

T. C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEEN
ENTEROBACTERIACEAE TÜRLERİNİN SÜTLERDEKİ PREVELANSI VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Fatma GÖKALP
Y1413.210008

GIDA GÜVENLİĞİ VE BESLENME ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

EYLÜL - 2015

T. C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN
ENTEROBACTERIACEAE TÜRLERİNİN SÜTLERDEKİ PREVELANSI VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ
Fatma GÖKALP

GIDA GÜVENLİĞİ VE BESLENME ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

EYLÜL - 2015



T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Yüksek Lisans Tez Onay Belgesi

Enstitümüz Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı Gıda Güvenliği Tezli Yüksek Lisans Programı Y1413.210008 numaralı öğrencisi **Fatma GÖKALP**'in "GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEK ENTEROBACTERİACEAE TÜRLERİNİN SÜTLERİNDEKİ PREVELANSI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 01.09.2015 tarih ve 2015/19 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından *oy.burcu* ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak *kabul* edilmiştir.

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi :18/09/2015

1)Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

[Handwritten signature]

2) Jüri Üyesi : Prof. Dr. Güner ARKUN

[Handwritten signature]

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

[Handwritten signature]

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

Tez referans numarsı :10104833

BEYAN

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Üreten Enterobacteriaceae Türlerinin Sütlerdeki Prevelansı ve Antibiyotik Dirençlilik Durumlarının İncelenmesi” başlıklı bu çalışmayı baştan sona kadar danışmanım Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR’ın sorumluluğunda tamamladığımı, başka kaynaklardan aldığım bilgileri metinde ve kaynakçada eksiksiz olarak gösterdiğimi, çalışma sürecinde bilimsel araştırma ve etik kurallara uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul ettiğimi beyan ederim. 18/09/2015

(İmza)

Fatma GÖKALP

ÖNSÖZ

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde bana yardımcı olan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, teşvikleriyle beni daima destekleyen İstanbul Aydın Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü ve Öğretim Üyesi Sayın Hocam, Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR'a, bilgi ve deneyimlerinden faydalanma olanaklı bulduğum İsmail Hakkı TEKİNER'e ve laboratuvar çalışmalarımda süresince bilgi ve deneyimleriyle bana destek olan ve yardımlarını esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Kamil BOSTAN'a, doğduğum günden beri her koşulda yanımda olan, yetişmemde büyük özveriler gösteren sevgili aileme, lisans hayatımdan bu yana hiçbir zaman beni yalnız bırakmayan, maddi ve manevi her şekilde bana destek olan manevi babam Sn. Osman PARLAK'a bir arada çalıştığım tüm laboratuvar arkadaşlarıma ve bu süreçte beni her şekilde desteklemiş olan bütün arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Fatma GÖKALP

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 3.1	Örnek alma işlemi.....	22
Şekil 3.2	Boşaltma hattı filtre drenajından örnek alma işlemi.....	24
Şekil 3.3	Ön zenginleştirme işlemi	30
Şekil 3.4	GSBL şüpheli koloni saflaştırma	31
Şekil 3.5	Selektif besiyerine geçiş	31
Şekil 3.6	Antibiyotik disk yerleştirme	33
Şekil 3.7	Disk difüzyon testi	33
Şekil 3.8	Vitek-MS ile Tiplendirme.....	34
Şekil 3.9	Vitek-Ms ile pleytlere inokülasyon.....	35
Şekil 3.10	Pleytlerin spektrofotometrede okutulması işlemi.....	35
Şekil: 3.11	Antibiyogram Doğrulama.....	36
Şekil: 3.12	GSBL üreten enterobakterlerin direnç yüzdelerinin dağılımı.....	39
Şekil: 3.13	GSBL üreten bakterilerin direnç profilleri.....	39

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1 Çiğ süt numuneleri ve alındıkları yer	23
Çizelge 2 Enterobacteriaceae enrichment broth kompozisyonu	26
Çizelge 3 GSBL kromojen agar kompozisyonu.	27
Çizelge 4 Mueller Hinton agar kompozisyonu	28
Çizelge 5 Mueller-Hinton Broth kompozisyonu	29
Çizelge 6 Trypton soya agar kompozisyonu	29
Çizelge 7 Tiplendirme sonuçları	38
Çizelge 8 GSBL tarama sonuçları	39

İÇİNDEKİLER

TEZ ONAYI	I
BEYAN.....	II
ÖNSÖZ.....	III
ŞEKİL LİSTESİ.....	IV
TABLO LİSTESİ	V
İÇİNDEKİLER	VI
KISALTMALAR	IX
ÖZET.....	X
ABSTRACT.....	XI
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Enterobacteriaceae ailesi bakterilerin genel özellikleri.....	3
2.1.1. Enterobacteriaceae	
.....Hata! Yer işareti tanımlanmamış.	
2.1.2 Enterobacteriaceae ailesinin önemli türleri	3
2.1.2.1. Escherichia (E.)coli.....	3
2.1.2.2. Klebsiella spp	4
2.1.2.3. Enterobacter	4
2.1.2.4 Enterococcus	5
2.2. Gıda maddelerindeki Enterobacteriaceae varlığı	5
2.3. Gram negatif bakterilerin halk sağlığı açısından önemi	7
2.4. Antibiyotikler ve kullanım amaçları	7
2.5. Antibiyotik direnci	8
2.6. Beta-laktam grubu antibiyotikler	9
2.6.1 Penisilinler	10
2.6.2 Sefalosporinler	11
2.6.3 Monobaktamlar	11
2.6.4 Karbapanemler	12
2.7. Beta-laktamazlar ve direnç mekanizmaları	12
2.7.1 Geniş spektrumlu beta -laktamazlar (GSBL).....	13
2.7.2 GSBL'lerin klinikte neden olduğu sorunlar.....	14
2.7.3 Ülkemiz ve dünyada GSBL görünme sıklığı.....	15
2.7.4 Süt sığırcılığında antibiyotik kullanımı.....	15
2.8.Süt örneklerinde GSBL üreten bakteriler üzerine yapılan çalışmalar.....	17
2.9.Bakterilerde antibiyotik direnç gelişimi ve oluşturduğu sorunlar.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	22
3.1.Gereç	22

3.1.1. Çiğ süt örneklerinin toplanması	22
3.1.2. Kullanılan cihaz ve ekipmanlar	25
3.1.3. Kullanılan kimyasal malzemeler ve besiyerleri.....	26
3.2.Yöntem	30
3.2.1. Süt örneklerinden gram negatif bakterilerin izolasyonu.....	30
3.2.1.1. Ön zenginleştirme	30
3.2.1.2. Selektif besiyerine geçiş	30
3.2.1.3. Saflaştırma	31
3.2.1.4. Oksidaz Testi	31
3.2.1.5. Gram negatif izolatların antibiyotik duyarlılıklarını belirleme.....	31
3.2.1.6. Disk difüzyon testi	32
3.2.1.7. Disk difüzyon konfirmasyonu testi	32
3.2.1.8. Vitek® MS ile tiplendirme.....	33
3.2.1.9. Antibiyotik Doğrulama ve MİK Değerlerinin Tayini.....	34
4. BULGULAR	37
4.1. Mikrobiyolojik bulgular	37
4.2. Selektif zenginleştirme bulguları.....	37
4.3. Oksidaz testi bulguları	38
4.4. Fenotipik bulgular	38
4.4.1. Disk difüzyon testi bulguları.....	38
4.3. Vitek-MS ile tiplendirme bulguları.....	38
4.4. Antibiyotik doğrulama ve MİK tayini bulguları.....	38
5.TARTIŞMA VE SONUÇ.....	41
KAYNAKLAR	47
ÖZGEÇMİŞ.....	57

SİMGELER VE KISALTMALAR

AB	Avrupa Birliği
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
AMD	Antimikrobiyal Direnç
TSA	Trypton Soy Agar
TSB	Trypton Soy Broth
µl	Mikrolitre
ph	Asitlik değeri
gr	Gram
L	Litre
µ	Mikron
µg	Mikrogram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
-	Negatif
+	Pozitif
oC	Santigrat derece
BL	Beta-Laktamaz
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz
ESBL	Extented Spectrum Beta-Lactamase
CAZ	Seftazidim
CAZ CV	Seftazidim Klavulanik Asitli
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPD	Sefpodoksim
CPD CV	Sefpodoksim Klavulanik Asitli
CTX	Sefotaksimaz/Sefotaksim
CTX CV	Sefotaksim Klavulanik Asitli
dk	Dakika
MHA	Mueller Hinton Agar
mik	Minimal İnhibitör Konsantrasyonu

GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN ENTEROBACTERIACEAE TÜRLERİNİN SÜTLERDEKİ PREVELANSI VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİK DURUMLARININ İNCELENMESİ

ÖZET

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) penisilin, sefalosporin ve monobaktamlar gibi beta laktam antibiyotikleri hidrolize edebilme yeteğine sahip enzimlerdir. Özellikle GSBL üreten Gram negatif enterobakterilerin hayvansal gıdalardaki artan yayılımı gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından Dünya genelinde önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu çalışma İstanbul ili ve çevre bölgelerden toplanan 135 adet çiğ süt örneğinde GSBL-üreten Enterobacteriaceae familyası üyesi bakterilerin varlıklarını araştırmak amaçlanmıştır. Örnekler sırasıyla Enterobacteriaceae zenginleştirme buyyonda ön zenginleştirme işlemine alınmış ve devamında kromojen GSBL selektif agar üzerine sürme yöntemle ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonunda selektif besiyerinden gelişen GSBL şüpheli izolatlar Trypton Soy agarda subkültür edilerek saflaştırılmıştır. Saflaştırılan kolonilere oksidaz testi uygulanmış ve oksidaz negatif sonuç veren izolatlar Kütle Spektrometeresi (Vitek® MS, bio Merieux) ile tiplendirilmişlerdir. Tiplendirmesi yapılmış GSBL şüpheli enterobakterler seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX) ve sefpodoksim (CPD) antibiyotik diskleri kullanılarak GSBL varlığı bakımından taranmışlardır. GSBL şüpheli izolatların doğrulaması klavulanik asit (CV) içeren türdeş diskler kullanılarak yapılmıştır. Kesin GSBL şüpheli türlerin konfirmasyonu ve MİK değeri tayini Merlin Micronaut-S beta-lactamase VII kiti prosedürü takip edilerek sıvı mikrodilüsyon yöntemiyle gerçekleştirilmiş, okulamalar multiscan spektrometre ile alınmış ve okuma sonuçları otomatik olarak bir yazılım tarafından değerlendirilmiştir. GSBL tarama ve doğrulama testlerinin tümü Clinical and Laboratory Standarts Institute (2013) talimatları takip edilerek uygulanmıştır. İncelenen çiğ süt örneklerinden toplam 40 adet GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatları elde edilmiştir. GSBL konfirmasyonu testi sonucu bu izolatların 29 adeti kesin GSBL pozitif olarak tespit edilmiştir. En baskın GSBL-üreten fenotip *E. coli* (%79,4) olarak belirlenirken, bunu *E. cloacae* (%10,3) ve *C. braakii* (%10,3) izlemiştir. Elde edilen bulgulara göre; çiğ süt örneklerinde GSBL-üreten Enterobacteriaceae türlerinin varlıkları tespit edilmiş olup, halk sağlığı açısından potansiyel risk oluşturdukları sonucuna varılmıştır. Son yıllarda antibiyotiklere dirençli bakterilerin görülme sıklıklarındaki artış sebebiyle bilinçli antibiyotik kullanımı politikalarının yaygınlaştırılması ve GSBL-üreten enterobakterilerin gıda güvenliği gösterge parametere olarak kodekslere konulması gerekmektedir.

