ile karşılaştırıldığında %85 ile Portekiz'e (Amador ve ark. 2009), %94 ile Hollanda'ya (Stuart ve ark. 2012) ve %93,3 ile İspanya'ya (Aidara ve ark. 2013) yakın olduğu görülürken; %53,3 ile Almanya'dan (Schwaiger ve ark. 2012), %1,3 ile Danimarka'dan (Garcia Migura ve ark. 2014), %45 ile Belçika'dan (Smet ve ark.

2008), %12,4 ile Çin'den (Zheng ve ark. 2012), %24 ile Avsutorya'dan (Peternel ve ark. 2014), %10,5 ile Tayvan'dan (Su ve ark. 2014) ve %3,1 ile Hindistan'dan (Kar ve ark. 2015) ise daha yüksek çıkmıştır. Türkiye açısından bakıldığında bu çalışmada hayvansal gıda kaynaklı GSBL-pozitif *E. coli* bulunma sıklığı Pehlivanlar-Önen ve ark. (2015), Sarıcı (2015), Gökalp (2015), Öndeş (2015), Sökmen ve ark. (2015) ve Özdam (2016) bulguları ile örtüşmüştür. Sonuç olarak, bu çalışmada incelenen izolatlar arasında GSBL-üreten *E. coli*'nin en baskın fenotip olduğu görülmüştür. Bu nedenle dirençli enterobakteriler ile kontamine olmuş tavuk etleri ve yeterince sterilizasyon işlemi görmeden direkt şekilde tüketilen ya da taze peynir üretiminde kullanılan çiğ sütler gıda güvenliği ve halk sağlığı bakımından ciddi riskler getirmektedir (Kumar ve ark. 2010). Örneğin, Türkiye'de bir yılda üretilen süt miktarının en az %90'ı inek sütü olup, yaklaşık %50'sinin hiçbir sterilizasyon işlemi görmeden direkt şekilde tüketilmektedir (Akbaş ve Tiryaki, 2008). Bu nedenle, GSBL-pozitif enterobakteriler bulaşmış süt ve süt ürünleri insan sağlığını için potansiyel risk oluşturmaktadır.

Türkiye açısından bakıldığında hastane kaynaklı dirençli enterobakteriler hakkında bulgular mevcut iken, gıda kaynaklı epidemiyolojik veriler bulunmamaktadır. T. C. Sağlık Bakanlığı Ulusal Hastane Enfeksiyonları Surveyan Programı verilerine göre (www.uhes.saglik.gov.tr) GSBL-pozitif *E. coli* frekansı 2008 yılında %33,2 iken 2013 yılında %48,8'e yükselmiştir. Sonuç olarak, hastane ve gıda kaynaklı dirençli türlerin ayırt edilebilmeleri için moleküler epidemiyolojik analizler yapılması gerekmektedir.

5.2 *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} ve *bla*_{CTX-M} gen tiplerinin genel durumu

Antibiyotiklere direnç gelişiminin son 70 yıl içinde gerçekleştiği düşünülmektedir. Ancak, Bering Boğazında 30.000 yıldır donmuş halde duran toprak tabakalarından izole edilen bakterilerde yapılan genomik analizler antibiyotiklere karşı direnç kodlayan farklı genlerin ataları hakkında şaşırtıcı bilgiler vermiştir (D'Costa ve ark. 2011).

GSBL'lerin %33'ü fenotipik yöntemlerle tespit edilememektedir (Naas ve ark. 2007). Bu durumun başlıca nedeni dirençli yeni türlerin ortaya çıkışı ve farklı direnç mekanizmalarının gelişmesidir. Örneğin, TEM ve SHV tipi beta-laktamazlar

seftazidime (CAZ) ve kısmen sefotaksime (CTX) direnç gösterirlerken, CTX-M tipi beta-laktamazlar sefpodoksime (CPD) ve kısmen seftazidime (CAZ) direnç sergilemektedirler. CTX-M tipi beta-laktamazlar CAZ ile tarandıkları zaman tespit edilemeyebilmektedirler (Srisangkaew ve Vorachit 2004). Bu gibi durumlarda genotipik testlerin yapılması tavsiye edilmektedir (Taneja ve Sharma 2008).

Türkiye için gıda kaynaklı GSBL'ler konusu 2015 yılına gelene kadar disk-yaklaşımli genel tarama testleri ve antibiyotik kalıntıları ile sınırlı kalmıştır. *bla*-genlerin moleküler epidemiyolojisi üzerine incelemeler yapılmamıştır. Gıda kaynaklı araştırmaların aksine, hastane ve toplumsal kaynaklı çalışmalara daha fazla ağırlık verilmiştir (Gundogan ve Yakar 2007; Gundogan ve ark. 2011; Gundogan ve Avcı 2013).

Hastaneler, toplumsal ve gıda kaynaklı CTX-M-tipi beta-laktamazın görülme sıklığı 2000'li yıllardan itibaren tüm Dünya'da yükselişe geçmiştir (Naas ve ark. 2007; Liebana ve ark. 2013). Benzer şekilde Türkiye'de hastane kaynaklı en sık rapor edilen *bla*-geni CTX-M-tipi olup, bunu TEM-tipi ve SHV-tipleri izlemektedir (Nazik ve ark. 2011; Sharma ve ark. 2013). Bir başka araştırma hastane kaynaklı SHV-tipi beta-laktamazın TEM-tipi beta-laktamazdan daha yüksek sıklıkta görüldüğünü rapor etmiştir (Zaniani ve ark. 2012).

Hastane kaynaklı enterobakterilerde TEM, SHV ve CTX-M-tipi *bla*-genlerin her üçü eş zamanlı olarak taşınmaktadır. Bu kombinasyonları taşıyan enterobakteriler antibiyotiklere karşı yüksek direnç davranışları göstermekte ve sağlık açısından önemli tehdit oluşturmaktadırlar (Novais ve ark. 2010; Zheng ve ark. 2012).

Bu çalışmada, karakterize edilen *bla*-genlerin tipleri ve kombinasyonları Ulusal hastane ve toplumsal kaynaklı ve Uluslararası hastane, toplumsal ve gıda kaynaklı bulgular ile örtüşmektedir. Bu çalışmada Türkiye'de *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{SHV} direnç genlerinin yalnız hastane ve toplumsal kaynaklı değil, aynı zamanda gıdalar aracılığıyla yayıldıkları, çoklu direnç özellikleri taşıdıkları ve hastane kaynaklı *bla*-genlerin bulunma sıklıkları ile karşılaştırıldıklarında benzerlikler taşıdıkları anlaşılmıştır. Bulgularımız neticesinde; gıda amaçlı hayvan yetiştiriciliğinin antibiyotik kullanımı bakımından ciddi şekilde kontrolü sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada toplam 55 adet GSBL-pozitif enterobakteri suşların %96,4'ünde *bla*_{TEM} , %65,5'inde *bla*_{CTX-M} ve %34,5'inde *bla*_{SHV} tipi genleri taşıdıkları tespit

edilmiştir. İzolatların %81,8'inin birden fazla *bla*-geni taşıdıkları görülmüştür. *bla*-genlerin kombinasyonları %57,8 *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}, %22,2 *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV}, %17,8 *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV}+*bla*_{CTX-M} ve %2,2 *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M} olarak belirlenmiştir. Sekanslama ve BLAST analizi üç adet GSBL-pozitif amplikonların taşıdıkları *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genleri doğrulamıştır.

Dünya'da tavuk etleri, çiğ sütler ve taze peynirlerden izole edilen enterobakteri türlerinde *bla*-genlerin karakterize edildikleri çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu çalışmada tespit edilen *bla*-genlere ait karakteristik bulgular Doğu Avrupa ve Yakın Doğu Ülkelerinde CTX-M ile (Bonnet 2004), Portekiz'de TEM (Amador ve ark. 2009), Tunus'ta TEM ve CTX-M (Chouchani ve ark. 2011), İspanya'da CTX-M (Geser ve ark. 2012), Almanya'da TEM, SHV ve CTX-M (Reich ve ark. 2013), Kuzey Avrupa Ülkelerinde CTX-M (Aidara ve ark. 2013), Japonya'da SHV ve CTX-M (Hiroi ve ark. 2012, Kawamura ve ark. 2014), Brezilya, Şili ve Arjantin'de CTX-M ve SHV (Bonelli ve ark. 2014; Ferreira ve ark. 2014), Avusturya'da SHV ve CTX-M (Zarfel ve ark. 2014), Tayvan'da TEM, CTX-M ve SHV (Su ve ark. 2014), İngiltere ve Galler'de CTX-M (Randall ve ark. 2014), İran'da CTX-M (Khoshbakht ve ark. 2014), Çin'de CTX-M (Rao ve ark. 2014), Endonezya'da TEM ve CTX-M (Sudarwanto ve ark. 2015), Mısır'da TEM, CTX-M ve SHV (Ahmed ve Shimamoto 2015) ve Hindistan'da TEM, CTX-M ve SHV (Kar ve ark. 2015) dağılımları ile benzerlik göstermiştir. Türkiye'de çiğ inek sütleri ve taze peynirlerde *bla*-genlerin varlıklarını ortaya koyan moleküler çalışmalar olmadığı için karşılaştırma yapılmamıştır. Ancak, Pehlivanlar-Önen ve ark. (2015)'in tavuk etlerinden izole ettikleri enterobakteri en baskın *bla*-geni *bla*_{CTX-M}, takiben *bla*_{TEM} ve *bla*_{SHV} olarak belirlenmiştir. Aynı çalışma, *bla*-gen kombinasyonları *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}+*bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}+*bla*_{TEM} ve *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV}. Bizim ve Pehlivanlar-Önen ve ark. (2015)'nin yaptıkları moleküler araştırma neticesinde en ortak yön CTX-M tipi ve TEM-tipi beta-laktamazları kodlayan genlerin baskın karakterler olmaları ve kombinasyonlar şeklinde bulunmalarıdır. Bu araştırma ve Pehlivanlar-Önen ve ark. (2015)'in çalışmasında *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M} en yaygın *bla*-gen kombinasyonu olarak bulunmuştur.

GSBL'ler kazanılmış ve sıklıkla plazmidler üzerinde yerleşik özgün *bla*-genler tarafından kodlanırlar. Dirençten sorumlu bu mobil genetik materyaller üzerine yapılan moleküler incelemeler genetik geçmişleri hakkında müşterek bağlantılar

bulduğunu göstermektedir. *bla* genlerin, farklı ve/veya türdeş enterobakter türleri arasında rastgele dağılmadıkları, gelişleri, gen ekspresyonları, muhafaza edilişleri, filogenetik geçmişleri ve virulans özellikleri arasında karmaşık etkileşimler olduğu anlaşılmıştır (Branger ve ark. 2005).

Bu çalışmada elde edilen genotipik Bulgular bazı hayvansal gıda kaynaklı GSBL-üreten enterobakterilerin SHV ve TEM-tipi *bla*-genler ile bu gen kümelerinin arasından sıyrılıp başkalaşarak farklı doğal direnç profili sergileyen CTX-M-tipi *bla*-genleri içerdiklerini, karakteristikleri, bulunma sıklıkları ve kombinasyonlarına bakıldığında Uluslararası Bulgular ile örtüşüklerini ve gıda kaynaklı antibiyotik dreinçliliğinin yayılmasında küresel bir sorunun önemli bir parçası olduğunu net şekilde ortaya koymuştur.

5.3 *bla*_{CTX-M} tipi altgrup genlerinin durumu

CTX-M-tipi beta-laktamazlar, aminoasit dizi benzerlikleri esas alınarak CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 olmak üzere 5 altgrupta toplanırlar (Tzouveleki ve ark. 2000).

CTX-M-1 altında toplanan “CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22 ve CTX-M-23” altgrupları arasında CTX-M-15 allelinin daha yaygın olduğu bilinmektedir (Hawkey 2015).

CTX-M-tipi genlerin orijini çevresel kaynaklı ve insanlara az ya da hiç patojen etki göstermeyen *Kluyvera* türleridir. Örneğin, CTX-M-1 ve CTX-M-2 tiplerinin menşei *Kluyvera ascorbata* iken, CTX-M-8 ve CTX-M-9 tiplerinin menşei *Kluyvera georgiana* olarak belirlenmiştir. Ancak, CTX-M-25 tiplerinin orijini olan *Kluyvera* suşu henüz tanımlanmamıştır (Rossolini ve ark. 2008).

