

T. C.

İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENTEROBAKTERİLERDE
GENİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) VE AMPC DİRENÇLİLİK
DURUMLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aylin ÖZADAM

Y1413.210017

**Gıda Güvenliği ve Beslenme Ana Bilim Dalı
Gıda Güvenliği Programı**

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

MART – 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 Y1413.210017 numaralı öğrencisi Aylin ÖZADAM'ın "PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENTEROKAKTERİLERDE GENİŞ SPEKTRUMLU BETA- LAKTAMAZ(GSBL) VE AMPC DİRENCLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 26.02.2016 tarih ve 2016/06 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından *g. b. h. g.* ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak *kabul* edilmiştir.

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi :10/03/2016

1)Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

2) Jüri Üyesi : Yrd. Doç. Dr. Burcu ÇAKMAK

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

[Handwritten signatures of Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR, Yrd. Doç. Dr. Burcu ÇAKMAK, and Yrd. Doç. Dr. Dilek DÜLGER ALTINER]

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

YEMİN METNİ

Doktora Tezi olarak sunduğum ‘‘Peynir rneklerinden İzole Edilen Enterobakterilerde Geniş Spektrumlu beta-Laktamaz (GSBL) ve AmpC Dirençlilik Durumlarının İncelenmesi’’ adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadar ki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve etik geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. (19.02.2016)

Aylin ÖZADAM

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimi ve tez çalışması süresince her aşamada destek veren ve tecrübeleri ile yol gösteren tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR'a, deneysel aşamalarda yardımlarını aldığım İsmail Hakkı TEKİNER, Çiğdem SÖKMEN, Fatma GÖKALP, Shila VAHABZADEH ve Leila MEHDIZADEHTAPEH'e ve her zaman maddi ve manevi yanımda olan Eşim Fırat ÖZADAM'a teşekkürlerimi sunarım.

19 Şubat 2016

Aylin ÖZADAM

Eşime ve Çocuklarıma

İÇİNDEKİLER

Sayfa

| | |
|--|-----------|
| ÖNSÖZ..... | iv |
| İÇİNDEKİLER | vi |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | viii |
| ÇİZELGE LİSTESİ | x |
| ŞEKİL LİSTESİ..... | xi |
| RESİM LİSTESİ..... | xii |
| ÖZET..... | xiii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1 GİRİŞ ve AMAÇ | 1 |
| 2 GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1 Dünya ve Türkiye'de peynircilik sektörü | 3 |
| 2.2 Süt ve süt ürünleri amaçlı yetiştirilen hayvanlarda antibiyotik kullanımı..... | 4 |
| 2.3 Peynirlerde mikrobiyolojik kalite değerleri..... | 5 |
| 2.4 Enterobacteriaceae familyası ve özellikleri..... | 6 |
| 2.4.1 GSBL- ve Amp- üreten Enterobacteriaceae..... | 7 |
| 2.5 Beta-laktam antibiyotikler ve etki mekanizmaları | 10 |
| 2.6 Direnç gelişimi, tipleri, etki mekanizması ve aktarımı..... | 10 |
| 2.7 Enzimatik inaktivasyon mekanizması ve beta-laktamazlar..... | 13 |
| 2.7.1 Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) | 13 |
| 2.7.2 AmpC- tipi beta-laktamazlar..... | 14 |
| 2.8 GSBL- ve AmpC- üreten Enterobacteriaceae kaynakları | 14 |
| 2.8.1 Klinik ve toplumsal kaynaklı | 14 |
| 2.8.2 Gıda kaynaklı | 16 |
| 2.9 GSBL- ve AmpC- tipi beta-laktamazları tespit yöntemleri..... | 16 |
| 2.9.1 Fenotipik yöntemler | 17 |
| 2.9.2 Genotipik yöntemler..... | 22 |
| 3 GEREÇ ve YÖNTEM | 24 |
| 3.1 Gereç..... | 24 |
| 3.1.1 Referans suşlar | 24 |
| 3.1.2 Kullanılan besiyerleri | 24 |
| 3.1.3 Gıda örnekleri..... | 26 |
| 3.2 Yöntem | 26 |
| 3.2.1 Mikrobiyolojik inceleme | 26 |
| 3.2.2 VİTEK® MS ile tiplendirme | 31 |
| 3.2.3 GSBL- ve AmpC-tipi beta-laktamazlar tarama testleri..... | 32 |
| 4 BULGULAR..... | 39 |
| 4.1 Mikrobiyolojik bulgular | 39 |
| 4.2 GSBL- ve AmpC- tipi beta-laktamazların tarama bulguları | 40 |
| 5 TARTIŞMA VE SONUÇ | 44 |
| KAYNALAR..... | 51 |

| | |
|----------------------|-----------|
| ÖZGEÇMİŞ..... | 58 |
|----------------------|-----------|

SİMGELER VE KISALTMALAR

| | |
|---------------|---|
| AB | : Avrupa Birliği |
| ABD | : Amerika Birleşik Devletleri |
| AMP-C | : Aminopenisilin İnaktive Eden Sefalosporinaz |
| BfR | : Bundesinstitut für Risikobewertung |
| BSAC | : British Society for Antimicrobial Chemotherapy |
| CA-SFM | : Comite de l'Antibiogramme de la Societe Française de Microbiologie |
| CAZ | : Seftazidim |
| CEP | : Sefepim |
| CLA | : Klavulanik Asit |
| CLSI | : Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu |
| CMC | : Sefepim/Klavulanik Asitli |
| COX | : Sefoksitin |
| CPD | : Sefpodoksim |
| CPO | : Sefpirom |
| CTX | : Sefotaksim |
| DIN | : Deutsches Institut für Normung |
| dk | : Dakika |
| EARSS | : European Antimicrobial Resistance Surveillance System |
| EE | : Enterobacteriaceae Ön Zenginleştirme Besiyeri |
| EFSA | : Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi |
| ERT | : Ertapenem |
| ESBL | : Genişlemiş-Spektrumlu-Beta-Laktamaz |
| EUCAST | : European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| FAO | : Gıda ve Tarım Örgütü |
| FDA | : Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi |
| GN | : Gram negatif |
| GP | : Gram pozitif |
| I | : Orta Duyarlı |
| lt | : Litre |
| kob | : Koloni Oluşturan Birim |
| KPC | : <i>K. pneumoniae</i> Sefalosporinaz |
| MBL | : Metallo-Beta-Laktamaz |
| MER | : Meropenem |
| MHA | : Muller Hinton Agar |
| MHB | : Muller Hinton Brot |
| MİK | : Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu |
| MS | : Kütle Spektrometresi |
| MYSTIC | : Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection |
| µl | : Mikrolitre |

| | |
|------------|---------------------------------------|
| µg | : Mikrogram |
| ml | : Mililitre |
| OIE | : Office International des Èpizooties |
| OXA | : Oksasilin |
| PBP | : Penisilin Bağlayan Protein |
| R | : Dirençli |
| S | : Duyarlı |
| WHO | : Dünya Sağlık Örgütü |

ÇİZELGE LİSTESİ

SAYFA

| | |
|--|----|
| Çizelge 2.1: 2008-2014 yılları arası Türkiye peynir üretimi (ton) (Yapraklı ve ark. 2015) | 4 |
| Çizelge 2.2: İngiltere’de veteriner ve beşeri tıp amaçlı kullanılan sefalosporinlerin kullanımı (Soil Association, 2015) | 5 |
| Çizelge 2.3: Tüm peynirler için mikrobiyolojik kalite değerleri | 6 |
| Çizelge 2.4: (A)Avrupa (1997–2004) ve (B)ABD (1999–2004) ülkelerinde GSBL-üreten enterobakterilerin prevalansları (Goossens ve Grabein, 2005) | 8 |
| Çizelge 2.5: (A)Avrupa (1997–2004) ve (B)ABD (1999–2004) ülkelerinde AmpC-üreten enterobakterilerin prevalansları (Goossens ve Grabein, 2005) | 9 |
| Çizelge 2.6: Antibiyotik ajanların etki mekanizmaları (Sommer, 2010) | 12 |
| Çizelge 2.7: Farklı fenotipik yöntemler ve GSBL tespiti performansları (Wiegand ve ark. 2007) | 20 |
| Çizelge 2.8: Başlıca GSBL tanı yöntemleri (Dağlar ve Öngüt, 2012) | 23 |
| Çizelge 3.1: CASO agar formülasyonu | 24 |
| Çizelge 3.2: CASO Brot formülasyonu | 25 |
| Çizelge 3.3: Kromatik GSBL ve AmpC agar formülasyonu | 25 |
| Çizelge 3.4: Mueller Hinton agar formülasyonu | 25 |
| Çizelge 3.5: Mueller Hinton Brot formülasyonu | 25 |
| Çizelge 3.6: Peynir örneklerinin toplandıkları semtler | 26 |
| Çizelge 3.7: <i>Enterobacteriaceae</i> için referans zon çapları ve MİK değerleri (CLSI 2013) | 36 |
| Çizelge 4.1: Kombine disk-difüzyonu doğrulama sonuçları | 40 |
| Çizelge 4.2: Antibiyogram doğrulama MİK bulguları | 41 |
| Çizelge 4.3: GSBL- ve AmpC- pozitif izolatların tür bazında dağılımı | 42 |
| Çizelge 5.1: Antibiyotiğe dirençli bakterilerin hayvanlardan insanlara muhtemel geçiş rotaları (Meral ve Korukluoğlu, 2014) | 45 |

ŞEKİL LİSTESİ

SAYFA

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1: Gram (-) bakteri Hücre Duvarı Yapısı (Orak, 2005)..... | 7 |
| Şekil 2.2: Direnç mekanizmaları (EKMUD)..... | 11 |
| Şekil 2.3: Seleksiyon mekanizması (EKMUD)..... | 11 |
| Şekil 2.4: Beta-laktamazlar ve sınıflandırması (Ghafourian ve ark. 2014)..... | 13 |
| Şekil 2.5: İnvaziv <i>E. coli</i> izolatlarında 3. kuşak sefalosporin direnç yüzdeleri, AB Ülkeleri ve Türkiye, 2012 (THSKB 2015) | 15 |
| Şekil 2.6: İnvaziv <i>K. pneumoniae</i> izolatlarında 3. kuşak sefalosporin direnç yüzdeleri, AB Ülkeleri ve Türkiye, 2012 (THSKB 2015). | 16 |
| Şekil 2.7: Antibiyogram doğrulama ve MİK analizi paneli | 21 |
| Şekil 4.1: GSBL- ve AmpC- pozitif izolatların tipleri | 39 |
| Şekil 4.2: Enterobacteriaceae izolatlarında GSBL- ve Amp- beta laktamazların dağılımı | 42 |
| Şekil 4.3: Beta-laktamazların..... | 43 |
| Şekil 5.1: Enterobacteriaceae familyası ve koliform bakteriler (ILSI Europe, 2011)46 | |

RESİM LİSTESİ

SAYFA

| | |
|---|----|
| Resim 2.1: Kombine disk difüzyon testi sonucu (Drieux ve ark. 2008) | 18 |
| Resim 2.2: Kombine disk difüzyon testi sonucu (Drieux ve ark. 2008) | 19 |
| Resim 2.3: Kombine disk difüzyon testi sonucu (Drieux ve ark. 2008) | 19 |
| Resim 2.4: GSBL pozitif <i>K. pneumoniae</i> E-test sonucu (Drieux ve ark. 2008) | 21 |
| Resim 3.1: Numune hazırlama | 27 |
| Resim 3.2: Hazırlanmış steril Enterobacteriaceae zenginleştirme brotu..... | 28 |
| Resim 3.3: Homojenizasyon..... | 28 |
| Resim 3.4: İnkübasyon | 29 |
| Resim 3.5: Selektif besiyerinde gelişen şüpheli GSBL izolatlar..... | 30 |
| Resim 3.6: Oksidaz testi | 31 |
| Resim 3.7: Dansitometre | 32 |
| Resim 3.8: 0,5 McFarland ayarlanmış süspansiyon okuma sonucu..... | 33 |
| Resim 3.9: GSBL tarama antibiyotik diskler | 34 |
| Resim 3.10: İnkübasyona alınmış Mueller Hinton agara yerleştirilmiş antibiyotik diskler..... | 34 |
| Resim 3.11: Mueller Hinton agara yerleştirilmiş antibiyotik diskler..... | 35 |
| Resim 3.12: Antibiyotik diskler etrafından oluşan zonlar..... | 35 |
| Resim 3.13: Micronaut-S beta-lactamase VII Panelin hazırlanması..... | 37 |
| Resim 3.14: MultiScan spektrometre cihazı ve panelin yerleştirilmesi aşaması | 38 |

PEYNİR ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENTEROBAKTERİLERDE GENİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) VE AMPC DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ

ÖZET

Aşırı ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı mikroorganizmalarda antibiyotik direnci gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Bu durum halk sağlığı açısından ciddi bir risk oluşturmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü bu sorunun önemine işaret etmekte, antibiyotik dirençliliğin yayılış yollarının anlaşılması için Ulusal otoriteleri uyarmaktadır. Antibiyotiklere dirençli bakterilerin başlıca kaynakları klinik ve toplumsal olarak bilinmektedir. Son yıllarda yürütülen epidemiyolojik araştırmalar gıdaların da dirençli bakteriler ve direnç kodlayan genetik elemanların yayılışlarında son derece önemli rolleri olduklarını ortaya koymuştur. Günümüzde, geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikleri inaktif eden beta-laktamaz üreten *Enterobacteriaceae* suşlarında çoklu ilaç direnci gelişimi artan şekilde görülmüştür. Araştırmalar genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL-) yanında aminopenisilin inaktive eden sefalosporinaz (AmpC-) tipi enzimlerin de enterik bakterilerde artış gösterdiğini saptamıştır. Bu *Enterobacteriaceae* suşları yol açtıkları infeksiyonlarda morbidite ve mortalite oranlarını üç kat artırmakta ve tedaviyi neredeyse olanaksız duruma getirmektedirler. Bu nedenle, antibiyotiklere çoklu direnç gösteren gıdalarda bu tip beta-laktamazların tespiti büyük önem taşımaktadır. Bu çalışmada peynir ürünlerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* suşlarında GSBL- ve AmpC- tipi beta-laktamazların varlıklarının incelenmesi amaçlanmıştır. Araştırmada 83 adet peynir örneklerinde ön zenginleştirme, selektif zenginleştirme ve oksidaz testleri uygulanarak mikrobiyolojik inceleme yapılmıştır. Elde edilen toplam 18 adet *Enterobacteriaceae* izolatu Vitek® MS kütle spektrometresi ile tiplendirilmiş ve tür bazında dağılımları %27,8 *Klebsiella pneumoniae*, %27,8 *Hafnia alvei*, %22,2 *Escherichia coli*, %11,2 *Klebsiella oxytoca*, %5,5 *Enterobacter cloacae* ve %5,5 *Citrobacter* spp. olarak belirlenmiştir. Tiplendirilmiş izolatlarda GSBL- ve AmpC-tipi beta-laktamazların karakterizasyonu Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu talimatlarına (CLSI 2013) göre disk difüzyon, disk difüzyon doğrulama ve MİK analizi testleri ile yapılmıştır. İnceleme sonucu 9 adet izolatta GSBL-, 4 adet izolatta GSBL- ve AmpC- kombinasyonu ve 5 adet izolatta AmpC- karakterize edilmiştir. Sonuç olarak, peynir örneklerinde GSBL- ve Amp- tipi beta-laktamazların varlıkları saptanmıştır. Satışa sunulan peynirlerin bu tip beta-laktamazları üreten *Enterobacteriaceae* suşları içerdikleri ve tüketici sağlığı açısından önemli risk teşkil ettikleri tespit edilmiştir. Dünya’da gıda kodeksleri gıdaların mikrobiyal bulaşmalarını kontrol amaçlı standartlar belirlemesine karşın antibiyotiklere dirençli mikroorganizmalardan bahsetmemektedir. Bu nedenle gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından gıda kodekslerine antibiyotiklere karşı dirençli mikroorganizmalarında tesbitinin ilave edilmesi gerekmektedir.

Anahtar kelimeler: *AmpC*, *Antibiyotik direnci*, *beta-laktamaz*, *peynir*, *Enterobacteriaceae*, *gıda güvenliği*, *halk sağlığı*.

INVESTIGATION OF THE RESISTANCE STATUS OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMA (ESBL) AND AMPC IN ENTEROBACTERIACEAE ISOLATED FROM CHEESE SAMPLES

ABSTRACT

The off-label over use of antibiotics results in development of antibiotic resistance in the bacteria. This situation significantly leads to a threat to the public health. The World Health Organization, therefore, has considerably warned the national legal authorities about this emerging issue, including understanding the ways of dissemination of antibiotic resistance. Both the human clinical and community settings are known the major sources of antibiotic resistant bacteria around the World. However, the recently conducted studies have provided that the foods suggest potential pathways for transportation and transfer of resistant bacteria and their resistance-encoding genetic elements across the World. In the present time, beta-lactamase producing Enterobacteriaceae inactivating extended spectrum beta-lactam antibiotics are known to produce multi-drug resistance. The recent studies are indicating that *Enterobacteriaceae* strains have increasingly both a co-existing pattern of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL-) and aminopenicillin inactivating cephalosporinase (AmpC-) type enzymes. Multi-drug resistant enterobacteria associated mortality and morbidity was found to be three-times higher than non-multi-drug resistant enterobacteria by leading to therapeutic failures against infections. Therefore, the detection of foodborne beta-lactamases has gained significant importance for the human health. The objective of this study was to determine ESBL- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cheese samples phenotypically. In this study, a total of 83 cheese samples was examined microbiologically by performing pre-enrichment, enrichment on selective media, and oxidase tests. Based on the microbiological results, a total of 18 isolates, including *Klebsiella pneumoniae* (27.8%), *Hafnia alvei* (27.8%), *Escherichia coli* (22.2%), *Klebsiella oxytoca* (11.2%), *Enterobacter cloacae* (5.5%), and *Citrobacter* spp. (5.5%) was identified by Vitek® MS mass spectrometer. The identified isolates were exposed to phenotypic characterization of beta-lactamase type by conducting disc diffusion, disc diffusion confirmation, and MIC determination tests according to the Guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute. The phenotypic results revealed that the most common beta-lactamase type was determined as ESBL in 9 isolates, followed by ESBL & AmpC in 4 isolates, and AmpC in 5 isolates, respectively. In conclusion, our study showed that the presences of ESBL- and Amp- type beta-lactamases were determined in the Enterobacteriaceae isolated from from cheeses. The sold cheese samples contained multi-drug resistant enterobacteria, and thereby significantly presented a health risk for the consumers. Although microbiological criteria have been considered appropriate to the Food Codex, an inspection for antibiotic-resistant enterobacteria as both food and health safety has not come into force yet all over the World. Thus, antibiotic resistance should be included as a food and health safety parameter in the Food Codex.

Keywords: *AmpC, Antibiotic resistance, Beta-lactamase, Cheese, Enterobacteriaceae, Food safety, Public health.*

1 GİRİŞ ve AMAÇ

Antibiyotikler, mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyon hastalıklarının tedavisinde ve korunmasında kullanılan yaygın kullanılan ilaçlardır. Antibiyotiklerin keşfi ile infeksiyon hastalıklarına bağlı ölüm olayları hızla azalmıştır. Ancak mikroorganizmalar antibiyotiklere karşı direnç geliştirerek yaşamlarını devam ettirmek istemektedirler. Bu şekilde antibiyotiklere karşı direnç kazanan mikroorganizmaların oluşturduğu infeksiyon hastalıklarının tedavisinde günümüzde büyük zorluklar yaşanmaktadır. Antibiyotik direnci gerçekten sadece bu günü değil geleceği de ilgilendiren dünyamızın en önemli sağlık sorunudur. Bu sebeple direnç genlerinin mikroorganizmayı antibiyotiklere karşı nasıl dayanıklı kıldığıının anlaşılması için antibiyotiklerin ve etki mekanizmalarının bilinmesi gerekmektedir (Wang ve ark. 2012).

