

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**SEBZELERDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ ÜRETEN
Enterobacteriaceae spp. İZOLATLARININ ANTİBİYOTİKLERE
DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çiğdem Sökmen

**GIDA GÜVENLİĞİ ve BESLENME ANABİLİM DALI
GIDA GÜVENLİĞİ PROGRAMI**

OCAK, 2016

T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



SEBZELERDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ ÜRETEN
Enterobacteriaceae spp. İZOLATLARININ ANTİBİYOTİKLERE
DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Çiğdem Sökmen

Y1413.210003

GIDA GÜVENLİĞİ ve BESLENME ANABİLİM DALI
GIDA GÜVENLİĞİ PROGRAMI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

OCAK,2016



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 Y1413.210003 numaralı öğrencisi **Çiğdem SÖKMEN**'in "**SEBZELERDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEN Enterobacteriaceae spp. İZOLATLARININ ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ**" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 08.12.2015 tarih ve 2015/28 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından **Qy birlip** ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak **Kabul** edilmiştir.

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi :08.01.2016

1)Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

.....
.....

2) Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Dilek DÜLGER ALTINER

.....
.....

3) Jüri Üyesi : Prof. Dr. Ali BİLGİLİ

.....
.....

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

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “**Sebzelerde Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten *Enterobacteriaceae spp.* İzolatlarının Antibiyotiklere Dirençlilik Durumlarının İncelenmesi**” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR ‘ın sorumluluğunda tamamladığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 08/01/2016

ÇİĞDEM SÖKMEN

Atiseme...

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca benden bilgilerini, deneyimlerini ve yardımlarını esirgemeyen başta değerli tez danışmanım Sn. Prof. Dr. Haydar Özpınar olmak üzere tüm hocalarıma, bu proje süresince büyük bir sabırla beni destekleyen değerli hocam Sn. İsmail Hakkı Tekiner ve başta Gamze Benlikurt olmak üzere tüm proje arkadaşlarıma, son olarak da hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, varlıklarıyla beni onurlandıran değerli aile bireylerime teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

OCAK 2016

ÇİĞDEM SÖKMEN

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	IX
İÇİNDEKİLER	XI
SİMGELER VE KISALTMALAR	XIII
ÇİZELGE LİSTESİ.....	XV
ŞEKİL LİSTESİ.....	XVII
ÖZET	XIX
ABSTRACT.....	XXI
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesi.....	3
2.1.1.Genel Özellikleri	3
2.1.2. <i>Escherichia coli</i>	4
2.1.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	5
2.1.4. <i>Citrobacter spp.</i>	5
2.1.5. <i>Enterobacter spp.</i>	6
2.1.6.Sebzelerde <i>Enterobacteriaceae</i> bulunma riskleri.....	7
2.1.7.Antibiyotikler ve önemi	8
2.1.8.Beta laktam grubu antibiyotikler.....	11
2.1.9.Antibiyotik direnci gelişimi	13
2.1.10.Antibiyotik direnç mekanizmaları.....	14
2.1.10.1.Antibiyotiğin hedefi olan molekülün değişmesi	14
2.1.10.2.Hücre duvarı geçirgenliğinin azalması	15
2.1.10.3. Enzimatik yıkımdan kaynaklanan direnç	16
2.1.11.Beta laktamaz	17
2.1.12.Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar.....	21
2.1.12.1.Tipleri.....	22
2.1.12.2.Tanı Yöntemleri	24
2.1.13.AmpC beta laktamazlar	26
2.1.14.Metallo beta laktamazlar (MBL).....	27
2.1.14.1.Metallo beta laktamaz (MBL) Özellikleri.....	28
2.1.14.2.Metallo beta laktamaz (MBL) Sınıflandırılması.....	28
2.1.15.Sebzelerde GSBL üreten <i>Enterobacteriaceae</i> türleri.....	30
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	33
3.1.Gereç	33
3.2. Kullanılan Besiyerleri ve Yöntemler.....	34
3.2.1. Kullanılan besi yerleri	34

3.2.1.1. Enterobacteriaceae Enrichment Buyyon (E.E. Broth)	34
3.2.1.2. Chromatic ESBL agar	35
3.2.1.3. Tryptic Soy Agar (TSA)	36
3.2.1.4. Mueller Hinton Agar (MHA)	36
3.2.1.5. Mueller Hinton Broth (MHB)	37
3.2.2. Yöntemler	37
3.2.2.1. Ön zenginleştirme	38
3.2.2.2. Selektif besiyerine inokülasyon	39
3.2.2.3. Oksidaz Testi.....	40
3.2.2.4. Disk difüzyon testi	40
3.2.2.5. Vitek ® MS ile Tiplendirme	42
3.2.2.6. Antibiyogram doğrulama	42
4.BULGULAR	43
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	48
KAYNAKÇA	56
ÖZGEÇMİŞ	67

SİMGELER VE KISALTMALAR

TSA	:Tryptic Soy Agar
TSB	:Tryptic Soy Broth
µl	:Mikrolitre
pH	:Asitlik değeri
gr	:Gram
L	:Litre
µ	:Mikron
µg	:Mikrogram
ml	:Mililitre
mm	:Milimetre
-	:Negatif
+	:Pozitif
°C	:Derece Santigrat
GSBL	:Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz
MBL	:Metallo beta laktamaz
CAZ	:Seftozidim
CAZ CV	:Seftozidim Klavulanik Asitli
CLSI	:Clinical and Laboratory Standarts Institute
CPD	:Sefpodoksim
CPD CV	:Sefpodoksim Klavulanik Asitli
CTX	:Sefotaksimaz/Sefotaksim
CTX CV	:Sefotaksim Klavulanik Asitli
dk	:Dakika
MHA	:Mueller Hinton Agar
MHB	:Mueller Hinton Broth
MIK	:Minimal İnhibitör Konsantrasyonu

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1. Beta laktam antimikrobiyal madde örnekleri ve grupları	12
Çizelge 2.2. Beta laktamaz sınıflandırmaları	20
Çizelge 3.1. Toplanan numunelerin alındığı semtler	33
Çizelge 4.1. VITEK MS ile kolonilerin tiplendirilmesi ve dağılımı.....	44
Çizelge 4.2. Sebzelerden izole edilen GSBL pozitif <i>Enterobacteriaceae</i> türleri	46
Çizelge 4.3. Sebzelerde farklı bakterilere karşı dirençlilik verileri ve yüzdesel dağılımları	47

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Antibiyotik dirençli bakterilerin taşınımı	10
Şekil 2.2. Gram (-) hücre duvarı	16
Şekil 2.3. Antibiyotik direnci mekanizmasının şematik gösterimi	17
Şekil 2.4. Beta Laktamaz etkisi	18
Şekil 2.5. Beta laktamazın moleküler yapısı	19
Şekil 3.1. Pazar ve süpermarketlerden toplanan sebze numuneleri ve ön zenginleştirme	39
Şekil 3.2. ESBL kromojen agarda oluşan renkli koloniler	40
Şekil 3.3. Mueller hinton agara yerleştirilen antibiyotik diskleri	41
Şekil 3.4. Antibiyogram doğrulama aşamaları	42
Şekil 4.1. Sefotaksim (CAZ) dirençli <i>Enterobacteriaceae</i> suşlarının yüzdece dağılımları	45
Şekil 4.2. Sefotaksim (CTX) dirençli <i>Enterobacteriaceae</i> suşlarının yüzdece dağılımları	45
Şekil 4.3. Sefpodoksim (CPD) dirençli <i>Enterobacteriaceae</i> suşlarının yüzdece dağılımları	46

SEBZELERDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN *Enterobacteriaceae spp.* İZOLATLARININ ANTİBİYOTİKLERE DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ

ÖZET

Günümüzde *Enterobacteriaceae* türlerinin Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktam antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç hızla artmış ve halk sağlığını önemli derecede tehdit eder düzeye ulaşmıştır. İnsanların bilinçsiz şekilde antibiyotik kullanımlarının yanı sıra gıdalarda farklı sebeplerden dolayı kullanılan antibiyotikler, burada bulunan bakterilerde dirence sebep olabilmekte ve tüketilmesiyle beraber insan vücuduna aktarılabilmektedir. Yapılan bu çalışmada; İstanbul ve çevre illerdeki semt pazarlarından temin edilen sebzelerde, GSBL üreten *Enterobacteriaceae* familyasına ait izolatların dirençlilik durumlarının tespiti amaçlandı. İstanbul semt pazarları ve süpermarketlerden alınan 13 çeşit (asma yaprağı, dereotu, ispanak, kıvırcık, karalahana, beyaz lahana, mantar, maydanoz, nane, pazı, pırasa, roka, semizotu) olmak üzere toplamda 108 adet sebze numunesi laboratuvara getirildi. Analizler, uluslararası kabul gören talimatlar (bakteri identifikasyonu; ISO/DIS 21528-2, antimikrobiyal duyarlılık; CLSI 2013) doğrultusunda yapıldı. Numuneler, E.E. Broth içerisinde ön zenginleştirme işlemine alındı ve daha sonra GSBL kromojen agara geçildikten sonra, saflaştırma amacı ile Tryptic Soy Agara (TSA) geçiş yapılarak kütle spektrofotometresi (Vitek® MS, bioMerieux) ile tiplendirildi. GSBL şüpheli suşlar ceftazidime (CAZ), sefotaksim (CTX), ve sefpodoksim (CPD) diskleri ile GSBL üretimi için tarandı. GSBL şüpheli türlerin doğrulama ve MİK değeri tayinleri için Merlin Micronaut-S beta-lactamase VII kiti prosedürü takip edildi ve okumalar multiscan spektrometre ile alınarak yazılım sayesinde değerlendirildi. İncelenen numunelerden 69 adet izole edilen bakteriden 18 adeti (%25,55) kesin GSBL (+) sonuç verirken, pozitif sonuç veren bu izolatlar; %55,5'i *Klebsiella pneumoniae* (n=10), %39'u *Escherichia coli* (n=7), %6'sı *Citrobacter freundii* (n=1) şeklinde sıralanmaktadır. Ayrıca antibiyogram doğrulama sırasında ortaya çıkan verilerde; izole edilen *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1) suşunun ve *Acinetobacter baumannii complex* (n=3) suşları olmak üzere toplamda 4 adet izolatın metallo beta laktamaz ürettiği ve ayrıca aynı zamanda GSBL üreten *E. coli* suşlarından birinin ise AmpC ürettiği belirlendi. Sonuç olarak bu çalışmada; beslenmede büyük önem taşıyan sebzelerin GSBL üretebilen enterik bakteriler için önemli bir kaynak olduğu, dolayısı ile gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından büyük bir risk unsuru olabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik direnci, *Enterobacteriaceae*, GSBL, sebze, halk sağlığı

**THE ANALYSIS of ANTIBIOTIC RESISTANCE SITUATIONS of THE
EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE (ESBL) PRODUCING
Enterobacteriaceae spp. ISOLATES' IN VEGETABLES**

ABSTRACT

Nowadays the resistance of *Enterobacteriaceae*s produced against extended spectrum beta lactamase antibiotics has been increased rapidly and reached to a level threatening community health significantly. ESBL are mainly plasmid-encoded enzymes providing an extended resistance to β -lactam antibiotics and can be produced by a variety of different bacteria, such as *Enterobacteriaceae* or nonfermenting bacteria. That people use antibiotics unconsciously and also the usage of antibiotics in foodstuff due to different reasons can cause bacteria resistance and can be transferred to human body via consumption. The objective of this study is to determine the resistance situations of isolates, which belong to *Enterobacteriaceae* family, producing GSBL on vegetables supplied from district bazaars in İstanbul and nearby cities. 13 types (grape leaf, dill, spinach, lettuce, collard greens, white cabbage, mushroom, parsley, mint, chard, leek, garden rocket, purslane) a total of 108 vegetable samples were collected from district bazaars in İstanbul and supermarkets. Analyzes were conducted in accordance with internationally accepted guidelines (bacteria identification; ISO / DIS 21528-2, antimicrobial susceptibility; the CLS 2013). After pre-enrichment in E.E. broth and inoculation on beta-lactamase selective media, the colonies were subcultured onto Trypton Soy agar for characterized by Vitek® MS (bioMérieux). The characterized ESBL suspected strains were screened for ESBL-production by ceftazidime (CAZ), cefotaxim (CTX), and cefpodoxime (CPD) discs respectively. Phenotypic Screening and MIC determination of β -lactamases were performed by disc-approximation testing and Micronaut-S beta-lactamase VII kit (Merlin) and Software (Sifin). 18 out of 69 (%25,55) isolated bacteria being taken from examined samples, results were absolute GSBL(+), this positive resulted isolates' %55,5 *Klebsiella pneumoniae* (n=10), %39 *Escherichia coli* (n=7), %6 *Citrobacter freundii* (n=1) are ranked. Also the existence of different antibiotics resistance was determined during antibiogramme verification. It has been determined that 4 isolate produce metallo beta lactamases notably *Stenotrophomonas maltophilia* (n=1) strains and *Acinetobacter baumannii* complex (n=3) strains, and at the same time one of the E. Coli strains producing GSBL also produces AmpC. Consequently it has been determined in this study that vegetables that we constantly consume in our daily lives are very important source for enteric bacteria producing GSBL, thus it can be a big element of risk for food security and community health.

Key Words: *Antibiotic resistance, Enterobacteriaceae, GSBL, vegetable, community health*

1. GİRİŞ

Son yıllarda insan sağlığına olumlu etkileri olan çiğ sebze tüketimine ilgi oldukça artış göstermektedir. WHO raporuna göre; diyetlerinde az miktarda sebze tüketilmesinin başta kalp ve damar hastalıkları olmak üzere Tip 2 diyabet ve obezite gibi birçok sağlık sorununa yol açtığı belirtilmekte ve buna bağlı olarak yılda 2,7 milyon insan çiğ sebze ve meyve tüketimine bağlı olarak öldüğü işaret edilmektedir (WHO, 2003).

Sebzeler, toprağın altında ve yüzeyinde yetiştirildiğinden toprak mikroorganizmalarıyla fazla miktarda kirlenirler (Kıvanç, 2011). *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* gibi fekal kökenli *Enterobacteriaceae* türleri genellikle suda, toprakta ve bitkilerde bulunabilir (Bagley, 1985; Hartl and Dykhuizen, 1984; Renaud ve ark. 1990; Tyler ve Triplett, 2008) ve bu alanlarda *Enterobacteriaceae* türlerinde GSBL üretimi görülebilmektedir (Chen ve ark. 2010; Dhanji ve ark. 2011; Hartmann ve ark. 2012; Kim ve ark. 2008; Lu ve ark. 2010; Machado ve ark. 2009; Tacao ve ark. 2012).

Antibiyotiklerin kullanıma başlanmasından itibaren günümüze kadar uzun bir süre geçmemesine karşın bu ilaçlarla ilgili gelişmeler artmakta ve kullanımları sırasında ve/veya sonrasında meydana gelebilecek önemli sorunlar da gündeme gelmeye başlamaktadır. Bu sorunların en önemlisi ise bu maddelere karşı gelişen bakteriyel direnç olarak bilinmektedir (Akalin, 1994). Antibiyotiklere karşı gösterilen bakteri direnci, bir bakterinin, üreme fonksiyonlarını bozabilen veya ölümüne neden olabilen etkiye karşı koyma yeteneği olarak tanımlanmaktadır (Meyers, 1987).

Antimikrobiyal maddelerin sebze ve meyvelere bulaşması birçok yolla olabildiği gibi en önemli bulaşma yolları; tedavi veya büyüme amacıyla hayvancılıkta kullanılan antibiyotiklerin gübre vasıtasıyla toprağa ulaşabilmesi ya da bu maddelerin doğrudan toprağa verilmesi olduğu söylenebilir. Toprağa karışması

halinde antibiyotiklere karşı sebzelerde ve meyvelerde bulunan bakteriler direnç kazanabilir ve birçok yıl toprakta kalabilir (Kemper, 2008; Teuber, 1999).

Dünyada, sebzelerde antibiyotik dirençlilikleri üzerine çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Avrupa'da yapılan çalışmalara bakıldığında sebze ve meyvelerden izole edilen *Enterobacter* türlerinin beta laktam grubu antibiyotiklere dirençli genleri taşıdıkları görülmektedir (Rulmy ve ark. 2010; Schwaiger ve ark. 2011; Blaak ve ark. 2013).

Bu çalışmada, yurtdışında ve ülkemizde kullanılan Beta – laktam grubu antibiyotiklerin (sefotaksim, seftazidim, sefpodoksim), İstanbul ve çevresindeki semt pazarlarından temin edilen sebzelerde bulunan *Enterobacteriaceae* familyasına ait bakterilerde oluşturabileceği dirençlerin tespiti amaçlandı. Bu çalışmanın sonucunda; ülkemiz literatürlerinde çok fazla yer bulamayan bu konunun literatürlere katkıda bulunması hedeflendi.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Enterobacteriaceae* Ailesi

2.1.1. Genel özellikleri

Enterobacteriaceae'ların adı ilk olarak Rahn (1937) tarafından önerilmiştir. *Enterobacteriaceae* ailesi spor oluşturmeyen, gram (-) özellikli, fakültatif anaerob ve genelde boyları 1-5 µm aralığında olan bakterilerdir. *Saccharobacter fermentans*, *Yersinia* ve *Erwinia*'nın bazı türleri hariç bu bakteriler nitrati nitrite indirgeme ve çeşitli karbonhidratları fermente etme özelliğine sahiptir (ILSI, 2011).

Enterobacteriaceae'lar bakterilerin genetik ve biyokimyasal olarak büyük bir grubunu oluşturmaktadırlar. 1960'lara kadar bakteri sınıflandırması büyük ölçüde fenotipik özelliklere ve kültür temelli gözlemlere dayanmaktadır. DNA-DNA hibridizasyonu ve guanin ve sitozin (G + C) tayini gibi genetik yöntemlerin tanıtılması ile; bakteriyel taksonomi ve sınıflandırmada devrim oldu. Sonuç olarak; 1974'te 12 cins ve 36 tür olarak tanımlanan *Enterobacteriaceae* familyası, 2006 yılında 34 cins, 149 tür ve 21 alt tür olmak üzere literatürlere geçti (Baylis, 2006). *Enterobacteriaceae* ailesine ait bu rakamlar şu anda en az 48 cins, 219 tür ve 41 alt türlere kadar büyüdü (ILSI, 2011).

Enterobacteriaceae türleri çevrede yaygın olarak bulunmaktadırlar. İnsan ve hayvan bağırsaklarında doğal konakçı olan bazı türler; *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providentia* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp. olarak sıralanabilmektedir (Murray ve ark. 2005; Paterson, 2006; Falagas ve Bliziotis, 2007). Bu suşlar; *E.coli*'nin bazı türleri gibi kommensal olarak zararsız olsalar da, diğerleri hayvanlarda ve insanlarda patojen olarak bulunmaktadırlar. Çok geniş bir alana yayılmaları nedeniyle *Enterobacteriaceae* üyelerinin besin zincirine de bulaşmaları kaçınılmazdır (ILSI,2011) .

Enterobacteriaceae sayımı gıda sıhhi durumunda önemli bir ölçüttür. Bu hücreler seçici ortam üzerinde koloniler oluşturmasalar bile vücuda alındığında enfeksiyona neden olabilirler (Sorrells ve ark., 1970).

Enterobacteriaceae neden olduğu enfeksiyonların antibiyotiklerle tedavi edilir ve etkili maddeler arasında florokinolonları, beta-laktamlar ve aminoglikozidler vardır. *Enterobacteriaceae* türleri, böylece antibiyotiklere dirençli hale gelebilir ve inhibitör etkisini önlemek için çeşitli mekanizmalar geliştirebilir. Günümüzde, çoklu dirence sahip suşlar ve farklı antibiyotik gruplarına karşı direnç mekanizmaları ortaya çıktı (Murray ve ark. 2005; Gilbert ve ark., 2007; Anonim 1, 2013).

2.1.2. *Escherichia coli*

1885’de Theodor Escherich tarafından ishalleri süt çocuklarının dışkılarından elde edilen *Escherichia coli* (*E. coli*), 1919 da Castellani ve Chalmer şu anki ismini önerene kadar *Bacterium coli commune* ismi ile tanınmaktaydı (Töreci 2002; Bilgehan 2000). *E. coli* bakterisinin ilk insan hastalıklarıyla ilgili olan suşu *Enteropatogenik E. coli* 1940 ve 1950 yılları arasında bulunmuştur ve bunun arkasından ortaya çıkan *E.coli* O157:H7 1980’li yıllarda ABD’de açıklanarak, birçok morbidite ve mortalite ile ilişkilendirildi (Lawson, 2004; Chen ve Frankel, 2005).

Escherichia türü bakteriler sıklıkla insan ve hayvan bağırsaklarından izole edilmektedirler ve bu bilgi göz önünde bulundurulduğunda; bu türlerin sudaki varlığı fekal kontaminasyonun indikatörü olarak düşünülebilmektedir (Topçu ve ark. 2008).

Özellikle *E.coli*’lerde direnç giderek büyüyen bir problem haline dönüşmektedir. Çoğu bakteride de olduğu gibi *E.coli*’lerde de direnç profiline bakıldığında; beta laktam türü antibiyotiklere karşı direnç gelişmesinde beta laktamaz enziminin yapımı ve bakteri içine antibiyotik girişinin azalması ayrıca florokinolonlara karşı dirençte hedef molekülde değişikliğin yanı sıra aminoglikozidlere karşı dirençte sentezlenen enzimlerle aminoglikozidlerin modifikasyonu önemli rol oynamaktadır (Palabıyıkoglu ve Bengisun 1999; Akalın ve ark., 2003).

2.1.3. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella cinsi 19. yüzyılın sonlarında Alman mikrobiyolog Edwin Klebs tarafından adlandırılmıştır. Daha sonraları Carl Friedlander tarafından *Klebsiella pneumoniae*'nin sebep olduğu ağır öldürücü pnömoni tablosu araştırılıp ve ayrıntılı bir şekilde tanımlandığından dolayı *Klebsiella pneumoniae* yıllarca 'Friedlander basili' olarak adlandırıldı (Koneman ve ark. , 1997; Erdem ve Ustacelebi 1999).

Enterobacteriaceae ailesinin yer alan *Klebsiella*, ailenin genel karakteri olan 2'şer 2'şer veya kısa zincirler oluşturan 0.7-1.5 x 2.0-5.0 µm boyutlarında ve gram (-) hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsüllü çomakçıklar olarak tanımlanmaktadır. (Bilgehan 2000).

Klebsiella cinsinde *Klebsiella pneumoniae*, *K. Ornithinolytica*, *K. oxytoca*, *K. ozanae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. planticola*, *K. terrigena*, olmak üzere 7 tür bulunmaktadır ve ayrıca bu bakteriler ısıya dayanıksız oldukları, nemli ortamda 55°C'de 30 dk içinde öldükleri, oda sıcaklığında tutulan kültürlerin haftalarca canlı kalabildiği gibi, + 4°C'de aylarca canlı kaldıkları bildirilmektedir (Koneman ve ark., 1997; Erdem ve Ustacelebi 1999).

Klebsiella cinsi bakteriler, insanlarda bağırsak, üst solunum yolları florasında bulunarak genellikle pnömoni, idrar yolu infeksiyonları, otitis media, sinuzit, menenjit gibi birçok hastalığa yol açmaktadır. Ayrıca hayvanlar ile toprak ve sularda da buldukları bildirilmektedir (Bilgehan, 2000).

İn vitro ortamlarda yapılan duyarlılık testleri ile sefalosporinlere, penisilinlere ve aztreonama karşı duyarlı belirlenen GSBL üreten *K. pneumoniae*, klinik olarak dirençli olduğu görülmektedir ve bu direnç hayatı tehdit eden enfeksiyonlarda kullanılabilir ilaçları sınırlamaktadır (CLSI,2005; Kizirgil ve ark. 2005).