Anahtar Kelimeler: GSBL, Enterobacteriaceae, Süt, Gıda Güvenliği, Halk Sağlığı

INVESTIGATION OF PREVALENCE AND ANTIBIOTIC RESISTANCE PROFILE OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASE-PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE IN RAW MILK SAMPLES

ABSTRACT

Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) are the enzymes that hydrolyze modern beta-lactam antibiotics such as penicillins, cephalosporins, monobactams and aztreonam. The increasing prevalence of ESBL-producing Gram negative bacteria has become a problem worldwide for food safety and public health. The objective of this study was to investigate the prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in a total of 135 raw milk samples collected from Istanbul and the surrounding districts. After pre-enrichment in Enterobacteriaceae Enrichment broth and selective enrichment on a chromogen ESBL media, the colonies were subcultured onto Trypton Soy agar for purification. The purified isolates were initially exposed to oxidase testing. Subsequently, the oxidase negative ones were selected and identified by using mass spectrometer (Vitek® MS, bio Merieux). The characterized ESBL suspected strains were screened for ESBL-production by ceftazidime (CAZ), cefotaxim (CTX), and cefpodoxime (CPD) discs respectively. The ESBL-suspected isolates were confirmed with a combination of ceftazidime (CAZ), cefotaxim (CTX), and cefpodoxime (CPD ± clavulanate (CV) discs based on combined disc-diffusion testing. Following that, the final confirmation of ESBL-production within the isolates were performed following the instructions of Merlin Micronaut-S beta-lactamase VII testing kit based on liquid microdilution, the readings were obtained by a multi-scan spectrometer, and the data was automatically analyzed by the Sifin software. All the ESBL screening and confirmatory testings were conducted according to the criteria by Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). The results revealed that the phenotypic screening for ESBL production yielded 40 suspected isolates in Enterobacteriaceae. Of 40 isolates, 29 of them were confirmed as ESBL-producer. The most common phenotype was determined to be *E. coli* (79.4%), followed by *E. cloacae* (10.3%), and *C. braakii* (10.3%), respectively. To conclude, our study indicated that the raw milks were significantly contaminated with ESBL-producing Enterobacteriaceae, potentially leading to a risk to the public health. In the recent years, we strictly advise that the antibiotic agents used for the farming animals should be carefully controlled, and the ESBL-producing enterobacteria should be included in the food regulations as a food safety indicating parameter.

Keywords: Enterobacteriaceae, ESBL, Milk, Food Safety, Public Health.

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Gıda maddelerinin kalitesi ve güvenliği halk sağlığı açısından her geen gn artan bir Şekilde nem kazanmaktadır. Tketim için piyasaya sunulan gıda maddelerinde insanlarda zehirlenmeye neden olabilen çok sayıda patojen mikroorganizma bulunabilir. Aynı zamanda gıda maddelerinde bulunan bozulma yapıcı mikroorganizmalar ciddi ekonomik kayıplara neden olabilmektedir.

Mikroorganizmalar yaşadığımız hayata hızlı bir Şekilde adapte olabilme yeteneğine sahip dünyanın en eski canlıları olarak bilinmektedir. **(Demirtürk ve Demirdal, 2004).**

Bakterilerin bu özellikleri nedeniyle onların her yeni antibiyotik türüne de, antibiyotik etkisini inhibe edici yeni sistemler geliştirmesi antibiyotik direnç sorununu ve enfeksiyonlarla mcadale de engelleyici bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır **(Vahaboğlu, 2004).**

GSBL'ler beta laktam antibiyotiklere karşı bakterilerin oluşturduğu enzimlerdir. Son yıllarda yapılan alışmalar GSBL üreten enterobakteriler için bir depo görevi gördüğünü rapor etmiştir **(Carattoli, 2008).**

Hayvansal gıdaların beta laktamaz üreten bakterilerce kontamine oluşu, besin zinciri yoluyla bu bakterilerin insan populasyonu içinde giderek yaygınlaştığını düşündürmektedir **(Lopez-Cerrero ve ark. 2012).**

Antibiyotikler; enfeksiyonel hastalıklara neden olan bakterilerin yok edilmesi için kullanılmış ilaçlardır. Antibiyotik kullanımı ile tıbbi alanda, enfeksiyon kaynaklı ölümlerin azaldığı görülmüş, beraberinde bakteriyel hastalıklarda kullanılan olağan bir ilaç haline gelmiştir. Antibiyotiklerin gün geçtikçe yoğun bir Şekilde kullanılması, peşi sıra farklı ve artan sayıda antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Çeşitli enfeksiyonlara neden olan bu dirençli mikroorganizmaların tedavisinde birçok sorunlar yaşandığı tüm dünyada bilinerek, yeni ilaçlar geliştirilmektedir. Fakat diğer taraftan da bu ilaçlara olağanca hızıyla, yeni dirençler kazanan mikroorganizmalar, hastalıkların tedavisinde sorun yaratmaya devam etmektedir **(Ammor ve ark. 2008).**

Antibiyotiklerin son on yılda bilinçsiz kullanımı sebebiyle enfeksiyona bağlı dirençli bakterilerin yol açtığı ölüm oranlarında artış görülmüştür. Bu durumlar göz önüne

alınarak antibiyotik kullanımı ve direnç faktörüne karşı, bilinçsiz antibiyotik alımının önüne geçilmelidir (**Wickramasingh, 2012**).

Antimikrobiyal ilaçlar için izin verilen maksimum kalıntı limitleri AB mevzuatı ile uyumlu olarak Türk Gıda Kodeksi kapsamında 28.04.2002 tarih ve 247739 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan tebliğ ile düzenlenmektedir. 19.01.2005 tarih ve 25705 sayılı Resmi Gazetede yayınlanan “Canlı Hayvanlar ve Hayvansal Ürünlerde Belirli Maddeler ile Bunların Kalıntılarının İzlenmesi için Alınacak Önlemlere Dair Yönetmelik” esaslarına göre Ulusal bir kalıntı izleme planı uygulanmaktadır.

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Avrupa Gıda Güvenliği Otoritesi (EFSA) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi uluslararası kuruluşlar bu sorunun üzerinde önemle durmaktadırlar (**EFSA 2011; WHO 2013**).

Klinik olarak insanlarda yanlış antibiyotik kullanımının direnç gelişiminde birincil etken olduğu kabul edilmekle birlikte, benzer hatanın hayvanlarda tekrar edilmesinin dirençli bakterilerin gıda zinciri yoluyla yayılmalarında en az klinik hatalar kadar önemli rol oynadığına dair görüşler gittikçe güçlenmektedir. Veteriner ilaçların kontrolsüz ve bilinçsiz kullanımı sonucu idrar, kan, atık sular, diğer su kaynakları ve toprak olmak üzere yaşadığımız çevreye bulaşması kaçınılmaz bir gerçektir (**Liguoro ve ark., 2003; Yang ve Carlson, 2004**).

Bu çalışmada, İstanbul ili ve çevresinden toplanan çiğ süt örneklerinde geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli enterobakterilerin identifikasyonu ve direnç profillerinin tespiti amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Enterobacteriaceae Genel Özellikleri

2.1.1 Enterobacteriaceae

Genellikle çevrede oldukça yaygın olarak bulunmalarına rağmen, çoğu Enterobacteriaceae insan ve hayvanların mide ve bağırsak florasında mevcuttur. Genellikle bu bakterilerin çoğu kan zehirlenmesi, üriner sistem enfeksiyonları gibi bir çok hastalıktan sorumludurlar (**Tham, 2012**).

Dirençli Enterobacteriaceae türlerinin ortaya çıkması ve yayılmasında, klinik kaynakların önemli rolü bulunmaktadır. Bunun bir sonucu olarak hastane enfeksiyonlarının tedavisi karmaşık hale gelmektedir (**Paterson, 2006**).

2.2 Enterobacteriaceae Ailesinin Önemli Türleri

2.2.1 *Escherichia (E.) coli*

Escherichia coli insan ve hayvanların mide ve bağırsak florasında bulunan bakteri gruplarıdır. *E. coli*, Enterobacteriaceae ailesi üyelerinden bir bakteri grubudur. Enterobacteriaceae ailesi içerisinde *E.coli* de dahil olmak üzere 30 a yakın cins ve oldukça fazla tür bulunmaktadır. Enterobacteriaceae grubuna dahil bakteriler gıda kaynaklı kirlenmelere yol açmaktan ziyade, gıda kaynaklı zehirlenmelere yol açması nedeniyle oldukça önemli bir gruptur.

Enterobacteriaceae grubuna dahil olan bakterilerden bazıları *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia*' dır (**Madigan ve ark. 1997**).

Bağırsak florası çevre koşulları, beslenme ve yaş gibi faktörlere bağlı olarak değişmekle birlikte, Enterobacteriaceae ailesi üyelerinden sadece bir kısmı sağlıklı insanların bağırsaklarında daimi olarak bulunur. *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* ve *Klebsiella koliform* olarak isimlendirilmekte olup, bazı özellikleri ile enterik patojenlerden ayrılmaktadır (**Batt, 2000**).

E. coli bağırsak ortamının bir üyesi olduğu için normal şartlarda hastalık etkeni olarak karşımıza çıkmamaktadır. *E. coli* tiplerinin bazıları ise, üzerinde buldukları hayvan türleri için zararsız bir halde iken, insanlara bulaştığında aksi yönde bir enfeksiyon etkeni olarak karşımıza çıkabilir. Bu enfeksiyon gruplarının başında ise, idrar yolu enfeksiyonları ve ishal gelmektedir (**Shabana, 2014**).

Dışkı kaynaklı bulaşmaların en önemli faktörlerinden ilki *E. Coli*'dir. Bir gıdada *E.coli* saptanmamış olması o gıda maddesinde enterik zararlı bakterilerin bulunmadığı anlamına gelmemektedir (**Smoot ve Pierson, 1997**).

2.2.2 *Klebsiella spp.*

Klebsiella cinsi bakteriler, hareketsiz, sporsuz, genellikle kapsüllü, Gram negatif ve Enterobacteriaceae familyasının genel özelliklerini gösteren çomakçıklardır (**Bilgehan, 2004**).

Klebsiella pneumoniae, insan sağlığı açısından çok önemli olan nazokomiyal enfeksiyonlar, üst solunum yolu enfeksiyonları, üriner sistem enfeksiyonları ve yara enfeksiyonları oluşmasında rol alan fırsatçı patojenlerdir (**Shen ve ark. 2001**).

K. pneumoniae insan kalın bağırsağında ve % 5-10 oranında da üst solunum yolları mikroflorasında bulunmaktadır. *Klebsiella* cinsi bakteriler bakteriyemilerin % 2'sinde, pnömonilerin %12'sinde ve cerrahi yaraların % 3'ünde etken olarak bulunmaktadır (**Akova ve ark. 1992**).

K. pneumoniae, üriner sistem ve nazokomiyal enfeksiyonlara yaygın olarak neden olan bakteriler sıralamasında *Escherichia coli*'den sonra ikinci sıradadır (**Pais ve ark. 2002**).

Piyelit, piyelonefrit ve sistit şeklinde ortaya çıkan enfeksiyonların, antibiyotiklerle yapılan tedavilerde oldukça dirençli oldukları görülmüştür (**Bilgehan, 2004; Akan, 1993**).

Üriner sistem enfeksiyonları, % 40 görülme sıklığı ile en sık görülen nazokomiyal enfeksiyonlardır (**Gülay, 2004**).

2.2.3 Enterobacter

Enterobacter türleri toprakta ve sularda oldukça yaygın bulunan bakterilerdir. Bazı enterotoksijenik grupları özellikle gıda kaynaklı zehirlenmelerde büyük rol oynar ve enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Enterobacter grubu bakterilerin yaygın olmalarına neden olarak bilhassa böceklerin büyük rol taşıdığı bildirilmektedir. Gıda maddelerinin elle işlenmesi durumunda elde bulunma sıklığının %25 oranında olduğu fakat bu bakteri grubunun ellerde olma sebebinin hijyen eksikliği değil de daha çok bitkisel temastan kaynaklanabileceği bildirilmektedir (**Huber, 2000**).

2.2.4 Enterococcus

Enterococcus insan ve hayvan bağırsakları olmak üzere, gıda üretim ortamlarında, alet ve ekipmanlarında ayrıca böceklerde, sularda, toprakta bulunma sıklığı oldukça fazla olan bir gruptur. Hızlı bir şekilde çoğalabilme yetenekleri ve ortamdan uzaklaştırabilmenin zor olması önemli bir sorun teşkil eder. Kurutma, ısıtma, asitlendirme ve soğuk muhafaza gibi üretim işlemi basamaklarına oldukça dirençli bir yapı sergilerler. Bilhassa ısıtma işlem uygulamaları görmüş bazı gıda gruplarında bulunması o işletmenin hijyen ve sanitasyon kurallarına etik davranmadığını gösteren bir kriter olarak değerlendirilir (**Shapton ve Shapton, 1994**).