Antimikrobiyal direnç halk sağlığını ve gıda güvenliğini yakından ilgilendirmektedir. Dirençli bakteriler hayvansal kaynaklı gıdalar yoluyla direkt olarak insana bulaşabilmekte aynı şekilde direnç kodlayan genler bakteri türleri arasında özgün aktarım mekanizmaları yoluyla karşılıklı olarak aktarılabilmektedirler (Laxminarayan ve ark. 2013). Bunun sonucu olarak ortaya dirençli farklı bakteriler çıkmaktadır. Direnç mekanizmalarını anlamak ve yeni türleri tanımlamak konuya geniş perspektiften bakılmasını ve mültidisipliner çalışmaları gerektirmektedir (Ganter ve Stelling, 2011). Uluslararası otoriteler antibiyotik dirençliliğini günümüzde “Biyolojik Tehlike” olarak tanımlamaktadırlar (EFSA 2011; WHO 2013).

Dünya’ da her yıl yaklaşık 175 milyon kişi antibiyotiklere dirençli enterobakterilerin yol açtıkları üriner sistem infeksiyonlarına yakalanmaktadır. Antibiyotiklere karşı en fazla dirençli olan Genişlemiş Spektrumlu beta-Laktamaz(GSBL) içeren Enterobacteriaceae türleridir (Brolund 2014). Aşırı ve sık üçüncü nesil sefalosporinler ve aztreonam kullanımı bu tip enzimleri üreten bakterilerin yayılışlarında etkin roller oynamaktadır (Rice, 2009). Bu patojen suşların beta laktam antibiyotiklere karşı beta-Laktamaz enzimleri üretebilme kabiliyeti kazanmaları en önemli direnç mekanizması olarak bilinmektedir. Geniş Spektrumlu beta-Laktam antibiyotikler hidrolize ederek

inaktif hâle getiren beta-Laktamaz enzimleri infeksiyon tedavilerinin başarısız olmasına sebep olmaktadır (Capita ve Alonso-Calleja, 2013).

Bu çalışmada, peynir örneklerinde mikrobiyolojik yöntemlerle izole edilen *Enterobacteriaceae* türlerinde GSBL- ve AmpC- tipi beta-laktamazların varlığının araştırılması amaçlanmıştır.

2 GENEL BİLGİLER

2.1 Dünya ve Türkiye'de peynircilik sektörü

Hayvancılığa dayalı bir sanayi kolu olan süt ve süt ürünleri sektörü tüm Dünya'da çok geniş bir tüketici kitlesine sahip olması nedeniyle büyük önem taşımaktadır. İnsan beslenmesi ve sağlığın korunmasında önemli roller oynayan süt ve süt ürünleri başta protein olmak üzere kalsiyum, B grubu vitaminler gibi önemli besin maddelerini içermektedir. Bu nedenle süt ve süt ürünlerinin kapsadığı besin maddelerinin zarar görmeden son tüketiciye ulaştırılabilmesi amacıyla gıda sanayi tarafından pek çok teknoloji uygulanmaktadır (Önen, 1999).

Dünya süt üretimi 2010 yılı itibariyle 721 milyon ton olarak rapor edilmiştir. Bu üretimin %83'ünü inek sütü teşkil etmiştir. Toplam üretimin 382 milyon tonu ise işlenmek amacıyla sanayiye aktarılmıştır. Türkiye, toplam 11,9 milyon ton süt üretimiyle, AB, ABD, Hindistan, Çin, Rusya, Brezilya, Yeni Zelanda ve Pakistan'ın hemen arkasından 9.sırada gelmektedir. Türkiye'yi Uruguay, Meksika ve Arjantin ülkeleri izlemektedir (www.ulusalsutkonseyi.org.tr).

Sütten üretilen ürünler sınıflandırmasından üçüncü alt grubu peynirler kullanılan sütün cinsine, kalitesine, katkı maddelerine ve yöresel özelliklere göre çeşitlilik sunmakta ve tüm Dünya'da en sevilerek tüketilen gıda maddeleri arasında yer almaktadırlar. Dünya peynir üretimi 20 milyon ton olup, %80'inden fazlası inek sütünden elde edilmektedir. Kalan %20'lik kısım koyun, keçi ve mandadan elde edilen sütler ile gerçekleştirilmektedir. AB, Brezilya, Arjantin, Rusya, Kanada, Avustralya ve Ukrayna Dünya üzerinde toplam peynir üretiminin %70'ini yapmaktadır. Türkiye yılda 574.000 ton peynir üretmektedir. Üretilen bu miktarın 40.000 tonu AB ve Orta Doğu ülkelerine ihraç edilmektedir (www.clal.it).

Türkiye açısından üretilen peynirlerde fiziksel, kimyasal ve diğer yapısal özellikleri bakımından farklılık görülmektedir. Peynir üretiminde kullanılan sütlerin temininde yaşanan sıkıntılar, modern işletmecilik ilkelerinin uygulanmaması, farklı sütlerin

karıştırılması gibi başlıca sorunlar peynir kalite ve sıhhiğini olumsuz şekilde etikelemektedir (Demir ve Aral, 2010).

Türkiye’de üretilen çiğ süt üretiminin %20’si modern kuruluşlar tarafından sıhhi olarak süt ürünlerine dönüştürülmektedir. Diğer taraftan kalan %80’lik kısmın sağlıksız koşullarda işlenerek açık olarak tüketiciye sunulduğu bilinmektedir. Gelişmiş ülkelerde ise üretilen sütlerin %90-98’inin modern tesislerde işlendiği bildirilmektedir. Bu durumda hijyenik olmayan sütlerden imal edilen peynirler tüketiciler açısından son derece riskli bir durum teşkil etmektedirler (İTO, 2002).

Çizelge 2.1: 2008-2014 yılları arası Türkiye peynir üretimi (ton) (Yapraklı ve ark. 2015)

| | 2008 | 2009 | 2010 | 2011 | 2012 | 2013 | 2014 |
|---------------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Miktar | 260.399 | 271.704 | 473.057 | 518.850 | 564.191 | 598.915 | 631.085 |

2.2 Süt ve süt ürünleri amaçlı yetiştirilen hayvanlarda antibiyotik kullanımı

Süt ve süt ürünleri üretimi amaçlı yetiştirilen hayvanlarda hastalıklardan korunma büyüme ve yemden yararlanmayı artırıcı amaçla antibiyotikler kullanılmaktadır (Sarmak ve ark. 2006). Hayvanlarda kullanılan antibiyotikler süte geçmeleri yanında dışkı ve idrarla dışarı atılabilmektedir. Özellikle gübre amaçlı kullanılan kompost üründe antibiyotik kalıntılarının bulunması bu ortamda yetişen bitkilerin bu kalıntıları taşımaları için bir sebep olduğu gibi, toprakta bulunan konak mikrofloranın antibiyotik stresine maruz kalmasına da yol açmaktadır (Call ve ark. 2008).

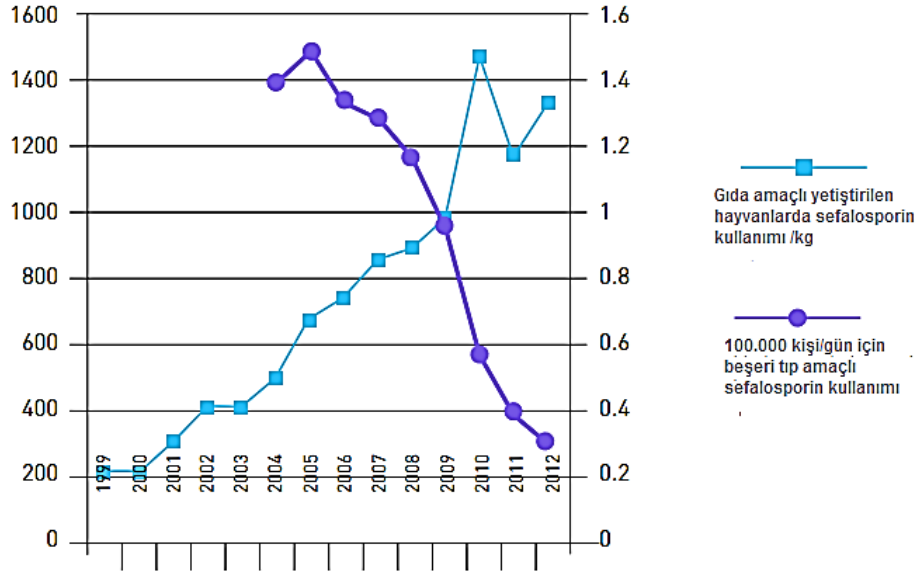
Amerika Birleşik Devletleri’nin 50 eyaleti ve Porto Riko’da 2013 ve 2014 yılları arasında yürütülen bir araştırmada toplam 3.680.185 adet çiğ ve pastörize süt örnekleri ile süt ürünlerinden 703 adetinde antibiyotik kalıntıları tespit edilmiştir (Kumar ve ark. 2010).

Süt Sığırcılığında Antibiyotikler genellikle sindirim sistemi hastalıkları (%36), akut bronşit (%25) ve ayak hastalıkları(%16) tedavisi amaçlı kullanılmaktadır. Bu kapsamda beta-laktamlar, streptomisin, flofenikol ve tetrasiklinler içeren toplam yirmiyi aşkın farklı antibiyotik kullanılmaktadır. Bu tip antibiyotikler arasında beta-

laktam içerenler özellikle mastitise karşı yaygın şekilde kullanılmaktadır. Diğer taraftan, ABD’de çiftliklerin %70’inin buzağı mamalarına oksitetrasiklin ve neomisin ilavelerinin olduğu bilinmektedir. Araştırma sonuçları antibiyotiklerin süt sığırlarında tedavi ve koruyucu amaçlı kullanımlarının son derece yaygın olduklarını göstermektedir (Sawant ve ark. 2007).

Süt sığırında bir kg et artışı için yıllık ortalama 45 mg antibiyotik kullanılmaktadır. Bu miktarın 2030 yılı itibariyle %67 oranında artacağı öngörülmektedir. Artışın Brezilya, Rusya, Hindistan, Çin ve Güney Afrika gibi ülkeler kaynaklı olduğu bildirilmektedir (Van Boeckel ve ark. 2015).

Çizelge 2.2: İngiltere’de veteriner ve beşeri tıp amaçlı kullanılan sefalosporinlerin kullanımı (Soil Association, 2015)



Yukarıdaki Çizelgede İngiltere’de yapılan bir araştırma genişlemiş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerden olan sefalosporinlerin çiftlik hayvanlarında ve insanlarda da kullanımını 1999-2012 yılları arasındaki dönem boyunca takip ederek sorunları tüm açıklığı ile ortaya koymuştur

2.3 Peynirlerde mikrobiyolojik kalite değerleri

Türkiye’de peynirlerin sıhhi üretimi, işlenmesi, muhafazası, taşınması ve arzını sağlamak üzere mikrobiyolojik değerlerinin belirlendiği Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği (Resmi Gazete 06.02.2009-27133/Sayı:2009/6) Çizelge 2.3’de sunulmuştur. Peynirlere ait mikrobiyolojik

değerler ilgili Tebliğ'in Ekinde Süt, Süt ürünleri ve Süt Bazlı Ürünler Bölümünde peynir, eritme peynirler ve eritme peynir ürünleri başlığı altında sunulmaktadır (Kaynar, 2011).

Peynirlerde tespit edilen başlıca bakteriler Koliform grubu bakteriler ve *E. coli* O157:H7, *Salmonella* türleri, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, Aerobik mezofilik bakteri, maya ve küflerdir. Özellikle Enterobacteriaceae suşları ile bulaş olmuş peynir ürünlerinin özellikleri değişebildiği gibi, tüketici açısından zehirlenmelere ve hastalıklara yol açabilmektedirler (Kaynar, 2011).

Çizelge 2.3: Tüm peynirler için mikrobiyolojik kalite değerleri

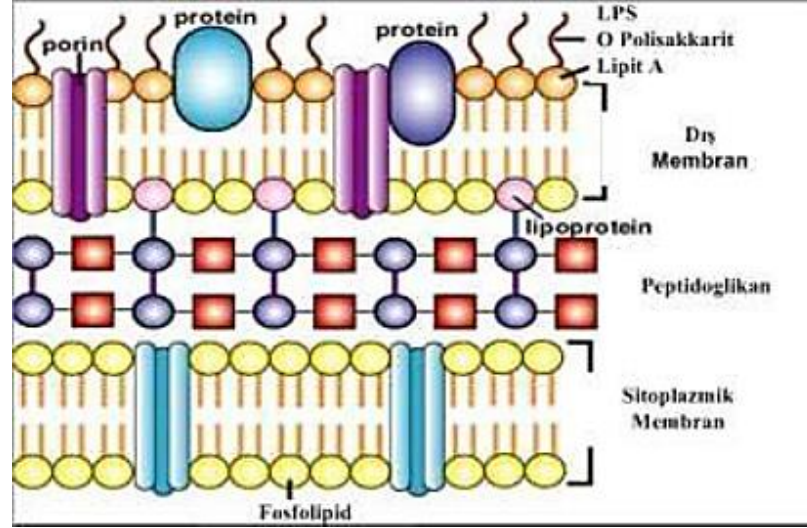
| Gıda | Mikroorganizmalar | Numune alma planı | | Limitler ⁽¹⁾ | |
|---|---------------------------------|-------------------|---|-------------------------|-----------------|
| | | n | c | min | maks |
| Eritme peynir hariç diğer tüm peynirler | Maya ve küf | 5 | 2 | 10 ² | 10 ³ |
| | Enterobacteriaceae | 5 | 0 | <10 ¹ | |
| | <i>S. aureus</i> ⁽²⁾ | 5 | 2 | 10 ¹ | 10 ² |
| | <i>Salmonella</i> spp. | 5 | 0 | 0/25 g-mL | |
| | <i>L. monocytogenes</i> | 5 | 0 | 0/25 g-mL | |
| | <i>E. coli</i> O157:H7 | 5 | 0 | 0/25 g-mL | |

⁽¹⁾ : Aksi belirtilmedikçe limit kob/g-mL olarak değerlendirilir. kob: Koloni oluşturan birim (katı besiyerinde)

⁽²⁾ Koagülaz pozitif stafilokoklar

2.4 Enterobacteriaceae familyası ve özellikleri

Enterobacteriaceae familyası üyeleri insan ve hayvan bağırsak mikroflorasının doğal üyeleridir. Bu tip bakteriler çoğunlukla Gram-negatif, çomak, sporsuz, glukoz ve diğer şekerleri fermente eden, fakültatif anaerob, nitratı nitrite indirgeyen, katalaz pozitif ve oksidaz negatiflerdir (Paterson ve Bonomo 2005).



Şekil 2.1: Gram (-) bakteri Hücre Duvarı Yapısı (Orak, 2005)

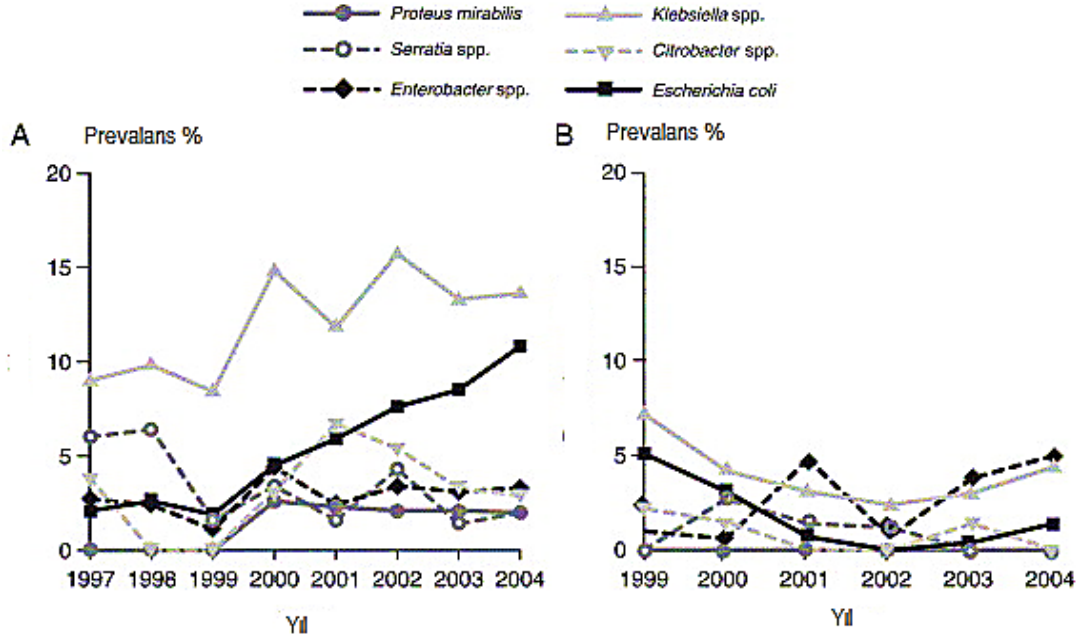
Başlıca üyeleri arasında *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Shigella* spp., *Citrobacter* spp., *Kluyvera* spp., *Enterobacter* spp. ve *Escherichia (E.) coli* gelmektedir (Torlak 2011). Enterik bakteriler üriner sistem enfeksiyonları başta olmak üzere, sepsis, pnömoni, menenjit ve gastroenterit gibi çok sayıda ciddi bakteriyel kaynaklı enfeksiyonların başlıca etmenleri olarak kabul edilmektedir (Foxman 2003).

2.4.1 GSBL- ve Amp- üreten Enterobacteriaceae

Direnç kodlayan genetik elemanların kendilerine özgü mekanizmalar yoluyla türdeş ve/veya farklı tip bakteriler arasında transfer edildikleri ve bu sayede Dünya üzerinde hızlı şekilde yayılış gösterdikleri anlaşılmıştır (WHO 2013).

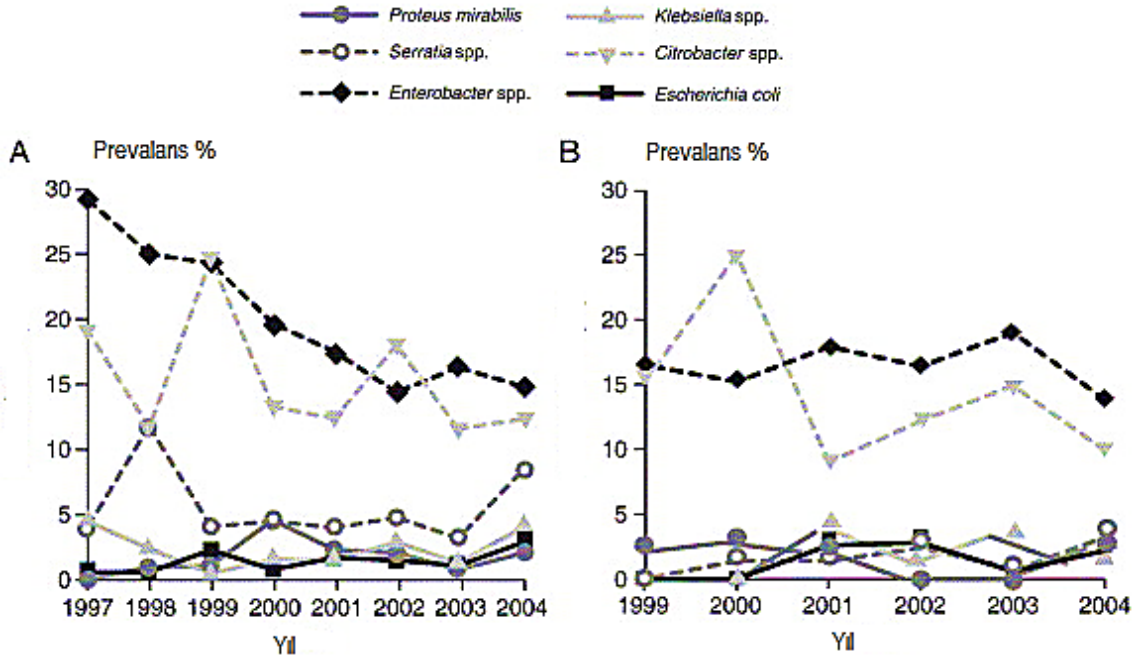
Klinik tedavileri başarısız kılan dirençli enterobakterilere klinik, toplumsal ve gıda kaynaklı yaygın şekilde rastlanmaktadır. Yapılan incelemeler dirençli bir enterobakterinin dirençli olmayan türdeşine nazaran sebep oldukları enfeksiyonların sonucunda en az üç katı daha ölümcül risk taşıdıklarını göstermiştir (Rao ve ark. 2014).

