

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KIRMIZI ET ÖRNEKLERİNDEN GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA
LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN *Enterobacteriaceae* İZOLATLARINDA
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nilüfer ÖNDEŞ

Gıda Güvenliği ve Beslenme Ana Bilim Dalı

Gıda Güvenliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

TEMMUZ 2015

T.C.

İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**KIRMIZI ET ÖRNEKLERİNDEN GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA
LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN *Enterobacteriaceae* İZOLATLARINDA
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Nilüfer ÖNDEŞ

Y1313.210014

Gıda Güvenliği ve Beslenme Ana Bilim Dalı

Gıda Güvenliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

TEMMUZ 2015



T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Yüksek Lisans Tez Onay Belgesi

Enstitümüz Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı Gıda Güvenliği Tezli Yüksek Lisans Programı **Y1313.210014** numaralı öğrencisi **Nilüfer ÖNDEŞ**'in "**KIRMIZI ET ÖRNEKLERİNDEN GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN ENTEROBACTERIACEAE İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ**" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 10.06.2015 tarih ve 2015/12 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından **ayb.ile** Tezli Yüksek Lisans tezi olarak **kabul** edilmiştir.

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi :09/07/2015

1)Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

2) Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. İrem KORKMAZ

3) Jüri Üyesi : Prof. Dr. Güner ARKUN

Not: Öğrencinin Tez savunmasında **Başarılı** olması halinde bu form **imzalanacaktır**. Aksi halde geçersizdir.

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Kırmızı Et Örneklerinden Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) Üreten *Enterobacteriaceae* İzolatlarında Antibiyotik Dirençlilik Durumlarının İncelenmesi” 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. 09/07/2015

(İmza)

Nilüfer ÖNDEŞ

Kardeşim Caner Can' ına Sevgilerimle...

ÖNSÖZ

Yüksek lisans öğrenim sürecinde, tez konumun belirlenmesi, çalışmamın yürütülmesi ve tamamlanmasında çok değerli bilgi, deneyim ve yönlendirmelerinden yararlandığım teşvikleriyle beni destekleyen tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR' a;

Bilgi ve deneyimlerinden yararlanma olanağı bulduğum, tezimin şekillenmesi ve tamamlanmasında bizzat yönlendirmelerini ve desteklerini aldığım jüri üyeleri Sayın Prof. Dr. Güner ARKUN ve Sayın Yrd. Doç. Dr. İrem OMURTAG KORKMAZ' a;

Tez çalışmamda, laboratuvar süreci ve tez yazımında yardımlarını esirgemeyen, yönlendirmeleriyle bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Sayın İsmail Hakkı TEKİNER' e;

Öğrenim hayatım boyunca, desteklerinin bir an olsun eksikliğini hissettirmeyen, her zaman yaptığım, hedeflediğim çalışmalarında güvenlerini aldığım aileme, özellikle bana bizzat destek verip yönlendirerek yüksek lisans öğrenimime başlamamı ve bitirmemi sağlayan anneme, teknolojik konularda bilgi ve yardımını aldığım okuma azmim kardeşim Caner Can' ına;

Bir arada çalıştığım, laboratuvarında yardımlarını esirgemeyen ve manevi destekleriyle yanımda olan bütün arkadaşlarıma en içten teşekkürlerimi sunarım.

9 Temmuz 2015

Nilüfer ÖNDEŞ
Gıda Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖNSÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	viii
ÇİZELGE LİSTESİ	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i>	3
2.1.1. <i>Enterobacteriaceae</i> ailesinin genel özellikleri ve morfolojileri.....	3
2.1.2. <i>Enterobacteriaceae</i> önemli türleri.....	3
2.1.2.1. <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	3
2.1.2.2. <i>Klebsiella</i> spp.	4
2.1.2.3. <i>Citrobacter</i> spp.	5
2.1.2.4. <i>Enterobacter</i> spp.	5
2.1.2.5. <i>Serratia</i> spp.	6
2.1.2.6. <i>Kluyvera intermedia</i>	6
2.1.2.7. <i>Moellerella wisconsensis</i>	6
2.2. Beta Laktam Antibiyotikler.....	7
2.2.1. Penisilinler.....	8
2.2.2. Monobaktamlar.....	9
2.2.3. Karbapenemler	9
2.2.4. Sefalosporinler.....	9
2.3. Bakterilerin Antibiyotik Direnci.....	10
2.3.1. Antibiyotik direncinin taşınma yolları.....	11
2.3.2. Hayvanlarda antibiyotik direnci oluşumu ve hayvandan insana geçişi.....	11
2.3.3. Mikroorganizmaların antimikrobiklere karşı direnç mekanizmaları.....	13
2.4. Beta Laktamazların Sınıflandırılması.....	16
2.5. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL).....	20
2.5.1. GSBL tipleri.....	20
2.5.1.1. SHV grubu GSBL	21
2.5.1.2. TEM grubu GSBL.....	21
2.5.1.3. CTX-M grubu GSBL	21
2.5.1.4. OXA grubu GSBL	22
2.5.1.5. PER grubu GSBL.....	22
2.5.1.6. VEB grubu GSBL.....	22
2.5.1.7. GES grubu GSBL.....	23
2.5.1.8. Diğer gruplandırılmayan GSBLler.....	23

2.5.2. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazların klinik önemi.....	23
2.6. GSBL Tanı Yöntemleri.....	24
2.6.1. Disk taraması.....	26
2.6.2. Disk tarama konfirmasyonu.....	26
2.6.3. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi.....	27
2.6.4. Otomatize sistemler.....	27
2.6.4.1. VITEK [®] MS (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) cihazı.....	27
2.7. Hayvansal Gıda Kaynağı Kırmızı Et.....	28
2.7.1. Dünya et üretim ve tüketiminde gelişmeler.....	29
2.7.2. Türkiye et üretim ve tüketiminde gelişmeler.....	31
2.8. Dünya' da Yapılan Çalışmalar	32
2.9. Türkiye' de Yapılan Çalışmalar.....	35
3. MATERYAL VE YÖNTEMLER.....	37
3.1. Materyal.....	37
3.1.1. Kullanılan laboratuvar gereçleri ve cihazlar.....	37
3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve içerikleri.....	38
3.1.2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Enrichment buyyon (EE buyyon).....	38
3.1.2.2. Chromatic [™] GSBL agar.....	39
3.1.2.3. Mueller Hinton agar (MHA).....	40
3.1.2.4. Mueller Hinton buyyon (MHB).....	41
3.1.2.5. Triptik Soy agar (TSA).....	41
3.2. Yöntemler.....	42
3.2.1. Numunelerin analize hazırlanması.....	42
3.2.2. Ön zenginleştirme işlemi.....	43
3.2.3. Selektif besiyerine geçişi.....	44
3.2.4. Disk difüzyonu testi.....	46
3.2.5. Disk difüzyonu konfirmasyonu testi	47
3.2.6. VITEK [®] MS ile identifikasyon.....	48
3.2.7. Antibiyogram doğrulama ve MİK tayini.....	48
4. BULGULAR.....	51
4.1. Oksidaz Testi Bulguları.....	51
4.2. GSBL Tarama Bulguları.....	51
4.3. VITEK [®] MS ile Tiplendirme Bulguları.....	52
4.4. Antibiyogram Doğrulama ve MİK Tayini Bulguları.....	53
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	59
KAYNAKLAR.....	65
ÖZGEÇMİŞ.....	75

KISALTMALAR

pH, g, L	Asitlik değeri, gram, litre
μ, μl, μg	Mikro, mikrolitre, mikrogram
ml, mm, nm	Mililitre, milimetre, nanometre
- , +	Negatif, pozitif
$^{\circ}$C, dk, s, sn	Derece Celsius, dakika, saat, saniye
bkz.	Bakınız Lütfen
vb.	Ve Benzeri
CLSI	Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
FAO	Gıda ve Tarım Örgütü
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
CAZ	Seftazidim
CAZ CV	Seftazidim Klavulanik Asitli
CPD	Sefpodoksim
CPD CV	Sefpodoksim Klavulanik Asitli
CTX	Sefotaksim
CTX CV	Sefotaksim Klavulanik Asitli
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
EE	<i>Enterobacteriaceae</i> Enrichment
MHA	Mueller Hinton Agar
MİK	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu
TSA	Triptik Soy Agar
PBP	Penisilin Bağlayıcı Proteinler
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
OIE	Uluslararası Dünya Bulaşıcı Hayvan Hastalıkları Örgütü
FDA	Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
CEESA	Brüksel Hayvan Sağlık Merkezi Çalışma Programı

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa No
Çizelge 2.1. Hayvanlarda anabolik hormon amaçlı kullanılan çeşitli antibiyotiklerin yasaklanması	12
Çizelge 2.2. Mikroorganizmalarda antibiyotik direnç mekanizmaları.....	16
Çizelge 2.3. Beta laktamazların sınıflandırılması.....	19
Çizelge 2.4. CTX-M beta laktamazlarının küresel dağılımları.....	21
Çizelge 2.5. <i>Enterobacteriaceae</i> için belirlenen standart zon çapları ve MİK değerleri.....	25
Çizelge 2.6. GSBL tarama testi inhibisyon zon çapları ve MİK değerleri	25
Çizelge 2.7. Dünya’ da et üretim miktarları.....	30
Çizelge 2.8. Türkiye’ de kırmızı et üretimi (ton).....	31
Çizelge 3.1. Toz EE buyyon içeriği.....	39
Çizelge 3.2. Toz GSBL agarın içeriği.....	40
Çizelge 3.3. Toz MHA içeriği.....	40
Çizelge 3.4. Mueller Hinton buyyon içeriği.....	41
Çizelge 3.5. Triptik Soy agar içeriği.....	42
Çizelge 3.6. Kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları.....	48
Çizelge 4.1. İzole edilen dirençli <i>Enterobacteriaceae</i> türleri ve GSBL dağılımları..	53
Çizelge 4.2. GSBL (+) numunelerin antibiyotik disk konfirmasyon zonları (mm), antibiyogram doğrulama ve MİK (µg/ml) sonuçları.....	55
Çizelge 4.3. Dana ve koyun eti GSBL verileri ve <i>Enterobacteriaceae</i> türlerinde yüzdesel dağılımlar.....	56

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 2.1. GSBL üreten <i>K. pneumoniae</i> organizmasının gölge tekniği ile elektron mikroskopundan görünüşü.....	5
Şekil 2.2. Bakteri ile çevre arasındaki antibiyotik direnci taşınma yolları.....	11
Şekil 2.3. Antibiyotik direnci taşıyan değişken genli plazmid.....	15
Şekil 2.4. Bakteriyel konjugasyon ile gen aktarımı.....	15
Şekil 2.5. Ülkelerin et üretim durumu bin ton bazında.....	30
Şekil 2.6. Ülkelere göre yıllık kırmızı et tüketimi (kg/kişi)	30
Şekil 3.1. Su banyosundan sonra kullanıma hazır <i>Enterobacteriaceae</i> Enrichment buyyonunun görünüşü.....	39
Şekil 3.2. Tartım işlemi ve stomacher cihazı.....	43
Şekil 3.3. Stomacher cihazında filtreli torba içerisinde süspanse edilmiş kırmızı et numunelerinin inkübasyona hazır hali	43
Şekil 3.4. Ön zenginleştirilmesi yapılmış kırmızı et numunelerinin görünümü.....	45
Şekil 3.5. Chromatic™ GSBL agarda üreyen pembe, mavi, beyaz kolonilerin alt kültür geçilmesi işlemi.....	45
Şekil 3.6. Alt kültür geçilen pembe, mavi, beyaz kolonilerin oluşumu ve oksidatif negatif testi.....	45
Şekil 3.7. Kullanılan antibiyotik diskler	47
Şekil 3.8. TSA' da oluşan koloniler ve VITEK®MS kartuş kuyucuklarına sürülmesi.....	49
Şekil 3.9. VITEK®MS cihazı ve kuyucuklarda ki bakterinin tiplendirilmesi.....	49
Şekil 3.10. Platelere inokülasyon ve inkübasyon sonrası spektrofotometrede okutulması.....	50
Şekil 4.1. VITEK®MS ile kolonilerin tiplendirilmesi ve dağılımları.....	52
Şekil 4.2. Kırmızı et numunelerinde disk difüzyonu konfirmasyonu ve MİK testi sonuçlarının grafiksel gösterimi.....	54
Şekil 4.3. Kırmızı etlerde GSBL üreten <i>Enterobacteriaceae</i> genel dağılımı.....	56
Şekil 4.4. GSBL üreten <i>Enterobacteriaceae</i> suşlarının kırmızı et türlerinde dağılımları.....	57
Şekil 4.5. Aynı numuneden izole GSBL üreten <i>Enterobacteriaceae</i> suşları.....	58

KIRMIZI ET ÖRNEKLERİNDEN GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN *Enterobacteriaceae* İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ

ÖZET

Enterobacteriaceae Gram (-) bakterilerde Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazların (GSBL) görülme sıklığı tüm Dünya’ da hızlı bir şekilde artış göstermektedir. Antibiyotiklerin aşırı ve bilinçsiz kullanımı bu durumun karmaşıklaşarak artmasına yol açmaktadır. Gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda ve bu hayvanlardan elde edilen ürünlerde GSBL üreten enterik bakterilerin varlıklarına daha sık şekilde rastlanmaktadır. Genetik materyaller sayesinde hızla yayılan türdeş ya da farklı tip bakterilere transfer edilebilen beta laktamazların başlıca bulaşma kaynakları arasında fekal bulaşma ve yeterince pişirilmeden tüketilen kırmızı etler ve et ürünleri gelmektedir. Bu çalışmada, İstanbul ili ve Marmara Bölgesi’ nde yerleşik diğer illerden toplanan (Bursa, Tekirdağ, Yalova) toplam 110 adet çiğ kırmızı et numunelerinde (65 dana ve 45 koyun) GSBL üreten enterobakterilerin fenotipik yöntemler kullanılarak tespiti amaçlanmıştır. Kırmızı et numune materyalleri *Enterobacteriaceae* buyyonda ön zenginleştirme işlemine alınarak 37°C’ de inkübasyona alınmıştır. Bu işlemi takiben kromatik GSBL selektif medya kullanarak tekrar gece aşırı inkübasyona bırakılarak selektif zenginleştirme aşamasına geçilmiştir. Selektif besiyerinde gelişen şüpheli GSBL izolatlar altkültür edilerek saflaştırılmışlar ve VITEK®MS (bioMérieux) cihazında tiplendirmeleri yapılmıştır. Tiplendirmesi yapılan şüpheli GSBL izolatlar GSBL varlıkları bakımından sırasıyla disk difüzyonu, disk difüzyonu konfirmasyonu ve GSBL doğrulama için antibiyogram doğrulama ve MİK tespiti analizlerine alınmıştır. Sonuçlar tüm numune materyallerde %20,9 (n=23) GSBL prevelansı tespit edilirken, izole edilen başlıca mikroorganizmalar *E. coli* (%30), *C. braakii* (%22), *E. cloacae* (%17), *K. pneumoniae* (%9), *C. freundii* (%9), *S. fonticola* (%4), *K. intermedia* (%4) ve *Moellerella wisconsensis* (%4) olarak belirlenmiştir. Bu çalışmada, insan beslenmesinde çok önemli olan kırmızı etin GSBL üreten enterik bakterilerle bulaşmış olduğu ve bu durumun halk sağlığı bakımından önemli bir risk teşkil ettiği görülmüştür.

Anahtar kelimeler: Antibiyotik Direnci, *Enterobacteriaceae*, Et, GSBL, Halk Sağlığı.

**INVESTIGATION OF ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILES IN
EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE PRODUCING
Enterobacteriaceae FROM RED MEAT SAMPLES**

ABSTRACT

The prevalence of extended spectrum beta lactamases (ESBLs) in the family of Gram (-) *Enterobacteriaceae* has been emerging all over the World. The off-label use of them causes severe un-anticipated adverse effects including development of resistance in the bacteria. Hence, the presence of ESBL producing enterobacteria within the food producing animals are increasingly detected at the present time. The genetic elements responsible for encoding these beta-lactamases are the major contributors for the dissemination of ESBLs among the same and/or different bacterial species through feces and the consumption of insufficiently cooked meats and meat-products. The objective of this study was to determine the presence of ESBL producing *Enterobacteriaceae* isolated from a total of 110 raw meat samples (65 cow and 45 sheep) in Istanbul and different districts (Bursa, Tekirdag, Yalova) of the region of Marmara using phenotypic methods. All the samples were homogenized in *Enterobacteriaceae* enrichment broth, followed by an incubation at 37°C overnight. The pre-enriched samples were subjected to selective enrichment in Chromagar ESBL selective media with an incubation at 37°C for 18-24 hours. The presumptive isolates were subcultured at tryptone soy agar, and identified by VITEK[®] MS (bioMérieux). The identified presumptive isolates were screened for the existence of ESBLs using a combination of CTX, CAZ and CPD antibiotic discs with/without CLA according to the guidelines of CLSI (2013). The final confirmation was performed by liquid microdilution method based on MIC determination. The results showed that overall, 20,9% (n=23) of the screened isolates were positive for ESBL. The distribution of the species were found to be *E. coli* (30%), *C. braakii* (22%), *E. cloacae* (17%), *K. pneumoniae* (9%), *C. freundii* (9%), *S. fonticola* (4%), *K. intermedia* (4%) and *Moellerella wisconsensis* (4%), respectively. In summary, the meats, essentially required for the human nutrition, were significantly contaminated with ESBL producing *Enterobacteriaceae*, and therefore presented a risk for the public health.

Keywords: Antibiotic Resistant, *Enterobacteriaceae*, Meat, ESBL, Public Health.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Antibiyotikler; yıllar öncesinden insanlarda, enfeksiyon kaynaklı hastalıklara neden olan bakterilerin yok edilmesi için kullanılan ilaçlardır. İnsanların yaşam koşullarının kötüleşmesiyle hastalıklara karşı oluşturduğu doğal direnç azalmış beraberinde antibiyotik kullanımı sürekli artmıştır. Antibiyotik kullanımıyla, enfeksiyon kaynaklı ölümlerin azaldığı görülmüş, beraberinde tüm enfeksiyonel hastalıklarda kullanılan olağan bir ilaç haline gelmiştir. Antibiyotiklerin gün geçtikçe yoğun bir şekilde kullanılması, antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Çeşitli mikroorganizmalara karşı antibiyotiklerin direnç kazanması nedeniyle hastalıkların tedavisinde sorunlar yaşanmaya başlanmıştır. Bu nedenle mikroorganizmalara karşı dirençli yeni antibiyotikler geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir (Ammor ve ark., 2007).

Antibiyotiklerin son on yılda yanlış kullanımı sebebiyle hastane vakaları artmış, yoğun bakım ünitelerinde ve bebeklerde enfeksiyona bağlı dirençli bakterilerin yol açtığı ölümlere neden olmuştur. Bu durumlar göz önüne alınarak antibiyotik kullanımı ve direnç faktörüne karşı, bilinçsiz antibiyotik alımının önüne geçilmeye çalışılmaktadır (Mathur ve Singh, 2005).

Bakterilerde antibiyotiğe karşı direnç oluşturan birçok mekanizmanın olduğu bilinmektedir. *Enterobacteriaceae* ailesinden olan Gram (-) bakteriler, beta laktam antibiyotiklere karşı oluşturduğu beta laktamaz enzimiyle inhibe edici rol oynamaktadır. Günümüze kadar 400' e varan beta laktamaz enzimi tespit edilmiştir. Bunların 200' e yakını Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) olup dirençli genler plazmidler aracılığı ile bakteriler arası transfer edilebilmektedirler. Tüm dünyada beta laktam ve genişlemiş spektrumlu sefalosporin antibiyotiklerin kullanımı yaygındır. Beraberinde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) bakterilerden *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* başta olmak üzere *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Morganella*, *Kluyvera*, *Enterobacter* türlerinin yaygınlaşmasını kolaylaştırmışlardır (Çelebi ve ark., 2009; Yetkin ve ark., 2006; Güler ve ark., 2008).

Antibiyotiklerin kullanımı günümüzde sadece insanlar için değil çiftlik ve besi hayvanlarında hastalıklara karşı patojenik bakterilerle savaşmada kullanılıp gelişimi hızla arttırmak amacıyla da üreticiler tarafından yaygın olarak tercih edilmektedirler (Gyles, 2008; Hendriksen ve ark., 2008). Ayrıca hayvansal gıdaların üretiminde anabolik madde olarak da antibiyotikler kullanılmaktadır. Bu şekilde antibiyotiğin bilinçsizce kullanımı, beraberinde hayvan ve insanların doğal mikroflorasını bozarak bağışıklık sistemini çökerten bir problem haline gelmektedir. Yararlı mikroorganizmaların antibiyotik kullanılarak yok edilmesiyle ortam, patojen mikroorganizmalara bırakılarak antibiyotiklere karşı direncin hızla oluşturulması sağlanmaktadır (Ammor ve ark., 2007). Antibiyotiğe karşı dirençli bakteriler hayvanların dışkılarıyla doğrudan temasla veya bu hayvanlardan üretilen etlerden, insanlara geçtiği bilinmektedir ve insanlarda kullanılan antibiyotiğin etkisinin azaldığı görülmektedir. Bu durum antibiyotiklerin bilinçsiz ve anabolik amaçlı kullanılmasının neticesinde oluşmaktadır (Jensen ve ark., 1999; Harada ve Asai, 2010; Jong ve ark., 2011).

Antibiyotiklerin, çiftlik hayvanlarında büyüme ve gelişimi artırıcı olarak kullanılması Avrupa ülkelerinde ve Türkiye’ de yasaklanmıştır. Ancak prevelansın bu kadar yüksek olması, antibiyotiklerin kaçak olarak kullanıldığını düşündürmektedir. (Gyles, 2008; Hendriksen ve ark., 2008).

Kaçak kullanımları önlemek ve bakteri direncini izlemek üzere WHO, FAO, OIE gibi örgütler bu sorunların üzerinde çalışmaktadırlar. Avrupa’ da, çiftlik ve hayvansal gıdada dirençli bakterilerin izlenmesi 1998’ de kurulan; Hayvanlarda Antibiyotik Duyarlılığın İzlenmesi Örgütü (EASSA) programı ile gözlemlenmektedir. Brüksel’ de hayvan sağlığı üzerine çalışma merkezi olan (CEESA) tarafından bu program denetlenmektedir (Jong ve ark, 2011; Harada ve Asai, 2010). Türkiye’ de bu durumun önlenmesi için, hayvansal kaynaklı dirençli bakterilerin her zaman gözetimde tutulması gerekmektedir. Bunun için gerekli laboratuvarlar kurulmalı, izleme prosedürleri oluşturulmalı, dirençli bakteriler fenotipik ve genotipik olarak araştırılmalıdır (Ünal, 2012).

Bu çalışmada, İstanbul ili ve Marmara Bölgesi’ nden toplanan kırmızı et örneklerinde GSBL üreten enterik bakterilerin varlığının fenotipik yöntemlerle incelenmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacteriaceae*

2.1.1. *Enterobacteriaceae* ailesinin genel özellikleri ve morfolojileri

Bakteri suşları arasında bahsedilen en önemli aile *Enterobacteriaceae*' dir. İnsanlar ve hayvanlarda doğal bağırsak florasında bulunurlar. Tıp alanında enfeksiyonlarıyla en çok savaş verilen gruptur. Üriner sistem enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, sindirim sistemi enfeksiyonları, menenjit, pnömoni gibi birçok hastalığın başlıca kaynağıdır. *Enterobacteriaceae* suşları yapısal olarak Gram (-), fakültatif anaerob, şekeri fermente eden basillerdir. Katalaz üretilen çok nadir oksidaz, nitratı nitrite indirgeyen yapıdadırlar (Tham, 2012).

2.1.2. *Enterobacteriaceae* önemli türleri

2.1.2.1. *Escherichia coli* (*E. coli*)

İlk *E. coli* bakterisi 1885 yılında, süt çağı çocuklarının ishallerinde tespit edilmiştir. Daha sonra da bağırsak dışı enfeksiyonlarında *E. coli*' nin patojen rolü ortaya çıkartılmıştır. Bilim adamları Chalmer ve Castellani 1919' da tür adı olarak *Escherichia* ismi kullanılana kadar *Bacterium coli* ismini koymuştur (Unat, 1986; Töreci ve ark., 2002).

Gram (-), fakültatif anaerob, sporsuz bir bakteridir. Hemen hemen her alanda görülen *E. coli* gıda sektöründe de hijyen ve sanitasyon göstergesi olan bir indikatör bakteridir. İnsan bağırsak florasında doğal olarak 10^6 ile 10^9 kob/g arasında bulunabilmektedir. Özellikle memeli hayvanların bağırsak florasında bulunan bir bakteridir fakat başka ortamlardan ağız yoluyla vücut ortamına girişiyle hastalık etmeni olmaktadır (Tham, 2012). *Escherichia coli*, insan ve hayvanlarda, mide-bağırsak sisteminde fırsatçı patojen olarak bulunan en yaygın türdür fakat aynı zamanda tıbbi bakımdan önemli hastalıklara da neden olmaktadır (Friedman ve ark., 2002).

E. coli türlerinin bağırsaklarda oluşturdukları başlıca 4 farklı hastalık bulunmaktadır:

Enterotoksijenik *E. coli* ETEC, bağırsak yapısının içerisinde enterotoksin oluşturarak hafif seyreden hastalıktan ağır seyreden hastalığa kadar gidebilmektedir. Özellikle 2 yaş altındaki çocuklarda bakteriyel diyarenin öncelikli nedenidir (Bilgehan, 2000; Erdem, 1999).

Enteropatojenik *E. coli* EPEC, süt çağındaki çocuklarda ağır ishallere neden olmaktadır. Salgın yapma potansiyeli vardır. Patogenezi henüz anlaşılamamıştır (Bilgehan, 2000; Erdem, 1999).

Enterohemorajik *E. coli* EHEC, O157H7 *E. coli* suşları hastalık sebebidir. Gıda ve su ile bulaşarak ishal yaparlar. Çocukların ishalinde kan görülmesi, ileri aşamalarda anemi ve böbrek yetmezliğine neden olurlar (Bilgehan, 2000).