CTX-M-8 altgruplarının orijin olarak *K. georgiana* kromozomal *bla*-genleri olan *kluG*, *kluY* ve *bla*_{CTX-M-78}'den çıktığı düşünülmektedir (Cantón ve ark. 2012). CTX-M-Grup-8 tipi beta-laktamazlar ilk kez 2000’li yıllarda CTX’e dirençli enterobakterilerde tanımlanmıştır (Bonnet ve ark. 2000).

CTX-M tipi genlerde karakterize edilmiş IS (İnsersiyon Elemanları) ISEcp1, ISCR1, IS10 and IS26’dır. Bunlardan ISEcp1 ilk olarak CTX-M-1 tiplerinden CTX-M-15 alt grubunda tanımlanmıştır. Bu insersiyon elemanı 42-266 bp aralığında yerleşik olup, insersiyon elemanın bulunduğu plazmid 80.000-85.000 bp büyüklüğündedir.

CTX-M-2 ve CTX-M-9 altgruplarında ISCR1 insersiyon elemanı ve CTX-M-8 tiplerinden ise IS10 tespit edilmiştir (Rao ve ark. 2014).

Uluslararası araştırmalar en yaygın görölen CTX-M pozitif Enterobacteriaceae türünü *E. coli* ve alt grupları CTX-M-1, CTX-M-2 ve CTX-M-9 olarak rapor etmiştir. Bu bulguları destekleyecek şekilde İspanya, Portekiz, İngiltere, Kuzey Avrupa ölkelerinde “CTX-M-9”, Kanada ve ABD’de “CTX-M-1 ve CTX-M-9”, Çin’de “CTX-M-1 ve CTX-M-9”, Japonya’da “CTX-M-2 ve CTX-M-9”, Hindistan’da “CTX-M-1”, Güney Amerika ölkelerinde “CTX-M-2 ve CTX-M-8 ” ve Avustralya’da “CTX-M-1” görölmektedir (Rao ve ark. 2014).

Gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlardan elde edilen fekal örneklere CTX-M pozitif enterobakterilerin varlıkları ilk olarak 2005 ve 2006 yıllarında İngiltere’de yürütölen iki ayrı çalışma ile ispatlanmıştır. Gıda üretiminde kesim ve diğer işleme aşamalarında gerçekte fekal çapraz bulaşma GSBL-pozitif *E. coli* suşları yoluyla CTX-M-tipi genlerin yayılmalarında rol oynamaktadır. Çiftlik hayvanlarında CTX-M-tipi beta-laktamazların yüksek görölme sıklıklarının temelinde hayvanlarda kullanılan antibiyotik türünün tayin edici olduğu düşünölmektedir (Horton ve ark. 2011).

Hollanda’da CTX-M-tipi beta-laktamazlara insanlarda az rastlanırken, tavuk etlerinde %80 gibi yüksek mertebelerde oldukları rapor edilmiştir. Epidemiyolojik incelemeler tavuk yetiştirilen çiftliklerde çalışan kişilerden izole edilen enterobakteriler ve taşıdıkları bla-genlerin hayvanda elde edilen karakteristiklerle örtüştüğünü göstermiştir. Fekal kaynaklı enterobakteriler ile çapraz bulaşma riski, bir gram fekal örneğinde 10^8 ve daha üzeri sayıda bakteri bulunduğu için normal karşılanmalıdır. Bu durumda, bla-genlerin miktarlarının saptanması ayrıca önem taşımaktadır (Carlet 2012).

Gıda kaynaklı CTX-M-1 pozitif enterobakterilerin toplumda nozokomiyal salgınlara yol açtıkları (Calbo ve ark. 2011), yenidoğanların bebek maması aracılığıyla bla_{CTX-M-1} ile infekte oldukları (Cassettari ve ark. 2009), çiftlik hayvanları ve çiftlikte çalışan kişilerde aynı direnç genlerine rastlanması gibi vakalar gıdaların bu tür direnç genlerinin yayılmalarında oynadıkları rolleri göstermesi bakımından büyük önem taşımaktadır (Miyakis ve ark. 2011; Hansen ve ark. 2014; Pokhrel ve ark. 2014).

CTX-M-8 tipi beta-laktamazlar son yıllarda insan, hayvan ve gıda kaynaklı *E. coli* suşlarında artan şekilde görülmektedir. Almanya’da gıda kaynaklı CTX-M-8 pozitif enterobakterilerin görülme sıklıklarının 2009-2012 yılları arasında dikkat çekici şekilde artış göstermiştir (Eller ve ark. 2013). İspanya ve ABD’de çok sık seyahat eden kişilerde bu tip bla-genlerin tespit edildikleri ve yayılmalarında gıdaların önemli rolleri oldukları ispatlanmıştır (Aizawa ve ark. 2014).

CTX-M-8 pozitif *E. coli* suşları Brezilya, Uruguay, Arjantin, ABD, Kanada, Kenya, İspanya ve Almanya’da süt ve sığır etlerinde, İngiltere, İsveç, Japonya ve Tunus’ta tavuk etlerinde tespit edilmiştir (Sihem ve ark. 2015).

Hong Kong’ta yapılan bir araştırma, tavuk etlerinden izole edilen CTX-M pozitif *E. coli* suşun taşıdığı 60.000 ila 90.000 bp uzunluğunda CTX-M-tipi bla-geninin aktarım sıklığının donör bazında 10^7 ila 10^3 arasında gerçekleştiğini rapor etmiştir. Bu bağlamda, bulgularımız hayvansal gıdalar kaynaklı enterobakterilerin bla-genleri için uygun rezervuar olduklarını göstermesi bakımından ayrıca önem taşımaktadır (Duan ve ark. 2006).

Bu çalışmada, CTX-M-pozitif izolatların alt grupları %97,2 $bla_{CTX-M-1}$ ve %2,8 $bla_{CTX-M-8}$ olarak belirlenmiştir. CTX-M-8 alt grubuna yalnızca bir adet *E. coli* suşunda rastlanmıştır. Türkiye’de gıda kaynaklı baskın altgrup CTX-M-1 olarak tek çalışmada bildirilmiştir (Pehlivanlar-Önen ve ark. 2015). Bu sonuç bizim çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular ile örtüşmüştür. *E. coli* suşunda karakterize edilen CTX-M-8 alt grubu genellikle hastane kaynaklı enterobakterilerde görülmektedir. Ancak, Türkiye’de hastane kaynaklı en yaygın CTX-M-1 alt grubu olup, *E. coli* izolatlarında %86,8 görülme sıklığına sahiptir (Gönüllü ve ark. 2008). Bu bulgu Çin (%72,2) ve ABD (%91) bulguları ile yakın benzerlikler göstermektedir (Zhang ve ark. 2014). Bu nedenle bizim çalışmamız bla_{CTX-M} altgrup dağılımının gıda kaynaklı ve hastane kaynaklı Ulusal ve Uluslararası veriler ile örtüşmesi açısından önem taşımaktadır.

A, B1, B2 ve D virüent filogenetik gruplarına ait enterobakterlerin *in vitro* ortam koşullarında dirençli olmayan türdeşlerine bla-genleri aktarımları incelenmiştir. Bu sebeple, Brezilya’da gıda kaynaklı $bla_{CTX-M-8}$ ve $bla_{CTX-M-1}$ genlerin *E. coli* suşları tarafından türdeşlerine ve patojen B2 suşlarına kolaylıkla aktarıldıkları kanıtlanmıştır. Bu sebeple, barsak mikroflorasının GSBL-üreten enterobakteriler ve

bla-genleri ile kolonizasyonu olmaları için uygun bir ortam sağladıkları, dirençli türlerin gelişmeleri ve yayılmalarından rezervuar görevi yaptıkları, insan ve hayvan mikroflorasının doğal üyesi olan enterobakterilerin insanlara gıda yoluyla bulaşmalarında başlıca itici sebeplerden oldukları anlaşılmıştır (Botelho ve ark. 2015).

Sonuç olarak, bulgularımız CTX-M altgruplarının öngörülmesi zor, hızlı ve dikkat çekici yayılışlarında hayvansal gıda kaynaklı enterobakterilerin önemli rolleri olabileceği, insanların bu tip direnç genlerini taşıyan enterobakterilerle infekte ve kolonize olmaları durumunda bakteriyel infeksiyonların ciddi şekilde artış göstereceği Dünya'daki diğer verilerle uyumlu olacak şekilde ortaya koymuştur (Cantón ve ark. 2008; Tham ve ark. 2012; Rasheed ve ark. 2014; Laube ve ark. 2014; Hammerum ve ark. 2014).

5.4 Gıda Bilimi ve halk sağlığı açılarından bulguların önemi ve öneriler

Bakterilerde görülen dirençlilik olgusu bütünsel bir yaklaşımla ele alınması gereken bir olgudur. Üç milyar yılı aşkın süredir yeryüzünde var olan bakteriler için ilk ciddi sınav diğer hayvan türlerinin ortaya çıkışları ile gerçekleşmiştir. Bakteriler, bu yeni potansiyel konakların kendilerine verecekleri zararlardan türlerini korumak için mekanizmalar geliştirmiştir. Bu tür savunma mekanizmaları aslında doğal ve edinilmiş immun sistemlerin ortak ve birbirlerini tamamlayıcı yanıtından başka bir şey değildir (Jarva ve ark. 2003).

İnsan immun sistemi doğal ve edinilmiş olmak üzere birbirini tamamlayıcı iki alt sistemden oluşmaktadır. Bu yapının başlıca aktivasyon yolları klasik antijen-antikor etkileşimi sonucu üretilen serum proteinleri, lektin, doğal inhibitörler ve korunmayan alternatif yüzeyler ile direnç mekanizmaları sergilemektedir. Bu nedenle insanlar açısından savunma mekanizmaları bakterilerden farklı görünmemektedir (Rautemaa ve Meri 1999).

Bakterilerin 3,5 milyar yıl önce evrimleşmeye başladıkları dikkate alırsak, antibiyotiklerin modern yaşama girdiği son 70 yılın ne kadar kısa bir an olduğunu görmemek mümkün değildir. Bu gerçeğe rağmen, penisilinin hizmete sunulduğu 1940'ların sonlarına doğru *S. aureus* suşlarının %50'sinin penisilinaz üreterek antibiyotik ilaçlara karşı direnç geliştirdikleri fark edilmiştir (WHO 2014).

Yalnızca ABD’de üretilen tüm antibiyotik ilaçların %80’i çiftlik hayvanları için kullanılmaktadır. FDA’nın 2009 yılı tahminlerine göre bu yüzdelik oran yıllık 13.000 tona karşılık gelmektedir. AB üyesi 10 ülkede 2007 yılı veteriner ilaçları satışı 3.500 ton civarında gerçekleşmiştir. Bu durum yalnız Fransa’da 2009 yılında 1067 tondur (Carlet ve ark. 2012).

AB 2006 yılında büyüme amaçlı antibiyotik ajanların hayvan yemlerine konulmasını yasaklamıştır. Ancak, 300 milyonu aşkın nüfusu olan ve gıda amaçlı 10 milyar hayvan bulunan ABD’de bu konuda olumlu bir gelişme olmamıştır (Huttner ve ark. 2013)

Bilinçsiz, aşırı ve kayıt dışı antibiyotik kullanıma getirilen Ulusal ve Uluslararası kısıtlamalar getirilmiştir. Buna rağmen, Dünya ülkelerinin günümüzde birbirlerine gıda zincirleri ve seyahat ağları ile bağlı oldukları gerçeğini göz önünde bulundurduğumuzda durumumuzun iyi anlatılan örneklerden birisi Hindistan’da tespit edilen beta-laktamaz üreten enterobakterilerin 4 ay gibi çok kısa bir süre sonra İngiltere’de izole edilmeleridir (Hawkey 2008).