2.1.4. *Citrobacter spp.*

Citrobacter türleri düz, fakültatif anaerobik ve hareketli gram (-) basillerdir. Bu cins Werkman ve Gillen tarafından 1932 yılında ortaya atılmıştır (Werkmen ve Gillen, 1932). 1993 öncesinde, sadece 3 tür, *Citrobacter freundii*, *Citrobacter koseri* (*Citrobacter Diversus*) ve *Citrobacter amalonaticus*, kabul edildi (Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology, 1993). 1993 yılında, Brenner ve ark. tarafından DNA hibridizasyonu ile 11 farklı tür olarak

Citrobacter sınıflandırıldı ve *C.freundii*, *C.koseri*, *C. amalonaticus*, *C. farmeri*, *C. youngae*, *C. braakii*, *C. werkmanii*, *C. sedlakii* olarak belirlendi fakat 9., 10. ve 11. türe isim verilmedi (Brenner ve ark. 1993). Daha sonra 9,10 ve 11 numaralı türler *C. rodentium*, *C. gillenii*, *C. Murlinae* olarak tanımlandı (Schauer ve ark., 1995; Brenner ve ark., 1999).

Citrobacter türleri genellikle su, toprak, gıda, hayvan ve insanlarda bağırsak sistemlerinde bulunur. β -laktamaz üretimi hem *C. freundii* hem de *C. koseri* isolatları için ortak bir olgudur. *C. Freundii*' nin sıklıkla ürettiği tip 1 beta laktamaz olan beta laktamaz AmpC genellikle kromozom aracılıdır (plazma aracılı da bulunabilir) ve klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam tarafından inhibe edilemezler (Ranjan KP. ve Ranjan N., 2013). Bu nedenle, *C. freundii* suşunda, beta-laktam'ın MIC değerleri, bir beta laktamaz inhibitörü ile kombinasyon halinde, örn; ampisilin + sulbaktam, amoksisilin + klavulanik asit ve tek başına beta-laktam antibiyotikler ile benzer özellik gösterirler (Bryson ve Brogden, 1994; Marshall ve ark., 1995). *Citrobacter freundii*, in vitro koşullarda kolaylıkla beta laktam direnci geliştirebilir (Gootz ve ark. 1984).

2.1.5. *Enterobacter spp.*

Enterobacter'ler, *Enterobacteriaceae* ailesine ait hareketli, genellikle ornitin dekarboksilaz pozitif ve üreaz negatif ve son yıllarda önemi giderek artan patojen mikroorganizmalardır. Klinik Mikrobiyoloji El Kitabı'nın en son baskısında yer alan *Enterobacter*'lere ait toplamda 14 tür veya biyogrup vardır (Farmer, 1995). En sık karşılaşılan türleri arasında, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans* ve *Enterobacter sakazakii* bulunmaktadır (Sanders W. ve Sanders C. 1997).

Enterobacter türleri bakteremi, solunum sistemi, üriner sistem, santral sinir sistemi, yumuşak doku ve yara infeksiyonları gibi geniş bir infeksiyon yelpazesine sahip mikroorganizmalar olmakla birlikte bu bakterilerin adı pre-antibiyotik döneminde pek duyulmaz iken, son yıllarda oluşturdukları hastalıklar ve aynı zamanda dezenfektanlara, antimikrobiyal maddelere karşı oluşturdukları direnç ile *Enterobacteriaceae* familyasına ait diğer üyelerinden daha dirençli olmasıyla ismi duyulmaya başlanmıştır (Ahmet ve ark., 1995; Banerjee ve ark. 1996, Çağlayan ve ark. 1997). Ayrıca; beta laktam antibiyotiklere beta laktamaz enzimleri sayesinde

gösterdikleri direnç ile; uygunsuz antibiyotik kullanımının sonuçlarının en kötü verileri bu türlerde gözlemlenmektedir (Livermore 1995; Gaston 1998).

Yapılan araştırmalara göre *Enterobacter* türlerinin toprakta, sebze ve meyvelerde, suda yaygın olarak bulunmasını göz önüne alarak gıdaya temel kontaminasyon kaynaklarının bu kaynaklar olduğu düşünülmekte ve ayrıca bakterinin yayılmasında böceklerinde önemli bir rol oynadığı bildirilmektedir (Huber, 2000; Iversen ve Forsythe 2003). Bu bakterilerin, gıdayı el ile işleyen kişilerin ellerinde %25 oranında bulunmasının sebebi olarak bitkisel ürünler ile temastan kaynaklanabileceği belirtilmektedir (Huber, 2000).

2.1.6. Sebzelerde *Enterobacteriaceae* bulunma riskleri

Sebze, insanların beslenmesinde kullanılan otsu bitkilerin, kök, gövde, sürgün, yaprak, çiçek, meyve tohumları olan, yüksek miktarda vitamin ve lif içeren bitkiler olarak tanımlanmaktadır (Oroman, 1970; Bayraktar,1970; WHO, 2003).

Sebzeler sulamada kullanılan suyla ve/veya toprakla doğal yollarla kontamine olabilmekte ve ishal, dizanteri yersiniozis gibi bir çok hastalığa sebep olan patojen bakterileri taşıyabilmektedirler (Pingulkar ve ark., 2001). Toprağın doğal florasında bulunan *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* veya insan ve hayvan bağırsağında bulunabilen *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *Campylobacter spp.* gibi patojen bakteriler bunlara örnek verilebilmektedir. WHO bunun kaynaklarını ise gübre, dışkı, işlenmemiş sulama suları olarak göstermektedir (WHO,1998).

İran'da karışık taze kesilmiş sebze salataları mikrobiyolojik kalitesini belirlemek amacıyla yapılan taramada *Enterobacteriaceae* ve toplam koliform seviyesi 3 - 8,3 log kob/g arasında değişmekte olduğu ve ayrıca hazır salatalardan %19,1 ve hazır yemeğe uygun sebzelerden ise %27,8 oranında *E. coli* izole edildiği bildirilmiştir (Najafi ve Bahreini, 2012).

İspanya'da yapılan doğal sebzeler üzerinde *Enterobacteriaceae* taraması olarak yapılan araştırmalarda; *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, *Serratia rubidaea*, *Enterobacter cloacae*, *Kluyvera ascorbata*, *Pantoea agglomerans*, *E. aerogenes*, *E. cancerogenus*, *E. gergoviae*, *E. sakazakii*,

Cronobacter spp., *Acinetobacter baumannii* ve *Stenotrophomonas maltophilia* suşları izole edildiği bildirilmektedir. (Falomir ve ark., 2010; Falomir ve ark., 2013; Rico ve ark.).

Nijerya'da 2015 yılında yapılan bir araştırmada 100 adet sebze numunesi üzerinde *Enterobacteriaceae* taraması ve ayrıca bu suşların antimikrobiyal maddelere karşı dirençliliklerini tespit etmek amacıyla yapılan çalışmada *Klebsiella*, *Proteus* ve *Escherichia coli* suşları izole edilmiştir (Odigie ve ark., 2015).

Dominik Cumhuriyetin'den, Hindistan'dan, Tayland ve Vietnam'dan toplanan sebze örneklerinde *Enterobacteriaceae* taraması yapılarak izole edilen bakteriler ise; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Cronobacter sakazakii* tespit edildiği görülmektedir. (Zurfluh ve ark., 2015).

Almanya'da çiftlik ve süpermarketlerden alınan sebzelerde yapılan fenotipik araştırmalara göre izole edilen bakterilerde *Enterobacter cloacae* ve *Enterobacter gergoviae* türlerine rastlanmaktadır (Schwaiger ve ark., 2011). Yapılan araştırmalarda; marul ve salatalardan izole edilen patojen mikroorganizmalar arasında ise; *Aeromonas hydrophila*, *Citrobacter freundii*, *E.coli* ve *Klebsiella pneumoniae* türlerine olduğu bildirilmektedir (Soriano ve ark., 2000). Geçmişte en fazla yankı uyandıran enfeksiyonlardan biri ise Japonya'da beyaz turp filizlerinden izole edilen ve 10.000 vaka ile sonuçlanan *Escherichia coli O157:H7* enfeksiyonudur (Taormina ve Beuchat, 1999).

Türkiye'de yapılan çalışmalarda; hazır tüketime uygun sebzelerden izole edilen *Enterobacteriaceae* türüne ait suşlardan; *Salmonella spp.*, *E. coli* izolatlarının izole edildiği görülmektedir (Ayçiçek ve ark., 2006; Taban ve ark., 2013; Özpınar ve ark., 2013; Gurler ve ark., 2015).

2.1.7. Antibiyotikler ve önemi

Mantar ve diğer mikroorganizmalar tarafından üretilen zararlı maddelerin ve canlıların gelişimini durduran veya öldüren doğal ya da kimyevi maddelere "antibiyotik" adı verilmektedir (Öner, 1992).

Antibiyotikler mikroorganizmalar üzerinde etki derecelerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmakokinetik özelliklerine göre çeşitli kriterlerin yanı sıra vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlara göre de sınıflandırılmaktadır (Aktuğlu, 1997; Ulusoy, 1999; Anonim 2, 2000; Chambers, 2001).

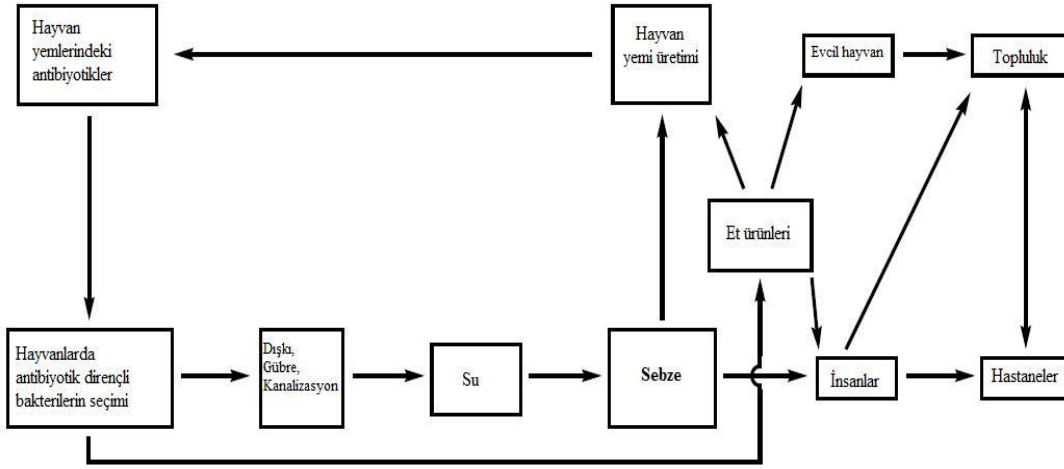
Bu sınıflandırmalar; hücre duvarı sentezini inhibe edenler (β -laktamlar, glikopeptidler) protein sentezini inhibe edenler (aminoglikozidler, tetrasiklinler, makrolidler, streptograminler) ve nükleik asit sentezini inhibe edenler (kinolonlar, sülfonamidler, rifamisinler) olmak üzere özetlenebilmektedir (Gangle 2005).

Kullanımına kısa bir zaman önce başlanan antibiyotiklerde gerçekleşen gelişmeler hızla artmakta ve bunun sonucu olarak da başta antibiyotik direnci olmak üzere ortaya çıkabilecek sorunlarda gündeme gelmeye başlamaktadır (Akalın, 1994).

Antibiyotiklerin çevreye serbest bırakılması sonucu çok az dönüşüme uğrayarak veya değişmeden ve polar moleküllere konjuge olarak, biyolojik ayrışabilirlikleri düşük olduğundan değişik ortamlarda birikim gösterebilirler (Çelebi, 2007; Kemper, 2008).

Hayvan yemlerinde antibiyotiklerin tarımsal ürün olarak kullanımı antibiyotiğe dirençli bakterilerin iletimine sebep olabilir. Bu bakterilerin çeşitli yollarla çevreye taşınması ile bu bakterilerin varlığı insan sağlığına olumsuz etkide bulunabilir (Şekil 2.1). Diğer bir taraftan veteriner hekimlerin tedavi ve büyüme amaçlı kullandıkları antibiyotikler, hayvanlar tarafından atılarak tarımsal gübre olarak kullanılan gübre ile toprağa karışırlar (Jorgensen S.E. ve ark., 2000).

Ayrıca, sularla toprağa ve dolayısıyla bitkilere geçen antibiyotiklerin sulardaki varlığı ve etkileri, 1998 yılında Halling-Sorensen tarafından incelenmiş; ilaçlar, bakım ürünleri ve metabolitlerin bir çok yolla özellikle kanalizasyon arıtma sahalarının çıkış sularıyla, çevreye devamlı olarak giriş yaptıklarını öne sürmüşlerdir.



Şekil 2.1. Antibiyotik dirençli bakterilerin taşınımı (George, 1998)

Antibiyotik kalıntıları ile oluşan dayanıklı mikroorganizmalar doğal toprak mikrobiyal topluluğunu ve fonksiyonlarını etkileyerek besin zinciri üzerinden hayvanlara geri dönüşüm yapabilir ve hatta insanların tüketimiyle beraber sağlığa zararlı olabilir (Richter, 1996; Kennedy ve ark., 2000). Bütün bu sebeplerden dolayı oluşan en önemli sorunlardan biri ise; dayanıklı patojenler tarafından oluşan enfeksiyonlar, insan ve hayvan ilaçlarının verimini düşürerek tedaviyi olumsuz yönde etkileyebilmesidir (Kennedy ve ark. 2000).

Enterobacteriaceae türleri sadece memeli mide bağırsak sisteminde bulunan patojenler değil (Mackie ve ark. 1997), hemen hemen her nemli ortamda, özellikle toprak, su ortamında bolca bulunan bakterilerdir (Scott ve ark. 1982). Bazı patojen bakteriler, *Escherichia coli* gibi, her zaman fekal kökenli olduğu kabul edilir ve diğer ortamlarında sadece geçici olarak bulunur. Diğerleri doğal çevresel suşlardır ve büyüyen sebze ile ilişkili florada bulunabilir (Wright ve ark. 1976).

Çiğ et ve sebzeler özellikle çok sayıda bakteri içermektedir. Araştırmalarda *E.coli*, *Klebsiella spp.* suşlarını gıdalarda ve aynı serotipleri bu gıdaları tüketen hastalarda tespit etmişlerdir (Cooke ve ark., 1970; Cooke ve ark., 1980). Mide bağırsak sistemi içinde direnç transferi, gıda da bulunan dirençli bakterilerin önemli sayılarda olmasıyla gelişebilir, böylece, fekal flora direnci önemli bir sorun olabilir.

Sebzeler, toprağın altında ve yüzeyinde yetiştirildiğinden toprak mikroorganizmalarıyla fazla miktarda kirlenirler. Ayrıca temiz sularla sulanmamaları sonucunda, sağlık için zararlı mikroorganizmaları, parazit larvalarını ve yumurtalarını da taşıdıklarından dolayı, sebzelerin kanalizasyon suları karışan sularla sulanmalarının tehlikeli olduğu bildirilmektedir (Kıvanç,2011).

2.1.8. Beta laktam grubu antibiyotikler

Beta laktamlar, mikroorganizmalar üzerinde gösterdikleri yüksek etki spektrumları ve seçici toksisiteleri ile neredeyse tüm yaş gruplarında uygulanabilir olmakla birlikte tüm vücut sıvılarına olan dağılım özellikleriyle günümüzde en çok kullanılan antibiyotikler olmuştur. Diğer bir taraftan beta laktamların yan etki insidanslarının düşük olması lisanslı tüm antibiyotikler içinde diğer antibiyotiklerle oranlarını %70e yaklaştırmıştır (Roy ve ark. 1983; Dağlar ve Öngüt, 2012).

Beta-laktam antibiyotiklerin gram (-) bakterilerde, hedeflerine bağlanmaları ve hücreye zarar verebilmeleri için içi su dolu porin (Outer Membran Protein, OMP) adı verilen protein kanalcıklarından geçmeleri ve aynı zamanda da dış membran ile sitoplazmik membran arasında, periplazmik boşlukta bulunan beta laktamazlar enziminden etkilenmemeleri gerekmektedir (Gür,1997).

Beta laktam grubu antibiyotikler; bakterilerin hücre duvarı sentezini iki mekanizma yoluyla inhibe etmeyi hedeflerler. Birincisi, bakteriyel hücre çeperi içine katılarak, hücre duvarının tamamlanmasından sorumlu transpeptidaz enziminin etkisini inhibe ederler. Bir diğeri ise; normal olarak hücre duvarı hidrolazlarını baskılayıcı olan penisilin bağlayıcı proteinleri bağlarlar ve böylece bu hidrolazlar sırayla bakteriyel hücre duvarını, parçalamak için serbest bırakarak hücreyi inhibe ederler (Dbaiyo,2000).

Beta laktamlar penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler olmak üzere dört büyük gruptan oluşan antimikrobiyal maddeler ailesidir (Çizelge 2.1.). Hepsi beta laktamaz tarafından hidrolize edilebilen bir beta laktam halkasına sahiptir. Gruplar ek halkalar (penisilinler için tiyazolidin halkası, sefalosporin için sefem çekirdeği, monobaktamlar için hiçbir, karbapenemler için çift halka yapısı) ile birbirlerinden ayrılırlar (Samaha-Kfoury ve Araj, 2003; Strohl ve ark., 2006).

Çizelge 2.1. Beta laktam antimikrobiyal madde örnekleri ve grupları

Penisilinler	Penisilin G., Penisilin Penisilnaz direnç penisilinleri: metisilin, nafsilin, oksasilin, kloksasilin Aminopenisilinler: ampisilin, amoksisilin Karboksipenisilinler: karbenisilin, ticarcillin Ureidopenisilinler: mezlosilin, piperasilin
Sefalosporinler	1. kuşak : Sefalotin, Sefazolin, Sefaloridin, Sefaleksim, Sefapirin, Sefradin, Sefadroksil, Sefasetril, Seftazol 2.kuşak: Sefuroksim, Sefoksitin, Sefamandol, Sefonisid, Sefonarid, Sefaklor, Sefotiam, Sefmetazol, 3.kuşak: Sefotaksim, Seftizoksım, Sefoperazon, Seftriakson, Moksolaktam, Seftazidim, Sefsulodin, Sefmenoksım, Sefpiramid 4.kuşak: Sefepim, Sefpirom
Karbapenemler	Imipenem, meropenem, ertapenem
Monobaktamlar	Aztreonam

Sefalosporinler yapı ve etkinlik yönünden penisilinlere olan büyük benzerlikleriyle bilinen ve *Cephalosporicum acremonium* mantarından elde edilen antibiyotiklerdir. Yapılan çalışmalarla birlikte sürekli gelişim gösteren sefalosporinler bakterisit özellikleriyle yaygın bir kullanım alanına sahiptirler. (Öncül, 2002; Strohl ve ark., 2006). Çalışmalar, sefalosporinlerin etki mekanizmalarını; hücre duvar sentezinde rolü olan penisilin bağlayıcı proteinleri (PBP) inhibe edip otolitik enzimlerin aktivasyonunu sağlamaları olarak belirtmektedirler (Öncül, 2002).

Çizelge 2.1’de sefalosporinlerin sınıflandırılması; 1’inci kuşakta; sefalotin, sefazolin, sefaloridin, sefaleksim, sefapirin, sefradin, sefadroksil, sefasetril, seftazol, 2’nci kuşakta; sefuroksim, sefoksitin, sefamandol, sefonisid, sefonarid, sefaklor, sefotiam, sefmetazol, sefotetan, 3’üncü kuşakta; sefotaksim, seftizoksım, sefoperazon, seftriakson, moksolaktam, seftazidim, sefsulodin, sefmenoksım, sefpiramid ve dördüncü kuşakta; sefepim, sefpirom olarak gösterilmektedir (Samaha Kfoury ve Araj, 2003; Strohl ve ark., 2006).

2.1.9. Antibiyotik direnci gelişimi

Direnç, bir bakterinin antimikrobiyal maddelerin etkileri olan öldürme veya üremeyi durdurma özelliklerine karşı koyabilme yeteneği olarak tanımlanmaktadır. Direnç gelişimi genellikle gereksiz ve uygun olmayan antibiyotiklerin kullanıma bağlı olmakla birlikte, 1940'lı yıllarda antibiyotik kullanılmayan adalarda toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisine karşı oluşan bir direncin varlığının saptanmasıyla; direnç gelişiminin, yalnızca uygunsuz kullanım sebebiyle oluşmayacağı, aynı zamanda bakterilerin çevre şartlarına göre yaşamlarını devam ettirebilmek için kullandığı bir mekanizma olabileceğini de göstermiştir.

Tüm bunların yanı sıra yoğun şekilde kullanılan antibiyotiklerin yıllar içinde mikroorganizmalar üzerinde çoklu dirence sebep olabileceği ve bu organizmalarla oluşan infeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar yaşanabileceği yapılan çalışmalarca bildirilmektedir (Cohen, 1992; Tenover ve Hugles, 1996).

Antibiyotik tedavisinde patojen bakteriler antibiyotiğe direnç geliştirerek değişik ortamlarda bakteriler arasında genetik bilgi aktarımı yaparak kullanılan bu antibiyotiklere karşı direnç yayılabilmektedir (Viljanen ve Boratynski, 1991). Direnç yayılımları doğal direnç, kazanılmış direnç, çapraz direnç olmak üzere 3 şekilde olabilmektedir.

Doğal direnç; bakteriler antibiyotiklere karşı herhangi bir ilaç kullanımı veya kalıtsal ilişki varolmaksızın gösterdikleri direnç olarak açıklanmaktadır (Eliopoulos, 1992; Jawetz ve ark, 1995).

Kazanılmış direnç; genetik kaynaklı yani kromozomal veya kromozom dışı olabilmektedir. Kromozomal dirençte; bakteride spontan olarak oluşan mutasyonlar sonucu ortaya çıkmakta ve bu spontan mutasyonlar bazı fiziksel ve kimyasal faktörlere bağlı olabilmektedir. Böylelikle bakteri hücresi yapısal değişimler göstererek hücrenini ilaca karşı geçirgenliği azalabilir veya ilacın hedefinde değişimler olabilir (Jawetz ve ark, 1995).

Çapraz direnç; belli bir antibiyotiğe dirençli olan mikroorganizmaların aynı veya benzer etki mekanizmaları ile diğer mikroorganizmalarda dirençli olmasıdır. Bu durum genellikle eritromisin, oleandomisin, neomisin ve kanamisin gibi benzer

yapılı antibiyotikler arasında gözlemlenmektedir (Eliopoulos, 1992; Jawetz ve ark, 1995).

2.1.10. Antibiyotik direnç mekanizmaları

2.1.10.1. Antibiyotiğin hedefi olan molekülün değişmesi

Antibiyotiklerin etki mekanizması bakteri hücre duvarının sentezinin, sitoplazmik membranın, DNA fonksiyonlarının ya da protein sentezinin inhibisyonu gibi etkilerden hangisi olursa olsun bu etki antibiyotiğin bakteride belirli moleküllerle birleşmesi, onların fonksiyonlarını engellemesi ile sağlanır (NEU,1984).

Antibiyotiğin bağlandığı hedef bölgeler ribozomlar ve çeşitli enzimler olarak farklılık göstermektedir (Ayliffe, 1997). Eğer bu molekülün yapısında, birçok defa kromozomal mutasyon sonucu veya yabancı bir DNA'nın kromozoma eklenmesi sonucunda hedefte değişimler gözlemlenebilmektedir (NEU,1984; Ayliffe 1997).

Örneğin; penisilin bağlayan proteinlerde (PBP) oluşan mutasyonal değişiklikler beta laktam antibiyotiklere, ribozomlarda S12 proteinindeki bir farklılaşma streptomisine, DNA – giraz enziminin de mutasyonal bir değişiklik kinolonlara direnç oluşmasına yol açar (NEU,1984). Bütün bu etkiler antibiyotiğin hedefi olan molekülün değişmesinden kaynaklanan dirençten ileri gelmektedir.

Sonuç olarak; antibiyotiğin hedeflediği yapıdaki değişiklikler, β -laktam, kinolon, glikopeptid, makrolit ve tetrasiklinlere karşı direnç gelişmesinde oldukça önemli bir yere sahiptir.(Sığırcı, 2010)

Beta laktam antibiyotiklerin hedef bölgesi, membrana bağlı proteinler olan PBP'dir. Bu proteinlerdeki değişiklikler; kromozomal mutasyonlar sebebiyle beta laktam antibiyotiğe karşı afinitesinin azalması, proteinlerin sayısında azalma veya bahsi geçen antibiyotiklere karşı düşük afinite gösteren yeni proteinlerin sentezlenmesi olarak gösterilmektedir (Malouin ve Bryan, 1986; Spratt, 1989). Bu bölgede olan her bir değişiklik direncin gelişmesine sebep olmakta ve Gram (-) bakterilerde nadir görünmektedir.