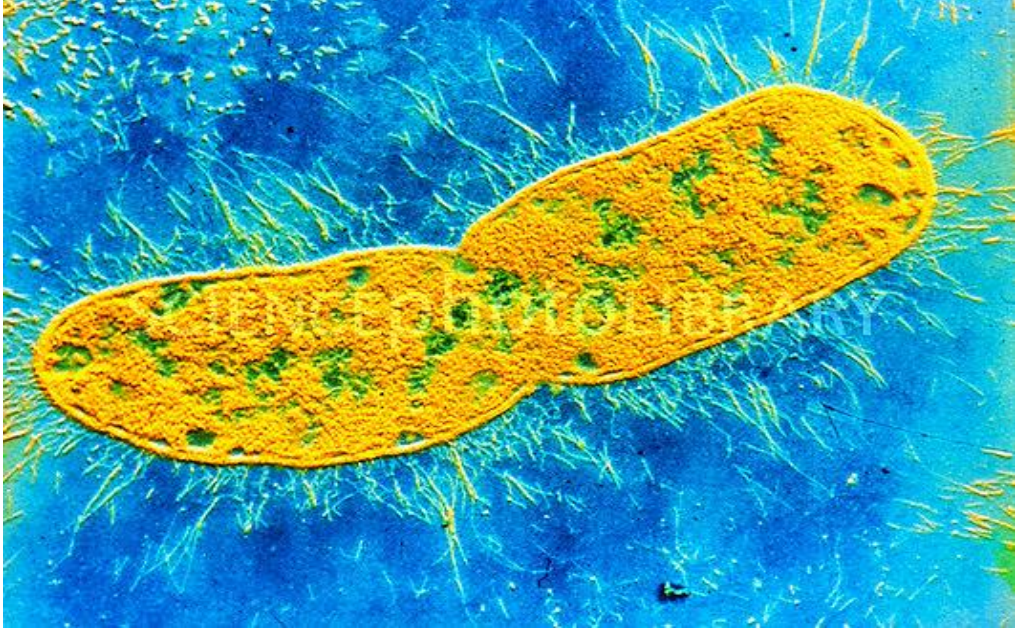
Enteroinvaziv *E. coli* EIEC, mukozada ülserli, salgılı lezyonlara neden olurlar (Bilgehan, 2000).

Bağırsak dışı hastalıklarında ise üriner sistem enfeksiyonlarının, hastane kaynaklı pnömonilerin, yeni doğan menenjitinin en önemli sebebi *E. coli*' dir (Bilgehan, 2000; Erdem, 1999).

2.1.2.2. *Klebsiella* spp.

Edwin Klebs, *Klebsiella* türünü keşfedip görüldüğü üzere kendi soyadını vermiş olan 19. yüzyıl sonunda yaşamış bir mikrobiyologtur. Spor oluşturmayan, kısa uçları yuvarlak, Gram (-), hareketsiz bir bakteridir. Fakültatif anaeropturlar. Optimal üreme ısısı 37°C' dir (Erdem, 1999). *Klebsiella pneumonia* (*K. pneumoniae*), *Klebsiella granulomatis* (*K. granulomatis*), *Klebsiella oxytoca* (*K. oxytoca*) ve bu cinsin en çok bilinen türlerindedir. *K. pneumonia* (Şekil 2.1) insan enfeksiyonlarından en çok rastlanıp izole edilen türdür ve yayılması endemikten fazla epidemiktir. İnsan dışısında *Klebsiella* spp. gastrointestinal sistemde 10⁴ kob/g olarak bulunur (Tham, 2012).

Klebsiella türleri çoğunlukla plazmid aracılı olup ürettiği karbapenemaz, KPC olarak bilinir ve diğer beta-laktam antibiyotiklerin dışında karbapenemleri de hidrolize eder (Nicasio ve ark., 2008; Nordmann ve ark., 2009).



Şekil 2.1. GSBL üreten *K. pneumoniae* organizmasının gölge tekniği ile elektron mikroskopundan görünüşü (CNRI, 2013).

2.1.2.3. *Citrobacter* spp.

Gram negatif bakteri cinsindedir. İdrar ve solunum sistemi hastalıklarının ana nedeni olan kommensallerdir (Gupta ve ark., 2003; Hodges ve ark., 1978).

Citrobacter spp. nin çok bilinmesinin diğer bir nedeni, bu cinse ait suşların kontamine olduğu gıdaların tüketiminde sağlıklı kişilerde gastrointestinal enfeksiyonlara neden olmasıdır. En sık gıda kontaminasyonu ile bağlantılı olan türler *C. freundii* ve *C. braakii* bakterileridir (Urbanov, 1997). Bu tür suşların, toksinler üreten ve toksinleri kodlayan genler içerdiği bilinmektedir (Guarino ve ark., 1989; Schmidt ve ark., 1997).

2.1.2.4. *Enterobacter* spp.

Enterobacter türleri, gram negatif, antimikrobiyal maddelere ve dezenfektanlara *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer türlerine göre daha dirençlidirler (Wade ve ark., 1991). Gıdada sık izole edilen önemli türleri *E. aerogenes*, *E. cloacae* ve *E. asburiae*' dir. Enterobakterilerin, antibiyotik kullanımının olmadığı dönemde adı pek duyulmaz iken, 1970' li yıllardan itibaren antibiyotik kullanımının başlangıcıyla enfeksiyonlarında görülmeye ve önem arz etmeye başlamıştır (Ahmet ve ark., 1995; Çağlayangil ve ark., 1991).

Beta laktam içerikli antibiyotiklere, indüklenebilen grup 1 kromozomal beta laktamaz enzimleriyle *Enterobacter* spp. türleri direnç geliştirmektedirler. Beta laktam antibiyotiğin kullanımıyla popülasyon etkilenebilmekte ancak deprese mutantlar seleksiyona uğrayarak çoğalmaktadır. Bu durum yeni dirençli genlerin oluşumuna ve yayılmasına neden olmaktadır (Livermore, 1995).

2.1.2.5. *Serratia* spp.

Enterobacteriaceae ailesinde *Klebsiella* kabilesi üyesi, gram negatif bakterilerdir. *S. marcescens*, *S. plymuthica*, *S. liquefaciens*, *S. rubidaea* ve *S. odorifera* türleri yanı sıra *Serratia fonticola* türünü gıdalardan son yıllarda izole edilmektedir. *Enterobacteriaceae* ailesinin diğer türlerinden; gastrointestinal yola daha az yerleşmesi olarak ayrılmaktadırlar. (Ustaçelebi, 1999; Koneman, 1997). 1979 yılında ilk kez *Serratia* türü olarak *Serratia fonticola* suşu toprak ve sudan izole edilerek tarif edilmiştir. Fırsatçı patojen bir bakteri türüdür. İnsanlarda intestinal sistem hastalıklarına ve bağışıklık sistemini düşürmeye neden olurlar (Gavini ve ark., 1979).

2.1.2.6. *Kluyvera intermedia*

Enterobacteriaceae ailesindedir. Basil veya kokbasilidir. Fakültatif aerobtur. Glukoz fermente eder ve katalazdır. İnsanlara patojen bakteri türüdür. İntestinal hastalıklara neden olurlar. İçme suyu, kanalizasyon ve toprak gibi doğal ortamlardan izole edilebilir. Bugüne kadar klinik örneklerden izole edildiği gibi doğal çevreden de daha sık izole edilmiştir (Berger, 2015).

2.1.2.7. *Moellerella wisconsensis*

1980' li yıllarda Amerika' da hastaneye gönderilen kültürlerden ilk kez *Enterobacteriaceae* ailesinin içinde *Moellerella* suşu olarak *M. wisconsensis* izole edilmiştir (Hickman-Brenner ve ark., 1984).

M. wisconsensis suşları enterobakteriyel ortak antijeni üreten, Gram-negatif, fakültatif anaerobik, nitrat düşürücü ve oksidaz negative çubuklardır. Yeni bir cins ve insan gaitasında karşılaşılmıştır. İnsanlarda intestinal sisteme yerleşip ishale neden olmaktadır (Hickman-Brenner ve ark., 1984; Ramia ve ark., 1982).

2.2. Beta Laktam Antibiyotikler

Penisilin, 1928 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir. 1940 yılında Abraham ve Chain *E. coli*'den elde ettikleri özüt ile penisilin etkisinin kesildiğini bulmuşlardır. Elde ettikleri enzime "penisilnaz" demişlerdir (Gür, 1997). 1960' lı yıllardan sonra, sentetik penisilinlerden ampisilin ve 1. kuşak sefalosporinlerin geliştirilmesiyle Gram (-) bakterilerde çok çeşitli beta laktamaz enzimi olduğundan ve plazmidlerden sentezlenebildiğinden kısa sürede antibiyotiklere karşı direnç artışı gözlemlenmiştir. 1980' li yıllarda ise beta laktamazlarla inhibe olmayan yeni beta laktam 3. kuşak sefalosporinler geliştirilmiştir. Fakat 1983 yılında bu antibiyotiği de parçalayan yeni beta laktamazlar bulunmuştur. Bu durum Gram (-) bakterilerin her koşulda yaşamlarını sürdürebilmek için direnç genlerini tekrar tekrar kodlayabildiğinin göstergesidir (Jacoby ve Medeiros, 1991).

Beta laktam antibiyotikler, yararlanılmaya başlandığı ilk tarihten itibaren günümüze kadar en sık kullanılan antibiyotiklerdendir. Bakterilerin 'penisilin bağlayan protein' adı verilen enzimlerine bağlandıktan sonra peptidoglikan hücre duvar yapısının sentezini inhibe ederek hücreyi parçalarlar (Gülay, 2005).

Peptidoglikan (mürein) tabakası bakterilerin bütünlüğünü sağlayan, kısa peptid zincirleri ile çapraz bağlanan ve Gram (-) bakterilerde kalın olan bir yapıdadır. Bu çapraz bağlantı D-alaninin transpeptidasyon reaksiyonu sonucu oluşur ve bu enzimlere penisilin bağlayan protein (PBP) denir (Gür, 2002). Beta laktam antibiyotikler bakterilerdeki bu penisilin bağlayıcı enzimi inhibe ederek korunmasız kalan hücre duvarını parçalar ve bakteri bütünlüğünü yitirerek ölür. Böylece bakterilere karşı beta laktam antibiyotikler kullanılarak tedavi yapılmış olunur (Sarı, 2005). Etki mekanizmaları ve spektrumları açısından akut ve üst solunum yolu enfeksiyonlarında daha çok tercih edilmektedir. Antimikrobiyel ilaçlar içerisinde beta laktamlar en seçici olanlarıdır. Diğer antimikrobiyal ilaçlarla beraber alt solunum yolu enfeksiyonlarında da kullanılırlar (Aplay, 1999; Bishop, 1996).

Beta laktam antibiyotikleri 5 grupta incelersek;

- I. Penisilinler
- II. Monobaktamlar
- III. Karbapenemler
- IV. Sefalosporinler
- V. Beta laktamaz inhibitörleri (klavulanik asit, sulbaktam, tazobaktam)
(Sarı, 2005).

2.2.1. Penisilinler

Penisilinlerin öz yapısında beta laktam halkası, tiazolidin ve bir yan zincir bulunmaktadır. Penisilinlerin 7 türü vardır:

- i. Doğal penisilinler (penisilin G, kristalize penisilin G)
- ii. Penisilinaza dayanıklı penisilinler (metisilin, oksasilin)
- iii. Aminopenisilinler (ampisilin, amoksisilin)
- iv. Amdinopenisilinler
- v. *Pseudomonas*' lara etkili penisilinler (karbenisilin)
- vi. Geniş spektrumlu pseudomonaslara etkili penisilinler
- vii. Kombine beta laktam inhibitörü penisilinler (amoksisilin/klavulanikli, tikarsilin/klavulanikli, ampisilin/sulbaktamlı, piperasilin/tazobaktamlı)
(Sarı, 2005).

Bakterileri öldürücü olduğu keşfedilen ilk penisilinler, alerji etkisi haricinde tüm ilaçlardan daha az tehlikelidir. Etki spektrumları dar olmasına karşın yukarıda verildiği gibi yarı sentetik ampisilin, karbenisilin, amoksisilin gibi ilaçlar oluşturulmuştur (Kaya, 2007). İnsanların bağırsak florasında bulunan *E. coli*' ler, ampisilin ve amoksisilinlere duyarlıdır. Fakat hastane kökenli olanlarda dirençli plazmidlerin yayılımı görülmektedir. *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. türleri aminopenisilin sınıfına direnç göstermektedir. Gram (-) bakterilerde pek tercih edilmemelidir (Sarı, 2005).

Günümüzde klavulanik asit gibi beta laktamaz inhibitörleri ile ampisilin, amoksisilin gibi penisilin türevlerinin aynı ilaçların içeriğinde kullanılarak birleştirilmesi, beta laktamaz üreticisi bakterileri etki alanı içine alarak kombine beta laktamaz inhibitörü penisilinler oluşturulmuştur. Fakat yine de beta laktamaz üreten bakterilerin tümünü

yok edemezler. *Staphylococcus* spp, *Klebsiella* spp ve *E. coli*' nin basitçe ürettikleri beta laktamazlara karşı etkilidirler (Chambers, 2005).

2.2.2. Monobaktamlar

Beta laktama bitişik başka halka içermedikleri için monobaktamlar penisilin ve sefalosporin grubu antibiyotiklerden farklıdır. İlk sentetik monobaktam olan aztreonam, Gram (-) bakterilerde penisilin bağlayan protein 3' e bağlanarak duvarın yapısındaki sentezi bozar. Gram (-) patojen olan *Klebsiella pneumoniae* ve *H. influenzae* gibi bakterilere etki gösterirler (Sarı, 2005).

2.2.3. Karbapenemler

Çift bağ içeren sefalosporinlerde, halkasındaki 5 farklı türdeki kolların birinde metilenin yerine sülfür yapısının geçmesiyle diğer beta laktam içeriklerinden ayrılmıştır. *Streptomyces cattleya* bakterisinin ürettiği tienamisin yapısındaki türevler karbapenemleri oluşturur. Bunlardan en geniş etki alanına sahip olanlar beta laktamlardır. Karbapenemler stabil ve değişmeyen, çok geniş antibakteriyel etkiye sahip ve beta laktamazlara karşı oldukça dayanıklıdır. Fazlasıyla genişlemiş spektrumlu beta laktamaz ve AmpC üreten Gram (-) bakterilere karşı karbapenemler etkisini sürdürebilmektedir (Livermore, 2000).

2.2.4. Sefalosporinler

Geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Etki biçimi olarak penisilin gibidirler. Penisiline karşı üretilen penisilinaz enzimine dayanık yapıda, Gram (+) ve Gram (-) bakterilere etki ederler (Hornis ve Kotarski, 2002; USP, 2007b). Bakterilerdeki etki spektrumunu gözlemleyebilmek ve tarih sıralaması açısından da sefalosporinler sırasıyla 4 gruba ayrılırlar (Sarı, 2005).

1. kuşak sefalosporin; sefazolin, sefasetril, sefaloridin, sefadroksil, seftezol, sefaleksil, sefalotin, sefradin, sefapirin.

2. kuşak sefalosporin; sefuroksim, sefamandol, sefonarid, sefmetazol, sefaklor, sefotiam, sefoksitin, sefonisid, sefotetan.

3. kuşak sefalosporin; sefotaksim sefoperazon, seftriakson, seftazidim, sefsulodin, sefpiramid, moksolaktam, seftizoksim, sefmenoksim.

4. kuşak sefalosporin; sefpirom ve sefepim (Sarı, 2005).

2. kuşak sefalosporinler, 1. kuşaklara oranla Gram (-) basillere ve anaeroblara daha çok etkilidir. Sefoksitin ajanı, *Enterobacteriaceae*' lar tarafından üretilen beta laktamazları oldukça iyi bir şekilde inhibe ederler (Sarı, 2005).

Üçüncü kuşak sefalosporinlerin ikinci kuşak sefalosporinden klinik tedavilerdeki önemli farkı, *Pseudomonas aeruginosa*' ya karşı ve diğer Gram (-) lere karşı daha güçlü etki göstermesidir. Gram (-) bakterilere karşı yaygın olarak 3. kuşak sefalosporinler kullanılmakta ve *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Serratia*' ya karşı etkili antibakteriyel rol oynamaktadırlar (Harold, 1985).

2.3. Bakterilerin Antibiyotik Direnci

Antimikrobiyal ajanların öldürücü veya üremeyi durdurucu etkisine karşı, bakterilerin kendini koruyabilme mekanizması direnç olarak adlandırılmaktadır (Yüce, 2001).

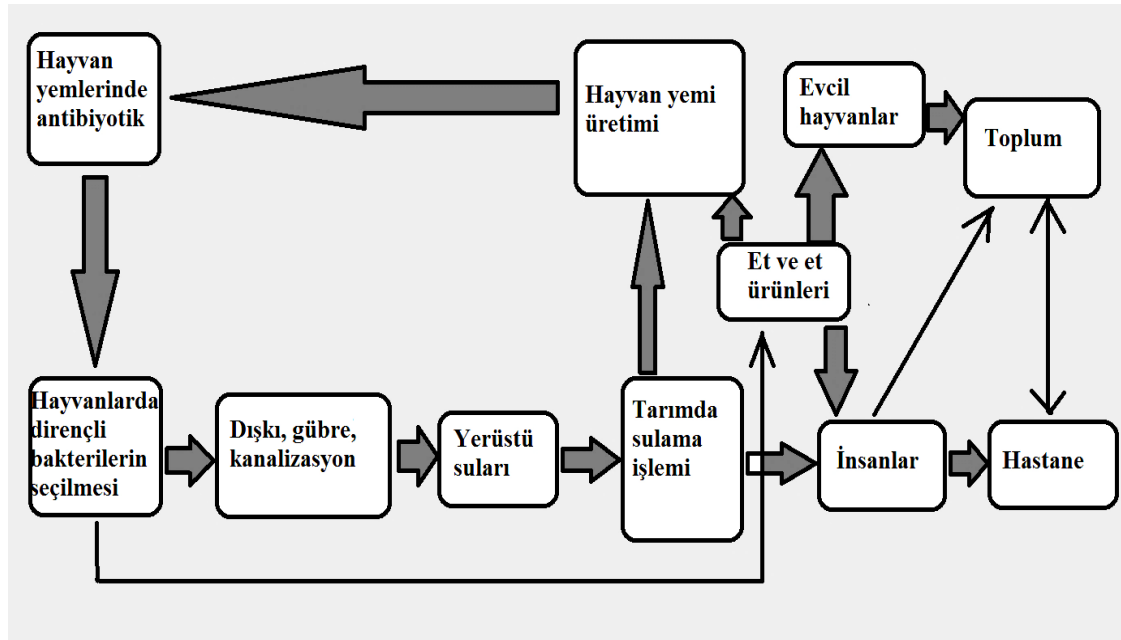
Antimikrobiyal ajan olan antibiyotiklerin yaşamımızda varoluşu ilk kez 1930' lu yıllara dayanmaktadır. Günümüze kadar birçok yeni antibiyotik çeşidinin kullanılmasıyla beraber *Enterobacteriaceae* Gram (-) bakteriler, antibiyotiğe karşı farklı dirençler oluşturarak tedavilerde sorun yaratmaya devam etmişlerdir (Levy, 1982). Alexander Fleming penisilini bularak dünyada çok önemli bir buluşa imza atmıştır. İnsanlar, tarihte o güne kadar birçok bakteriyel enfeksiyonlara yakalanarak ölmekte en küçük bir sindirim sistemi hastalığında bile çözüme kavuşamamaktaydı. Birçok bakteriyel hastalığın tedavisinde çözüm yolu olarak başvuru bu antimikrobiyal ajan beraberinde antimikrobiyal direnç mekanizmasını oluşturarak tüm dünyada önemli bir soruna da yol açmıştır. Antibiyotiklerde beta laktam grubu etken madde içeriğiyle de bakterilerin antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç en önemlilerindendir. *Enterobacteriaceae* Gram (-) bakteri suşlarında beta laktam antibiyotiklere karşı direnç 3 yolla sağlanmaktadır:

- i. Penisilini bağlayan proteinlerin yer değiştirmesi
- ii. Beta laktamaz enziminin üretimi
- iii. Penisilin bağlayıcı proteinlere erişimin engellenmesi

olarak bu üç mekanizma belirtilmiştir. Gram (-) bakterilerde beta laktamaz enzimiyle direnç oluşturmaları en yaygın ve bilinen tiptir (Tang, 2014).

2.3.1. Antibiyotik direncinin taşınma yolları

Günümüzde antibiyotik döngüsü kaynakları; konutlar, hastaneler (tıbbi atıklar, tedavi ve sonrasında insan vücudundan ilacın atılması), kanalizasyondan su ve toprağa geçiş, kümes ve çiftlik hayvanlarının besleme işlemleri esnasında hayvanlara geçiş (büyüme artırıcılar) ve ilaç üretim işletmeleridir (Türkdoğan ve Yetilmezsoy, 2009; Kulis ve ark., 2003). Bu antibiyotik kullanımının doğaya atılması ve döngüsü söz konusudur. Canlılar üzerinde kullanılan antibiyotikler vücutta az veya hiç değişmeden doğaya atılmaktadır. Bu durumda doğaya atılan düşük konsantrasyondaki antibiyotikler, direnç gelişimine sebep olmakta ve bu dirençli bakteriler döngüye karışmaktadır (Topal ve ark., 2012). Şekil 2.2’ de çevre, hayvanlar, insanlar arasındaki dirençli bakterilerin yayılım yolu gösterilmiştir.



Şekil 2.2. Bakteri ile çevre arasındaki antibiyotik direnci taşınma yolları (Khachatourians, 1998).

2.3.2. Hayvanlarda antibiyotik direnci oluşumu ve hayvandan insana geçişi

Hayvanlarda tedavi edici, koruyucu ve anabolik amaçla kullanılan antibiyotikler, normal ve patojen flora bakterilerinde antibiyotik direncinin oluşumuna neden olurlar. Gıdalar aracılığıyla insanlar, direnç genlerine sahip olan bu bakterileri, kendi bağırsak mikroflorasına kolonize oluşuyla almaktadırlar (Barton, 2000).

Birçok ülkede büyümeyi artırıcı amaçla çeşitli anabolik antibiyotiklerin kullanımı yasaklanmıştır ve bu tür antibiyotiklerin yasaklanma durumlarına ait bilgiler Çizelge 2.1’ de verilmiştir. Antibiyotiklerin hayvan yeminde kullanılarak hastalıkların

önlenmesi, büyümenin hızlandırılması, toksinleri engelleyici ve besinlerin emilimini arttırıcı amaçlı kullanımı hedeflenmiştir (Arpacık, 1999; Tuncer ve ark., 1999; Sarıca, 1999).

Çizelge 2.1. Hayvanlarda anabolik hormon amaçlı kullanılan çeşitli antibiyotiklerin yasaklanması (Tuncer, 2007).

ÜLKE	YASAK YILI	KARAR AÇIKLAMASI
İsveç	1969	Büyütme faktörlü antibiyotik bilimsel olarak yasaklandı.
AB	1970	Antibiyotik büyütme faktöründe geçici sınırlamalar
İngiltere	1970	Tetrasiklin ve penisilin türü antibiyotikler yasaklandı.
AB	1971	Tetrasiklin yasaklanmıştır.
İsveç	1971	Gelişimi arttırıcı antibiyotik ve tetrasiklin yasaklanmıştır.
İsveç	1986	Gelişimi arttırıcı tüm antibiyotikler yasaklanmıştır.
AB	1997	Avoparcin ilacı kullanımı yasaklanmıştır.
Hollanda	1998	Olaquinox kullanımı yasaklanmıştır.
Danimarka	1998	Gelişimi arttırıcı antibiyotiklerin tümü ve virginamycin kullanımı yasaklanmıştır.
İsviçre	1998	Gelişimi arttırıcı antibiyotiklerin tümü yasaklanmıştır.
AB	1998	Tylosin phosphate, zincbacitracin, spiramycin, virginiamycin gibi ilaçlar yasaklanmıştır.
İngiltere	1999	Tylosin phosphate, zincbacitracin, spiramycin, virginiamycin gibi ilaçlar yasaklanmıştır.
AB	01.01.2006	Gelişimi arttırıcı amaçlı antibiyotiklerin hepsi yasaklanmıştır.
Türkiye	21.01.2006	Gelişimi arttırıcı antibiyotiklerin hepsi ülkemizde yasaklanmıştır.

Akkan ve Karaca (2003) yaptığı çalışmada, veteriner hekimlik alanında en çok ve sıklıkla kullanılan ilaç grubunun antibiyotikler olduğunu, yapılacak sağaltıma dikkat edilmesi, antibiyotiklerin etki mekanizmasına göre tercih edilmesi gerekliliği ve antibiyotiklerin kombine kullanımında uyulması gereken hususları irdelleyerek sunmuşlardır.

Modern koşulların gereksinimlerinden ötürü çiftlik hayvanlarında ölümleri azaltmak amacıyla bilinçsiz antibiyotik kullanılmaktadır. Bu durum hayvanlarda oluşabilecek dirençli bakterilerin insanlara yayılmasının temelini oluşturmaktadırlar. Hayvansal gıdalardan insanlara geçebilecek dirençli bakteriler insanların doğal floralarını da bozarak birçok hastalığa yakalanmalarını ve tedavi sırasında kullanılan antimikrobiyal ajanların etkisine direnç göstermektedirler. Halk sağlığı açısından, antibiyotik kullanımı, insanlarda doktor ve çiftlik hayvanlarında veteriner kontrolünde olmalıdır (McEwan ve ark., 2006; Aarestrup, 2004; White ve ark., 2001; Franklin ve ark., 2001).

2.3.3. Mikroorganizmaların antimikrobiklere karşı direnç mekanizmaları

Dirençler üçe ayrılmaktadır:

- I. Doğal (intrensek) direnç
- II. Çapraz direnç
- III. Kazanılmış direnç

Doğal Direnç: Bakterilerin antibiyotiklere karşı gösterdiği yapısal direnci doğal direnç olarak tanımlayabiliriz. Bakterinin yaşamını sürdürebilmesi için ortam popülasyonuna karşı gösterdiği baskın rol sağlayan doğal dirençleri temel özellikleridir ve antibiyotik kullanımıyla ilişkisi yoktur. Kalıtsal olarak geçmez. Mikroorganizmalar doğal direnç göstererek antibiyotiklerin bünyelerine geçmesine engel olurlar. Örneğin, Gram (-) bakterilerin dış membranından vankomisin ilacının geçmemesi doğal olarak dirençli olmasından kaynaklanmaktadır (Yüce, 2001).