Çizelge 2.4: (A)Avrupa (1997–2004) ve (B)ABD (1999–2004) ülkelerinde GSBL-üreten enterobakterilerin prevalansları (Goossens ve Grabein, 2005)



AB ve ABD tarafından 1994 ve 2004 yılları arasında ortaklaşa yürütülen “MYSTIC” başlıklı çalışma GSBL- ve AmpC- tipi beta-laktamazları aynı anda üreten Enterobacteriaceae suşlarının görülme sıklıklarındaki artışa dikkat çekmiştir. GSBL- ve Amp- tipi beta-laktamazlar plazmid aracılı olup, direnç kodlayan genleri benzer ve farklı türler arasında aktarılabilir. Bu durum GSBL- ve AmpC- tipi beta laktamaz üreten enterik bakterilerin Dünya’da yayılmalarını kontrol edebilmek hususunda en ciddi engellerden birisi olduğu bildirilmiştir. (Goossens ve Grabein, 2005)

Çizelge 2.5: (A)Avrupa (1997–2004) ve (B)ABD (1999–2004) ülkelerinde AmpC-üreten enterobakterilerin prevalansları (Goossens ve Grabein, 2005)



AmpC-tipi beta-laktamazlar klavulanik asit tarafından kısmen inhibe edilirken, kloksasilin tipi antibiyotikler daha etkili sonuçlar vermektedirler. Klinik laboratuvarların pek çoğu GSBL-tipi beta-laktamazların tespitinde *E. coli* ve *K. pneumoniae* türü suşları tercih ederlerken, plazmid aracılı AmpC-tipi enzimleri test etmemektedirler. Amp-C-tipi enzimler ile GSBL-tipi enzimlerin birlikte bulunmaları çoklu antibiyotik direncine işaret eder. Antibiyotiklere karşı çoklu direnç gösteren suşlar kaynaklı infeksiyonların tedavisi ise çok güçleşmekte ve hatta tedavi şansı ortadan kalkabileceği belirtilmektedir. (Taneja ve ark. 2008).

Kromozomal aracılı AmpC-tipi beta laktamaz üreten suşların başlıcaları *Serratia*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Citrobacter* ve *Enterobacter* türleridir. Plazmid aracılı AmpC-tipi beta-laktamazlara ise daha çok *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Salmonella* spp., *C. freundii*, *E. aerogenes* ve *P. mirabilis* türlerinde rastlandığı belirtilmektedir (Grover ve ark. 2013).

AmpC- tipi beta-laktamazlar son yıllarda Gram (-) Enterobacteriaceae türleri arasında yaygın şekilde tespit edilebilmektedir (Kaye ve ark. 2004).

2.5 Beta-laktam antibiyotikler ve etki mekanizmaları

Beta-laktam grubu antibiyotikler günümüzde tüm Dünya’da yaygın şekilde kullanılan bir ilaç grubudur (Öncü, 2002). Beta-laktam antibiyotikler, yapısında beta-laktam halkası içermektedirler. Beta-laktam antibiyotikler grubunda penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta-laktamaz inhibitörleri bulundurmaktadırlar (Şadan, 2003).

Beta-laktam antibiyotikler bakterilerde Penisilin Bağlayan Proteinlerin (PBP) transpeptidaz aktivitelerini bloke ederler. Bu şekilde peptidoglikan sentezini engellenir ve hücre duvarı sentezi yapılamayarak, bakteri lizise uğrayıp etkisizleşir. Beta-laktam antibiyotikler bakterisidal etki göstermektedirler (Ulusoy, 2004). Bakterilerin beta-laktam antibiyotiklere karşı savunma mekanizması olarak beta-laktamaz tipi enzimleri kullanarak, antibiyotikleri inaktive ederler (Aktaş, 2004).

2.6 Direnç gelişimi, tipleri, etki mekanizması ve aktarımı

Gram (-) bakterilerde bugün bilinen 600’ü aşkın tür beta-laktamaz enzimleri tespit edilmiştir. Bu tip bakterilerde çok sayıda ve farklı beta-laktamazların olması, antibiyotik dirençliliğin çok kısa sürede yayılışını açıklamaktadır (Orak, 2005).

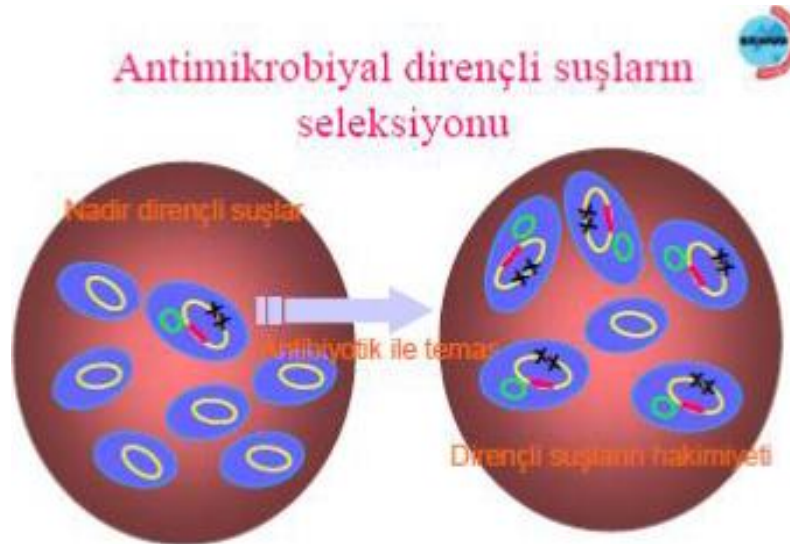
Antibiyotik direnci edinsel olduğu kadar, genetik değişimlerden de kaynaklanmaktadır. Bu biyotehlikenin yaygınlaşmasında bakteri türleri arasında mobil genetik elemanlardan olan plazmidler, transpozonlar ve integronların önemli rolleri bulunmaktadır (Eraksoy, 2008).

Bir bakteri antibiyotiğe karşı enzim sentezi, bakteri zarının geçirgenliğinin azalması, eflüksü pompası, hedef bölgelerin değişmesi ve korunması, hedefin aşırı üretimi, antibiyotik inhibisyonunun devre dışı kalması gibi farklı mekanizmalarını kullanarak mücadele edebilmektedir (Gür ve ark. 2008).



Şekil 2.2: Direnç mekanizmaları (EKMUD)

Bakteriler ‘Yatay Gen Transferi’ ile antibiyotik direnci kazanabilirler. Bakterinin sahip olduğu genetik materyal aynı türe ait başka bir bakteriye hatta farklı türdeki bakterilere dahi taşınabilir. Bakteride rekombinasyon olayları üç ana mekanizma ile meydana gelmektedir: Transformasyon, Transdüksiyon ve Konjugasyon (Verraes ve ark. 2013).



Şekil 2.3 Seleksiyon mekanizması (EKMUD)

Çizelge 2.6: Antibiyotik ajanların etki mekanizmaları (Somer, 2010)

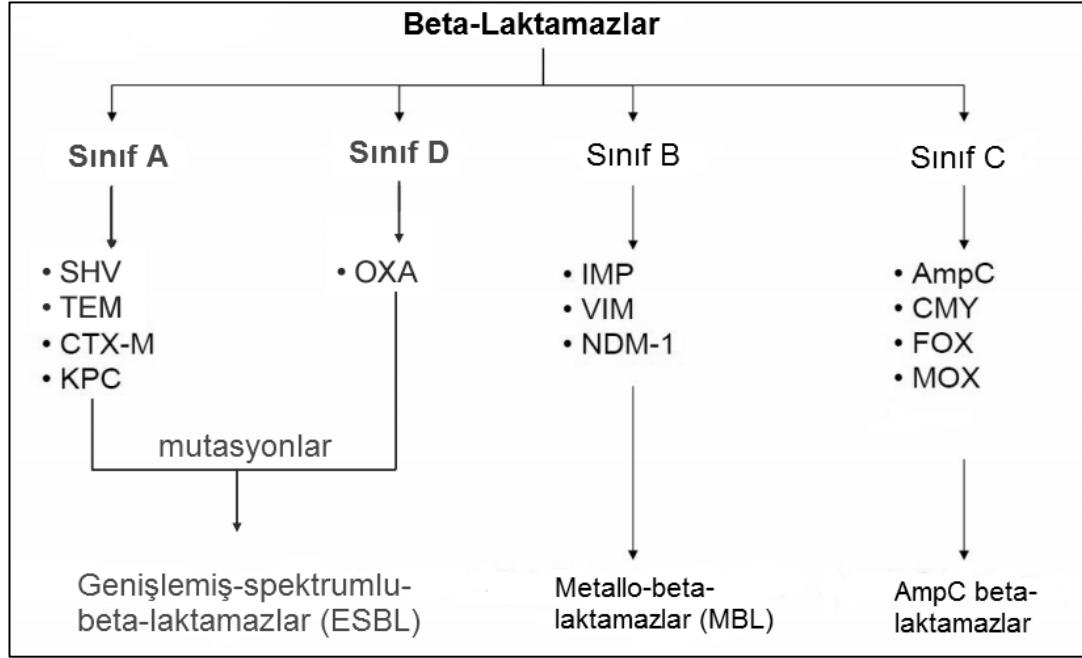
| Mekanizma | Etkili olduğu antibiyotik ajanlar |
|---|---|
| Hücre duvarı sentezini önleme | <ul style="list-style-type: none">• Beta-laktamlar: penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar• Glikopeptitler: vankomisin, teikoplanin |
| Protein sentezinin baskılanması | <ul style="list-style-type: none">• 50S ribozomal alt ünitesine bağlanma• 30S ribozomal alt ünitesine bağlanma |
| Nükleik asit sentezine etki | <ul style="list-style-type: none">• DNA sentezi baskılanması• RNA sentezi baskılanması |
| Metabolik yolların baskılanması: sülfonamidler, folik asit analogları | |
| Bakteriyel membran yapılarının bozulması; polimiksinler, daptomisin | |

Beta-laktam grubu antibiyotiklere direnç ise PBP'lerde değişiklik ile antibiyotiğin bağlanmasının önlenmesi, zar proteinlerinde oluşan değişimler ile antibiyotik ajanın hücreye girişinin önlenmesi ve beta-laktamaz enzimler ile ilacın inaktivasyonu yollarıyla olmaktadır (Öcal, 2012).

GSBL üreten bakteriler genellikle antimikrobiyal maddelere kromozomal ya da plazmid aracılı mekanizmalar yardımıyla çoklu direnç sergilemektedirler (EFSA, 2011). Beta-Laktam antibiyotiklere direnç ve laktamaz seviyesi arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır (Sun ve ark. 2009).

2.7 Enzimatik inaktivasyon mekanizması ve beta-laktamazlar

Enzimatik inaktivasyon kendiliğinden mutasyonlar ya da genetik alışveriş neticesinde gelişen bir mekanizmadır. Bu mekanizma antibakteriyel ajanı inaktif eden beta-laktam halkasının etkisinin hafifletilmesi veya ortadan kaldırılmasını gerçekleştirmektedir. Özellikle aminoglikozidler, kloramfenikol ve makrolidler gibi beta-laktam antibiyotiklere karşı son derece önemlidirler (Somer, 2010).



Şekil 2.4: Beta-laktamazlar ve sınıflandırması (Ghafourian ve ark. 2014)

2.7.1 Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)

Gram (-) bakteriler içinde en yaygın antibiyotik direnç mekanizması beta-laktamaz tipi enzim sentezidir. Başlangıçta, penilisin ve 1.nesil sefalosporinleri inaktive eden plazmid-aracılı beta-laktamazlar, zamanla bu tip enzimleri kodlayan genlerinden uğradıkları başkalaşımın sonucu genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) olarak adlandırılmışlardır. GSBL-tipi enzimler 3.nesil sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilmektedirler. Ancak, bu tip enzimlere karşı genellikle klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi inhibitörlere karşı duyarlı duyarlı olmalarıdır (Dağlar ve Öngüt, 2012).

GSBL tipi enzimler Ambler moleküler sınıf A ve sınıf D tipi beta-laktamazlardan oluşmaktadır. Bu tip enzimlerin etki spektrumları oksimino-beta-laktamaları kapsamaları sebebiyle genişlemiş spektrumlu olarak adlandırılmakta olup, geniş

spektrumlu penisilinlere, 1., 2., ve 3. nesil sefalosporinlere ve sefepime karşı etkili, karbapenemlere, sefamisinlere ve beta-laktamaz inhibitörlerine karşı etkisizdirler (Şadan, 2003).

2.7.2 AmpC- tipi beta-laktamazlar

Plazmid kökenli AmpC tipi enzimler ilk olarak 1989 yılında tanımlanmış olup, Ambler sınıflandırmasında C grubu yer almaktadırlar. Aktarılabılır olma özelliğine sahip olduklarından kolayca yayılabilmektedirler (Koldaş ve ark. 2011).

AmpC tipi beta-laktamazlar daha çok Gram (-) bakteriler arasında görülmektedir. *C. freundii* ve *E. cloacae* örnek olarak verilebilir. Bu tip bakteriler tarafından üretilen AmpC-tipi enzimler aslında sefalosporinlere karşı sentezlenen sefalosporinazlardır. Bu tip enzimler beta-laktamaz inhibitörlerine karşı dirençli göstermekte ve sefamisin türü antibiyotikleri hidrolize ederek etkisizleştirmektedirler (Demirbakan ve ark. 2008).

Bu tip enzim üreten bakteriler kaynaklı gelişen infeksiyonlarda tedavide başarı olasılığını düşürmekte ve ölüm riskini artırmaktadır (Pai ve ark. 2004).

AmpC-tipi enzimlere GSBL'a nisbeten daha az rastlanmaktadır. Ancak, düşük görülme sıklıklarına rağmen geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere karşı GSBL-tipi enzimlerden daha fazla direnç göstermektedirler (Coşkun ve Altanlar, 2012).

2.8 GSBL- ve AmpC- üreten Enterobacteriaceae kaynakları

2.8.1 Klinik ve toplumsal kaynaklı

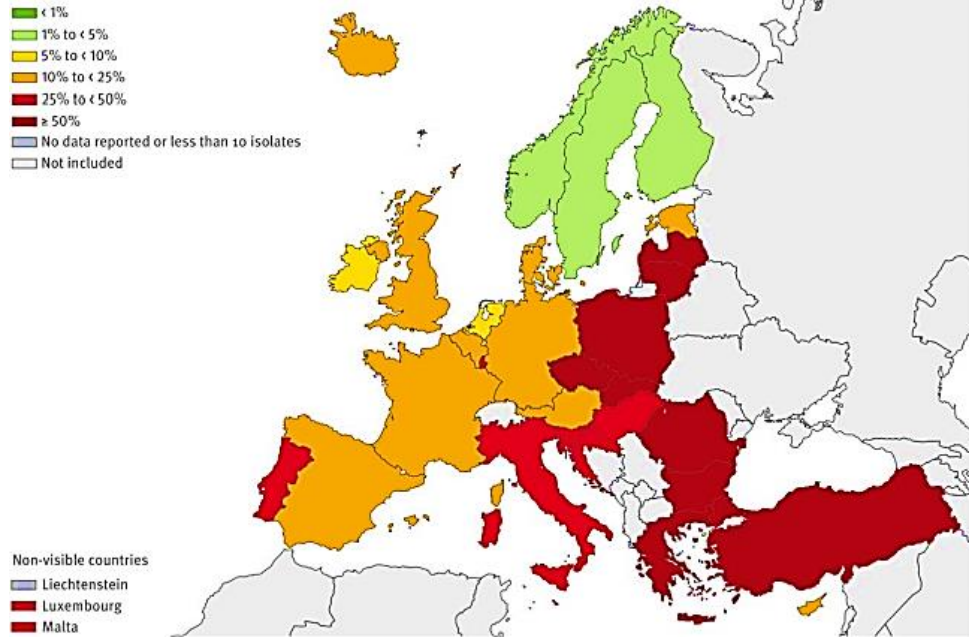
GSBL- ve AmpC-tipi dirençlilik farklı bakteri türleri arasında kendine özgü mekanizmalar ile aktarılırlar. Bu özellikleri dirençli bakterilerin sağlık merkezlerinde dahi salgın hastalıklara yol açmalarına sebep olmaktadır. ABD hastaneleri yoğun bakım ünitelerinde *K. pneumoniae* infeksiyonlarının %20'si ve *Enterobacteria* spp. infeksiyonlarının %31'i GSBL üreten Enterobacteriaceae kaynaklı olup, 3.kuşak sefalosporinlere duyarlı değildir. Tipik olarak GSBL hastane infeksiyonlarından izole edilirken, günümüzde toplum kaynaklı izolatlarda sıklıkla görülmeye başlanmıştır (Tükenmez-Tigen ve Mülazımoğlu, 2012).

Hastane ve toplum kaynaklı GSBL üreten Gram (-) Enterobacteriaceae infeksiyonlarının düzenli takibi tedavide kullanılacak antibiyotik ajana karar vermede önemlidir. Bu tür infeksiyonlarda en sık izole edilen türlerden birisi *E. coli*'dir (Çalgın ve ark. 2014).

Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı (THSKB) tarafından 2012 yılında yürütülen Ulusal bir araştırmada 45 ilde yerleşik 35'i Üniversite Hastanesi, 19'u Eğitim ve Araştırma Hastanesi ve 23'ü de Devlet Hastanesi olmak üzere toplam 77 adet katılımcı ile klinik örneklerden izole edilen *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pneumoniae*, *Enterococcus faecium/faecalis* izolatlarında Ulusal antimikrobiyal direnç surveyansı yapılmıştır. Araştırma bulgularına göre özellikle GSBL pozitif *E.coli* (%42,5) ve *K. pneumoniae* (%49.7) izolatlarında yüksek dirençlilik görülmüştür.



Şekil 2.5: İnvaziv *E. coli* izolatlarında 3. kuşak sefalosporin direnç yüzdeleri, AB Ülkeleri ve Türkiye, 2012 (THSKB 2015)



Şekil 2.6: İnvaziv *K. pneumoniae* izolatlarında 3. kuşak sefalosporin direnç yüzdeleri, AB Ülkeleri ve Türkiye, 2012 (THSKB 2015).

Avrupa Birliği ülkelerinin 2012 yılı üçüncü kuşak sefalosporinlere dirençlilik (EARS-Net) verileri ile Türkiye 2012 yılı verileri karşılaştırıldıklarında; İsveç'te bu oran %4,4 ve Bulgaristan'da %38,1 iken, Türkiye'de %41 olarak tespit edilmiştir. Türkiye açısından oranın Avrupa bulgularına göre ciddi yüksek oluşu antibiyotik kullanım politikaları açısından yeni düzenlemelerin yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır. EARSS-Net 2012 yılı raporunda yer alan direnç haritaları üzerine Türkiye için 2012 yılı bulguları eklenmiş olan epidemiyolojik haritalar aşağıdaki Şekillerde sunulmaktadır. Klinik ve toplumsal kaynaklardan izole edilen Enterobacteriaceae türlerinde GSBL- tipi ve AmpC- tipi beta-laktamazların ortak bulunuşları Avrupa'da ortalama %19,5 olarak rapor edilirken, bu oran Türkiye için %13,9 olarak bildirilmiştir (Turner, 2009).