2.1.10.2. Hücre duvarı geçirgenliğinin azalması

Antibiyotik etkinliğinde; etken maddenin hücre içine girebilmesi elzem olduğundan dolayı iç ve dış membran geçirgenliğindeki değişimler ve ayrıca maddenin dışarı atılmasına sebep olabilecek aktif pompa sistemleri antibiyotik dirençleri için son derece önemlidir (Nikaido, 1994; Mayer ve ark, 1995).

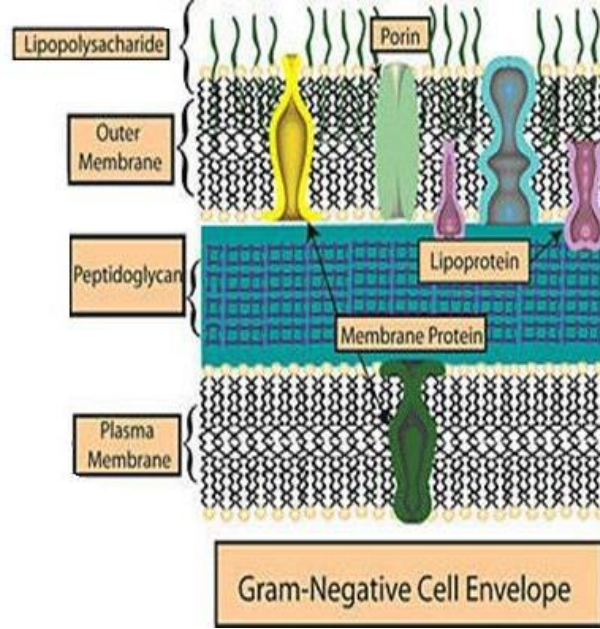
Antibiyotiklerin bakteri hücrelerine girmesini engelleyebilen ve bu engel ile ortaya çıkan direnç, bakterinin salgıladığı ekzopolisakkaritler ve bakteri kapsülü, ortamın pH ve iyonik durumu ile de ilgili olarak ortaya çıkar ve genellikle çok düşük düzeydedir. Hücre duvarının geçirgenlik özelliği daha çok Gram (-) bakterilerdeki antibiyotik dirençliği ile ilgilidir (Nikaido,1987).

Gram (-) bakterilerin dış duvarı, içte fosfolipit tabaka, dışta ise lipopolisakkarit olmak üzere iki tabakadan oluşmaktadır. Bunlardan lipopolisakkaritin hidrofob moleküllere karşı bir bariyer oluşturma özelliği ve dış tabakada fosfolipit tabakanın bulunmaması eritromisin ve nafsilin gibi hidrofob moleküllerin birçok Gram (-) bakteriye girişini engeller. Hücre dış duvarında içi su dolu kanalcıklar oluşturan proteinlere porin demek ve besin moleküllerinin hücre içine alınıp, artık maddelerin dışarı atılımlında görevlidirler (Şekil 2.2).

Örneğin; *Escherichia coli*'deki iki çeşit porinden OmpC (Outer membrane porin of *E. coli*) olarak gösterilenler ince yapıda olup, 180 dalton kadar olan moleküllerin geçmesine elverişlidir. Daha geniş olan OmpF porinleri ise 600 daltonluk moleküllerin geçmesine elverişli kanallar olarak bilinmektedir. Beta laktam antibiyotikler ancak OmpF porinlerinden bakteri hücrelerine girebilmektedirler. Bir *E. coli*'de 105 kadar porin bulunması, yapısı ve yüküne göre porinlerden geçebilen bir antibiyotiğin çok kısa bir sürede hücre içine yeterli miktarda girmesini sağlar. Sonuç olarak; porinlerin yapısında, dolayısıyla hücre duvarında oluşabilen değişiklik belirli antibiyotiklerin bakteriye girişini engelleyerek antibiyotik direncine yol açar (Nikaido,1987).

Ancak yapılan araştırmalarda bazı bakterilerin belirli koşullarda ortamın ozmolaritesine göre farklı porinler sentezleme yeteneğine sahip olabildikleri ve mutasyonlar ile membran porin proteinlerindeki değişim sonucu geçirgenlikleri

azalarak dirençli suşların ortaya çıkabileceği görülmüştür (Nikaido, 1994; Mayer ve ark, 1995).



Şekil 2.2. Gram (-) hücre duvarı (Anonim 3)

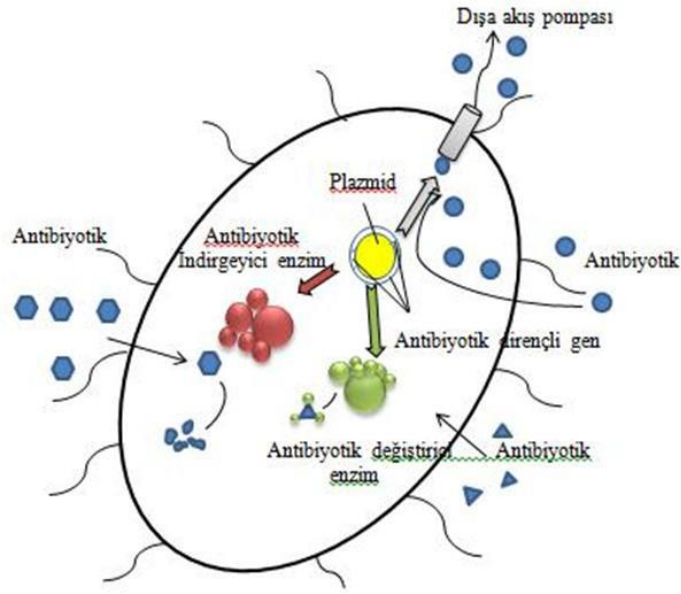
(<https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/low-g-and-c-gram-positive-bacteria>)

Hücre duvarı geçirgenliğinden başka, ilacın hızla hücre dışına atılmasını sağlayan aktif pompa sisteminin varlığı ilk olarak tetrasiklinlerin, enerjiye bağımlı bir pompa sistemiyle hücre içinde birikme göstermeksizin dışarı atılmasıyla saptanmıştır. Bu dirençlilik davranışının plazmit ve kromozom kontrolünde olduğunu ve bununla birlikte bu genlerin büyük ölçüde transpozonlar üzerinde bulunduğu saptanmıştır. Direnç genleri özel membran proteinleri ile sentezlenmekte ve bu proteinlerle antibiyotikler hızla hücre dışına atılmaktadır. Kinolonlar, makrolidler, kloramfenikol ve beta laktamlara dirençte de etkili olan aktif pompa sistemi birçok bakteride bulunmaktadır (Nikaido, 1994; Mayer ve ark.,1995).

2.1.10.3. Enzimatik yıkımdan kaynaklanan direnç

Diğer bir direnç yolu ise bakterinin oluşturduğu enzimle antibiyotiği inaktive ederek direnç kazanmasıdır. Bu yol ilk defa 1944'de bir *Staphylococcus aureus* suşunun penisilini inaktive eden enzim yani penisilaz enziminin oluşumunun

anlaşılması ile tanımlanmıştır. Daha sonra ise *E.coli* ve diğer bakterilerden de benzer enzimler elde edilmiştir. Bununla beraber, yalnız penisilinleri hidrolize eden enzimlere penisilinaz, yalnız sefalosporinleri hidrolize edenlere sefalosporinaz, her iki grup beta laktam antibiyotiği hidrolize edenlere ise GSBL olarak bildirilmiştir. Ancak bu enzimlerin beta laktam halkasını hidrolize etmeleri ortak özellikleri olduğu için beta laktamaz olarak genel bir tanım getirilmiştir. Beta laktamazlar, neredeyse bütün bakteriler tarafından oluşturulurlar ve gram (+) bakteri plasmitleri ekstraselüler enzimlerdir; bakteriden dış ortama salgılanırlar (Hewitt, 1986).



Şekil 2.3. Antibiyotik direnci mekanizmasının şematik gösterimi (Anonim 4).

(http://www.chembio.uoguelph.ca/merrill/research/enzyme_mechanisms.html).

Bakterilerin beta laktam grubu antibiyotikleri inaktive eden beta laktamaz enzimlerini sentezlemesi ile oluşan bu direnç, bu antibiyotiklere karşı en çok gözlenen direnç olduğu bildirilmektedir. Beta laktamaz genleri genel olarak bakterilerde kromozomda ya da plazmit, transpozon, integron gibi hareketli genetik elemanlarda bulunabilmektedir (Bradford, 2001).

2.1.11. Beta laktamaz

Beta laktamazlar; beta laktam halkasındaki amit bağına parçalayarak etkisini gösteren ve bu tür antibiyotikleri işlevsiz hale getiren enzimlerdir (Şekil 2.4) (Gür, 1997). Beta laktamaz sentezi; ya *Pseudomonas aeruginosa* da olduğu gibi

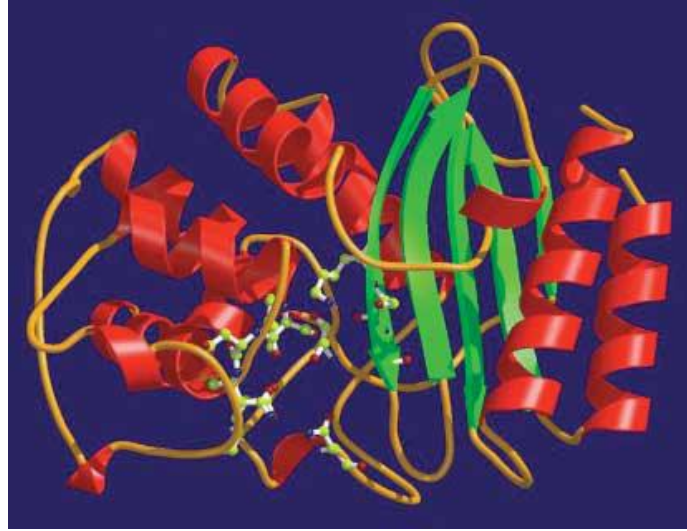
kromozomal (kurucu) olabilir ya da *Aeromonas hydrophila* ve *Staphylococcus aureus* olduğu gibi plazmit aracılı (uyarılabılır) olabilir.



Şekil 2.4. Beta laktamaz etkisi(Gülay,2003)

Gram (+) bakterilerde; beta laktamaz ekzoenzimler gibi dış zar ortamına salgılanır. Gram (-) bakterilerde ise; daha önce antibiyotiklerin saldırıda bulunmadıkları reseptör alanlarına ulaşarak periplazmik alanlarda kalırlar (Stratton, 2000). Gram (-) bakterilerde fazla çeşitte beta laktamaz bulunması sebebiyle ve plazmit kontrolünde sentezlenebildiğinden dolayı kısa bir süre zarfında direnç görülebilmektedir (Dağlar ve Öngüt, 2012).

Beta laktamaz enzimleri, iki önemli mekanizma ile beta laktam halkasını tahrip ederler. Öncelikle, yaygın olarak beta laktamazlar serin tabanlı eylem mekanizmasına sahiptirler. Beta laktamazlar amino asit dizileri temelinde 3 ana sınıfa (A, C, ve D) ayrılırlar. Bunlar dar uzunluğuna bir oluk içeren bir aktif bölge, substrat bağlanma açısından şekilsel esnekliğe sahip olmak amacıyla gevşek yapılmış olan zemini bir boşluk (oksianyon cep), içerirler (Şekil 2.5) (Stratton, 2000; Kotra ve ark., 2002). Geri dönüşümü olmayan şekilde serin kalıntısı beta laktam halkasındaki karbonil karbon ile reaksiyona girerek, açık halka (inaktive beta laktam) meydana getiriler ve beta laktamızı oluştururlar. Beta laktamaz enzimleri, çok sayıda penisilinlere, oxyimino- 2., 3. ve 4. nesil sefalosporinlere (örneğin; seftazidim, sefotaksim, seftriakson ve sefepim) ve monobaktamlara (örneğin, aztreonam) karşı aktiftir. Bir kısmı klavulanik asit gibi beta laktamaz inhibitörleriyle inhibe olabilmektedir (Daoud, 2006).



Şekil 2.5. Beta laktamazın moleküler yapısı (Samaha ve Araj, 2003)

İkincisi ise; daha az sıklıkla karşılaşılan beta laktamazların bir grubu olan metallo beta laktamazlar ya da B sınıfı beta laktamazlardır. Bunlar çift değerlikli metal iyonu ki genellikle çinko kullanarak histidin ya da sistin kalıntısına ya da ikisine birden bağlanarak monobaktamlar hariç penisilin ve sefalosporinlerin karbonil grubunun amin bağı ile reaksiyona girerler (Page,2002). Genellikle klavulanik asit, az olarak da sulbaktam veya tazobaktam gibi inhibitörlere duyarlı olmaları bu enzimlerin en önemli özelliğidir.

Beta laktamaz üretimi başta *Enterobacteriaceae* türleri, özellikle de, *E. coli*, *Klebsiella spp.* ve *Salmonella spp.* suşları olmak üzere mikroorganizmaların beta laktam halkası içeren antibiyotiklere karşı direncinde en önemli yoldur (Daoud, 2006; ILSI, 2011).

1960'ların sonlarından bugüne kadar, çeşitli enzimatik özelliklere sahip birçok beta laktamaz sınıflandırılmıştır. Bu sınıflandırmalar 2 temel yaklaşım içermektedir: birincisi biyokimyasal ve fonksiyonel özelliklerine (Bush – Jacoby – Medeiros sınıflandırılması); ikincisi ise, enzimin molekül yapısına (Ambler sınıflandırılması) dayanmaktadır (Çizelge 2.2) (Bush ve Fisher, 2011).

Beta laktamazlar da fonksiyonel sınıflandırma

Beta laktamazların Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından yapılan en yeni sınıflandırmadasında biyokimyasal özellikler yani; enzim net yükü (pI), hidroliz hızı

(Vmax), bağlanma afinitesi (Km), izoelektrik odaklanması, protein moleküler ağırlığı, enzim inhibisyon profili ve amino asit kompozisyonu gibi çeşitli kriterler kullanılmıştır (Bush ve ark., 1995). Bush-Jacoby-Medeiros, beta laktamaz sınıflandırmasını 3 ana grupta ve 16 alt grupta gruplandırılmıştır (Bush ve Fisher, 2011).

Beta laktamazlar da moleküler sınıflandırma

Ambler sınıflandırmasında yani en sık kullanılan moleküler sınıflandırmada beta laktamazlar, enzimleri kodlayan nükleotit dizilerine göre A,B,C ve D olmak üzere dört sınıfa ayrılır. A, C ve D sınıfı beta laktamazlara serin betalaktamazları adı verilirken; B sınıfı beta laktamazlara ise metallo beta laktamazlar denilmektedir (Çizelge 2.2) (Ambler, 1980).

Çizelge 2.2. Beta laktamaz sınıflandırmaları (Bush ve Fisher, 2011)

Bush-Jacoby-Medeiros sınıflandırması	Ambler sınıflandırması	Özgün substrat	İnhibitör	Temsilci enzim
1	C	Sefalosporinler	Hiçbiri	AmpC
2b	A	Penisilinler, sefalosporinler	Beta laktamaz inhibitörler	TEM-1, TEM-2, TEM-13,
2bc	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonam	Beta laktamaz inhibitörler	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2d	D	Kloksasilin	Beta laktamaz inhibitörler	OXA-1, OXA-10
2de	D	Genişlemiş spektrumlu sefalosporinler	Beta laktamaz inhibitörler	OXA-11, OXA-15
2df	D	Karbapenemler	Beta laktamaz inhibitörler	OXA-23, OXA-18
2f	A	Karbapenemler	Beta laktamaz inhibitörler	KPC, IMI, SME, NMC
3a	B	Karbapenemler	EDTA	MBL

2.1.12. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar

Ambler moleküler sınıf A'da yer alan grup 2be, grup 2e ve sınıf D (grup 2d) beta laktamazlar genişlemiş spektrumlu beta laktamazları oluştururlar. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) olarak adlandırılmasının sebebi etki spektrumlarının oksimino-betalaktamları da kapsamaktadır. GSBL'ler; kısmi olarak sefepime ve 1., 2., ve 3. jenerasyon sefalosporinlere geniş spektrumlu penisilinlere etkili olmakla beraber, karbapenemlere, sefamisinlere ve beta laktamaz inhibitörlerine etkisizdirler (Dağlar ve Öngüt, 2012).

GSBL'ler beta laktamaz inhibitörleri (örn; klavulanik asit) tarafından inhibe edilirler. Ancak birçok GSBL üreten suş; piyasada mevcut olan penisilin-inhibitör kombinasyonlarına, florokinolonlar ve aminoglikozit içeren diğer antibiyotiklere karşı çoklu direnç göstermektedirler (ILSI, 2011)

GSBL üreten izolatlar tüm dünyada olduğu gibi bizim ülkemizde yaygın olarak bulunmaktadır ve 1980'li yıllarda tedavi amaçlı kullanılan 3. kuşak sefalosporinlerin kullanımı ile ortaya çıkmıştır. Bunun sonucu olarak bu yaygın kullanım ile birlikte 1995 yılında 35 civarında olan GSBL günümüzde 100'ü geçmektedir (Bush, 2001). Sıklıkla Gram (-) bakterilerde bulunan GSBL enzimleri özellikle *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan *K. pneumoniae*'da, *E. coli* ve *Salmonella spp.*'de rastlanmaktadır (Winokur ve ark., 2000).

Beta laktamaz genleri; bakteride plazmit ya da transpozonlarda yerleşmiş genler üzerinde ve/veya kromozom kontrolünde kodlanmaktadır. Bu genlerden TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi plazmit kaynaklı olanlar *Enterobacteriaceae* üyeleri arasında yaygın olup, plazmitler ile diğer bakterilere aktarılmaktadır (Roy ve ark. 1983)

İlk olarak birinci kuşak sefalosporinleri ve penisilinleri hidrolize edebilen enzimler olan plazmit kaynaklı beta laktamazlar, sonradan bu enzimleri kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonlar ile GSBL denilen, 3. kuşak sefalosporin ve aztreonamı hidrolize eden yeni beta laktamazlar ortaya çıkmıştır (Sirot, 1995).

Günümüzde 100'den fazla tanımlanmış olan GSBL enzimleri; kökenleri TEM ve SHV enzimlerinden olsa da, kökeni TEM ve SHV olmayan CTX-M, OXA-1,

PER-1, PER-2 gibi tanımlanan yeni plazmit kaynaklı GSBL'ler de bulunmaktadır. Bu enzimler tüm sefalosporinlere karşı etkili olduğu bildirilmektedir (Jacoby GA, 1994; Jacoby ve Bush).

Klasik anlamda tanımlaması yapılan GSBL'lerin büyük çoğunluğu TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzim kökenlidir ve bu ana enzimin moleküler yapısında bulunan aminoasitlerden bir ile 4'ünün yerine farklı aminoasitlerin gelmesi ile farklı GSBL'ler oluşur (Dağlar ve Öngüt, 2012).

2.1.12.1. Tipleri

TEM ve SHV grubu enzimler;

Ampisilin, penisilin ve birinci kuşak sefalosporinlere dirençli olan TEM-1 grubu enzimler, plazmit kökenli olarak bilinen, Gram (-) bakterilerde en sık kodlanan ve *E.coli*'lerde ampisiline karşı %90 oranında dirençten sorumlu olan en eski enzimlerdir (Gür 2004).

Yapılarında oluşan aminoasitlerin değişikliklerine bağlı olarak TEM – 2 ve TEM – 3 enzimler oluşmaktadır (Gür,2004). TEM enziminin ilk varyantının bildiriminin ardından mutasyonlarla gelişen aminoasit değişikliğine bağlı olarak, birçoğu GSBL aktivitesine sahip olmakla birlikte bazıları inhibitör dirençli beta laktamaz özelliğine sahip 150'den fazla bu enzimin yeni türleri tanımlanmıştır (Canton ve ark., 2008).

En sık *E.coli* ve *K. pneumoniae*'de tanımlanmış olan TEM kökenli GSBL'ler *Salmonella spp.*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerinde de tanımlanmaktadır (Stürenburg ve Mack, 2003).

TEM enzimi dışında; başta *K.pneumoniae*'da olmakla beraber *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bulunan ve *K.pneumoniae*'daki plazmid aracılı ampisilin direncinin yaklaşık %20'sinden sorumlu olan SHV - 1 enzimi, ampisilin, tikarsilin ve piperasiline karşı direnç oluşturmakta ama oksimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi bulunmamaktadır (Stürenburg ve Mack, 2003). 1983 yılında, *K. pneumoniae* suşunda bildirilen GSBL, SHV-2'dir (Rahal, 2000).

CTX-M grubu enzimler;

CTX-M grubu enzimler sefotaksimi substrat olarak tercih etmektedir. ilk olarak 1989 yılında Almanya’da *E.coli* suşunda saptanan CTX-M tipi beta laktamaz, daha sonra *Salmonella typhimurium* ve *E. coli* başta olmak üzere birçok *Enterobacteriaceae* türünde üretim göstermiştir ve günümüzde yaklaşık 80’den fazla CTX-M enzimi bildirilmiştir (Jacoby ve Bush).

TEM ve SHV enzimlerine göre kaynak farklılığı gösteren CTX – M enzimleri, SHV ve TEM tip GSBL’ler öncül enzimlerden aminoasit değişiklikleriyle oluşurken, CTX- M tip GSBL’ler konjugatif plazmit ya da transpozon aracılığı ile başka bakteriden gen transferi yoluyla oluşurlar (Livermore, 2007).

Özellikle Güney Amerika Ülkeleri ve bazı Avrupa Ülkelerinde sık görülen ve sayıları her geçen gün artan CTX-M grubu enzimler; seftazidim ve aztreonama kıyasla sefotaksimi daha etkin biçimde hidrolize eden enzimlerdir (Gülay, 2001).

Diğer gruplara ait enzimler;

TEM ve SHV tipi GSBL’lerle DNA baz dizileri bakımından %25-27 oranında homoloji gösteren, penisilin ve sefasporinleri hidrolize eden ve klavulanik asit ile inhibe olan PER enzimleri, ilk olarak Fransa’da bir Türk hastadan izole edilen bir *P. aeruginosa* suşunda saptanmıştır (Nordmann vd, 1993; Nordmann ve Naas,1994; Bauernfeind ve Stemplinger, 1996).

VEB-1 enzimi ise; PER-1 ve PER-2 enzimleriyle %38 oranında homoloji gösteren ve seftazidime, sefotaksime ve aztreonama yüksek düzeyde direnç göstermekle beraber klavulanik asit ile inhibe olan enzimlerdir (Poiri ve ark., 1999). VEB – 1 ve VEB – 2, İlk kez Vietnam’lı bir hastadan izole edilen bir *E. coli* ve bir *K. pneumoniae* suşundan izole edilmiştir (Gülay, 2001)

Tüm bu enzimlerin haricinde; GES-1 enzimi; ilk olarak Fransız Guyana’sında izole edilen bir *K. pneumoniae*’da, BES-1 enzimi, Brezilya’da izole edilen bir *S. marcescens* suşunda ve son olarak da, TLA-1 enzimi *E. coli* suşlarından izole edildiği bildirilmiştir (Gülay, 2001).

2.1.12.2. Tanı yöntemleri

GSBL enzimlerinin saptanması amacı ile CLSI tarafından belirlenen fenotipik tarama (disk difüzyon tarama testi, sıvı mikrodilüsyon testi) ve doğrulama testlerinin (kombine disk yöntemi, çift disk sinerji yöntemi, E test yöntemi, mikrodilüsyon yöntemi, üç boyutlu test, boronik asit yöntemi, otomatize sistemler) kullanılması önerilmektedir.

GSBL tarama testleri

Disk difüzyon tarama testi (DDTT): GSBL varlığının belirlenmesinde kullanılan bu yöntemde bakteri 0.5 McFarland standardına göre hazırlanarak Mueller Hinton agar (MHA) besiyerine sürüntü ekimi yapılır ve sefpodoksim (30 µg), seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftriakson (30 µg) veya aztreonam (30 µg) diskleri yerleştirilir. Daha sonra 35°C'de 18-24 saat inkübasyonda bekletilen agarlardaki antibiyotik zon çapları ölçülür. *K.pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *E.coli* için seftazidim ≤ 22 mm, seftriakson ≤ 25 mm, sefotaksim ≤ 27 mm, sefpodoksim ≤ 17 mm, aztreonam ≤ 27 mm olması durumunda GSBL tarama testi pozitif kabul edilerek doğrulama testi uygulanır (CLSI, 2009).