Çapraz Direnç: Belli bir ilaç grubuna karşı direnç gösteren mikroorganizmaların benzer mekanizmalarla kendisine saldıran diğer antibiyotiklere karşı direnç göstermesi durumudur. Eritromisin, kanamisin, neomisin gibi yapıları benzer ilaçlarda gözlemlenmektedir (Yüce, 2001).

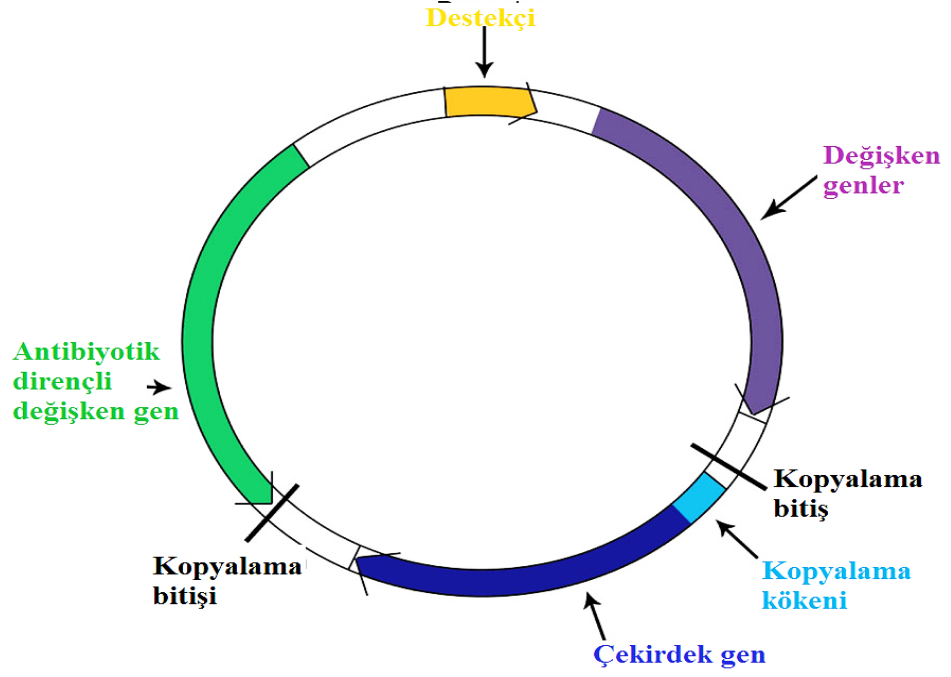
İnsan ve hayvan tedavisinde kullanılan ilaçlar arasında çapraz direnç bulunmaktadır. Hayvanların gelişiminde kullanılan antibiyotiklere karşı direncin oluşması beraberinde insanların tedavisinde kullanılan antibiyotiklere direnç oluşumuna neden olmaktadır (Emborg ve ark., 2003).

Kazanılmış Direnç: Bakterilerin genetik kromozomal yapısında oluşan değişimler sonucunda duyarlı olduğu ilaca karşı direnç göstermesi durumudur. Bu dirençli genler kromozom içinde veya dışında olabilirler. Bakteri direnç genleri plazmidler, transformasyon, konjugasyon, transpozon ve ekstrakromozomal ile kromozomal direncin dışında da bakteriler arası aktarılabilmektedir (Yüce, 2001).

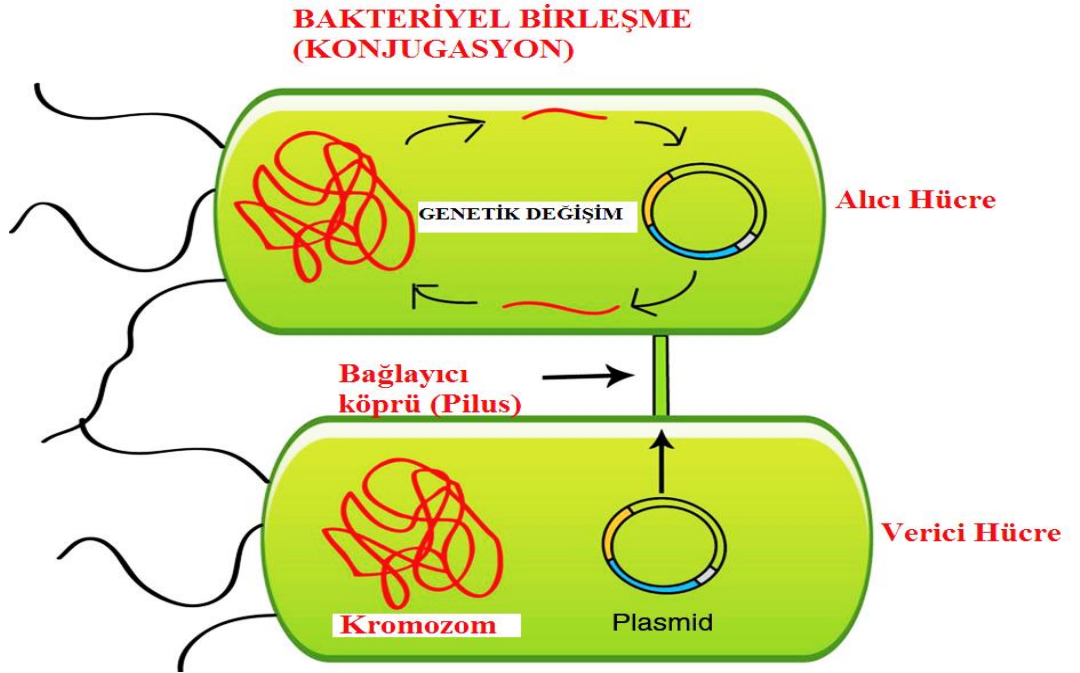
Plazmidler, mikroorganizmalarda antibiyotiklerin kullanımından öncede var olan sonradan oluşmamış kromozomdan bağımsız davranabilen DNA parçacıklarıdır. Şekil 2.3’ de bir plazmid örneği gösterilmiştir. Ağır metaller ve antimikrobiyal ilaçlara karşı direnç genlerini taşıyan yapıdır (Yüce, 2001).

Transpozonlar, bakteri kromozomunda değişik yerlere yerleşen veya kromozomdan plazmid yapısına, plazmidten tekrar plazmide, plazmidten DNA ve bakteriyofaj yapısına aktarılabilen DNA yapısıdır. Plazmid veya kromozom üzerindeki direnç genleri bakterinin bölünerek çoğalması ile diğer bölünen hücreye aktararak geçerler. Buna **dikey geçiş** denir. Yeni hücrelerin oluşmasıyla dirençli şuş ve genler hızla yayılarak çoğalmaktadır. Buna da **klon yayılımı** denir. (Yüce, 2001).

Konjugasyon (bakteri birleşmesi), iki bakteri hücrelerinin birbiriyle temasıyla genetik aktarımda bulunmasıdır. Şekil 2.4’ de iki bakteri arasında gen aktarımı gösterilmiştir. Direnç plazmidleri, Gram (+) ve Gram (-) bakteriler arasında da aktarılmaktadırlar. Son yıllarda direnç genlerinin transpozonlarca taşınıp aktarıldıkları belirlenmiştir. Bu tip aktarım durumunun ise düşük yoğunluklu antibiyotik kullanımında hızlanmasıdır. Bu durumdan da anlaşıldığı gibi bilinçsiz yanlış dozajlarda antibiyotik kullanımı veya tedavinin tam sonuç vermeden bırakılması direncin oluşumu ve aktarılmasına sebep olmaktadır (Yüce, 2001). Mikroorganizmalarda kazanılmış antibiyotik direncinin mekanizmaları Çizelge 2.2’ de gösterilmiştir (Töreci, 2003; Gold ve Moellering, 1996).



Şekil 2.3. Antibiyotik direnci taşıyan değişken genli plazmid (Brolund ve ark., 2014).



Şekil 2.4. Bakteriyel konjugasyon ile gen aktarımı (Brolund ve ark., 2014).

Çizelge 2.2. Mikroorganizmalarda antibiyotik direnç mekanizmaları (Töreci, 2003; Gold ve Moellering, 1996).

Direnç mekanizması	Etkilediği antibiyotikler
Antibiyotiğin bakterinin sentezlediği bir enzimle inaktive edilmesi yoluyla	Beta laktamlar, aminoglikozidler, kloramfenikol.
Antibiyotiğin hedef bölgeye ulaşımının engellenmesi yoluyla (içeri girmesini güçleştirerek veya dışarı atılımını hızlandırarak yapılır)	Beta laktam antibiyotikler, kinolonlar, kloramfenikol, tetrasiklin, eritromisin, trimetoprim.
Antibiyotiğin etkilediği hedef noktanın değiştirilmesi	Beta laktamlar, aminoglikozid, eritromisin, klindamisin, kinolonlar, rifampin, sülfanamid, trimetoprim, vankomisin

2.4. Beta Laktamazların Sınıflandırılması

Enterobacteriaceae suşlarının en önemli özelliği bünyelerinde beta laktamaz üreterek beta laktam içeren antibiyotiklere karşı direnç göstermesidir. Beta laktamazlar, beta laktam halkasını hidrolize ederek beta laktam içerikli antibiyotiklere karşı bakteriler kendilerini korumuş olurlar (Yu ve Chuang, 2006). Bu enzimler Gram (-) bakterilerde periplazmik boşluk içerisinde yer alır ve beta-laktam halkasındaki bağı parçalarlar (Gülay, 2005).

Bugüne kadar 400 civarında beta laktamaz enzimi tespit edilmiştir. Beta laktamazların sınıflandırılmasında 2 şema en sık kullanılandır:

- Ambler moleküler sınıflandırması
- Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırması

Ambler moleküler sınıflandırması: 1980 yılında beta laktamazlar A, B, C, D olarak dört sınıfa ayrılmıştır. A, C ve D grupları ‘serin’ enzimlerini, B grubu ‘çinko’ enzimlerini içermektedir (Gülay, 2005; Gür, 1997; Vahaboğlu, 1998).

Sınıf A penisilinazları, **sınıf B** metallo enzimleri, **sınıf C** sefalosporinazları ve **sınıf D** oksasilini hidroliz eden beta laktamazları içermektedir (Gülay, 2005; Gür, 1997).

Bush, Medeiros ve Jacoby bilim adamları 1995' de, biyokimyasal yapıları, moleküler ağırlığı, enzim-substrat profili, inhibitör ve hidroliz hızı, bağlanma afinitesi ve izoelektrik nokta gibi özelliklere dayanarak beta laktamazları 4 grup olarak açıklamıştır (Bush ve ark., 1995).

Plazmid Aracılı Beta Laktamazlar; Moleküler sistemde A ve D sınıfları içinde yer alan en geniş kategoriye sahip enzimlerdir (Gülay, 2005). Plazmid beta laktamazlar 6 grup altında toplanabilir: TEM-1, TEM-2, SHV-1, Klasik OXA, PSE enzimleri ve inhibitöre dirençli TEM mutantları (Gür, 1997).

Kromozomal Beta Laktamazlar; A ve C sınıfı grubundakilerdir (Gür, 1997).

Grup 1: Ambler moleküler sınıflamasında sınıf C' de yer alırlar. Kromozomal enzim olup indüklenebilme özelliğine sahiptirler. Bu grupta genler enzimlerin yapısını oluşturarak plazmidlerin içeriğinde görülmekte ve *Enterobacteriaceae* spp. ailesi içerisinde transfer edilerek aktarılmaktadır. Grup 1 beta laktamazlara sulbaktam ve klavulanatlı antibiyotikler etki etmezler. Bu grubu inhibe eden antibiyotikler kloksasilin ve aztreonamdır. Duyarlı olduğu antibiyotik ise karbapenemdir. Salmonella dışında tüm Gram (-) bakterilerde *Citrobacter freundii*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Morgenella morgani*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Providencia rettgeri* bakterilerinin yapılarında kromozomal grup 1 beta laktamazlar az veya çok sentezlenerek bulunurlar. Beta laktam antibiyotikler grup 1 beta laktamazları farklı oranlarda indükleyebilir. Fakat, indükleyici beta laktam etkisinin ortadan kalkışıyla bakteri eski beta laktamaz sentezini tekrar yapmaktadır (Livermore, 1995; Gür, 1997).

Grup 2: Hepsi moleküller A ve D sınıfı içerisindedir. Bu grup 2 beta laktamazlar penisilinleri, karbenisilini, monobaktamları, sefalosporinleri, karbapenemleri, kloksasilini hidrolizlerine göre 6 alt grupta toplanır (Medeiros, 1997). Sık görülen türler; 2b, 2be, 2br alt grubundaki TEM ve SHV grubu enzimlerdir (Livermore, 1995; Gür, 1997).

2a: Bu alt grupta klavulanik asite duyarlı ve penisilini hidrolize eden enzimler bulunmaktadır. Örnek olarak *Streptococcus aureus* bakterisinin ürettiği enzimler verilebilir (Bush ve ark., 1995).

2b: Bu grup enzimler, klavulanik asite duyarlı olup penisilin ve sefalosporin türü antibiyotikleri ise hidrolize eder. Yapısında plazmid aracı taşıyan TEM-1, TEM-2, SHV-1 enzimleri bu grup içerisindedir. Ampisilin, tikarsilin, sefalotin, karbenisilin gibi beta laktam antibiyotiklere direnç göstermeleriyle geniş spektrum olarak nitelendirirler ve *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunur. (Gür, 1997).

2be: Monobaktamlar, oksimin beta laktamlar antibiyotiklerin yaygın kullanımıyla oluşmuş, SHV-1, TEM-1, TEM-2 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasitlerin yer değişimiyle GSBLlere de (seftazidim, sefotaksim, seftriakson, aztreonam) etki eden yeni oluşumlu SHV ve TEM bu grupta bulunur. Özellikle *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarında yaygın görülmektedir. PER-1 enzimi ilk kez Türkiye’ de ki bir suştan izole edilmiştir. (Yuluğ, 1997).

2br: Bu grupta klavulanik asidin etki etmediği geniş spektrumlu beta laktamaz enzimleri (TEM-30’ dan TEM-36’ ya TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi) bulunmaktadır (Hall, 1993).

2c: Bu grupta klavulanik asite duyarlı ve karbenisilini hidroliz eden enzimler (PSE-1, 3, 4 beta laktamazları) yer almaktadır. (Hall, 1993).

2d: OXA enzimleri bu grupta olup OXA-11 enzimi ise Türkiye’ de bir bakteri suşundan tespit edilmiş olup klavulanik asit ve sulbaktam antibiyotiklere direnç gösterirler (Hall, 1993).

2e: Grup 1’ in içeriğinden farklı olarak, 2e grubunda sefalosporinaz beta laktamaz olarak klavulanik asit ortamında inhibe olmaktadır (Bush ve ark., 1995).

2f: Bu grupta *Enterobacter cloacae*’ nın IMI-1 enzimiyle, kromozomal NMC-A enzimi yer almaktadır. Bu enzimler klavulanik asit ortamında yok olup karbapenem direnç göstermektedirler (Bush ve ark., 1995).

Grup 3 (metallo-beta laktamazlar): B sınıfı içerisinde olan bu beta laktamazlar, aktif bölgelerinde Zn^{+2} çinko iyonu bulunmasıyla monobaktam antibiyotikler dışında tüm beta laktamları ve karbapenem antibiyotikleri hidrolize etmektedirler (Bush ve ark., 1995).

Grup 4: Klavulanik asitle iyi inhibe olmayan küçük bir grup olan penisilinazlardan oluşur (Bush ve ark., 1995). Tüm bu grupların daha iyi anlaşılabilmesi için Çizelge 2.3' de toparlanmıştır.

Çizelge 2.3. Beta laktamazların sınıflandırılması (Ambler ve ark., 1991; Aydın, 2010).

Ambler Moleküler sınıfı	Bush Alt grup	Enzim sayısı	Özellikleri
C	1	51	Gram (-) bakterilerdeki kromozomal enzimlerdir. Klavulanik asit ortamında yok olmazlar.
A ve D	2		Birçoğu klavulanik asit ortamında yok olmaktadır.
A	2a	23	<i>S. aureus</i> enzimleri, penisilini hidrolize eden.
A	2b	16	GSBLler (TEM-1,-2, SHV-1) bu gruptadır. <i>Klebsiella</i> ve <i>E. coli</i> suşlarında bulunur.
A	2be	200	Oksiiminosefalosporin ve monobaktamlara dirençli GSBL
A	2br	24	Klavulanik asitten etkilenmeyen TEM enzimleri
A	2c	19	PSE-1,-3,-4 enzimleri olup karbapenamazı hidroliz ederler.
D	2d	31	Enzimi OXA olup, klavulanik asite dirençlidir.
A	2e	20	klavulanik asitle inhibe
A	2f	4	IMI-1, NMC-A enzimleri, klavulanik asitle inhibe
B	3a, b, c	24	Karbapenemleri hidrolize, Zn ⁺² çinko iyonu.
D	4	9	Penisilinazlar, klavulanik asite inhibe olmayan

2.5. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL)

1983' de Avrupa' da ilk kez *K. pneumoniae*' ye karşı, GSBL kullanılmasının ardından keşfedilen bu enzimler, ileri ki zamanlarda *Enterobacteriaceae* suşlarında saptanmıştır. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL), sefotaksim, seftazidim, seftriakson gibi oksimino beta laktam antibiyotiklere ve aztreonama dirençli enzimler olup plazmid aracılığıyla ise genlerini diğer bakterilere aktarmaktadırlar (Rahal, 2000).

1980' li yıllarda çoğu GSBL üreten suşlar hastane kökenli iken 2000' li yıllardan sonra bu durum toplum kökenli kaynaklarda ortaya çıkmıştır. İlk keşfedildiği yıllarda GSBL üretimi, *K. pneumoniae*' de TEM ve SHV enzimleriyle sık görülürken günümüzde ise toplum kökenli GSBL üretimi *Enterobacteriaceae* suşlarında ve *Escherichia coli* bakterisinde CTX-M enzimi yapısında saptanmıştır (Canton ve ark., 2003).

2.5.1. GSBL tipleri

Sınıf A; 2be, 2e ve sınıf D; 2d beta laktamazlar GSBL' yi oluştururlar (Rahal, 2000). GSBL üretimi çoğunlukla SHV, TEM ve OXA enzim kökenine dayanmaktadır. TEM türü beta laktamazlar 130, SHV türü beta laktamazlar ise 50 farklı enzim çeşitliliğini aşmışlardır. Geniş spektrumlu penisilinlere, 3. jenerasyon sefalosporinlere duyarlıdırlar. CTX-M, PER, VEB ise bunların dışında GSBLler olup günümüzde yeni ortaya çıkıp sıkça izole edilendendir. GSBL tüm tipleri; SHV, TEM, OXA, CTX-M, PER, VEB, TLA, GES/IBC, BES olarak sınıflandırılmıştır (Gür, 2005).

Avrupa ve Amerika' da son 5 yılda CTX-M enzimi üreten GSBL oranında artış olduğu yapılan çalışmalarda belirtilmektedir. 5 gruba ayrılır: CTX-M-1, M-2, M-8, M-9, M-25. CTX-M enzimi üreten bakterilerin ülkelerdeki yoğunluğuna göre Çizelge 2.4' de dağılımları gösterilmiştir (Pitout, 2008).

Çizelge 2.4. CTX-M beta laktamazlarının küresel dağılımları (Pitout, 2008).

ENZİM TÜRÜ	YOĞUN SAPTANDIĞI ÜLKELER
CTX M-1	İtalya
CTX M-2	İsrail
CTX M-9	İspanya
CTX M-14	İspanya
CTX M-15	Dünya

2.5.1.1. SHV grubu GSBL

K. pneumoniae' da en sık SHV-1 enzimi bulunur. Enzimin üretimiyle ampisilin, piperasilin, tikarsilin türü antimikrobiyalara direnç oluştururlar. (Stürenburg ve Mack, 2003). 1983 yılında ilk türev olarak SHV-2 enzimi tanımlanmıştır. SHV grubu en çok *K. pneumoniae* dışında *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Citrobacter diversus* bakterilerinde de tespit edilmiştir (Bradford, 2001).

2.5.1.2. TEM grubu GSBL

Gram (-) bakterilerde en sık bulunan TEM-1 enzimidir. *E. coli*' lerin %90' ında ampisiline karşı direnci TEM-1 enzimi oluşturmaktadır. TEM-1 en eski plazmid kökenli enzim olup penisilin, ampisilin ve 1. kuşak sefalosporinlere karşı dirence neden olmaktadır. *E. coli* ve *K. pneumoniae* başlıca TEM grubu içerirken *Morganella morganii*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella*, *Proteus mirabilis* ve *Enterobacteriaceae* ailesinde sıklıkla tespit edilmektedir (Gür, 2004).

2.5.1.3. CTX-M grubu GSBL

1989 yılında Almanya' da CTX-M *Escherichia coli*' de ilk kez tespit edilmiş sonraları ise *Salmonella spp.* ve birçok *Enterobacteriaceae* suşlarında bulunmuştur. Günümüz zamanına kadar 40 CTX-M enzimi belirlenmiştir. CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-14 en yaygın bulunan enzimler olup plazmid aracılığıyla yayılmaktadırlar. CTX-M hastane infeksiyonu, SHV ve TEM toplum infeksiyonu olarak bildirilmektedir. (Bonnet, 2006).

Aminoasit dizilerine göre beş farklı grupta toplanırlar:

CTX M-1 grubu (CTX-M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 54, UOE-1)

CTX M-2 grubu (CTX-M-2, 4, 6, 7, 20, 31, 44 ‘önceden TOHO-1 olarak adlandırılmıştır’ ve FEC-1),

CTX M-8 grubu (CTX-M-8 ve CTX-M-40),

CTX M-9 grubu (CTX-M-9, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 45 (önceden TOHO-2 idi), 46, 47, 48, 49 ve CTX-M-50) ve

CTX M-25 grubu (CTX-M-25, 26, 39 ve CTX-M-41) olarak özetlenebilir (Cantón ve Coque, 2006).

2.5.1.4. OXA grubu GSBL

Aminoasit dizilişleri üzerinde oluşan evrimleşme sonucunda OXA grubu oksiiimino sefalosporin antimikrobiklerini sentezleyen geniş etki alanına sahip enzim haline dönüşmüşlerdir. OXA-11, 14, 15, 16, 33, 34 grupları seftazidim direnci oluştururken, OXA-17 seftotaksime dirençli olup OXA-24 ise karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. OXA-31 sefepime dirençli, seftazidime duyarlı gruptur (Aubert ve ark., 21).

2.5.1.5. PER grubu GSBL

İlk olarak Fransa’ da Türk olan bir hastadan izole edilmiş ve *P. aeruginosa* suşunda tespit edilmiştir. PER-1 enzimi penisilin ve sefasporinleri hidrolize eder, klavulanik asitle inhibe olur (Nordman, 1993).

2.5.1.6. VEB grubu GSBL

VEB-1 ilk kez Vietnam’ da bir *E. coli*’ de saptanmıştır. Seftazidim, seftotaksim ve aztreonama yüksek düzeyde direnç gösterirler, klavulanik asit ile inhibe olurlar (Poiril ve ark., 1999).

2.5.1.7. GES grubu GSBL

Bu grupta GES-1 vardır. İlk kez Fransa' da *Enterobacteriaceae* ailesinden *K. pneumoniae* bakterisinde görülmüştür (Poiril ve ark., 2000).

2.5.1.8. Diğer gruplandırılmayan GSBLler

BES, BES-1, TLA, TLA-1, TOHO-1, 2, SFO ve IBC gibi geniş spektrumlu sefalosporinleri hidrolizleyebilen GSBLler tanımlanmıştır (Naas ve ark., 2008).

2.5.2. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazların klinik önemi

Klinik açıdan, bakterilerin neden olduğu en büyük problem GSBL senteziyle antibiyotik direncinin oluşmasıdır. Gram (-) bakterilerde çeşitli antibiyotiklere karşı direnç artarak yaygınlaşmakta, tedavi seçimi de bunu etkilemektedir. *Escherichia coli* yenidoğan bebeklerde, nötrojenik kanser hastalarında ve bu sebeple oluşan yan hastalıkları olan çocuklarda ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. GSBL kaynaklı enfeksiyonlar bilindiği üzere günümüzde uzun yatışları beraberinde insan iş gücü kaybı, yüksek tedavi masrafları olarak da ülke açısından ekonomik kayıplara yol açmaktadır (Kim, 2002). GSBL üretiminin toplum kökenli olarak en çok görüldüğü *Enterobacteriaceae* suşları üriner sistem enfeksiyonuna neden olmaktadır. GSBL üreten bakteriler son yıllarda menenjit, pnömoni, intraabdominal enfeksiyon gibi hastalıklara neden olmaktadır (Weyrich ve ark., 2012; Chaudhuri ve ark., 2011).

Gram (-) bakteri tespit edildiğinde aztreonam ve tüm geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı bu bakterinin dirençli olduğu kabul edilerek tedavi uygulanmalıdır. Bu enzimleri bakterilerde nesilden nesile aktaran veya bakteriler arası geçişini sağlayan plazmidler, dirençli olmayan yapısında beta laktam antibiyotiklere karşı dirençli hale gelmesine neden olmaktadır. Laboratuvarda da klinik açıdan GSBLlerin saptanmasında bakterilerin farklı duyarlılık ve dirençleri önem teşkil etmektedir (Bradford, 1994).

Antibiyotiklerin kullanımında, örneğin; dar spektrumlu antibiyotiklerin yeterli olduğu durumda geniş spektrumlu antibiyotiğin seçimi, tedavinin gereksiz uzatılması, antibiyotik duyarlılık oluşması, tedaviyi değiştirmede başarısızlığa neden olmaktadır. İnsan sağlığı ve klinik açıdan sorunlar çözülmeli ve antibiyotik kontrol standartları olmalıdır (Akalın, 1999).

Hastalıkların çoğunluğunun dirençli bakterilerden meydana gelmesi klinik açıdan GSBLlerin önemini açıklamaktadır. Günümüzde Gram (-) bakterilerin direnç sorunlarının yoğunlukla klinik ortam üzerinden araştırılması halk sağlığının en önemli zincirinin olduğunu göstermektedir. Klinik ortamda hastalardan izole edilen *Enterobacteriaceae* bakterileri, GSBL üreterek direnç göstermeleri bu çalışmaların daha sıklıkla yapılması gerektiğinin göstergesidir. Kan, idrar, burun mukozası gibi insan orjinli araştırmalarda dirençli bakteri genlerinin bulunması insanların hasta olmadan önce bulaşma yollarının önlenmesiyle klinik açıdan koruyucu tedavi amaçlanmalıdır. Yediğimiz gıdalar, toplum hijyeni gibi konularda kişisel temizlik gibi konular klinik öncesi başvurulması gereken en önemli yoldur.