2.8.2 Gıda kaynaklı

2.9 GSBL- ve Ampc- tipi beta-laktamazları tespit yöntemleri

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazların tespiti fenotipik ve genotipik yöntemler ile yapılmaktadır. Yöntemlerin tercihinde ise yöntemin ayırım gücü, tekrarlanabilirlik, tiplendirebilirlik, stabilitesi ile kullanım kolaylığı, maliyet, hız ve bilgisayar analizine uygunluk durumları dikkate alınmaktadır (MSU 2011).

Antibiyotik duyarlılık tespit yöntemleri Uluslararası otoriteler tarafından belirlenmekte ve düzenli şekilde güncellenmektedir. Bu otoriteler Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu (CLSI, ABD), Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST, AB), Office International des Èpizooties (OIE, AB), İngiliz Antimikrobiyal Kemoterapi Topluluğu (BSAC, İngiltere), Alman Standartlar Enstitüsü (DIN, Almanya), Fransız Mikrobiyoloji Derneği Antimikrobiyal Duyarlılık Komitesi (CA-SFM, Fransa), Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA, İsveç) ve Calibrated Dichotomous Sensitivity Test (CDS, Avustralya)'tir (WHO 2013).

GSBL'ler çoğunlukla fenotipik yöntemler (katı ve sıvı besiyerlerinde seyreltme ve disk-difüzyonu yaklaşımı, E-test ve otomatik sistemler ve genotipik yöntemler takip edilerek gerçekleştirilmektedir (MSU, 2011). Beta-laktamazların otoanalizör cihazlar kullanarak doğrulaması fenotipik yöntemlerin yeterli olmadıkları durumlarda tercih edilmektedir (Shi ve ark. 2015).

2.9.1 Fenotipik yöntemler

Beta-laktamazların tespitinde kullanılan fenotipik yöntemler arasında başlıcaları disk difüzyonu, mikrodilüsyon, E-test ve otoanalizör sistemler bulunmaktadır (Yıldırım, 2010).

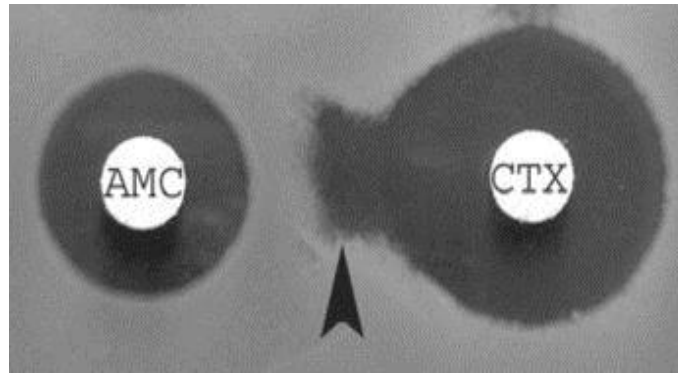
Fenotipik yöntemler yararlı bilgiler sağlamakla birlikte; zaman alıcı olması, düşük tekrarlanabilirliği, yorum güçlülüğü, suşlar arasında ayırım yapmada yetersiz olma olasılığı gibi dezavantajlarda sahiptirler (Polsfuss ve ark. 2012).

Biyotipleme suşların morfolojik, biyokimyasal özellikleri ve çevresel etkenlere karşı duyarlılıklarına dayalı bir tiplendirir. Bu aşamada API, Vitek MS Maldi tof ve BD Phoenix yöntemleri kullanılmaktadır. Ancak, bu tip yöntemlerin test, metabolik aktivite ve büyüme şartlarından etkilenmesi ve biyolojik özelliklerin değişmesine yol açan mutasyonlar ve gen ekspresyonundaki varyasyonlardan dolayı ayırım gücü zayıf kalmaktadır. Özellikle disk difüzyonu testlerinde suştaki dirençlilik mekanizmaları tespit edilememektedir. Bu gibi durumlarda bazı ek testler uygulayarak gizli direnç mekanizması tespit edilebilmektedir (CLSI, 2013).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri

Antimikrobiyal duyarlılık testleri antibiyotik ajanların bakteri türlerine karşı *in-vitro* etkinliklerini belirlemek için kullanılırlar (Gülay, 2002). Bu tip testler "difüzyon testi" ve "dilüsyon testi" olarak ikiye ayrılırlar. Disk difüzyon testi bulguları dilüsyon testi uygulanarak doğrulanır (Yıldırım 2010). Bu tip testlerde duyarlılık ve özgülüğünü belirleyen en önemli faktör kullanılan sefalosporin grubu antibiyotiktir (Polsfuss ve ark. 2012).

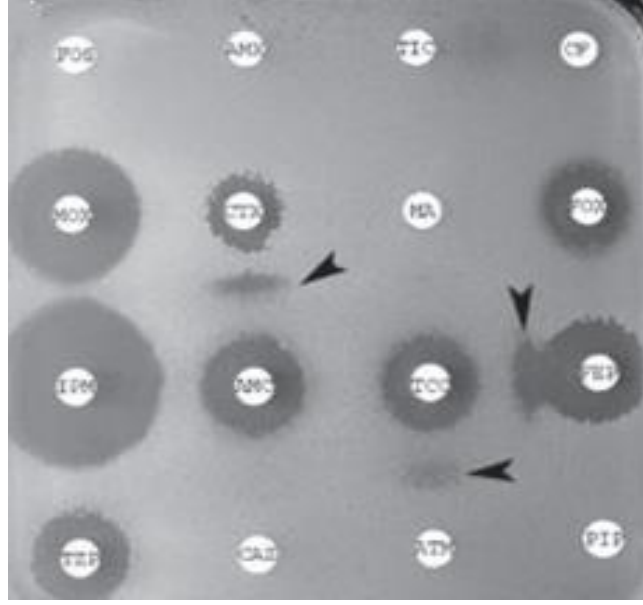
Disk difüzyon testi GSBL pozitif olduğu düşünülen enterik bakterinin sefpodoksim (CPD), seftazidim (CAZ) ve sefotaksim (CTX) antibiyotiklere karşı duyarlılığını saptamaktadır. Bu yöntemle göre oluşan zon çapı $CAZ \leq 22$ mm, $CTX \leq 27$ mm ve $CPD \leq 7$ mm referans kabul edilmektedir. Bir izolat bu üç antibiyotikten en az birisine ait inhibisyon zonu çapı altında değere sahipse, GSBL şüpheli olarak kabul edilir (CLSI, 2013). Ancak, sessiz direnç mekanizmaları bu yöntemle tespit edilememekte ve özgülük gücü düşük kalmaktadır (Gülay 2002). Disk difüzyonu testi zon referans sınırları gerekli durumlarda bağımsız Uluslararası otoriteler tarafından güncellenir (Wang ve ark. 2011).



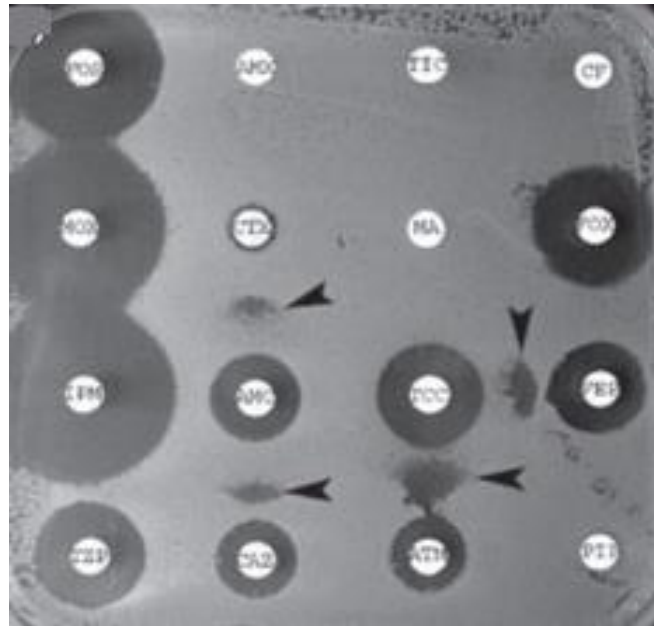
Resim 2.1: Kombine disk difüzyon testi sonucu (Drieux ve ark. 2008)

Disk difüzyonu testi doğrulaması klavulanik asit (CLA) ve gösterge sefalosporin disk kombinasyonu esasına dayanan kombine disk difüzyonu yöntemi, MİK değeri tespitine dayalı dilüsyon yöntemi ve E-test yöntemi ile yapılmaktadır (Mohanty ve ark. 2009).

Kombine disk difüzyonu CLA içeren ve içermeyen CAZ, CTX ve CPD diskler etrafında oluşan zonların ölçüm farkı ≥ 5 mm ise, izolat GSBL pozitif kabul edilir (CLSI 2013).



Resim 2.2: Kombine disk difüzyon testi sonucu (Drieux ve ark. 2008)



Resim 2.3: Kombine disk difüzyon testi sonucu (Drieux ve ark. 2008)

Dilüsyon yönteminde hedef mikroorganizma ile antibiyotik ilacı bir araya getirilir. Bu sayede aralarındaki etkileşimin göstergesi olarak bir “Minimum İnhibitör

Konsantrasyonu (MİK)” değeri ya da inhibisyon zon çapı (mm) elde edilir (Gölmez 2014).

MİK değeri bakterinin üremesinin önlendiği minimum ilaç konsantrasyonudur. MİK değerinde yükselme suşta direnç gelişimine işaret etmektedir. Bu değişim referans eşik değeri geçerse bakteri dirençli kabul edilir (Qurbanov ve Attar 2007). Enterobacteriaceae için referans zon çapları ve MİK değerleri izelge 2.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 2.7: Farklı fenotipik yöntemler ve GSBL tespiti performansları (Wiegand ve ark. 2007)

| Test Adı | Duyarlılık % | Özgüllük % |
|--------------|--------------|------------|
| MicroScan | 83,5 | 72,9 |
| VİTEK MS | 85,9 | 78 |
| Kombine Disk | 92,9 | 96,6 |
| E-test | 94,1 | 84,7 |

Duyarlılık doğrulama yöntemlerinden birisi ise MicroScan panelleridir. Paneldeki kuyucuklar GSBL test substratların bir seri dilüsyonlarını içermektedirler. Bu tip analizler %100 duyarlılık iken, özgüllük değerleri düşük (%61) kalmaktadır (Pfaller ve Segreti 2006).

Direnç mekanizmalarının hızlı değişimi, sayıca ve tipe dikkat çekici artışı fenotipik yöntemlerin duyarlılık ve özgüllükleri etkilemekte ve geliştirilmeleri zaman almaktadır. Bu nedenle, disk difüzyon yöntemi referans teknik olarak geçerliliğini sürdürmektedir (Araj 2000; Tomlin ve ark. 2001).

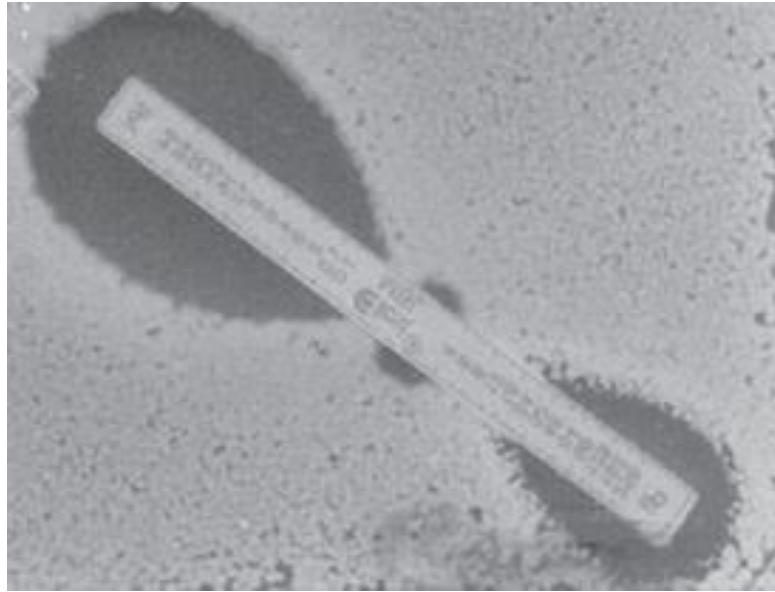
| Micronaut-S Beta-Lactamase VII Paneli | | | | | | | | | | | | | Sembol | Antimikrobiyal Ajan |
|---------------------------------------|-----|--------|-----|--------|------|-----|--------|------|-----|------|------|------|--------|----------------------------------|
| A | CEP | CMC | CAZ | CZC | CZB | CTX | C/C | CTB | MER | MEE | MEB | COX | CEP | Sefepim |
| | 128 | 32/4 | 128 | 32/4 | 32 | 128 | 32/4 | 32 | 128 | 32 | 32 | 32 | CMC | Sefepim/Klavulanik Asit |
| B | CEP | CMC | CAZ | CZC | CZB | CTX | C/C | CTB | MER | MEE | MEB | COX | CAZ | Seftazidim |
| | 64 | 16/4 | 64 | 16/4 | 16 | 64 | 16/4 | 16 | 64 | 16 | 16 | 8 | CZC | Seftazidim/Klavulanik Asit |
| C | CEP | CMC | CAZ | CZC | CZB | CTX | C/C | CTB | MER | MEE | MEB | COX | CZB | Seftazidim+ 350 µg/ml 3-APB |
| | 32 | 8/4 | 32 | 8/4 | 8 | 32 | 8/4 | 8 | 32 | 8 | 8 | 4 | CTX | Sefotaksim |
| D | CEP | CMC | CAZ | CZC | CZB | CTX | C/C | CTB | MER | MEE | MEB | ERT | C/C | Sefotaksim/Klavulanik Asit |
| | 16 | 4/4 | 16 | 4/4 | 4 | 16 | 4/4 | 4 | 16 | 4 | 4 | 1 | CTB | Sefotaksim+ 350 µg/ml 3-APB |
| E | CEP | CMC | CAZ | CZC | CZB | CTX | C/C | CTB | MER | MEE | MEB | ERT | MER | Meropenem |
| | 8 | 2/4 | 8 | 2/4 | 2 | 8 | 2/4 | 2 | 8 | 2 | 2 | 0,5 | MEE | Meropenem+0,4 mM EDTA |
| F | CEP | CMC | CAZ | CZC | CZB | CTX | C/C | CTB | MER | MEE | MEB | GC/B | MEB | Meropenem+ 350 µg/ml 3-APB |
| | 4 | 1/4 | 4 | 1/4 | 1 | 4 | 1/4 | 1 | 4 | 1 | 1 | | COX | Sefoksitin |
| G | CEP | CMC | CAZ | CZC | CZB | CTX | C/C | CTB | MER | MEE | MEB | GC/E | ERT | Ertapenem |
| | 2 | 0,5/4 | 2 | 0,5/4 | 0,5 | 2 | 0,5/4 | 0,5 | 2 | 0,5 | 0,5 | | GC/B | Kontrol Kuyucuğu+350 µg/ml 3-APB |
| H | CEP | CMC | CAZ | CZC | CZB | CTX | C/C | CTB | MER | MEE | MEB | GC | GC/E | Kontrol Kuyucuğu+0,5 mM EDTA |
| | 1 | 0,25/4 | 1 | 0,25/4 | 0,25 | 1 | 0,25/4 | 0,25 | 1 | 0,25 | 0,25 | | GC | Kontrol Kuyucuğu |

Şekil 2.7: Antibiyogram doğrulama ve MİK analizi paneli

E-test

E-testi katı besiyeri kullanılarak MİK değerinin belirlendiği bir tekniktir. Bu bakımdan aslında disk difüzyonu ve sıvı mikrodilüsyon yöntemleriyle benzeşmekte veya ayrılmaktadır (Leverstein-van Hall ve ark. 2002).

E-testin kombine disk difüzyon testine göre daha yüksek duyarlılık gösterirken, özgülük bakımından eşdeğer performansa sahip olduklarını bildiren çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Diğer taraftan, başka çalışmalar bu iddiaların tersini ifade etmektedir (Espino ve ark. 2010; Soltani ve ark. 2014).



Resim 2.4: GSBL pozitif *K. pneumoniae* E-test sonucu (Drieux ve ark. 2008)

Otoanalizör sistemler

Otoanalizör sistemler, duyarlılık testlerinin beta-laktamazları tespit edemedikleri zaman başvurulan yöntemlerdir. Günümüzde bu amaca uygun test sistemlerini üreten ve hizmet sağlayan bioMérieux S.A Fransa ve BD Biosciences, ABD firmaları bulunmaktadır.

Bu firmalar tarafından üretilen otoanalizör sistemler (i)VİTEK 1 (bioMérieux S.A., Marcy-l'Etoile, Fransa), (ii)VİTEK 2 (bioMérieux S.A.) ve (iii)Phoenix (BD Biosciences, ABD) sistemleridir (Numanovic ve ark. 2013). Bu tiğ cihazlar özellikle rutin ve çok sayıda örnek analizlerinin gerekli olduğu durumlarda tercih edilmektedirler (Rhodes ve ark. 2014; Bastos ve ark. 2015).

2.9.2 Genotipik yöntemler

Fenotipik özellikler aslında hücresel seviyede gen ifadelerinin bir sonucudurlar. Fenotipik yaklaşım duyarlılık analizinde çok faydalı bilgiler sağlamakla birlikte, bazı dezavantajlara da sahiptirler. Başlıca dezavantajları zaman alıcı olmaları, düşük tekrarlanabilirlik, bulguların güç yorumlanması ve gen seviyesinde başkalaşımını ayıramamasıdır (EUCAST 2013).

Çizelge 2.8: Başlıca GSBL tanı yöntemleri (Dağlar ve Öngüt, 2012)

| Yöntem | Test | Testin avantajı | Testin dezavantajı |
|-----------|------------------------|---|---|
| Fenotipik | CLSI tarama testleri | Uygulama kolaylığı ve yorum kolaylığı | GSBL'ler her zaman dirençli olmayabilir |
| | Çift disk sinerji | Uygulama kolaylığı ve yorum kolaylığı | Diskler arası mesafeler halen standart değil |
| | E-testi | Uygulama kolaylığı | Duyarlılığı çift disk sinerji yönteminden daha düşük |
| | Otomatize sistemler | Uygulama kolaylığı | <i>K. pneumoniae</i> suşlarında Karbapenem direnci saptamada düşük duyarlılık |
| Genotipik | İzoelektrik odaklama | Enzim gruplarını sınıflandırarak PCR testine öncül olma özelliğindedir. | Uygulama zor, benzer izoelektrik noktalı enzimleri ayırt etmekte yetersiz |
| | PCR | Kolay uygulama | TEM ve SHV allellerini ayırmakta yetersizlik |
| | Nükleotid dizi analizi | Altın standart. Yeni enzimler saptanabilir | Uygulamada zorluğu yüksek maliyet |

GSBL pozitif bakterilerin fenotipik yaklaşımla %40'ının sefalosporin grubu antibiyotiklere duyarlılıkları yanlış tespit edilmektedir. Bu olgu GSBL- ve AmpC-tipi beta-laktamazlar söz konusu olduğunda analiz laboratuvarları içinde hatalı okuma yapan kurumların oranı %32'ye çıkmaktadır (Pfaller ve Segreti 2006).

Rutin fenotipik yöntemlerle belirlenmesi olanaksız olan direnç genleri için en ideal yöntem genotipik teknikleri kullanmaktır (Marshall ve Levy 2011).