Sıvı mikrodilüsyon testi; disk difüzyon testinde seftazidim inhibisyon zon çapının ≥22 mm, sefpodoksim zon çapının ≥17 mm, aztreonam ve sefotaksim zon çaplarının ≥27 mm; seftriakson zon çapının ≥25 mm olması halinde, ya da sefotaksim, seftazidim, seftriakson, aztreonam MİK değerleri ≥2µg/mL, sefpodoksim MİK değeri ise ≥8 µg/mL olarak saptandığında GSBL varlığını belirlemek için doğrulama testi yapılması önerilmektedir (CLSI, 2009).

GSBL doğrulama testleri

GSBL'lerin beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı olma özelliği kuulanılarak doğrulama testleri yapılmaktadır. Başka bir deyişle doğrulama testlerinde söz konusu enzimlerin klavulanik asit ile inhibisyonu temeline dayanan yöntemler kullanılmaktadır. Sık kullanılan yöntemler; kombine disk yöntemi, çift disk sinerji yöntemi, E test yöntemi, mikrodilüsyon yöntemi, üç boyutlu test, boronik asit yöntemi, otomatize sistemler olarak sıralanabilmektedir.

Kombine (modifiye) disk sinerji testi: CLSI'nın fenotipik doğrulama testi olarak belirlediği bu testte, MHA besiyerine 0.5 McFarland standardına göre hazırlanan mikroorganizma ekilir ve ekimi yapılan bu plaklara seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg) ve sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg) diskleri yerleştirilerek, 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılır. Sefotaksim ve seftazidim diskinin klavulanik asitlisi ile gözlenen zon çapının, tek başına test edildiğinde gözlenen zon çapıyla arasında ≥ 5 mm artış olması durumunda GSBL pozitif olarak kabul edildiği yöntem olarak tanımlanmaktadır (CLSI, 2011).

Çift disk sinerji (ÇDS) testi; GSBL üretimi araştırılan mikroorganizmanın 0.5 McFarland standardına uygun olarak hazırlanarak Mueller Hinton besiyeri yüzeyine yayılması ve bir amoksisilin/klavulanik asit diski (20/10 µg) ile bundan 2 cm uzaklıkta olacak şekilde sefotaksime (30 µg), seftazidime (30 µg), aztreonam (30 µg) ve imipenem (10 µg) diskleri yerleştirilmesi ve 35°C'de 18 saat inkübasyondan sonra genişlemiş spektrumlu beta laktam disklerinden herhangi birinin inhibisyon zonunun ölçülmesi prensibine dayanmaktadır (Kaçmaz ve Ece, 2010).

E-test yöntemi: % 94 duyarlı ve % 95 özgün olduğu bilinen bu yöntem; imipenem ya da seftazidime, EDTA ya da MPA eklenerek geliştirilen E-test şeritleri kullanılarak yapılan bir yöntemdir. MHA'a bakteri ekimi yapılarak kuruması sağlanır ve E- test şeritleri yerleştirilir. 35°C'de ve 16-18 saat inkübasyona bırakılarak imipenem ve imipenem-EDTA'nın MİK oranlarının 8 kat azalması ve ya fantom zonunun görülmesi MBL pozitifliği olarak değerlendirilmesi ile sonuçlanır (Yan ve ark. 2004).

Mikrodilüsyon testinde ise; üzerine klavulanik asit (10 µg) damlatılan genişlemiş spektrumlu beta laktam disklerinin zon çaplarında ≥ 5 mm genişleme saptanması GSBL üretimi açısından pozitif kabul edilir (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2001). Sefotaksim ve seftazidime MİK değerleri, klavulanik asit varlığında ≥ 8 kat azalma olması halinde GSBL göstergesi olarak kabul edilmektedir (Gülay ve ark. 2004).

Üç boyutlu test (M3D); Kanlı agarda bir gün önceden üretilen bakteriler 0,5 McFarland bulanıklığına ayarlanarak Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine ekimi yapılır ve 35°C'de dört saat inkübe edilir. Daha sonra hücreler santrifüjlenerek beş

kez dondurulup çözdürülür ve enzim ekstraksiyonu sağlanır. Disk difüzyon testine geçilerek Mueller Hinton agara *E. coli* suşu inoküle edilir ve ortasına sefoksitin (30 µg) diski konulur. Diskten 5 mm uzaklıkta açılan yarıklara 25-30 µL elde edilen enzimlerden eklenerek 35 °C'de bir gece inkübe edilir. Sonuç olarak; inhibisyon zonuyla kesişen yarıklardaki suşlardan ≥ 3 mm distorsiyona neden olanlar “3 boyutlu test pozitif” olarak kabul edilir (Barroso ve ark. 2000).

Boronik asit yöntemi; rutin olarak kullanılmayan bu yöntem Boronik asitin AmpC beta laktamaz aktivitesini inhibe etme özelliğinden yararlanılarak yapılmaktadır. Bu yöntemin; *K. pneumoniae* karbapenemaz pozitif suşlarının belirlenmesinde oldukça başarılı olduğu bildirilmiştir (Patel ve ark. 2009).

Otomatize sistemler; bakteriyolojide kullanılan VITEK 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile/Fransa) ve Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD/ABD), Mikro-scan panel test vb. yöntemler GSBL üreten suşları saptayabilmek amacıyla geliştirilmiştir. Bu sistemler; çeşitli kuralları işleterek tüm penisilinleri, sefalosporinleri ve aztreonamı dirençli olarak rapor edebilmektedirler (Endimiani ve ark. 2010).

2.1.13. AmpC beta laktamazlar

AmpC tipi beta laktamazlar, Gram (-) basiller tarafından kromozomal olarak üretilmektedir ve aktif bölgelerinin özellikleri nedeniyle 1., 2., 3. kuşak sefalosporinleri, penisilinleri ve monobaktamları hidrolize edebilmektedirler (Medeiros, 1997). Beta laktamaz inhibitörlerine karşı dirençli olmalarının nedeni; aktif bölgelerinin yapısal özellikleri nedeniyle klavulanik asit ve sulfonların beta laktam halkalarına bağlanamamaları olarak gösterilmektedir. Bu enzimlerin çoğu beta laktam madde varsa salınmakta yani indüklenebilir niteliktedir (Medeiros, 1997; Wiedemann ve Preifle, 1998).

Geniş spektrumlu penisilinlere ve sefalosporinlere dirençli olmaları, en sık *Enterobacter spp.*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus vulgaris*, *Providencia spp.*, *P. aeruginosa*'da saptanmaktadır (Livermore, 1997).

Kromozomal AmpC beta laktamaz genlerinin plazmitlere transfer olması ile gelişen plazmit kökenli aktarılabılır AmpC tipi beta laktamazlar, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *C. freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* suşlarında bulunabilmektedir (Negri ve ark., 2000; Bush, 2001). AmpC tipi enzimlerin sayısı, günümüzde 20'yi aşmıştır.

AmpC tipi enzimlerin enterik bakteriler arasında yayılması dolayısıyla tedavi seçeneklerinin iyice daralması sorun oluşturmakta ve özellikle AmpC tipi enzim, bir diğer beta laktamazın sentezi gibi ek bir mekanizma ile birleştiğinde enzimlerin etki spektrumları iyice genişlemektedir (Bradford ve ark., 1997).

Tüm bunların yanı sıra, *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında, 3. kuşak sefalosporinlerin yanısıra diğer beta laktamaz inhibitörlerine direnç bulunması, AmpC tipi bir enzimin varlığını düşündürmelidir (Gülay,2011).

2.1.14. Metallo beta laktamazlar (MBL)

Metallo beta laktamaz (MBL), Ambler sınıf B ve Bush sınıflamasında grup 3'te bulunan beta laktamazlar içerisinde yer almaktadırlar (Akyıldız ve ark. 2002). Diğer beta laktamazlardan MBL'yi ayıran en büyük özellik aktif bölgelerinde Zn⁺² iyonu bulunan enzimler olmalarıdır (Nordman ve Poirel, 2002).

Çinko bağımlı ilk MBL 1960'lı yılların ortalarında pek önemli sayılmayan patojenlerden olan *Bacillus cereus*'ta tanımlanmıştır. 2. olarak ise; 1980'lerin başında *S. maltophilia*'da çinko bağımlı penisilinaz gösterilmiştir. Karbapenemlerin geleceği konusunda endişe doğuran olaylardan biri ise; önceleri imipinem hidrolizi yapan MBL'lar *A. hydrophilia* ve *B. fragilis*'ten identifiye edilmesi ve daha sonra 1991'de Japonya'da *S. marcescens* ve *P. aeuriginosa* suşlarında plazmit kökenli bir MBL'in (IMP-1) saptanması olmuştur (Bush, 1998).

Metallo beta laktamazlar (MBL), geçtiğimiz günlerde aztreonam hariç, penisilin, sefalosporin ve karbapenem gibi tüm beta-laktam antibiyotikleri hidrolize etme kapasiteleri ile endişe verici direnç mekanizması olarak ortaya çıkmıştır.

MBL'ler tüm beta laktamaz gibi normal olarak kromozomal aracılı olanlar ve transfer genleri tarafından kodlananlar olarak ayrılmaktadırlar ve sınıf I integronlar üzerinde yer almasından dolayı bakteriler arasında hızla yayılabilirler. *Serratia*

marcescens, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Acinetobacter spp.* ve *Alcaligenes xylosoxidans* gibi bilinen bakterilerde MBL üretildiği belirtilmiştir. Aktarılabılır MBL enziminin bulunmasından dolayı karbapenemlere karşı oluşan direnç gelişimi endişe yaratmaya başlamıştır (Walsh ve ark. 2005; Gian Maria Rossolini, 2005; Varaiya ve ark. 2008; Chakraborty ve ark. 2010).

2.1.14.1. Metallo beta laktamaz (MBL) Özellikleri

Metallo beta laktamaz katalitik aktivitesi için çinko gerektirir. Bu enzimler tazobaktam ve sulbaktam gibi inhibitörlerinden etkilenmez iken EDTA gibi bir metal şelatörü ile inaktive olabilirler. Metallo beta laktamaz karbapenemler dahil olmak üzere tüm beta laktam antibiyotikleri hidrolize ederler. Bu gruba aztreonamlar (monobaktam) girmemektedir. Bunların yanı sıra MBL'lar karbapenemleri hidroliz edebilme yetenekleri olmasıyla beraber bunlardan bazıları aynı zamanda beta laktam grubunu da hidroliz edebilecek kapasiteye sahiptirler. MBL üreten suşlar beta laktamaz inhibitörlerinden klavulanata duyarlı değildir. Sonuç olarak; MBL üreten organizmalar beta laktam antibiyotiklerin kullanılabilirliğini sınırlandırılmış durumdadır (Bush 1998; Nordman ve Poirel, 2002; Gian Maria Rossolini, 2005; Varaiya ve ark., 2008; Chakraborty ve ark., 2010).

Katalitik aktivitesi olarak kullanılan çinko MBL'larda 2 role sahiptir. Öncelikle çinko iyonu bağlı su molekülü beta laktam antibiyotiklerin peptid karboniline bir nükleofilik saldırı gerçekleştirmek için devreye girer. 2. olarak çinko iyonu bağlanır ve bu karbonil grubu polarize olur. IMP, VIM, SPM, GIM ve SIM olarak 5 farklı tipi olan MBL'lar, IMP ve VIM başta olmak üzere prevalans değerleri hızla artmaktadır (Schilling ve ark. 2005; Muge, 2008).

2.1.14.2. Metallo beta laktamaz (MBL) Sınıflandırılması

MBL'ların sınıflandırılması 1995 yılında Bush ve arkadaşları tarafından "fonksiyonel grup 3" içinde sınıflandırma yapılmıştır. İlk sınıflandırmanın yapıldığı zamanlarda substrat profilleri göz önüne alınarak bu enzimlerin subgruplara ayrılması yapılmamıştır. Ancak ilerleyen zamanlarda tanımlanan MBL sayısı yükseldikçe enzimlerin substrat özelliklerine göre alt gruplara ayrılma gerekliliği

ortaya çıkmış ve Rasmussen ve Bush tarafından 3 fonksiyonel grup tanımlanmıştır (Bush,1998).

Grup 3a'ya ait enzimler, maksimum aktivite gösterebilmeleri için çinko eklenmesi gerekmektedir. Yapılan çalışmalarda genellikle penisilinleri imipenemden en az %60 daha hızlı olarak hidrolize edebildikleri, sefalosporinlerin de, imipenem kadar olmasa da bu enzimler tarafından güçlü bir şekilde hidrolize edebildiklerini bildirmişlerdir. Bu enzimlerin çok çeşitli beta laktam içeren maddelere karşı tehdit oluşturmalarına neden olarak, çok geniş aralıkta ve çok çeşitli substratları tanıyabilir olması gösterilmektedir (Rasmussen ve Bush, 1997).

Grup 3b'ye ait enzimler, *Aeromonas* türlerinin metallo enzimlerini kapsamasından ve karbapenemlere yüksek özgüllüğü bulunmasından dolayı “gerçek karbapenemazlar” olarak da isimlendirilmektedir. Bu enzimleri grup 3a MBL'larından ayıran önemli özelliklerden biri, çinko ilavesinin aktif enzim üzerindeki etkisidir. Tüm MBL'lar aktivasyon için aktif bölgelerinde çinko bulunma zorunluluğuna rağmen grup 3b enzimlerinden en az 3 tanesi düşük çinko konsantrasyonları ile inhibe olur (Bush,1998).

Grup 3c'de sadece *Legionella gormanii*'nin MBL'ı yer almaktadır ve bu enzim literatürde bir kez tanımlanmıştır. Diğer grup 3 enzimlerinden farklı biyokimyasal özellikler taşımasının yanı sıra yüksek sefalosporinaz aktivitesi ile diğer alt gruplardan ayrılmaktadır (Bush,1998).

MBL enzimleri etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) gibi maddeler ile inaktive olduklarından dolayı Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), *Enterobacteriaceae* için fenotipik doğrulama yapmak için Modifiye Hodge yöntemini önermektedir. Bu yöntemde ertapenem veya meropenem diskleri kullanılmaktadır ancak bu yöntemde nonfermentatif Gram (-) basillerdeki karbapenemaz üretiminin saptanmasında kullanılabilirliğine ilişkin veri bulunmadığı için laboratuvarlarda çift disk sinerji testinin yanı sıra IPM-EDTA kombine disk testi ve modifiye Hodge testi gibi testler MBL saptanmasında kullanılmaktadır (Fidan ve ark. 2005; Gayyurhan ve ark. 2008; Khosravi ve Mihani 2008; Aktaş ve ark. 2009; CLSI 2009).

2.1.15. Sebzelerde GSBL üreten *Enterobacteriaceae* türleri

Gürler ve Arkadaşları'nın 2015 yılında yaptıkları Türkiye'deki hazır yemeğe uygun salatalardaki mikrobiyal kalite konulu çalışmalarında; 261 adet sebze numunesinde, 21 adetinden *Salmonella spp.*, 10 adetinden ise *E. coli* suşlarını izole etmişlerdir. Ayrıca yapılan antimikrobiyal duyarlılık testlerine göre izole edilen *Salmonella* suşlarından %9'unun sefotaksime karşı dirençli oldukları tespit edilmiştir (Gürler ve ark. 2015).

Schwaiger ve Arkadaşları'nın 2011 yılında yaptıkları çalışmada, pazarlama aşamasındaki (süpermarket vs çiftlik) sebzelerden izole edilen bakterilerin antibiyotik direnci araştırılmıştır. Bu çalışma da 1001 çeşit meyve, kök, soğanlı sebzeler, salata ve tahıllardan oluşan sebze grubu Almanya'da bulunan 13 çiftlik ve 11 süpermarketten alınmış ve bakteriyolojik muayeneleri yapılmıştır. *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* ve *Enterococcus faecalis* türlerinin 30 kadar antibiyotiğe karşı fenotipik dirençleri mikro-seyreltme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. β -laktamlara karşı direncin en sık *P. agglomerans*'ta ve Sefakloro karşı ise *E. Gergoviae*'ta (% 41 ve % 29) olduğu ifade edilmiştir. Nispeten yüksek direnç oranları *E. faecalis* da doksisisiklin'e karşı %23, eritromisin'e %21 ve rifampisin'e ise %65 olarak gözlenmiştir. Son olarakta *E. cloacae* türünde spectinomisin'e 28% mezlosillin'e 12%, *P. putida*. ve *P. aeruginosa* türlerinde ise streptomisin'e 19% oranında direnç görülmüştür (Schwaiger ve ark. 2011).

Blaak ve Arkadaşları Hollanda'da sebzelerde GSBL ve AmpC üreten *Enterobacteriaceae* varlığını belirlemek amacıyla; kereviz, havuç demeti, hindiba, frenk salatası, marul, mantar ve turp olmak üzere 7 adet, süpermarketlerden alınan sebze kullanmışlardır. GSBL üreten *Enterobacteriaceae* türlerinin kaynaklarının tarımsal ile ilgili olup olmadığını belirlemek için, marullar üç çiftlikten toprak ve sulama suyu ile birlikte doğrudan alınmıştır. GSBL üreten sebzelerden izole edilmiş *Enterobacteriaceae* türleri; *Rahnella aquatilis* (n = 119), *Serratia fonticola* (n = 45) ve *Pantoea agglomerans* (n = 1) olarak belirlemişlerdir. *R. aquatilis* ve *S. fonticola* GSBL genleri, sırasıyla *bla_{RAHN-1}* ve *bla_{RAHN-2}* ve *bla_{FONA-1}*, *bla_{FONA-2}*, *bla_{FONA-3/6}* ve *bla_{FONA-5}* olarak belirlenmiştir. *R. aquatilis*, toprak numunelerinin %46'sından, sebze numunelerinin %83'ünden; *S. fonticola* ise, toprak numunelerinin %60'ında ve sebze

numunlerinin ise %1,3'ünden izole edilmiştir. Üçüncü kuşak sefalosporine dayanıklı fekal *Enterobacteriaceae* türleri sırasıyla %2,7, %1,3 ve %1,1 oranlarında olmak üzere süpermarket sebzelerden, çiftliklerden alınan maruldan ve tarım topraklardan izole edilmiştir. Fekal *Enterobacteriaceae* türlerinden *Citrobacter koseri* suşunun dışında, *Citrobacter*, *Enterobacter* türlerinin fenotipik olarak AmpC üretimi belirlendi. Taze ürünler ve tarımsal çevrenin karşılaştırılması halinde; taze ürünlerdeki *Enterobacteriaceae* türleri yetiştirilen toprağı yansıttığını belirlemişlerdir. (Blaak ve ark., 2014)

Reuland ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada; geniş spektrumlu betalaktamaz (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* (GSBLE) türlerinin Amsterdam, Hollanda'da perakende olarak satılan çiğ sebzelerde mevcut olup olmadığını belirlemek için, çeşitli kaynaklardan 15 farklı tipte 119 adet sebze numune toplamışlardır. İdentifikasyon ve duyarlılık testlerinden sonra GSBL kodlayan genler bir mikroarray ile karakterize edilmiştir. 15 sebze türlerinden dört tanesi GSBL-E ile kontamine edilerek, yedi numunede (% 6) GSBLE elde ettiklerini bildirmişlerdir. 3 adet *bla_{CTX-M-15}*, tek bir adet *bla_{CTX-M-1}*, CTX-M-9 grubuna ait iki gen ve bir SHV GSBL kodlayan gen bulunmuştur. Aynı zamanda elde edilen bu GSBL genleri insan kaynaklı enterobakteriyel suşlarla benzerlik gösterdikleri belirtilmiştir (Reuland ve ark., 2014).

Skočková ve Arkadaşları'nın 2013 yılında; Almanya'da shigatoxigenic *Escherichia coli* (*E.coli*)'nin çiğ sebze ve filizlenmiş tohumlarda büyük bir salgın nedeni olmasından dolayı sağlık güvenliğine güven azalmasına neden olmasının sonucu olarak yaptıkları bir çalışmada; çiğ sebzelerde ve Çek Cumhuriyeti'nde satışı yapılan filizlenmiş tohumlarda *E. coli* tespiti ve karakterizasyonu üzerinde durulmuştur. 24 adet örnekte (% 26.4), *E. coli* varlığı pozitif olarak belirlenmiş ve direnç tespiti E test ve disk difüzyon yöntemleri ile belirlenmiştir. Polimeraz zincir reaksiyonu hastalık oluşturma etkisinin kodlayan genlerin saptanması için kullanılmış ve *eaeA*, *hly*, *stx1* ve *stx2* ve tetrasiklin direnci kodlayan genler, *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, ve *tet(G)*, β -laktam direnci kodlayan genler, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, ve *bla_{CTX}* elde etmişlerdir (Skočková ve ark., 2013).

Yine aynı şekilde, Raphael ve Arkadaşları'nın 2011 yılında yayımladıkları çalışmalarında; Temmuz 2007 ve Nisan 2008 tarihleri arasında, 25 parti paket

halinde satılan ıspanağı 16S rRNA gen dizilimi ile GNB popülasyonunu antimikrobiyal maddelere karşı gösterdikleri direnci ve GSBL genlerinin varlığı açısından incelemiştir. İncelenen ıspanak numunelerinin 231 rastgele seçilmiş koloniler arasından 165 (%71) tanesinde 20 adet tanınan GNB türü bulunmuştur. Sefotaksim ve seftazidime direnç göstermesiyle GSBL pozitif şüpheli 12 adet suş daha *bla_{CTX-M}* ve *bla_{TEM}* genleri açısından incelemiştir. *E. coli* suşunun 876-bp *bla_{CTX-M-15}* geniyle %100 olarak özdeş olan 712-bp sekansta *Pseudomonas teessidea* suşu bulmuşlardır. Buna ek olarak da GSBL *bla_{RAHN-2}* genine sahip *Rahnella aquatilis* identifiye etmişlerdir (Raphael ve ark., 2011).

Ruimy ve arkadaşlarının 2010 yılında Fransa’da yayımladıkları, çalışmalarını 2003 ile 2004 yılları arasında tamamladıkları organik ve konvansiyonel sebze – meyveler (4 çeşit meyve ve 6 çeşit sebze) üzerinde yaptıkları araştırmada; We 292 adet sebze ve 107 adet meyve olmak üzere toplamda 399 adet numune, üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli nonoksidatif Gram (-) bakterilerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkisi üzerinde durulmuştur. Bu bakterilerin çoğu toprak ve çevre kaynaklı olduğunu ve bu bakterilerin arasında, bağışıklığı etkileyecek potansiyel patojen türler nadir olarak bildirilmiş ve test edilen ürünlerin % 13’ünün genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz üreten ve *Rahnella sp.* olarak tanımlanan bakteriler olduğu ve *bla_{RAHN}* genini taşıdığı beyan edilmiştir. Böylece, organik ve konvansiyonel meyve - sebzelerin dirençli bakterilerin ve direnç genlerinin önemli kaynaklarını teşkil edebileceği görülmektedir (Ruimy ve ark. 2010).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Gereç

İstanbul ve çevresindeki illerde bulunan semt pazarlarından Temmuz – Kasım 2014 tarihleri arasında alınan 8 adet asma yaprağı, 8 adet dereotu, 9 adet ıspanak, 8 adet kıvırcık, 8 adet karalahana, 7 adet beyaz lahana, 8 adet mantar, 8 adet maydanoz, 8 adet nane, 11 adet pazı, 8 adet pırasa, 8 adet roka, 9 adet semizotu olmak üzere 108 adet numune (Çizelge 3.1) aynı gün içerisinde numune taşıma kutusunda saklanarak laboratuvara getirilip ön zenginleştirme için hazırlıklara başlandı.

Çizelge 3.1. Toplanan numunelerin alındığı semtler.