İnsan sağlığı bakımından tehlikeli *E. coli*, *Salmonella* ve *Campylobacter* gibi patojen mikroorganizmaların gıdalarda varlıkları rutin şekilde kontrol edilmektedir. Ancak, direnç özellikleri için Uluslararası ve Ulusal kodekslerde henüz bir düzenleme getirilmemiştir. Şayet bu düzenlemeler yapılırsa, gıda kaynaklı dirençten sorumlu mobil genetik elemanların yayılma yolları anlaşılacaktır. Örneğin, Hong Kong’ta gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlardan izole edilen GSBL-pozitif enterobakteriler ile hastane kaynaklı türdeşleri arasındaki benzerlikler bulunmuştur. Bu bulgular yayılma yolları için mantıklı bir açıklama getirmektedir. Diğer taraftan, Brezilya’da gıda kaynaklı CTX-M pozitif *E. coli* suşları ile İngiltere’de izole edilen CTX-M pozitif türdeşleri farklılıklar göstermektedir. Bu bilgiler antibiyotik dirençliliği ve yayılış yollarının anlaşılması açısından konunun karmaşıklığını açıklamak bakımından önemlidir (Duan ve ark. 2006).

EFSA 2007 yılında antibiyotiklere dirençli suşların hayvan yemlerine, insani tüketim amaçlı fermente ve probiyotik gıdalara konulmasına yasak getirmiştir (Vankerckhoven ve ark. 2008; Sharma ve ark. 2014). Ancak probiyotik ve starter kültürlerde için getirilen tedbirler diğer gıda maddeleri söz konusu olduğunda gıda güvenliği parametresi olarak henüz gıda kodekslerine girmemiştir.

Ampisilinin 1960'lı yıllarda piyasaya sürülmesinden sadece 7 yıl sonra SHV-tipi ve TEM-tipi beta-laktamazların sebep oldukları plazmid-aracılı direnç önemli bir sorun olmaya başlamış ve izolatların %17'sinde görülmüştür. CTX ve CAZ gibi üçüncü nesil genişlemiş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler enterobakteri kaynaklı infeksiyonların tedavilerinde 1980'li yıllarda kullanılmaya başlamıştır. Bir müddet sonra *E. coli* ve *K. pneumoniae* türlerinde SHV-tipi ve TEM-tipi beta-laktamaz kodlayan genlerin mutantları tespit edilmiştir. Bu durumu takip eden 20 yıl içinde GSBL-üreten enterobakterler başdöndürü bir hızla yayılmış ve çeşitlenmişlerdir (Canton ve Hawkey 2006).

Asıl sürpriz Enterobacteriaceae familyasının bir üyesi olan çevresel kaynaklı *Kluyvera* suşlarından *E. coli* ve *K. pneumoniae* türlerine geniş spektrumlu plazmidin aktarımı sayesinde CTX-M-tipi yeni bir beta-laktamazın gelişmesidir. Bu tip beta-laktamazlar ilk olarak 2000'li yıllarda Hindistan'da tespit edilmiş, *E. coli* suşlarının %60'ında görülmüş ve kısa zaman içinde 50'yi aşkın alleli bulunmuştur. CTX-M-tipi beta laktamazlar yakın akrabalarından çok daha hızlı yayılmış ve Dünya'nın neredeyse insan ayağı değmemiş Antartika bölgesine kadar ulaşma başarısı göstermiştir. Günümüze geldiğinde GSBL-üreten bakterilerin eş zamanlı çoklu direnç sergiledikleri anlaşılmıştır. Bilim Dünyası bu kezde çoklu direnç gösteren enterobakterlere karşı karbapenemleri geliştirmiştir. Bu seferde aynı döngü devam ederek, karbapenemlere karşı karbapenamaz enzimi ortaya çıkmıştır (Hawkey 2008).

Antibiyotik dirençliliğin sebep olduğu mali yükler yalnızca morbidite, mortalite ve tedavinin başarısızlığı ile sınırlı kalmamaktadır. Bunların yanında aslında daha büyük külfet gelişimi ve yayılmasını önlemek için alınacak tedbirlerden doğmaktadır. Başlıca giderler karantina ve çapraz bulaşmaları engelleyecek biyolojik tedbirler, farnasötik geliştirmeler, eğitim ve bilinçlendirme faaliyetleri, yeni düzenleyici yönetmelikler oluşturulması, karantina ile çapraz hastane bulaşmalarını önleyecek tedbirlerdir. Tüm bu gider kalemleri maliyetlendirilmeleri son derece zor olan detaylardır.

Avrupa Birliğinde yapılan bir anket, insanların %53'ünün antibiyotiklerin virüslere ve gribal infeksiyonlara karşı etkili olduklarına inandıklarını göstermiştir (Carlet ve ark. 2012).

Bu durum bilinçsiz antibiyotik kullanımına ne kadar uygun bir ortam olduğunu göstermesi bakımından ayrıca önem taşımaktadır. Türkiye’de antibiyotik ajanların doğru kullanımı sağlayacak teknik personel sayısının diğer ülkelerden az olması sebebiyle, dirençliliğin 2,5 kat daha yüksek görüldüğü rapor edilmiştir (Olivier ve ark. 2010).

Antimikrobiyal direnç ABD’ne her yıl 400 milyon ila 18,6 milyar \$ arasında mali yük getirmektedir. Güney Afrika’da tedavi başına duyarlı tüberküloz mikrobi için 35 \$ harcanırken, dirençli tüberküloz mikrobuna karşı 4.300 \$ harcanmaktadır. Peru’lu yetkililer duyarlı tüberküloz tedavisi 267 \$ olurken, çoklu direnç gösteren tüberkülozun tedavisi yaklaşık 8.000 \$ yük getirmektedir (Okeke ve ak. 2005).

Her yıl Avrupa’da 25.000 ve ABD’de 19.000 kişinin dirençli mikroorganizmaların sebep oldukları infeksiyonlar sebebiyle öldükleri bildirilmiştir. Çoklu direnç özellikleri gösteren bakterilerin sağlık giderlerinde yol açtıkları maliyetin Avrupa’da 1,5 milyar Euro (Carlet ve ark. 2012) ve ABD’de 2013 yılı itibariyle 50 milyar \$ olduğu tahmin edilmektedir (Huttner ve ark. 2013).

Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi bu hızla devam ederse, 2050 yılı sonunda yaklaşık 100 milyon insanın dirençli bakterilerin sebep oldukları infeksiyonlar sebebiyle ölecekleri ve Ülkelere getireceği toplam mali yükün 100 trilyon \$’ı aşacağı öngörülmektedir (O’Neill 2014; WHO 2014).

Türkiye için dirençli mikroorganizmalar sebebiyle ekstra mali yük 2007 yılı bazında 7,3 milyon Euro olarak tahmin edilmiştir. Ancak, bu bilginin içinde gıdaların katkısı hakkında veriler bulunmamaktadır (de Kraker ve ark. 2011).

Bu araştırmada öne çıkan başlıca sonuçlar ve öneriler aşağıda sunulmuştur:

- İncelenen gıdalardan izole edilen enterobakteriler genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları kodlayan ve transfer edilebilen *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{SHV} mobil genetik elemanlara konak görevi yapmaktadırlar. TEM-tipi ve CTX-M-tipi genler frekansları en yaygın genotipik elemanlardır. *bla*_{TEM} ve *bla*_{CTX-M} ortak bulunma paterni yüksektir. En yaygın CTX-M-tipi alleleri CTX-M-1 ve CTX-M-8’dir. Genotipik dağılım Dünya’daki diğer bulgular ile örtüşen benzerlikler göstermiştir. Türkiye açısından gıda kanaklı GSBL-kodlayan genlerin hastane ve toplumsal kaynaklı olanlar ile benzerliklerinin/farklılıklarının moleküler incelemeleri yapılmalıdır.

- Hayvansal kaynaklı gıdalar dirençli enterobakteri türleri ve dirençten sorumlu genleri için potansiyel rezervuar görevi yapmaktadır. Bu nedenle, hastane ve toplumsal kaynaklar dışında, gıdalar da *bla*-genlerin yayılmalarında önemli roller oynamaktadırlar.
- Direnç kodlayan genlerin benzer ve farklı türler arasında aktarılabilmesi beta-laktamaz üreten enterobakterilerin yayılmalarını önlemede en ciddi engeldir.
- Endüstriyel gıda amaçlı hayvan yetiştiriciliğinin fayda-çıkara ilişkisinden çok; insan sağlığını koruyacak şekilde sürdürülmesi, etraflıca tekrar değerlendirilmesi ve düzenlemeler yapılması gerekliliği anlaşılmıştır.
- Dünya’da gıda kodeksleri gıdaların mikrobiyal bulaşmalarını kontrol amaçlı standartlar belirlemesine karşın antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalardan bahsetmemektedir. Bu nedenle gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından gıda kodekslerine antibiyotiklere karşı dirençli mikroorganizmalarında tespitinin ilave edilmesi gerekmektedir.
- Gıda teknolojileri fırsatçı veya patojen mikroorganizmaların gıdalarda varlıklarını ortadan kaldırmaya dönük işlemler uygulamaktadır. Ancak, bu teknolojiler dirençten sorumlu genetik materyali ortadan kaldırmamaktadır. Bu sebeple, gıda teknolojilerinde ileri mühendislik çalışmaları yapılması gerekmektedir.
- Gıda Mühendisliği açısından, gıda güvenliği araştırmalarında moleküler yöntem kullanımlarının yaygınlaştırılması, sağlık ve yaşam bilimleri ile disiplinlerarası lisansüstü çalışmalarının teşvik edilmesi gerekliliği görülmüştür.
- Gıda güvenliği açısından dirençli bakteriler ve direnç kodlayan genetik elemanların farklı gıdalarda hızlı ve kesin tespitine olanak verecek duyarlılık ve özgüllüğü yüksek genotipik (moleküler) yöntemleri geliştirilmeli veya kullanımı yaygınlaştırılmalıdır.

Sonuç olarak, bazı hayvansal kaynaklı gıdalardan elde edilmiş enterobakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları kodlayan *bla*-genlerin varlıkları, gıdaların direnç genetiğinden sorumlu bu tür DNA materyallerin yayılmalarında rol oynadıkları, tüketiciler açısından gıda güvenliği ve halk sağlığı bakımından tehdit oluşturdukları kanıtlanmıştır.

KAYNAKLAR

- Ahmed, A.M. ve Shimamoto, T.** (2015): Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, **193**, 68–73.
- Aidara-Kanea, A., Andremontb, A. ve Collignon, P.** (2013): Antimicrobial resistance in the food chain and the AGISAR initiative. *Journal of Infection and Public Health*, **6**, 162–165.
- Aizawa, J., Neuwirt, N., Barbato, L., Neves, P.R., Leigue, L., Padilha, J., Pestana de Castro, A.F., Gregory, L. ve Lincopan, N.** (2014): Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Antimicrob Chemother*, **69**, 10, 2866-2869.
- Akalın, E.H.** (2004): Beta Laktam? Beta Laktamaz İnhibitörü Antibiyotiklerin Klinik Kullanımı (I). Amoksisilin/Klavulanik Asit ve Ampisilin/Sulbaktamın Klinik Kullanımları. *Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*, **2**, 2, 123-127.
- Akçam, F.Z., Gönen, İ., Kaya, O. ve Yaylı, G.** (2004): Hastane infeksiyonu etkeni çeşitli Gram negatif bakterilerde geniş spektrumlu beta-laktamaz yapımının iki yöntemle karşılaştırılması. *Klinik Derg*, **17**, 47-49.
- Aktaş, F.** (2004): Beta Laktam- Beta Laktamaz İnhibitörü Antibiyotiklerin Klinik Kullanımı (II). Piperasilin- Tazobaktam, Tikarsilin- Klavulanik Asit ve Sefoperazon? Sulbaktam'ın Klinik Kullanımları. *Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*, **2**, 2, 123-127.
- Aktaş, Z., Satana, D., Kayacan, Kayacan, Ç., Can, B., Gönüüllü, N. ve Küçükbaşmacı, Ö.** (2012): Antibiotic Susceptibility Rates and Beta-Lactam Resistance Mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Mikrobiyol Bul*, **46**, 3, 386-397.
- Albayrak, G. ve Yörük, E.** (2013): Biyoinformatik Araçların *Fusarium graminearum* Genomunda Kullanımı. *Elektronik Mikrobiyoloji Dergisi*, **11**, 1, 1-18.
- Alekshun, MN. ve Levy, SB.** (2007): Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell*, **128**, 1037-1050.
- Al-Jasser, A.M.** (2006): Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): A global problem. *KMJ*, **38**, 171–185.
- Allmer, J.** (ed): Biyoenformatik'te Dizi Kıyaslamaları. Nobel Yayıncılık İstanbul, Türkiye, (erişim: <http://www.biolnk.com/habf/>).
- Allen, HK., Donato, J., Wang, HH., Cloud-Hansen, KA., Davies, J. ve Handelsman, J.** (2010): Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments, *Nature Reviews Microbiology*, **8**, 251-259.

- Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, C. ve Brito, L.** (2009): Resistance to β -lactams in Bacteria Isolated from Different Types of Portuguese Cheese. *Int. J. Mol. Sci*, **10**, 1538-1551.
- Arslan, S. ve Özdemir, F.** (2008): Extended spectrum beta-lactamases in Escherichia coli strains isolated from homemade white cheeses: prevalence and antibiotics susceptibility. *World J Microbiol Biotechnol*, **24**, 2361–2364.
- Arslan, H.** (2014): Acinetobacter moleküler epidemiyolojisi. *ANKEM Derg*, **28**, Ek 2, 71-72.
- Ata, Z., Yıbar, A., Muştak, HK., Temelli, S. ve Eyigör, A.** Tavuk Karkas Kökenli Salmonella İzolatlarında Plazmid İlişkili Kinolon Direnci, *5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi*, Antalya-Türkiye, (2013) pp:7.
- Atilla, A., Eroğlu, C., Esen, Ş., Sünbül, M. ve Leblebicioğlu, H.** (2012): Investigation of the Frequency of PER-1 Type Beta-Lactamase and Antimicrobial Resistance Rates in Nosocomial Isolates of Pseudomonas aeruginosa. *Mikrobiyol Bul*, **46**, 1, 1-8.
- Aygül, A.** (2015): The Importance of Effl ux Systems in Antibiotic Resistance and Effl ux Pump Inhibitors in the Management of Resistance. *Mikrobiyol Bul*, **49**, 2, 278-291.
- Ayhan, G. ve Taş, D.** (2013): Antimikrobiyal, Antiinflamatuvar İlaçlar ve Biyolojik Ajanlarla Oluşan Akciğer Hastalıkları. *Türkiye Klinikleri J Pulm Med-Special Topics*, **6**, 2, 40- 46.
- Bağlan, H.P.** (2003): Bakteri ve Yapısı. *Güncel Gastroenteroloji*, **7**, 3, 226-232.
- Barker, K.F.** (1999): Antibiotic resistance: a current perspective. *Br J Clin Pharmacol*, **48**, 2, 109–124.
- Bastos, Mde.S., Menegucci, T.C., Moreira, R.R., Garcia, L.B., Cardoso, C.L. and Tognim, M.C.** (2015): A rapid and simple method to detect ESBL in Enterobacter cloacae based on MIC of cefepime. *Rev Soc Bras Med Trop*, **48**, 2, 208-211.
- Bayraktar, B., Toksoy, B. ve Bulut, E.** (2010): Detection of blaCTX-M Beta Lactamase Genes in Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Gram-Negative Bacteria *Mikrobiyol Bul*, **44**, 187-196.
- Bayram, G., Delialioğlu, N. ve Emekdaş, G.** (2011): Mersin İlinde Tüketime Sunulan Etlerden İzole Edilen Enterokok Türlerinin Prevalansı ve Tiplendirilmesi. *Mersin Univ Sağlık Bilim Derg*, **4**, 12-16.
- Bhattacharjee, A., Sen, M.R., Prakash, P., Gaur, A. Ve Anupurba, S.** (2008): Increased prevalence of extended spectrum β lactamase producers in neonatal septicaemic cases at a tertiary referral hospital. *Indian J Med Microbiol*, **26**, 356-360.
- Birben, E.** (2006): Sekans tekniği. *Astım Allerji İmmünoloji*, **4**, 3, 159-161.
- Blaak, H., van Hoek, A.H.A.M., Veenman, C., van Leeuwen, A.D., Lynch, G., van Overbeek, W.M. ve de Roda Husman, A.M.** (2014): Extended spectrum β -lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology*. **168–169**, 8–16.
- Bonelli, R.R., Moreira, B.M. ve Picão, R.C.** (2014): Antimicrobial resistance among Enterobacteriaceae in South America: History, current dissemination status and associated socioeconomic factors. *Drug Resistance Updates*, **17**, 24–36.

- Bonnet, R., Sampaio, J.L.M., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C. ve Sirot, J.** (2000): A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant Enterobacteriaceae isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, **44**, 1936-1942.
- Bonnet, R.** (2004): Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **48**, 1–14.
- Botelho, L.A., Kraychete, G.B., Costa E Silva, J.L., Regis, D.V., Picão, R.C., Moreira, B.M. ve Bonelli, R.R.** (2015): Widespread distribution of CTX-M and plasmid-mediated AmpC β -lactamases in Escherichia coli from Brazilian chicken meat. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **110**, 2, 249-254.
- Branger, C., Zamfir, O., Geoffroy, S., Laurans, G., Arlet, G., Thien, H.V., Gouriou, S., Picard, B. ve Denamur, E.** (2005): Genetic background of Escherichia coli and extended-spectrum beta-lactamase type. *Emerg Infect Dis*, **11**, 1, 54-61.
- Brolund, A.** (2014): Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective, *Infect Ecol Epidemiol.*, **4**, 10.3402/iee.v4.24555.
- Brolund, A., Franzén, O., Melefors, Ö., Tegmark-Wisell, K. ve Sandegren, L.** (2013): Plasmidome-Analysis of ESBL-Producing Escherichia coli Using Conventional Typing and High-Throughput Sequencing. *PLoS ONE*, **8**, 6, e65793, doi: 10.1371/journal.pone.0065793.
- Bulut, Y. ve Çağlar, H.** (2013): Detection of Metallo-Beta-Lactamase Enzyme in Gram Negative Non-Fermentative Bacteria by Different Methods. *F Ü Sağ Bil Tıp Derg*, **27**, 3, 135-140.
- Calbo, E., Freixas, N., Xercavins, M., Riera, M., Nicolás, C., Monistrol, O., Solé Mdel, M., Sala, M.R., Vila, J. ve Garau, J.** (2011): Foodborne nosocomial outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing Klebsiella pneumoniae: epidemiology and control. *Clin Infect Dis*, **52**, 6, 743-749.
- Canton, R. ve Coque, T.M.** (2006): The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, **9**, 466–475.
- Cantón, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F. ve Coque, T.M.** (2008): Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect. Suppl*, **1**, 144-153.
- Cantón, R., González-Alba, J.M. ve Galán, J.C.** (2012): CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion. *Front Microbiol*, **3**, 110, doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.
- Capita, R. ve Alonso-Calleja, C.** (2013): Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **53**, 11-48.
- Carlet, J.** (2012): The gut is the epicentre of antibiotic resistance. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, **1**, 1, 39. doi: 10.1186/2047-2994-1-39.
- Carlet, J., Jarlier, V., Harbarth, S., Voss, A., Goossens, H., Pittet, D; Participants of the 3rd World Healthcare-Associated Infections Forum.** (2012): Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. *Antimicrob Resist Infect Control*, **1**, 1, 11, doi: 10.1186/2047-2994-1-11.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., ve Phillips, I.** (2003): The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother*, **52**, 2, 159-161.

- Cassettari, V.C., da Silveira, I.R., Dropa, M., Lincopan, N., Mamizuka, E.M., Matté, M.H., Matté, G.R. ve Menezes, P.R.** (2009): Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. *J Hosp Infect*, **71**, 4, 340-347.
- Castanon, J.I.R.** (2007): History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds. *Poultry Science*, **86**, 11, 2466-2471.
- Cengiz, M.** (2010): Bakterilerde Kinolon Direncinin Genetiği. *Uludag Univ J Fac Vet Med*, **29**, 1, 55-60.
- Chen, T., Feng, Y., Yuan, J.L., Qi, Y., Cao, Y.X. ve Wu, Y.** (2013): Class 1 integrons contributes to antibiotic resistance among clinical isolates of *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *Indian J Med Microbiol*, **31**, 4, 385-389.
- Cherkaoui, A., Emonet, S., Renzi, G., Riat, A., Greub, G. ve Schrenzel, J.** (2014): ESBL and carbapenemases in Enterobacteriaceae, *Rev Med Suisse.*, **10**, 2142-2148.
- Cho, H., Uehara, T. ve Bernhardt, T.G.** (2014): Beta-Lactam Antibiotics Induce a Lethal Malfunctioning of the Bacterial Cell Wall Synthesis Machinery. *Cell*, **159**, 6, 1300–1311.
- Chong, Y.** (2011): Extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria: an emerging Clinical concern. *Infect Genet Evol*, **11**, 7, 1499-1504.
- Chong, Y., Shimoda, S., Yakushiji, H., Ito, Y., Miyamoto, T., Kamimura, T., Shimono, N. ve Akashi, K.** (2013): Community spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis*: a long-term study in Japan. *J Med Microbiol*, **62**, Pt 7, 1038-1043.
- Chouchani, C., Marrakchi, R. ve El Salabi, A.** (2011): Evolution of β -lactams resistance in Gram-negative bacteria in Tunisia. *Critical Reviews in Microbiology*, **1–11**, DOI: 10.3109/1040841X.2011.552880.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Third Informational Supplement, CLSI Document M100-S23, CLSI, Wayne PA, (2013).
- Cogliani, C., Goossens, H. ve Greko, C.** (2011): Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe*, **6**, 274-279.
- Colodner, R.** (2005): Extended-spectrum β -lactamases: a challenge for clinical microbiologists and infection control specialists. *Am J Infect Control*, **33**, 104–107.
- Coque, C.M., Baquero, F. ve Canton, R.** (2008): Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance*, **13**, 5437-5453.
- Corpet, D.E.** (1988): Antibiotic resistance from food. *N. Engl. J. Med.*, **318**, 1206–1207.
- Culyba, M.J., Mo, C.Y. ve Kohli, R.M.** (2015): Targets for Combating the Evolution of Acquired Antibiotic Resistance. *Biochemistry*, **54**, 23, 3573–3582.
- Çiftçi, İ.H. ve Aşık, G.** (2011): *Acinetobacter baumannii*'nin antibiyotik direnç mekanizmaları. *ANKEM Derg*, **25**, 3, 196-207.
- Çöleri, A. ve Çökmüş, C.** (2008): Molecular Mechanisms of Resistance to Glycopeptide Antibiotics in *Enterococcus* Species and Modes of Gene Transfer. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **65**, 2, 87-96.

- Crepin, S., Harel, J. ve Dozois, C.M.** (2012): Chromosomal Complementation Using Tn7 Transposon Vectors in Enterobacteriaceae. *Applied and Environmental Microbiology*, **78**, 17, 6001-6008.
- Dahmen, S., Métayera, V., Gayb, E., Madeca, J.Y. ve Haennia, M.** (2013): Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of *Enterobacteriaceae* causing cattle mastitis in France. *Veterinary Microbiology*, **162**, 793–799.
- D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N. ve Wright, G.D.** (2011): Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, **477**, 7365, 457-461.
- de Kraker, M.E.A., Davey, P.G. ve Grundmann, H.** (2011): Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. *PLoS Med*, **8**, 10, e1001104.
- de Visser, J.A., Akkermans, A.D., Hoekstra, R.F. ve de Vos, W.M.** (2004): Insertion- sequence-mediated mutations isolated during adaptation to growth and starvation in *Lactococcus lactis*. *Genetics*, **168**, 3, 1145-1157.
- Demirtürk, N. ve Demirkal, T.** (2004): The Problem of The Antimicrobial Drug Resistance. *The Medical Journal of Kocatepe*, **5**, 17- 21.
- Dikici, A.** (2009):Çevresel Stres Faktörlerine Karşı Bakteriye Adaptasyonlar ve Mekanizmaları. *Electronic Journal of Food Technologies*, **4**, 3, 59-68.
- Doğan, H.B., Sarıkaya, E. ve Halkman, K.A.** (1996): Enterobacter İdentifikasyonunda Birleştirilmiş Testler Üzerine Bir Araştırma, *Gıda*, **21**, 431-434.
- Duan, R.S., Sit, T.H., Wong, S.S., Wong, R.C., Chow, K.H., Mak, G.C., Yam, W.C., Ng, L.T., Yuen, K.Y. ve Ho, P.L.** (2006): *Escherichia coli* producing CTX-M beta- lactamases in food animals in Hong Kong. *Microb Drug Resist*, **12**, 2, 145-148.
- Duman, Y., Bozkurt, I. ve Tekerekoglu, M.S.** (2014): Antibiotic Resistance and ESBL-Presence of Community- Acquired *Escherichia Coli* Strains. *Med-Science*, **3**, 3, 1408-1418.
- Durso, L.M., Miller, D.N. and Wienhold, B.J.** (2012): Distribution and Quantification of Antibiotic Resistant Genes and Bacteria across Agricultural and Non-Agricultural Metagenomes. *PLoS ONE*, **7**, 11, e48325.
- Durupınar, B.** (2001): Antibiyotiklere Dirençte Yeni Eğilimler. *Klimik Dergisi*, **14**, 2, 47-56.
- Doyle, M.P., Loneragan, G.H., Scott, H.M. ve Singer, R.S.** (2013): Antimicrobial resistance: Challenges and perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12**, 234-48.
- Dümen, E., Issa, G., İkiz, S., Bağcıgil, F., Özgür, Y., Kahraman, T., Ergin, S. ve Yeşil, O.** (2011): Determining Existence and Antibiotic Susceptibility Status of *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy Products, Serological and Molecular Typing of the Isolates. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **17**, 111-119.