2.6. GSBL Tanı Yöntemleri

Enterobacteriaceae ailesinin GSBL üretim prevalansında ki artış, plazmidle kolay ve çabuk yayılmaları, mortalite artması, salgın durumu ve sağaltım başarısızlıkları ciddi klinik sorunlara yol açmaktadır. GSBLlerin rutin duyarlılık testleri ile tanımlanması güç olmakta ve doğru saptanmaları gerekmektedir (Gülay, 2004). Bu durum GSBL tarama ve doğrulama testlerinin hızlı ve güvenilir laboratuvar testleri olarak yapılmasını gerektirmektedir (Samaha-Kfoury ve Araj, 2003). Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI) bu testlerin *K. oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli* ve *P. mirabilis* izolatlarının rutin olarak GSBL üretiminin tespiti ve doğrulanması standardını oluşturmuşlardır. Buna göre, disk difüzyon testinde GSBL üretimi için sefotaksim, seftazidim, sefpodoksim antibiyotiklerine karşı duyarlılık saptanmalıdır. Duyarlılığının azaldığı durumlarda ise disk difüzyon doğrulama testi uygulanmalıdır. CLSI tarafından *Enterobacteriaceae* duyarlılıklarını belirleyen zon çapları Çizelge 2.5' de ve GSBL inhibisyon zon çapları ve MİK değerleri Çizelge 2.6' da verilmiştir (CLSI, 2013).

Çizelge 2.5. *Enterobacteriaceae* için belirlenen standart zon çapları ve MİK değerleri (CLSI, 2013)

Antibiyotik	Antibiyotik disk inhibisyon zon çapı (mm)			MİK (µg/ml)		
	S (Duyarlı)	I (Orta)	R (Dirençli)	S	I	R
CTX	≥26	23-25	≤22	≤1	2	≥4
CTX CLA	≥31	28-30	≤27			
CAZ	≥21	18-20	≤17	≤4	8	≥16
CAZ CLA	≥26	23-25	≤22			
CPD	≥21	18-20	≤17	≤2	4	≥8
CPD CLA						

CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, CPD: Sefpodoksim, CLA: Klavulanatlı

Çizelge 2.6. GSBL tarama testi inhibisyon zon çapları ve MİK değerleri (CLSI, 2013)

Antibiyotik	İnhibisyon zonu (mm)	MİK (µg/ml)
CTX	≤27	≥2
CAZ	≤22	≥2
CPD	≤17	≥8

CTX: Sefotaksim, CAZ: Seftazidim, CPD: Sefpodoksim

Fenotipik doğrulama yöntemleri Gram (-) bakterilerde GSBL araştırmasında %100 duyarlı sonuç verebilen olup olmadığı tartışma konusudur. Tüm mikrobiyolojik çalışmalarda bunlardan bahsedilmiştir. Tablodan da görüldüğü gibi CLSI (2013), sıvı mikrodilüsyon testi ile sefotaksim, seftazidim, seftriakson, aztreonam MİK değerlerini ≥2 µg/ml, sefpodoksim MİK değeri ≥8 µg/ml veya disk difüzyon testinde sefpodoksim ≤17 mm, seftazidim ≤22 mm, seftriakson ≤25 mm, sefotaksim ≤27 mm, aztreonam ≤27 mm olarak bulunduğu GSBL varlığı için disk difüzyon doğrulama testi yapılmasını önermektedir. Fakat görüldüğü üzere halen disk difüzyon testinde disklerin merkezden ne kadar uzak olacaklarının kesin bir standardı

bulunmamaktadır. Klavulanik asit içeren antibiyotik diskler piyasada ticari olarak satılmakta veya CLSI (2013) kuralları doğrultusunda laboratuvar koşullarında hazırlanabilir. Öngörülen standartlar ölçüsünde klavulanik asit içeren/içermeyen seftazidim ve sefotaksim diskleri kullanılır. Kombine olan disklerin etrafındaki zonlara bakıldığında klavulanik asit içerenle içermeyen eş diskler arasındaki fark karşılaştırıldığında ≥ 5 mm fark varsa GSBL üretiminin var olduğu öngörülmektedir.

Tanımlama testlerinin temel prensibi genişlemiş spektrumlu beta laktamazın, beta laktamaz inhibitörü antibiyotiğe karşı gösterdiği duyarlılıktan yararlanılmasıyla yapılmaktadır. Şu an için bulunan 7 farklı yöntem aşağıdaki gibidir:

- I. Disk taraması
- II. Disk tarama konfirmasyonu
- III. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi (MİK)
- IV. E test
- V. Boronik asit
- VI. Üç boyutlu test
- VII. Otomatize sistemler

2.6.1. Disk taraması

0,5 McFarland bulanıklık standardı bakteri yoğunluğundaki süspansiyonu Mueller Hinton besiyerine yayılarak, klavulanik asit (10 μg) içeren ve klavulanik asit içermeyen, seftazidim (30 μg) ile sefotaksim (30 μg) diskleri yerleştirilir. Sonrasında bir gün 37°C ' de inkübasyona bırakılır. İnhibisyon zonları ölçülerek klavulanatlı ve klavulanatsız farklar karşılaştırılır. Bu türdeş diskler arasındaki fark ≥ 5 mm olan suşlar, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilir (Gülay, 2004).

2.6.2. Disk tarama konfirmasyonu

McFarland 0,5 bulanıklık olarak hazırlanan bakteri süspansiyonu aynı şekilde MHA besiyerine yayılarak petrinin orta noktasına bir amoksisilin/klavulanik asit diski (AMC 20/10 μg) ile diskin merkezleri arasında 30 mm uzaklık olacak şekilde seftriakson (CRO), seftazidim (CAZ) veya aztreonam (ATM), sefotaksim (CTX), veya sefpodoksim (CPD) antibiyotik diskleri konulur. 18 saat 37°C ' de inkübasyon sonunda, amoksisilin/klavulanik asit diskinin doğru sefalosporin veya aztreonam disklerinin etrafındaki inhibisyon zonunun genişlemesi veya arada bakteri

üremesinin olmadığı bir etkileşim alanı bakterinin GSBL üretim varlığını belirtmektedir (Gülay, 2004).

2.6.3. Sıvı mikrodilüsyon yöntemi

Seftazidim ve sefotaksimın MİK değerleri, tekli ve klavulanik asitli olarak bulunur. MİK değerleri karşılaştırıldığında klavulanik asit ortamında ≥ 8 kat azalma oluyorsa sonuç GSBL (+) olarak belirlenir (Gülay, 2004).

2.6.4. Otomatize sistemler

Bakteriyolojide kullanılan VITEK[®]MS (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) ve BD-Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD/ABD), Mikro-scan panel test gibi otomatize sistemler de GSBL üretimini saptamaktadırlar. Çeşitli kuralları kullanarak GSBL üretimini saptayan bu sistemler karbapenem dirençli *K. pneumoniae* suşları dışındaki tüm penisilinleri, sefolosporinleri ve aztreonamı dirençli kayıt ederler (Endimiani ve ark., 2010).

2.6.4.1. VITEK[®]MS (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) cihazı

Çalışma prensibi olarak kütle spektrometresi temelinde mikrobik tanımlama yapan sistemdir. MASS Spektrometre (MALDI TOF MS; Matriks Yardımcılı Lazer İyonizasyonlu Kütle Spektrometresi 'Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry') yöntemi protein profilini bakteri hücrelerinden çıkararak referans bir spekturum ile karşılaştırma yapması üzerine dayalı identifikasyon yöntemidir (Rıfaat ve ark., 2014).

MALDI; şekerler, peptitler, proteinler gibi biyolojik moleküllerin ve eski iyonizasyon yöntemlerinin kullanılmasıyla parçalanıp dağılmaya eğilimli olan dendrimerler ve polimerler gibi organik moleküllerin analizi, kütle spektrometresi temelli, hassasiyeti yüksek bir teknolojiye dayandırılarak yapılması işlemidir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012). Bu sistem temelinde VITEK[®]MS cihazında kullanılmış ve mikroorganizmaların lazer ışını ile parçalanmasıyla proteinlerin kütle ile orantılı olarak absorpsiyonu sayesinde tanımlanması gerçekleştirilmiştir.

Kütle spektrometre sistemi VITEK[®]MS cihazıyla, mikrobiyoloji laboratuvarında hızlı, doğru ve güvenilir bir bakteri tanımlama sonucu almak için kullanımı tercih edilen bir cihazdır. Coğrafi olarak farklı izolatları, farklı numune kökenleri ve farklı tür besiyeri ortamlarında izole edilen bakterilerin tanımlanmasını yapmaktadır. Türlerin özellikleri kapsamlı olarak cihazın veritabanında bulunmasıyla 1-2 dk gibi kısa bir sürede bakterilerin tanımlanmasını gerçekleştiren cihazdır (bioMerieux, 2013).

Bu sebeplerle özellikle klinik olarak çalışma alanlarında hastanelerde, üniversitelerde, bakteri tanımlanmasına ihtiyaç duyulan her türlü prosede VITEK[®]MS cihazı kullanımını görebilmekteyiz.

2.7. Hayvansal Gıda Kaynağı Kırmızı Et

Kırmızı et, memeli hayvanların vücutlarını saran protein ve yağ içeriği bakımından zengin kas dokusudur. Türkiye’ de kırmızı et denildiğinde akla büyükbaş ve küçükbaş hayvanlar olan sığır, dana, koyun, keçi vb. kasaplık hayvanlar gelmektedir. Bu hayvanların derilerinin yüzülerek iç organlarının çıkarılması sonucunda geriye kalan kemikli karkasta kırmızı et olarak yenilebilen kısım bulunmaktadır (Gökten, 1990).

Kırmızı etlerin yağ oranı hayvanların beslenmesi, hangi mevsimde kesildiği gibi faktörlere göre değişmekle beraber yaklaşık %30 civarındadır. Kas yapısında, miyofibril ve sarkoplazmik proteinleri içermektedir. Etin pH’ sı 7 civarında ve su oranı %70’ dir. Kırmızı et birçok besleyici protein yağ ve vitaminler gibi öğeleri bünyesinde barındıran vazgeçilmez bir gıda kaynağıdır. Zengin içeriğinden dolayı mikrobiyolojik olarak birçok bakterinin gelişimi kırmızı ette kolaydır (Gökten, 1990).

Etin hijyenik ortamda kesilip kesilmediği gibi konuda bilgi almanın en doğru yolu bağırsak kökenli mikroorganizmaların varlığına bakılmasıdır. Gıda üretiminde hijyen ve sanitasyonun indikatörü bu mikroorganizmalardır. Ette indikatör olarak *Enterobacteriaceae*, *E. coli*, toplam koliform, fekal koliform sayıları önemlidir. Bunlar bağırsak orjinli kontaminasyonu göstermektedirler. *Enterobacteriaceae* doğada serbest halde yaşamasıyla beraber dış çevreden gelen kontaminasyonu da belirtir (Ünlütürk ve ark., 1999).

Sağlıklı bir hayvanın kas sisteminde patojen bakteriler bulunmamaktadır. Kesim sırasında yenilebilir kırmızı et kısmına deri veya hayvanın mide ve bağırsaklarında ki mikrofloradan bakteriler kontamine olabilmektedir. Kesim aletleri, insanlar, su ve toprak da kontaminasyonu destekleyebilir (Göktaş, 1990).

2.7.1. Dünya et üretim ve tüketiminde gelişmeler

FAO' ya göre 2012-2021 yılları arasında, Asya kıtasında et ürünlerine talepte artış beklenmektedir (FAO, 2011). 2021 yılına kadar et üretiminde, artışın büyükbaş hayvan etinde %16, koyun etinde %21 oranında olacağı öngörülmektedir. Gelişmekte olan ülkelerde ve dünyada artan nüfustan kaynaklı et üretiminin artacağı ve önümüzdeki 10 yıl boyunca böyle süreceği öngörülmektedir. Dünya et ticaretinin 2021 yılına kadar toplamda %1,5 oranında artış göstermesi beklenmektedir. Dünya' da et üretim miktarları Çizelge 2.7' de yer almaktadır (FAO Gıda Öngörülere, 2010/2011). Dünya' da ülkelerin et üretim dağılımları Şekil 2.5' de gösterilmiştir (OECD – FAO, 2012).

Sığır eti ve dana eti karkas üretiminin dünyada 65,2 milyon ton, koyun ve keçi eti karkas üretiminin ise 13,1 milyon ton olacağı öngörülmektedir. Dünya' da kişi başına et tüketimi yıllık; Brezilya' da 95,1 kg, Kanada' da 82,7 kg, AB' de 77,1 kg, Rusya' da 58,7 kg, ABD' de 107,5 kg, Avustralya' da 91,4 kg' dır (FAPRI, 2012). Ülkelerin kişi başına kırmızı et tüketimi (kg/kişi), 2010 yılı verileri Şekil 2.6' da değinilmiştir.

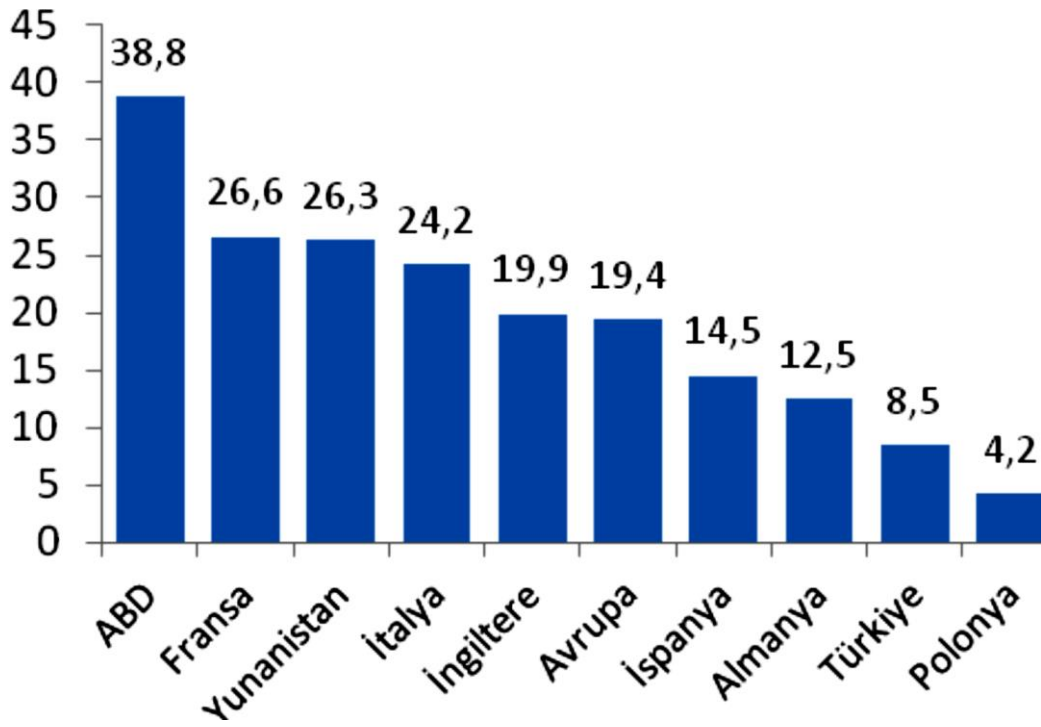
Çizelge 2.7. Dünya' da et üretim miktarları (FAO Gıda Öngörülere, 2010/2011; FAO, 2015)

Milyon ton	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015(Ö)	2015(D)
Beyaz ve kırmızı et toplam üretim	279,3	283,6	294,6	297,2	302	308,5	311,8	308,3	% -1,1
Dana eti	65,4	65	67,5	67,5	67,5	67,7	68	67,2	% -1,1
Koyun eti	12,9	12,9	13,5	13,5	13,6	13,9	14	13,8	% -1

Ö: Öngörü D: Değişim



Şekil 2.5. Ülkelerin et üretim durumu bin ton bazında (FAO istatistik kitabı, 2012).



Şekil 2.6. Ülkelere göre yıllık kırmızı et tüketimi (kg/kişi) (BMI, 2010).

2.7.2. Türkiye et üretim ve tüketiminde gelişmeler

Türkiye’ de 2011 yılı sonunda toplam büyükbaş hayvan sayısı 12 483 969 baştır. Büyükbaş hayvanların dağılımı; sığır sayısı 12 386 337 baş, koyun sayısı 25 031 565 baş olarak kayıt altına alınmıştır (TUİK, 2012a). Ortalama karkas ağırlığı sığır başına 220 kg olarak hesaplanırsa, üretim yıllık toplam kırmızı ette 776 915 ton (sığır eti üretimi 644 906 ton, manda eti üretimi 1 615 ton, koyun eti üretimi 107 076 ton) olarak gerçekleşmiştir.

Mayıs 2014 TÜİK verilerine göre büyükbaş hayvan sayısı 14 898 533, küçükbaş hayvan sayısı 42 372 432 baştır (TUİK, 2014a).

2014 yılı toplam sığır eti üretimi 881 999 ton, koyun eti üretimi 98 978 ton olarak belirtilmiştir (TUİK, 2014b). Çizelge 2.8’ de yıllara göre Türkiye’ de kırmızı et üretimi verilmiştir (TUİK, 2012b; TUİK, 2014a; TUİK, 2014b).

Kişi başı hayvan tüketimi ise ülkeden ülkeye değişmektedir. Türkiye’ de kişi başına düşen ortalama kırmızı et tüketimi 2012 yılında 12 kg/yıl dır (FAPRI, 2012). Türkiye’ de et tüketimi görüldüğü gibi diğer ülkelere göre düşük kalmaktadır. Kırmızı et tüketiminin düşüklüğünün ekonomik nedenlere bağlı olduğu bilinmektedir. Bunun yanında nüfus yapısında meydana gelen değişimler ve yıllık nüfus artışı, tüketici tercih durumları, tüketicinin eğitimi, ürün kalitesi, dağılımı, etlerin gıda hijyen kurallarına uygunluğu, gıda ile ilgili reklamlar, sağlık sorunları, dini inançlar, gelenekler, iklim gibi pek çok etken tüketimi belirlemektedir (Şeker ve ark., 2011; Ergönül, 2011).

Çizelge 2.8. Türkiye’ de kırmızı et üretimi (ton) (TUİK, 2012b; TUİK, 2014a; TUİK, 2014b).

ET	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015 *
Kırmızı	482 443	412 599	780 718	776 915	915 845	996 155	1 008 272	202 601
Sığır	370 619	325 286	618 584	644 906	799 344	869 292	881 999	184 511
Koyun	96 738	74 633	135 687	107 076	97 334	102 943	98 978	18 090

*: İlk 4 aylık dönem, Ocak, Şubat, Mart, Nisan.

2.8. Dünya' da Yapılan Çalışmalar

Guerra ve arkadaşları (2003) Almanya' da 1999-2001 yıllarında yaptığı çalışmada sığır, kümes hayvanları ve domuzdan *Escherichia coli* suşlarını izole edip antibiyotik dirençliliğini fenotip-genotip yöntemlerle tespit etmişlerdir. Almanya' da hayvansal gıda ürünlerinde GSBL üreten *E. coli* suşlarının %25 oranında olduğu belirtilmiştir.

Geser ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada, kesimhanelerdeki sığır, koyun, tavuk ve domuzlardan temin edilen 334 dışkı örneğini, 104 sığır eti ve domuz kıyması örneklerini GSBL üreten mikroorganizma yönünden incelemişlerdir. Dışkı örneklerinde GSBL üreten enterik mikroorganizmaların, sığırdan %13,7, koyunda %8,6 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Toplamda 91 adet GSBL üreten enterik mikroorganizmanın hemen hemen hepsi 89 adetinin *E. coli* olarak izole edildiğini belirtmişlerdir. Diğer iki tiplendirmenin ise, 1 adet *Citrobacter youngae* koyunda ve diğer 1 adet *Enterobacter cloacae* sığırdan izole edildiğini belirtmişlerdir. Kıymalarda ise GSBL üreticisine rastlanmadığını belirtmişlerdir. Son zamanlarda ülkelerde yapılan farklı çalışmalarda, özellikle sığırlarda GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının yaygın olduğunu belirtmişlerdir.

Reist ve arkadaşları (2013) İsviçre' de kesimhanelerde yaptıkları araştırmada genç iki yaşından küçük 517 adet sığırın dışkılarında 48 adet GSBL üreten *Enterobacteriaceae* saptamış, bunlardan 46 adet *E. coli*, 1 adet *Enterobacter cloacae*, 1 adet *Citrobacter youngae* bakterilerinin olduğunu belirtmişlerdir. 48 izolattan 45' i (%93,8) sefuroksim, 1' i (%2,1) sefoksitin, 28' i (%58,3) sefotaksim, 2' si (%4,2) seftazidim, 2' si (%4,2) sefepimedden izole edilen dirençli bakteriler olduklarını belirtmişlerdir.

Saenz ve arkadaşları (2001) İspanya' da 1997-1999 yılında yaptıkları çalışmada, insan ve hayvan dışkılarından, hayvansal gıdalardan 532 adet örnekten 474 adet antibiyotiğe dirençli *E. coli* izole ettiklerini belirtmişlerdir. Hasta olan insanlardan 235 adet, en az 3 ay süreli antibiyotik kullanmayan sağlıklı insanlardan 45 adet dışkı örneği, aynı zamanda sağlıklı hayvanlardan 40 adet tavuk ve 74 adet domuzdan kesimhanelerde dışkı örneği alınmış, ayrıca 25 adet köpek, 5 adet kedi, 35 adet boğa ve 5 adet attan dışkı örnekleri topladıklarını belirtmişlerdir. 69 adet kanatlı eti ise marketlerden temin edilmiş. Boğalardan 32 adet *E. coli* izole edildiğini

belirtmişleridir. Böylece hesaplandığında boğaların dışkısından %91,4 oranında antibiyotiğe dirençli *E. coli* tespit edildiği çalışmaları görülmektedir.

Madec ve arkadaşları (2008) Mart-Kasım 2006 tarihleri arasında Fransa’ da yaptıkları çalışmada, 657 hasta sığır çiftlik hayvanından topladıkları dışkı numunelerini seftazidim ve sefotaksim takviyeli agar üzerine ekmişler ve 117’ sinde koloni oluşumu olduğunu belirtmişlerdir. GSBL test şeritleriyle MİK belirlendikten sonra 52’ sinde GSBL veya sefalosporinaz üreticileri tespit edildiğini yazmışlardır. Bakteri türleri; 41 adet *E. coli*, 7 adet *Acinetobacter* spp., 2 adet *Pseudomonas aeruginosa*, 1 adet *Citrobacter freundii* ve 1 adet *Hafnia alvei* olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. 41 adet *E. coli*’ nin PCR ile gen analizleri sonucunda 17 tanesinin GSBL üreticisi genlere sahip olduğunu belirtmişlerdir. Böylelikle hasta hayvanların dışkılarında 657 tane örnekten 17 (%2,6) GSBL üreticisi tespit edildiği belirtilmiştir.

Madec ve arkadaşları (2008) aynı çalışmada Mart 2005-Haziran 2006 tarihleri arasında 607 sağlıklı sığırdan aldıkları dışkı numuneleriyle de aynı çalışmayı yapmışlardır. 61 koloni oluşumu görülmüş, sonrasında 46’ sında GSBL veya sefalosporinaz üreticileri tespit edildiğini belirtmişlerdir. Bu bakteriler; 35 adet *E. coli*, 8 adet *Acinetobacter* spp., 1 adet *Pseudomonas aeruginosa*, 1 adet *Enterobacter cloacae*, 1 adet *Hafnia alvei* olarak dağılım gösterdiğini yazmışlardır. 35 *E. coli*’ de PCR ile gen analizi sonrasında 25 adetinin GSBL üreticisine sahip olduğunu yazmışlardır. Böylelikle sağlıklı hayvanların 657 adet dışkı örneğinden 25 (%4,1) GSBL üreticisinin tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Hordijk ve arkadaşları (2013) Hollanda’ da 1997-2010 yılları arasında dana yavrusu buzağılardan dışkı örneklerinden izole *E. coli* bakterisinin GSBL/AmpC genlerinin sıklığı ve moleküler özellikleri üzerinde çalışmalarını yapmışlardır. 1997 ve 2010 yılları arasında her yıl yaptıkları çalışmada sefotaksim dirençli *E. coli* sıklığı (1997-2005 ve 2006-2010) yıllarında sürekli olmayan artış trendi göstererek 1998 (%4), 1999’ dan 2010’ a kadar (%39) olduğunu belirtmişlerdir.

Rasheed ve arkadaşları (2014) Hindistan’ da yaptıkları çalışmada 150 adet farklı gıda gruplarında 30 sebze salatası, 30 çiğ yumurta yüzeyi, 30 çiğ tavuk, pastörize edilmemiş süt ve 30 çiğ et numunelerinde, antibiyotiğe dirençli GSBL üreten *E. coli* izole ettiklerini belirtmişlerdir. *E. coli* izolatlarında ilaç direnci yüksek yüzdeler; sebze salatası (%20), çiğ et (%13,3), çiğ yumurta yüzeyi (%10) çiğ tavuk (%23,3) ve

pastörize edilmemiş sütte (%6,7) olarak saptandığını belirtmişlerdir. Antibiyotiğe dirençli *E. coli* prevelansı tüm gıda örneklerinde toplamda %14,7 olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. Bunlardan ise GSBL üreten *E. coli* tüm gıda örneklerinde toplamda %4 oranında bulunduğunu belirtmişlerdir. 30 adet taze koyun eti örneğinde metod kurallarına göre yapılan çalışmada antibiyotiğe dirençli *E. coli* 4 adet (%13,3) iken sonraki aşamada GSBL üreten *E. coli* 1 adet (%3,3) oranında tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Peternel ve arkadaşları (2014) Avusturya’ da Eylül 2011-Eylül 2012 tarihleri arasında 100 adet karışık et kıyması (dana ve domuz eti) süpermarket ve kasaplardan temin ettikleri örnekler üzerinde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* türlerini araştırmışlardır. Çalışmalarının sonucunda GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarından sadece *E. coli*’ nin tek tür olarak 20 adet (%20) oranında izole edildiğini belirtmişlerdir. İlerisinde genotipik olarak analiz edildiğinde bu *E. coli* izolatlarında 24 ayrı GSBL üreten direnç modelleriyle karşılaşıldığını belirtmişlerdir. 18 adet CTX-M-1, 2 adet CTX-M-4, 1 adet CTX-M-32, 2 adet TEM-52, 1 adet SHV-12 olarak GSBL üreten gen tiplerinin dağılımlarını belirtmişlerdir.