No	Numune Cinsi	Alındığı Yer	No	Numune Cinsi	Alındığı Yer	No	Numune Cinsi	Alındığı Yer
1	İspanak	Yeşilköy	37	K. Lahana	Üsküdar	73	Mantar	Bahçelievler
2	Maydanoz	Yeşilköy	38	Mantar	Üsküdar	74	Mantar	Bahçelievler
3	İspanak	Yeşilköy	39	K. Lahana	Üsküdar	75	Roka	Sakarya M.
4	Mantar	Yeşilköy	40	Maydanoz	Üsküdar	76	Roka	Sakarya M.
5	Pazı	Yeşilköy	41	Roka	Üsküdar	77	Roka	Sakarya M.
6	Asma	Yeşilköy	42	Maydanoz	Üsküdar	78	Nane	Sakarya M.
7	Roka	Yeşilköy	43	Kıvırcık	Üsküdar	79	Nane	Sakarya M.
8	Pırasa	Yeşilköy	44	Kıvırcık	Üsküdar	80	Nane	Sakarya M.
9	Semizotu	Yeşilköy	45	Nane	Üsküdar	81	K. Lahana	Eminönü
10	Dereotu	Yeşilköy	46	Mantar	Üsküdar	82	B. Lahana	Beykoz
11	Roka	Yeşilköy	47	Pazı	Yeniköy	83	K. Lahana	Kadıköy
12	Kıvırcık	Yeşilköy	48	Pırasa	Yeniköy	84	Asma	Eminönü
13	Semizotu	Beykoz	49	K. Lahana	Yeniköy	85	Asma	Eminönü
14	Dereotu	Beykoz	50	Pırasa	Ümraniye	86	Asma	Silivri
15	Maydanoz	Beykoz	51	Pırasa	Ümraniye	87	Asma	Kadıköy
16	Maydanoz	Beykoz	52	Mantar	Ümraniye	88	Asma	İzmir
17	Dereotu	Beykoz	53	K. Lahana	Ümraniye	89	Kıvırcık	Eminönü
18	Semizotu	Beykoz	54	Asma	Beykoz	90	Kıvırcık	Şişli
19	Roka	Beykoz	55	Asma	Beykoz	91	Semizotu	Şişli

Çizelge 3.1. Toplanan numunelerin alındığı semtler (devamı).

20	Nane	Beykoz	56	Pırasa	Yeşilkent	92	B. Lahana	Kadıköy
21	K. Lahana	Beykoz	57	Pırasa	Esenyurt	93	B. Lahana	Kadıköy
22	Semizotu	Beykoz	58	Pazı	Esenkent	94	K. Lahana	Eminönü
23	Ispanak	Beykoz	59	Pazı	Bahçeşehir	95	Pazı	Kadıköy
24	Nane	Beykoz	60	Pazı	Bahçeşehir	96	Maydanoz	Kadıköy
25	Kıvırcık	Beykoz	61	Pazı	Bahçeşehir	97	Ispanak	Şişli
26	Semizotu	Beykoz	62	Pazı	Bahçeşehir	98	Dereotu	Eminönü
27	Ispanak	Beykoz	63	Ispanak	Bahçelievler	99	Dereotu	Kadıköy
28	Pazı	Beykoz	64	B. Lahana	Bahçelievler	100	Dereotu	Şişli
29	Ispanak	Levent	65	B. Lahana	Bahçelievler	101	Ispanak	Kadıköy
30	Roka	Levent	66	B. Lahana	Bahçelievler	102	Ispanak	Kadıköy
31	Pırasa	Bağcılar	67	Kıvırcık	Bahçelievler	103	Semizotu	Bursa M.
32	Kıvırcık	Üsküdar	68	Maydanoz	Bahçelievler	104	Semizotu	Bursa M.
33	Nane	Üsküdar	69	Maydanoz	Bahçelievler	105	Semizotu	Bursa M.
34	Nane	Üsküdar	70	Pırasa	Bahçelievler	106	Pazı	Bursa G.
35	Dereotu	Üsküdar	71	Mantar	Bahçelievler	107	Pazı	Bursa M.
36	Dereotu	Üsküdar	72	Mantar	Bahçelievler	108	B. lahana	Bursa M.

3.2. Kullanılan Besiyerleri ve Yöntemler

3.2.1. Kullanılan besi yerleri

3.2.1.1. *Enterobacteriaceae* Enrichment Buyyon (E.E. Broth)

E.E. Broth, Mossel, Visser ve Cornelissen tarafından Enterobacteriaceae büyümesini kolaylaştırmak için tarafından geliştirilmiştir (Mossel ve ark.,1963). Bu ortam, özellikle gıda örneklerinde bulunan *E. coli* ve *Salmonella spp.* büyümesini artırmak için dekstroz içerir ve diğer sorunlu organizmalar Ox Bile ve Brilliant Green eklenerek baskılanır. E.E. Broth, hasarlı veya yaralanan hücrelerin iyileşmesi için zengin bir ortam sağlayarak, bir zenginleştirme suyu olarak kullanılmaktadır.

E.E. Broth, azot, vitamin ve aminoasit içermektedir. Diğer bir taraftanda içeriğinde bulunan dekstroz organizma büyümesini artırma amacıyla kullanılan bir karbon kaynağıdır. Kurutulmuş Ox Bile (Öküz Safrası) ve Brillant Green Gram (+) bakteriler, özellikle de basil ve fekal streptokoklara karşı seçici maddelerdir ve ayrıca sodyum fosfat ve potasyum fosfat kuvvetli tampon maddeleridir.

Litre başına içerikleri, istenen performans başına değişebilen değerler ile genel olarak;

- Kurutulmuş öküz safrası 20 g/L
- Enzimatik jelatin 10 g/L
- Sodyum fosfat dibazik 8 g/L
- Dekstroz 5 g/L
- Potasyum fosfat monobazik 2 g/L
- Brilliant Green 0.015 g/L

şeklinde oluşmaktadır.

45 g E.E. Broth 1 L su içerisinde iyice süspanse olması sağlanır. 100 °C’de ki sıcak suyun bulunduğu su banyosunda, otoklavlama işlemi olmadan, 30 dk süre ile bekletilerek sonucunda 25 °C’de koyu siyah-yeşil renkte buyyon elde edilir.

3.2.1.2. Chromatic ESBL agar

Chromatic ESBL agar, Genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının tespiti için kullanılan bir kromojenik ortamdır. Chromatic ESBL + AmpC agar ise hem GSBL üreticilerini hemde AmpC üreticilerini inceleyen kromojenik besiyeridir.

Chromatic ESBL agar içeriğinde;

- Pepton karışımı 43,2 g/L
- Agar 15 g/L
- Kromojenik karışım 1 g/L
- Selektif karışım 0,5 g/L

bulunmaktadır.

ESBL kromojen hazır agar (Chromoagar™ ESBL, Paris, Fransa) hazırlanırken hassas terazide toz halinde bulunan agardan 59,2 g tartılarak topaklanmasına izin vermeden 1 L suda süspanse edilir ve 121 °C’de 15 dk süre ile otoklav kullanılarak steril edilir. Daha sonra 50 oC’ye kadar soğutulan besi yerinin içerisine toz ESBL+AmpC steril ampülü (Liofilchem 81090, İtalya) eklenir, ve çözüldüğüne emin olunduktan sonra steril petri kaplarına dökülerek oda sıcaklığında

katılaşması sağlanır. Kullanımına kadar 4 °C’de soğuk ortamda muhafaza edilebilmektedir (CLSI, 2013).

3.2.1.3. Tryptic Soy Agar (TSA)

TSA, soya fasulyesi unu ve kazein içeriği ile kolay üremeyen mikroorganizmaların izolasyonu ve yetiştirilmesi için kullanılır ama anaeroblar için tercih edilen bir ortam değildir. Soya ve kazein pepton kombinasyonu amino asitler ve polipeptidlerin formunda organik nitrojen kaynağı olarak son derece besleyici bir ortamdır (MacFaddin, 1985; APHA, 2001; Jorgensen ve ark. 2015).

İçeriği;

- | | |
|---------------------------|--------|
| • Peptonlu kazein | 15 g/L |
| • Peptonlu soya fasülyesi | 5 g/L |
| • Sodyum Klorür (NaCl) | 5 g/L |
| • Agar-Agar | 15g/L |

şeklinde oluşmaktadır.

Mikrobiyoloji analizlerinde kullanılırken kutu üzerinde bulunan talimata göre; 40 g tartılarak saf suda süspansiyon edilir ve 121 °C’de 15 dk süre ile steril edilir. Steril petrilere 40-50 °C’ye düşmesi beklendikten sonra dökülerek oda sıcaklığında katılaşması sağlanır.

3.2.1.4. Mueller Hinton Agar (MHA)

Mueller Hinton Agar (MHA), patojenik *Neisseria* türleri izolasyonu için 1941 yılında, Mueller Hinton tarafından geliştirildi. Günümüzde daha yaygın Kirby-Bauer disk difüzyon yöntemi ile mikroorganizmanın rutin duyarlılık testleri için kullanılmaktadır.

Mueller Hinton medya sığır özü, kazein, kazein hidrolizat, agar ve nişasta içerir. Sığır özü ve kazein asit hidrolizat azot, vitaminler, karbon, amino asitler, kükürt vb. temel besinleri sağlarlar. Nişasta ise; üretilen herhangi bir toksik metaboliti emmek için ilave edilir.

İçeriği;

- Kazein hidrolizat 17,5g/L
- Agar-agar 13 g/L
- Sığır özü 2 g/L
- Nişasta 1,5 g/L

şeklinde oluşmaktadır.

Hazırlanışı ise; paket üzerindeki talimatlar izlenerek, 34 g toz MHA 1 L saf suda çözündürülür ve 115 °C'de 10 dk süre ile otoklavda steril edilir. Steril çözelti 40-50 °C olduğu zaman petri kaplarına dökülerek oda ısısında katılaşma sağlanır. 4 °C'de buzdolabında muhafaza edilebilir.

3.2.1.5. Mueller Hinton Broth (MHB)

Mueller Hinton Broth üreyen ve/veya üremeyen mikroorganizmaların çeşitli yetiştirme metodlarında kullanılacak genel amaçlı bir besiyeridir. Mueller Hinton Broth en sık karşılaşılan aerobik ve fakültatif anaerobik bakteri türlerinde antimikrobiyal duyarlılık testleri için tavsiye edilmektedir.

İçeriği;

- Et infizyonu 2.0 g
- Kazein hidrolizat 17.5 g
- Nişasta 1.5 g

şeklinde oluşmaktadır.

Hazırlanışı; 34 g toz MHB 1 lt saf suda çözündürülür ve 115 °C'de 10 dk süre ile sterilize edilerek olmaktadır. Sıvı halde kalacağı için oda sıcaklığında soğutularak 4 °C buzdolabı sıcaklığında muhafaza edilebilmektedir.

3.2.2. Yöntemler

Bu çalışmada; sebze numunelerinde *Enterobacteriaceae* bakteri identifikasyonu için ISO/DIS 21528-2 (ISO/TC34/SC9) 'Gıda ve hayvan yemleri mikrobiyolojisi – *Enterobacteriaceae* tanımlama ve sayımı için yatay yöntemler - Bölüm 2: Koloni-sayım yöntemi (Microbiology of food and animal feeding stuffs -

Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae - Part 2: Colony-count method)' talimatları ve daha sonra, disk difüzyon, disk difüzyon konfirmasyon, antibiyogram doğrulama ve MIK değerleri için CLSI (2013) talimatları takip edildi.

Araştırmada; CLSI talimatları baz alınarak kontrol suşu olarak *Escherichia coli* ATCC 25922 GSBL(-) kontrol ve *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 GSBL(+) kontrol suşları fenotipik olarak bakterilerin identifikasyonu için kullanıldı.

3.2.2.1. Ön zenginleştirme

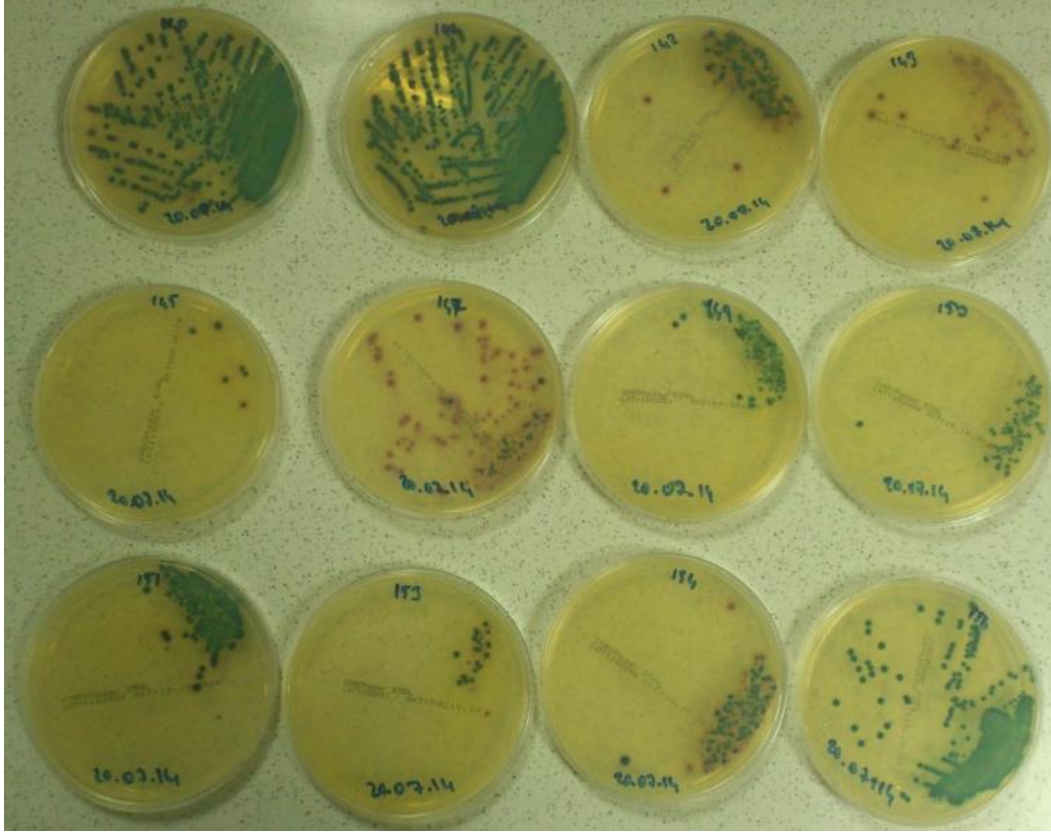
Numune taşıma kutusunda analize için getirilen numune materyallerden, karot yöntemiyle 25 gr hassas terazide (AND GF-6100, Japonya), kontaminasyonu engellemek amacı ile bek alevi ortamında tüm aletler %96'lık etanol (Merck 100967, Darmstadt, Almanya) çözeltisine batırılıp steril edilerek, homojenizatör torbasına (Interscience bagsystem- sterile full page filter bags) tartıldı (Şekil 3.1). Bu sterilizasyon işlemi her numune tartımı sırasında tekrarlandı. Tartımı yapılan torbalara 225 ml kullanım talimatına göre hazırlanmış ve sterilizasyon işleminden sonra soğutulmuş EE buyyon (E.E. Broth; LABM LAB091, Lancashire, İngiltere) steril mezür yardımıyla eklendi. Ağızları dikkatlice kapatıldıktan sonra homojenizatörde (EasyMix, AES Chemunex, BruzFransa) 2 dk süresince homojenize edildi. 37 °C' de 18-24 s süre ile inkübasyona bırakıldı ve inkübasyonu tamamlanan kültürler selektif besiyeri ESBL kromojen agara aktarılmak üzere bir sonraki işleme alındı.



Şekil 3.1. Pazar ve süpermarketlerden toplanan sebze numuneleri ve ön zenginleştirme

3.2.2.2. Selektif besiyerine inokülasyon

Ön zenginleştirme işlemi tamamlanmış numunelerden steril 10 µl'lik öze yardımı ile kullanıma hazır ve oda sıcaklığına ulaşmış ESBL kromojen hazır agara (Chromoagar™ ESBL, Paris, Fransa) sürme yöntemiyle ekim yapıldı. 18 saat süre ile 37°C de inkübasyona alındı ve oluşan 1-2 mm çapında yeşil renkli koloniler şüpheli GSBL pozitif *Klebsiella pneumoniae*'ye işaret etti (Şekil 3.2). Her bir petriden saf olduğu düşünülen kolonilerden steril öze yardımıyla alınarak saflaştırma amacı ile tekrar ESBL kromojen agara sürme yöntemi ile ekim yapıldı ve 18 saat süre ile 37°C de tekrar inkübasyona alındı. Saflaştırılan kolonilerden steril öze yardımı ile TSA(LABM /UK) hazır besiyerine pasaj edilerek 37 °C' de 18-48 s daha inkübasyona bırakıldı. TSA 'da oluşan koloniler, tiplendirme, disk difüzyon doğrulama testi için kullanıldı.



Şekil 3.2. ESBL kromojen agarda oluşan renkli koloniler

3.2.2.3. Oksidaz testi

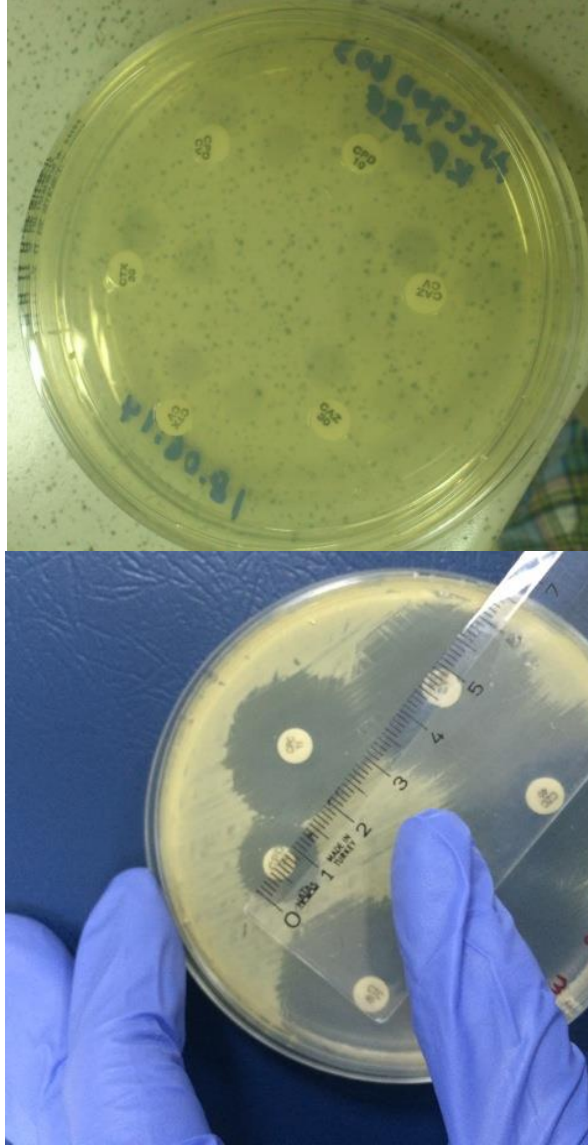
İzolatlara oksidaz testi (Bactident Oxidase test kiti) uygulanarak, oksidaz negatif sonuç veren izolatlar antibiyotik duyarlılık ve tanımlama testleri yapıncaya kadar buzdolabı koşullarında muhafaza edildi.

3.2.2.4. Disk difüzyon testi

Ön zenginleştirme aşamasında sonra ESBL agar besiyerinde oluşan şüpheli kolonilerin antimikrobiyal duyarlılıkları CLSI (2013) talimatı takip edilerek yapıldı.

ESBL besiyerinde oluşan tek koloniler steril tuzlu su çözeltisinde (% 0,85 NaCl₂) süspansiyon edildi. Yapılan bu süspansiyon 0,5 McFarland (bioMerrieux, Marcy l'Etoile, Fransa) standardına göre (108 kob/ml) dansitometre (BD Phoenix Phoenix spec, USA) kullanılarak ayarlandı. 0,5 MacFarland standardına göre ayarlanan süspansiyondan Mueller Hinton Agar (MHA) (LiofilChem, İtalya) 90 mm hazır besiyerine steril bir eküvyon yardımıyla sürüntü ekimi yapıldı. Bu işlemi takiben steril forsep ile Sefpodoksim, Sefoktaksim ve Seftazidim (+/- Klavulanik asit) içeren

kullanıma hazır diskler (Mast Group ESBL Kit CPD10, İngiltere) yerleştirildi (Şekil 3.3). Bu işlem sırasında diskler oluşabilecek zon bölgeleri birbirlerini baskılamayacak şekilde CLSI (2013) talimatına uyarak dikkatle konumlandırıldı. Oluşacak zonların birbiri üzerine gelmemesi için, disk merkezleri arasında 25 mm, petri kenarından ise 15 mm en az uzaklık olmasına dikkat edildi. Plaklar ters çevrilerek 37 °C'lik etüvde 24 s süreyle inkübe edildi ve sonrasında oluşan zonlarının çapları ölçülerek kaydedildi. Diskler 12 s daha inkübasyona bırakılarak, inkübasyon bitiminde klavulanik asitli ve klavulanik asitsiz zonlar arasında oluşan farklar karşılaştırıldı ve kit talimatına göre GSBL varlığı bakımından değerlendirmeleri yapıldı.



Şekil 3.3. Mueller Hinton Agara yerleştirilen antibiyotik diskler

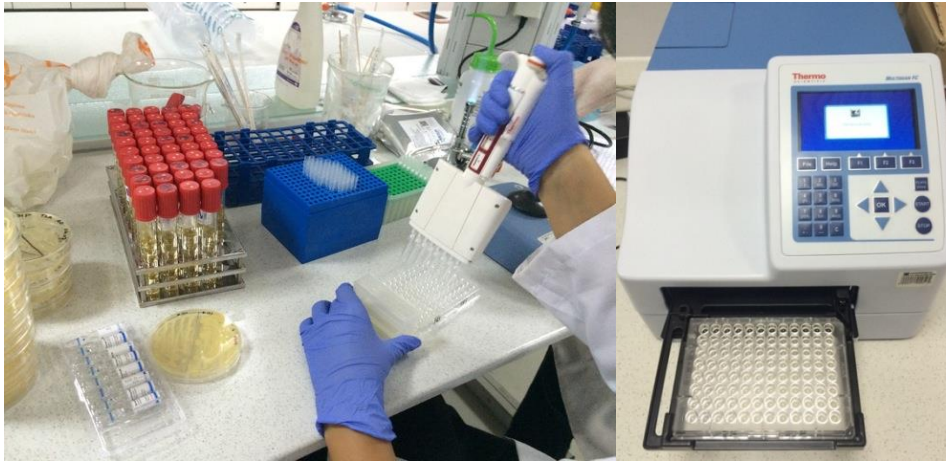
3.2.2.5. Vitek ® MS ile tiplendirme

Bakteri tiplendirme işlemi, TSA besisi yerinde oluşan koloniler kullanılarak kütle spektrofotometresi (VITEK® MS) (bioMerieux, Fransa) ile belirlendi. TSA besiyerinde oluşan kolonilerden 1µL'lik steril plastik öze kullanılarak cihaza ait olan slaytta yer alan haznelere sürüldü ve 1 µL CHCA matrix eklenerek kuruması sağlandı. Daha sonra slayt cihaza yerleştirilerek okuma işlemi tamamlandı ve sonuç olarak tanımlama işlemi yapıldı.

3.2.2.6. Antibiyogram doğrulama

Antibiyogram duyarlılık testleri ve MIC tayini Micronaut-S beta-lactamase VII Plate (Merlin Diagnostika, Germany) kullanılarak yapıldı.