Genotipik yöntemler hızlı sonuç vermeleri, yüksek sensitivite ve spesifite ile öne çıkmakta ve hassas tanımlama yapabilmektedirler (Waldeisen ve ark. 2011). Başlıca genotipik yöntemler izoelektrik nokta, PCR, Real-time PCR ve nükleotid dizi analizidir (Willemsen ve ark. 2011).

3 GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Referans suşlar

Bu çalışmada Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu (CLSI 2013) tarafından önerilen *Klebsiella (K). pneumoniae* ATCC700603 (GSBL pozitif kontrol suşu, Oxoid, İngiltere) ve *Eschericia (E). coli* ATCC25922 (GSBL negatif kontrol suşu, Oxoid, İngiltere) kullanılmıştır. Kontrol suşları CASO agar (TSA) (Liofilchem, İtalya) yüzeyine steril bir öze yardımıyla bulaştırılmış ve devamında 37⁰C’de gece aşırı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda gelişen kolonilerden bir adeti 121⁰C/15 dk otoklavda (Hirayama, Japonya) steril edilmiş %90 Gliserol (Merck, Almanya) ve %10 CASO broth (TSB) (LABM, İngiltere) içeren ve 5 ml Eppendorf tüpü içinde tutulan stok solüsyonuna inoküle edilmiştir. Stoklar -20⁰C’de ileri çalışmalarda kullanılmak amacıyla derin dondurucuya kaldırılmıştır.

3.1.2 Kullanılan besiyerleri

Çizelge 3.1: CASO agar formülasyonu

| Bileşen | Miktarı (gr/L) |
|-------------------------|----------------|
| Peptonlu kazein | 15 |
| Peptonlu soya fasülyesi | 5 |
| Sodyum Klorür | 5 |
| Agar-Agar | 15 |

Çizelge 3.2: CASO Brot formülasyonu

| Bileşen | Miktarı (gr/L) |
|-------------------------|-----------------------|
| Peptonlu kazein | 17 |
| Peptonlu soya fasülyesi | 3 |
| Sodyum Klorür | 5 |
| Dipotasyum fosfat | 2,5 |
| Dekstroz | 2,5 |

Çizelge 3.3: Kromatik GSBL ve AmpC agar formülasyonu

| Bileşen | Miktarı (gr/L) |
|--------------------|-----------------------|
| Pepton karışımı | 43,2 |
| Agar | 15 |
| Kromojenik karışım | 1 |
| Selektif karışım | 0,5 |

Çizelge 3.4: Mueller Hinton agar formülasyonu

| Bileşen | Miktarı (gr/L) |
|-------------------|-----------------------|
| Kazein hidrolizat | 17,5 |
| Agar-agar | 13 |
| Sığır özü | 2 |
| Nişasta | 1,5 |

Çizelge 3.5: Mueller Hinton Brot formülasyonu

| Bileşen | Miktarı (gr/L) |
|-------------------|-----------------------|
| Et infizyonu | 2 |
| Kazein hidrolizat | 17,5 |
| Nişasta | 1,5 |
| Nişasta | 1,5 |

3.1.3 Gıda örnekleri

2014 yılı içinde İstanbul ilinin farklı semtlerinde yerleşik halk pazarları ve şarküterilerden toplam 83 adet peynir örnekleri randomize toplanmıştır. Alınan peynir örnekleri steril numune torbaları içine konularak, 4⁰C buz akülü taşıma kutusunda (JPB, UK, İngiltere) gıda mikrobiyolojisi laboratuvarına getirilerek bekletilmeden analize alınmışlardır (Çizelge 3.3).

Çizelge 3.6: Peynir örneklerinin toplandıkları semtler

| Semt adı | Örnek sayısı (n) |
|---------------|------------------|
| Çatalca | 10 (%12,04) |
| Kadıköy | 5 (%6,02) |
| Üsküdar | 7 (%8,48) |
| Fatih | 14 (%16,86) |
| Beykoz | 6 (%7,22) |
| Ümraniye | 8 (%9,64) |
| Silivri | 6 (%7,22) |
| Bakırköy | 9 (%10,84) |
| Kemerburgaz | 5 (%6,02) |
| Bahçelievler | 8 (%9,64) |
| Esenyurt | 5 (%6,02) |
| Toplam | 83 (%100) |

3.2 Yöntem

3.2.1 Mikrobiyolojik inceleme

Numune hazırlama

Bir peynir örneği için filtreli Stomacher torbası (Interscience, Fransa) hazırlanarak, hassas terazide (AND GF-6100, Japonya) darası alınmıştır. Daha sonra filtreli Stomacher torbasına örnekten karot yöntemi ile 25 gr peynir örneği hassas terazi (AND GF-6100) yardımıyla tartılarak konulmuştur. Bulaşmayı önlemek için, bu aşamada kullanılan tüm aletler %96'lık etanol (Merck, Almanya) çözeltilisine batırılıp bek alevinden geçirilerek kullanılmıştır.



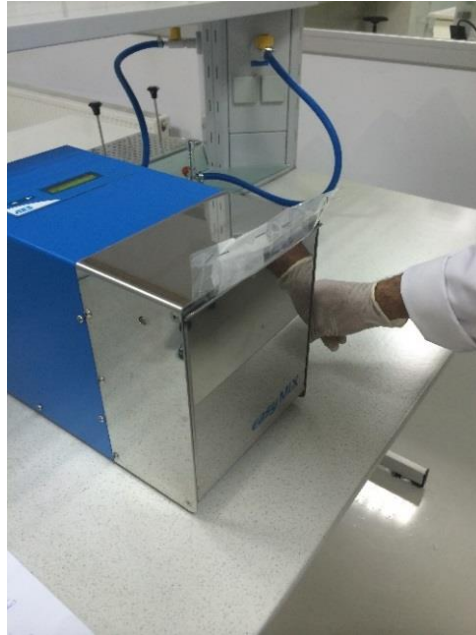
Resim 3.1: Numune hazırlama

Tartımı tamamlanmış Stomacher torbası içine steril bir emzür yardımıyla 225 ml kullanım talimatına göre hazırlanmış Enterobacteriaceae zenginleştirme brothu (EE) (LABM) dökülmüştür.



Resim 3.2: Hazırlanmış steril Enterobacteriaceae zenginleştirme brotu

Stomacher torbalarının ağzı kapatılmış ve 2 dk süresince homojenizatörde (AES Chemunex EasyMix, Fransa) homojenize edilmiştir.



Resim 3.3: Homojenizasyon

Ön zenginleştirme

EE brot içinde homojenize edilen peynir örneği aerobik koşullara altında 37°C'de gece aşırı inkübasyona bırakılmıştır.



Resim 3.4: İnkübasyon

Selektif zenginleştirme

Ön zenginleştirme işlemi tamamlanmış kültürden steril bir öze kullanarak üretici talimatına göre hazırlanmış selektif GSBL- ve AmpC- katı besiyerine (Liofilchem, İtalya) sürme yöntemiyle ekim yapılmıştır. Selektif besiyerinin süspansiyonu emmesi için 3-5 dk beklenmiştir. Sürenin sonunda petri plağı ters çevrilerek 37°C/18-24 saat aerobik koşullarda altında tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda selektif besiyeri kullanım talimatına göre yeşil-mavi renkli gelişen 1 koloniler GSBL üreten *K. pneumoniae* ve/veya *Enterobacter* spp., pembe-kırmızı renkli koloniler GSBL pozitif *E. coli* olarak ön kabul görmüştür.



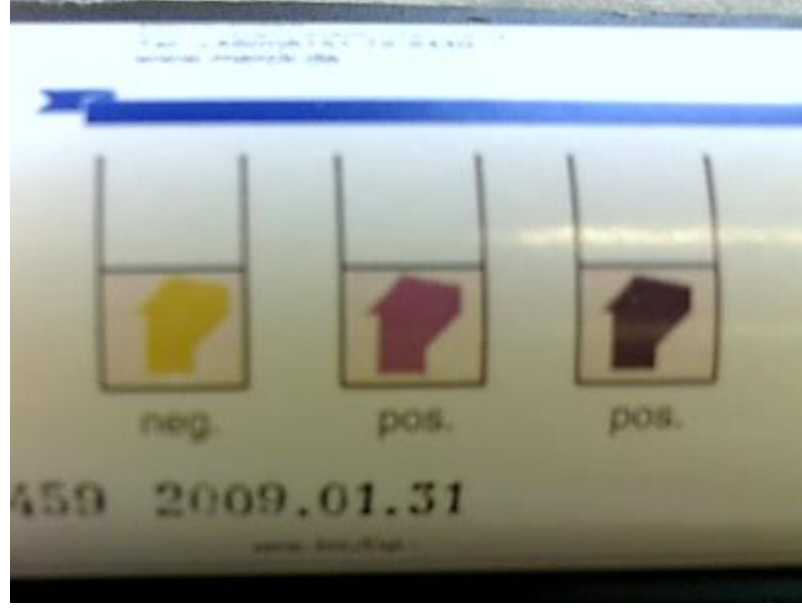
Resim 3.5: Selektif besiyerinde gelişen şüpheli GSBL izolatlar

Bu şüpheli kolonilerden öze yardımıyla kullanım talimatına göre hazırlanmış CASO agara (LABM) saflaştırma amaçlı pasaj edilmiş ve petri aerobik koşullar altında 37°C/18-48 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır.

İnkübasyon sonunda saf izolatlar oksidaz testi ve devamında ise Vitek® kütle spektrometresi (bioMérieux, Fransa) ile tiplendirme işlemine alınmıştır.

Oksidaz testi

Şüpheli GSBL izolatlara Bactident Oxidase Test kiti (Merck, Türkiye) kullanılarak oksidaz testi uygulanmıştır. Test sonucu oksidaz (-) sonuç veren izolatlar bir ileri aşama olan otoanalizör ile tiplendirme aşamasına alınmıştır.



Resim 3.6: Oksidaz testi

3.2.2 VİTEK® MS ile tiplendirme

Oksidaz negatif sonuç veren saflaştırılmış GSBL şüpheli izolatlar steril öze yardımıyla VİTEK® MS (bioMérieux, Fransa) matriks pleytindeki kuyucuklara sürülmüştür. Matriks pleytin pozitif kontrol kuyusuna İ.A.Ü Sağlık Bilimleri Fak. Mikrobiyoloji Laboratuvarı'ndan tedarik edilen referans *E. coli* ATCC8739 kontrol suşu bulaştırılmıştır. Bu işlemin ardından her bir kuyucuğa 1 µl matriks solüsyonu (MS-CHCA Yellow) pipetlenmiştir. Kuyucuklar kuruyana kadar oda koşullarında 1-2 dk bekletilmiştir. Tüm bu işlemler ESCO Tip A2 Biyogüvenlik Kabini (ESCO, Singapur) içinde gerçekleştirilmiştir.

Pleyt tiplendirme için hazırlandıktan sonra, cihaz yazılımı açılmıştır. İzolatlar yazılımda girilmiştir. Matriks pleyt kartuşa yerleştirilmiş, cihaza verilmiş ve tiplendirme işlemi başlatılmıştır. Okuma sonunda sonuçlar kontrol edilmiş ve onaylanarak cihaz veritabanına kaydedilmiştir.

Tiplendirilmiş GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatlar Eppendorf tüpünde bulunan steril %90 CASO brot (LABM) ve %10 Gliserol (Sigma Aldrich) karışımına süspanse edilerek, ileri analizlerde kullanılmak amacıyla -20°C'de saklamaya alınmıştır.

3.2.3 GSBL- ve AmpC-tipi beta-laktamazlar tarama testleri

Mikrobiyolojik inceleme sonucu elde edilen GSBL ve AmpC şüpheli Enterobacteriaceae izolatların fenotipik incelemeleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu (CLSI 2013) talimatları takip edilerek yapılmıştır.

Disk difüzyon testi

Tiplendirilen oksidaz negatif GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatlar disk difüzyon testine alınmıştır.



Resim 3.7: Dansitometre

Şüpheli izolat eküvyon çubuk ile %0,85 NaCl tuzlu su çözeltisine (Adeka, Türkiye) bulaştırılmıştır. Süspansiyonun dansitesi 0,5 McFarland (10^8 kob/ml) olacak şekilde dansitometre (BD Phoenix, Türkiye) ile ayarlanmıştır.



Resim 3.8: 0,5 McFarland ayarlanmış süspansiyon okuma sonucu

Bu süspansiyondan üretici firma talimatına göre hazırlanmış Mueller Hinton (MHA) (LiofilChem, İtalya) katı besiyerine eküvyon çubuk ile sürüntü ekimi yapılmış ve petri plağı nemi absorbe olması için 3-5 dk bekletilmiştir. Bu işlemi takiben steril bir forsepe ile sefodoksim (CPD;10 µg), seftazidim (CAZ;30 µg) ve sefotaksim (CTX;30 µg) antibiyotik diskleri (MAST GSBL kiti CPD10, İngiltere) MHA petri plağına yerleştirilmiştir. Diskler, kit kullanım talimatlarına uyularak disk merkezleri arasında minimum 25 mm ve petri kenarından minimum 15 mm kalacak şekilde konumlandırılmıştır. Disklerin yerleştirildiği petri 37°C’de gece aşırı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda disklerin etraflarında oluşan zon çapları bir milimetrik cetvel yardımıyla ölçülerek kaydedilmiştir. Üç farklı antibiyotik disklerden en az birisinin zon ölçüm değeri (CAZ≤17 mm, CTX≤22 mm ve CPD≤17 mm) referans değerinden düşük ise, o izolat şüpheli GSBL-üreten Enterobacteriaceae olarak ön kabul alarak, kombine disk difüzyon testine geçilmiştir.



Resim 3.9: GSBL tarama antibiyotik diskler



Resim 3.10: İnkübasyona alınmış Mueller Hinton agara yerleştirilmiş antibiyotik diskler

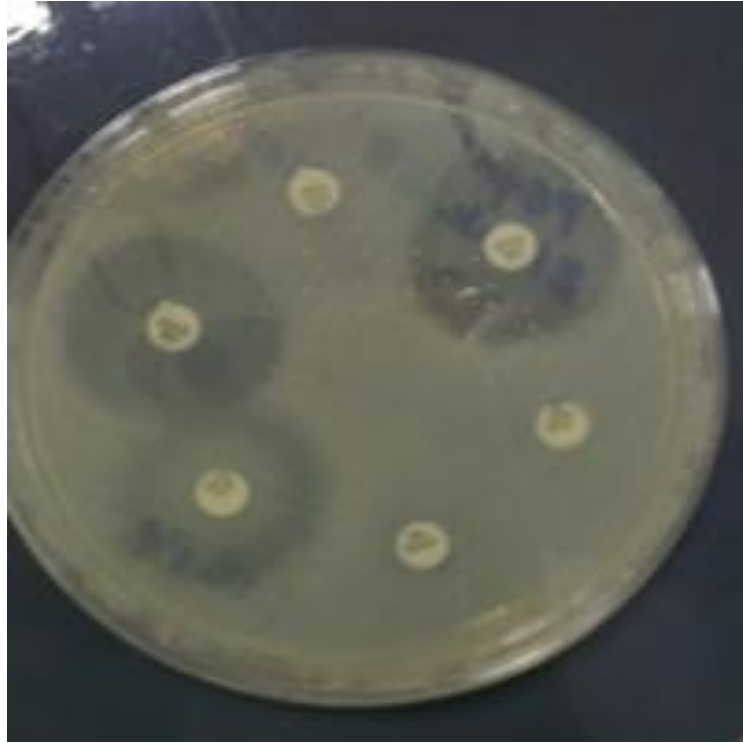
Kombine disk difüzyon testi

Disk difüzyon sonucu şüpheli GSBL üreten izolatlar MAST GSBL D67C kiti kullanım talimatları takip edilerek disk difüzyon doğrulama testine alınmıştır. Steril bir eküvyon çubuk ile şüpheli izolat %0,85 NaCl tuzlu su çözeltisine (Adeka, Türkiye) dansitesi 0,5 McFarland (10^8 kob/ml) olacak şekilde bulaştırılmıştır. Süspansiyonun dansitesi BD Phoenix dansitometre ile ayarlanmıştır. Süspansiyondan Mueller Hinton (MHA) (LiofilChem, İtalya) katı besiyerine eküvyon çubuk ile sürüntü ekimi yapılmıştır. Petri nemin absorbe etmesi için 3-5 dk bekletilmiştir.



Resim 3.11: Mueller Hinton agara yerleştirilmiş antibiyotik diskler

Disk difüzyon testinde pozitif sonuç veren antibiyotik disk ve klavulanik asit (CLA;10 μ g) içeren türdeş diski MAST GSBL D67C kitinden alınarak, yine aynı kitin kullanım talimatlarına uyularak steril bir forsep yardımıyla MH katı besiyerine yerleştirilmiştir. Diskler merkezleri arasında minimum 25 mm ile petri kenarından minimum 15 mm olacak şekilde konumlandırılmıştır.



Resim 3.12: Antibiyotik diskler etrafından oluşan zonlar

Disklerin yerleştirildiği petri ters çevrilerek 37°C'de gece aşırı inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda diskler etrafından oluşan zon çapları bir milimetrik cetvel yardımıyla ölçülerek kaydedilmiştir. Klavulanik asitli ve klavulanik asit içermeye türdeş disklerin etraflarında oluşan zon çapları arasındaki ölçüm farkı değeri ≥ 5 mm olan izolat pozitif GSBL Enterobacteriaceae olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 3.7: *Enterobacteriaceae* için referans zon çapları ve MİK değerleri (CLSI 2013)

| Antimikrobiyal ajan | Disk içeriği | Zon çapı (mm) | | | MİK ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|------------------------------------|---------------------------------|---------------|-------|-----------|--------------------------|---|-----------|
| | | S | I | R | S | I | R |
| Seftazidim (CAZ) | 30 μg | ≥ 21 | 18-20 | ≤ 17 | ≤ 4 | 8 | ≥ 16 |
| Seftazidim Klavulanatlı (CAZ CLA) | 30 $\mu\text{g}+10 \mu\text{g}$ | ≥ 26 | 23-25 | ≤ 22 | | | |
| Sefpodoksim (CPD) | 10 μg | ≥ 21 | 18-20 | ≤ 17 | ≤ 2 | 4 | ≥ 8 |
| Sefpodoksim Klavulanatlı (CPD CLA) | 10 $\mu\text{g}+10 \mu\text{g}$ | | | | | | |
| Sefotaksim (CTX) | 30 μg | ≥ 26 | 23-25 | ≤ 22 | ≤ 1 | 2 | ≥ 4 |
| Sefotaksim Klavulanatlı (CTX CLA) | 30 $\mu\text{g}+10 \mu\text{g}$ | ≥ 31 | 28-30 | ≤ 27 | | | |

S: Duyarlı; I:Orta; R:Dirençli;MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu

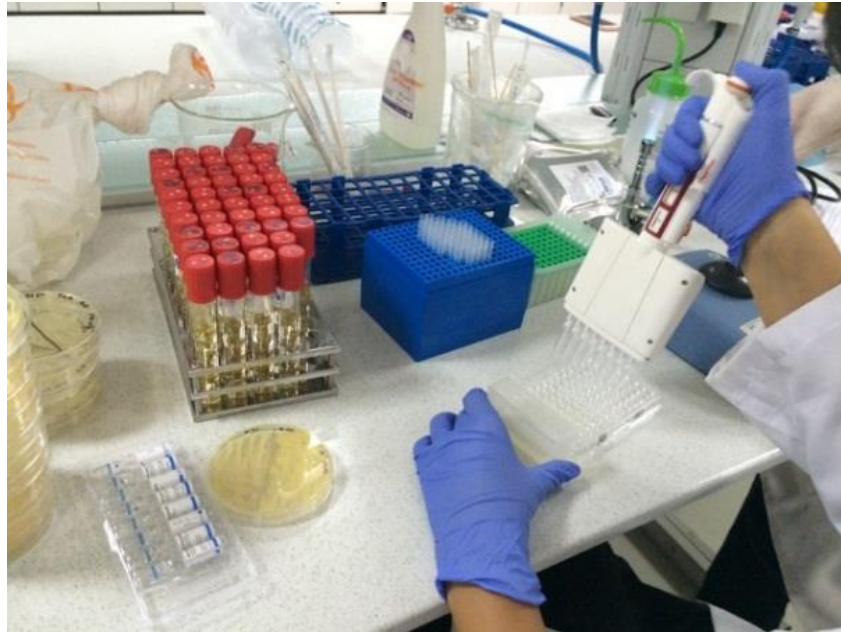
Antibiyogram doğrulama ve MİK analizi

Kombine disk difüzyonu testi sonucu GSB pozitif olduğu kesinleşen izolat antibiyogram doğrulama ve MİK değeri tespitine alınmıştır. Bu fenotipik işlem için sıvı mikrodilüsyon prensibine dayalı Micronaut-S beta-lactamase VII kiti (Merlin Diagnostika, Almanya) kullanılmıştır. Micronaut-S beta-lactamase VII kiti, GSBL-tipi beta-laktamaz dışında, aminopenisilin inaktive eden sefalosporinaz (AmpC), *K. pneumoniae* sefalosporinaz (KPC), metallo-beta-laktamaz (MBL) ve Tip D karbapenamaz tipi diğer beta-laktamazların varlıkları tespit edebilecek seçicilik ve hassasiyete sahip olacak şekilde tercih edilmiştir.