Cavaco ve arkadaşları (2008) Danimarka’ da domuzlardan izole ettikleri *E. coli* suşlarının üçüncü nesil genişlemiş spektrumlu beta laktam sefotaksim cinsi antibiyotiğe karşı dirençli olduklarını ve gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda bu tip antibiyotiklerin mutlaka veteriner kontrolünde kullanılmaları gerektiğini bildirmişlerdir. Hayvanların bağırsak florasında GSBL üreten bakteri genlerinin varlığı ve bu genlerinde bakteriler arası yatay geçişinin olabileceğini belirtmişlerdir. Hayvandan insana dirençli bakteri ve dolayısıyla dirençli genlerin geçişinin mümkün olabileceğini ifade etmişlerdir.

Knothe ve arkadaşları (1983) yaptıkları çalışmada *Klebsiella pneumoniae* suşlarından izole edilen plazmid gen aktarım aracının sefotaksim, sefalosporin, penisilin ve gentamisine karşı dirençleri hassas suşlara aktardığını, sefalosporin direncinin plazmidle yayıldığını ve son kuşak beta laktam antibiyotik direncinin *E. coli*’ ye kolaylıkla aktarıldığını yazmışlardır.

2.9. Türkiye’ de Yapılan Çalışmalar

Arslan ve Eyi (2011) Kasım 2007- Mayıs 2008 tarihleri arasında Bolu’ da yaptıkları çalışmada, 168 adet parekende 56 sığır eti, 56 sığır kıyma ve 56 kanatlı eti örneklerinde, 72 (%42,9) *E. coli* izole etmiştir. Bunlardan 48 (%66,7) kanatlı etinde, 13 (%18,1) dana kıymasında ve 11 (%15,3) dana etinde GSBL üreten *E. coli* tespit edilmiştir.

Gündoğan ve Avcı (2013) Temmuz 2010 ile Mart 2011 tarihleri arasında Ankara’ da yapılan çalışmada çiğ tavuk but ve çiğ dana kıyma, çiğ süt, beyaz peynir ve dondurmada GSBL üreten mikroorganizma taraması yapıldığını belirtmiştir. 50 adet *Klebsiella oxytoca*, 45 adet *Escherichia coli* ve 13 adet *Klebsiella pneumoniae* GSBL ürettiği bulunmuş, 15 dana kıymasında *E. coli* 5 adet (%25), *K. pneumoniae* 1 adet (%20), *K. oxytoca* 4 adet (%30,8) olmak üzere toplamda 10 adet (%26,3) dirençli GSBL (+) olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir.

Mahmood ve Büyükunal-Bal (2014) antibiyotik direnci gösteren *Enterobacteriaceae* suşlarının hayvan ve insan sindirim sistemleri arasında *in vivo* plazmitden kaynaklı geçiş olduğuna yönelik çalışma yapmışlardır. Asıl konunun bakteri ve plazmit kaynaklı bakteri direncinin hayvanlardan insanlara nasıl geçebildiği hususunda durmuşlardır. Çiftlik hayvanları ve temas halindeki çiftlik çalışanlarından izole edilen bakteriler arasındaki direnç profillerinin benzer olduğunu belirtmişlerdir. Direkt kanıtların insan ve hayvanlarla ilişkili zoonotik bakterilerin dirençle ilgili plazmitlerin moleküler metodlarla bulunduğunu belirtmişlerdir. Antibiyotiklerin çiftlik hayvanlarında kullanıldığını ve dirençli bakterilerin antibiyotik tedavisi almış çiftlik çalışanı ve çiftlik hayvanlarında varlıkları hususunda durduklarını belirtmişlerdir.

Deveci ve arkadaşları (2010) yaptıkları çalışmada insan idrar örneklerinden izole edilen *E. coli*’ de GSBL prevalansını %13 olarak tespit etmiş ve direnç oranlarının suşlarda yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

Güdücüoğlu ve arkadaşları (2007) Haziran 2005-Haziran 2006 tarihleri arasında yaptıkları çalışmada yatan ve poliklinikte tedavi gören hastalardan 1 yıl süresince laboratuvara gönderilen örneklerden hastane ve toplum kaynaklı *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarında GSBL üretimini ayrıca GSBL üretim gösteren ve göstermeyen suşlarda da diğer antibiyotiklere direnç oranlarını araştırmışlardır. İzole edilen 672 adet *E. coli* suşunun 193'ünde (%29), 154 adet *K. pneumoniae* suşunun 75'inde (%49) GSBL üretimi tespit etmişlerdir. Poliklinik hastalarından izole edilen *E. coli* suşlarından %18' i ve *K. pneumoniae* suşların %30' u, yatan hastalarda *E. coli* suşu %47 ve *K. pneumoniae* suşunun %63 GSBL üreticisi olarak dağılım gösterdiğini belirtmişlerdir.

3. MATERYAL VE YÖNTEMLER

3.1. Materyal

Çalışmada materyal olarak kullanılmak üzere alınan numuneler; 110 adet çiğ et örnekleri olup 65 adet çiğ dana eti ve 45 adet çiğ koyun eti olarak tedarik edilmiştir. Numuneler Ekim-Aralık 2014 tarihlerinde İstanbul ili ve Marmara Bölgesi'nde yerleşik diğer illerden (Bursa, Tekirdağ, Yalova) rastgele olarak gıda perakende sektörü, kasap, market ve kesimhanelerden her biri en az 50 g olacak şekilde toplanmıştır.

Tüm numuneler steril tek kullanımlık kesicilerle alınarak, steril numune torbalarının içine yerleştirildi. Alınan numune materyaller soğutuculu gıda taşıma kabı (AND-JYA24) ile 4°C' de saklama koşulu sağlanmış kapaklı özel numune taşıma kutusunda analiz işlemlerini başlatmak üzere laboratuvara getirildi.

3.1.1. Kullanılan laboratuvar gereçleri ve cihazlar

Laboratuvar gereçleri ve aletler:

- i. Steril pamuklu eküvyon çubuğu
- ii. Petri (tek kullanımı için 90 mm çapta plastik steril üretim)
- iii. Öze (tek kullanım için plastik amaçlı steril üretim)
- iv. Bek alevi, beherglass, spatül, neşter, pens, alkol, pamuk, kağıt havlu.
- v. Sterilize edilmiş tuz-su çözeltisi (NaCl₂ %0,85)
- vi. 0,5 McFarland standardında solüsyon (YouLI, 2014)
- vii. Kapaklı deney tüpleri, tüplük, magnet balıklar
- viii. Steril filtreli karıştırma torbası (Interscience bag system)
- ix. Otoklav torbası, steril eldiven (Broche)
- x. Otoklava dayanıklı cam şişe, 250, 500, 1000 ml' lik, plastik kapaklı.
- xi. Otomatik Pipet: 1 ml (Rainin)
- xii. 8 uçlu otomatik pipet 1 ml (Rainin)
- xiii. Tek kullanımlık steril pipet uçları 100 µl, 200 µl (Rainin)

Elektrikli cihazlar

- i. Su banyosu (Nüve- ST30)
- ii. Hassas Terazî (AND GF/GX)
- iii. Buzdolabı (Beko) (4-6 °C)
- iv. Stomacher (Blender easyMIX™) karıştırıcı
- v. Distile su cihazı (GFL)
- vi. İnkübatör (37°C) (Nüve-EN500P)
- vii. Otoklav (JSR-JSAX), Numune taşıma kutusu soğutuculu (AND-JYA24)
- viii. Mikrobiyoloji kabini (Chemocell LRC X UV)
- ix. Merlin MCN6 yazılımlı bilgisayar (Casper), yazıcı (hp)
- x. Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Mikroplate Spektrofotometre
- xi. Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Dragon-Med – 81322102)

3.1.2. Kullanılan besiyerleri ve içerikleri

3.1.2.1. *Enterobacteriaceae* Enrichment buyyon (EE buyyon)

Enterobacteriaceae spp. ailesi bakterilerinin gelişimini destekleyen içeriğiyle seçici bir sıvı besiyeridir. EE buyyon (Mossel-7603), gıdada ve yemlerde bulunan *Enterobacteriaceae*' nin ekimi ve zenginleştirme işlemi için kullanılır. EE buyyon, Mossel *Enterobacteriaceae*' nin büyümesini kolaylaştırmak için Mossel, Visser ve Cornelissen tarafından geliştirilmiştir (Mossel ve ark., 1963).

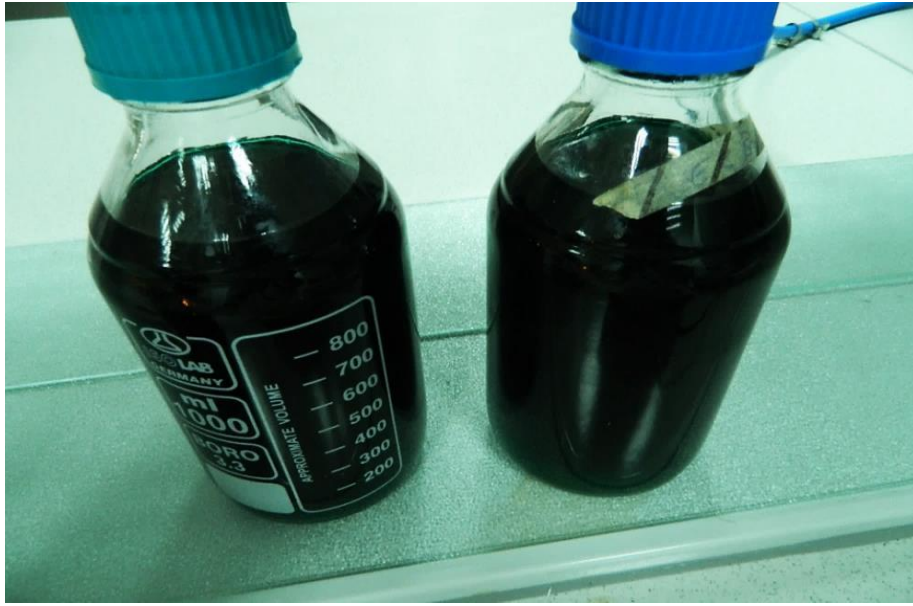
Enterobacteriaceae organizmaları, düşük sıcaklık, alt marjinal ısı, kurutma, radyasyon, koruyucu, ya da sanitasyona maruz kalma gibi gıda işleme prosedürlerinde yara almış olabilir. EE buyyon, Mossel hasarlı veya yaralanan hücrelerin iyileşmesi için zengin bir ortam sağlayarak, zenginleştirme suyu olarak kullanılmaktadır (Hartman ve Minnich, 1981). *Enterobacteriaceae* gıda da önemli bir ölçüdür. Hasarlı hücreler seçici ortam üzerinde koloniler oluşturmasa bile yutulduğunda enfeksiyona neden olabilir (Sorrells ve ark., 1970).

Bileşiminde dekstroz, azot, vitaminler ve amino asitler içerir. Çizelge 3.1' de içeriğine değinilmiştir. Ayrıca içeriğinde sodyum fosfat ve potasyum fosfat içermesiyle bakteriler gelişirken oluşturdukları asidi tamponlayarak ortamda ki olumsuz etkiyi önler.

45 g EE buyyon (Mossel-7603) tartılarak 1 L suda süspanse edilir. 100°C’ deki su banyosunda 30 dk bekletilir. Otoklavlanmaz. Finalde pH: 7,2±0,2 25°C’ de koyu siyah-yeşilimsi renktedir (Şekil 3.1).

Çizelge 3.1. Toz EE buyyon içeriği

İçindekiler	Miktarı (g/L)
Kurutulmuş dana safrası	20
Enzimatik jelatin	10
Sodyum fosfat dibazik	8
Dekstroz	5
Potasyum fosfat, monobazik	2
Parlak Yeşil	0,015



Şekil 3.1. Su banyosundan sonra kullanıma hazır *Enterobacteriaceae* Enrichment buyyonun görünüşü

3.1.2.2. Chromatic™ GSBL agar

Paketinde hazırlanışı kısmında yazılan prosedür uygulanır. Toz formundaki GSBL agar (Liofilchem 610629, İtalya) 59,2 g/L şeklinde tartılarak besiyeri hazırlanır. Karışımın hızlı ve topaklanmaması için ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözündürülür. Otoklavda 121°C’ de 15 dk steril edilerek besiyeri hazırlanmış olunur. Steril edilen besiyeri 50 °C’ ye kadar soğutulduktan sonra içerisine toz GSBL+AmpC steril ampülü (Liofilchem 81090, İtalya) eklenir, manyetik karıştırıcıda iyicene

özündürölür ve çözelti tek kullanımlık steril plastik petri kaplarına dökölerek besiyerinin kalıplaşması beklenir. 4°C' ye ayarlı buzdolabı ortamında kullanıma kadar muhafaza edilir (CLSI, 2013).

Stomacher torbalarında 1 gün inkübasyona bırakılan ve EE buyyonda ki oluşumları koloni halinde gözlemleyebilmek amacıyla kullanılan seçici agardır. İçeriği izelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Toz GSBL agarın içeriği

İçindekiler	Miktarı (g/L)
Pepton karışımı	43,2
Agar	15
Kromojenik karışım	1
Selektif karışım	0,5

3.1.2.3. Mueller Hinton agar (MHA)

Paket üzerindeki hazırlanış prosedürüne bakılarak, 34 g toz Mueller Hinton agar (Merck-1.05437) tartılıp 1 litre saf su ile karıştırılır. Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı kullanılarak topraklanması engellenir. Çözelti otoklavda 115°C' de 10 dk bekletilir. Steril özelti 45°C olana kadar soğutulup tek kullanımlık steril plastik petri kaplarına dökölür. Kullanılana kadar 4°C' de buzdolabında muhafaza edilir.

Mueller Hinton agar (CLSI, 2013) yönergesinde kullanılan, hızlı bir şekilde bakteri izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını belirlemek için öngörölmüş ve bu işleme bağdaşmış bir agardır. İçeriği izelge 3.3' de yer almaktadır.

Çizelge 3.3. Toz MHA içeriği

İçindekiler	Miktarı (g/L)
Kazein Hidrolizat	17,5
Agar-agar	13
Et İnfüzyonu	2,0
Nişasta	1,5

3.1.2.4. Mueller Hinton buyyon (MHB)

Antibiyotik duyarlılık çalışmaları (MİK-determinasyon) için kullanılan sıvı bir besiyeri ortamıdır. Mueller Hinton buyyon (Merck-110293) minimal inhibitör konsantrasyonunu (MİK) belirlemek için kullanılır. Mueller Hinton gıda ve klinik malzemede en sık karşılaşılan aerobik ve fakültatif anaerobik bakteri testi için FDA ve WHO tarafından tavsiye edilmektedir (CLSI, 2013).

34 g tartılarak 1 L suda çözündürülür. İyiye çözündürülmesi için manyetik karıştırıcı kullanılır. Otoklavda 115°C' de 10 dk sterilize edilir. pH, 25°C' de 7,4±0,2' dir.

Mueller Hinton içeriği, sığır ekstraktı, kazein, azotlu bileşikler, vitaminler, karbon, kükürt ve amino asidine sahiptir. Nişasta ise, üretilen herhangi toksik metabolitleri emmek için ilave edilmiştir. İçeriği Çizelge 3.4' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Mueller Hinton buyyon içeriği

İçindekiler	Miktarı (g/L)
Kazein hidrolizat	17,5
Et infizyonu	2,0
Mısır nişastası	1,5

3.1.2.5. Triptik Soy agar (TSA)

TSA (Merck 1.05458) bakterilerin rutin üretimleri için tercih edilen bir agardır. TSA deney tüpleri veya petrilere eklendikten sonra zor veya orta düzey gelişim sağlayabilen mikroorganizmaların gelişimlerini sağlamak için kullanılmaktadır. Özel amaçlı bir besiyerdir. İçeriği Çizelge 3.5' de verilmiştir. *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella* gibi bakterilerde üreme iyi sonuç verdiği için kullanılmaktadır. Besiyerinde ki, kazein, soya, organik nitrojen aminoasitler bakterilere iyi birer besin sağlamaktadır. Mikroorganizmalar için besiyeri olarak, kültürlerin stoklanıp korunması, çeşitli ortam ve maddelerden mikroorganizmanın izolasyonu, plak sayım gibi çeşitli alanlarda TSA tercih edilmektedir (MacFaddin, 1985; Nash ve Krenz, 1991). Atık ve temiz su, gıda analizleri için birçok aşama ve yöntemlerde kullanılmaktadır (Eaton ve ark., 1995; Downes ve Ito, 2001).

Hazırlanması, 40 g tartılarak 1 L saf suda çözündürülür. 121°C' de 15 dk sterilizasyonu sağlanır. 25°C' ye düştüğünde pH: 7,3±0,2' dir. Steril petriye 12,5 ml aktarılır. Buzdolabı koşullarında muhafazası sağlanır.

Çizelge 3.5. Triptik Soy agar (TSA) içeriği

İçindekiler	Miktarı (g/L)
Peptonlu Kazein	15,0
Peptonlu Soya Fasulyesi	5,0
Sodyum Klorür (NaCl)	5,0
Agar-agar	15,0

3.2. Yöntemler

Bu çalışmada, kırmızı et numunelerinde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) mikroorganizmaların varlıklarını tespit edebilmek için ISO/DIS 21528-2 (ISO/TC34/SC9) Gıda zincirinde mikrobiyoloji tespiti ve *Enterobacteriaceae* sayımı için yatay yöntemleri ve bölüm 2: Koloni sayım yöntemi (Microbiology of the food chain. Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. Part 2: Colony-count method) talimatları takip edildi. Disk difüzyon, disk difüzyon konfirmasyonu, antibiyogram doğrulama ve MİK değerleri CLSI (2013) talimatlarına uyularak test edildi.

Araştırmada CLSI tavsiyeli kontrol suşları *Escherichia coli* ATCC® 25922 GSBL negatif kontrol ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC® 700603 GSBL pozitif kontrol suşları fenotipik olarak VITEK®MS ile bakterilerin identifikasyonunda kullanılmıştır.

3.2.1. Numunelerin analize hazırlanması

Tüm analizler, bek alevi ortamında steril koşullarda çalışıldı. Numune almak için kullanılan kesici, pens ve spatula gibi bütün araçlar dikkatli bir şekilde %96' lık etanol (24102 Sigma-Aldrich) içine daldırılarak bek alevinde yakılarak sterilize edildi.

Laboratuvara analize getirilen numuneler katı yapıda olduğu için karot yöntemiyle laboratuvar terazisinde (AND GF/GX Japonya) 25 g olacak şekilde tartıldı.

3.2.2. Ön zenginleştirme işlemi

Steril karıştırma torbası (Interscience, France) kullanılarak, 25 g çiğ et ve üzerine, önceden otoklavlanıp steril edilen mezür yardımıyla 225 ml *Enterobacteriaceae* Enrichment buyyon eklendi. İçi filtreli karıştırma torbasında ağzı kilitli bir yapıda, 2 dk stomacher cihazında süspansiyon edildi. Süspansiyonlar 37°C' de 18-24 saat inkübatörde aerobik koşullarda bırakıldı.

Şekil 3.2' de tartım işlemi ve stomacher cihazı, Şekil 3.3' de tartımı yapılmış kırmızı et numunelerine eklenen EE buyyonun inkübasyona hazır durumu gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Tartım işlemi ve stomacher cihazı



Şekil 3.3. Stomacher cihazında filtreli torba içerisinde süspansiyon edilmiş kırmızı et numunelerinin inkübasyona hazır hali

3.2.3. Selektif besiyerine geçişi

24 saat inkübasyona bırakılan et numuneleri inkübatörden çıkarıldı (Şekil 3.4). Ön zenginleştirme işlemleri tamamlanan kırmızı etler-EE buyyon süspansiyonundan, 10 µl hacmindeki steril öze ile bir koloni alındı. Alınan koloni oda sıcaklığına ulaşmış Chromatic™ GSBL selektif besiyerine çizgiler halinde sürülerek ekimi yapıldı. Numuneler bu çalışmada aranan *Enterobacteriaceae* Gram (-) bakterilerin solunumu göz önüne alınarak aerobik ortamda 37°C' de 18-24 saat inkübasyonda bekletildi.

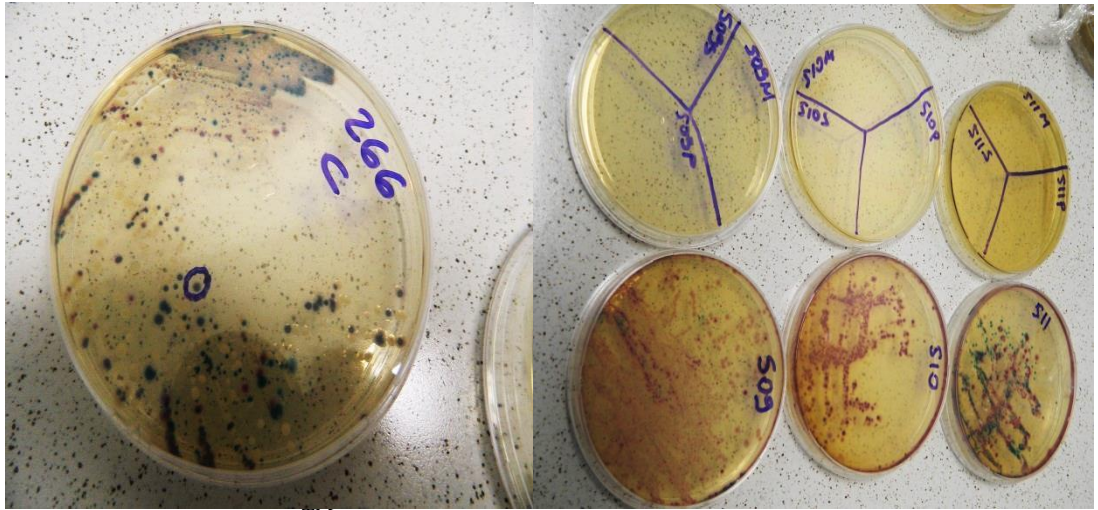
İnkübasyondan sonra oluşan renklere bakılarak; mavi-yeşil koloniler *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Klebsiella* spp., kırmızı-pembe-mor rengi koloniler *E. coli* spp., beyaz-sarımtırak renk koloniler *Acinetobacter* spp. olduğu doğrultusunda renklerine bakılarak tahmin yürütüldü.

Renkleri birbirine karışmamış saflığa yakın pembe, mavi, beyaz kolonilerden, öze yardımıyla rengin en parlak ve temiz görüldüğü noktadan örnekler alınarak tekrar Chromatic™ GSBL agar ortamına alt kültürleme yapıldı (Şekil 3.5). Numuneler tekrar aerobik koşullarda 18-24 saat 37°C' de inkübe edildi. Bu işlemin amacı, saflaştırılmak istenilen koloninin petride karışık halde bulunan diğer renkteki kolonilerden ayırmak ve seçici besiyeri ortamına tekrardan inoküle ederek saf kolonilerin daha fazla üremesini sağlamaktır.

24 saat sonra inkübasyondan alınan petrielerde, renklerinde saflık görülen kolonilere oksidaz negatif testi yapıldı. Bu çalışmada, taraması yapılacak bakteri türü *Enterobacteriaceae* Gram (-) olduğu için oluşan kolonilere oksidaz negatif testi yapılarak Gram (-) koloniler tespit edildi. Bunun için mikrobiyolojik oksidaz test çubukları (Merck, Germany) kullanıldı. (Şekil 3.6).



Şekil 3.4. Ön zenginleştirilmesi yapılmış kırmızı et numunelerinin görünümü



Şekil 3.5. Chromatic™ GSBL agarda üreyen pembe, mavi, beyaz kolonilerin alt kültür geçilmesi işlemi



Şekil 3.6. Alt kültüre geçilen pembe, mavi, beyaz kolonilerin oluşumu ve oksidaz negatif testi

3.2.4. Disk difüzyonu testi

GSBL şüpheli kolonilerin antimikrobiyal duyarlılıkları CLSI (2013) talimatına uyularak test edildi.

Buna göre GSBL şüpheli kolonilerin analizleri; sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg), sefpodoksim (10 µg) diskleriyle (Bioanalyse-Türkiye) yapıldı.

Chromatic™ GSBL agarda oluşan saf koloniden pamuklu eküvyon çubukla alınarak, steril %0,85' lik 5 ml tuzlu suya (NaCl₂), süspansiyon yoğunluğu 0,5 McFarland (BBL McFarland Turbidity Standard) (10⁸ kob/ml) olacak şekilde aktarıldı. Süspansiyon yoğunluğu dansitometre (DM40-Mettler Toledo) kullanılarak ayarlandı.

Mueller Hinton agar yüzeyine süspansiyon, petrinin her yerine eşit yayılacak şekilde steril pamuklu çubukla sürüldü. 3-5 dk besiyerinin sıvıyı absorplaması için beklendi (CLSI, 2013).

Steril pensle sefpodoksim, seftazidim ve sefotaksim diskleri Mueller Hinton agar üzerine, antibiyotik disk etrafında oluşacak zonlar birbirini egale etmeyecek şekilde, disk kullanım talimatlarına ve CLSI (2013) standartlarına uyularak yerleştirilmesi yapıldı.

Antibiyotik diskler, disk merkezleri baz alınarak birbirinden en az 25 mm, petri kabının kenarından ise en az 15 mm uzaklıkta olacak şekilde yerleştirildi (CLSI, 2013). Şekil 3.7' de antibiyotik diskler gösterilmiştir.

Disklerin konumlandırıldığı petriler 37°C' de 18-24 s inkübasyonda bırakıldı ve inkübasyon sonrası disk etrafında oluşan zonlar cetvelle ölçülerek kaydedildi. Ölçümü yapılan diskler tekrar 24 s inkübasyona bırakılarak oluşan zonlarda değişim olup olmayacağına bakıldı.

Dirençli bakterilerin disk difüzyonu testiyle belirlenebilmesi için, 3 ayrı diskin en az birinin CLSI (2013) tarafından önerilen zon çaplarında olması gerekmektedir.

Antibiyotik disk etrafında oluşan zon çapları, ceftazidim (CAZ) için ≤17 mm veya sefotaksim (CTX) için ≤22 mm ise CLSI (2013) talimatlarına göre, GSBL olabilirliği doğrultusunda disk difüzyonu konfirmasyonu testine geçildi. CLSI (2013)' ün GSBL taramada kullanım önerisi olan sefpodoksim (CPD) disk de kullanılarak, ≤17 mm zon çapı oluşanlar bir sonraki disk difüzyonu konfirmasyonu testine alındı.