50 µl'lik 0,5 McFarland standarta sahip mikrobiyal süspansiyon 11 ml'lik olarak hazırlanan Mueller Hinton Buyyon (Merck, Almanya) içinde pipetlenerek vorteks işlemi yapıldı. Daha sonra hazırlanan bu süspansiyondan 100 µl alınarak daha önceden antibakteriyal maddelerin hidratlanmış ve vakumla kurutulmuş olarak bulunduğu plakaların her bir gözüne gelecek şekilde eklendi ve 37°C 'de 18 saat süre ile inkübe edildi. Okuma işlemi Thermofischer Multiskan FC spektrometre ile yapıldı. MIC verilerin analizi otomatik olarak MCN6 yazılımı (Sifin, Almanya) ile gerçekleştirildi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Antibiyogram doğrulama aşamaları

4. BULGULAR

Kullanılan numune sayıları ve izolasyon sonuçları

Bu çalışmada İstanbul ve çevresinde bulunan semt pazarlarından satın alınan 13 çeşit toplamda 108 adet sebzedden izole edilen Üsküdar, Beykoz, Bahçelievler, Levent, Yeniköy, Yeşilköy, Yeşilkent, Esenyurt, Esenkent, Bahçeşehir, Silivri, Eminönü, Şişli, Kadıköy, Bağcılar, Ümraniye olmak üzere 16 farklı ilçeden, Sakarya ve Bursa olmak üzere 2 farklı ilden; 8 adet asma yaprağı, 8 adet dereotu, 9 adet ıspanak, 8 adet kıvırcık, 8 adet karalahana, 7 adet beyaz lahana, 8 adet mantar, 8 adet maydanoz, 8 adet nane, 11 adet pazı, 8 adet pırasa, 8 adet roka, 9 adet semizotu olmak üzere 108 adet numune toplandı ve bu numunelerden 70 adet bakteri izolasyonu yapıldı. İzole edilen *Enterobacteriaceae* türü bakterilerin fenotipik yöntemler izlenerek beta laktam grubu antibiyotiklere gösterdikleri dirence bakıldı.

Oksidaz testi sonuçları

Ön zenginleştirme işlemlerinden sonra selektif zenginleştirme amacıyla kullanılan ESBL kromojen agarda genel olarak 3 farklı renkte (pembe, mavi, şeffaf) koloni veren bakteriler saflaştırılarak disk difüzyon testine geçmeden önce oksidaz test çubukları (Merck) ile talimatlara uygun olarak test edildi ve 69 adet kolonide oksidaz (-) sonuç alındı.

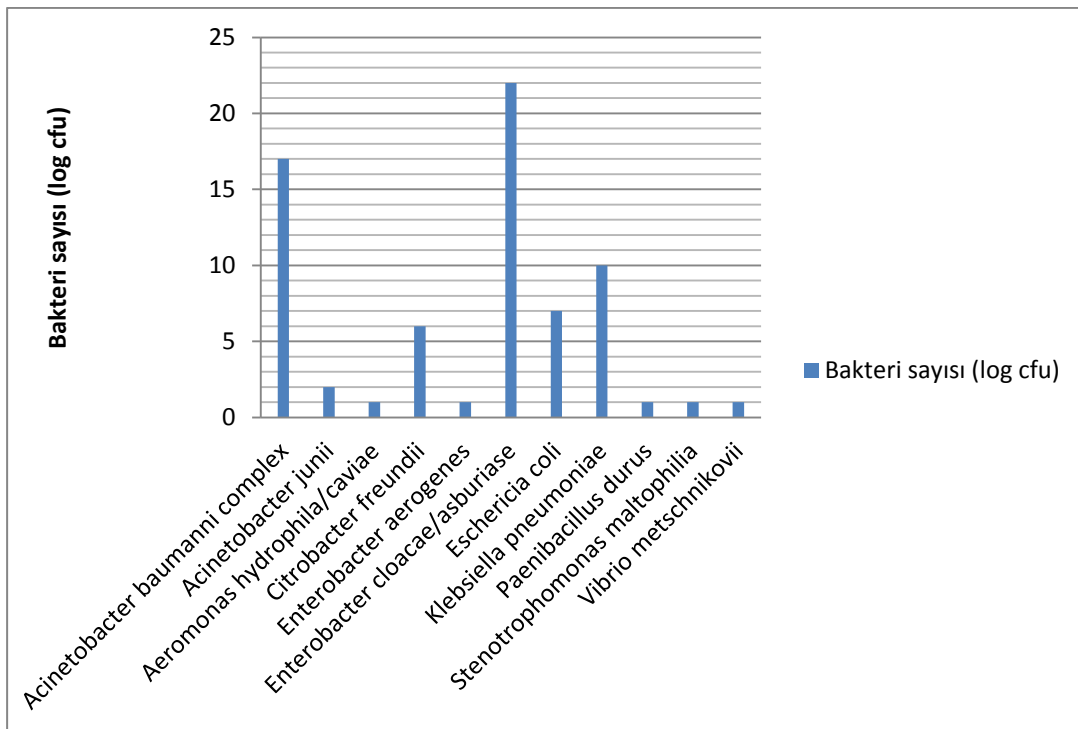
Disk difüzyon testi sonuçları

CLSI (2013) talimatları takip edilerek, oksidaz (-) sonuç veren 69 koloniye uygulanan antibiyotik disk difüzyon sonuçlarına göre; 21 adet izolatın seftazidime (CAZ) dirençli, 24 adet izolatın sefotaksime (CTX) dirençli, 50 adet izolatın ise sefpodoksime (CPD) dirençli olduğu tespit edildi. Üç tür antibiyotiğe (CAZ, CTX, CPD) aynı anda direnç gösteren izolatların ise 23 adet olduğu belirlendi.

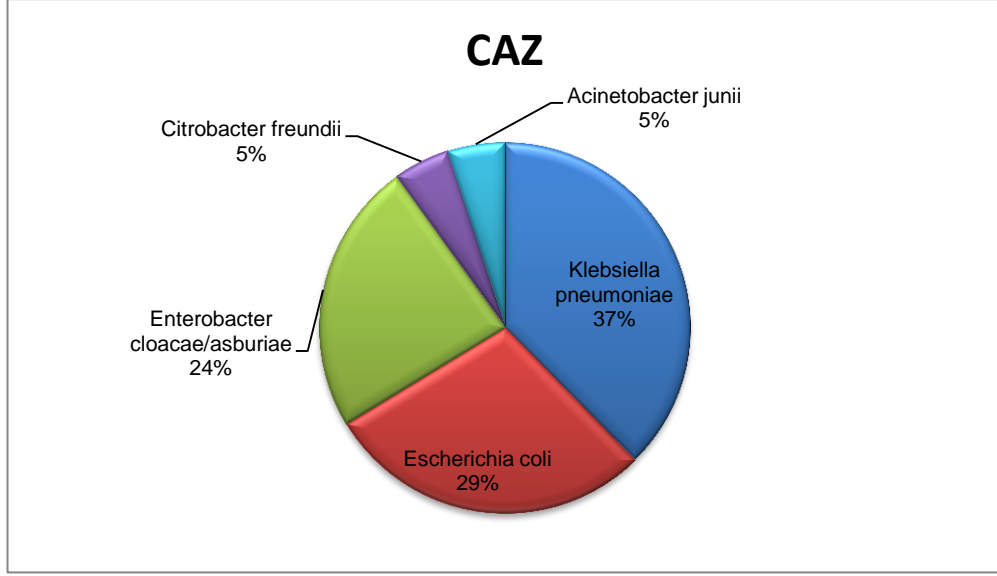
VITEK MS Sonuçları

Sonuçlar elde edildikten sonra izolatlar VITEK-MS cihazı kullanılarak sırası ile; *Enterobacter cloacae/asburiae* (%32), *Acinetobacter baumannii complex* (%25), *Klebsiella pneumoniae* (%14), *Escherichia coli* (%10), *Citrobacter freundii* (%9), *Acinetobacter junii* (%3), *Aeromonas hydrophila /caviae* (%1,4), *Enterobacter aerogenes* (%1,4), *Paenibacillus durus* (%1,4), *Stenotrophomonas maltophilia* (%1,4), *Vibrio metschnikovii* (%1,4) olarak tanımlandı. İzole edilen bakterilerin sayıları (log cfu) bazında çizelge 4.1’de gösterildi.

Çizelge 4.1. VITEK MS ile kolonilerin tiplendirilmesi ve dağılımı

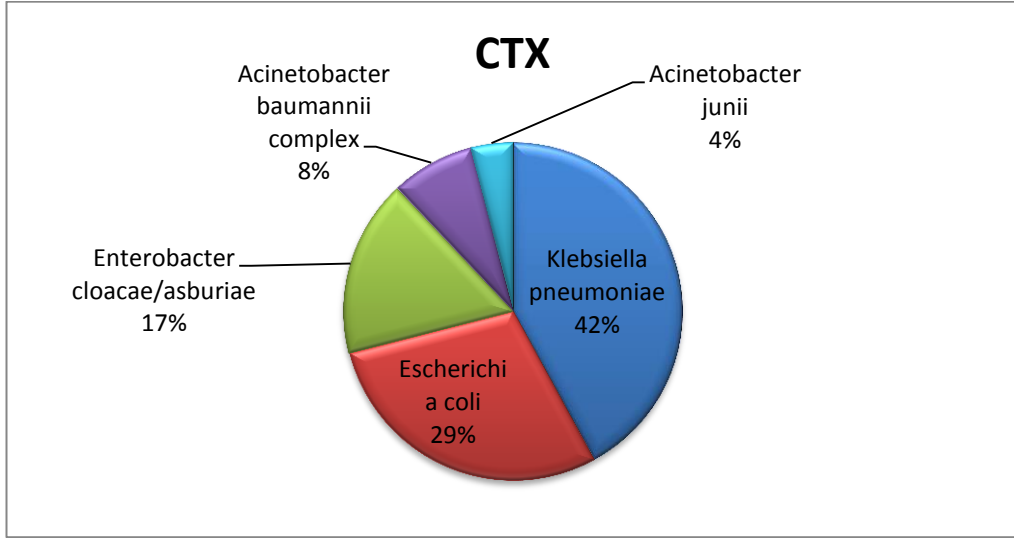


Tanımlamalardan sonra elde edilen sonuçlar incelendiğinde şekil 4.1’de gösterildiği gibi, tanımlanan bakterilerde sadece seftazidime (CAZ) dirençli 21 adet izolatın yüzdeleri sırası ile; *Klebsiella pneumoniae* (%38), *Escherichia coli* (%29), *Enterobacter cloacae/asburiae* (%24), *Citrobacter freundii* (%5), *Acinetobacter junii* (%5) olarak sıralandığı görüldü.



Şekil 4.1. Seflazidime (CAZ) dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarının yüzde dağılımları

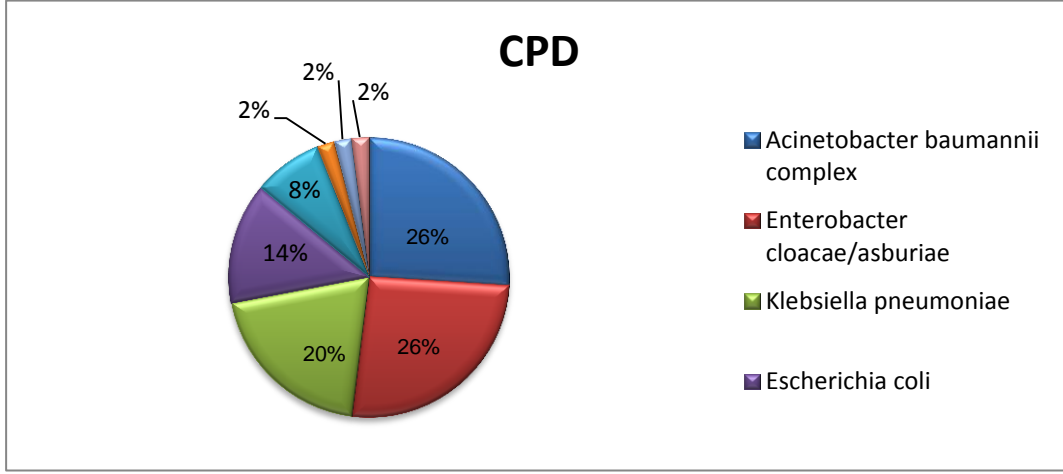
Ayrıca şekil 4.2’de gösterildiği üzere, sadece sefotaksime (CTX) dirençli 24 adet bakterinin yüzdeleri sırası ile; *Klebsiella pneumoniae* (%42), *Escherichia coli* (%29), *Enterobacter cloacae/asburiae* (%17), *Acinetobacter baumannii complex* (%8), *Acinetobacter junii* (%4) şeklinde sıralandığı görüldü.



Şekil 4.2. Sefotaksim (CTX) dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarının yüzde dağılımları

Son olarak da şekil 4.3’de görüldüğü üzere sadece sefpodoksim (CPD) dirençli 50 adet bakterilerin yüzdeleri sırası ile; *Acinetobacter baumannii complex* (%26), *Enterobacter cloacae/asburiae* (%26), *Klebsiella pneumoniae* (%20), *Escherichia coli* (%14), *Citrobacter freundii* (%8), *Acinetobacter junii* (%2),

Paenibacillus durus (%2), *Stenotrophomonas maltophilia* (%2) şeklinde sıralandığı görüldü.



Şekil 4.3. Sefpodoksım (CPD) dirençli *Enterobacteriaceae* suşlarının yüzde dağılımları

Antibiogram doğrulama testi sonuçları

Disk difüzyon testine göre 69 adet şüpheli GSBL pozitif bakterinin antibiyogram doğrulama testi sonucuna göre 18 adet gram (-) *Enterobacteriaceae* türünün GSBL (+) üreticisi sonucuna kesin olarak ulaşıldı.

İzole edilen suşların 18 adeti (%25,55) GSBL pozitif bulundu. Tüm numunelerden GSBL pozitif olarak belirlenen veriler sebze de bulunma yüzdeleri ile beraber Çizelge 4.2 de gösterildi.

Çizelge 4.2. Sebzelerden izole edilen GSBL pozitif *Enterobacteriaceae* türleri

Sebze Örnekleri	Bakteri sayısı (n)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n) (GSBL pozitif)	<i>Escherichia coli</i> (n) (GSBL pozitif)	<i>Citrobacter freundii</i> (n) (GSBL pozitif)	Toplam GSBL (+) (n)
Maydanoz (n=8)	6	1 (%16,6)	2 (%33,4)	-	3 (%50)
İspanak (n=9)	9	2 (%22,2)	2 (%22,2)	-	4 (%44,4)
Roka (n=8)	5	3 (%60)	-	-	3 (%60)
Pazı (n=11)	11	1 (%9)	-	-	1 (%9)
Kıvırcık (n=8)	6	2 (%33)	-	-	2 (%33)
Dereotu (n=8)	8	-	2 (%25)	1 (%12,5)	3 (%37,5)
Karalahana (n=8)	3	-	1 (%33,3)	-	1 (%33,3)
Nane (n=8)	3	1 (%33,3)	-	-	1 (%33,3)

Tüm fenotipik sonuçlara göre; 8 adet maydanoz numunesinden izole edilen 6 adet bakteriden 3(%50) izolattın; 9 adet ıspanak numunesinden izole edilen 9 adet bakteriden 4 (%44,4) izolattın; 8 adet rokadan izole edilen 5 adet bakteriden 3 (%60) izolattın; 11 adet pazıdan izole edilen 11 adet bakteriden 1 (%9) izolattın; 8 adet kıvırcıktan izole edilen 6 adet bakteriden 2 (%33) izolattın, 8 adet dereotundan izole edilen 8 adet bakteriden 3 (%25) izolattın; 8 adet karalahanadan izole edilen 3 adet bakteriden 1 (%33,3) izolattın ve son olarakta 8 adet naneden izole edilen 3 adet bakteriden 1 (%33,3) izolattın GSBL pozitif sonuç verdiği belirlendi.

Tüm verilerin yanı sıra, antibiyogram doğruma işlemi sonuçlarına göre MBL ve AmpC olmak üzere GSBL'dan hariç olarak iki farklı direnç daha tespit edildi (Çizelge 4.3). 108 adet numuneden belirli aşamalar ile izole edilen ve 69 adet bakterinin tanımlaması yapılan izolatlardan toplamda 1 adet *Stenotrophomonas maltophilia* suşunun ve 3 adet *Acinetobacter baumannii complex* suşunun MBL ürettikleri ve aynı zamanda GSBL üreten *E. coli* suşlarından birinin ise AmpC ürettiği belirlendi.

Çizelge 4.3. GSBL, MBL, AmpC enzimlerinin sebzelerde bakteri tiplerine göre dağılımları (n=69)

Mikroorganizma cinsi	GSBL	MBL	AmpC
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10	-	-
<i>Escherichia coli</i>	7	-	1
<i>Citrobacter freundii</i>	1	-	-
<i>Acinetobacter baumannii complex</i>	-	3	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	1	-
<u>TOPLAM</u>	18	4	1

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde antibiyotiklere karşı oluşan direncin hızla artması ve halk sağlığını önemli derecede tehdit eder düzeye ulaşmasından dolayı; WHO ve Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) başta olmak üzere uluslararası kuruluşlar ve bu konuda yapılan çalışmalar bu sorunun üzerinde önemle durmaktadırlar. Bunlardan biri ise; WHO'nun 2015'in Eylül ve Ekim aylarında yaptıkları Barbados, Çin, Mısır, Hindistan, Endonezya, Meksika, Nijerya, Rusya Federasyonu, Sırbistan, Güney Afrika, Sudan ve Viet Nam olmak üzere toplam 12 ülkede antibiyotik kullanımı ve antibiyotik direncine ilişkin bilgilendirme anketleridir. Bunun gibi anketler bu konu üzerinde oluşabilecek büyük boşlukları anlamada ve en yaygın yanlış bilgiler ile mücadele açısından WHO ve ortaklarına büyük yarar sağlamaktadır (WHO, 2015).

Enterobacteriaceae suşlarında salgılanan geniş spektrumlu beta laktamaz enzimi halk sağlığı açısından büyük bir sorun teşkil etmektedirler. 2001 ve 2002 yılları arasında poliklinik dışkılarında GSBL üreten *Enterobacteriaceae* sıklığını belirlemek amacıyla yapılan bir ankette, GSBL taşıyıcılarının sıklığında %2,1 den % 7,5'e artış gösterdiği belirlenmiştir (Mirelis ve ark., 2003). Bir başka çalışmada ise; toplum kaynaklı GSBL üreten *Enterobacteriaceae* bakteriyemi sıklığı % 4,1'dir (Kang ve ark. 2008). Halk sağlığında büyük bir önem taşıyan bakterilerin oluşturdukları multidirencin yayılmasına katkı sağlayan faktörler arasında; fekal taşıyıcılık, bağırsak kolonizasyonu, uluslararası seyahat ve ev üyesi aktarımı olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmektedir (Leupland ve ark. 2008; Ho ve ark. 2008).

Sebzeler dış ortama direkt temas ile yetiştiklerinden dolayı (toprak, su) mikroorganizmalarca kontamine olabilmekte ve buna ek olarakta temiz sularla sulanmayan sebzelerde, sağlık için zararlı mikroorganizma popülasyonunun arttığı yapılan çalışmalarda görülmektedir (Kıvanç, 2011). Araştırmalar incelendiğinde; *E.coli* ve *Klebsiella spp.* suşlarını gıdalarda ve aynı serotipleri bu gıdaları tüketen hastalarda tespit edilmiştir (Cooke ve ark., 1970; Cooke ve ark., 1980).

Bu çalışmada; çiğ tüketime uygun olan sebze örneklerinde, antimikrobiyal direnç tespiti için kullanılan bir yöntem olan disk difüzyon testinin dışında, elde edilen kültürleri tanımlamak amacıyla, kütle spektrofotometresi (VITEK MS) kullanılmış ve sonuçlar %99,9 kesinlik payıyla belirlenmiş olup, tanımlaması yapılan izolatların antibiyogram doğrulama ve minimal inhibisyon konsantrasyonu (MIK) değerleri belirlenmiştir. Sonuç olarak; alınan sebze numunelerinden izole edilebilen GSBL (+) *Enterobacteriaceae* suşlarının varlığı saptandı.

Son yıllarda birçok çalışmaya konu olan antibiyotik direnci, ülkemiz literatürlerinde, gıdalar üzerine yapılan araştırmalarda da yer bulmaktadır. Özellikle incelendiğinde; kırmızı et, balık, süt ve tavuk gibi tüketimi yoğun olan gıdalarda yapılan çalışmalar bulunmakla beraber bu konuyla ilgili olarak sebzeler ülkemiz literatürlerinde pek yer bulamamaktadır. Bu nedenle, yapılan çalışma ülkemizde sebzelerden izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinin dirençlilik durumlarını inceleme açısından yeni bir çalışma olma özelliği taşımaktadır.

Analizlerin sonucunda; CLSI 2013 prosedürlerine göre uluslararası kabul gören yöntem ve standartları baz alınarak uygulanan disk difüzyon ve mikrodilüsyon testlerinin yanı sıra VITEK MS Maldi-tof tiplendirme ve antibiyogram doğrulama işlemleri de yapıldı; İstanbul ve çevresinde bulunan semt pazarlarından satın alınan, 13 çeşit olmak üzere toplamda 108 adet sebzedden izole edilen 69 adet izolatın, antibiyogram doğrulama ve MIK değerleri sonucuna göre; %55,5'i *Klebsiella pneumoniae* (n=10), %39'u *Escherichia coli* (n=7), %6'sı *Citrobacter freundii* (n=1) olmak üzere toplamda 18 (%25,71) adeti kesin olarak GSBL (+) sonuç verdi (CLSI, 2013).

Sebzelerden izole edilen bakterilerin dünya literatürleri ile karşılaştırıldığında benzerlik gösterdikleri görülmektedir. İzole edilen bakteriler; *Enterobacter cloacae/asburiae*, *Acinetobacter baumannii complex*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Acinetobacter junii*, *Aeromonas hydrophila/caviae*, *Enterobacter aerogenes*, *Paenibacillus durus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Vibrio metschnikovii* olarak belirlendi olup literatürler ile benzerlik gösteren bakteriler ise; *Enterobacter cloacae/asburiae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii* olarak görüldü (Soriano ve ark., 2000; Falomir ve ark., 2010; Falomir ve ark., 2013; Zurfluh ve ark., 2015).

Türkiye ve uluslararası çapta yapılan araştırmalar incelendiğinde, Türkiye’de sebzeler üzerine yapılan direnç çalışmaları yok denecek kadar az iken; dünya literatürlerinde analize alınan sebzelerden izole edilen mikroorganizmaların direnç profillerine bakılarak, oluşan direncin genleri dahil olmak üzere tespit edildi.

Schwaiger ve Arkadaşları’nın 2011 yılında yaptıkları çalışmada, pazarlama aşamasındaki (süpermarket vs çiftlik) sebzelerden izole edilen bakterilerin antibiyotik direnci araştırılmıştır. *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida* ve *Enterococcus faecalis* türlerinin 30 kadar antibiyotiğe karşı fenotipik dirençleri mikro-seyreltme yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Köklü sebzelerde *E. Cloacae*, soğanlı sebzelerde *E. gergoviae*, hububat ve salatalarda *P. Agglomerans* yüksek prevelansa sahip olduğu bildirilmektedir. β -laktamlara karşı direncin en sık *P. agglomerans*’ta ve Sefakloro karşı ise *E. Gergoviae*’ta (% 41 ve% 29) olduğu ifade edilmiştir (Schwaiger ve ark., 2011). Ülkemizde yapılan bu çalışma ile Almanya’da yapılan bu araştırmada elde edilen izolat sonuçları, sebzelerden izole edilen bakteriler açasından benzerlik göstermesinin yanı sıra, bizim sonuçlarımıza göre GSBL (+) olan suşlar ile Almanya’da yapılan çalışma arasında farklılıklar olduğu görüldü.

Blaak ve Arkadaşları 2014 yılında Hollanda’da sebzelerde GSLB ve AmpC üreten *Enterobacteriaceae* varlığını belirlemek amacıyla; kereviz, havuç demeti, hindiba, frenk salatası, marul, mantar ve turp gibi süpermarketlerden alınan sebzeleri kullanmışlardır. GSBL üreten *Enterobacteriaceae* türlerinin kaynaklarının tarımsal ile ilgili olup olmadığını belirlemek için, marullar 3 çiftlikten toprak ve sulama suyu ile birlikte doğrudan alınmıştır. GSBL üreten sebzelerden izole edilmiş *Enterobacteriaceae* türlerini; *Rahnella aquatilis* (n = 119), *Serratia fonticola* (n = 45) ve *Pantoea agglomerans* (n = 1) olarak belirlemişlerdir. Kerevizden izole edilen *R. aquatilis* ve ıspanaktan izole edilen *S. Fonticola* suşlarının GSBL genleri, sırasıyla *bla_{RAHN-1}* ve *bla_{RAHN-2}* ve *bla_{FONA-1}*, *bla_{FONA-2}*, *bla_{FONA-3/6}* ve *bla_{FONA-5}* olarak belirlenmiştir. 3’üncü kuşak sefalosporine dayanıklı fekal *Enterobacteriaceae* türleri sırasıyla %2,7, %1,3 ve %1,1 oranlarında olmak üzere süpermarket sebzelerden, çiftliklerden alınan maruldan ve tarım topraklarından izole edilmiştir. Taze ürünler ve tarımsal çevrenin karşılaştırılması halinde; taze ürünlerdeki *Enterobacteriaceae* türleri yetiştirilen toprağı yansıttığını bildirmişlerdir (Blaak ve ark., 2014).