Enterobacteriaceae izolat eküvyon çubuk ile %0,85 NaCl tuzlu su çözeltisine (Adeka) süspanse edilmiştir. Süspanسیونun dansitesi BD Phoenix dansitometre ile 0,5 McFarland (10^8 kob/ml) değerine ayarlanmıştır.

Dansitesi ayarlanan süspanسیونdan mikropipet yardımıyla 50 µl alınarak, 11 ml Muller Hinton Brota (Merck) pipetlenmiştir. Bulaş yapılmış brot tüp vortekslenerek iyice karıştırılmış ve plastik bir küvete boşaltılmıştır.

Micronaut-S beta-lactamase VII kit pleytinin ambalajı açılmıştır. Sekiz kanallı otomatik bir pipet kullanarak küvete boşaltılan süspanسیون pleyt kuyucuklarına 100'er µl olacak şekilde pipetlenmiştir. Pleytin üzeri şeffaf film ile kapatılmıştır. Kapatılan pleyt 37^0C 'de gece aşırı inkübasyona alınmıştır.



Resim 3.13: Micronaut-S beta-lactamase VII Panelin hazırlanması

İnkübasyon sonunda Pleytin üzerine yapıştırılmış plastik film çıkarılmıştır. MultiScan spektrometre cihazı (Thermoscientific, Finlandiya) ve sonuçları otomatik analiz edecek yazılım (Sifin MCN6, Almanya) açılmıştır. Yazılım ana menüsü kullanılarak izolatın tipi ve inokülasyon tarihi girilmiştir. Pleyt cihazın gözüne yerleştirilmiş ve okuma işlemi başlatılmıştır. Okuma sonuçları paket yazılım tarafından otomatik değerlendirilmiş ve sonuçlar kaydedilmiştir.



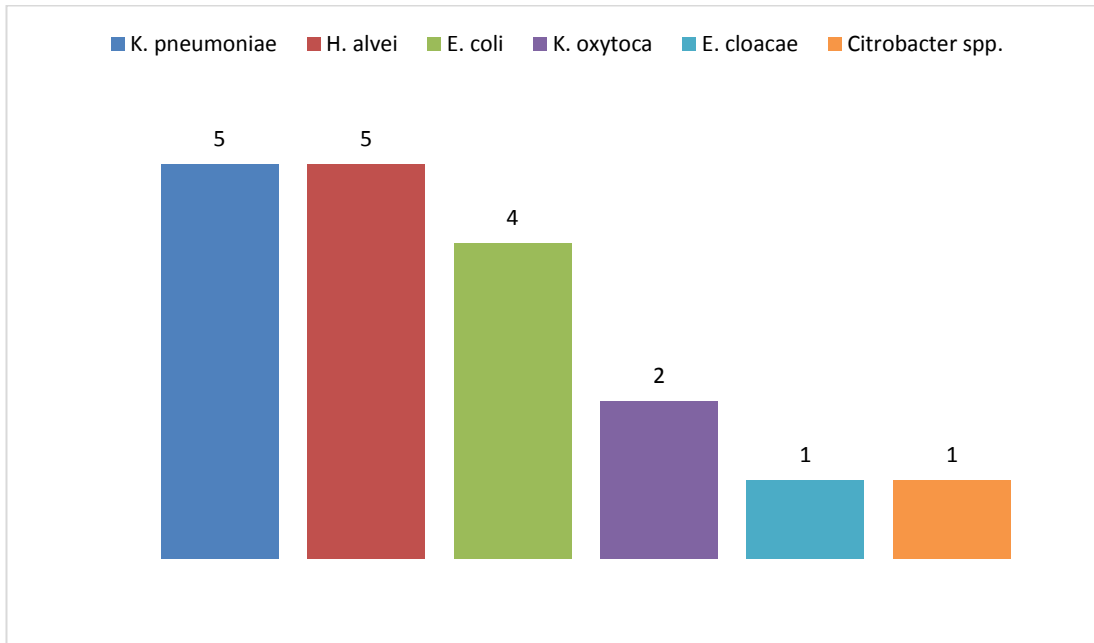
Resim 3.14: MultiScan spektrometre cihazı ve panelin yerleştirilmesi aşaması

4 BULGULAR

Bu çalışmada, 2014 yılı içinde İstanbul ilinin farklı semtlerinde yerleşik halk pazarları ve şarküterilerden randomize şekilde toplanan toplam 83 adet peynir örneklerinde Enterobacteriaceae suşlarının varlıkları incelenmiştir. İnceleme sonucu toplam 18 adet GSBL şüpheli izolatlar disk difüzyon, disk difüzyon doğrulama MİK tespiti testleri yapılmıştır. Elde edilen izolatlarda GSBL- ve AmpC- tipi beta-laktamazların varlıkları tespit edilmiştir.

4.1 Mikrobiyolojik bulgular

Toplam 83 adet peynir örneklerinde yapılan mikrobiyolojik inceleme sonucu toplam 18 adet GSBL-tipi beta-laktamaz üreten şüpheli *Enterobacteriaceae* izolatları elde edilmiştir. Bu izolatlar VİTEK® MS kütle spektrometresi ile tiplendirilmiştir. Tiplendirme sonucu izolatların tür dağılımı %27,8 *K. pneumoniae*, %27,8 *H. alvei*, %22,2 *E. coli*, %11,2 *K. oxytoca*, %5,5 *E. cloacae* ve %5,5 *Citrobacter* spp. olarak saptanmıştır (Şekil 4.1).



Şekil 4.1: GSBL- ve AmpC- pozitif izolatların tipleri

4.2 GSBL- ve AmpC- tipi beta-laktamazların tarama bulguları

Disk difüzyon ve disk difüzyonu doğrulaması testleri bulguları

Madde 4.1’de tiplendirilmiş izolatlarda yapılan disk difüzyonu ve disk difüzyonu doğrulaması incelemesi sonucu izolatların antibiyotik ajanı ve türdeş klavulanatlı diski genel ortalama zon inhibisyon ölçüm değerleri Çizelge 4.1’de sunulmuştur.

Çizelge 4.1: Kombine disk-difüzyonu doğrulama sonuçları

| Antibiyotik ajan | İzolat sayısı (n=18) | |
|------------------|----------------------|---------------------|
| | Ortalama (X; mm) | Std Sapma (S; ± mm) |
| CAZ | 14,5 | 3,536 |
| CAZ CLA | 24,5 | 3,536 |
| Δ_1 | 10 | 0 |
| CTX | 12 | 1,414 |
| CTX CLA | 27 | 5,657 |
| Δ_2 | 15 | 4,243 |
| CPD | 6 | 0 |
| CPD CLA | 20,5 | 2,121 |
| Δ_3 | 14,5 | 2,121 |

İzolatların beta-laktamaz enzimi tipi bazında kombine disk difüzyonu ortalama zon inhibisyon ölçüm değerleri GSBL- pozitif izolatlar için CAZ±CLA için 26,3±3,2 mm, CTX±CLA için 28,6±7,4 mm ve CPD±CLA için 24,4±11,7 mm; GSBL- ve AmpC kombinasyonu pozitif izolatlar için CAZ±CLA 22,0±10,0 mm, CTX±CLA için

23,0±12,0 mm ve CPD±CLA için 19,0±13,0 mm ve yalnızca AmpC- tipi beta laktamaz pozitif izolar içinse CPD±CLA 15,5±1,9 mm bulunmuştur.

Antibiyoqram doğrulama MİK bulguları

Toplam 9 adet GSBL- pozitif izolatların iki adeti CTX (≥128 µg/mL), iki adeti CAZ (16 µg/mL), bir adeti COX (>32 µg/mL), iki adeti CEP (=64 µg/mL), bir adeti MER (MIC=8 µg/mL) ve bir adeti CMC (≤0,25/4 µg/mL) dirençli oldukları belirlenmiştir.

Toplam 4 adet GSBL- ve AmpC- tipi pozitif izolatların dört adeti CTX (≥128 µg/mL) ve CAZ (MIC=16 µg/mL), bir adeti MER (=64 µg/mL), iki adeti COX (>32 µg/mL), bir adeti ERT (>1 µg/mL), üç adeti CEP (>128 µg/mL) ve iki adeti CMC (≤0.25/4 µg/mL) direnç gösterdikleri tespit edilmiştir.

Toplam 5 adet Yalnızca AmpC- tipi beta-laktamaz pozitif izolatlardan üç adeti CTX (=8 µg/mL) bir adeti CAZ (≥16 µg/mL), dört adeti COX (≥32 µg/mL) ve bir adeti ERT (>1 µg/mL) karşı dirençli oldukları görülmüştür.

Çizelge 4.2: Antibiyogram doğrulama MİK bulguları

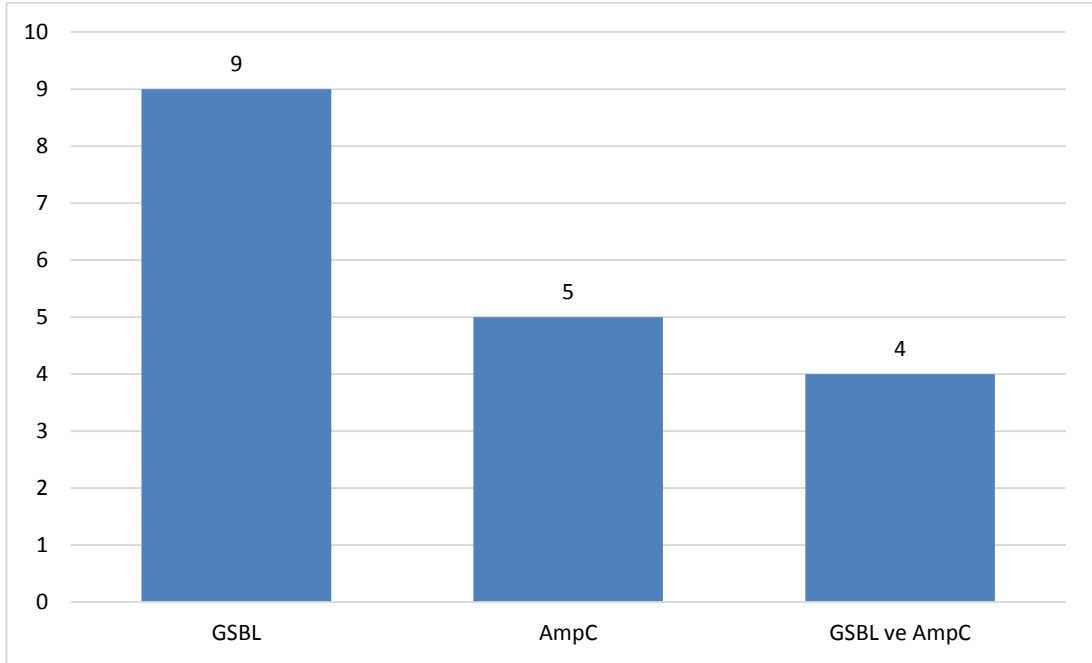
| Beta-laktamaz tipi | İzolat sayısı (n) | Antibiyotik tipi ve MİK değeri (µg/mL) | | | | | | |
|--------------------|-------------------|--|-----|-----|------|-----|---------|-----|
| | | CTX | CAZ | COX | CEP | MER | CMC | ERT |
| GSBL- | 9 | ≥128 | =16 | >32 | =64 | =8 | ≤0,25/4 | - |
| GSBL- ve AmpC- | 4 | ≥128 | =16 | >32 | >128 | =64 | ≤0,25/4 | >1 |
| AmpC- | 5 | =8 | ≥16 | ≥32 | - | - | - | ≥1 |

Enterobacteriaceae türü bazında beta-laktamazların dağılımı

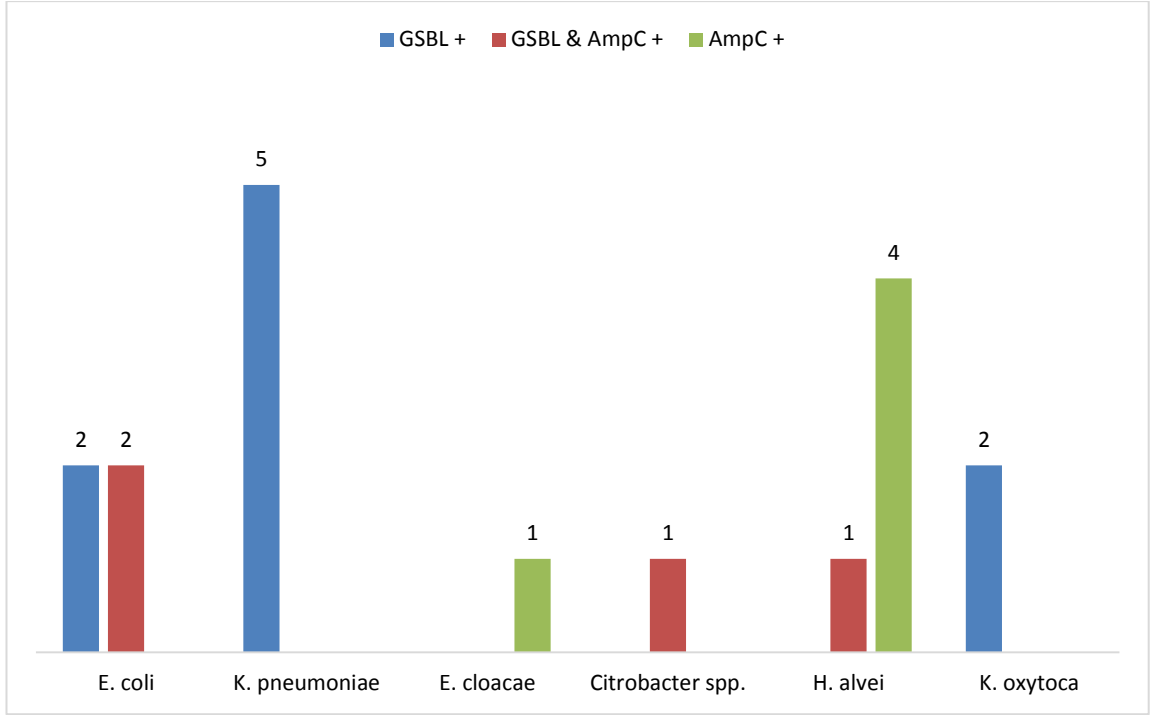
Madde 4.1'de tiplendirilmiş izolatlarda yapılan fenotipik inceleme sonucu 9 adet izolatta (5 *K. pneumoniae*, 2 *E. coli*, and 2 *K. oxytoca*) GSBL-, 4 adet izolatta (2 *E. coli*, 1 *H. alvei*, and 1 *Citrobacter* spp) GSBL- ve AmpC- kombinasyonu ve 5 adet izolatta (4 *H. alvei* and 1 *E. cloacae*) AmpC- tipi beta-laktamazlar karakterize edilmiştir. Tüm fenotipik Bulgular Çizelge 4.2, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te sunulmuştur.

Çizelge 4.3: GSBL- ve AmpC- pozitif izolatların tür bazında dağılımı

| Type | ESBL | ESBL and AmpC | AmpC | Total |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| <i>K. pneumoniae</i> | 5 | - | - | 5 (27.8%) |
| <i>H. alvei</i> | - | 1 | 4 | 5 (27.8%) |
| <i>E. coli</i> | 2 | 2 | - | 4 (22.2%) |
| <i>K. oxytoca</i> | 2 | - | - | 2 (11.2%) |
| <i>E. cloacae</i> | - | - | 1 | 1 (5.5%) |
| <i>Citrobacter</i> spp. | - | 1 | - | 1 (5.5%) |
| Total | 9 (50.0%) | 4 (22.2%) | 5 (27.8%) | 18 (100%) |



Şekil 4.2: Enterobacteriaceae izolatlarında GSBL- ve Amp- beta laktamazların dağılımı



Şekil 4.3: Beta-laktamazların

5 TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, toplam 83 adet peynir örneklerinde GSBL- ve AmpC- tipi beta-laktamazları üreten 18 adet izolat (%27,8 *K. pneumoniae*, %27,8 *H. alvei*, %22,2 *E. coli*, %11,2 *K. oxytoca*, %5,5 *E. cloacae* ve %5,5 *Citrobacter* spp.) fenotipik olarak karakterize edilmiştir.

Bilimsel araştırmalar, antibiyotiklere dirençlilik olgusunun antibiyotiklerin 1940'lı yıllarda keşfinden çok daha önce dönemlere kadar dayandığını ortaya koymaktadır. Moleküler incelemeler izolatların direnç kodlayan genlerin öncülerini taşıdıklarını göstermektedir (D'Costa ve ark. 2011).

Yirminci yüzyıla gelindiğinde hızla sanayileşen, nüfusu artan Dünyamızda gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda veteriner hekimlikte kullanılan antibiyotikler ve beşeri hekimlikte kullanılan antibiyotikler mikroorganizmalarda antimikrobiyal direnç gelişimini hızlandırmıştır. Veteriner hekimlik ve beşeri tıp dışında diğer gıdalar (meyveler ve sebzeler) için kullanılan her türlü haşere ve yabancı tola mücadele için geliştirilen ilaçlar çevresel mikroflorada bu direnç gelişimi sürecini ayrı bir şekilde etkilemiştir (Ata ve ark. 2013; Reuland ve ark. 2014).