Şekil 3.7. Kullanılan antibiyotik diskler

3.2.5. Disk difüzyonu konfirmasyonu testi

Enterobacteriaceae' nin ürettiği GSBL enzimi tespiti, CLSI (2013) talimatlarına uyularak disk difüzyonu konfirmasyonu testiyle gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik eş diskler (klavulanik asitsiz-klavulanik asitli) aynı anda kullanıldığında disklerin etrafında oluşan zon çaplarına bakılarak, GSBL enzimi üretimi tespit edilebilmektedir.

Disk difüzyonu testi sonucuna göre ayırdığımız petrilere disk difüzyonu konfirmasyonu testi uygulamak üzere Mueller Hinton agara uygulanan işlemler aynı şekilde tekrarlanır (CLSI, 2013).

Mueller Hinton agarlı petrilere, genişletilmiş spektrum beta laktamaz seti, seftazidim (CAZ), seftotaksim (CTX), seftopodoksim (CPD) ve bu disklerin 10 µg klavulanik asit içeren türdeş diskleri CAZCV, CTXCV ve 1 µg klavulanik asitli disk CPDCV ile yapıldı. (Çizelge 3.6). Diskler 24 s 37°C' de bırakıldı ve zon çapları ölçüldü.

Klavulanik asitsiz-asitli eş diskler arasında, ≥ 5 mm fark olduğunda fenotipik olarak kesin pozitif GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) bakteri olarak kabul edildi (CLSI, 2013). Bir sonraki aşama olan bakterilerin identifikasyonu işlemine geçildi.

Çizelge 3.6. Kullanılan antibiyotik diskleri ve konsantrasyonları

Antibiyotik disk	Kısaltması
Seftazidim 30 µg	CAZ 30
Sefpodoksim 10 µg	CPD 10
Sefotaksim 30 µg	CTX 30
Seftazidim 30 µg/klavulanat 10 µg	CAZ CV
Sefpodoksim 10 µg/klavulanat 1 µg	CPD CV
Sefotaksim 30 µg/klavulanat 10 µg	CTX CV

3.2.6. VITEK[®]MS ile identifikasyon

Antibiyotik disk difüzyonu konfirmasyonu işleminden sonra GSBL üreten alt kültür izolatları, TSA besiyerine çizgi şeklinde geçilmiştir. TSA’ da oluşan kolonilerin kullanımı ve identifikasyonu yapılacak alt kültürler taze üretilmiş 48 saati geçmemelidir. Önceden disk difüzyonu konfirmasyonu testi yaparak GSBL üreticisi varsaydığımız alt kültürler, VITEK[®]MS (bioMérieux, Fransa) cihazı ile bakterilerin tiplendirmesi yapılarak belirlenmiştir. Şekil 3.8’ de TSA’ da bakteri kolonileri ve VITEK[®]MS kartuş kuyucuklarına sürülmesi, Şekil 3.9’ da VITEK[®]MS cihazı ve kuyucuklardaki bakterinin tiplendirilmesi gösterilmiştir.

3.2.7. Antibiyogram doğrulama ve MİK tayini

Antibiyogram doğrulama ve MİK (Minimal İnhibitör Konsantrasyonu) tayini işlemi, Micronaut-S Beta Laktamaz VII Platelereyle (Merlin Diagnostika), fenotipik tespate dayanarak, MİK parametreleriyle GSBL varlığının tanımlanması işlemidir.

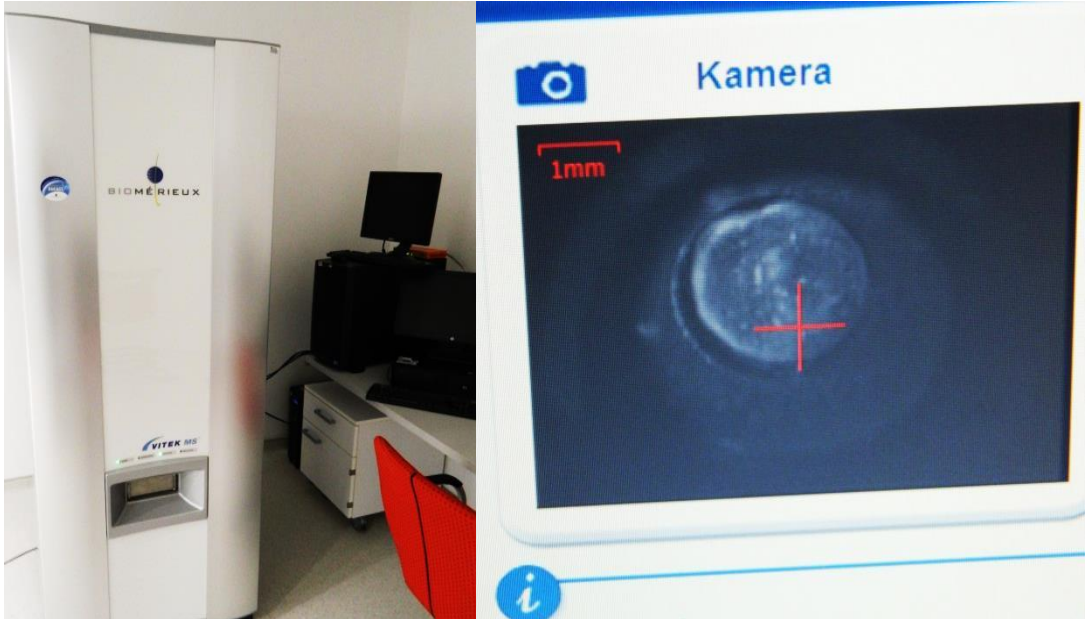
TSA’ da oluşan koloniler, steril pamuklu çubukla %0,85’ lik steril 5 ml tuzlu suda 0,5 McFarland yoğunluğu elde edilecek şekilde alındı. Bu çözeltiden 100 µl otomatik pipetle çekilerek, tüpte önceden hazırlanmış 11 ml steril Mueller Hinton buyyona aktarıldı ve süspansiyon vortexlendi. MHB çözeltisinden, 100 µl otomatik pipetle alınarak her bir plate gözüne (96 adet) aktarıldı. Platelere üstü yapışkan ambalajla kapatılarak 37°C’ de 24 saat süreyle inkübasyonu yapıldı.

İnkübasyondan sonra, Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Mikroplate spektrofotometresiyle (405 nm) okutma işlemi yapıldı. Şekil 3.10' da platelere inokülasyon yapımı ve inkübasyon sonrası spektrofotometrede okutulması işlemi yer almaktadır.

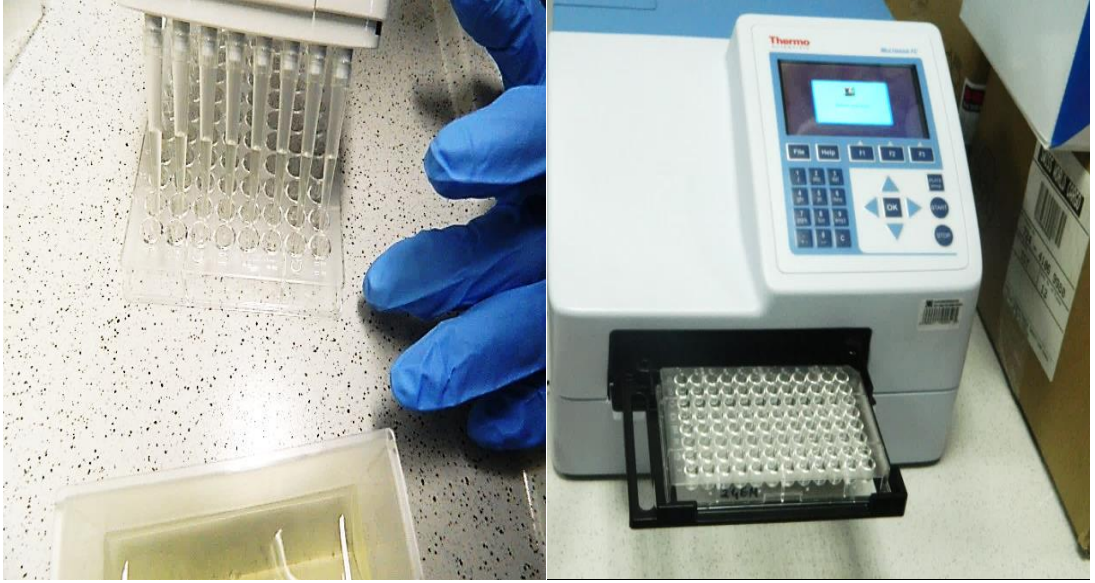
MİK verilerin analizi, otomatik olarak MCN6 yazılımı (Sifin, Germany) ile gerçekleştirildi. Otomatik sistem plateleri analiz ederek, sonuçlar GSBL pozitif veya negatif olarak kaydedildi. Böylelikle numunelerin hangi tür bakteriler içerdiği ve bu bakterilerin GSBL üretilip üretmedikleri yapılan analizler sonucunda belirlendi.



Şekil 3.8. TSA' da oluşan koloniler ve VITEK®MS kartuş kuyucuklarına sürülmesi



Şekil 3.9. VITEK®MS cihazı ve kuyucuklarda ki bakterinin tiplendirilmesi



Şekil 3.10. Platelere inokülasyon ve inkübasyon sonrası spektrofotometrede okutulması

4. BULGULAR

İstanbul ili ve Marmara Bölgesi'nde yerleşik diğer illerden (Bursa, Tekirdağ, Yalova) rastgele olarak gıda perakende sektörü, kasap, market, şarküteri, kurban ve ticari amaçlı kesimhanelerden ayırım gözetmeksizin 110 adet (65 dana, 45 koyun) kırmızı et numuneleri toplanarak, GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) bakterilerin varlıkları fenotipik yöntemlerle incelendi. Genel olarak sonuçlar; 23 adet %20,9 GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) mikroorganizma tespit edilmiştir. *Enterobacteriaceae* suşlarında ki dağılımlar; *Escherichia coli* (%30), *Citrobacter braakii* (%22), *Enterobacter cloacae* (%17), *Klebsiella pneumoniae* (%9), *Citrobacter freundii* (%9), *Serratia fonticola* (%4), *Kluyvera intermedia* (%4), *Moellerella wisconsensis* (%4) olarak sonuçlanmıştır.

4.1. Oksidaz Testi Bulguları

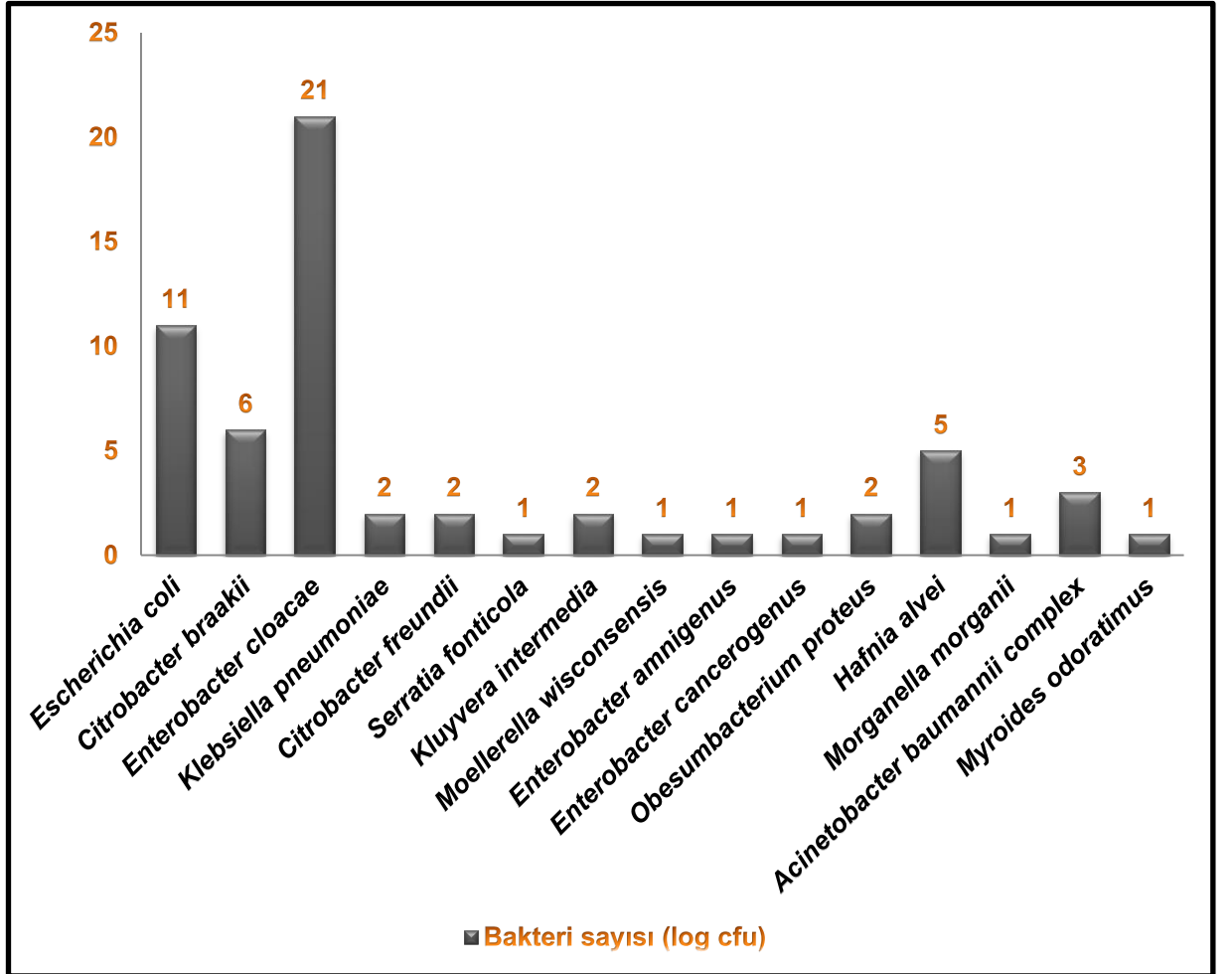
Bir numune petrisinde aynı anda mavi, pembe ve beyaz kolonilerin oluşumları görülmüştür. Oluşan saf temiz koloni oluşumları bir sonraki aşama olan disk difüzyon testine geçilebilmesi için öncelikle Merck oksidaz test çubukları kullanım talimatına uyularak bakteri kolonilerine oksidaz testi yapıldı. Testin sonunda 106 adet petride oksidaz (-) sonucu alındı.

4.2. GSBL Tarama Bulguları

CLSI (2013) talimatlarına uyularak, 106 adet oksidaz (-) sonucu alınan kolonilere yapılan antibiyotik disk difüzyonu ve disk difüzyonu confirmasyonu testleri sonucuna göre 60 adet petrinin GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) mikroorganizmaya sahip oldukları fenotipik olarak bulunmuştur.

4.3. VITEK[®]MS ile Tiplendirme Bulguları

VITEK[®]MS (bioMérieux, France) cihazı ile 60 adet GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) mikroorganizmaların kimlikleri belirlenmiştir. VITEK[®]MS cihazı ile tiplendirilen *Enterobacteriaceae* Gram (-) şuşlar; *Escherichia coli*, *Citrobacter braakii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Serratia fonticola*, *Kluyvera intermedia*, *Moellerella wisconsensis*, *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Obesumbacterium proteus*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Acinetobacter baumannii complex*, *Myroides odoratimus* olarak belirlenmiştir. 60 adet GSBL üreten bakterinin VITEK[®]MS ile tanımlanması ve kantitatif bulgu sayıları Şekil 4.1' de verilmiştir.



Şekil 4.1. VITEK[®]MS ile kolonilerin tiplendirilmesi ve dağılımları

4.4. Antibiyogram Doğrulama ve MİK Tayini Bulguları

Disk difüzyonu konfirmasyonu testine göre 60 adet GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) bakterinin MİK parametreleriyle yapılan antibiyogram testi sonucuna göre 23 adet petrinin kesin GSBL pozitif olduğu tespit edilmiştir.

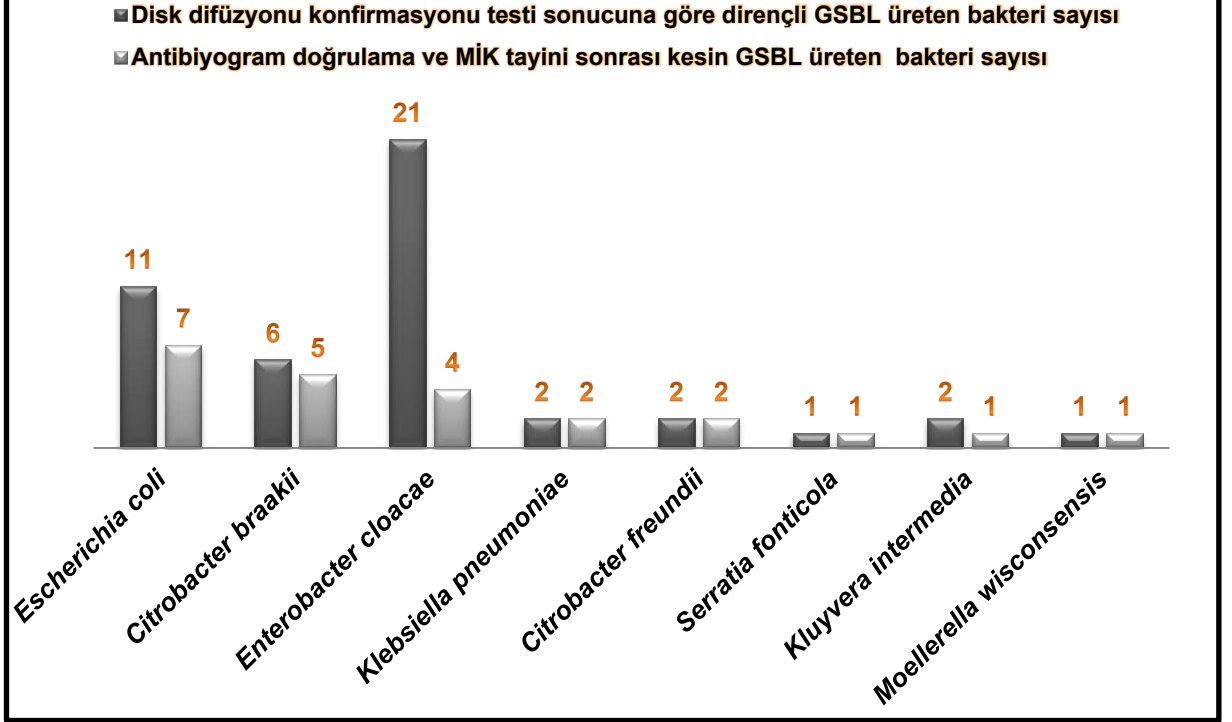
Sonuç olarak; 110 adet numunede 23 adet %20,9 oranında kesin GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) mikroorganizma varlığı sonucuna ulaşılmıştır.

Çizelge 4.1’ de izole edilen dirençli *Enterobacteriaceae* türleri ve GSBL (+) dağılımları verilmiştir. Şekil 4.2’ de ise kırmızı et numunelerinde disk difüzyonu konfirmasyonu ve MİK testi sonuçlarının karşılaştırmalı grafiksel gösterimi verilmiştir.

Çizelge 4.1. İzole edilen dirençli *Enterobacteriaceae* türleri ve GSBL dağılımları

VITEK [®] MS Bakteri Tiplendirmesi	Disk difüzyonu konfirmasyonu sayısı (n=60)	MİK testi GSBL (+) sayısı (n=23)	Bakterilerin metodlar arası GSBL (+) çıkma oranı (%)
<i>Escherichia coli</i>	11	7	63,6
<i>Citrobacter braakii</i>	6	5	83,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	21	4	19
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2	2	100
<i>Citrobacter freundii</i>	2	2	100
<i>Serratia fonticola</i>	1	1	100
<i>Kluyvera intermedia</i>	2	1	50
<i>Moellerella wisconsensis</i>	1	1	100
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	0	0
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	1	0	0
<i>Obesumbacterium proteus</i>	2	0	0
<i>Hafnia alvei</i>	5	0	0
<i>Morganella morganii</i>	1	0	0
<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	3	0	0
<i>Myroides odoratimimus</i>	1	0	0

Disk difüzyonu confirmasyonu ve MİK testi sonuçlarına göre GSBL üreten bakteriler



Şekil 4.2. Kırmızı et numunelerinde disk difüzyonu confirmasyonu ve MİK testi sonuçlarının grafiksel gösterimi

Kırmızı etlerde 23 adet (%20,9) GSBL pozitif saptanan türlerde 6 tanesi (%26,1) çiğ koyun etinde ve 17 tane (%73,9) çiğ dana etinden izole edilmiştir.

Kırmızı et türleri arasındaki dağılımlar şu şekildedir: Çiğ koyun etinde; *Escherichia coli* (n=2; %33,3), *Citrobacter braakii* (n=1; %16,7), *Klebsiella pneumoniae* (n=1; %16,7), *Serratia fonticola* (n=1; %16,7) *Moellerella wisconsensis* (n=1; %16,7). Çiğ dana etinde; *Escherichia coli* (n=5; %29,1), *Citrobacter braakii* (n=4; %23,5), *Enterobacter cloacae* (n=4; %23,5), *Citrobacter freundii* (n=2; %11,8), *Klebsiella pneumoniae* (n=1; %5,9), *Kluyvera intermedia* (n=1; %5,9).

Çizelge 4.2’ de GSBL (+) numunelerin disk difüzyonu confirmasyonu zon çapları ve MİK değerleri kırmızı et türlerine göre verilmiştir. Çizelge 4.3’ de dana ve koyun etinde GSBL yüzde dağılımları, Şekil 4.3’ de yüzdesel genel dağılım grafiği, Şekil 4.4’ de GSBL kırmızı et numunelerinin türlerine göre dağılım sayıları grafiksel olarak verilmiştir.

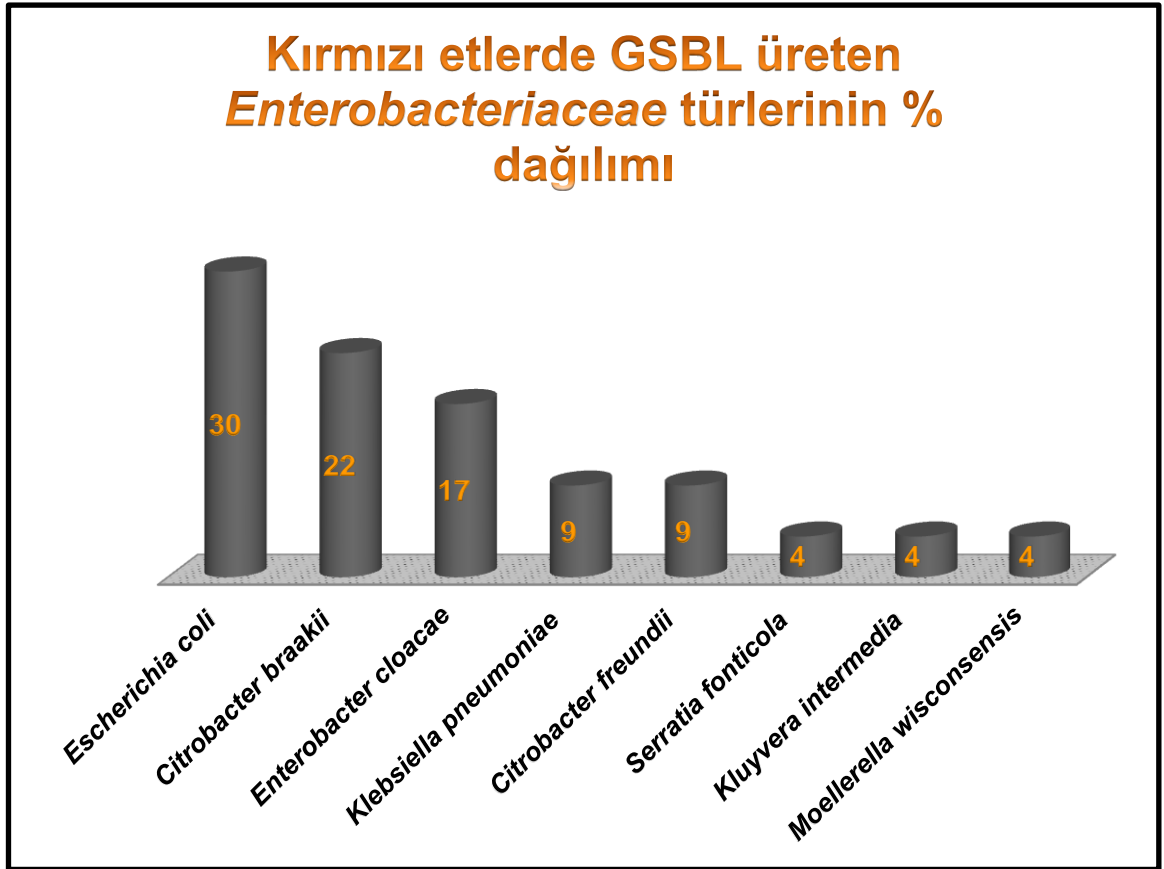
Çizelge 4.2. GSBL (+) numunelerin antibiyotik disk konfirmasyon zonları (mm), antibiyogram doğrulama ve MİK (µg/ml) sonuçları