2.3 Gıda Maddelerindeki Enterobacteriaceae Varlığı

Özellikle enterik bakteri gruplarında gelişen beta-laktamaz üretimi beta-laktam grubu antibiyotiklerin türlerinde direnç katkısında bulunan çok önemli sebeplerden biridir (**Parlak ve ark. 2012**).

Günümüzde antibiyotik grupları, bilhassa hayvan gruplarında gelişen enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde ve bu hastalıkların kontrol altında tutulmasında oldukça geniş çaplı kullanılan bir alternatif olmuştur. (**Wang ve ark. 2008**).

Günümüzde gıda zinciri yoluyla, antimikrobiyal direnç gelişiminin bu kadar hızlı yayılması, aslında hayvanlarda yoğun ve bilinçsiz bir şekilde antibiyotik kullanımı ile ilgilidir. Antimikrobiyal direnç bu sebeple, insan ve halk sağlığını direk olarak ilgilendirmesi açısından çok önemli bir hale gelmiştir (**Reuland ve ark. 2014**).

Bu sebeple, Gram negatif bakterilere bağı mevcut antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması antimikrobiyal direnç gelişimi konusundaki endişeyi arttırmıştır.

Beta-laktamaz enzimi, Gram negatif bakterilerin bazıları tarafından sentezlenir. Beta laktamaz genellikle beta- laktam antibiyotiklerini inhibe edici bir enzimdir. Bu tür enzim bulunduran bakteriler, süt aracılığıyla insan organizmasına geçebilir (**Uraz ve ark. 1996**).

Özellikle çiftlik hayvanlarında antibakteriyel direnç genlerini taşıyan bakterilerin izole edilmesi ve direnç mekanizmasında rol oynayan bu tip enzimlerin varlığı nedeniyle, farklı çevrelerden izole edilen Gram negatif bakteri suşlarında GSBL aktivitesinin araştırıldığı epidemiyolojik çalışmalar önem kazanmaktadır (**Dinç ve ark. 2012**).

Sütteki çok düşük miktarlardaki antibiyotik kalıntıları dahil, toplumda duyarlı bazı kişilerde şiddetli alerjik reaksiyonlara neden olabilmektedir. Antibiyotik bulaşlı süt ve diğer gıda maddelerinin tüketimi, bu ürünlerde bulunabilen antibiyotiklere dirençli patojen mikroorganizmaların insanlara direkt olarak aktarılma tehlikesini arttırmaktadır. Ülkemizde hayvan sağlığının öneminin artmasına paralel olarak enfeksiyon hastalıklarına karşı olarak, antibiyotik kullanımında artmıştır (**Yaygın ve ark. 1977**).

Antibiyotik tedavisine tabi tutulmuş bir hayvanın, 72-96 saat içinde sağılan sütlerinin antibiyotik içerebileceği ve bunların güvenle kullanılamayacağı kabul edilmektedir. (**Kosikowski ve ark. 1982**).

Ancak ülkemiz süt üreticilerinin çoğu, hayvana antibiyotik uygulamasını takiben, belirli süreler içerisinde sağılan sütleri ayırıp, işletmelere göndermemesi gerektiğinin bilincinde değildirler. Bütün bunlara karşılık, sütteki antibiyotik varlığı, ve bunun süt ürünleri üzerindeki etkileri konusunda ülkemizde çok az çalışma yapıldığı görülmektedir (**Süer ve Anter, 1969**).

Gıda mevzuatları bu tür bakterilerin gıdalarda varlıklarını bir hijyen indikatörü kabul etmesine rağmen, antibiyotiklere direnç bir gıda güvenliği kriteri olarak yer almamaktadır (**Dinç ve ark. 2012**).

Özellikle Enterobacteriaceae familyasına ait türlerin insanlarda antibiyotik dirençliliğinin yayılmasında aktif rol oynadığı görülmektedir.

Özellikle yapılan son çalışmalar, Gram negatif bakterilerin (*K. pneumoniae*, *Enterobacter cloaca*, *P.aeruginosa*, *A. baumannii*, *Escherichia coli*) birinci, ikinci ve üçüncü nesil penisilin ve antibiyotiklere karşı çoklu direnç geliştirdiklerini göstermektedir.

Bu suşlar içinde en önemli direnç mekanizması beta-laktamaz enzimi üretebilmeleri ve bu enzimlerin Geniş Spektrumlu Beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getirmektir. İnaktivasyon sonucunda enfeksiyon tedavisi çoğu zaman başarısız olabilmektedir.

2.4 Enterobacteriaceae'ların Halk Sağlığı Açısından Önemi

Bakterilerin antibiyotiklere direnç geliştirmesi küreselleşmiş bir sorun olup, özellikle hastane enfeksiyonlarında tedaviyi zorlaştıran, mortaliteyi ve tedavi maliyetlerini artıran önemli bir unsurdur. Bu kapsamda; gram-negatif bakterilerdeki direncin çok hızlı yayılması özellikle yoğun bakımlarda, kullanımdaki antibiyotiklerin hemen hepsine dirençli bakterilerin ortaya çıkmasına yol açarak son derece tehlikeli gelişmelere neden olmaktadır (**Beşirbellioğlu, 2010**).

Son yıllar da özellikle Gram-negatif bakterilerde direnç oranları sürekli artmaktadır. Son zamanlarda antibakteriyellerin etkilerinden kaçabilen mikroorganizmaları tanımlamak için (*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Enterobacter* türleri) olarak adlandırılan dirençli mikroorganizmalar grubu literatüre girmiştir (**Taşova, 2011**).

Ciddi hastane enfeksiyonlarından sıklıkla sorumlu olan gram-negatif bakteriler; geniş spektrumlu beta-laktamaz üretimi nedeniyle klinik önemi giderek artan bir konu haline almıştır. Beta-laktamaz üretimi ile gelişen direnç, Gram negatif enterik bakterilerde en önemli direnç mekanizmasıdır. Beta-laktamazlar substrat ve inhibitor profilleri ile sekans homolojilerine göre farklılaşabilirler. Klinik izolatlarda bu güne kadar en az 500 tip beta-laktamaz saptanmıştır (**Falagas, 2009**).

Enterobacteriaceae üyesi bu tarz bakterilerin antibiyotiklere karşı geliştirdikleri direnç mekanizması toplum sağlığını yakinen ilgilendirmektedir. Bu sebeple Gram-negatif direnç ile mücadelede multidisipliner yaklaşım çok önemlidir. Bu mücadelede önem verilmesi gereken unsur, antimikrobiyal kullanımının kontrolüdür.

2.5 Antibiyotikler ve Kullanım Amaçları

Bilhassa bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde mücadeleden sorumlu madde olarak çok uzun yıllardan bu yana kullanılan ve tıp bilimlerinin amaçlarından biri haline gelen maddelerdir (**Baştürk, 2005**).

İlk kez İskoçyalı bilim adamı Alexander Fleming'in 1929'da gözlemlediği ve 1940 da Chain ve Flarey'in *Penicillium notatum*'un salgılarına penisilin olarak isimlendirdikten sonra çoğu mikrop grubuna ölümcül etki mekanizmasının olduğu anlaşıldıktan sonra tıp bilimleri açısından bir ilk yaşanmıştır. Özellikle enfeksiyonel hastalıkların tedavisinde uzun yıllarca kullanılabilir olması ve hastalığı ortadan kaldıracı veya hastalık engelleyici olması dolayısıyla çoğu hastalığın tedavisinde yaygın kullanılan bir ilaç olmuştur. (**Berzeg, 2005**).

Gıda Teknologları Enstitüsü (**IFT**) **2006 yılı raporunda**; gıda zinciri yoluyla yayılan dirençli bakteriler ve direnç genleri hakkında güncel bilimsel verileri kamuoyu ile paylaşmış ve farklı disiplinlerden araştırmacıların dikkatlerini bu konuya çekmiştir. Son yıllarda çok sayıda araştırmacı antibiyotik direncinin ekonomik ve sağlık boyutları, gelişimi, yayılımı, etki mekanizmaları ve gıdaların rollerini irdeleyen araştırmalara yoğun şekilde ilgi göstermektedirler.

2.6 Antibiyotik Direnci

Antibiyotik direnci bakterilerin antibiyotik varlığında dahi üreyebilmeleri ve hastalık yapabilmeleri durumudur. Bazı antibiyotiklere direnç doğal olarak mevcut iken diğerlerine karşı direnç bakterilerde gelişen mutasyon yoluyla ortaya çıkmaktadır. (**Yemen, 2010**).

Bakteriler antibiyotiklere karşı doğal bir dirence sahip olabilecekleri gibi transpozon ve plazmidler gibi hareketli genetik parçacıkları alarak basit mutasyonlar ile veya

endojen antibiyotik direnç mekanizmalarının yeniden düzenlenmesi ile dirençli hale gelebilirler (**Baskın, 2005**).

Alexander Fleming (1929) penisilini küf mantarlarından elde etmiş, 1940 ta ise Chain ve Florey tarafından saflaştırılarak bakteriyel enfeksiyonlardan korunma ve tedavilerinde etkili ve güvenilir aşama kaydedilmiştir (Bozkaya, 2002). Ancak, hemen arkasında 1940 yılında Abraham ve Chain'in penisilinazı bulması ile penisilin bakteriyel hastalıkların tedavisinde kesin çözüm olmayacağı anlaşılmıştır (**Demirtürk ve Demirdal 2004**).

Takiben bir çok yeni antibiyotik türü geliştirilmiş olmasına rağmen mikroorganizmalar bulunan her antibiyotiğe yeni bir yolla direnç geliştirmeyi başarmıştır.

2.8 Beta Laktam Grubu Antibiyotikler

Beta laktam grubu antibiyotikler az olan yan etkileri ve bakteri öldürücü etkileri sebebiyle çağımızda oldukça yaygın olarak kullanılan antibiyotik gruplarının içindedir. (**Gür ve ark. 2008**).

Beta-laktam grubu antibiyotikler, yapı grubunda azot, karbon ve dört üyeden oluşan doymuş beta-laktam halkasına sahiptirler. Beta-laktam antibiyotikler grubunda penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler bulunmaktadır.

Beta-laktam antibiyotiklerin 4 grubu aşağıdaki gibidir.

- a. Penisilin
- b. Sefalosporin
- c. Monobaktam
- d. Karbapenem

2.8.1 Penisilinler

Penisilinlerin yapısı, tiazolidin halkası, betalaktam halkası ve yan zincirden oluşmaktadır.

Doğal penisilinler: penisilin G, prokain penisilin G, kristalize penisilin G, benzatin penisilin G.

Penisilinaza dayanıklı penisilinler: metisilin, nafsilin, kloksasilin, d flukloksasilin, oksasilin

Aminopenisilinler: ampisilin, amoksisilin, bakampisilin, siklasilin, episilin, hetasilin, pivampisilin

Pseudomonaslara etkili penisilinler: karbenisilin, indanil karbenisilin (korindasilin), tikarsilin

Geniş spektrumlu pseudomonaslara etkili penisilinlere: azlosilin, piperasilin

Amdinopenisilinler: pivamdinosilin

Beta-laktam inhibitörlü kombine penisilinler: ampisilin/sulbaktam, amoksisilin/klavulonat (Sarı 2005).

2.8.2 Sefalosporinler

Yapı yönünden penisilinlere benzerlik göstermektedirler. Beta-laktam halkası yanında penisilindekinden farklı olarak 6 üyeli bir dihidrotiazin halkası bulundurur. Kronolojik esasa dayanan ve bakterilere karşı etki spektrumundaki gelişmeyi de yansıtması yönünden pratik değeri olan bir sınıflandırma şu şekildedir:

1. kuşak sefalosporinler: sefalotin, sefazolin, sefaloridin, sefalekssin, sefapirin, sefradin, sefadroksil, sefasetril, seftezol.