- EFSA.** (2007): Opinion of the scientific committee on a request from EFSA on the introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. *EFSA Journal*, **187**, 1–16.
- EFSA.** (2010): The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, **8**, 1658.
- EFSA.** (2011): Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food producing animals. *EFSA Journal*, **9**, 2322-2417.
- Ehlers, M.M., Veldsman, C., Makgotlho, E.P., Dove, M.G., Hoosen, A.A. ve Kock, M.M.** (2009): Detection of blaSHV, blaTEM and blaCTX-M antibiotic resistance genes in randomly selected bacterial pathogens from the Steve Biko Academic Hospital. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **56**, 191-196.
- Eller, C., Leistner, R., Guerra, B., Fischer, J., Wendt, C., Rabsch, W., Werner, G. ve Pfeifer, Y.** (2013): Emergence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany. *J Antimicrob Chemother*, doi: 10.1093/jac/dkt387.
- Eraclio, G., Ricci, G. ve Fortina, M.G.** (2015): Insertion sequence elements in *Lactococcus garvieae*. *Gene*, **555**, 2, 291–296.
- Eraksoy, H.** (2008): Antimicrobial Resistance and Resistance Mechanisms. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics*, **4**, 1-14.
- EUCAST.** Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0 December 2013.
- FAO.** Status Report on Antimicrobial Resistance, 2015. Erişim: <http://www.fao.org/3/a-mm736e.pdf>, erişim tarihi 6-13 Haziran 2015.
- Fazeli, H., Dolatabadi, R.K., Taraghian, A., Isfahani, B.N. ve Moghim, S.** (2015): Genetic Characterization of blaSHV/VEB/PER Genes in ESBLProducing MDR Klebsiella Pneumonia Strains Isolated from Patients in Isfahan, Iran. *European Online Journal of Natural and Social Sciences*, **4**, 1, 191-202.
- Fernandes, R., Amador, P., Oliveira, C. ve Prudêncio, C.** (2014): Molecular Characterization of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in Northern Portugal. *Scientific World Journal*, Article ID 782897, doi:10.1155/2014/782897.
- Fernández, L. ve Hancock, R.E.W.** (2012): Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. *Clin Microbiol Rev*, **25**, 4, 661-681.
- Fernández-Canigia, L., Cejas, D., Gutkind, G. ve Radice, M.** (2015): Detection and genetic characterization of β -lactamases in *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolated from oral cavity infections and peritonsillar abscesses. *Anaerobe*, **33**, 8-13.
- Ferreira, J.C., Filho, R.A.C.P., Andrade, L.N., Junior, A.B., Darini, A.L.C.** (2014): IncI1/ST113 and IncI1/ST114 conjugative plasmids carrying blaCTX-M-8 in *Escherichia coli* isolated from poultry in Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.*, **80**, 4, 304–306.

- Fischbach, M.A. ve Walsh, C.T.** (2009): Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, **325**, 1089-1093.
- Foxman, B.** (2003): Review Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon*, **49**, 53-70.
- FVE Avrupa Veteriner Hekimler Federasyonu.** Using Antimicrobials Responsibly: Advice for Doctors, Dentists and Veterinarians, 2014, erişim: http://www.fve.org/veterinary/pdf/medicines/AMR%20leaflets/ONE%20HEALTH_HP/FVE_sheet_vet_doctor_dentist_EN.pdf, erişim tarihi: 14 Kasım, 2014.
- Ganter, B. ve Stelling, J.** (2011): Expert consultation on antimicrobial resistance, WHO-Regional Office for Europe, Copenhagen-Denmark.
- Garcia-Migura, L., Hendriksen, R.S., Fraile, L. ve Aarestrup, F.M.** (2014): Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, **170**, 1– 9.
- García-Tello, A., Gimbernat, H., Redondo, C., Arana, D.M., Cacho, J. ve Angulo, J.C.** (2014): Extended-spectrum beta-lactamases in urinary tract infections caused by Enterobacteria: Understanding and guidelines for action. *Actas Urol Esp.*, **38**, 678-684.
- Geser, N., Stephan, R., ve Hächler H.** (2012): Occurrence and characteristics of extended- spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Veterinary Research*, **8**, 21. doi:10.1186/1746-6148-8-21.
- Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S. ve Sekawi Z.** (2014): Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology, *Curr Issues Mol Biol.*, **17**, 11-22.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R. ve Pavilionis, A.** (2011): Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, **47**, 3, 137- 146.
- Gomez, M.J. ve Neyfakh, A.A.** (2006): Genes Involved in Intrinsic Antibiotic Resistance of Acinetobacter baylyi. *Antimicrob. Agents Chemother*, **50**, 11, 3562-3567.
- Gökalp, F.** (2015). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten Enterobacteriaceae türlerinin sütlerdeki prevalansı ve antibiyotik dirençlilik durumlarının incelenmesi, (yüksek lisans tezi), İstanbul Aydın Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Göncüoğlu, M. ve Ormancı, F.S.B.** Piliç Karkas, Kanat ve Karaciğerlerinde Salmonella Typhimurium Varlığı ve Antibiyotik Direnç Profili, *5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi*, Antalya-Türkiye, (2013) pp:37.
- Gundogan, N. ve Yakar, U.** (2007): Siderophore production, serum resistance, hemolytic activity and extended spectrum beta lactamaseproducing Klebsiella species isolated from milk and milk products. *J.Food Saf.*, **3**, 251-260.
- Gundogan, N., Cıtak, S. ve Yalcin, E.** (2011): Virulence properties of Extended spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella species in meat samples. *J. Food Prot.*, **74**, 559-564.
- Gundogan, N. ve Avci, E.** (2013): Prevalence and antibiotic resistance of Extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing Escherichia coli and

- Klebsiella species isolated from foods of animal origin in Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, **7**, 4059-4064.
- Güçlü, A.Ü., Kılıç, A., Bedir, O., Yılmaz, S. ve Güney, M.** (2013): Screening of the production of metallo-beta-lactamases in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates existing carbapenemase activity from Intensive. *Gulhane Med J*, **55**, 3, 176-180.
- Gür, D.** (1989): Gram negatif bakterilerde antibiyotik direnci ve hastane infeksiyonlarındaki rolü. *ANKEM Derg*, **3**, 3, 464-474.
- Gürler, Z., Pamuk, Ş., Yıldırım, Y. ve Ertaş, N.**, Tüketime Hazır Gıdaların Mikrobiyolojik Güvenliği: *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Dirençliliği, 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Antalya-Türkiye, (2013), pp:157.
- Habeeb, M.A., Sarwar, Y., Ali, A., Salman, M. ve Haque, A.** (2013): Rapid emergence of ESBL producers in *E. coli* causing urinary and wound infections in Pakistan. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, **29**, 2, 540-544.
- Hansen, K.H., Bortolaia, V., Damborg, P. ve Guardabassi, L.** (2014): Strain diversity of CTX-M-producing Enterobacteriaceae in individual pigs: insights into the dynamics of shedding during the production cycle. *Appl Environ Microbiol*, **80**, 21, 6620-6626.
- Haque, A., Yoshizumi, A., Saga, T., Ishii, Y., ve Tateda, K.** (2014): ESBL-producing Enterobacteriaceae in environmental water in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **20**, 11, 735-737.
- Hammerum, E.M., Larsen, J., Andersen, V.D., Lester, C.H., Skovgaard Skytte, TS., Hansen, F., Olsen, S.S., Mordhorst, H., Skov, R.L., Aarestrup, F.M. ve Agersø, Y.** (2014): Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* obtained from Danish pigs, pig farmers and their families from farms with high or no consumption of third- or fourth-generation cephalosporins. *J Antimicrob Chemother*, Doi:10.1093/jac/dku180.
- Hasman, H., Mevius, D., Veldman, K., Olesen, I. ve Aarestrup, F.M.** (2005): beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**, 115-121.
- Hawkey, P.M.** (2008): The growing burden of antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **62**, Suppl. 1, 1-9.
- Hawkey, P.M.** (2015): Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. *Journal of Hospital Infection*, doi:10.1016/j.jhin.2015.01.008.
- Hiroi, M., Yamazaki, F., Harada, T., Takahashi, N., Iida, N., Noda, Y., Yagi, M., Nishio, T., Kanda, T., Kawamori, F., Sugiyama, K., Masuda, T., Hara-Kudo, Y. ve Ohashi, N.** (2012): Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J Vet Med Sci.*, **74**, 2, 189-195.
- Horton, R.A., Randall, L.P., Snary, E.L., Cockrem, H., Lotz, S., Wearing, H., Duncan, D., Rabie, A., McLaren, I., Watson, E., La Ragione, R.M. ve Coldham, N.G.** (2011): Fecal carriage and shedding density of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in

cattle, chickens, and pigs: implications for environmental contamination and food production. *Appl Environ Microbiol*, **77**, 11, 3715-3719.

- Huttner, A., Harbarth, S., Carlet, J., Cosgrove, S., Goossens, H., Holmes, A., Jarlier, V., Voss, A. ve Pittet, D.** (2013): Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrob Resist Infect Control*, **2**, 31, doi: 10.1186/2047-2994-2-31.
- Ibrahimagić, A., Bedenić, B., Kamberović, F. ve Uzunović, S.** (2014): High prevalence of CTX-M-15 and first report of CTX-M-3, CTX-M-22, CTX-M-28 and plasmid-mediated AmpC beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* causing urinary tract infections in Bosnia and Herzegovina in hospital and community settings. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **21**, 363–369.
- Jarva, H., Jokiranta, T.S., Würzner, R. ve Meri, S.** (2003): Complement resistance mechanisms of streptococci. *Molecular Immunology*, **40**, 95–107.
- Kalaycıoğlu, A.T.** (2013): Translation of Nucleotide Sequences to Amino Acids and Their Comparison with Data Stored in Databases. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **19**, 2, 359- 363.
- Kalter, H.D., Gilman, R.H., Moulton, L.H., Cullotta, A.R., Cabrera, L. ve Velapatiño, B.** (2010): Risk Factors for Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Carriage in Young Children in Peru: Community-Based Cross-Sectional Prevalence Study. *Am J Trop Med Hyg.*, **82**, 879–888.
- Kar, D., Bandyopadhyay, S., Bhattacharyya, D., Samanta, I., Mahanti, A., Nanda, P.K., Mondal, B., Dandapat, P., Das, A.K., Dutta, T.K., Bandyopadhyay, S. ve Singh, R.K.** (2015): Molecular and phylogenetic characterization of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from poultry and cattle in Odisha, India. *Infection Genetics and Evolution*, **29**, 82–90.
- Kawamura, K., Goto, K., Nakane, K. ve Arakawa, Y.** (2014): Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. *Foodborne Pathog Dis.*, **11**, 2, 104-110.
- Khoshbakht, R., Shahed, A. ve Aski, H.S.** (2014): Characterization of Extended Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichiae coli* Strains Isolated From Dairy Products. *J Microbiol Biotech Food Sci*, **3**, 333-336.
- Koldaş, K., Mumcuoğlu, İ., Karahan, Z.C., Coşkun, F.A., Kurşun, Ş. ve Aks, N.** (2011): Enterobacteriaceae Suşlarında Plazmid Kökenli AmpC Beta-Laktamaz Varlığının Multipleks PZR ve Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **41**, 2, 65-72.
- Korten, V., Ulusoy, S., Zarakolu, P. ve Mete, B.** (2007): Turkish MYSTIC Study Group (2007) Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period (2000-2003) in Turkey: results of the MYSTIC Program. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **59**, 4, 453-457.
- Kumar, A., Talwar, A., Dhatwalia, V.K.** (2010): Antimicrobial Resistance Patterns of *Klebsiella* spp. Isolated from Raw Milk of Doon Valley. *Journal of Biotechnology*, **150**, 425–426.
- Kuyucu, N.** (2007): Antibiyotik direnci. *Çocuk Enf Derg*, **1**, Özel Sayı 1, 33-38.