Reuland ve Arkadaşları'nın 2014 yılında yaptıkları bir çalışmada; geniş spektrumlu betalaktamaz (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* (GSBL-E) türlerinin Amsterdam ve Hollanda'da perakende olarak satılan çiğ sebzelerde mevcut olup olmadığını belirlemek için sebze numuneleri toplayarak, identifikasyon ve duyarlılık testlerinden sonra GSBL kodlayan genler bir mikroarray ile karakterize edilmiştir. 15 sebze türlerinden 4 tanesi GSBL-E ile kontamine edilerek, 7 numunede (% 6) GSBL-E elde ettiklerini bildirmişlerdir. 3 adet *bla_{CTX-M-15}*, tek 1 adet *bla_{CTX-M-1}*, *CTX-M-9* grubuna ait iki gen ve bir SHV GSBL kodlayan gen bulunmuştur. Aynı zamanda elde edilen bu GSBL genleri insan kaynaklı enterobakteriyel suşlarla benzerlik gösterdikleri belirtilmiştir (Reuland ve ark., 2014). Bildirilen bu sonuçlar göz önüne alındığında; insan florasında bulunan geniş spektrumlu beta laktamaz geni taşıyan bakterilerin kaynağı olarak, vücuda alınan ve metabolizmaya katılan çiğ sebzelerinde olabileceği göz ardı edilmemelidir.

Skočková ve Arkadaşları'nın 2013 yılında; Almanya'da shigatoxigenic *Escherichia coli* (*E.coli*)'nin çiğ sebze ve filizlenmiş tohumlarda büyük bir salgın nedeni olmasından dolayı yaptıkları bir çalışmada; çiğ sebzelerde ve Çek Cumhuriyeti'nde satışı yapılan filizlenmiş tohumlarda *E. coli* tespiti ve karakterizasyonu üzerinde durulmuştur. 24 adet (% 26.4) örnekte *E. coli* varlığı pozitif olarak belirlenmiş ve direnç tespiti E test ve disk difüzyon yöntemleri ile tayin edilmiştir. Elde ettikleri sonuçlara göre; β -laktam direnci kodlayan genler, *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}*, ve *bla_{CTX}* olarak bildirilmiştir (Skočková ve ark., 2013). Sonuç olarak, perakende pazarında satılan çiğ sebze ve filizlenmiş tohumlar; β -laktam antibiyotiklere karşı dirençli *E.coli* suşlarının varlığı ile tüketiciler için potansiyel bir risk temsil edebilmektedir. Yapılan bu çalışmada ise; elde edilen 7 adet *E.coli* suşunun, disk difüzyon ve antibiyogram doğrulama sonuçlarına göre, hepsinin GSBL (+) sonuç vermesi, Çek Cumhuriyetinde yapılan çalışma ile paralellik göstererek aynı yargının bizde de olabileceği ortaya konmaktadır.

Raphael ve Arkadaşları'nın 2011 yılında yayımladıkları çalışmalarında; 25 parti paket halinde satılan ıspanağı 16S rRNA gen dizilimi ile GNB popülasyonunun antimikrobiyal maddelere karşı gösterdikleri direnci ve GSBL genlerinin varlığı açısından incelemişlerdir. İncelenen ıspanak numunelerinin 231 rastgele seçilmiş koloniler arasından 165 (%71) tanesinde 20 adet tanınan GNB türü bulunmuştur. Organik veya inorganik ıspanaklardan izole edilen bakterileri; *Acinetobacter*

rhizosphaerae, *Enterobacter aerogenes*, *Erwinia persicina*, *Pantoea agglomerans*, *Pseudomonas fragi*, *Pseudomonas teessidea*, *Rahnella aquatilis*, *Serratia fonticola* olarak tanımlamışlardır. Sefotaksim ve seftazidime direnç göstermesiyle GSBL pozitif şüpheli 12 adet suşu (*Rahnella aquatilis*, *Pseudomonas teessidea*) *bla_{CTX-M}* ve *bla_{TEM}* genleri açısından incelemişlerdir (Raphael ve ark., 2011). Bu tür çalışmalara bakıldığında; taze ürünlerin antimikrobiyal ilaçlara özellikle de beta laktama karşı dirençli Gram (-) bakterilerin yayılmasında bir liman görevi görebileceği ve bakterilerin bu tür ilaçlara karşı direnç oluşturabilecek genleri taşıyabileceği görülmektedir.

Ruimy ve Arkadaşları'nın 2010 yılında Fransa'da yayımladıkları, organik ve konvansiyonel sebze – meyveler (4 çeşit meyve ve 6 çeşit sebze) üzerinde yaptıkları araştırmada; 292 adet sebze ve 107 adet meyve olmak üzere toplamda 399 adet numune, üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençli nonoksidatif gram negatif bakterilerin insan sağlığı üzerindeki potansiyel etkisi üzerinde durmuşlardır. Tanımlanan bu bakteriler; *Acinetobacter sp.*, *Stenotrophomonas sp.*, *Rahnella sp.*, *Proteus sp.*, *Pantoea sp.*, *Klebsiella sp.*, *Ewingella sp.*, *Escherichia sp.* ve *Erwinia sp.* olarak tanımlanmıştır. Bu bakterilerin çoğu toprak ve çevre kaynaklı olduğunu ve bu bakterilerin arasında, bağışıklığı etkileyecek potansiyel patojen türler nadir olarak bildirilmiş ve test edilen ürünlerin % 13'ünün genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz üreten *Rahnella sp.* olarak tanımlanan bakteriler olduğu ve *bla_{RAHN}* genini taşıdığı beyan edilmiştir. (Ruimy ve ark., 2010).

İstanbul'da yapılan bu çalışmada; GSBL üreten 3 tür bakteri (*K. pneumoniae*, *E. coli* ve *C. Freundii*) maydanoz (%50), ıspanak (%44,4), roka (%60), pazı (%1), kıvırcık (%33), dereotu (%37,5), karalahana (%33,3) ve nane (%33,3) gibi geniş yapraklı ve toprağa yakın yetişen sebzelerden izole edildi. Diğer taraftan toprağa uzaklığı diğerlerine nazaran daha fazla olan asmadan ve toprağa yakınlığı daha fazla olan mantardan ise GSBL üreten izolat alınmadı.

Literatürde bulunan çalışmalar incelendiğinde ıspanak gibi sebzelerden *E. coli* suşunun izole edilebildiği ve bu suşun sebebinde fekal bir bulaşma olabileceği görülmektedir (Raphael, 2011). Yurtdışında yapılan diğer bir çalışmada ise; marulların yetiştirildiği çiftlikten toprak, su ve sebze olmak üzere 3 farklı türden numune alınmıştır ve sonuçta sebzedeki %14, topraktan %14 ve sulama suyundan ise

%100 oranında *Enterobacteriaceae* suşları izole etmişlerdir (Blaak ve ark., 2014). Bu çalışmada gözlemlenen sonuçlara bakıldığında bulaşmanın kaynaklarının büyük çoğunlukla sulama kaynaklarından olabileceği ortaya çıkmaktadır.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde meyve ve sebzelerde dirençli Gram (-) bakteri popülasyonunun varlığı sıkça görülmekte olduğu ve kaynakları bakımından pek bir fark görülmediği, aynı zamanda da bu direnci sağlayan genleri taşımaları ile tüm dünya literatürü ile paralel sonuçlar elde edilerek sonuç olarak çiğ tüketime uygun sebzelerin, antimikrobiyal maddelere dirençli bakteriler için ciddi bir kaynak oluşturduğu görülmektedir.

Bu çalışmada GSBL yanında antibiyotik dirençleri konusunda önemli bir direnç türü olan metallo beta laktamaz (MBL)'da sebzelerde rastlanmıştır. Yapılan çalışmada; bir adet *Stenotrophomonas maltophilia* ve 3 adet *A. baumannii* suşlarında MBL enziminden kaynaklanan direnç tespit edilmiştir.

Diğer bir direnç türü olan MBL direnci, klinik olarak yapılan çalışmalarda *Stenotrophomonas maltophilia* suşlarında görülmekte ve sebzelerden de izole edilebilen bu suşlarda metallo beta laktam direnci, *bla_{L1}* ve/veya *bla_{L2}* bölgelerinden kaynaklanmaktadır (Mercuri ve ark. 2002; Zhuo ve ark. 2004; Yang ve ark. 2014). Diğer bir taraftan hazır yemeğe uygun salatalarda yapılan bir çalışmada *Stenotrophomonas maltophilia* suşu %78 oranında izole edilmiştir (Qureshi ve ark., 2005). Sebzeler üzerine yapılan bu çalışmada antibiyogram doğrulama aşamasında ortaya çıkan bu direnç türü için literatürlere bakıldığında, sebzelerden izole edilen *S. maltophilia* izolatlarında MBL direncine fazla değinilmediği görülmektedir. Fakat klinik olarak incelenen örnekler göz önüne alındığında sebzelerde bulunabilen bu suşunda aynı şekilde direnç kazanabilmesi olasıdır. Bu çalışmada; MBL direncini tespit etmek için gerekli metotlardan biri olan ve CLSI tarafından belirtilen Modifiye Hodge yöntemini uygulanmadığı için, bu sonuçlar tartışmalı olabilmektedir.

Yine bu çalışmada; bir adet *E. coli* suşunda AmpC beta laktamaz direnci tespit edilmiştir. Araştırmalarda; sebzelerde bulunabilecek AmpC beta laktamaz direncine bakıldığında *Enterobacteriaceae* familyasına ait *Citrobacter* ve *Enterobacter* türlerinin AmpC üretimi yapabildiği, özellikle de önemli bir fekal bakteri olan ve AmpC üreten *E. coli*'nin sebzelerden izole edilebildiği görülmektedir

(Blaak ve ark., 2014; Van Hoek ve ark., 2015; Njage ve Buys, 2015). Yapılan çalışmalar ile karşılaştırıldığında, analizlerin son aşamasında yer alan antibiyogram doğrulama kısmında rastlanan AmpC dirençli *E. coli* suşunun benzerlik gösterdiği ve aynı zamanda çalışmalarda görüldüğü gibi GSBL ve AmpC'ye karşı multidirenç gösterebildiği belirlendi.

Giderek artan bir sorun haline gelen çoklu direnç, günümüzde *Enterobacteriaceae* suşlarında görülmekte, farklı antibiyotik gruplarına karşı direnç mekanizmaları geliştirerek ve yayılımlar göstermektedirler (Murray ve ark., 2005; Gilbert ve ark. 2007; www.eucast.org, 2013). Çoklu direnç genellikle, değişik direnç mekanizmalarının genetik determinantlarını taşıyan plazmit ve transpozonların alınmasının bir sonucu olarak ortaya çıktığı bildirilmektedir (Gür, 1999; Pechere ve Köhler, 1999). Böylece, antibiyotiğe dirençli bakteri genleri kolayca fırsatçı patojenlere transfer edilebilir. Bu transfer ilk olarak marul (Bezanson ve ark., 2008) ve ispanakta (Waila ve ark., 2013) bulunan bakterilerin, GSBL genleri tarafından kodlanan ampisilin direnci ile ortaya konmuştur. Çoklu direncin sebeplerinden bir diğeri ise; aktif efluks pompalarıdır ve son yıllarda yapılan çalışmalar bu mekanizmaya odaklanmıştır (Ruzin ve ark., 2010; Coyne ve ark., 2011; Fernando ve Kumar, 2012).

Son yıllarda insan sağlığına olumlu etkileri ile tüketimi artan çiğ sebzeler, diyetlerde başta kalp rahatsızlıkları olmak üzere, obezite ve diyabet gibi hastalıkların tedavi süreçlerinde ana gıdalardan biri olarak kullanılmaktadır. Birçok gıdada olabileceği gibi sebzelerde de bulunan bakterilerdeki antimikrobiyal dirençliliğin önüne geçebilmek amacı ile Türkiye ve Dünya'da yapılan çalışmalar daha geniş yankı oluşturmalı ve insan sağlığına karşı antibiyotiklerin oluşturdukları olumsuz etkilerin azaltılması hedeflenmelidir.

Bu çalışmada; sebze örneklerinden izole edilen enterik bakterilerin fenotip yöntemler kullanılarak beta laktamlara karşı oluşturdukları direnç tespit edildi ancak yeterli olmayacağı öngörülerek bu yöntemlere ek olarak VITEK MS ile tiplendirmesi ve son olarakta antibiyogram doğrulama ile MİK değerleri tespit edildi.

Sonuç olarak; bu çalışmada GSBL üreten enterik bakteriler saptandı ve bunların yurt dışı literatürleri ile de benzerlikler gösterdiği belirlendi. Bu bakteriler

sadece klinik veya toplumsal kökenli olmayıp, gıdalardan (çiğ tüketilen sebzelerden) da kaynaklanabildiği ve ayrıca tüketimi ile insan organizmasına geçebilme olasılığının da olduğu unutulmamalı ve bu tip bakterilerin kontaminasyonları engellenmeli veya minimum seviyeye indirgenmelidir. Sağlıklı yaşamada, özellikle antibiyotiklere karşı oluşan dirençlerin önlenmesi amacıyla, potansiyel direnç kaynağı olabilecek sebzelerin kontrol altında tutulması için; hayvancılık sektörünün ve aynı zamanda ürün bazında tüm girdilerin sıkı denetimlere tabi tutulması gerekmektedir. Sebzelerde kullanılan gübrelerin alındığı çiftliklerdeki besi hayvanlarında kullanılan antibiyotiklerin miktarı, buna bağlı olarak gübrelerin içeriğinde bulunan GSBL üreten enterik bakterilerin varlığı ve sebzelere verilen su kaynaklarının temizliği gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından son derece önemli olduğu kanaatini taşımaktayız.

KAYNAKÇA

- Ahmet Z., Houang E., Hurley R.** 1995. Pyrolysis mass spectrometry of cephalosporin-resistant *Enterobacter cloacae*, *J Hosp Infect* 31:99
- Akalın, H. E.** 1994. Antibiyotiklere Direnç Gelişmesi ve Antibiyotik Kullanımı (H. E. AKALIN Editör). Klinik Uygulamalarda Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar. Güneş Kitabevi Limitet Şirketi. Ankara, s.38–39.
- Akalın H. Doğanay M., Unal S.** 2003. Coğul dirençli Gram negatif bakteriler. Hastane enfeksiyonları Bilimsel tıp Yayınevi; 269-287.
- Aktaş AE, Yiğit N, Kayserili F, Ayyıldız A.** 2009. *Pseudomonas* ve *Acinetobacter* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları ve metallo-beta-laktamaz üretiminin araştırılması, *İnfeksiyon Derg*; 23(2):57-62.
- Aktuğlu, Y.** 1997. Giriş ve Genel Bilgiler Ed: Aktuğlu Y. Pratikte Antibiyotik Kullanımı. Sempozyum Dizisi Yayın, 1: 11-53.
- Ambler RP.** 1980. The structure of β -lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci.*; 289: 321–331
- Anonim 1.** The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing “www.eucast.org” erişim tarihi: 2015
- Anonim 2,** Antibiyotik Kullanımı. Enfeksiyon Kontrol Komitesi Yayını, Ankara Gata Basımevi, No.3
- Anonim 3,** Low G+C Gram Positive Bacteria, Cornell University, Department of Microbiology “https://micro.cornell.edu/research/epulopiscium/low-g-and-c-gram-positive-bacteria” erişim tarihi: 16.08.2015
- Anonim 4,** Enzyme reaction mechanisms of bacterial mono-ADP-ribosyltransferase family, “http://www.chembio.uoguelph.ca/merrill/research/enzyme_mechanisms.html” erişim tarihi: 27.01.2014
- Andes DR, Craig WA.** 2005. Cephalosporins. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (eds). Principles and Practice of Infectious Diseases. Sixth edition, Pennsylvania: Elsevier Churchill Livingstone Inc:294-311.
- APHA Technical Committee on Microbiological Methods for Foods.** 2001. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 4th ed. APHA, Washington, D.C.
- Aycicek H, Oguz U ve Karci K.** 2006. Determination of total aerobic and indicator bacteria on some raw eaten vegetables from wholesalers in Ankara, Turkey. *Int J Hyg Environ Health*. Mar;209(2):197-201.
- Ayliffe, G.A.,** 1997. The progressive intercontinental spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Infect Dis* 24(Suppl 1):S74-9
- Ayyıldız A, Kocazeybek B, Arıtürk S.** 2002. Değişik klinik örneklerden izole edilen *Acinetobacter* ve *Pseudomonas* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları, *ANKEM Derg*;16(1):1-3.
- Bagley, S.T.,** 1985, Habitat association of *Klebsiella* species. *Infect. Control* 6, 52-58
- Bağcı U., Toğay S.Ö., Temiz A.** 2008. Çiğ Tüketilen Sebzelere Uygulanan Yüzeysel Dekontaminasyon Yöntemleri, Türkiye 10. Gıda Kongresi; 21-23 Mayıs, Erzurum

- Banerjee G, Ayyagari A., Prasad K.N., Dhole T.N., Singh S.K.** 1996. Nosocomial infection due to *Enterobacter cloacae* in tertiary care hospital in northern India, *Indian J Med Res* 103:58
- Barroso H, Freitas VA, Lito LM.** 2000. Survey of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases at a Portuguese hospital: TEM-10 as the endemic enzyme. *J Antimicrob Chemother*; 45: 611-6.
- Bauernfeind A, Stemplinger I.** 1996. Characterization of beta-lactamase gene blaPER-2, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*; 40: 616-20.
- Baylis, C.L.** 2006. Enterobacteriaceae. In *Food spoilage microorganisms*, Blackburn C. deW. (Ed), Cambridge, Woodhead Publishing Ltd.
- Bayraktar K.** 1970, Sebze Yetiştirim – II AÜ. ZF Yay. No 169. Ankara
- Bezanson G. S., MacInnis R., Potter G., Hughes T.** 2008. Presence and potential for horizontal transfer of antibiotic resistance in oxidase-positive bacteria populating raw salad vegetables. *International Journal of Food Microbiology*.;127(1-2):37–42. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2008.06.008.
- Bilgehan H.** 2000. Klinik mikrobiyoloji- Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 10. baskı: sayfa 3-17,59-69
- Blaak H. , Hoek A.H.A.M. , Veenman C., Leeuwen A.E.D., Lynch G., Overbeek W.M., Roda Husman A.M.** 2014. Extended spectrum β – lactamase – and constitutively AmpC-producing Enterobacteriaceae on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology* 168-169 (2014) 8-16, The Netherlands
- Bradford PA.** 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21 st century: Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clin Microbial Rev*; 14: 933-51.
- Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projak SJ, Rahal JJ, Bush K.** 1997. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1 a plasmid mediated AmpC beta-lactamase and the loss of an outer membrane porin. *Antimicrob Agents Chemother*;41:563-9.
- Brenner DJ, Grimont PA, Steigerwalt AG, Fanning GR, Ageron E, Riddle CF.** 1993. Classification of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genospecies. *Int J Syst Bacteriol*;43:645-658. **Brenner DJ, O'hara CM, Grimont PA, Janda JM, Falsen E, Aldova E, Ageron E, Schindler J, Abbott SL, Steigerwalt AG.** 1999. Biochemical identification of *Citrobacter* species defined by DNA hybridization and description of *Citrobacter gillenii* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genospecies 10) and *Citrobacter murliniae* sp. nov. (formerly *Citrobacter* genospecies 11). *J Clin Microbiol*;37:2619-2624.
- Bryson HM, Brogden RN.** 1994. Piperacillin/tazobactam: a review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential. *Drugs*;47:506-535.
- Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA.** 1995. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*;39:1211-33.
- Bush K.** 1998. Metallo-beta-lactamases: A Class Apart. *Clin Infect Dis*;(Suppl1):S48-53.

- Bush K.** 2001. New β -lactamases in gram-negative bacteria, diversity and impact on selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*;32:1085-9.
- Bush K, Fisher JF.** 2011. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from Gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*; 65: 455-478.
- Canton R, Morosini MI, de la Maza OM, de la Pedrosa EG.** 2008. IRT and CMT beta lactamases and inhibitor resistance. *Clin Microbiol Infect*; 14: 53-62.
- Chakraborty D., Basu S. and Das S.** 2010. A Study on Infections Caused By Metallo Beta Lactamase Producing Gram Negative Bacteria in Intensive Care Unit Patients. *American Journal of Infectious Diseases* 6 (2): 34-39.
- Chambers, F.H.,** 2001. Goodman LS, Gilman A. Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics 10th edition. The McGraw-Hill Company, USA. Antimicrobial Agents. 1143-1169.
- Chen, H., Shu, W., Chang, X., Chen J.A., Guo, Y., Tan, Y.,** 2010. The profile of antibiotics resistance and integrons of extended- spectrum beta lactamase producing thermotolerant coliforms isolated from the Yangtze River basin in Chongqing. *Environ. Pollut.* 158,2459-2464.
- Chen HD, Frankel G.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: Unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev*; 29 (1): 83-98.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)/NCCLS.** 2005. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, Fifteenth Informational Supplement, M2-A8 and M7-A6, Vol.25, No.1, CLSI, Wayne, Penn.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)** (Çeviri editörü D Gür), 2009. Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları, Ondokuzuncu Bilgi Eki, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara .
- Clinical Laboratory Standards Institute,** 2009. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty first informational supplement. M100-S21. Wayne, Philadelphia.
- Clinical and Laboratory Standards Institute,** 2011 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-first Informational Supplement, CLSI Document M100-S20, CLSI, Wayne PA.
- CLSI,** (2013). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty – Third Informational Supplement, CLSI Document M100-S23, CLSI, Wayne PA.
- Cohen, ML.,** 1992. Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era. *Science.* 257:1050-5.
- Cooke, E. M.,** 1970. Shooter, R. A., Kumar, P. J., Rousseau, S.A.& Foulkes, A.L. Hospital food as a possible source of *Escherichia coli* in patients. *Lancet* 28,436-7
- Cooke, E. M., Sazegar, T., Edmonson, A.S., Brayson, J.C.& Hall, D.** 1980. *Klebsiella* species in hospital food and kitchens: a source of organisms in the bowel of patients. *Journal of Hygiene* 84,97-101.
- Coyne S, Courvalin P, Périchon B.** 2011. Efflux-mediated antibiotic resistance in *Acinetobacter* spp., *Antimicrob Agents Chemother*;55(3):947-53.
- Çağlayanlı A., Sümerkan B., Doğanay M.:** 1997. Enterobakter sepsisi: 35 olgunun klinik ve mikrobiyolojik özellikleri, *Flora* 2:91.

- Çelebi H., Sponza D.** 2007. Antibiyotiklerin çevresel etkileri, toksisiteleri ve anaerobik arıtılabilirlikleri, 7. Ulusal Çevre Mühendisliği Kongresi, pp367-373, 24-27 Ekim, İzmir.
- Daoud Z, Moubareck C, Hakime N.** 2006. Extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in Lebanese ICU patients: Epidemiology and patterns of resistance. *J Gen Appl Microbiol*; 52: 169-178.
- Dağlar D., Öngüt G.,** 2012. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve Tanı Yöntemleri, İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi; 1: 1-9.
- Dbaibo GS.** 2000. Old and new targets of antibacterial therapy. *Leb Med J*;48:177-81.
- Dhanji, H., Murpy, N.M., Akhigbe, C., Doumith, M., Hope R., Livermore, D.M., Woodford, N.,** 2011. Isolation of fluoroquinolone- resistant O25b:H4-ST131 Escherichia coli with CTX-M-14 extended- spectrum beta-lactamase from UK river water. *J. Antimicrob. Chemother.* 66,512-516.
- Eliopoulos, G. M.,** 1992. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial drugs. In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow N, eds. Infectious Diseases. Philadelphia: WB Saunders Co. 280-6.
- 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* 2010; 48(12): 4417-25.
- Erdem B, Ustacelebi Ş.** 1999. *Enterobacteriaceae*, Temel ve Klinik mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 1. baskı: sayfa 471-515
- Falagas ME, Bliziotis IA.** 2007. Pandrug-resistant Gram-negative bacteria: the dawn of the post antibiotic era *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 630-636. **Gilbert DN, Moellering RC, Eliopoulos GM, Sande MA.** 2007. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy 2007. 37th Edition, Sperryville, VA, USA
- Gootz TD, Jackson DB, Sherris JC.** 1984. Development of resistance to cephalosporins in clinical strains of Citrobacter sp. *Antimicrob Agents Chemother* 1984;25: 591-595.
- Gülay Z.** 2001. Antibiyotiklere Direnç Mekanizmaları ve Çözüm Önerileri: Beta-Laktamlara ve Karbapenemlere Direnç, Hasta İnfeksiyonları Dergisi, İzmir 2001-5-3-210-22
- Gülay Z.,** 2003. Hücre Duvar Sentezini Etkileyen Antibakteriyeller, ANKEM Derg. 17 (No. 3): 192-204.
- Gülay Z. Ünal S, Vahaboğlu H, Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ (eds).** 2004. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.
- Gür D.** 1997. Beta-laktamazlar. *Flora Dergisi* 1997; 2:3-18.
- Gür D.** 1997. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1997;1:38-45.
- Gür D.** 1999. Hastane infeksiyonu etkeni gram-negatif nonfermentatif basiller ve antibiyotiklere direnç sorunu. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1999;3:33-9.
- Gür D.** 2004. ESBL'ların Genel Özellikleri ve ESBL Tipleri. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.