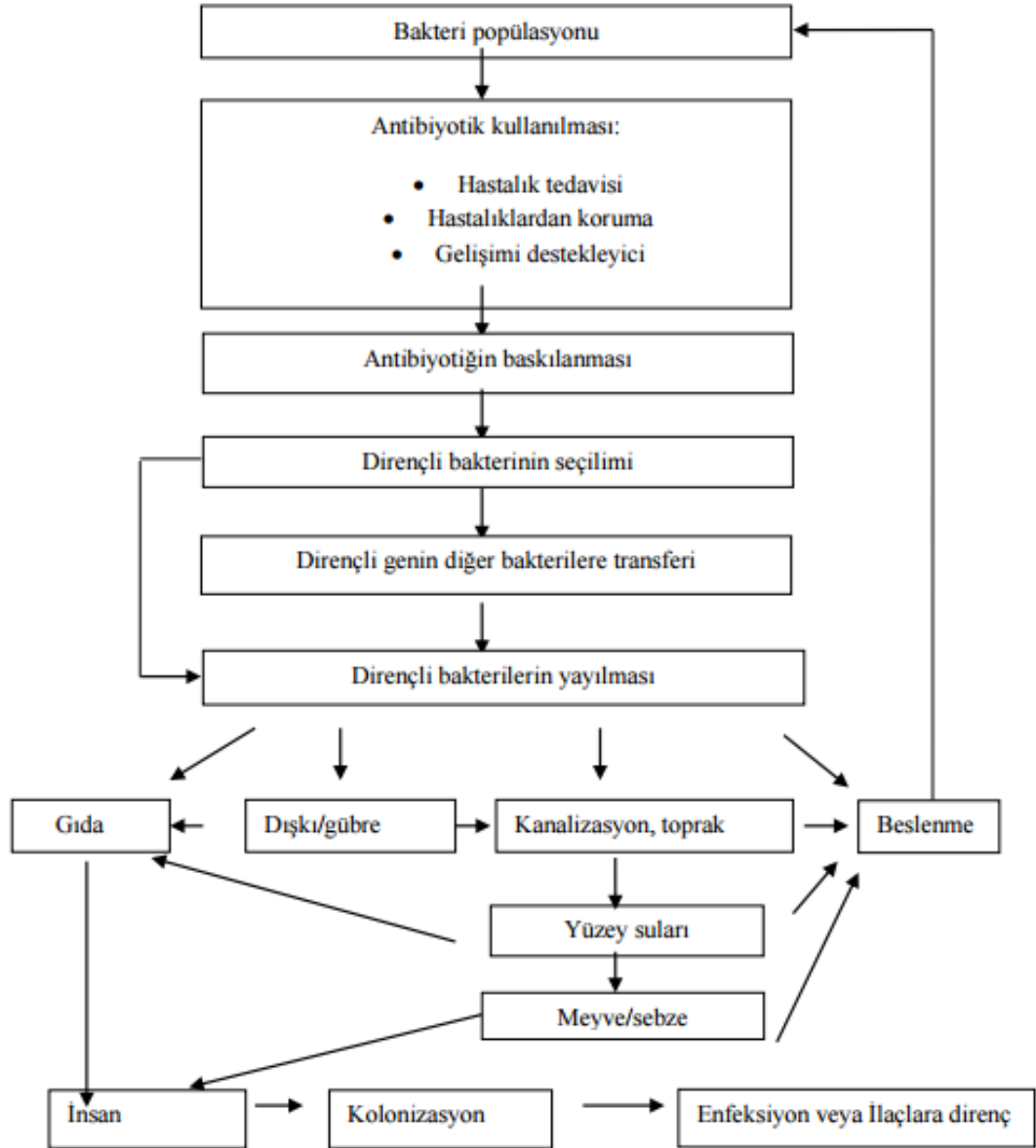
Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi her türlü mikroflorada tespit edilmiştir. Ancak, bu durumdan en çok etkilenen bakteri grubu enterobakteriler olmuştur. Bu tip bakteriler hayvan ve insan mikroflorasının doğal üyeleridir. Doğal olarak, Enterobacteriaceae türlerine bağlı infeksiyonlar ile mücadeleyi zorlaştırmaktadırlar. Dirençli enterobakteri kaynaklı infeksiyonlarda morbidite ve mortalite oranları normal infeksiyonlara nisbeten 2-3 kat daha yüksek seyretmekte ya da tedavileri zorlaştırarak uzamasına, sonuç olarak bakım ve tedavi giderlerinde ciddi artışlara yol açmaktadır (Lupo ve ark. 2013).

Araştırmalar antibiyotiklere dirençli bakterilerin ilk başta klinik kökenli olduklarını göstermiştir. Bu saptamanın arkasında yatan temel düşünce ise antibiyotiklerin beşeri tıpta infeksiyöz tedavisinde yaygın şekilde kullanıldıkları fikrinden doğmuştur (Overdeest ve ark. 2011).

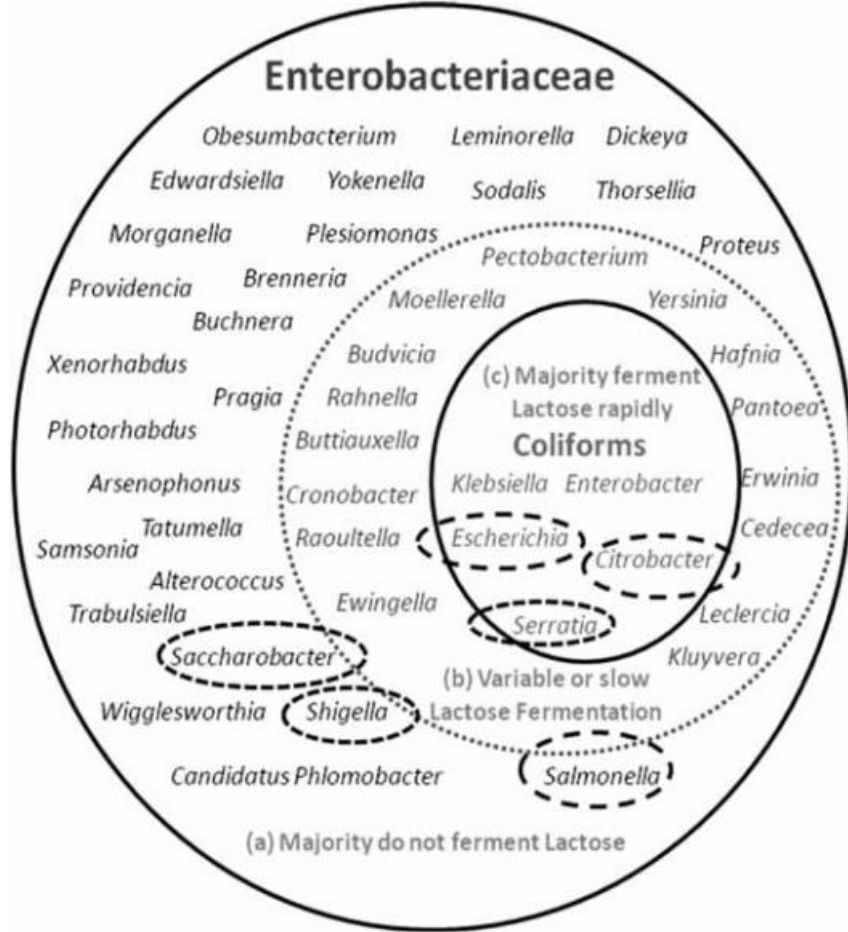
Uluslararası istatistikler beşeri tıpta kullanılan antibiyotik miktarının en az iki katının gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda kullanıldıklarını kesin şekilde göstermektedir. Bu bilgiye ek olarak, günümüzde yapılan ileri epidemiyolojik araştırmalar artık

antibiyotiklere dirençli suşların yalnız klinik ve gıda kökenli değil, toplumsal kökenliden yayıldıklarını göstermektedir. Dirençli bakterilerin hızlı yayılışları, bilimadamlarını sürekli yeni tiplerinin ortaya çıkışı, izlenmelerini, kontrol altına alınmalarını ve yeni nesil antibiyotiklerin tedavi güçlerinin azalmasını gibi durumları açıklayabilmek için daha ileri ve mültidisipliner çalışmalar yapmak durumunda bırakmaktadır (Stefani ve ark. 2014). Örneğin, hayvansal kaynaklı dirençli izolatlar ile klinik ve kökenli dirençli suşların genetik yakınlıkları ve/veya benzerlikleri tespit edilmektedir (Cogliani ve ark. 2011).

Çizelge 5.1: Antibiyotiğe dirençli bakterilerin hayvanlardan insanlara muhtemel geçiş rotaları (Meral ve Korukluoğlu, 2014).



Hayvancılığa dayalı süt ve süt ürünleri sektörü tüm Dünya nüfusu için en önemli besin girdilerinden birisini teşkil etmektedir. Süt ve süt ürünlerinin son tüketiciye ulaştırılması için gıda sanayi teknoloji yoğun programlar uygulamaktadır (Önen, 1999).



Şekil 5.1: Enterobacteriaceae familyası ve koliform bakteriler (ILSI Europe, 2011)

Gerek Dünya ve gerek Türkiye’de üretilen çiğ sütlerin dikkat çekici bir oranı peynir üretiminde kullanılırken, bir miktarı ise hiçbir ısı işlem görmeden taze ve yerel peynir çeşiti olarak direkt şekilde üretilmektedir (www.clal.it).

Türkiye açısından modern işletmecilik ilkelerinin uygulanmaması, farklı sütlerin karıştırılması gibi başlıca sorunlar peynir kalite ve sağlığını olumsuz şekilde etkilemektedir (Demir ve Aral, 2010). İşlenen tüketime sunulan ve direkt peynir üretiminde kullanılan sütler %80’i bulmakta, tüketici açısından mikrobiyolojik riskler içermektedir. Sütün bulaş olduğu özellikle enterobakteriler bir de dirençlilik özelliğine sahip ise, türdeş ve/veya farklı mikroorganizmalar arasında rahatlıkla aktarılabilen

mobil genetik elementler sayesinde pandemik şekilde yayılmaktadır. Bu durumda sıhhi olmayan sütlerden imal edilen peynirler tüketiciler açısından son derece riskli bir durum teşkil etmektedirler (İTO, 2002).

Bu alıŐma peynirlerde GSBL- ve AmpC- tipi beta laktamazları üreten enterobakteri suşlarının varlıklarını kesin Şekilde tespit etmiştir. Bulgularımız AB Codex Alimentarius Komisyonu ve diŐer Uluslararası sağlık otoritelerinin gıda kaynaklı dirençli bakterilerin yayılmalarının önlenmesi ve geniş Şekilde mücadele edilmesi politikalarının haklılığını göstermesi bakımından önem taŐıtmaktadır

Bu çalışmada mikrobiyolojik inceleme sonucu elde edilen toplam 18 adet izolat kütle spektrometresi ile tiplendirilmiştir. İzolatlarda Enterobacteriaceae dağılımının %27,8 *K. pneumoniae*, %27,8 *H. alvei*, %22,2 *E. coli*, %11,2 *K. oxytoca*, %5,5 *E. cloacae* ve %5,5 *Citrobacter* spp. olduğu saptanmıştır. İzole edilen dirençli bakterilerin tümü enterobakteri türü olup, Uluslararası Bulgular ile morfolojileri bakımından kesin Şekilde rtŐmektedir (Stefani ve ark. 2014). İzolatlarımız arasında *K. pneumoniae* ve *E. coli*'nin yüksek frekansta görülmeleri tüm Dünya'da dirençli *E. coli* türünün geniş Şekilde tespiti ile önlenemez yükseliŐini doğrulamaktadır (Kalter ve ark. 2010).

Dünya ve Türkiye açısından klinik kökenli GSBL_reten enterobakterilerin artan frekanslarının sebepleri yalnızca beşeri tıp amaçlı kullanılan antibiyotikler midir? Bu sorunun cevabı henüz net Şekilde ortaya koyulmamıŐtır. Ancak, ileri moleküler epidemiyolojik araştırmalar klinik kökenli, toplumsal kökenli ve gıda kökenli GSBL-üreten enterobakterilerin yayılışlarında çok sayıda farklı parametrenin etken ve konunun düŐünüldüėünden daha karmaŐık olduğunu göstermektedir. DiŐer bir deyiŐle, Ulusal otoritelerin yalnız ya da ortaklaşa kurdukları antibiyotik dirençlilik surveyans sistemleri bulguları altında dirençli tek bir izolatın ya da Ulusal frekans değerleri içinde toplumsal ve gıdaların hisseleri henüz anlaŐılmamıŐtır. Bu durumda, dirençli enterobakterilerin yayılışlarında gıdaların rollerinin daha derinlemesine incelenmesi gerekliliği görülmektedir. Ancak, Türkiye açısından veteriner hekimlikte kullanılan kesin antibiyotik miktarları ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten enterobakterilerin prevalansları hakkında somut sonuçlar mevcut bulunmamaktadır (Arslan ve zdemir 2008).

Fenotipik inceleme sonucunda bulgularımız peynirlerden izole edilen GSBL-üreten enterobakterilerin görülme sıklıklarının Uluslararası bir sorunun önemli bir parçası

olduğunu ortaya koymuştur (Kalter ve ark. 2010; Dahmen ve ark. 2013). Uluslararası araştırmalar özellikle çiğ sütlerden imal edilen peynirlerde dirençli enterobakterilere rastlandığını bildirmektedir (Kumar ve ark. 2010).

Isıl işlem görmemiş sütler ile imal edilen peynirler en çok gelişmiş ülkeleri tarafından tüketilmektedirler. Bu ülkeleri arasında Hollanda ve Fransa başı çekmektedirler (Dahmen ve ark. 2013). Peynirlerde sıklıkla tespit edilen Enterobacteriaceae suşları *E. coli* ve *Enterococcus* sübtipleridir ve özellikle GSBL pozitif *E. coli* prevelansı dikkat çekici şekilde artış göstermektedir (Wang ve ark. 2006).

GSBL- pozitif *E. coli* suşlarının peynirlerde bulunma frekansları Portekiz’de %80,9 (Amador ve ark. 2009), Fransa’da %5,8 (Dahmen ve ark. 2013), Hindistan’da %1,5 (Kar ve ark. 2015), Tayvan’da %10,5 (Su ve ark. 2014), İran’da %38 (Khoshbakht ve ark. 2014) ve Mısır’da %58,6 (Ahmed ve Shimamoto 2015) olarak bildirilmiştir.

Türkiye’de süt ve süt ürünlerinde antibiyotik kalıntıları ve/veya genel disk yaklaşımli testler ile suşların antibiyotik duyarlılıkları üzerine çalışmalar bulunmaktadır. Dümen ve ark (2011) ve Gürler ve ark (2013) incelemelerinde süt ve süt ürünlerinde antibiyotiklere duyarlı ve dirençli *L. monocytogenes* ve *Brucella* suşları tespit etmişlerdir.

Bu çalışmada dört adet izolatta (2 *E. coli*, 1 *H. alvei*, and 1 *Citrobacter* spp.) GSBL- ve AmpC- kombinasyonu ve beş adet izolatta (4 *H. alvei* and 1 *E. cloacae*) AmpC- tipi beta-laktamazlar karakterize edilmiştir. Enterobakteri tipi bazından Amp-C tipi beta-laktamazlar en çok *H. alvei* ve *E. coli*’de saptanmıştır. Bu nedenle Pérez-Pérez ve Hanson (2002) ve Kiratisin ve Henprasert (2010) çalışmaları ile örtüşmektedir.

En çok enterobakterilerde belirlenen ve diğer tip beta-laktamazlar ile bir arada bulunan AmpC tipi beta-laktamaz tüm sefalosporinlere, aztreonama ve penisilinlere karşı direnç göstermektedirler. Hatta (karbapenemler dışında) hariç tüm kalan diğer tüm beta-laktamlar bu tip bakterilere karşı etkisiz kalmaktadırlar (EFSA 2011).

Sonuç olarak, bu çalışmada klinik kaynaklı bulgular dışında, Türkiye’de gıda kaynaklı farklı direnç profillerinin kökenli GSBL ve Amp-C çoklu beta-laktamazları üreten enterobakterlerin peynirlerde varlıkları somut şekilde ortaya konulmuştur. AmpC tipi beta-laktamaz üreten Enterobacteriaceae suşunu önemli kılan şey bu tip beta-laktamazların tespitinde hata yapıldığı takdirde, umulmadık hızda çoğalacakları ve tedavileri kesin başarısız kılacakları gerçeklerdir (Thomson 2001). Bu nedenle,

tarama ve tespitleri için AmpC'den etkilenmeyecek yeni inhibitörler ve/veya yeni nesil antibiyotikler geliştirilmelidir.

Dirençli enterik bakterilerin gıdalarda varlıkları rutin şekilde kontrole dönük genel mikrobiyolojik değerler henüz gıda kodeksinde bulunmamaktadır. Bu sebeple, bu konunun tüm Dünya ve Türkiye açısından gündeme taşınması ve Uluslararası ve Ulusal gıda tebliğlerinden düzenlemeler yapılması kesinlikle bir ihtiyaçtır.

Bu çalışmada öne çıkan sonuçlar aşağıda sunulmuştur:

- Hayvansal kaynaklı gıda maddesi peynir örneklerinden izole edilen Gram (-) Enterobacteriaceae izolatlarında fenotipik yöntemler kullanarak genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ve AmpC-tipi beta laktamazlar karakterize edilmiştir.
- Uluslararası otoriteler tarafından tavsiye edilen genel yaklaşımli disk difüzyonu tesleri tatbik edilmiştir. Ancak, Uluslararası bilimsel literatür ile paralel olarak, farklı bir beta-laktamaz olan AmpC-tipi beta-laktamazlarda sıvı mikrodilüsyon yöntemi ile kesin şekilde tespit edilmiştir. Bulgular beta-laktamazların tespitlerinden kullanılan fenotipik yöntemlerin henüz tam olarak oturmadıklarını, sürekli takip ve geliştirme ihtiyaçları duyduklarını ortaya koymuştur.
- Klinik ve toplumsal kaynaklı durumlara ek olarak, hayvansal kaynaklı gıda maddelerinden peynirlerin de beta-laktamaz üreten Enterobacteriaceae suşlarının yayılmalarında etkin ve önemli rolleri oldukları bu çalışmada gösterilmiştir.
- Farklı suşlarda direnç profillerinin yalnız fenotipik yöntemler kullanılarak tespitlerinin yeterli olmadığını, moleküler tabanlı daha ileri test yöntemlerinin uygulanmaları ve geliştirilmeleri gerekliliği tespit etmiştir (Tekiner ve Özpınar, 2016).
- Peynirlerden izole edilen Enterobacteriaceae İzolatlarının çoklu ilaç dirençliliğine sahip olduklarını göstermiştir. Bu durum, gıda kaynaklı dirençli suşların yol açabilecekleri infeksiyonlarda hastaların tedavi olma şansını düşürdüğünü, morbidite ve mortalite riskini artırdığını kesin şekilde göstermiştir.

Sonuç olarak, gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlarda aşırı ve bilinçsiz antibiyotik kullanımının hayvansal kaynaklı gıda üretiminde antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin oluşumuna neden olduğu belirlenmiştir. Ülkemizde yaygın olarak tüketilen peynir ürünlerinin antibiyotiklere dirençli bakteriler ile bulaş olması halk sağlığı açısından büyük sorun teşkil etmektedir. Bu nedenle bu alandaki çalışmaların yaygınlaştırılması ve Gıda Güvenliği ile ilgili mevzuata antibiyotiklere karşı direnç kazanmış mikroorganizmalarında alınması gerekmektedir.