- Lahlaouia, H., Ben Haj Khalifa, A. ve Ben Moussa, M.** (2014): Epidemiology of Enterobacteriaceae producing CTX-M type extended spectrum β -lactamase (ESBL). *Médecine et Maladies Infectieuses*, **44**, 400–404.
- Laube, H., Friese, A., von Salviati, C., Guerra, B., ve Rösler, U.** (2014): Transmission of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* from broiler chicken farms to surrounding areas. *Veterinary Microbiology*, **172**, 519–527.
- Law, J.F.W., Ab Mutalib, N.S., Chan, K.G. ve Lee, L.H.** (2014): Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front Microbiol*, **5**, 770.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O.** (2013): Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*, **13**, 12, 1057-1098.
- Leistner, R., Meyer, E., Gastmeier, P., Pfeifer, Y., Eller, C., Dem, P. ve Schwab, F.** (2013): Risk Factors Associated with the Community-Acquired Colonization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Positive *Escherichia coli*. An Exploratory Case-Control Study. *PLoS ONE*, **8**, 9, e74323. doi:10.1371/journal.pone.0074323.
- Levin, B.R. ve Bergstrom, C.T.** (2000): Bacteria are different: Observations, interpretations, speculations, and opinions about the mechanisms of adaptive evolution in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 13, 6981-6985.
- Levin, B.R., Baquero, F. ve Johnsen, P.J.** (2014): A model-guided analysis and perspective on the evolution and epidemiology of antibiotic resistance and its future. *Current Opinion in Microbiology*, **19**, 83–89.
- Levy, S.B.** (2002): Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **49**, 25-30.
- Levy, S.B. ve Marshall, B.** (2004): Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses, *Nature Medicine Supplement*, **10**, 122-129.
- Li, X.H., Li, Y.L., Alvarez, A., Harper, W.J. ve Wang, H.H.** (2011): Antibiotic resistance mitigation in dairy fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 7093-7095.
- Liebana, E., Carattoli, A., Coque, T.M., Hasman, H., Magiorakos, A.P., Mevius, D., Peixe, L., Poirel, L., Schuepbach-Regula, G., Torneke, K., Torren-Edo, J., Torres, C. ve Threlfall, J.** (2013): Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases or AmpC β -Lactamases in Food and Food-Producing Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors, and Control Options. *Clinical Infectious Diseases*, **56**, 1030–1037.
- Livermore, D.M.** (1995): β -Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, **8**, 4, 557-584.
- Livermore, D.M.** (1997): β -lactamases: Quantity and resistance. *Clin Microbiol Infect*, **3**, 4, 10-19.

- Lupo, A., Papp-Wallace, K.M., Sendi, P., Bonomo, R.A. ve Endimiani, A.** (2013): Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **77**, 179-194.
- Machado, E., Ferreira, J., Novais, A., Peixe, L., Canton, R., Baquero, F. ve Coque, T.M.** (2007): Preservation of Integron Types among Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum-Lactamases in a Spanish Hospital over a 15-Year Period (1988 to 2003). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **51**, 6, 2201-2204.
- Makaa, L., Maćkiwa, E., Ścieżyńska, H., Pawłowska, K. ve Popowska, M.** (2014): Antimicrobial susceptibility of Salmonella strains isolated from retail meat products in Poland between 2008 and 2012. *Food Control*, **38**, 199-204.
- Marcade, G., Deschamps, C., Boyd, A., Gautier, V., Picard, B., Branger, C., Denamur, E., ve Arlet, G.** (2009): Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases. *J Antimicrob Chemother*, **63**, 67-71.
- Mardis, E.R.** (2008): Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **9**, 387-402.
- Marshall, B.M. ve Levy, S.B.** (2011): Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Cin Microb. Rev.*, **24**, 718-733.
- Medeiros, A.A.** (1997): Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin Infect Dis*, **24**, Suppl 1, 19-45.
- Melzera, M. ve Petersen, I.** (2007): Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *E. coli* compared to non-ESBL producing *E. coli*. *Journal of Infection*, **55**, 254-259.
- Meral, H. ve Korukluoğlu, M.** (2014): Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, **28**, 2, 71-82.
- Mesa, R.J., Blanc, V., Blanch, A.R., Cortés, P., González, J.J., Lavilla, S., Miró, E., Muniesa, M., Saco, M., Tórtola, M.T., Mirelis, B., Coll, P., Llagostera, M., Prats, G. ve Navarro, F.** (2006): Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in different environments (humans, food, animal farms and sewage). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **58**, 211-215.
- Miyakis, S., Pefanis, A. ve Tsakris, A.** (2011): The Challenges of Antimicrobial Drug Resistance in Greece. *CID*, **53**, 177-184.
- Mohanty, S., Gaind, R., Ranjan, R. ve Deb, M.** (2009): Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria. *J Infect Dev Ctries*, **21**, 4, 1, 24-29.
- Mor-Mur, M. ve Yuste, J.** (2010): Emerging bacterial pathogens in meat and poultry: An overview. *Food and Bioprocess Technology*, **3**, 24-35.
- Morrissey, I., Bouchillon, S.K., Hackel, M., Biedenbach, D.J., Hawser, S., Hoban, D. ve Badal, R.E.** (2014). Evaluation of the Clinical and Laboratory Standards Institute phenotypic confirmatory test to detect the presence of extended-spectrum β -lactamases from 4005 *Escherichia coli*,

- Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates. *J Med Microbiol*, **63**, Pt 4, 556-561.
- Naas, T., Oxacelay, C. ve Nordmann, P.** (2007): Identification of CTX-M-Type Extended-Spectrum- β -Lactamase Genes Using Real-Time PCR and Pyrosequencing. *Antimicrob Agents Chemother*, **51**, 1, 223-230.
- Nazik, H., Bektore, B., Ongen, B., Ilktaç, M., Ozyurt, M., Kuvat, N., Baylan, O., Kekulluoglu, H., Haznedaroglu, T. ve Kelesoglu, F.M.** (2011): Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in *Escherichia coli* Urinary Isolates from Two Teaching Hospitals in Turkey: Coexistence of TEM, SHV, CTX-M and VEB-1 Type β -lactamases. *Trop J Pharm Res* **10**, 3, 325–333.
- Newell, D.G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J. ve Kruse, H.** (2010): Food-borne diseases-The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*, **139**, 3–15.
- Nordstrom, L., Liu, C.M. ve Price, L.B.** (2013): Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistant foodborne illness. *Front Microbiol*, **4**, 29.
- Norman, A., Hansen, L.H. ve Sørensen, S.J.** (2009): Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Phil Trans R Soc B*, **364**, 2275–2289.
- Novais, Â., Comas, I., Baquero, F., Cantón, R., Coque, T.M., Moya, A., González-Candelas, F. ve Galán, J.C.** (2010): Evolutionary Trajectories of Beta-Lactamase CTX-M-1 Cluster Enzymes: Predicting Antibiotic Resistance. *PLoS Pathog*, **6**, 1, e1000735.
- Ochman, H., Lawrence, J.G. ve Groisman, E.A.** (2000): Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. *Nature*, **405**, 299-304.
- OECD Ekonomik İşbirliği ve Kalkınma Örgütü.** Report for Global Antimicrobial Use in The Livestock Sector, 2015. Erişim:: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=TAD/CA/A PM/WP\(2014\)34/FINAL&docLanguage=En](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=TAD/CA/A%20PM/WP(2014)34/FINAL&docLanguage=En), erişim tarihi: 26 Şubat 2015.
- Ojdana D., Sacha P., Wieczorek P., Czaban S., Michalska A., Jaworowska J., Jurczak A., Poniatowski B., ve Trynieszewska E.** (2014): The Occurrence of blaCTX-M, blaSHV, and blaTEM Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase-Positive Strains of *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis* in Poland. *International Journal of Antibiotics*, Vol: 2014, Article ID 935842, doi:10.1155/2014/935842.
- Okeke, I.N., Laxminarayan, R., Bhutta, Z.A., Duse, A.G., Jenkins, P., O'Brien, T.F., Pablos-Mendez, A. ve Klugman, K.P.** (2005): Antimicrobial resistance in developing countries. Part I: recent trends and current status. *Lancet Infect Dis*, **5**, 8, 481-493.
- Olivier, C., Williams-Jones, B., Doize, B. ve Ozdemir, V.** (2010): Containing Global Antibiotic Resistance: Ethical Drug Promotion in the Developing World, in *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*. ISBN 978-0-387-89369-3, p. 505-520, Eds. Anibal de J. Sosa, Denis K. Byarugaba, Carlos F. Ama bile-Cuevas, Po-Ren Hsueh, Samuel Kariuki, Iruka N. Okeke, Springer, New York.

- O'Neill, J.** (2014): Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. Review on Antimicrobial Resistance, p. 7, (Erişim: 2014, <http://amr-review.org>).
- Orak, F.A.** (2005): Hastane Enfeksiyonuna Neden Olan Gram-Negatif Bakterilerde Direnç Paterni ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Tayini, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD, Adana, Türkiye.
- Overdeest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., van der Zwaluw, K., Huijsdens, X. ve Kluytmans, J.** (2011): Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, *The Netherlands Emerg Infect Dis*, **17**, 1216–1222.
- Oyinloye, J.M.A. Jnr. ve Ezekiel, C.N.** (2011): Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-producing Multidrug Resistant *Enterobacteria* from Commercial Poultry Feeds in Nigeria. *Annals of Biological Research*, **2**, 250-254.
- ndeş, N.** (2015). Kırmızı et rneklerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)-reten Enterobacteriaceae izolatlarında antibiyotik dirençlilik durumlarının incelenmesi, (yüksek lisans tezi), İstanbul Aydın Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- zadam, A.** (2016). Peynir rneklerinden İzole Edilen Enterobakterilerde Geniş Spektrumlu beta-Laktamaz (GSBL) ve AmpC Dirençlilik Durumlarının İncelenmesi, (yüksek lisans tezi), İstanbul Aydın Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- zgen Arun, . Ve Uğur, M.** (1999): Sosislerdeki Etin Orijininin Belirlenmesinde Pseudoperoksidaz Boyama Tekniğinin Poliakrilamid Jel İzoelektrik Odaklama (PAGIF) Metodunda Kullanılması. *Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences*, **23**, 599-603.
- Page, M.C.P.** (2012): Beta-Lactam Antibiotics. *Antibiotic Discovery and Development*, **12**, 79-117.
- Pehlivanlar nen, S., Aslantaş, . şebnem Yılmaz, E. ve Krekci, C.** (2015): Prevalence of β -Lactamase Producing *Escherichia coli* from Retail Meat in Turkey. *J Food Sci*, doi: 10.1111/1750-3841.12984. [Epub ahead of print].
- Paterson, D.L. ve Bonomo, R.A.** (2005): Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, **18**, 657-686.
- Peternel, C., Galler, H., Zarfel, G., Luxner, J., Haas, D., Grisold, A.J., Reinthaler, F.F. ve Feier, G.** (2014): Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. *Food Microbiology*, **44**, 41-46.
- Pfaller, M.A. ve Segreti, J.** (2006): Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis*, **42**, Suppl 4, 153-163.
- Pitout, J.D.D., Nordmann, P., Laupland, K.B. ve Poirel, L.** (2005): Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **56**, 52–59.
- Pokhrel, R.H., Thapa, B., Kafle, R., Shah, P.K. ve Tribuddharat, C.** (2014): Co-existence of beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* from

Kathmandu, Nepal. *BMC Research Notes*, **7**, 694 doi:10.1186/1756-0500-7-694.