2. kuşak sefalosporinler: sefuroksim, sefoksitin, sefamandol, sefonisid, sefonarid, sefaklor, sefotiam, sefmetazol, sefotetan.

3. kuşak sefalosporinler: sefotaksim, seftizoksim, sefopezon, seftriakson, moksolaktam, seftazidim, sefsulodin, sefmenoksim, sefpiramid

4. kuşak sefalosporinler: sefepim, sefpirom

İkinci kuşak sefalosporinler, 1. kuşağa göre stafilokok ve streptokoklara daha az, GN basillere ve anaeroblara daha fazla etkilidir. Sefoksitin, Gram negatif basillerin ürettiği bazı beta-laktamazlara dirençlidir ve bazı Enterobacteriaceae'lar tarafından üretilen betalaktamazları inhibe edicidir (Sarı, 2005).

2.8.3 Monobaktamlar

Aztreonam ilk sentetik monobaktam antibiyotiktir. Beta-laktam halkasından başka halka ihtiva etmezler. Etki alanları ise genellikle Gram negatif aerob bakteriler ile sınırlıdır. Dokulara ve vücut sıvılarına son derece iyi dağılırlar. *K.pneumoniae*, *H.influenzae*, gibi oldukça yaygın görülen Gram negatif patojenlere etkilidir (**Sarı, 2005**)

2.8.4 Karbapanemler

1976'dan bu yana gündemde olan karbapanemler beta-laktam antibiyotik grubunun en geniş spektrumlu ve en yaygın olarak kullanılan türleridir. Karbapanemleri diğer beta-laktam antibiyotiklerden ayıran kimyasal farklılık beta-laktam halkasındaki tiyazolidinik ekinde 4. pozisyonda sulfon yerine karbon içermeleridir. Karbapanemler plazmid kökenli ve kromozom kökenli beta-laktamazlara dayanıklıdır. Fakat zamanla karbapanemleri parçalayan metallo-beta-laktamaz ve serin karbapanemazların çıkışı endişeyi arttırmıştır (**Lee ve ark. 2003**).

Etkinlikleri genellikle aşağıdaki mikroorganizmaları kapsamaktadırlar (**Kattan, Villegas ve Quinn, 2008**).

Gram negatif mikroorganizmalar (betalaktamaz üreten *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*, Enterobacteriaceae ve *Pseudomonas aeruginosa* (genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten mikroorganizmalar dahil), Anaeroblar, (*Bacteroides fragilis* dahil) Gram pozitif organizmalar, (*Enterococcus faecalis* ve *Listeria dahil*).

2.9 Beta Laktamazlar ve Direnç Mekanizmaları

Beta laktam antibiyotiklerin genel olarak bilinen en önemli özellikleri beta laktam denilmekte olan 4 atoma sahip halka taşımalarıdır. Bu halkaya bağlanan farklı halka ve yan zincirlerle farklı özelliklere sahip değişik grup beta laktam antibiyotikleri elde edilir (**Özsoy, 2001**).

Beta-laktamazlar, beta laktam grubu antibiyotiklerin beta laktam halkasına ait amid bağlarını kırarak bu antibiyotiklerin etki mekanizmasını inhibe eden enzimlerdir(Nicolas ve Chanoine 1996).

Beta laktam antibiyotiklere direnç esas olarak beta-laktamaz üretimine bağlıdır. Beta laktamazları kodlayan genler, bakteri kromozomlarında, plazmidlerde veya transpozonlarda yerleşmiş olabilirler. Son yıllarda pek çok bla geni (beta-laktamaz geni) integronlar üzerinde tanımlanmışlardır (Weldhagen, 2004).

Beta-laktamaz enzimi ilk kez 1928 yılında Fleming tarafından fark edilmiştir. Bu araştırmacı bazı bakterilerin penisilinler tarafından inhibe olmadığını gözlemlemiş, 1940'da Abraham ve Chain, *E. coli*'den izole ettikleri ekstraktın penisilin etkisini ortadan kaldırdığını göstermişler ve elde ettikleri bu enzime 'penisilinaz' adını vermiştir.

2.9.1 Geniş Spektrumlu Beta-laktamazlar (GSBL)

GSBL'lerin karmaşık bir epidemiyolojisi vardır, bu sebeple GSBL' nin ortaya çıkışı değerlendirildiğinde içinde bulunduğu ülke ve coğrafik alanları, temsil ettiği topluluğu, çoğu zaman hasta ya da hasta olmayan taşıyıcı bakterinin aktarılmasında neden olan faktörlerden biridir (Tham, 2012).

Daha etkili ve daha geniş spektrumlu ajanlar geliştirildikçe, özellikle Gram (-) bakterilerden çok çeşitli beta-laktamazlar tanımlanmaya başlandı. Geniş spektrumlu beta-laktamazlar (ESBL) ise 3. kuşak sefalosporinlerin üretiminden çok kısa bir süre sonra ortaya çıkmışlar ve dünya genelinde dirençli *Klebsiella pneumoniae* ve *E. coli* salgınlarının başlıca sebebi olmuşlardır. Veriler incelendiğinde ESBL'lerin ortaya 15 çıkması ile seftazidin ve sefotaksim gibi ajanların aşırı kullanımının bağlantılı olduğu görülmüştür. ESBL'ler ilk tanımlandıklarında, TEM ve SHV gibi plazmid kaynaklı beta-laktamazların bir varyantı olarak bildirilmelerine rağmen, bugün Türkiye'de PER-1 varyantı olan, batı Avrupa'da ise CTX-M varyantı olan pek çok ESBL bulunmaktadır (Bauernfeind ve ark., 1996; Vahaboğlu, 1997; Gazouli ve ark., 1998; Palucha ve ark., 1999; Bush, 2000)

GSBL'ler ayrıca OXA beta-laktamazlardan türemiş enzimleri de içerirler (Grup 2d beta-laktamazlar). Bu enzimler, isoksazolil penisilinleri de geniş spektrumlu sefalosporinler kadar iyi hidrolize edebilirler. Böyle bir enzim Türkiye'den izole

edilen bir *Pseudomonas aeruginosa*'da tanımlanmıştır (Danel ve ark. 1995, Philippon ve ark. 1997, Naas ve ark. 1998, Danel ve ark. 1998, Bush, 2000)

2.9.2 GSBL'ların Klinikte Neden Olduğu Sorunlar

A-Direnç: GSBL sentezleyen bakterilerin klinikte neden olduğu sorunların başında bu enzimleri sentezleyen bakterilerin yol açtığı direnç problem aklı gelmektedir. Bu enzimlerden birini sentezleyen Gram negatif bakteri saptandığında tüm geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençli olarak kabul edilmelidir. Ayrıca bu enzimleri kodlayan plazmidler aynı zamanda birçok beta-laktam dışı antibiyotiğe karşı genetik materyal taşıyabilmektedir (Ulusoy ve ark. 2004).

B-Hastaların Kolonizasyonu: Hastanede yatan hastalarda GSBL sentezleyen bakterilerle kolonizasyonu arttıran çeşitli risk faktörleri tanımlanmıştır. Bunlar arasında uzun süreli antibiyotik kullanımı, uzun süre yoğun bakımda yatma, altta yatan ciddi ve ağır hastalık varlığı, invaziv işleme maruz kalma sayılabilir (Ulusoy ve ark. 2004).

C-Labarotuvarda GSBL Saptanmasında Karşılaşılan Sorunlar: GSBL sentezleyen bir bakteri, sentezlediği enzimin farklı sefalosporinlere afinitesinin değişik olması ve inokulum etkisi gibi nedenlerle üçüncü kuşak sefalosporinlere duyarlı gibi görünebilir (Ulusoy ve ark. 2004).

2.9.3 Ülkemizde ve Dünyadaki GSBL Görünme Sıklığı

GSBL görünme sıklığı bölgeden bölgeye ve her coğrafya üzerinde farklı bir gelişme göstermesi nedeniyle önemlidir. 2000-2003 yılları arasında yapılan bir araştırma sonucuna göre GSBL' nin görülme oranı *E. coli*'de % 19,5 *K. pneumoniae* 'da % 48,7 olduğu görülmüştür (Korten ve ark. 2003).

2005-2007 yılları arasında yapılan başka bir çalışma sonuçlarına göre göre GSBL görülme oranı *E.coli*'de %42, *Klebsiella pneumoniae* 'da %41,4 olarak bulunmuştur. *E.coli*'de karbapenem direnci saptanmazken, *Klebsiella pneumoniae*'da % 3,1 olarak bulunmuştur. Çalışma sonuçlarına göre ise yurdumuz geneli ve dünya genelinde GSBL sıklığı günden güne artan bir grafik olarak karşımıza çıkmaktadır (Gür ve ark. 2008).

2.9.4 Süt Sığırcılığında Antibiyotik Kullanımı

Antibiyotik kalıntılarının sütlerde bulunması insan sağlığı açısından oldukça zarar verici sonuçlar doğurabilmektedir. Bazı antibiyotik grupları alerjik tepkimelere sebep verebilir. Düşük miktarda antibiyotik kalıntılara maruz kalma nedeniyle ortaya çıkabilen uzun dönem seyreden etkiler de görülmektedir. Özellikle insanlarda hafif alerjik reaksiyonlarla baş gösteren, fakat ileri periyotta doku ve organ hasarlarına hatta ölümlere kadar çeşitli etkilere yol açabilirler (**Bakırcı ve Akyüz, 1996; Velioğlu, 2006**).

Sığırcılıkta antibiyotik kullanımı, özellikle A.B ülkelerinde ve A.B.D'de, antibiyotik kalıntılarının et veya sütle insanlara geçebileceği endişesiyle kısıtlanmaya çalışılmaktadır. Bu endişe son yıllarda ülkemizde de gündeme gelmektedir. Bilinmeden, gıdalarla alınan antibiyotikler mikroorganizmaların direnç kazanmasına, kullanılması gerektiği hallerde ise, antibiyotiğin etkisiz kalmasına yol açmaktadır. Bunun dışındaki yan etkileriyle, çocuklarda, hamilelerde yapabileceği kötü etkileri de göz önüne alınarak gıdalardaki antibiyotik kalıntılarıyla sıkı bir mücadeleye girilmiştir.

Gıdalarda antibiyotik kalıntısı olmaması için ilk akla gelen önlem antibiyotiğin arınma süresine dikkat etmektir. Antibiyotik kullanımını gerektiren birçok enfeksiyon vardır. Süt sığırcılığında en çok antibiyotik kullanılan vakalar mastitis, metritis (rahim iltihabı), solunum yolu enfeksiyonları, ayak hastalıkları, sonun atlamaması, şap hastalığının ikincil enfeksiyonları, sindirim yolu, idrar yolu, göz ve deri enfeksiyonları, yaralar, eklem iltihapları, vulva-vaginitis gibi diğer enfeksiyonlardır.

Devam eden süt yahut süt ürünleriyle alınan antibiyotik ilaç kalıntıları, vücutta birikmekte ve bazı bakteri gruplarında direnç mekanizması geliştirebilmekte ve bunun bir sonucu olarak antibiyotik tedavilerinin yönetiminde büyük problemlerle karşılaşmaktadır (**Uysal ve ark. 1995**).

Antibiyotikler hayvansal varlığımızın elden çıkmaması için kullandığımız en önemli silahlarımızdır. Çünkü mikroorganizmalar hazır halde beklemektedir. Ancak; antibiyotik kullanımını en aza indirmek ve gıdaları antibiyotik kalıntılarından korumak mümkündür. Aşılar ve yem katkı maddelerini yerinde ve zamanında kullanılırsak stresi önleyebilirsek, hayvanların yardıma muhtaç oldukları günleri bilerek onlara gerekli destekleri uzman veteriner hekimler tarafından sağlırsak, kısacası sürümüzü iyi yönetirsek antibiyotik kullanımını en aza indirebiliriz.