No	Kırmızı et türü	Bakteri tipi	CAZ ZON	CAZ CV	CTX ZON	CTX CV	CPD ZON	CPD CV	CAZ	CAZ MİK	CAZ CV MİK	CTX	CTX MİK	CTX CV MİK
1	Dana	<i>E. cloacae</i>	22	26	23	26	16	17	?	-	=8/4	?	-	=8/4
2	Koyun	<i>Serratia fonticola</i>	26	27	27	28	20	23	S	<=1	<=0,25/4	R	=128	<=0,25/4
3	Dana	<i>Escherichia coli</i>	18	25	13	28	0	21	S	32	≤0,25/4	R	>128	≤0,25/4
4	Koyun	<i>K. pneumoniae</i>	21	30	15	31	13	21	R	16	=4/4	R	128	=4/4
5	Koyun	<i>M. wisconsensis</i>	19	28	22	32	14	21	R	128	-	R	32	=0,5/4
6	Dana	<i>C. freundii</i>	24	25	24	25	16	20	S	2	1	R	16	=8/4
7	Dana	<i>C. braakii</i>	22	22	15	25	16	20	R	64	<=0,25/4	R	128	=16/4
8	Dana	<i>K. intermedia</i>	21	22	20	22	18	20	S	<=1	<=0,25/4	S	<=1	<=0,25/4
9	Dana	<i>Escherichia coli</i>	15	27	10	28	10	16	R	128	<=0,25/4	R	>128	<=0,25/4
10	Dana	<i>Escherichia coli</i>	11	29	25	27	10	13	R	128	<=0,25/4	S	<=1	<=0,25/4
11	Dana	<i>Escherichia coli</i>	12	18	10	19	7	9	R	=64	=2/2	R	>128	=4/4
12	Dana	<i>C. freundii</i>	18	24	19	22	14	16	R	=64	=8/4	R	=32	=4/4
13	Dana	<i>E. cloacae</i>	20	12	10	9	-	-	S	=4	>32/4	R	=32	>8/4
14	Dana	<i>C. braakii</i>	9	18	17	24	14	16	R	>128	=8/4	R	=128	=8/4
15	Dana	<i>C. braakii</i>	22	14	25	26	16	18	R	=64	=8/4	R	=4	=1/4
16	Dana	<i>K. pneumoniae</i>	16	25	10	24	7	9	R	=32	-	R	>128	=4/4
17	Dana	<i>C. braakii</i>	23	31	10	28	13	16	R	=16	=2/4	R	>128	=8/4
18	Dana	<i>E. cloacae</i>	21	26	21	27	18	19	R	=128	=4/4	R	=128	>32/4
19	Dana	<i>Escherichia coli</i>	15	25	9	25	7	10	R	>128	=0,5/4	R	>128	=0,5/4
20	Dana	<i>E. cloacae</i>	16	22	16	22	6	9	R	=64	-	R	>128	-
21	Koyun	<i>Escherichia coli</i>	19	14	27	23	17	19	R	=64	=16/4	R	32	=8/4
22	Koyun	<i>Escherichia coli</i>	22	31	21	24	17	18	R	=128	=32/4	R	=64	=4/4
23	Koyun	<i>C. braakii</i>	20	27	25	31	18	20	R	=128	<=0,25/4	R	=64	-

R=Dirençli, S=Duyarlı

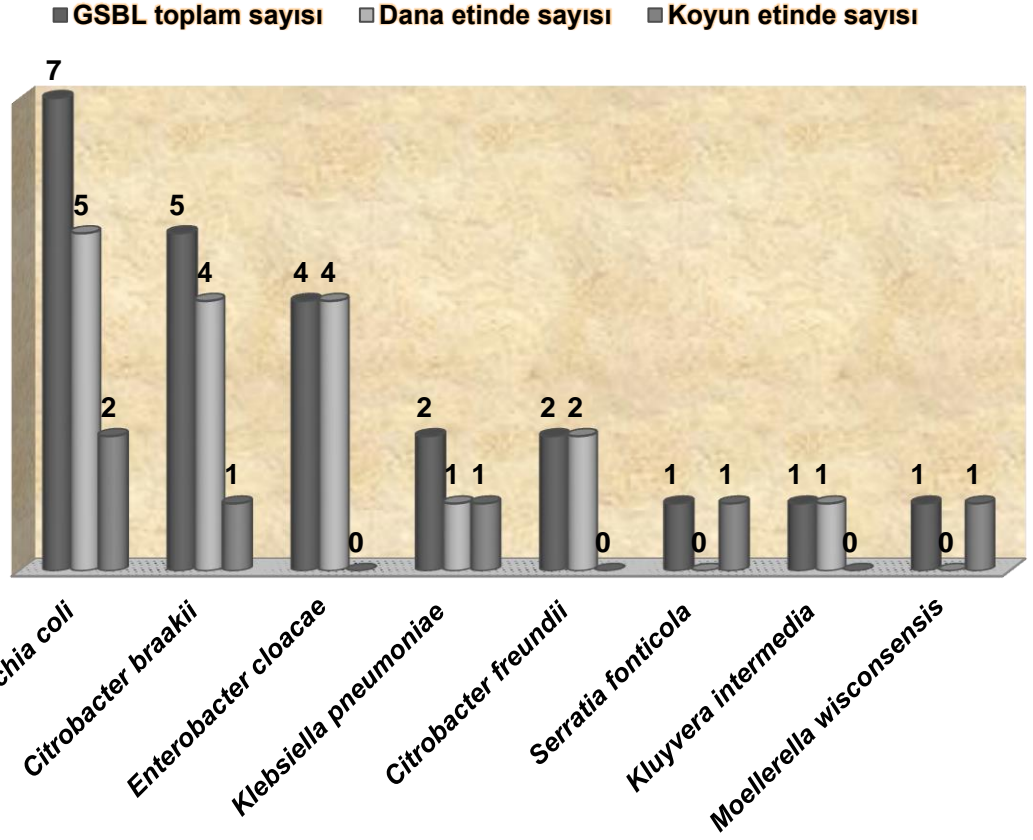
Çizelge 4.3. Dana ve koyun eti GSBL verileri ve *Enterobacteriaceae* türlerinde yüzdesel dağılımlar

110 numunede sonuçlara göre Toplam GSBL (n=23; %20,9)		Çiğ Koyun Eti (n=6; %26,1)	Çiğ Dana Eti (n=17; %73,9)
GSBL çıkan bakteriler arasındaki % dağılımlar		Koyun etinde izole edilen bakterilerin % dağılımları	Dana etinde izole edilen bakterilerin % dağılımları
<i>Escherichia coli</i>	(n=7; %30)	(n=2; %33,3)	(n=5; %29,1)
<i>Citrobacter braakii</i>	(n=5; %22)	(n=1; %16,7)	(n=4; %23,5)
<i>Enterobacter cloacae</i>	(n=4; %17)	-	(n=4; %23,5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	(n=2; %9)	(n=1; %16,7)	(n=1; %5,9)
<i>Citrobacter freundii</i>	(n=2; %9)	-	(n=2; %11,8)
<i>Serratia fonticola</i>	(n=1; %4)	(n=1; %16,7)	-
<i>Kluyvera intermedia</i>	(n=1; %4)	-	(n=1; %5,9)
<i>Moellerella wisconsensis</i>	(n=1; %4)	(n=1; %16,7)	-



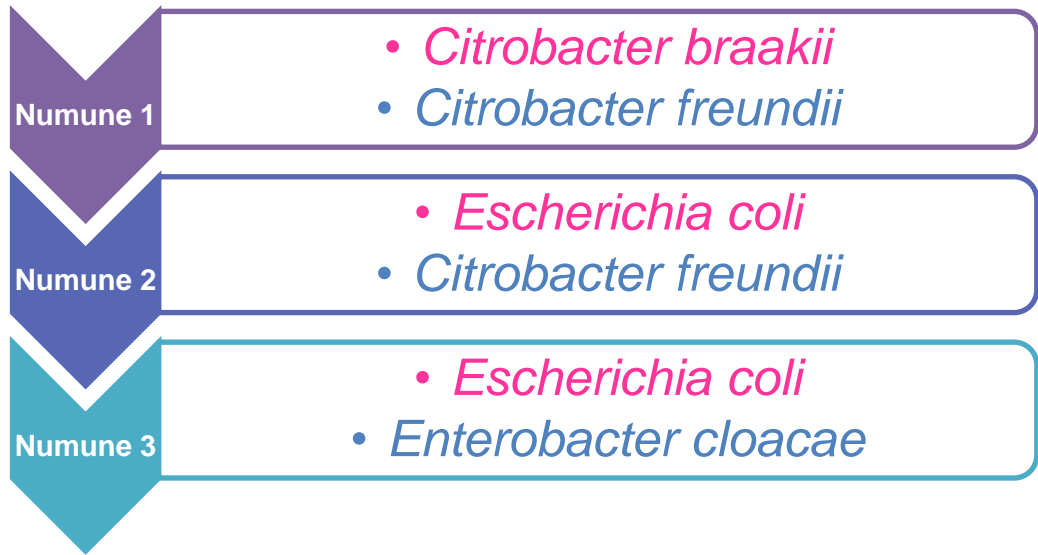
Şekil 4.3. Kırmızı etlerde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* genel dağılımı

Dana ve koyun etlerinde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* türlerinin dağılımı



Şekil 4.4. GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının kırmızı et türlerinde dağılımları

GSBL üreten suşlara ulaşmak için birçok analiz yapıldı. Chromatic™ GSBL agar ortamına inokülasyon ile numunelerdeki bakteriler mavi, pembe ve beyaz renkli koloni oluşumlarıyla kültür çalışmaları sonuçlanmıştır. Kırmızı et numunelerinden izole edilen 23 adet kesin GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) bakterilerden, 6 farklı türün 2' şerli olarak aynı 3 adet kırmızı et numunesinden izole edildiği görülmüştür. Şekil 4.5' de aynı numuneden izole GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşları verilmiştir.



Şekil 4.5. Aynı numuneden izole GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşları

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Antibiyotik direnci; patojen mikroorganizmaların antibiyotik kullanımına karşın üreyebilmeleri ve hastalık yapabilmeleri durumu olup, toplum sağlığını tehdit eden en önemli unsurlardan biridir (Yüce, 2001). Yaygın olarak insanlarda hastalıklara neden olan Gram (-) enterik bakteriler özellikle; *Klebsiella* spp., ve *Escherichia coli* başta olmak üzere *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*' dir. Bu bakterilerin yüksek düzeyde dirençli suşları, dünyanın her yerinde dikkat çekici sıklıkta saptanmaktadır.

Gram (-) bakterilerde en sık saptanan direnç mekanizmaları antibiyotikleri parçalayan enzimlerin üretimidir. En sık ve önemli direnç mekanizması, beta laktam halkasını hidrolize eden bakterilerin genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) enzimi üreterek beta laktam antibiyotiklerin büyük çoğunluğuna direnç geliştirerek bu grup antibiyotikleri inaktive edebilen beta laktamaz enzimi üretimidir (Çelebi ve ark., 2009; Yetkin ve ark., 2006; Güler ve ark., 2008).

GSBL, karbapenemler ve sefamisinler haricindeki tüm beta laktam antibiyotikleri inaktive eden, fakat beta laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe olan beta laktamazlardır (Rahal, 2000). Ülkemizde çoğunlukla bu konuda yapılan araştırmalar hastane ve toplumsal kaynaklıdır (Güdücüoğlu ve ark., 2007; Deveci ve ark., 2010). Ancak, gıdalar kaynaklı çalışmalar yeterli değildir. Buna karşın insanlarda oluşan antibiyotik direncinin hayvansal kaynaklı gıdalardan kaynaklanabileceği konusunda yurt dışında çok sayıda çalışmalar yapılmıştır (Petternel ve ark., 2014; Rasheed ve ark., 2014; Geser ve ark., 2012; Guerra ve ark., 2003). Buna karşın ülkemizde ise bu konuda çalışma planlanmış ancak kesin sonuca gidilememiştir.

Bu araştırmada; hayvansal gıda kaynağı olan kırmızı et örneklerinde Türkiye’ de ilk defa, antibiyotik disk difüzyonu ve disk difüzyonu konfirmasyonu testleri dışında daha ileri aşama olan antibiyogram doğrulama ve Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu (MİK) değerleri saptanmıştır. Ayrıca kùltür yöntemiyle saptanan mikroorganizmaların tiplendirilmesi için VITEK[®]MS cihazı kullanılmıştır. VITEK[®]MS methodu MALDI-TOF MS yöntemiyle mikroorganizmaların tiplendirilmesinde %99,9 oranında başarılı bir sonuç vermektedir. Sonuçta kırmızı etlerde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının belirlenmesine çalışılmıştır.

Ùlkemizde çiğ kırmızı etlerde antibiyotiğe direnç gösteren GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşları üzerine çalışmalar çok az sayıdadır (Arslan ve Eyi, 2011; Gündoğan ve Avcı, 2013). Bu çalışmalarda sadece antibiyotik disk difüzyonu ve antibiyotik çift disk sinerji metotları kullanılmış ancak antibiyogram doğrulama ve MİK değerleri analizleri yapılmamıştır. Bu nedenle sonuçlar tartışmalıdır.

Ùlkemizde çiğ kırmızı ette GSBL üreten bakteri suşlarının incelenmesi yakın dönemlerde önem kazanmıştır. Dünya’ da ise çoğunlukla çiftlik hayvanlarının dışkı örnekleri üzerinde çalışılmış ve geniş çaplı olmasa da çiğ kırmızı et üzerinde de çalışılmıştır. Ayrıca antibiyotik kullanımından doğan dirençli bakterilerin tiplendirilmesi, yıllara göre ùlkelerdeki değişkenlik gösteren prevelansları, hangi genlerin direnç gösterdiği incelenmiştir (Hordijk ve ark., 2013; Reist ve ark., 2013; Geser ve ark., 2012). Ancak bu çalışmalarda, kırmızı et örnekleri üzerinde yapılan incelemelerde kırmızı etlerin türlerine göre çeşitlendirilmemesi ve numune sayılarının az tutulması bu gıda grubundaki GSBL üreten *Enterobacteriaceae* Gram (-) suşlar hakkında kapsamlı bilgi veremediği gör÷lmektedir.

Gıda amaçlı üretilen çiftlik hayvanlarının bağırsak floralarındaki dirençli bakterilerin fenotipik ve genotipik yapıları insanların intestinal florasındaki bakterilere benzerlik gösterip göstermedikleri üzerinde araştırmalar yapılmıştır (Mahmood ve Büyükunal-Bal, 2014). Çiftlik hayvanlarında aşırı kullanılan antibiyotikler, hayvanların bağırsak florasındaki bakterileri dirençli hale getirerek kesim aşamasında ve etin üretiminde gıdaya geçebilmektedir. Bu durum toplum sağlığını tehdit etmektedir (Jensen ve ark., 1999; Harada ve Asai, 2010; Jong ve ark., 2011).

Et üretimi amacıyla besiyeye alınan hayvanlarda canlı ağırlığı artırmak amacıyla antibiyotik kullanımı, ayrıca veteriner kontrolü dışında tedavi amacıyla da antibiyotik kullanımı hayvanların bağırsak florasında GSBL üreten bakterilerin oluşumuna neden olabileceği bildirilmektedir (Gyles, 2008; Hendriksen ve ark., 2008; Ammor ve ark., 2007).

Bu çalışma ülkemizde ilk defa dana ve koyun etlerinde ISO/DIS 21528-2 belirtilen analiz metotları kullanılarak GSBL analizleri yapılmıştır. Ön zenginleştirilmiş numunelerin GSBL agarda koloni oluşumları görüldükten sonra disk difüzyonu, disk difüzyonu konfirmasyonu testleri CLSI (2013) yönergelerine göre yapılmıştır. Devamında VITEK[®]MS ile koloniler tiplendirilmiştir. Antibiyogram doğrulama işleminde izolatların antibiyotiklere karşı oluşturduğu MİK düzeyleri ölçülmüştür. Sonuçta 110 adet kırmızı et numunelerinden 23 adet kesin GSBL üreten Gram (-) *Enterobacteriaceae* izolatları elde edilmiştir. Ancak, disk difüzyonu konfirmasyonu yaklaşımlı analizleri ile başlangıçta 60 adet şüpheli potansiyel GSBL üreten izolatlar belirlenmiştir. Disk difüzyonu testi ve disk difüzyonu konfirmasyonu testleri %100 kesin sonuçlar vermemektedir. Bu nedenle, bu tip testlerin devamı olarak sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle antibiyogram doğrulaması ve MİK tespitleri yapılmıştır. Bu analizin doğru sonuca ulaşmada zorunlu olduğu bu çalışmada gösterilmiştir.

Ülkemizde kırmızı et üzerinde yapılan GSBL araştırmalarına bakıldığında; Arslan ve Eyi (2011), Gündoğan ve Avcı (2013) iki çalışmada antibiyotik disk difüzyonu ve çift disk sinerji testlerini uygulayarak kırmızı etlerde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarını araştırmışlardır. Arslan ve Eyi (2011), çalışmalarında 13 adet (%18,1) dana kıymasında ve 11 adet (%15,3) dana etinde GSBL üreten *E. coli* tespit etmişlerdir. Gündoğan ve Avcı (2013), 15 dana kıymasında *E. coli* 5 adet (%25), *K. pneumoniae* 1 adet (%20), *K. oxytoca* 4 adet (%30,8) olmak üzere toplamda 10 adet (%26,3) dirençli GSBL üreticisi tespit edildiğini belirtmişlerdir. Çalışmalarında metodları, antibiyogram ve MİK analizleriyle tamamlamadıkları için sayısal verilerin daha az olabileceği ve bakteri türlerinin sadece *E. coli* ile sınırlı kalmayacağı tartışılabilir. Gündoğan ve Avcı (2013) çalışmalarında kırmızı ette *Enterobacteriaceae* suşları *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* olarak 3 farklı tür dağılımı gösterdiğini belirtmişlerdir. Bu tezdeki çalışmada ise disk difüzyonu konfirmasyonu testi sonrası VITEK[®]MS ile yapılan identifikasyonda 15 farklı *Enterobacteriaceae* suşu kırmızı etlerde tespit edilmiştir (bkz. Çizelge 4.1).

Uluslararası çalışmalarda kırmızı et üzerine GSBL aranması konusunda fazla çalışma bulunamamıştır. Daha çok çiftlik hayvanlarının dışkılarında bu araştırmalar yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda GSBL üreten *Enterobacteriaceae* türleri arasında en çok *E. coli* bulunmuştur (Reist ve ark., 2013; Saenz ve ark., 2001; Madec ve ark., 2008; Hordijk ve ark., 2013; Geser ve ark., 2012). Bu tezdeki çalışmada sıklığı en yüksek görülen GSBL üreten *Enterobacteriaceae* fenotipi *E. coli* (%30) olarak tespit edilmiştir.

Saenz ve arkadaşları (2001), antibiyotik disk testlerini kullanarak çalışmalarını tamamlamışlardır. Boğaların dışkılarından 32 adet (%91,4) oranında antibiyotiğe dirençli *E. coli* tespit edildiği çalışmalarında görülmektedir. O yıllardan günümüze antibiyotik duyarlılık testleri üzerinde gelişmeler ilerlemesine karşın yapılan çalışmalarda metot olarak bir aşama kaydedilemediği görülmektedir. Ayrıca günümüze kadar çiftlik hayvanlarında var olan bu antibiyotiğe dirençli bakterilerin öneminin farkına girilememiş ve yaygınlaşmasının önüne geçilememiştir. Uluslararası işbirliği kurularak halk sağlığı için özellikle gıda amaçlı üretilen çiftlik hayvanlarında antibiyotiğe dirençli bakterilerin izlenmesi, önlenmesi, hayvandan hayvana ve hayvandan insana bulaşarak yaygınlaşmasının önüne geçilmelidir.

Rasheed ve arkadaşları (2014), antibiyotik disk difüzyonu ve disk difüzyonu konfirmasyonu testlerini kullanarak 30 çiğ koyun eti numunesinde çalışmışlardır. Metod kurallarına göre sırasıyla yapılan çalışmada antibiyotiğe dirençli *E. coli* 4 adet (%13,3) iken sonraki disk difüzyonu konfirmasyonu testi aşamasında GSBL üreten *E. coli* 1 adet (%3,3) oranında tespit edildiğini belirtmişlerdir. Antibiyotik disk difüzyonu konfirmasyonu testi devamında fenotipik yöntemlerle GSBL araştırmasına devam edilmemiştir. Bu 1 adet *E. coli*'nin ise MİK verilerine göre kesin GSBL çıkıp çıkmayacağı ise test edilmemiştir.

Geser ve arkadaşları (2012), dışkı örneklerinde GSBL üreten enterik mikroorganizmaların, sığırdan %13,7, koyunda %8,6 oranında olduğunu belirtmişlerdir. Toplam 91 adet GSBL üreten enterik mikroorganizmanın 89 adetinin *E. coli* olarak izole edildiğini belirtmişlerdir. Diğer iki tiplendirmenin ise, 1 adet *Citrobacter youngae* koyunda ve diğer 1 adet *Enterobacter cloacae* sığırdan izole edildiğini belirtmişlerdir. Kıymada ise GSBL üreten enterik mikroorganizmanın bulunmadığını belirtmişlerdir. Bu tezdeki çalışmada kırmızı etlerde GSBL üreten

Enterobacteriaceae suşları bulundu. Ayrıca bu çalışmada GSBL üreten 8 farklı bakteri türü izole edilmiştir (bkz. Şekil 4.3).

Madec ve arkadaşları (2008), 657 örnekten GSBL test şartlarıyla MİK değerlerini belirledikten sonra 52' sinde GSBL veya sefalosporinaz üreticileri tespit edildiğini yazmışlardır. Bakteri türleri; 41 adet *E. coli*, 7 adet *Acinetobacter* spp., 2 adet *Pseudomonas aeruginosa*, 1 adet *Citrobacter freundii* ve 1 adet *Hafnia alvei* olarak tespit edildiğini belirtmişlerdir. 41 adet *E. coli*' nin PCR ile gen analizleri sonucunda 17 (%2,6) GSBL üreticisi tespit edildiği belirtilmiştir. Burada görüldüğü gibi kesinlikle tek başına disk difüzyon ve GSBL E-test çubukları yeterli olmayıp doğru bir sonuç vereceği de tartışmaya açıktır.

Guerra ve arkadaşları (2003), *Escherichia coli* suşlarını izole edip antibiyotik dirençliliğini fenotip-genotip yöntemlerle tespit etmişlerdir. Almanya' da hayvansal gıda ürünlerinde GSBL üreten *E. coli* suşlarının %25 oranında olduğu belirtilmiştir. Bu tezdeki çalışmada da *E. coli* kırmızı etlerde %30 oranında çıktığı için paralellik göstermektedir.

Mahmood ve Büyükunal-Bal (2014) antibiyotik direnci gösteren *Enterobacteriaceae* suşlarının hayvan ve insan sindirim sistemleri arasında *in vivo* plazmit kaynaklı geçiş olduğuna yönelik çalışma yapmışlardır. Çiftlik hayvanları ve temas halindeki çiftlik çalışanlarından izole edilen bakteriler arasındaki direnç profillerinin benzer olduğunu belirtmişlerdir. Direkt kanıtların insan ve hayvanlarla ilişkili zoonotik bakterilerin dirençle ilgili plazmitlerin moleküler metotlarla bulunduğunu belirtmişlerdir. Antibiyotiklerin çiftlik hayvanlarında kullanıldığını ve dirençli bakterilerin antibiyotik tedavisi almış çiftlik çalışanı ve çiftlik hayvanlarında varlıkları hususunda durduklarını belirtmişlerdir. Bu hususlara bakıldığında gıda hayvanlarının dışkılarında izole edilen bakteri tipleriyle çiğ dana ve koyun etlerinden izole edilen bakterilerin farklı olmaması durumunu açıklamaktadır.

Knothe ve arkadaşları (1983), yaptıkları çalışmada *Klebsiella pneumoniae* suşlarından izole edilen plazmid gen aktarım aracının, dirençleri hassas suşlara aktardığını, plazmidle yayıldığını ve son kuşak beta laktam antibiyotik direncinin *E. coli*' ye kolaylıkla aktarıldığını belirtmişlerdir. Bu tez çalışmasında; *Citrobacter freundii*-*Citrobacter braakii*, *E. coli*-*Citrobacter freundii*, *E. coli*-*Enterobacter cloacae* aynı numuneden izole edilen farklı dirençli kolonilerdi. Aynı etten izole

edilen iki ayrı bakteri çeşidinin de dirençli ve GSBL üretici özellikte çıkması, Knothe ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada direncin plazmidle *E. coli*' ye kolaylıkla aktarıldığını belirtmeleri, bu durum hakkında fikir vermekte ve benzerlik göstermektedir. *E. coli*' nin iki numunede de bulunması, aynı ortam popülasyonunda bakteri konjugasyon aktarımıyla plazmid geçişinin de olabirliğini düşündürmektedir.

Kırmızı et tüm Dünya' da ve Türkiye' de insanların vazgeçemediği bir gıdadır. Besleyici değeriyle, tadıyla kokusuyla, Türk Mutfağı' nda ve Kurban Bayramı' nda büyükbaş ve küçükbaş hayvanların kesilerek ibadet edilmesiyle kırmızı et tüketimini vazgeçilemez kılmıştır. Hayvanlarda anabolik amaçlı antibiyotiklerin bilinçsizce kullanılması halk sağlığını tehdit etmektedir. İnsanlarda antibiyotiğe dirençli bakterilerin izole edilmesi, bakteri popülasyonun canlılıklarını sürdürme isteğiyle beraber, hastanelerde antibiyotik tedavilerinde karşılaşılan güçlükler bilinmektedir. Dünya' da ve Türkiye' de veteriner ve gıda alanında yeni mevzuatlar oluşturularak ve daha geniş çaplı çalışmalar yapılarak GSBL üreten enterik bakterilerin önlenmesi hedeflenmelidir.

Bu çalışmada, incelenen koyun ve dana et örneklerinin GSBL üreten *Enterobacteriaceae* fenotipleri ile bulaş oldukları ve halk sağlığı bakımından risk oluşturdukları belirlenmiştir. GSBL üreten enterik bakteriler ve bu tip enzimleri kodlayan genetik materyallerin yalnız klinik ve toplumsal kaynaklı değil, aynı zamanda gıdaların da yayılmalarında potansiyel rezervuarlar oldukları görülmüştür. Ülkemizde gıda güvenliği kuralları içerisinde patojen bakterilerle ilgili birçok mevzuat bulunmaktadır. Fakat gıdalarda GSBL üreten mikroorganizmalar hakkında tanımlamalar, kurallar, yasaklar, riskler, gıdada üretimden tüketimine kadar uygulanması gereken önlemler hakkında hiçbir yasal mevzuat bulunmamaktadır. Yetkili makamların bu konuda en hızlı şekilde birimlerini oluşturup gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından çalışmalarını sunarak bu konuda yeni mevzuatlar ortaya koymalıdır.