- Polsfuss, S., Bloemberg, G.V., Giger, J., Meyer, V. ve Hombach, M.** (2012): Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI screening parameters for the detection of extended-spectrum β -lactamase production in clinical Enterobacteriaceae isolates. *J Antimicrob Chemother*, **67**, 1, 159-166.
- Randall, L., Heinrich, K., Horton, R., Brunton, L., Sharman, M., Bailey-Horne, V., Sharma, M., McLaren, I., Coldham, N., Teale, C., ve Jones, J.** (2014): Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011. *Res Vet Sci.*, **96**, 15-24.
- Rao, L., Lv, L., Zeng, Z., Chen, S., He, D., Chen, X., Wu, C., Wang, Y., Yang, T., Wu, P., Liu, Y. ve Liu, J.H.** (2014): Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003–2012. *Veterinary Microbiology*, **172**, 534–541.
- Rao, S.P.N., Rama, P.S., Gurushanthappa, V., Manipura, R. ve Srinivasan, K.** (2014): Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: A Multi-Centric Study Across Karnataka. *J Lab Physicians*, **6**, 1, 7–13.
- Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z. Ve Jamil, K.** (2014): Antimicrobial Drug resistance in Strains of *Escherichia coli* Isolated from Food Sources. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **56**, 4, 341-346.
- Rautemaa, R. ve Meri, S.** (1999): Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes Infect*, **1**, 10, 785-794.
- Reich, F., Atanassova, V. ve Klein, G.** (2013): Extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing enterobacteria in healthy broiler chickens, Germany. *Emerg Infect Dis.*, **19**, 8, 1253-1259.
- Reuland, E.A., al Naiemi, N., Raadsen, S.A., Savelkoul, P.H.M., Kluytmans, J.A.J.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E.** (2014): Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **33**, 1843–1846.
- Rice, L.B.** (2009): The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol*, **12**, 5, 476-481.
- Rossolini, G.M., D'Andrea, M.M. ve Mugnaioli, C.** (2008): The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. *Clin Microbiol Infect*, **14**, Suppl. 1, 33–41.
- Rupp, M.E. ve Fey, P.D.** (2003): Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*, **63**, 353-365.
- Samaha-Kfoury, J.N. ve Araj, G.F.** (2003): Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. *BMJ*, **327**, 1209–1213.
- Sarıcı, B.** (2015). Tavuk etlerinde genişlemiş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli enterik bakterilerin identifikasyonu ve direnç profillerinin tespiti, (yüksek lisans tezi), İstanbul Aydın Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.

- Schneider, D. ve Lenski, R.E.** (2004): Dynamics of insertion sequence elements during experimental evolution of bacteria. *Research in Microbiology*, **155**, 319–327.
- Schwaber, M.J. ve Carmeli, Y.** (2007): Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*, **60**, 5, 913-920.
- Schwaiger, K., Huther, S., Hölzel, C., Kämpf, P. ve Bauer, J.** (2012): Prevalence of antibiotic-resistant enterobacteriaceae isolated from chicken and pork meat purchased at the slaughterhouse and at retail in Bavaria, Germany. *International Journal of Food Microbiology*, **154**, 206–211.
- Seiffert, S.N., Hilty, M., Perreten, V. ve Endimiani, A.** (2013): Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock: an emerging problem for human health?, *Drug Resist Updat.*, **16**, 22-45.
- Sepp, E., Stsepetova, J., Lõivukene, K., Truusalu, K., Kõljalg, S., Naaber, P. ve Mikelsaar, M.** (2009): The occurrence of antimicrobial resistance and class 1 integrons among commensal *Escherichia coli* isolates from infants and elderly persons. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, **8**, 34. doi:10.1186/1476-0711-8-34.
- Shaikh, S., Fatima, J., Shakil, S., Rizvi, S.M. ve Kamal, M.A.** (2015): Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi J Biol Sci*, **22**, 1, 90-101.
- Sharmah, A.K., Meyer, M.T. ve Boxall, A.B.A.** ((2006): A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, **65**, 725–759.
- Sharma, M., Pathak, S. ve Srivastava, P.** (2013): Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **7**, 2173–2177.
- Sharma, P., Tomar, S.K., Goswami, P., Sangwan, V. ve Singh, R.** (2014): Antibiotic resistance among commercially available probiotics. *Food Research International*, **57**, 176–195.
- Shi, X.M., Long, F. ve Suo, B.** (2010): Molecular methods for the detection and characterization of foodborne pathogens. *Pure Appl Chem*, **82**, 1, 69–79.
- Shi, H., Sun, F., Chen, J. Ou, Q., Feng, W., Yong, X. ve Xia, P.** (2015): Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial *Escherichia coli* infection in China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **14**, 4, doi: 10.1186/s12941-015-0063-7.
- Shousha, A., Aawaiwanont, N., Sofka, D., Smulders, F.J., Paulsen, P., Szostak, M.P., Humphrey, T. ve Hilbert, F.** (2015): Bacteriophages Isolated from Chicken Meat and the Horizontal Transfer of Antimicrobial Resistance Genes. *Appl Environ Microbiol*, **81**, 14, 4600-4606.
- Sihem, M., Salah, H., Riadh, M. ve Salah, A. M.** (2015): Overview of ESBL-producing *Escherichia coli* of Animal Origin in Tunisia: In the Way of the Global Spread of CTX-M β -Lactamases. *Archives of Clinical Microbiology*, **6**, 2:4, 1-7.

- Singh, R.M. ve Singh, H.L.** (2014): Comparative evaluation of six phenotypic methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *J Infect Dev Ctries*, **8**, 4, 408-415.
- Sjölund-Karlsson, M., Howie, R.L., Blickenstaff, K., Boerlin, P., Ball, T., Chalmers, G., Duval, B., Haro, J., Rickert, R., Zhao, S., Fedorka-Cray, P.J. ve Whichard, J.M.** (2013): Occurrence of b-Lactamase Genes Among Non-Typhi Salmonella enterica Isolated from Humans, Food Animals, and Retail Meats in the United States and Canada. *Microbial Drug Resistance*, **19**, 191-197.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Catry, B., Herman, L., Haesebrouck, F. ve Butaye, P.** (2008): Diversity of extended-spectrum beta-lactamases and class C beta-lactamases among cloacal *Escherichia coli* Isolates in Belgian broiler farms. *Antimicrob Agents Chemother*, **52**, 1238-1243.
- Smet, A., Martel, A., Persoons, D., Dewulf, J., Heyndrickx, M., Herman, L., Haesebrouck, F. ve Butaye P.** (2009): Broad-spectrum β -lactamases among Enterobacteriaceae of animal origin: molecular aspects, mobility and impact on public health. *FEMS Microbiology Reviews*, **34**, 3, 295-316.
- Soltani, R., Ehsanpoor, M., Khorvash, F. ve Shokri, D.** (2014): Antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria causing nosocomial urinary tract infections in an Iranian referral teaching hospital. *J Res Pharm Pract*, **3**, 1, 6-11.
- Somer, A.** (2010): Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Turk Arch Ped*, **45**, 45-49.
- Söbeli, C. ve Kayaardı, S.** (2014): New techniques for detecting meat quality. *Gıda*, **39**, 4, 251-258.
- Sökmen, Ç.** (2015): Sebzelelerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten Enterobacteriaceae İzolatlarının Antibiyotiklere Dirençlilik Durumlarının İncelenmesi, (yüksek lisans tezi), İstanbul Aydın Üniversitesi, İstanbul, Türkiye.
- Sørum, H. ve L'Abée-Lund, T.M.** (2002): Antibiotic resistance in food-related bacteria--a result of interfering with the global web of bacterial genetics. *Int J Food Microbiol*, **78**, 43-56.
- Srisangkaew, S. ve Vorachit, M.** (2004): The Optimum Agent for Screening and Confirmatory Tests for Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Ramathibodi Hospital, Thailand. *J Infect Dis Antimicrob Agents*, **21**, 1-5.
- Stefani, S., Giovanelli, I., Anacarso, I., Condò, C., Messi, P., Niederhäusern, de S., Stelling, J., Travers, K., Jones, R., Turner, P., O'Brien, T.F., and Levy, S.B.** (2005): Integrating *Escherichia coli* antimicrobial susceptibility data from multiple surveillance programs. *Emer. Infect Dis*, **11**, 873-882.
- Storberg, V.** (2014): ESBL-producing Enterobacteriaceae in Africa - a non-systematic literature review of research published 2008-2012. *Infect Ecol Epidemiol*, **4**, 20342, <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v4.20342>.
- Stuart, J.C., van den Munckhof, T., Voets, G., Scharringa, J., Fluit, A. ve Leverstein-Van Hall, M.** (2012): Comparison of ESBL contamination in organic and conventional retail chicken meat. *International Journal of Food Microbiology*, **154**, 212-214.

- Su, Y., Yu, C.Y., Tsai, Y., Wang, S.H., Lee, C. ve Chu, C.** (2014): Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, doi:10.1016/j.jmii.2014.10.003.
- Sudarwanto, M., Akineden, O., Odenthal, S., Gross, M. ve Usleber, E.** (2015): Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)–Producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulk Tank Milk from Dairy Farms in Indonesia. *Foodborne Pathog Dis*, 12, 7, 585-590.
- Sun, S., Berg, O.G., Roth, J.R. ve Andersson, D.I.** (2009): Contribution of Gene Amplification to Evolution of Increased Antibiotic Resistance in *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, 182, 1183–1195.
- Şadan, G.** (2003): Beta-Laktam Antibiyotikler. *Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*, 1, 2, 194-202.
- Taham, J.** (2012): Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Epidemiology, Risk Factors, and Duration of Carriage. Department of Clinical Sciences, Malmö Infectious Disease Research Unit Lund University, ISBN 978-91- 87189-28-9, Lund Sweden.
- Taneja, N. ve Sharma, M.** (2008): ESBL detection in clinical microbiology: why & how? *Indian J Med Res*, 127, 297-300.
- Taşlı, H. ve Bahar, İ.H.** (2010): Enterobacteriaceae Klinik İzolatlarında SHV-2, SHV-5, SHV-12 VE CTX-M-3 Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Saptanması. *Türkiye Klinikleri J Med Sci*, 30, 5, 1701-1706.
- Tängdén, T., Cars, O., Melhus, Å., Löwdin, E.** (2010): Foreign Travel Is a Major Risk Factor for Colonization with *Escherichia coli* Producing CTX-M-Type Extended- Spectrum β -Lactamases: a Prospective Study with Swedish Volunteers. *Antimicrob Agents Chemother*, 54, 9, 3564–3568.
- Tärnberg, M.** (2012): Extended-spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae*: aspects on detection, epidemiology and multi-drug resistance, Linköping University medical dissertations, No. 1300, ISBN 978-91-7519-938-2, Sweden.
- Tenover, F.C.** (2006): Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119, 6A, 3–10.
- Terzi, G., Gücükoğlu, A., Çadırcı, Ö., Uyanık, T. ve Alisharlı, M.** Tüketime Hazır Gıdalarda *L.monocytogenes*'in Varlığı, Serotip Dağılımı ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi, 5. *Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi*, AntalyaTürkiye, (2013) pp:63.
- Thenmozhi, S., Moorthy, K., Sureshkumar, B.T., Suresh, M.** (2014): Antibiotic Resistance Mechanism of ESBL Producing *Enterobacteriaceae* in Clinical Field: A Review. *Int J Pure App Biosci*, 2 (3), 207-226.
- Thomas, C.M. ve Nielsen, K.M.** (2005): Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 711-721.
- Tomlin, P., Sand, C. ve Rennie, R.P.** (2001): Evaluation of E test, disk diffusion and broth microdilution to establish tentative quality control limits and review susceptibility breakpoints for two aerobic actinomycetes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 40, 4, 179-186.