2.10 Süt Örneklerinde, GSBL Üreten Bakteriler Üzerine Yapılan Çalışmalar

Ankara, Balıkesir, ve Çorum'daki süt işletmelerinden toplanan çiğ süt örneklerinden izole edilen 92 adet *E.coli* suşunda GSBL aktivitesi ve antibiyotik duyarlılıkları araştırılmış. *E.coli* suşlarında Disk Difüzyon Testi ile GSBL Tarama Testi, fenotipik GSBL Doğrulama Testi ve 12 adet antibiyotik için, in vitro duyarlılık testleri yapılmış. Sonuç olarak, en yüksek dirençlilik oranları sırasıyla eritromisine %70, ampisiline % 40, tetrasiline %35 olarak bulunurken, *E.coli* suşlarının %55'inin iki veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir **(Dinç ve ark. 2012)**.

Çalışmalarında mastitisli süt örneklerinden izole edilen 82 koagülaz pozitif ve 25 adet koagülaz negatif toplam 107 Sitofilokok suşunun beta laktamaz aktiviteleri ve antibiyotik duyarlılıklarını saptamayı amaçlamışlardır. Bu amaçla sitofilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını Mueller-Hinton Agarda Disk Difüzyon yöntemi ile belirlemişlerdir. Antibiyotik testlerine göre 107 sitofilokok suşunun 105'i (%98.1) enrofloksasiline, danofloksasiline ve amoksisilin+klovonik asite, 104'ü (%97.1) sefaperazan+sulbaktam, 98'i (%91.5) kloksasiline duyarlı olduğunu saptamışlar. Ayrıca sitofilokok suşlarının % 62.3'nün ampisilin, %61.7'sinin penisilin, %39.3'nün ise amoksisiline dirençli olduğunu tespit etmişler **(Hadimli ve ark. 2001)**.

Yapılan başka bir çalışmada, süt örneklerinden toplamda 57 adet *E.coli* suşu izole edilmiş ve GSBL varlığı bakımından incelenmiştir. Bu amaçla *E.coli* suşlarına sırayla Antibiyotik Duyarlılık Testi, PCR ve Jel Elektroforezi uygulanmıştır. Tüm *E.coli* izolatları kloksasiline karşı dirençli bulunmuş (%100); izolatların %50 si sefotaksim, seftazidim ve ampisiline dirençli bulunmuştur. Aynı çalışmada

izolatların yaklaşık %70'i en az iki antibiyotiğe dirençli olduğu da saptanmıştır (**Su ve ark. 2014**).

Uraz ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada çeşitli işletmelerden 103' ü çiğ süt, 52'si pastörize süt ve 42'si beyaz peynir olmak üzere toplam 197 örnekte GSBL üreten bakterilerin varlığı araştırılmış; pozitiflerin %45'i *E.coli*, %40'ı *Klebsiella*, %13'ü *Enterobacter* olarak tanımlanmıştır. Araştırmada çalışılan 197 örneğin 190'unda üreme görmüşler, 7 tanesinde üreme görmemişlerdir.190 bakteri üreyen örnekten toplamda 597 bakteri izole etmişlerdir. Araştırmalarında toplam 597 adet izole ettikleri bakterileri İodometrik Test yöntemiyle beta laktamaz enzim varlığı yönünden test etmişlerdir.286 sının beta laktamaz pozitif olduğunu saptamışlardır. Geriye kalan 311 örnekte beta laktamaz enzimi negatif olarak bulunmuştur (**Uraz ve ark. 1998**).

Hindistan'ın Haydarabad şehrinin 12 farklı bölgesinden aldıkları 30 adet çiğ süt örneklerinin %6.7'sinde GSBL pozitif *E. coli* tespit ettiklerini bildirmişlerdir (**Rasheed ve ark. 2014**).

İsviçre'de yapılan bir çalışmada, Nisan 2011 ayında büyük bir süt işleme tesisinden 100 gün süresince toplanan 100 adet çiğ süt örneğinden 67 *E. coli* izole edilmiş; bunların %1.5' inin GSBL üreten serotip olduğu saptanmıştır (**Geser ve ark. 2012**).

İstanbul ve Trakya bölgelerinden topladıkları 700 adet süt ve süt ürünleri örneklerini *L. monocytogenes* yönünden incelemişler ve 20 adet *L. monocytogenes* pozitif örneğin tümünün antibiyotiğe karşı duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır (**Dümen ve ark. 2011**).

İngiltere ve Galler bölgelerinde yerleşik 103 adet süt üreticisi çiftlikten aldıkları örneklerin yoğun olarak *E. coli* ile kontamine durumda olduğunu ve tüm örneklerin %3.9'unda GSBL pozitif *E. coli* tespit ettiklerini ifade etmişlerdir (**Randall ve ark; 2014**).

Ankara piyasasında satılan sütlerden, 120 çiğ süt ve 7 ticari firmadan sağlanan 120 pastörize süttten oluşan toplam 240 adet örnekte ampisilin, amoksisilin, danofloksasin, enrofloksasin, eritromisin, florfenikol ve kloksasilin kalıntı analizi gerçekleştirilmiş. Sonuçlara göre 1 pastörize süt örneğinde ampisilin kalıntısına rastlanmıştır. 239 örnekte hiçbir antibiyotik kalıntısı belirlememişler. Örneklerin

tümünde ampisilin ile kirlenme sıklığı %0,4 olarak saptamışlar (**Temamoğulları ve ark. 2010**).

Ankarada biri kamu, diğeri özel sektöre ait, süt işletmesinden topladıkları 335 süt örneğini antibiyotik varlığı bakımından incelemişler. Kamu ya ait süt örneklerinin %6,04 ünün değişik düzeylerde penisilin içerdiğini saptamışlar. Özel sektöre ait süt işletmesinin ise %14,38 nin penisilin, %1, 31 inin ise penisilin dışında diğeri bir inhibitör madde içerdiği ortaya konulmuştur (**Temiz, 1998**).

Avrupa Birliği kaynaklı bir rapor (**Liebana ve ark. 2013**) gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlar ve hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinde mevcut *E. coli* ve *Salmonella* serotiplerinin insanlara GSBL kodlayan suşların bulaşma yollarından birisi olduğunu bildirmiştir.

2.11 Bakterilerde Antibiyotik Direnç Gelişimi ve Oluşturduğu Sorunlar

Antibiyotik direnci; herhangi bir mikroorganizma grubunun bazılarının antibiyotiklerden etkinlenmeyip veya sonraki kullanımlarında antibiyotik miktarının arttırılması ve antibiyotik direnç mekanizması ile antibiyotiğin etkisinin baskılanması olarak tanımlanır (**Demirtürk ve Demirdal, 2004**).

Beta laktamaz enzimi, Gram negatif bakterilerin bazıları tarafından sentezlenir. Beta laktamaz genellikle beta- laktam antibiyotiklerini inhibe eden bir enzimdir. Bu tür enzim bulunduran bakteriler, süt aracılığıyla insan organizmasına geçebilir (**Uraz ve ark. 1996**).

Özellikle enterik bakterilerde beta-laktamaz enziminin etkisi, beta laktam grubu antibiyotiklerde dirence sebep olan önemli faktörlerden biridir (**Parlak ve ark. 2012**).

Bu sebeple, gram negatif bakterilere bağlı mevcut antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması Antimikrobiyal direnç gelişimi konusundaki endişeyi arttırmıştır. Özellikle *Klebsiella* türleri ve *Escherichia coli* başta olmak üzere Geniş Spektrumlu beta-laktamaz üretimi, Gram negatif enterik bakteriler arasında giderek yayılması sebebiyle, bilhassa çağımızda önemli bir sorun haline almıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Gereç

3.1.1 Çiğ süt örneklerinin toplanması

Çalışmada İstanbul ili ve çevre bölgelerdeki, çeşitli köylerden ve semt pazarlarından 42 adet ve bir süt işleme tesisine işlenmek üzere getirilen çiğ süt tankerlerinden 70 adet tanker gözü ve 23 adet tanker süt boşaltma hattı filtresinden olmak kaydıyla, toplamda 135 adet çiğ süt materyali toplanmıştır. Süt örnekleri en az 10'ar ml olacak şekilde aseptik olarak steril kaplar içine alınarak soğuk koşullarda laboratuvara ulaştırılmış ve aynı gün analize alınmıştır. Şekil; 3.1.1 de alınan süt numuneleri gösterilmiştir.



Şekil 3.1.1.1 Örnek alma işlemi

Tablo 1. Çiğ süt numuneleri ve alındıkları yerler

No	Numune cinsi	Tanker Plakası	Alındığı yer ve örnek sayısı (n)		
			Adet	Adet	Toplam
1	Çiğ İnek Sütü	59 DZ 008	2	1	3
2	Çiğ İnek Sütü	39 EZ 847	3	1	4
3	Çiğ İnek Sütü	39 SN 739	5	2	7
4	Çiğ İnek Sütü	34 ZV 057	6	2	8
5	Çiğ İnek Sütü	39 TF 381	4	2	6
6	Çiğ İnek Sütü	59 DZ 008	8	2	10
7	Çiğ İnek Sütü	39 SS 740	8	2	10
8	Çiğ İnek Sütü	39 EZ 847	6	0	6
9	Çiğ İnek Sütü	39 TF 381	6	2	8
10	Çiğ İnek Sütü	39 SN 739	6	2	8
11	Çiğ İnek Sütü	39 SS 740	2	2	4
12	Çiğ İnek Sütü	59 DZ 008	8	2	10
13	Çiğ İnek Sütü	39 TF 381	4	2	6
14	Çiğ İnek Sütü	39 EZ 847	2	1	3
Toplam			93		



Şekil 3.1.1.2. Boşaltma hattı filtre drenajından örnek alma işlemi

Tablo: 2 Süt örneklerinin alındıkları yerler

Alındığı Yer	ADET
Avcılar	10
Beykoz	10
Çatalca	10
Lüleburgaz	8
Silivri	4
Toplam	42

3.1.1 Kullanılan laboratuvar gereçleri ve cihazlar

Laboratuvar gereçleri ve aletler:

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

Elektrikli cihazlar

- Su banyosu (Nüve- ST30)
- Hassas Terazı (AND GF/GX)
- Buzdolabı (Beko) (4-6 °C)
- Stomacher (Blender easyMIX™) karıştırıcı
- Distile su Cihazı (GFL)
- İnkübatör (37°C) (Nüve-EN500P)
- Otoklav (JSR-JSAX), Numune taşıma kutusu soğutuculu (AND-JYA24)
- Mikrobiyoloji kabini (Chemocell LRC X UV)
- Sifin MCN6 yazılımı (Sifin GmbH, Almanya)

- Multiskan FC Spektrometre (Thermofischer)
- Isıtıcılı manyetik karıştırıcı (Dragon-Med – 81322102)

3.1.2 Kimyasal malzemeler ve Besiyerleri

3.1.2.1 Enterobacteriaceae Enrichment (EE Broth)

Enterobacteriaceae familyası bakterilerinin gelişimini destekleyen içeriğiyle seçici bir sıvı besiyeridir. EE Broth, gıdada ve yemlerde bulunan Enterobacteriaceae'nın ekimi ve zenginleştirme işlemi için kullanılır. EE Broth, Enterobacteriaceae'nın büyümesini kolaylaştırmak için Mossel, Visser ve Cornelissen tarafından geliştirilmiştir (**Mossel ve ark., 1963**).

Enterobacteriaceae türleri, düşük sıcaklık, alt marjinal ısı, kurutma, radyasyon, koruyucu, ya da sanitasyona maruz kalma gibi gıda işleme prosedürlerinde hasar görmüş olabilir. EE Broth, hasarlı veya yaralanan hücrelerin iyileşmesi için zengin bir ortam sağlayarak, zenginleştirme suyu olarak kullanılmaktadır (**Hartman ve Minnich, 1981**).

Bileşiminde dekstroza, azot, vitaminler ve amino asitler içerir. Tablo 3.1.2.1' de içeriğine değinilmiştir. Ayrıca içeriğinde sodyum fosfat ve potasyum fosfat içermesiyle bakteriler gelişirken oluşturdukları asidi tamponlayarak ortamda ki olumsuz etkiyi önler.