KAYNAKLAR

- Aarestrup FM.** (2004). Monitoring of antimicrobial resistance among food animals: principles and limitations. *J Vet Med B*, 51:380-388.
- Ahmet Z, Houang E, Hurley R.** (1995). Pyrolysis mass spectrometry of cephalosporin-resistant *Enterobacter cloacae*. *J Hosp Infect* 31:99.
- Akalın H.** (1995). Yoğun bakım ünitelerinde *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* ve diğer tedavisi zor gram-negatif bakteriler. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1999;3: 202-11.
- Akkan HA, Karaca M.** (2003). Veteriner İç Hastalıklarında Antibiyotiklerin Kullanımı, *YYÜ Vet. Fak. Derg.* 14 (2),72-77.
- Ammor M. S, Florez A. B, Mayo B.** (2007). Antibiotic Resistance in Non-Enterococcal Lactic Acid Bacteria and *Bifidobacteria*. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Ambler R.P. Coulson A.F., Frere J.M., Ghuysen J. M., Joris B., Forsman M., Levesque R.C., Tiraby G., Waley S. G.** (1991). A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochemical Journal*, 276 (Pt 1), 269-70.
- Aplay M.** (1999). Respiratory disease therapeutics. 462–471. In: Howard JL, Smith RA (Ed), *Current Veterinary Therapy Food Animal Practice*. W.B. Saunders Company, USA.
- Arpacık R.** (1999). Entansif Sığır Besiciliği. 3. Baskı, Şahin Matbaası, Ankara.
- Arslan S, Eyi A.** (2011). Antimicrobial Resistance and ESBL Prevalance in *Escherichia coli* From Retail Meats. *Journal of Food Safety* 31 262–267 © 2011 Wiley Periodicals, Inc.
- Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM.** (2001). Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemother*; 45: 2615-20.
- Aydın G.** (2010). Çeşitli gıda ürünlerinden izole edilen *Pseudomonas* türlerinde siderofor varlığı, serum direnci, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üretimi ve antibiyotik direncinin belirlenmesi. Ankara.
- Barton D.** (2000). Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nut Res Rev*, 13:279-99.
- Berger Stephen.** (2015). Gideon Guide to Medically Important Bacteria. S: 907.
- Bilgehan H.** (2000). *Escherichia*. Prof. Dr. Hakkı Bilgehan, klinik mikrobiyoloji-Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 2000, 10. baskı: Sayfa 3-17.
- Bishop YM.** (1996). *The Veterinary Formulary*. 3rd Ed., London.

- bioMerieux.** (2013). Selection of Publications VITEK®MS. http://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/selection-of-publications-vitek-ms-final-03-04-2013_0.pdf Erişim tarihi: 05.05.2015
- BMI** (2010). Business Monitor International. <http://www.bmiresearch.com/> Erişim tarihi: 03.06.2015
- Bonnet R.** (2004). Growing group of extended spektrum beta lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrobial Agents Chemother*; 48: 1-14.
- Bradford PA.** (2001). Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Micr Rev*;14:933-51.
- Bradford PA, Cherubin CE, Idemyor V, Rasmussen BA, Bush K.** (1994). Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* from two Chicago hospitals: idenitification of the extended spectrum TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing beta-lactamases in a single isolates. *Antimicrob Agents Chemother*; 38: 761-6.
- Brolund A, MScPharm, PhD.** (2014). Overview of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from a Nordic perspective. *Infection Ecology and Epidemiology*, 4: 24555 - <http://dx.doi.org/10.3402/iee.v4.24555> Erişim tarihi: 10.04.2015
- Bush K, Jacoby G A, Medeiros A A.** (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*, 39: 1211-1233.
- Cantón R, Coque TM.** (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, 9:466-75.
- Cantón R, Novais A, Valverde A.** (2008). Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 14 (Suppl. 1): 144-53.
- Cavaco LM, Abatih E, Aarestrup FM, Guardabassi L.** (2008). Selection and persistence of CTX-M-producing *Escherichia coli* in the intestinal flora of pigs treated with amoxicillin, ceftiofur, or cefquinome. *Antimicrob Agents Chemother.* 52(10): 3612-6.
- Chambers HF. Penicillins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R.** (2005). Principles and Practice of Infectious Diseases. Sixth edition, *Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc.* 281-93.
- Chaudhuri BN, Rodrigues C, Balaji V.** (2011). Incidence of ESBL producers amongst Gram-negative bacilli isolated from intra-abdominal infections across India (based on SMART study, 2007 data). *J Assoc Physicians India.* 59: 287-92.
- CLSI.** (2013). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Third Informational Supplement, CLSI Document M100-S23, CLSI, Wayne PA.
- CNRI. (2013) / Science Photo Library**
<http://fineartamerica.com/featured/klebsiella-pneumoniae-bacterium-cnri.html>
Erişim tarihi: 29.06.2015

Çağlayangil A, Sümerkan B, Doğanay M. (1991). Enterobacter sepsisi: 35 olgunun klinik ve epidemiyolojik özellikleri, Flora 2: 91 Çelebi S, Yüce N, Çakır D, Hacımustafaoğlu M, Özkaya G. Çocuklarda genişlemiş spektrumlu β -laktamaz üreten *E. coli* enfeksiyonlarında risk faktörleri ve klinik sonuçları; beş yıllık çalışma. *J Pediatr Inf* 2009; 3: 5-10.

Çelebi S, Yüce N, Çakır D, Hacımustafaoğlu M, Özkaya G. Çocuklarda genişlemiş spektrumlu β -laktamaz üreten *E. coli* enfeksiyonlarında risk faktörleri ve klinik sonuçları; beş yıllık çalışma. *J Pediatr Inf* 2009; 3: 5-10.

Çetinkaya, E. ve Ayhan K. (2012): Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1): 53-62.

Deveci Ö, Yula E, Tekin A. (2010). İdrar kültürlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında beta-laktamaz sıklığı ve antibiyotik direnci. *Klinik ve Deneysel Araştırmalar Dergisi*. Cilt/Vol 1, No 3, 182-186.

(EDQM) Directorate for the Quality of Medicines of the Council of Europe (2007). The European Pharmacopoeia, Amended Chapters 2.6.12, 2.6.13, 5.1.4, Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France.

Downes F P, K Ito. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 4th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Eaton A D, L S Clesceri, A E Greenberg. (1995). Standard methods for the examination of water and wastewater, 19th ed. American Public Health Association, Washington, D.C.

Emborg H. D, Andersen J. S, Seyfarth A. M, Boel J, Weneger H. C. (2003). Relations Between The Occurance of Resistance to Antimicrobial Growth Promoters Among *Enterococcus faecium* Isolated from Broilers and Broiler Meat. *International Journal of Food Microbiology*, 84, 273-284.

Endimiani A, Perez F, Bajaksouzian S, Windau AR, Good CE, Choudhary Y, Hujer AM, Bethel CR, Bonomo RA, Jacobs MR. (2010). Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol*; 48(12): 4417-25.

Erdem B. Enterobacteriaceae. Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi, Temel ve Klinik mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 1999, 1. baskı: sayfa 471-515.

Ergönül, B. (2011). Meat Consumption and Buying Behaviors of Consumers Living in Manisa City Center, Turkey. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 10(3):286-290.

FAPRI (2012). World Livestock: FAPRI-ISU 2011 Agricultural Outlook, http://www.fapri.iastate.edu/outlook/2011/tables/6_livestock.pdf Erişim tarihi: 10.05.2015

FAO Gıda Öngörüler Raporu, (2010-2011). Global Pazar Analizi, ISSN 1560-8182, www.fao.org Erişim tarihi: 05.05.2015

FAO. (2015). <http://www.fao.org/ag/againfo/themes/en/meat/background.html> Erişim tarihi: 29.06.2015

- Franklin A, Acar J, Anthony F, Gupta R, Nicholls T, Tamura Y, Thompson S, Threlfall EJ, Vose D, van Vuuren M, White DG, Wegener HC, Costarrica ML.** (2001). Antimicrobial resistance: harmonisation of national antimicrobial resistance monitoring and surveillance programmes in animals and in animal-derived food. *Rev Sci Tech*, 20: 859–870.
- Friedman ND, Kaye KS, Stout JE, McGarry SA, Trivette SL, Briggs JP.** (2002). Health care-associated bloodstream infections in adults: a reason to change the accepted definition of community-acquired infections. *Ann Intern Med*. 137:791-7.
- Gavini F, Ferragut C, Izard D, Trinel P. A, Leclerc H, Lefebvre, B, D. A. A. Mossel.** (1979). *Serratia fonticola*, a new species from water. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 29, 92-101.
- Geser N, Stephan R, 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.
- Gold HS, Moellering Jr RC.** (1996). Antimicrobial-drug resistance. *The N Engl J Med*, 335: 1445-1451.
- Göktan D.** (1990). Gıdaların Mikrobiyal Ekolojisi: Et Mikrobiyolojisi. Ege Üniversitesi Basımevi, Bornova, İzmir.
- Guerra B, Junker E, Schroeter A, Malorny B, Lehmann S, Helmuth R.** (2003). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 52, 489–492.
- Guarino A, Giannella R, Thompson MR.** (1989). *Citrobacter freundii* produces an 18-amino-acid heat-stable enterotoxin identical to the 18-amino-acid *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin (ST Ia). *Infect Immun* 57:649–652.
- Gupta R, Rauf SJ, Singh S, Smith J, Agraharkar ML.** (2003). Sepsis in a renal transplant recipient due to *Citrobacter braakii*. *South Med J* 96:796–798.
- Güler Ö, Aktaş O, Uslu H.** (2008). Klinik örneklerden izole edilen bakterilerde beta-laktamaz varlığının ve çeşitli antibiyotik gruplarına karşı duyarlılıklarının araştırılması. *Ankem Derg.* 22:72-80.
- Gülay Z.** (2005). Beta-laktamlara direnç mekanizmaları. antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizmaları. Ulusoy S (Editör). Beta-laktamazlar ve klinik önemi'nde. Ankara: *Bilimsel Tıp Yayınevi*; s.9-34.
- Gülay Z.** (2004). ESBL'lerin tanı yöntemleri. Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ (eds). Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar. *Bilimsel Tıp Yayınevi*, Ankara.
- Gündogan N, Avcı 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. *Afr. J. Microbiol. Res.* Vol. 7(31), pp. 4059-4064, 2 August, 2013 DOI: 10.5897/AJMR12.943. ISSN 1996-0808 ©2013 Academic Journals.

- Güdücüoğlu H, Baykal S, İzci H, Berktaş M.** (2007). Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarının antibiyotiklere direnci. *ANKEM Derg* 2007; 21 (3): 155-160.
- Gür D.** (2002). Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul, Nobel tıp kitabevleri, 182-93.
- Gür D.** (1997). Beta-laktamazlar. *Flora Dergisi*; 2:3-18.
- Gyles CL.** (2008). Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim Health Res Rev.* 9: 149-58.
- Hall LMC, Livermore DM, Gür D, Akova M, Akalın HE.** (1993). OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.* 37: 1637-44.
- Harada K, Asai T.** (2010). Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *J Biomed Biotechnol*; doi:10.1155/2010/180682.
- Hartman P. A, S A Minnich.** (1981). Automation for rapid identification of salmonellae in foods. *J. Food Prot.* 44:385-386.
- Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Meunier D, Butaye P, Franco A, Utinane A, Amado A, Moreno M, Greko C, Stärk K, Berghold C, Myllyniemi AL, Wasyl D, Sunde M, Aarestrup FM.** (2008). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002–2004. *Acta Vet Scand*; 50: 28.
- Hickman-Brenner F W, Huntley-Carter G P, Saitoh Y, Steigerwalt A G, Farmer J. J. Brenner D. J.** (1984). *Moellerella wisconsensis*, a new genus and species of *Enterobacteriaceae* found in human stool specimens. *J Clin Microbiol*, 19, 460–463.
- Hodges GR, Degener CE, Barnes WG.** (1978). Clinical significance of *Citrobacter* isolates. *Am J Clin Pathol* 70:37–40
- Hordijk J, Wagenaar J A, Giessen A V D, Dierikx C, Essen-Zandbergen A V, Veldman K, Kant A, Mevius D.** (2013). Increasing prevalence and diversity of ESBL/AmpC-type b-lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from veal calves from 1997 to 2010. *J Antimicrob Chemother*; 68: 1970–1973 doi:10.1093/jac/dkt132 Advance Access publication 8 May 2013.
- IMS – GIRA Dünya Kırmızı Et ve Beyaz Et Durum Raporu 2012**, International Meat Secretariat, Paris, Fransa
- IMS – GIRA Dünya Kırmızı Et ve Beyaz Et Durum Raporu 2012**, International Meat Secretariat, Paris, Fransa.
- Jacoby GA, Medeiros AA.** (1991). More extended spectrum β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 35: 1697–704.
- Japanese Pharmacopoeia.** (2007). Society of Japanese Pharmacopoeia. *Amended Chapters* 35.1, 35.2, 7. The Minister of Health, Labor, and Welfare.

- Jensen L.B, Hammerum A.M, Poulsen R.L, Westh H.** (1999). Vancomycinresistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed field gel electrophoresis patterns containing similar Tn-1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:724-729.
- Jong A, Stephan B, Silley P.** (2011). Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the EU. *J Appl Microbiol*; 112: 239-45.
- Khachatourians GG.** (1998). Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. *CMAJ* 1998;159:1129-36.
- Kim YK, Pai H, Lee HJ.** (2002). Bloodstream infections by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: epidemiology and clinical outcome. *Antimicrob Agents Chemother*; 46:1481-91.
- Knothe H, Shah P, Kremery V, Antal M, Mitsuhashi S.** (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11(6), 315–317.
- Levy SB.** (1982). Microbial resistance to antibiotics. An evolving and persistent problem. *Lancet*, 10:83-88.
- Livermore D. M.** (1995). Beta-lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8(4): 557-584.
- Livermore DM.** (2000). Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol*; 3: 489-95.
- MacFaddin J.F.** (1985). Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.
- Madec JY, Lazizzera C, Chatre P, Meunier D, Martin S, Lepage G, Menard MF, Lebreton P, Rambaud T.** (2008). Prevalence of Fecal Carriage of Acquired Expanded-Spectrum Cephalosporin Resistance in *Enterobacteriaceae* Strains from Cattle in France. *Journal of Clinical Microbiology*, p. 1566-1567 0095-1137/08/\$08.00_0 doi:10.1128/JCM.02299-07. Copyright © 2008, American Society for Microbiology. All Rights Reserved. Vol. 46, No. 4.
- Mahmood K, Büyükunal-Bal E B.** (2014). Transmission of Antibiotic Resistant *Enterobacteriaceae* between Animals and Humans Gastrointestinal Tract with the Evidence of in vivo Plasmid Transfer. *KSU J. Nat. Sci.*, 17(1).
- Mathur S, Singh R.** (2005). Antibiotic Resistance in Food Lactic Acid Bacteria-A Review. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-295.
- Mossel, Vissar, Cornellsen.** (1963). *J. Appl. Bacteriol.* 26:444.
- Naas T, Poirel L, Nordmann P.** (2008). Minor extended spectrum beta-lactamases. *Clin Microbiol infect*; 14(S1): 42-52.
- Nash P, M M Krenz.** (1991). Culture media. In: A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy, Manual of clinical microbiology, 5th ed. *American Society for Microbiology*, Washington, D.C.

- Nordmann, Cuzon G, Naas T.** (2009). The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis*;9:228-36.
- Nordman P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel- Briand Y, Labia R.** (1993). Characterization of a novel extended-spectrum β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 37: 962–9.
- Nicasio AM, Kuti JL, Nicolau DP.** (2008). The current state of multidrug-resistant gram-negative bacilli in North America. *Pharmacotherapy*; 28:235-49.
- OECD - FAO Tarım Öngörüleri Raporu, 2012 – 2021, OECD Publishing and FAO.** http://dx.doi.org/10.1787/agr_outlook-2012-en Erişim tarihi: 05.05.2015
- Peternel C, Galler H, Zarfel G, Luxner J, Haas D, Grisold A J, Reinthaler F F, Feierl G.** (2014). Isolation and characterization of multidrug-resistant bacteria from minced meat in Austria. *Food Microbiology* 44 (2014) 41-46.
- Pitout JD, Laupland KB.** (2008). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.*; 8(3): 159-66.
- Poiri L, Naas T, Guibert M, Chaibi B, Labia R, Nordmann P.** (1999). Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *E. coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 573-81.
- Poiri L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P.** (2000). Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamases, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 44: 622-32.
- Ramia S, Neter E, Brenner D. J.** (1982). Production of enterobacterial common antigen as an aid to classification of newly identified species of the families *Enterobacteriaceae* and *Vibrionaceae*. *J Clin Microbiol*, 32, 395–398.
- Rasheed M U, Thajuddin N, Ahamed P, Teklemariam Z, 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.
- Reist M, Geser N, Hachler H, Scharrer S, Stephan R.** (2013). ESBL-Producing *Enterobacteriaceae*: Occurrence, Risk Factors for Fecal Carriage and Strain Traits in the Swiss Slaughter Cattle Population Younger than 2 Years Sampled at Abattoir Level. *PLOS ONE* 8(8): e71725. doi:10.1371/journal.pone.0071725.
- Rıfaat E.A., Tekiner İ.H. ve Özpınar H.** (2014): Halk Sağlığı Açısından İçme ve Kullanma Sularında Koliform ve Fekal Koliform Bakterilerin Varlıklarının Klasik ve MASS Spektrometresi Yöntemleriyle İncelenmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(2):20-32.
- Rice LB, Sahm D, Bonomo RA.** (2003). Mechanism of resistance to antibacterial agents. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover FC (Eds.). *Manual of clinical microbiology*. 8th ed. Washington: ASM Press; p.1074-1104.
- Sarıca Ş.** (1999). Kanatlı Hayvan Beslemede Probiyotik Kullanımı. *Hayvansal Üretim*, 39-40: 105-112.

Sarı H. (2005). Karbapenemlere dirençli gram-negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA / meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta- laktamaz varlığının araştırılması. Uzmanlık tezi, İstanbul.

Saenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. (2001). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. *International Journal of Antimicrobial Agents* 18 353–358.

Samaha-Kfoury JN, Araj GF. (2003). Recent development in β lactamases and extended spectrum β lactamases. *Br Med J*;327(7425):1209-13.

Schmidt H, Montag M, Bockemuhl J, Heesemann J, Karch H. (1993). Shiga-like toxin II-related cytotoxins in *Citrobacter freundii* strains from humans and beef samples. *Infect Immun* 61:534–543.

Sorrells K M, Speck M L, Warren J A. (1970). Pathogenicity of *Salmonella gallinarum* after metabolic injury by freezing. *Appl. Microbiol.* 19:39-43.

Springer B, Bruckner K. (2012). Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* from raw meat and comparison to human isolates. *Wien. Tierarztl. Monatsschr.* 99, 44e50.

Stürenburg E, Mack D. (2003). Extended spektrum beta lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect*; 47: 279-95.

Şeker İ, Özen A, Güler H, Şeker P, Özden İ. (2011). Elazığ'da Kırmızı Et Tüketim Alışkanlıkları ve Tüketicilerin Hayvan Refahı Konusundaki Görüşleri. *Kafkas Üniversitesi Vet Fak Dergisi*, 17(4): 543-550.

Tang S S, Apisarnthanarak A, Hsu LY. (2014). Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community-and healthcare-associated multidrug-resistance bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews*.

Tham J. (2012). Extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: epidemiology, risk factors, and duration of carriage. Sweden: *Department of Clinical Sciences/Malmö Infectious Disease Research Unit/Lund University*; Available from: <http://lup.lub.lu.se/luur/download?func=downloadFile&recordOid=3045564&fileOid=3045665> Erişim tarihi: 10.04.2015

Töreci K. (2002). *Escherichia* türleri. Ayşe Willke Topçu, Güner Söyletir, Mehmet Doğanay, infeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Nobel tıp kitapçevleri, cilt 2,: sayfa 1564-1574.

TUİK, (2012a). Hayvansal Üretim İstatistikleri 2011. <http://www.tuik.gov.tr> Erişim tarihi: 05.05.2015

TUİK, (2012b). Kırmızı Et Üretim İstatistikleri 2011. <http://www.tuik.gov.tr> Erişim tarihi: 05.05.2015

TUİK, (2014a). Hayvansal Üretim İstatistikleri, Mayıs 2014. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/medas/?kn=79&locale=tr> Erişim tarihi: 05.05.2015

TUİK, (2014b). Kırmızı Et Üretimi, IV.Çeyrek: Ekim-Aralık 2014. <http://tuikapp.tuik.gov.tr/medas/?kn=79&locale=tr> Erişim tarihi: 05.05.2015

- Tuncer Ş D, Şanlı Y, Küçükersan K, Filazi A.** (1999). Stabilize Rumen Ekstraktının Broyler Rasyonlarında Kullanılması. S.287-293.VIV. Poultry Yutav' 99, Uluslararası Tavukçuluk Fuarı ve Konferansı 3-6 Haziran Bildiriler Kitabı, İstanbul.
- Tuncer H.İ.** (2007). Karma Yemlerde Kullanımı Yasaklanan Hormon, Antibiyotik Antikoksidiyal ve İlaçlar. *Lalahan Hay. Arast. Enst. Derg.*, 47(1):29-37.
- Türkdoğan F. I, Yetilmezsoy K.** (2009). Appraisal of potential environmental risks associated with human antibiotic consumption in Turkey, *Journal of Hazardous Materials*, 166, 297-308.
- Unat EK.** (1986). *Escherichia coli*. Prof. Dr. Ekrem Kadri Unat, Tıp bakteriyolojisi ve virolojisi, *Dergah Tıp yayınları*, ikinci baskı, cilt 1: sayfa 546.
- United States Pharmacopeial Convention.** (2007). The United States pharmacopeia, 31st. *Amended Chapters* 61, 62, 111. The United States Pharmacopeial Convention, Rockville, MD.
- Urbanov E, Pěov Z.** (1997). Identification of Citrobacter species and their occurrence in raw products and foods (in Czech). *Vet Med (Praha)* 42:87-91.
- Ustaçelebi Ş.** (1999). Temel ve Klinik Mikrobiyoloji, içinde; Erdem B. *Enterobacteriaceae*. Bölüm: 11, 1.Baskı, Güneş Kitabevi Ltd Şti, Ankara, s: 471-515.
- Ünal N.** (2012). Mastitisli Hayvanlardan İzole Edilen Stafilokokların Antibiyotik Direnci ve Hayvanlarda Metisiline Dirençli Staphylococcus aureus. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 9(3) 221-231.
- Vahaboğlu H.** (1998). Beta-laktamaz tanı testlerinin rutin kullanımı ve klinik önemi. *Flora*;3:73-9.
- Wade JJ, Desai N, Casewall MW.** (1991). Hygienic hand disinfection fort he removal epidemic vancomycin resistant *Enterococcus faecium* and gentamisin resistant Enterobacter cloacae, *J Hosp Infect* 18:211.
- Weyrich P, Ettahar N, Legout L, Meybeck A, Leroy O, Senneville E.** (2012). First initial community-acquired meningitis due to extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* complicated with multiple aortic mycotic aneurysms. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 11: 4.
- Yetkin G, Kuzucu Ç, Çalışkan A, Ay S.** (2006). Kan kültürlerinde üreyen *Escherichia coli*' lerin antibiyotik duyarlılıkları, GSBL oranları ve hastane birimlerine göre dağılımı. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*; 13: 147-150.
- Yıldırım Y.** (2010). Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri; İlgili Metodlar, Sonuçların Yorumlanması ve Kanatlılarda Bulunan Bazı Bakterilerdeki Dirençlilik. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg* 7(2) 117-129.
- Yu WL, Chuang YC, Rasmussen JW.** (2006). Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control. *J Microbiol Immunol Infect*; 39:264-77.
- Yuluğ N.** (1997). Beta-laktamazlar ve klinik açıdan önemi. *Ankem Derg.* 11: 205-207.

Yüce A. (2001). Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları. *Klinik Dergisi* Cilt 14.Sayı:2 S:41-46 Ankara.

Yüksek N. (2000). Eterde Antibiyotik Kalıntılarının Aranması Üzerinde Çalışmalar, *J Fac Vet Med* 20 (2001) 85-90.

ÖZGEÇMİŞ

NİLÜFER ÖNDES

Adres: İST. **E-MAİL:** niluferondes@hotmail.com

Doğum Tarihi-Yeri: 02.11.1990- Kayseri

Eğitim Durumu: Gıda Mühendisi



Bitirdiği okullar
:İlköğretim 1996-2004
:Lise (sayısal) 2004-2007

Çanakkale 18 Mart Üni. Bayramiç MYO Gıda Teknolojisi (2007-2009)
3.44 / 4'lük sistem (Bölüm 3. lüğü)

İstanbul Aydın Üni. **Mühendislik-Mimarlık Fakültesi**
Gıda Mühendisliği (2011-2013; 2,82/4)

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Güvenliği ve Beslenme Anabilim Dalı (2013-2015; 3,66/4)

Stajlar

Büyükçekmece İlçe Tarım Müdürlüğü (2008)
Bakırköy Bürosu Gıda Denetimi (15 iş günü)

Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı (2008)

İstanbul İl Kontrol Laboratuvar Müdürlüğü-Fiziksel Analiz ve Kalıntı Laboratuvarları-Gıda Analizleri (Florya, 30 iş günü)

T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı (2012)

Bakırköy Kaymakamlığı ilçe, gıda, tarım ve hayvancılık müdürlüğü (15 iş günü)

Ekol Et Gıda İNŞ. ve Tekstil Sanayi TİC. LTD. ŞTİ (2012)

Üretim ve Kalite Güvence (40 iş günü)

Sertifika-Konferans-Başarılar

ISO 22000:2005 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Standardı Eğitim Sertifikası
Er Danışmanlık-Hatice Er (3 tam gün-2009)

ÖSYM 2011 DGS Sayısal 1407. sı

Puan: 293,285

Rodos Grup Eğitim ve Kariyer Hizmetleri (25-26 Mayıs 2013)

ISO 9001:2008;

ISO 19011-INTERNAL AUDITOR;

ISO 18001:2007;

ISO 22000:2005

ISO 14001:2004 Kalite eğitim sertifikaları

Tezden Üretilen Yayınlar

Bilimsel Makale

- **Öndes, N.** ve **Özpınar, H.** (2015): Phenotypic Determination of ESBL Producing *Enterobacteriaceae* in Red Meat Samples. **Sunuldu.**

Uluslararası Kongre Sözlü Bildiri

- **Öndes, N., Tekiner, İ.H.** ve **Özpınar, H.** (2015): Risk Assesment of the Extended-Spectrum Beta Lactamase (ESBL) Producing *Enterobacteriaceae* in Meat Samples For Public Health. 2. Dünya Sağlık Bilimleri Konferansı 30 Nisan- 2 Mayıs 2015, Efes Sürmeli Hotel, İzmir, Türkiye.