- Gurler Z, Pamuk I, Yildirim Y, Ertas N.** 2015. The microbiological quality of ready-to-eat salads in Turkey: a focus on *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* Mar 2;196:79-83.
- Halling-Sorensen B., Nors Nielsen S., Lanzky P. F., Ingerslev F., Holten Lützhof H.C. and Jorgensen S.E.** 1998. Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review, *Chemosphere*, 36, 2, 357-393.
- Hartl, D.L., Dykhuizen D.E.,** 1984, The population genetics of *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* 18, 31-48
- Hartmann A., Locatelli A., Amoureux L., Depret G., Joliet C., Gueneau E., Neuwirth C.** 2012. Occurrence of CTX-M producing *Escherichia coli* in soils. Cattle, and farm environment in France (Burgundy region). *Front. Microbiol.* 3,83
- Hewitt W,** 1984. The third generation cephalosporins, "J S Remington, M N Swartz (eds): *Current Clinical Topics in Infectious Diseases, Vol 4*" _kitabında s. 403, McGraw-Hill Book Co, New York.
- Ho PL, Wong RC, Chow KH, Yip K, Wong SS, Que TL.** 2008. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. *J Microbiol Immunol Infect* 2008;41:428–32.
- Huber, T.W.** 2000. *Enterobacter*. In *Encyclopedia of Food Microbiology*. 598-603. (RK Robinson, CA Batt, PD Patel eds). Academic Press, NY.
- ILSI (International Life Sciences Institute),** 2011. The Enterobacteriaceae and Their Significance to the Food Industry, 2011/10.996/30
- Iversen, C. and Forsythe, S.J.** 2003. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends in Food Science and Technology*, Vol. 14, pp. 443–454.
- Jacoby GA.** 1994. Genetics of extended-spectrum betalactamases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; 13(1): 2-11.
- Jacoby G, Bush K.** Lahey clinic page on amino acid sequence for TEM, SHV and OXA extended spectrum and inhibitor resistant beta-lactamases. "<http://www.lahey.org/Studies>"
- Jawetz, E., Melnick, J. L., ve Adelberg, E. A.,** 1995. *Medical Microbiology*. East Norwalk, CT: Appleton & Lange, 137-67.
- Jorgensen S.E., Halling-Sørensen B.** 2000. Drugs in the environment. *Chemosphere* 40, 691–699.
- Jorgensen, J.H., et al.** 2015. *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed. American Society Microbiology, Washington, D.C.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematic Bacteriology.** 1993. Opinion 67. Rejection of the name *Citrobacter diversus* Werkman and Gillen 1932. *Int J Syst Bacteriol* 1993;43:392.
- Kang CI, Cheong HS, Chung DR, Peck KR, Song JH, Oh MD, et al.** 2008. Clinical features and outcome of community-onset bloodstream infections caused by extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008;27:85–8.
- Kaçmaz B, Ece G.** 2010. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz saptanmasında ikinci, üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlerin çift disk sinerji testinde kullanılması ve sefoksitin duyarlılığı, *ANKEM Derg* 2010;24(2):61-4.

- Kemper N.** 2008. Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecological Indicators*, 8, 1-13.
- Kennedy D.G., Cannavan A. and McCracken R. J.** 2000. Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *J. Chromatogr.* 882, 37-52.
- Kıvanç M.,** 2011. Erzurum’da Çiğ Olarak Yenilen Çeşitli Sebzeler ile İçme Sularından İzole Edilen *Escherichia Coli* Suşlarının Değişik Özellikleri Üzerinde Araştırmaları, Atatürk Üniversitesi, Doktora Tezi, Erzurum
- Kim, J., Kang, H.y., Lee, Y.** 2008. The Identification of CTX-M-14,TEM-52, and CMY-1 enzymes in *Escherichia coli* isolated from the Han River in Korea. *J. Microbiol.* 46,478-481
- Kizirgil A, Demirdag K, Ozden M, Bulut Y, Yakupogullari Y, Toraman ZA.** 2005. In vitro activity of three different antimicrobial agents against ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* blood isolates, *Microbiol Res* 2005;160(2):135-40. **Khosravi AD, Mihani F.** Detection of metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008;60(1):125-8.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Jonda, W. M., Schreckenber., P. C., and Winn W.C., JR.,** 1997. *Enterobacteriaceae*, Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 5thed., Lippincott Company, Philadelphia, Newyork, 171.
- Kotra LP, Samama J, Mobashery S.** 2002. Beta-lactamases and resistance to beta-lactam antibiotics. In: Lewis K, Salyers AA, Taber HW,Wax RG, eds. *Bacterial resistance to antimicrobials*. New York: Marcel Decker, 2002: 123-60.
- Laupland KB, Church DL, Vidakovich J, Mucenski M, Pitout JD.** 2008. Community-onset extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli*: importance of international travel. *J Infect* 2008;57:441–8.
- Lawson J M.** 2004. Update on *Escherichia coli* O157:H7. *Curr Gastroenterol Rep* 2004; 6 (4): 297-301.
- Lee K, Chong Y, Shin HB, ve ark.** 2001. Modified Hodge test and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-B-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001;7: 88-91.
- Livermore D.D.** 1995. Beta- lactamases in laboratory and clinical resistance, *Clin Microbiol Rev* 8: 557.
- Livermore DM.** 1997. β -lactamases: Quantitiy and resistance. *Clin Microbiol Infect* 1997;3(Suppl 4):10-19.
- Livermore D.** 2007. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(2): 165-74.
- Lu, S.Y., Zhang, Y.L., Geng, S.N., Li T.Y., Ye, Z.M., Zhang D.S., Zou, F., Zhou, H.W.,** 2010. High diversity of extended- spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Appl. ENVIRON. Microbiol.* 76,5972-5976.
- MacFaddin, J.F.** 1985. *Media for Isolation, Cultivation, Identification, Maintenance of Bacteria* , Vol. I. Williams & Wilkins, Baltimore, MD.
- Machado, E., Coque, T.M., Canton, R., Sousa, J.C., Silva, D., Ramos, M., Rocha, J., Ferreira, H., Peixe, L,** 2009. Leakage into Portuguese aquatic environments of extended-spectrum- beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *J. Antimicrob. Chemother.* 63,616-618.

- Mackie, R.I., White, B.A. & Isaacson, R.E.** 1997. *Gastrointestinal Microbiology: Gastrointestinal Microbes and Host Interactions*, vol.2. Cahpman &Hall, New York
- Malouin F, Bryan LE.** 1986. Modification of penicillin-binding proteins as mechanisms of beta-lactam resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1986;30:1-5.
- Marshall SA, Aldridge KE, Allen SD, Fuchs PC, Gerlach EH, Jones RN.** 1995. Comparative antimicrobial activity of piperacillin-tazobactam tested against more than 5000 recent clinical isolates from five medical centers: a reevaluation after five years. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1995;21:153-168.
- Mayer, K. H., Opal, S. M., and Medeiros, A. A.,** 1995. Mechanisms of antibiotic resistance. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*. Fourth ed. New York: Churchill Livingstone, 212-25.
- Medeiros AA.** 1997. β -lactamases: Quality and resistance. *Clin Microbiol Infect* 1997;3(Suppl 4):4S2-4S9.
- Mercuri P.S., Ishii Y., Ma L., Rossolini G.M., Luzzaro F., Amicosante G., Franceschini N., Frere J.M., Galleni M.** 2002. Clonal diversity and metallo-beta-lactamase production in clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Microb Drug Resist.* Fall;8(3):193-200.
- Meyers B.R.** 1987. Bacterial resistance: Exploring the facts and myths, *Bull NY Acad Med* 63:211.
- Mirelis B, Navarro F, Miro E, Mesa RJ, Coll P, Prats G.** 2003. Community transmission of extended-spectrum beta-lactamase. *Emerg Infect Dis* 2003;9:1024–5.
- Mossel, Vissar, and Cornellisen.** 1963. *J. Appl. Bacteriol.* 26:444.
- Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA.** 2005. *Medical Microbiology* 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania USA.
- Najafi M.H.B. ve Bahreini M.** 2012. Microbiological Quality of Mixed Fresh-Cut Vegetable Salads and Mixed Ready- to-Eat Fresh Herbs in Mashhad, Iran. *International Conference on Nutrition and Food Sciences IPCBEE* vol. 39.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards.** 2001. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 11th informational supplement M100-S11; Villanova, Pa.
- Negri MC, Morrossini MI, Blazquez J, Bacquero F.** 2000. Antibiotic resistance in hospital infections: The role of newer cephalosporins. *Clin Microb Infect* 2000;6(Suppl 3):95-7.
- Neu H C.** 1984. Changing mechanisms of bacterial resistance, *Am J Med* 77:11.
- Nikaido H.** 1987. Cell membrane and antibiotic characteristics and interactions, *Proceedings of a Symposium on Antibiotic Resistance and Cross- resistance*, s.17, Merck and Co Inc, West Point.
- Nikaido, H.,** 1994. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 264:382-8.
- Njage PM, Buys EM.** 2015. Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC β -lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microb Biotechnol.* May;8(3):462-73.
- 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* 1993; 37: 962–9.
- Nordmann P, Naas T.** 1994. Sequence analysis of PER-1 extended spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and comparison with class A beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38: 104-14.

- Nordmann P, Poirel L.** 2002. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002;8:321-33.
- Odigie I. E., Akinbo B.D., Atere A.D., Idemudia N.L., Asuquo A.** 2015. Antimicrobial Susceptibility Of Some Members Of Enterobacteriaceae Isolated From Salad Vegetables In Calabar. *New York Science Journal* 2015;8(2).
- Oraman, M. N.** 1970, Sebze İlimi. AÜ. ZF Yayın No 323.
- Öncül, O.,** 2002. Antibiyotikler I.İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinlerde toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyumu, 31: 23-28.
- Özpinar H, Turan B, Tekiner IH, Tezmen G, Gökçe I, Akıneden O.** 2013. Evaluation of pathogenic *Escherichia coli* occurrence in vegetable samples from district bazaars in Istanbul using real-time PCR. *Lett Appl Microbiol.* Oct;57(4):362-7.
- Öner, M.,** 1992. Genel Mikrobiyoloji, Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi, İzmir, 94: 231- 245.
- Page MI.** 2002. Understanding metallo-beta-lactamases. *ASM News* 2002;68: 217-21.
- Palabıyıkoglu İ, Bengisun JS.** 1999. Yoğun bakım ünitesi ve diğer unitelerde yatan hastalardan izole edilen nozokomiyal *A.baumannii* suşlarının İn vitro antibiyotik duyarlılıkları. *Hastane İnfeksiyonları Dergisi* 1999;2:107-10
- Patel JB, Rasheed JK, Kitchel B.** 2009. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. *Clin Microbiol Newsletter* 2009; 31(8): 55-62.
- Paterson DL.** 2006. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Med* 2006; 119: 20-28.
- Pécherre JC, Köhler T.** 1999. Patterns and modes of β -lactam resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect* 1999;5(Suppl 1):15-8.
- Pingulkar K, Komat A, Bongirwar D.** 2001. Microbiological quality of fresh leafy vegetables, salad components and ready-to-eat salads: an evidence of inhibition of *Listeria monocytogenes* in tomatoes. *Int.J. Food Science and Nutrition.* 52, 15-23.
- Poirl 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* 1999; 43: 573-81.
- Qureshi A., Mooney L., Denton M. ve Kerr K.G.** 2005. *Stenotrophomonas maltophilia* in Salad. *Emerg Infect Dis.* Jul; 11(7): 1157–1158.
- Rahal JJ.** 2000. Extended spectrum β -lactamases; how big is the problem. *Clin Microbiol Infect* 2000; 6 (Suppl 2):2-6.
- Ranjan KP ve Ranjan N.** 2013. *Citrobacter*: an emerging health care associated urinary pathogen. *Urol Annals* 2013;5;313-314.
- Rasmussen BA ve Bush K.** 1997. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1997;41: 223-32.
- Raphael E., Wong L.K. ve Riley L.W.** 2011. Extended-Spectrum Beta-Lactamase Gene Sequences in Gram-Negative Saprophytes on Retail Organic and Nonorganic Spinach. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1601–1607 Vol. 77, No. 5
- Renaud, F., Freney, J., Gavini, F. Boeufgras, J.M., Fleurette, J.,** 1990. Comparaison de deux systemes d'identification d'enterobacteries coliformes nouvellement decrites ou rarement rencontrees en clinique, *Ann. Biol. Clin.* 48,111-115.

- Reuland E. A., Naiemi N. al, Raadsen S. A., Savelkoul P. H. M., Kluytmans J. A. J. W., Vandenbroucke-Grauls C. M. J. E.,** 2014. Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables, Eur J Clin Microbiol Infect Dis 33:1843–1846
- Richter A., Löscher W., Witte W.** 1996. Leistungsförderer mit antibakterieller Wirkung: Probleme aus pharmakologisch toxikologischer und mikrobiologischer Sicht. Prakt. Tierarzt 7, 603–624.
- Rico H., Gozalbo D., Sebastia C. ve Falomir P.** Enterobacter Cloacae in Fresh Vegetables: A Potential Carrier of Antibiotic Resistances to Consumers. An Interdisciplinary Journal, Volume 2, Issue 3, pp.1-7.
- Roy C, Foz A, Segura C, Tirado M, Fuster C, Reig R.** 1983. Plasmid-determined identified in a group of 204 ampicillin-resistant *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother 1983; 12: 507-10.
- Ruimy R. , Brisabois A., Bernede C., Skurnik D., Barnat S., Arlet G., Momcilovic S.,Elbaz S., Moury F., Vibet M.A.,Courvalin P., Guillemot D. and Andremont A.,** 2010. Organic and conventional fruits and vegetables contain equivalent counts of Gram-negative bacteria expressing resistance to antibacterial agent, Environmental Microbiology 12(3), 608–615
- Ruzin A, Immerman FW, Bradford PA.** RT-PCR and statistical analyses of adeABC expression in clinical isolates of Acinetobacter calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex, Microb Drug Resist 2010;16(2):87-9.
- Samaha-Kfoury J. N, Araj G. F.** 2003. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases, V. 327,2003
- Sanders CC.** 1992. Beta lactamases of gram-negative bacteria: New challenges for new drugs. Clin Infect Dis 1992;14:1089-99.
- Sanders W.E., JR.,and Sanders C.C.** 1997. Enterobacter spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. Clinical Microbiology Reviews, Apr. 1997, p 220-241
- Schauer DB, Zabel BA, Pedraza IF, O'hara CM, Steigerwalt AG, Brenner DJ.** 1995. Genetic and biochemical characterization of Citrobacter rodentium sp. nov. J Clin Microbiol 1995; 33: 2064-2068.
- Schwaiger K., Helmke K., Hölzel C.S., Bauer J.** 2011. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket), International Journal of Food Microbiology 148 (2011) 191–196
- Schilling O., Vogel A., Kostelecky B., Natal Da Luz H., Spemann D., Spath B., Marchfelder A., Tröger W. and Meyer-klaucke W.** 2005. Zinc- and iron-dependent cytosolic metallo-β-lactamase domain proteins exhibit similar zinc-binding affinities, independent of an atypical glutamate at the metal-binding site. Jan 1;385(Pt 1):145-53.
- Scott, E.,Bloomfield, S.F. &Barlow, C. G.** 1982. An Investigation of microbial contamination in the home. Journal of Hygiene 89, 279 – 93
- Sirot D.** 1995. Extended-spectrum plasmid mediated beta lactamases. J Antimicrob Chemother 1995; 36: 19-34.
- Skočková A, Karpíšková R, Kolářková I, Cupáková Š.,** 2013. Characteristics of Escherichia coli from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. Int J Food Microbiol. Oct 15;167(2):196-201.
- Soriano, J.M., Rico, H., Molto, J.C. and Manes, J.,** 2000. Assesment of the microbiological quality and wash treatments of lettuce served in university restaurants, Internaional Journal of Food Microbiology, 58, 123-128.

- Sorrells, K. M., M. L. Speck, and J. A. Warren.** 1970. Pathogenicity of *Salmonella gallinarum* after metabolic injury by freezing. *Appl. Microbiol.* 19:39-43.
- Spratt BG.** 1989. Resistance to beta lactam antibiotics mediated by alterations of penicillin-binding proteins. In: Bryan LE (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin: Springer-Verlag, 1989:77-100.
- Stratton CW.** 2000. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *Leb Med J* 2000; 48:186-98.
- Strohl, W. A., Rouse, H., ve Fisher, B. D.,** 2006. Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology (R. A. HARVEY ve P. A. CHAMPE editör). Nobel Tıp Kitapevleri, 516:44-47.
- Stürenburg E ve Mack D.** 2003. Extended spektrum beta lactamases: Implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. *J Infect* 2003; 47: 279-95.
- Taban BM, Aytac SA, Akkoc N, Akcelik M.** 2013. Characterization of antibiotic resistance in *Salmonella enterica* isolates determined from ready-to-eat (RTE) salad vegetables. *Braz J Microbiol.* Oct 30;44(2):385-91.
- Tacao, M., Correia, A., Henriques, I.,** 2012. Resistance to broad-spectrum antibiotics in aquatic systems: anthropogenic activities modulate the dissemination of bla_{CTX-M}- like genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78,4134-4140.
- Tamilselvi AE Govindasamy Muge sh.** . 2008. Zinc and antibiotic resistance: metallo-b-lactamases and their synthetic analogues. *J Biol Inorg Chem* (2008) 13:1039–1053.
- Taormina, P.J. and Beuchat, L.R.,** 1999. Comparison of chemical treatments to eliminate enterohemorrhagic *Esherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds, *Journal of Food Protection*, 62, 4, 318-324.
- Tenover, F. C., and Hugles, J. M.,** 1996. The challenges of emerging infectious diseases development and spread of multiply resistant bacterial pathogens. *JAMA*, 275: 300-4.
- Teuber M.**1999. Spread of antibiotic resistance with foodborne pathogens, *Cell. Mol. Life Sci.*, 56, 755–763.
- Topçu A.W., Söyletir G., Doğanay M.** 2008. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri. s2136-2147
- Töreci K.** 2002. “*Escherichia turleri*” Ayşe Willke Topcu, Guner Soyletir, Mehmet Doğanay, infeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Nobel tıp kitapevleri, cilt 2,: sayfa 1564-1574
- Tyler, H.L., Triplett, E.W.,** 2008. Plants as a habitat for beneficial and /or human pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 53-73
- Ulusoy, S.,** 1999. Antibiyotikler. *Solunum Sistemi Enfeksiyonları.* Toraks Dergisi, 125-163.
- Van Hoek AH, Veenman C, van Overbeek WM, Lynch G, de Roda Husman AM, Blaak H.** 2015. Prevalence and characterization of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae on retail vegetables. *Int J Food Microbiol.* Jul 2;204:1-8.
- Varaiya A., Kulkarni N., Kulkarni M., Bhalekar P. & Dogra J.** 2008. Incidence of metallo beta lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in ICU patients. *Indian J Med Res* 127, April, pp 398-402.

- Viljanen, P. and Boratynski, J.**, 1991. The Susceptibility of Conjugative Resistance Transfer in Gram-negative Bacteria to Physicochemical and Biochemical Agents. *FEMS Microbiology Rev*, 88: 43–54.
- Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P.** 2005. Metallo-beta-lactamases: the quite before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 306-25.
- Walia S., Rana S. W., Maue D., Rana J., Kumar A., Walia S. K.** 2013. Prevalence of multiple antibiotic-resistant Gram-negative bacteria on bagged, ready-to-eat baby spinach. *International Journal of Environmental Health Research*. 2013;23(2):108–118. doi: 10.1080/09603123.2012.708916.
- Werkman CH, Gillen GF.** 1932. Bacteria producing trimethylene glycol. *J Bacteriol* 1932; 23: 167-182.
- WHO**, 2003. Promoting fruit and vegetable consumption around the world. “<http://who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/print.html>” erişim tarihi: 2015
- WHO/FSF/FOS.2.** 1998. Surface decontamination of fruits and vegetables eaten raw:a review.
- WHO**, 2015. Antibiotic resistance: multi-country public awareness survey. ISBN 978 92 4 150981 7.
- Wiedemann Bi Dietz H, Preifle D.** 1998. Induction of β -lactamase in *Enterobacter aerogenes*. *Clin Infect Dis* 1998;27(Suppl 1):42-7.
- Winokur PL, Brueggemann, DeSalvo DL, et al.** 2000. Animal and human multidrug resistant, cephalosporin-resistant *Salmonella* isolates expressing a plasmid-mediated CMY-2 AmpC beta lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2777-83.
- Wright, C., Kominos, S.D. & Yee, R.B.** 1976. *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* recovered from vegetable salads. *Applied and Environmental Microbiology* 31, 453-4
- Yan JJ, Wu JJ, Tsai SH, Chuang CL.** 2004. Comparison of the double-disk, combined disk, and E- test methods for detecting metallo- β -lactamases in Gram negative bacili, *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004; 49(1):5-11.
- Yang Z., Liu W., Cui Q., Niu W., Li H., Zhao X., Wei X., Wang X., Huang S., Dong D., Lu S., Bai C., Li Y., Huang L. ve Yuan J.** 2014. Prevalence and detection of *Stenotrophomonas maltophilia* carrying metallo- β -lactamase blaL1 in Beijing, China. *Front Microbiol*. 2014; 5: 692.
- Zhuo C., Qian Y.S., Xiao G.X.** 2004. Investigation on the antibiotic resistance and risky factors of nosocomial infections caused by *Stenotrophomonas maltophilia*. 2004 Feb;20(1):10-3.
- Zurfluh K., Nüesch-Inderbinena M., Moracha M., Berner A.Z., Hächlera H. ve Stephana R.** 2015. Extended – Spectrum – β – Lactamase – Producing *Enterobacteriaceae* Isolated from Vegetables Imported from the Dominican Republic, India, Thailand, and Vietnam. *Appl Environ Microbiol* 81:3115–3120. doi:10.1128/AEM.00258-15

ÖZGEÇMİŞ



1. GENEL

DÜZENLEME TARİHİ: 20.12.2015
T.C. KİMLİK NO: 23182578860
ADI SOYADI : ÇİĞDEM SÖKMEN
DOĞUM TARİHİ ve YERİ: 21.10.1990 /İSTANBUL
TEL (GSM): 0551 710 74 79
E-POSTA: cigdem_sokmen@hotmail.com

2. EĞİTİM

ÖĞRENİM DÖNEMİ	DERECE	ÜNİVERSİTE	ÖĞRENİM ALANI
2014-2016	Yüksek Lisans	İstanbul Aydın Üniversitesi	Gıda Güvenliği ve Beslenme
2009- 2013	Lisans	İstanbul Aydın Üniversitesi	Gıda Mühendisliği

3. SEMİNERLER VE KURSLAR

- HACCP /ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Standartı – Çukurova Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi 2012
- ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi – Çukurova Üniversitesi Su ürünleri Fakültesi 2012