Tablo 3.1.2.1. Toz EE Broth kompozisyonu

İçindekiler	Miktarı (g/l)
Kurutulmuş öküz safrası	20
Enzimatik jelatin	10
Sodyum fosfat dibazik	8
Dekstroza	5
Potasyum fosfat, monobazik	2
Parlak Yeşil	0.015

3.1.2.2 Kramojen GSBL selektif agar

Ambalaj üzerinde hazırlanış talimatı kısmında yazılan prosedür uygulanır. Toz formundaki GSBL Agar (Liofilchem 610629, İtalya) 59.2 gr/L şeklinde tartılarak besiyeri hazırlanır. Karışımın topaklanmaması için ısıtıcılı manyetik karıştırıcıda çözdürülür. Otoklavda 121°C’de 15 dk steril edilir ve besiyeri hazırlanmış olur. Steril edilen besiyeri 50 °C’ye kadar soğutulduktan sonra içine toz ESBL+AmpC steril ampülü (Liofilchem 81090, İtalya) eklenir, manyetik karıştırıcıda iyice çözdürülür ve çözelti tek kullanımlık steril plastik petri kaplarına dökülerek besiyerinin kalıplaşması beklenir. 4°C ye ayarlı buzdolabı ortamında kullanıma kadar muhafaza edilir.

Stomacher torbalarında 1 gün inkübasyona bırakılan E.E Broth da oluşumların koloni halinde gözlemleyebilmek amacıyla kullanılan seçici agardır. **Tablo 3.1.2.2’** de içeriği verilmiştir.

Tablo 3.1.2.2. GSBL kromojen agar kompozisyonu

İçindekiler	Miktarı (g/l)
Pepton karışımı	43.2
Agar	15
Kromojenik karışım	1
Selektif karışım	0.5

3.1.2.3. Mueller Hinton Agar (MHA)

Paket üzerindeki hazırlanış prosedürüne bakılarak, 34,0 g toz Mueller Hinton Agar (Merck-1.05437) tartılıp 1 litre saf su ile karıştırılır. Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı kullanılarak topaklanması engellenir. Çözelti otoklavda 115 °C-10 dk bekletilerek steril edilir. Steril çözelti 45 °C olana kadar soğutulup tek kullanımlık steril plastik petri kaplarına dökülür. Kullanılana kadar 4°C de buzdolabında muhafaza edilir.

Müller Hinton Agar (CLSI,2013) yönergesinde kullanılan, bakteri izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarını hızlı bir şekilde belirlemek için kullanılan bir agardır. İçeriği tablo 3.1.2.3' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.2.3. Toz MHA kompozisyonu

İçindekiler	Miktarı (g/L)
Kazein Hidrolizat	17.5
Agar-agar	13
Et İnfüzyonu	2.0
Nişasta	1.5

3.1.2.4. Mueller Hinton Broth (M-H Broth)

Antibiyotik duyarlılık çalışmaları (MIC-determinasyon) için kullanılan sıvı bir besiyeri ortamıdır. **Mueller-Hinton Broth** (Merck-110293) minimum inhibe edici konsantrasyon (MIC) belirlemek için kullanılır. Mueller Hinton gıda ve klinik malzemede en sık karşılaşılan aerobik ve fakültatif anaerobik bakteri testi için CLSI tarafından tavsiye edilmektedir (CLSI, 2013).

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

Mueller Hinton içeriği, sığır ekstraktı, kazein, azotlu bileşikler, vitaminler, karbon, kükürt ve amino asidine sahiptir. Nişasta ise, üretilen herhangi toksik metabolitleri emmek için ilave edilmiştir. İçeriği tablo 3.1.2.4' de gösterilmiştir.

Tablo 3.1.2.4. Mueller Hinton Broth kompozisyonu

İçindekiler	Miktarı (g/l)
Kazein hidrolizat	17.5

Et infizyonu	2.0
Mısır nişastası	1.5

3.1.2.5.Tripton Soya Agar (TSA)

TSA (Merck 1.05458) bakterilerin rutin gelişimleri için tercih edilen bir agardır. TSA deney tüpleri veya petrilere eklendikten sonra zor veya orta düzey gelişim sağlayabilen mikroorganizmaların gelişmelerini sağlamak için kullanılmaktadır. Özel amaçlı bir besiyerdir. İçeriği tablo 3.1.2.5' de verilmiştir. *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella* gibi bakterilerde üreme iyi sonuç verdiği için kullanılmaktadır.

Besiyerindeki, kazein, soya, organik nitrojen aminoasitler bakterilere iyi birer besin sağlamaktadır. Mikroorganizmalar için besiyeri olarak, kültürlerin stoklanıp korunması, çeşitli ortam ve maddelerden mikroorganizmanın izolasyonu, plak sayım gibi çeşitli alanlarda TSA tercih edilmektedir (**MacFaddin, 1985; Nash ve Krenz, 1991**). Atık ve temiz su, gıda analizleri için birçok aşama ve yöntemlerde kullanılmaktadır (**Eaton ve diğ., 1995; Downes ve Ito; 2001**).

Hazırlanış talimatına göre, 40 g tartılarak saf suda çözündürülür. 121 °C de 15 dk sterilizasyonu sağlanır. 25 °C deki pH: 7,3±0,2' olmalıdır. Steril petriye 12,5 ml aktarılır. Buzdolabı koşullarında muhafazası sağlanır.

Tablo 3.1.2.5. Triptik Soya Agar (TSA) kompozisyonu

İçindekiler	Miktarı (g/l)
Peptonlu Kazein	15.0
Peptonlu Soya Fasulyesi	5.0
Sodyum Klorür (NaCl)	5.0

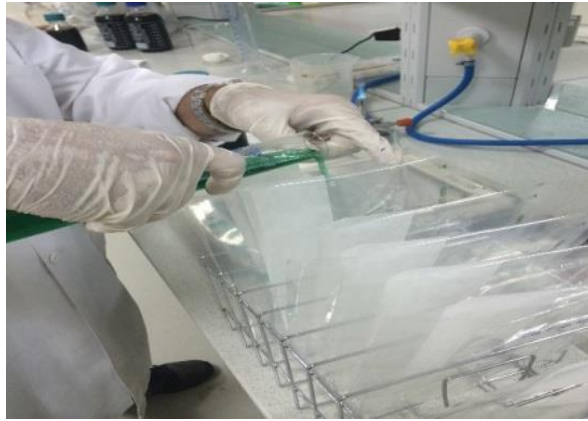
Agar-agar	15.0
-----------	------

3.2. Yöntem

3.2.1. Süt Örneklerinden Gram Negatif Bakterilerin İzolasyonu

3.2.1.1 Ön Zenginleştirme

Laboratuvara getirilen süt örnekleri öncelikle selektif ön zenginleştirmeye tabi tulmuştur. Bu amaçla, her bir süt örneğinden 10'ar ml alınarak steril homojenizatör (stohmacher) torbalarına aktarılmıştır. Üzerlerine 90'ar ml önceden hazırlanmış Enterobacteriaceae Enrichment (EE) Broth ilave edilmiştir. Süt ve besiyerinin iyice karışması temin edildikten sonra 37°C' de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Aşağıdaki şekil; 3.2.1.1 de ön zenginleştirmeye tabi tutulan çiğ süt örneklerine E.E Broth ilavesi gösterilmiştir.

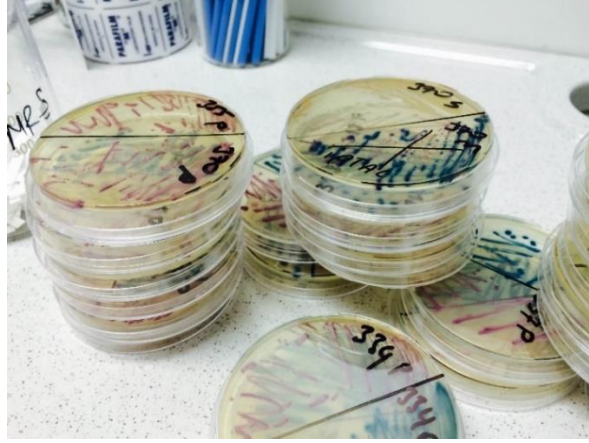


Şekil:3.2.1.1 Ön zenginleştirme işlemi

3.2.1.2 Selektif Besiyerine Geçiş

Ön zenginleştirme işlemi tamamlandıktan sonra zenginleştirme ortamından, steril öze yardımı ile ESBL Kromojen agar plaklarına seyreltme yöntemi ile ekim yapılmıştır. Plaklar 37°C' de 18 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda 1-2 mm çapında koyu pembe/yeşil-mavi renkli koloniler şüpheli GSBL pozitif suşlar olarak değerlendirilmiştir. Aşağıdaki şekilde GSBL şüpheli koloni saflaştırma işlemi

gösterilmiştir.



Şekil 3.2.1.2. GSBL şüpheli koloni saflaştırma

3.2.1.3 Saflaştırma

Selektif katı besi yerlerinde gelişme gösteren tipik kolonilerden 37°C’de 18 ile 24 saatlik inkübasyon süresinden sonra tek düşen kolonilerden biri alınarak tripton soy agar (TSA) öze ile aktarılarak çoğaltma yapılmıştır. TSA genel amaçlı katı besiyerine geçiş işlemi aşağıdaki şekil; 3.2.1.3 de gösterilmiştir.



Şekil: 3.2.1.3 Selektif besiyerine geçiş

3.2.1.4 Oksidaz Testi

İzolatlar oksidaz testi (**Bactident Oxidase test kiti**) uygulanmış, oksidaz negatif izolatlar (*Eschericia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Citrobacter braakii*) ve antibiyotik duyarlılık ve identifikasyon testleri yapıncaya kadar buzdolabı koşullarında muhafaza edilmiştir.

3.2.1.5 Gram Negatif İzolatların Antimikrobiyal Duyarlıklarının Belirlenmesi

3.2.1.6 Çift Disk Difüzyon Testi

Selektif zenginleştirme aşamasını ve oksidaz negatif kontrolünü geçen GSBL şüpheli kolonilerin, antibiyotik duyarlılık testi için çift disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır.

Bu amaçla, GSBL besiyerinde oluşan tek düşen koloniler steril tuzlu su çözeltisinde (% 0,85 NaCl₂) süspansiyon edilmiştir. McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu steril bir eküvyon çubuğu ile Mueller-Hinton agara yayılmıştır.

Disk merkezleri arasındaki uzaklık 25 mm olacak şekilde sefotaksim (30 µg), seftazidim (30 µg), sefpodoksim (10 µg) diskler yerleştirildi. 18-24 saat 37 C'de inkübasyona bırakıldı. Zon çapları inhibasyon kesim noktaları, ceftazidim (CAZ) için ≤17 mm veya sefotaksim (CTX) için ≤22 mm ise 'muhtemel GSBL tarama testi sonucu pozitif olarak kabul edildi.

3.2.1.7 Antibiyotik Disk Difüzyon Konfirmasyon Testi

Elde edilen, gram negatif enterik türlerin ürettiği GSBL enzimi, CLSI talimatlarına uyularak antibiyotik disk difüzyon konfirmasyon testiyle gerçekleştirilmiştir. Antibiyotik diskleri (klavulanik asitsiz / klavulanik asitli) şeklinde kullanılarak etraflarında oluşan inhibasyon zonu çapı ölçülmüştür. Bu şekilde GSBL enzimi üretimi inhibasyon zonları ölçülerek tespit edilmiştir.

GSBL besiyerinde oluşmuş tek koloniler % 0,85 steril serum fizyolojik solüsyonunda 0,5 McFarland bulanıklık standardında (BBL McFarland Turbidity Standard) olacak şekilde ayarlanmış ve aynı şekilde Müller Hinton Agara pamuklu eküvyon çubuğu yardımı ile iyice yayılmıştır.

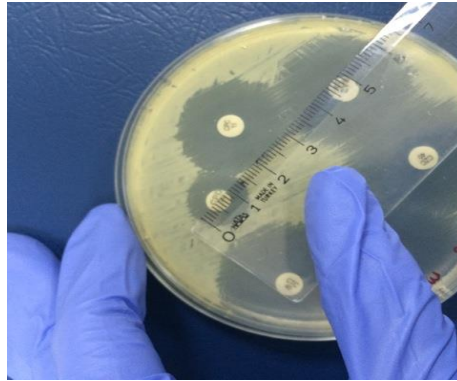
Petrilere, 30 µg sefotaksim (CTX), 30 µg seftazidim (CAZ) ve 10 µg Sefpodoksim (CPD10) diskleri, 10 µg klavulanik asit CAZCV ve CTXCV, 1 µg klavulanik asit CPDCV olarak antibiyotik kitleri yerleştirilmiştir. Petrilere 18-24 saat gece aşırı 37 C' de inkübasyona bırakılmıştır.