- Torlak, E.** (2011): Gıda mikrobiyolojisinde Enterobacteriaceae üyeleri için kromojenik ve florojenik besiyerleri. *Turk Hij Den Biyol Derg.*, **68**, 49 – 58.
- Torrence, M. E. ve Isaacson, R. E.** (2003): Microbial food safety in animal agriculture: Current topics. Ames, Iowa: Iowa State Press.
- Tzouvelekis, L.S., Tzelepi, E., Tassions, PT. ve Legakis, NJ.** (2000): CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Ag.*, **14**, 137–142.
- Tükenmez-Tigen, E. ve Mülazımoğlu, L.** (2012): Extended-Spectrum β -Lactamases and Their Clinical Importance in Community-Acquired Infections. *Klimik Dergisi*, **25**, 3, 94-98.
- Ulusoy, S.** (2004): Antibakteriyel Ajanlar. *Türkiye Klinikleri J Urology*, **1**, 2, 187-196.
- Üstek, D., Abacı, N., Sırma, S. ve Çakiris, A.** (2011):Yeni Nesil DNA Dizileme. Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Dergisi, 1, 1, 11-18.
- Valentin, L., Sharp, H., Hille, K., Seibt, U., Fischer, J., Pfeifer, Y., Michael, G.B., Nickel, S., Schmiedel, J., Falgenhauer, L., Friese, A., Bauerfeind, R., Roesler, U., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Helmuth, R., Valenza, G., Werner, G., Schwarz, S., Guerra, B., Appel, B., Kreienbrock, L. ve Käsbohrer, A.** (2014): Subgrouping of ESBL-producing *Escherichia coli* from animal and human sources: an approach to quantify the distribution of ESBL types between different reservoirs. *Int J Med Microbiol.*, **304**, 805-816.
- van Hoek, A.H.A.M., Mevius, D., Guerra, B. Mullany, P., Roberts, A.P. ve Aarts, H.J.M.** (2011): Acquired Antibiotic Resistance Genes: An Overview. *Front Microbiol*, **2**, Article ARTN 203. 10.3389/fmicb.2011.00203.
- Vankerckhoven, V., Huys, G., Vancanneyt, M., Vael, C., Klare, I., Romon, M.B., Entenza, J.M., Moreillon, P., Wind, R.D., Knol, J., Wiertz, E., Pot, B., Vaughan, E.E., Kahlmeter, G. ve Goossen, H.** (2008): Biosafety assessment of probiotics used for human consumption: recommendations from the EU-PROSAFE Project. *Trends in Food Science & Technology*, **19**, 102–114.
- Veenemans, J., Overdeest, I.T., Snelders, E., Willemsen, I., Hendriks, Y., Adesokan, A., Doran, G., Brusio, S., Rolfe, A., Pettersson, A. Ve Kluytmans, J.A.J.W.** (2014): Next-Generation Sequencing for Typing and Detection of Resistance Genes: Performance of a New Commercial Method during an Outbreak of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol*, **52**, 7, 2454– 2460.
- Verraes, C., van Boxtael, S., van Meervenne, E., van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, MA., van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J. ve Herman, L.** (2013): Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 2643-2669.
- Waldeisen, J.R., Wang, T., Mitra, D., ve Lee, L.P.** (2011): A real-time PCR antibiogram for drug-resistant sepsis. *PLoS One*, **6**, e28528.
- Walsh, C., Duffy, G., Nally, P., O'Mahony, R., McDowell, DA. ve Fanning, S.** (2008): Transfer of ampicillin resistance from *Salmonella Typhimurium*

- DT104 to Escherichia coli K12 in food. *Letters in Applied Microbiology*, **46**, 210–215.
- Walsh, F. ve Duffy, B.** (2013): The Culturable Soil Antibiotic Resistome: A Community of Multi-Drug Resistant Bacteria. *PLoS One*, **8**, 6, e65567.
- Wang, H.H., Manuzon, M., Lehman, M., Wan, K., Luo, H., Wittum, T.E., Yousef, A. ve Bakaletz, L.O.** (2006): Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **254**, 226–231.
- Wang, P., Hu, F., Xiong, Z., Ye, X., Zhu, D., Wang, Y.F. ve Wang, M.** (2011): Susceptibility of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae according to the new CLSI breakpoints. *J Clin Microbiol*, **49**, 9, 3127-3131.
- Wang, Q., Lin, H.R., Zhang, S.T. ve Yu, X.** (2012). Real-time PCR detection and quantification of emerging waterborne pathogens (EWPs) and antibiotic resistance genes (ARGs) in the downstream area of Jiulong River. *Huan Jing Ke Xue*, **33**, 2685- 2690.
- Webber, M.A. ve Piddock, L.J.V.** (2003):The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother*, **51**, 1, 9-11.
- WHO.** (2013): Integrated surveillance of antimicrobial resistance: guidance from a WHO Advisory Group. ISBN 978 92 4 150631 1, Switzerland.
- WHO.** (2014): Antimicrobial resistance: Global report on surveillance. ISBN 978 92 4 156474 8, France.
- Willemsen, I., Overdevest, I., Al Naiemi, N., Rijnsburger, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., Kluytmans, J. Ve TRIANGLE Study Group.** (2011): New diagnostic microarray (Check-KPC ESBL) for detection and identification of extended-spectrum beta-lactamases in highly resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, **49**, 8, 2985-2987.
- Woerther, P.L., Burdet, C., Chachaty, E. ve Andremont, A.** (2013): Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum β -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. *Clinical Microbiology Reviews*, **26**, 4, 744 –758.
- Woodford, N., Fagan, E.J. ve Ellington, M.J.** (2006): Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum b-lactamases. *J Antimicrob Chemother.*, **57**, 154-155.
- Yalçıntepe Güneştutar, L. ve Cantürk Rodop, M.** (2009): .New Approaches in Electrophoresis. *Journal of Engineering and Natural Sciences*, **Sigma 27**, 151-160.
- Yamaguchi, T., Miura, Y. ve Matsumoto, T.** (2013): Antimicrobial susceptibility of Enterococcus strains used in clinical practice as probiotics. *Journal of Infection and Chemotherapy*, **19**, 1109–1115.
- Yibar, A. ve Soyutemiz, E.** (2013): Gıda Değeri Olan Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı ve Muhtemel Kalıntı Riski. *Atatürk Üniversitesi Vet. Bil. Derg.*, **8**, 97-104.
- Yıldırım, Y.** (2010): Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri; İlgili Metodlar, Sonuçların Yorumlanması ve Kanatlılarda Bulunan Bazı Bakterilerdeki Dirençlilik. *J Fac Vet Med Univ Erciyes*, **7**, 117-129.
- Yumuk, Z., Afacan, G., Nicolas-Chanoine, M.H., Sotto, A. ve Lavigne, J.P.** (2008): Turkey: a further country concerned by community-acquired

- Escherichia coli clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother*, **62**, 2, 284-288.
- Yüce, A. (2001):** Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, **14**, 2, 41-46.
- Zaniani, F.R., Meshkat, Z., Nasab, M.N., Khaje-Karamadini, M., Ghazvini, K., Rezaee, A., Esmaily, H., Nabavinia, M.S. ve Hoseini, M.D. (2012)** The Prevalence of TEM and SHV Genes among Extended-Spectrum BetaLactamases Producing Escherichia Coli and Klebsiella Pneumoniae. *Iran J Basic Med Sci*, **15**, 1, 654-660.
- Zankari, E., Hasman, H., Cosentino, S., Vestergaard, M., Rasmussen, S., Lund, O., Aarestrup, F.M. ve Larsen, M.V. (2012):** Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother*, **67**, 2640–2644..
- Zarfel, G., Galler, H., Luxner, J., Petternel, C., Reinthaler, F.F., Haas, D., Kittinger, C., Grisold, A.J., Pless, P., ve Feierl, G. (2014):** Multiresistant Bacteria Isolated from Chicken Meat in Austria. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **11**, 12582-12593.
- Zhang, J., Zheng, B., Zhao, L., Wei, Z., Ji, J., Li, L. ve Xiao, Y. (2014):** Nationwide high prevalence of CTX-M and an increase of CTX-M-55 in Escherichia coli isolated from patients with community-onset infections in Chinese county hospitals. *BMC Infect Dis*, **14**, 659, doi: 10.1186/s12879-014-0659-0.
- Zheng, H., Zeng, Z., Chen, S., Liu, Y., Yao, Q., Deng, Y., Chen, X., Lv, L., Zhuo, C., Chen, Z. Ve Liu, J.H. (2012):** Prevalence and characterisation of CTX-M β -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. *Int J Antimicrob Agents*

ÖZGEÇMİŞ

Adı-Soyadı : İsmail Hakkı TEKİNER
Doğum Tarihi ve Yeri : 03 Kasım 1969; Kırıkkale
E-posta : ihakkitekiner@aydin.edu.tr



ÖĞRENİM DURUMU:

- **Doktora:** 2011-2016, İstanbul Aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, 34295-İstanbul-TÜRKİYE.
- **Lisans:** 1987-1994, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06520-Ankara-TÜRKİYE.

İsmail Hakkı TEKİNER lisans derecesini ODTÜ Kimya Mühendisliği Anabilim Dalından 1994 yılında aldı. Türk ve çok uluslu şirketlerde sırasıyla kalite kontrol, üretim, süreç iyileştirme, proje mühendisliği gibi farklı pozisyonlarda çalıştı. 2010 yılında İstanbul Aydın Üniversitesi'ne Projeler Uzmanı olarak katıldı. İsmail Hakkı TEKİNER' in SCI indeksli 6 araştırma makalesi, Ulusal ve Uluslararası hakemli dergilerde 6 makale ve 17 bildirisi, Uluslararası 4 dergide bilim kurulu üyelikleri vardır. H-indeksi 2016 Mart ayı itibariyle 3 olup, makalelerine aldığı toplam atıf sayısı 9'dur. İyi seviyede İngilizce bilen İsmail Hakkı TEKİNER, evli ve iki çocuk sahibidir.

TEZDEN TÜRETİLEN SCI-MAKALE / BİLDİRİLER:

- **Tekiner İH**, Özpınar H. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. *Braz J Microbiol*, (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.034>.

- Özpınar H, **Tekiner İH**. Emerging Extended-Spectrum beta-Lactamases (ESBLs) in Foodborne Enterobacteriaceae from Turkey. *Innovations in Food Packaging, Shelf Life and Food Safety Congress*. 15-147 September 2015, Munich, Germany.
- Özpınar H, **Tekiner İH**, Özpınar A. Status of Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) Producing Enterobacteriaceae in Certain Foods from İstanbul-Turkey. *Proteomics: Back to The Future-9th Annual Congress of European Proteomics Association-EuPA*. 23-28 of June 2015 Milano, Italy.
- Özpınar H, **Tekiner İH**. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in raw milks and raw milk cheeses: Considerations in diagnosis and genotypic characterization. *II. Uluslararası Tarım Gıda ve Gastronomi Kongresi*, 8-12 Nisan 2015, Belek-Antalya, Türkiye.

SCI MAKALELER:

- **Tekiner İH**, Özpınar H. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. *Accepted by Braz J Microbiol*, (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2015.11.034>.
- Özpınar H, **Tekiner İH**, Karaman O, Kurt Y. Investigation of Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis (MAP) in Fecal and Bulk Milk Samples from Dairy Farms in European Thrace Region of Turkey. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 21(2): 247-252, (2015).
- Özpınar H, Turan B, **Tekiner İH**, Tezmen G, Gökçe İ, Akmeden Ö. Evaluation of Pathogenic Escherichia coli Occurrence in Vegetable Samples from District Bazaars of İstanbul Using Real Time PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 57(4): 362-367, (2013).
- Özpınar H, Tezmen G, Gökçe İ, **Tekiner İH**. Detection of Animal Species in Some Meat and Meat Products by Comparatively Using DNA Microarray and Real Time PCR Methods. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 19(2): 245-252, (2013).
- Özpınar H, Aydın İH, Klasing KC, **Tekiner İH**. Interaction of Mannan oligosaccharide with Immune System “Transport of MOS in to the Lamina Propria”. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 18(1): 121-128, (2012).

- Özpınar H and **Tekiner İH**. The Keynotes for Doctoral Education in Food Engineering To Health Sciences. *Turkish Journal of Biochemistry*, 36(1):87-89, (2011).