KAYNALAR

- Ahmed, A.M. ve Shimamoto, T.** (2015): Molecular analysis of multidrug resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 isolated from meat and dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, **193**, 68–73.
- Aktaş, F.** (2004): Beta Laktam- Beta Laktamaz İnhibitörü Antibiyotiklerin Klinik Kullanımı (II). Piperasilin- Tazobaktam, Tikarsilin- Klavulanik Asit ve Sefoperazon? Sulbaktam'ın Klinik Kullanımları. *Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*, **2**, 2, 123-127.
- Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, C. ve Brito, L.** (2009): Resistance to β -lactams in Bacteria Isolated from Different Types of Portuguese Cheese. *Int. J. Mol. Sci.*, **10**, 1538-1551.
- Araj, G.F.** (2000): Available laboratory tests to guide antimicrobial therapy. *J Med Liban*, **48**, 4, 199-202.
- Arslan, S. ve Özdemir, F.** (2008): Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from homemade white cheeses: prevalence and antibiotics susceptibility. *World J Microbiol Biotechnol*, **24**, 2361–2364.
- Ata, Z., Yıbar, A., Muştak, H.K., Temelli, S. ve Eyigör, A.** Tavuk Karkas Kökenli Salmonella İzolatlarında Plazmid İlişkili Kinolon Direnci, *5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi*, Antalya-Türkiye, (2013) pp:7.
- Bastos, Mde.S., Menegucci, T.C., Moreira, R.R., Garcia, L.B., Cardoso, C.L. and Tognim, M.C.** (2015): A rapid and simple method to detect ESBL in *Enterobacter cloacae* based on MIC of cefepime. *Rev Soc Bras Med Trop*, **48**, 2, 208-211.
- Call, D.R., Davis, M.A. ve Sawant, A.A.** (2008): Antimicrobial resistance in beef and dairy cattle production. *Anim Health Res Rev*, **9** (2):159-167.
- Capita, R. ve Alonso-Calleja, C.** (2013): Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **53**, 11-48.
- CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-Third Informational Supplement, CLSI Document M100-S23, CLSI, Wayne PA, (2013).
- Cogliani, C., Goossens, H. ve Greko, C.** (2011): Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe*, **6**, 274-279.
- Coşkun, S. ve Altanlar, N.** (2012): AmpC Beta-laktamazlar. *ANKEM Derg* **26**(4):203-214.
- Çalgın, M.K., Çetinkol, Y. ve Yıldırım, A.A.** (2014): Extended Spectrum Beta-Lactamase Production and Antimicrobial Resistance Rates of the *Escherichia coli* Strains Isolated from Urine Samples. *Odu J Med*, **2**: 36-40.
- Dağlar, D. ve Öngüt, G.** (2012): Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve Tanı Yöntemleri. *İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi*, **1**, 1-9.
- Dahmen, S., Métayera, V., Gayb, E., Madeca, J.Y. ve Haennia, M.** (2013): Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying

- plasmids and clones of *Enterobacteriaceae* causing cattle mastitis in France. *Veterinary Microbiology*, **162**, 793–799.
- D'Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B., Poinar, H.N. ve Wright, G.D. (2011):** Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, **477**, 7365, 457-461.
- Demir, P. ve Aral, S. (2010):** Kars İli Süt Sanayi İşletmelerinde Üretim ve Sanayi Entegrasyonunun Ekonomik ve Sosyo-Ekonomik Analizi. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **16** (4): 585-592.
- Demirbakan, H., Midilli, K., Ögünç, D., Özen, N., Öngüt, G., Dağlar, D., Mutlu, D., Özhak, B. ve Çolak, D. (2008):** Sefoksitine dirençli ya da az duyarlı saptanan *Klebsiella* spp. ve *Escherichia coli* izolatlarında plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzim tiplerinin araştırılması. *Mikrobiyol Bul*, **42**: 545-551
- Drieux, L., Brossier, F., Sougakoff, W. ve Jarlier, V. (2008):** Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. *Clinical Microbiology and Infection*, **14**, Supp-1, 90–103.
- Dümen, E., Issa, G., İkiz, S., Bağcıgil, F., Özgür, Y., Kahraman, T., Ergin, S. ve Yeşil, O. (2011):** Determining Existence and Antibiotic Susceptibility Status of *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy Products, Serological and Molecular Typing of the Isolates. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, **17**, 111-119.
- EFSA. (2010):** The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2008. *EFSA Journal*, **8**, 1658.
- EFSA. (2011):** Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum β -lactamases and/or AmpC β -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal*, **9**, 2322-2417.
- Eraksoy, H. (2008):** Antimicrobial Resistance and Resistance Mechanisms. *Türkiye Klinikleri J Inf Dis-Special Topics*, **4**, 1-14.
- Espino, H. M., Alvarez, V.E., Zayas, T.A. ve Contreras, A.R. (2010):** Detection of expanded-spectrum-beta-lactamases by DIRAMIC system: comparison with the double-disk synergy test and E-test. *Rev Chilena Infectol*, **27**, 6, 544-550.
- EUCAST. Guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance. Version 1.0 December 2013.**
- Ganter, B. ve Stelling, J. (2011):** Expert consultation on antimicrobial resistance, WHO-Regional Office for Europe, Copenhagen-Denmark.
- Ghafourian, S., Sadeghifard, N., Soheili, S. ve Sekawi Z. (2014):** Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology, *Curr Issues Mol Biol.*, **17**, 11-22.
- Goossens, H. ve Grabein, B. (2005):** revalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β -lactamase– and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997–2004). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **53**: 257-264.
- Grover, N., Sahni, A.K. ve Bhattacharya, S. (2013):** Therapeutic challenges of ESBLs and AmpC beta-lactamase producers in a tertiary care center. *Med J Armed Forces India*, **69**(1): 4–10.
- Gülây, Z. (2002):** Antibiyotik Duyarlılık Testlerinin Yorumu. *Toraks Dergisi*, **3**, 75-88.

- Gülmez, D.** (2014): Antimikrobiyal direnci belirlemede fenotipik yöntemler veya klasik yöntemler. *ANKEM Derg.*, **28**, 221-228.
- Gür, D.** (2008): Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç, ‘Topçu, A.W., Söyletir, G. ve Doğanay, M. (eds). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*, Cilt 1, s.243-257, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Gürler, Z., Pamuk, Ş., Yıldırım, Y. ve Ertaş, N.**, Tüketime Hazır Gıdaların Mikrobiyolojik Güvenliği: *Salmonella* spp. ve *Listeria monocytogenes* İzolatlarının Antibiyotik Dirençliliği, 5. Ulusal Veteriner Gıda Hijyeni Kongresi, Antalya-Türkiye, (2013), pp:157.
- İTO.** (2002): Dünya ve Türkiye’de Süt ve Süt Ürünleri Sanayinde Gelişmeler, Yayın No:2002- 7 S:46.
- Kalter, H.D., Gilman, R.H., Moulton, L.H., Cullotta, A.R., Cabrera, L. ve Velapatiño, B.** (2010): Risk Factors for Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* Carriage in Young Children in Peru: Community-Based Cross-Sectional Prevalence Study. *Am J Trop Med Hyg.*, **82**, 879–888.
- Kar, D., Bandyopadhyay, S., Bhattacharyya, D., Samanta, I., Mahanti, A., Nanda, P.K., Mondal, B., Dandapat, P., Das, A.K., Dutta, T.K., Bandyopadhyay, S. ve Singh, R.K.** (2015): Molecular and phylogenetic characterization of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from poultry and cattle in Odisha, India. *Infection Genetics and Evolution*, **29**, 82–90.
- Kaye, K.S., Engemann, J.J., Fraimow, H.S. ve Abrutyn, E.** (2004): Pathogens resistant to antimicrobial agents: epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infect. Dis. Clin. North Am*, **18**: 467–511.
- Kaynar, P.** (2011): Ülkemiz Peynirleri Üzerine Mikrobiyolojik Araştırmalar. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **41**(1):1-8.
- Khoshbakht, R., Shahed, A. ve Aski, H.S.** (2014): Characterization of Extended Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichiae coli* Strains Isolated From Dairy Products. *J Microbiol Biotech Food Sci*, **3**, 333-336.
- Kiratisin, P. ve Henprasert, A.** (2010): Genotypic analysis of plasmid-mediated beta-lactamases amongst Enterobacteriaceae other than *Escherichia* spp. and *Klebsiella* spp. that are non-susceptible to a broad-spectrum cephalosporin. *Int J Antimicrob Agents*, **36**, 4, 343-347.
- Koldaş, K., Mumcuoğlu, İ., Karahan, Z.C., Coşkun, F.A., Kurşun, Ş. ve Aks, N.** (2011): Enterobacteriaceae Suşlarında Plazmid Kökenli AmpC Beta-Laktamaz Varlığının Multipleks PZR ve Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, **41**, 2, 65-72.
- Kumar, A., Talwar, A., Dhatwalia, V.K.** (2010): Antimicrobial Resistance Patterns of *Klebsiella* spp. Isolated from Raw Milk of Doon Valley. *Journal of Biotechnology*, **150**, 425–426.
- Laxminarayan, R., Duse, A., Wattal, C., Zaidi, A.K., Wertheim, H.F., Sumpradit, N., Vlieghe, E., Hara, G.L., Gould, I.M., Goossens, H., Greko, C., So, A.D., Bigdeli, M., Tomson, G., Woodhouse, W., Ombaka, E., Peralta, A.Q., Qamar, F.N., Mir, F., Kariuki, S., Bhutta, Z.A., Coates, A., Bergstrom, R., Wright, G.D., Brown, E.D., Cars, O.** (2013): Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis*, **13**, 12, 1057-1098.
- Leverstein-van Hall, M.A., Fluit, A.C., Paauw, A., Box, A.T., Brisse, S. ve Verhoef, J.** (2002): Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-

- spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *J Clin Microbiol*, **40**, 10, 3703-3711.
- Lupo, A., Papp-Wallace, K.M., Sendi, P., Bonomo, R.A. ve Endimiani, A.** (2013): Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **77**, 179-194.
- Marshall, B.M. ve Levy, S.B.** (2011): Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clin Microb. Rev.*, **24**, 718-733.
- Meral, H. ve Korukluoğlu, M.** (2014): Laktik Asit Bakterilerinin Antibiyotik Direnç Mekanizmaları. *Journal of Agricultural Faculty of Uludag University*, **28**, 2, 71-82.
- Mohanty, S., Gaiind, R., Ranjan, R. ve Deb, M.** (2009): Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria. *J Infect Dev Ctries*, **21**, 4, 1, 24-29.
- MSU Michigan State University.** Mechanisms of Resistance Against Different Antimicrobial Classes, Erişim: <http://amrls.cvm.msu.edu>, erişim tarihi 2011.
- Numanovic, F., Hukic, M., Delibegovic, Z., Tihic, N., Pasic, S. ve Gegic, M.** (2013): Comparison of double disk synergy test, VITEK 2 and Check-MDR CT102 for detection of ESBL producing isolates. *Acta Med Acad*, **42**, 1, 15-24.
- Öncül O.** (2002): Antibiyotikler I. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar. Sempozyum Dizisi, 31: 23-38.
- Orak, F.A.** (2005): Hastane Enfeksiyonuna Neden Olan Gram-Negatif Bakterilerde Direnç Paterni ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Tayini, Uzmanlık Tezi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ABD, Adana, Türkiye.
- Overdeest, I., Willemsen, I., Rijnsburger, M., Eustace, A., Xu, L., Hawkey, P., Heck, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., van der Zwaluw, K., Huijsdens, X. ve Kluytmans, J.** (2011): Extended-spectrum beta-lactamase genes of *Escherichia coli* in chicken meat and humans, *The Netherlands Emerg Infect Dis*, **17**, 1216-1222.
- Öcal, D.** (2012): Gram Negatif Bakterilerde Antibakteriyal Direncin Fenotipik Yöntemler ile Tayin ve Bildirimi. *ANKEM Derg*, **26**, 154-164.
- Önen M.O.** (1999): Süt ve süt ürünleri sektörü. Türkiye Kalkınma Bankası Sektörel Araştırmalar, Araştırma Müdürlüğü Nisan 1999, Ankara, Türkiye. (Erişim: http://www.daka.org.tr/panel/files/files/belgeler/planlama/sut_urunleri.pdf).
- Pai, H., Kang, C.I., Byeon, J.H., Lee, K.D., Park, W.B., Kim, H.B., Kim, E.C., Oh, M.D., Choe, K.W.** (2004): Epidemiology and clinical features of bloodstream infections caused by AmpC-type-β-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, **48**: 3720-3728.
- Pérez-Pérez, F.J. ve Hanson, N.D.** (2002): Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, **40**, 6, 2153-2162.
- Pfaller, M.A. ve Segreti, J.** (2006): Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis*, **42**, Suppl 4, 153-163.
- Polsfuss, S., Bloemberg, G.V., Giger, J., Meyer, V. ve Hombach, M.** (2012): Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and CLSI screening parameters for the detection of extended-spectrum β-lactamase production in clinical *Enterobacteriaceae* isolates. *J Antimicrob Chemother*, **67**, 1, 159-166.

- Qurbanov, A.İ. ve Attar, A.** (2007):The Effect of Antioxidants on Antibiotic Sensitivity of Bacteria. *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, **64**, 2, 14-20.
- Rao, L., Lv, L., Zeng, Z., Chen, S., He, D., Chen, X., Wu, C., Wang, Y., Yang, T., Wu, P., Liu, Y. ve Liu, J.H.** (2014): Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003–2012. *Veterinary Microbiology*, **172**, 534–541.
- Rao, S.P.N., Rama, P.S., Gurushanthappa, V., Manipura, R. ve Srinivasan, K.** (2014): Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: A Multi-Centric Study Across Karnataka. *J Lab Physicians*, **6**, 1, 7–13.
- Reuland, E.A., al Naiemi, N., Raadsen, S.A., Savelkoul, P.H.M., Kluytmans, J.A.J.W., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E.** (2014): Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, **33**, 1843–1846.
- Rhodes, N.J., Richardson, C.L., Heraty, R., Liu, J., Malczynski, M., Qi, C. ve Scheetz, M.H.** (2014): Unacceptably high error rates in Vitek 2 testing of cefepime susceptibility in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **58**, 7, 3757-3761.
- Rice, L.B.** (2009): The clinical consequences of antimicrobial resistance. *Curr Opin Microbiol*, **12**, 5, 476-481.
- Sarmah, AK., Meyer, M.T., Boxall, A.B.** (2006): A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, **65** (5):725-59.
- Sawant, A.A., Hegde, N.V., Straley, B.A., Donaldson, S.C., Love1, B.C., Knabel, S.J. ve Jayarao, B.M.** (2007): Antimicrobial-Resistant Enteric Bacteria from Dairy Cattle. *Appl. Environ. Microbiol*, **73** (1): 156-163.
- Shi, H., Sun, F., Chen, J. Ou, Q., Feng, W., Yong, X. ve Xia. P.** (2015): Epidemiology of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing nosocomial -*Escherichia coli* infection in China. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, **14**, 4, doi: 10.1186/s12941-015-0063-7.
- Soltani, R., Ehsanpoor, M., Khorvash, F. ve Shokri, D.** (2014): Antimicrobial susceptibility pattern of extended-spectrum β -lactamase-producing bacteria causing nosocomial urinary tract infections in an Iranian referral teaching hospital. *J Res Pharm Pract*, **3**, 1, 6-11.
- Somer, A.** (2010): Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Turk Arch Ped*, **45**, 45-49.
- Stefani, S., Giovanelli, I., Anacarso, I., Condò, C., Messi, P., Niederhäusern, de S., Bondi, M., Iseppi, R. ve Sabia, C.** (2014): Prevalence and characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in food-producing animals in Northern Italy. *New Microbiologica*, **37**, 551-555.
- Su, Y., Yu, C.Y., Tsai, Y., Wang, S.H., Lee, C. ve Chu, C.** (2014): Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan. *Journal of Microbiology Immunology and Infection*, doi:10.1016/j.jmii.2014.10.003.
- Sun, S., Berg, O.G., Roth, J.R. ve Andersson, D.I.** (2009): Contribution of Gene Amplification to Evolution of Increased Antibiotic Resistance in *Salmonella typhimurium*. *Genetics*, **182**, 1183–1195.

- Şadan, G.** (2003): Beta-Laktam Antibiyotikler. *Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*, **1**, 2, 194-202.
- Taneja, N., Rao, P., Arora, J. ve Dogra, A.** (2008): Occurrence of ESBL & Amp-C b-lactamases & susceptibility to newer antimicrobial agents in complicated UTI. *Indian J Med Res*, **127**: 85-88.
- Tekiner, İ.H. ve Özpınar, H.** (2016): Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae from foods of animal origin. *Braz J Microbiol*. DOI: 10.1016/j.bjm.2015.11.034.
- Thomson, K.S.** (2010): Extended-Spectrum-β-Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *J Clin Microbiol*, **48**, 4, 1019–1025.
- Tomlin, P., Sand, C. ve Rennie, R.P.** (2001): Evaluation of E test, disk diffusion and broth microdilution to establish tentative quality control limits and review susceptibility breakpoints for two aerobic actinomycetes. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **40**, 4, 179-186.
- Turner, P.J.** (2009): MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*, **63**, 217–222.
- Tükenmez-Tigen, E. ve Mülazımoğlu, L.** (2012): Extended-Spectrum β-Lactamases and Their Clinical Importance in Community-Acquired Infections. *Klimik Dergisi*, **25**, 3, 94-98.
- Ulusoy, S.** (2004): Antibakteriyel Ajanlar. *Türkiye Klinikleri J Urology*, **1**, 2, 187-196.
- Türkiye Halk Sağlığı Kurumu Başkanlığı (THSKB)** “Ulusal Antimikrobiyal Direnç Surveyans Sistemi 2012 Yılı Yıllık Raporu Ankara, Türkiye (Erişim: http://uamdss.thsk.gov.tr/index.php?option=com_phocadownload&view=category&download=20:uamdss-2011-raporu&id=6:raporlar&Itemid=13, erişim tarihi: 2015).
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A. ve Laxminarayan, R.** (2015): Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci USA*, **112** (18):5649-54.
- Verraes, C., van Boxstael, S., van Meervenne, E., van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, MA., van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J. ve Herman, L.** (2013): Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **10**, 2643-2669.
- Waldeisen, J.R., Wang, T., Mitra, D., ve Lee, L.P.** (2011): A real-time PCR antibiogram for drug-resistant sepsis. *PLoS One*, **6**, e28528.
- Wang, H.H., Manuzon, M., Lehman, M., Wan, K., Luo, H., Wittum, T.E., Yousef, A. ve Bakaletz, L.O.** (2006): Food commensal microbes as a potentially important avenue in transmitting antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **254**, 226–231.
- Wang, P., Hu, F., Xiong, Z., Ye, X., Zhu, D., Wang, Y.F. ve Wang, M.** (2011): Susceptibility of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae according to the new CLSI breakpoints. *J Clin Microbiol*, **49**, 9, 3127-3131.
- Wang, H., McEntire, J.C., Zhang, L., Li, X. ve Doyle, M.** (2012): The transfer of antibiotic resistance from food to humans: facts, implications and future directions, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, **31**, 249-260.
- WHO.** (2013): Integrated surveillance of antimicrobial resistance: guidance from a WHO Advisory Group. ISBN 978 92 4 150631 1, Switzerland.

- Wiegand, I., Geiss, H.K., Mack, D., Stürenburg, E. ve Seifert, H.** (2007): Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases among Enterobacteriaceae by Use of Semiautomated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. *J Clin Microbiol*, **45**, 4, 1167–1174.
- Willemsen, I., Overdeest, I., Al Naiemi, N., Rijnsburger, M., Savelkoul, P., Vandenbroucke-Grauls, C., Kluytmans, J. Ve TRIANGLE Study Group.** (2011): New diagnostic microarray (Check-KPC ESBL) for detection and identification of extended-spectrum beta-lactamases in highly resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*, **49**, 8, 2985-2987.
- Yapraklı, Ş., Uçan, Ö.F., ve Çamurcu, F.** (2015): A reserach on marketing problems of Erzincan tulum cheese manufacturer's and the suggestions. ERZSOSDER, VIII-II: 105-114.
- Yıldırım, Y.** (2010): Antimikrobiyel Duyarlılık Testleri; İlgili Metodlar, Sonuçların Yorumlanması ve Kanatlılarda Bulunan Bazı Bakterilerdeki Dirençlilik. *J Fac Vet Med Univ Erciyes*, **7**, 117-129.

ÖZGEÇMİŞ



ADI SOYADI : Aylin Özadam
DOĞUM TARİHİ ve YERİ : 08 Nisan 1971, İzmir
TEL (GSM) : 0 532 401 42 48
E-POSTA : aylin.ozadam@ayos.com.tr

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Yüksek Lisans:** 2016, İstanbul Aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Güvenliği ve Beslenme Anabilim Dalı, Gıda Güvenliği (Tezli) Yüksek Lisans Programı, İstanbul-Türkiye.
- **Lisans:** 1995, Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, İzmir, Türkiye.

TEZDEN TÜRETİLEN MAKALE:

- **Özadam A,** Özpınar H. Pnetypic Determination of ESBL- and AmpC-producing Enterobacteriaceae in Cheese Samples. **Kabul edildi:** *International Journal of Food Engineering Research*, (2016).