18-24 saat 37 C'de inkübasyon sonrası, klavulanik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibasyon zonları ölçülerek karşılaştırılmıştır. Kombinasyon diskleri

etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonundan ≥ 5 mm daha geniş olan suşlar, GSBL üretimi açısından şüpheli pozitif olarak kabul edilmiştir. Aşağıdaki şekil; 3.2.4 de antibiyotik disk yerleştirme işlemi gösterilmiştir.



Şekil: 3.2.4 Antibiyotik disk yerleştirme



Şekil 3.2.4.1 Disk difüzyon testi

3.2.1.8 Vitek-MS ile Tiplendirme

GSBL şüpheli kolonilerin varlığını doğrulamak ve kolonileri karakterize etmek için Vitek-MS cihazı (**Vitek-MS, Biomerieux Fransa**) kullanılmıştır. Gelişen kolonilerden cihaza ait slayda $1\mu\text{L}$ ' lik steril plastik özeyle yayılmıştır. Üzerine $1\mu\text{L}$ matrix solüsyonu eklenmiştir. Pleyt hazırlanırken, pozitif kontrol kuyucuğuna *E.coli* ATCC 8739 referans suşu ve diğer kuyucuklara şüpheli koloniler steril bir öze yardımıyla sürülmüştür. Bu işlemler II.sınıf biyogüvenlik kabini içinde yapılmıştır. Cihaz yazılımındaki ana menüye giriş yapılarak, hazırlanmış slayt barkodu okutulmuş ve örneklerin olduğu kuyucuklar işaretlenmiştir. Hazırlanan slayt kasete

yerleştirildikten sonra okuma başlatılmıştır. Tiplendirmesi yapılan GSBL şüpheli koloniler daha sonra GSBL tarama testine alınmıştır.

Yeterli kuruma sũresi sonunda slayt cihaza yũklenmiř ve okuma işlemi yapılmıştır. Bũylelikle sadece birkaç dakika içinde kolonilerin tũr, cins ve aile dũzeyinde net tanımlanması sağlanmıştır.

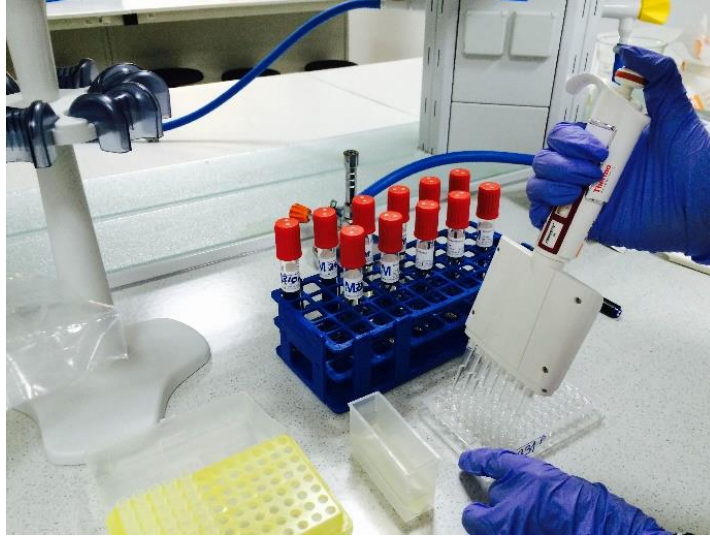


şekil: 3.2.5 Vitek MS ile tiplendirme

3.2.1.9 Antibiyogram Doğrulama ve MİK Tayini

Antibiyogram doğrulama ve MİK tayini işlemi, Micronaut-S beta-laktamaz VII test kiti (Merlin Diagnostika, Germany), talimatları takip edilerek yapılmıştır.

TSA' da saflaştırılan izolatlar, steril ekim çubuğuyla, steril serum fizyolojik solũsyonunda 0,5 McFarland bulanıklık elde edilecek şekilde hazırlanmıştır. Bu özeltiden 100µl otomatik pipetle çekilerek, tũpte önceden hazırlanmış 11ml steril Mũller Hinton Brotha aktarılmış ve sũspansiyon vortekslendirilmiştir. MHB sũspansiyonundan, 100 µl otomatik pipetle alınarak her bir pleyt gzũne aktarılmıştır. Pleytlerin ũstũ özel bir pleyt kapatıcısı ile kapatılarak 37⁰C de 18-24 saat sũreyle inkũbasyona bırakılmıştır. şekil; 3.2.6 da platalere inokũlasyon işlemi ve şekil; 3.2.6.1 de 18-24 saat sonucu inkũbasyon sonrası spektrofotometrede okutma işlemi gösterilmiştir.



Şekil 3.2.6 Vitek-MS ile pleytlere inokülasyon

Multiskan FC spektrometresi ile pleytlerin okutma işlemi yapılmıştır. Spektrofotometre 405 nm dalga boyuna ayarlanmıştır.



Şekil: 3.2.6.1 Pleytlerin spektrofotometrede okutulması işlemi

MİK verilerin analizi, otomatik olarak MCN6 yazılımı (Sifin, Germany) ile gerçekleştirilmiştir. Çıkan sonuçlarda GSBL pozitif veya negatif olarak okunarak kaydedilmiştir. Bu sayede Vitek-MS cihazı ile tespit ettiğimiz, gram negatif enterik türlerin hangisinde GSBL pozitif (+) yada GSBL üretimi açısından negatif (-) olup olmadıklarına analiz sonucunda kesin olarak ulaşılmış olundu. Şekil; 3.2.6.2'de Merlin Micronaut cihazı ile pleyt okutma işlemi gösterilmiştir.



Şekil: 3.2.6.2 Antibiyogram doğrulama

4. BULGULAR

4.1 Mikrobiyolojik bulgular

Bu çalışmada İstanbul ili ve çevre bölgelerdeki, çeşitli köylerden ve semt pazarlarından 42 adet, ve bir süt işleme tesisine işlenmek üzere getirilen çiğ süt tankerlerinden 70 adet tanker gözü, ve 23 adet tanker süt boşaltma hattı filtresinden olmak kaydıyla, toplamda 135 adet çiğ süt numunesi geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklere dirençli enterik bakterilerin identifikasyonu ve direnç profillerinin tespiti amacıyla analize alınmıştır. Ön zenginleştirme sonrası selektif besi yeri (GSBL)'ye sürme yöntemiyle ekim yapılmıştır. Toplam 135 çiğ süt materyalinde %21,5 GSBL pozitif enterik bakteri izole edilmiştir.

4.2 Selektif zenginleştirme sonuçları

GSBL selektif besiyerine ekimi yapılan 135 adet çiğ süt örneğinde şeffaf, mavi ve pembe olmak üzere üç farklı koloni gelişmiştir. Bazı petrilerde hem pembe hem mavi koloniler oluşurken, bazı petrilerde tek renk koloniler gözlenmiştir. Şüpheli izolatlar TSA besiyerine geçilerek saflaştırma yapılmıştır.

4.3 Oksidaz testi sonuçları

Saf temiz koloni oluşumları bir sonraki aşama olan disk difüzyon testine geçilebilmesi için öncelikle Merck Oksidaz test çubukları (Merck, Almanya) kullanım talimatına uyularak bakteri kolonilerine oksidaz testi yapılmıştır. Testin sonunda 131 adet petriden toplamda 86 adeti oksidaz (-) sonuç vermiştir.

4.4 Fenotipik bulgular

4.4.1 Disk difüzyon testi bulguları

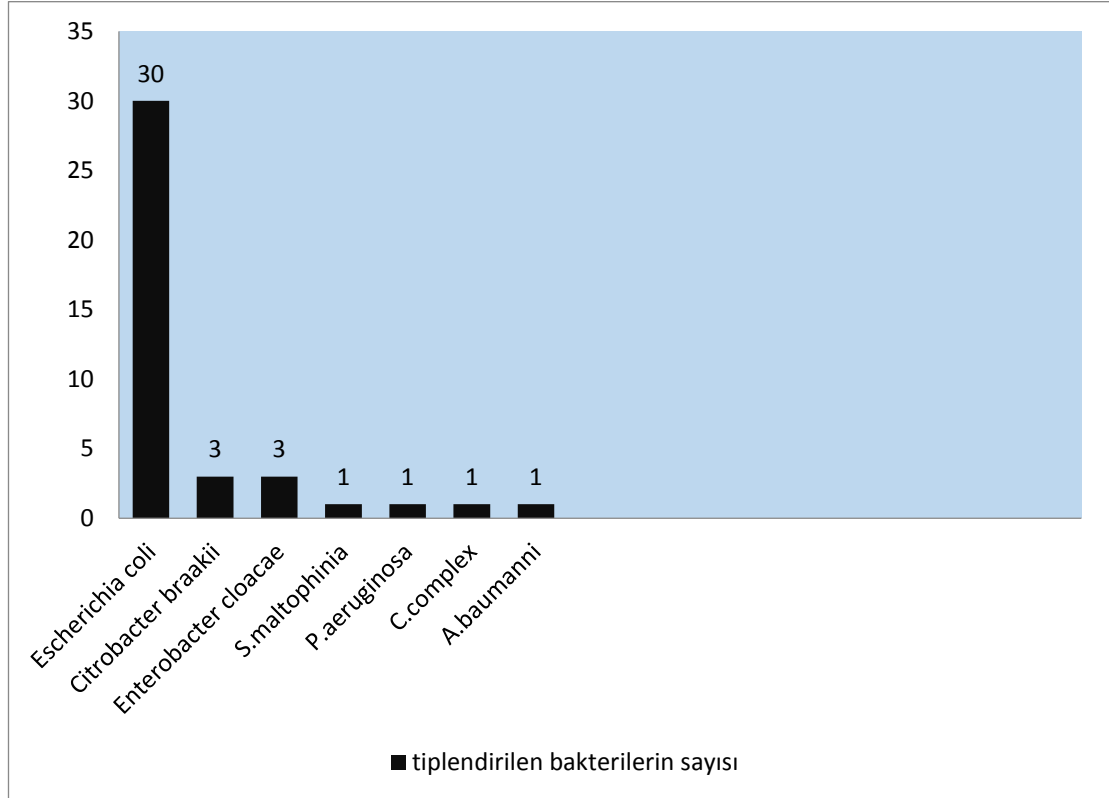
Gram negatif bakteri olduğu kesinleşen şüpheli (GSBL) üreticisi olabilecek kolonilerin, bir sonraki aşama olan antibiyotik duyarlılıkları için antibiyotik diskleri kullanılarak fenotipik tarama CLSI 2013 talimatlarına göre yapılmıştır.

Disk difüzyon doğrulama testi sonucunda 86 adet teste alınan petriden 40 adedi önceden GSBL(+) üreticisi varsaydığımız alt kültürler olarak bulunmuştur.

4.3 Vitek-MS ile Tiplendirme Bulguları

40 adet şüpheli GSBL(+) petrilerin VITEK®MS (bioMérieux, France) cihazı ile bakterilerin kimlikleri tiplendirilmiştir. 40 adet kesin şüpheli GSBL(+) kolonilerin VITEK-MS ile tiplendirme sonuçları şekil: 4.2' de verilmiştir.

Şekil:4.2 Vitek-MS ile kolonilerin tiplendirme sonuçları



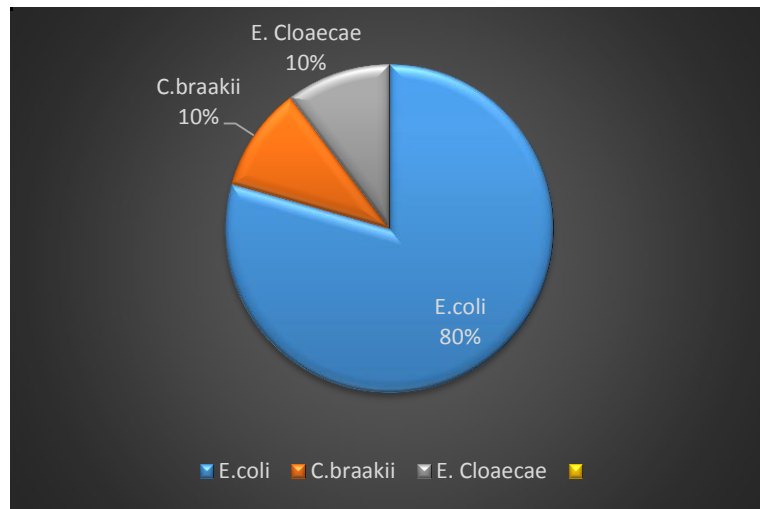
4.4 Antibiyogram Doğrulama ve MİK bulguları

Disk difüzyon testine göre 40 adet kesin şüpheli GSBL pozitif bakterinin MİK parametreleriyle yapılan antibiyogram testi sonucuna göre 29 adet gram negatif enterik türün GSBL (+) üreticisi sonucuna kesin olarak ulaşılmıştır.

İzole edilen suşların 29 adedi (%21,5) GSBL pozitif bulunmuştur. İzole edilen gram negatif enterik bakteriler ve bakterilerin GSBL çıkma yüzdeleri aşağıdaki tabloda gösterilmiştir.

Tablo: 4.4 GSBL tarama sonuçları

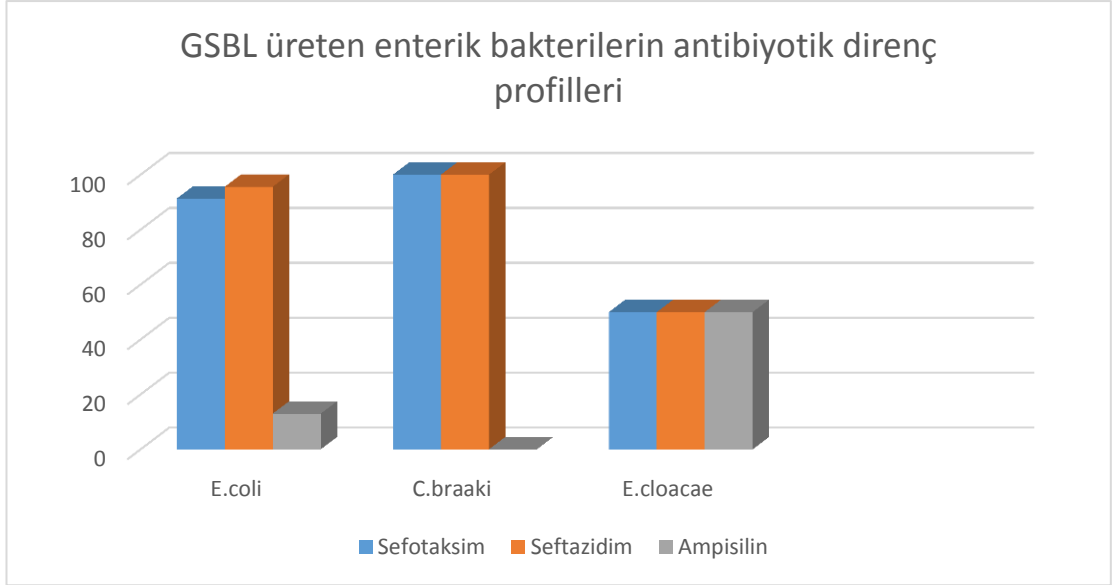
Bakteri Tipi	GSBL şüpheli izolat sayısı	GSBL (+) izolat sayısı	Bakterinin GSBL(+) izolat (%)
<i>Escherichia coli</i>	30	23	79,4
<i>Citrobacter braakii</i>	3	3	10,3
<i>Enterobacter cloacae</i>	3	3	10,3
<i>S. maltophilia</i>	1	0	0
<i>P. aeruginosa</i>	1	0	0
<i>C. complex</i>	1	0	0
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1	0	0
TOPLAM	40	29	100,0



Şekil: 4.4.1 GSBL üreten enterobakterlerin direnç yüzdelерinin dağılımı

23 adedi (% 79,4) *E. coli*, 3 adedi (%10,3) *E.cloacae*, 3 adedi (%10,3) *C. braakii*, olarak belirlenmiştir.

Aşağıdaki grafikte, GSBL üreten Gram negatif enterik türlerin hangi antibiyotiğe ne oranda direnç geliştirdiğinin gösteren şekil: 4.4.2 de sunulmuştur.



Şekil: 4.4.2 GSBL üreten bakterilerin direnç profilleri

E. coli izolatlarının, 21 tanesi (%91, 3) sefotaksime, 22 tanesi (%95, 6) s1 seftazidim ve 3 tanesi (%13) ü ampisilin dirençli bulunmuştur. 3 adet *C. braakii* izolatu sefotaksim ve seftazidim %100 dirençli bulunmuştur. 1 adet *E. cloacae* %50 izolatu ise sefotaksim, seftazidim ve ampisilin dirençli saptanmıştır. Ayrıca *E. coli* suşlarının %13 ü iki veya daha fazla antibiyotiğe karşı dirençli olduğu belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışma, çiğ sütlerde antibiyotik dirençli Gram negatif enterik bakterilerin insan organizmasına bulaşma yollarının anlaşılmasında, geleneksel ve modern teknikleri bir araya getirerek sonuca varma bakımından bir ilk olmuştur.

Çiğ sütlerde antibiyotiğe direnç konusunda GSBL üreten Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaları inceleyen çalışma sayısı oldukça azdır. Aynı zamanda bu tip çalışmalarda, yalnızca Disk Difüzyon ve Antibiyotik Çift Disk Sinerji Metotları kullanılmış ve çalışmalar genellikle bu noktada sonlandırılmıştır. Daha ileri teknikler olan Antibiyogram Doğrulama, Vitek MS ile İdentifikasyon ve MİK değerleri analizi yapılmamıştır. Bu tip metodların uygulanması araştırmaların doğruluğu açısından gereklidir. Bu sebepten dolayı diğer çalışmalardaki sonuçlar kesin doğruluk açısından tartışmalı olmuştur.

Çalışma hayvansal gıda kaynağı olan süt aracılığı ile, antibiyotik dirençli bakterilerin insanlara bulaşma yollarının anlaşılması konusunda, ülkemizin en büyük metropolitan şehri olan İstanbul ve civar bölgelerdeki mevcut durumu ortaya koymuştur ve çiğ sütlerde dirençli bakterilerin özelliklerinin anlaşılması açısından ülkemizdeki büyük bir bilgi boşluğunu doldurmuştur.

Araştırmada, İstanbul ve çevre bölgelerden toplanan, hayvansal gıda kaynağı olan çiğ sütler üzerinde yurdumuzda ilk defa genel tarama amaçlı disk tarama yönteminin dışına çıkılarak, daha ileri boyut olan Antibiyogram Doğrulama ve MİK tayini yöntemleri birlikte uygulanmıştır. Ayrıca besiyeri ortamında elde ettiğimiz mikroorganizmaların tiplendirilmesi için Vitek MS cihazı kullanılmıştır. Vitek MS cihazı mikroorganizmaların kesin tiplendirilmesinde kullanılan ve %99,9 oranında kesin bir sonuç vermektedir. İdentifikasyon işlemi ile çiğ sütlerden izole edilen GSBL üreten Enterobacteriaceae familyası türlerin kesin olarak tanımlanması sağlanmıştır.

Gram Negatif Bakterilerde beta-laktamaz üretimi beta-laktam antibiyotiklere direnç geliştirmede insan sağlığı açısından önemli sorun olmuştur (**Parlak ve ark. 2012**)

GSBL üreten bakterilere bağlı olarak oluşan enfeksiyonların prevalansının artması özellikle toplumda oral olarak uygulanan antimikrobiyal tedavinin etki göstermesine neden olmaktadır (**Kassakian ve Leonard 2014**).

Bu sebeple, Gram negatif bakterilere bağılı mevcut antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkması Antimikrobiyal direnç gelişimi konusundaki şüpheyi arttırmıştır.

Ön zenginleştirme işlemine tabi tutulan numunelerin GSBL kromojen agarda koloni oluşumları görüldükten sonra Disk Difüzyon, Disk Difüzyon Konfirmasyon testleri CLSI (2013) talimatlarına göre yapılmıştır. İzole edilen Gram Negatif mikroorganizmaların tiplendirilme işlemi VITEK MS cihazı ile yapılmıştır. Hemen ardından Antibiyogram Doğrulama işlemine geçilmiş, identifiye edilen tiplerin antibiyotiklere karşı oluşturduğu direnç MİK parametreleri Thermofisher Multiskan FC spektrometresi ile otomatik olarak okutularak analizler sonlandırılmıştır.

135 adet çiğ süt örneğinden kesin olarak 29 adet (% 21,5) GSBL üreten Enterobacteriaceae Gram (-) suşların bulunduğu tespit edilmiştir. Disk difüzyon testlerinde CLSI (2013) talimatlarına göre belirlenen GSBL sonucu 40 adet kesin şüpheli GSBL (+) iken, MİK tayini sonrası bu sayı 29 adet (%21,5)'e düşmüştür.

Yaptığımız çalışmada kullanılan metod açısından fenotipik yöntemlerin GSBL belirlemede yeterli olmadığı, GSBL tarama sonuçlarının MİK değerleri tespiti ve mikrodilüsyon ile doğrulanması gerektiğini ortaya koymuştur. Fenotipik sonuçlara göre kuvvetle muhtemel GSBL üreten enterik bakteri sayısı 40 iken, antibiyotik doğrulama ve MİK değerleri tespiti sonunda bu sayı 29'a düşmesi ile aslında, iki yöntem arasındaki farkın tarama testlerinin bu alanda yapılan çalışmalarda yeteri kadar güvenilir olmayacağını düşündürmüştür.

Burada sonuçların neden tutarsızlık gösterdiği hususu tartışılabilir ama en önemlisi sadece disk difüzyon testleri kullanılarak sonuca gitmenin doğru olmayacağı gerçeğidir. Antibiyotik disklerinin bu çalışmada, sadece izolatların dirençlilik yönünden ön elemesinin yapıldığı bir aşama olarak kaldığı görülmektedir. İlerisinde Antibiyogram Doğrulama ve MİK parametreleri kullanılarak doğru analiz sonuçlarına ulaşılmalıdır. Aksi takdirde sadece GSBL tarama metodları ile alınan veriler doğru sonucu yansıtmada konusunda yetersiz kalacaktır.

Ülkemiz ve Dünya'da süt örneklerinde GSBL üreten bakteriler üzerine yapılan çalışmalara bakıldığında;

(Dinç ve ark.(2012)); Ankara, Balıkesir, ve Çorum' daki süt işletmelerinden toplanan çiğ süt örneklerinden izole edilen 92 adet *E.coli* suşunda GSBL aktivitesi ve antibiyotik duyarlılıkları araştırılmış. *E.coli* suşlarında Disk Difüzyon Testi ile GSBL

Tarama Testi, fenotipik GSBL Doğrulama Testi ve 12 adet antibiyotik için, in vitro duyarlılık testleri yapılmış. Sonuç olarak, en yüksek dirençlilik oranları sırasıyla eritromisine %70, ampisiline % 40, tetrasiline %35 olarak bulunurken, *E.coli* suşlarının %55 inin iki veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada direç profili en yüksek bakteri olarak *E. coli* (%79,4) tespit etmiş olmamız ve *E.coli* izolatını iki veya daha fazla antibiyotiğe dirençli olarak tespit etmiş olmamız literatürle paralellik göstermiştir.

(Su ve ark.(2014)); tarafından yapılan çalışmada süt örneklerinden toplamda 57 adet *E.coli* suşu izole edilmiş ve GSBLvarlığı bakımından incelenmiştir. Bu amaçla *E.coli* suşlarına sırayla Antibiyotik Duyarlılık Testi, PCR ve Jel Elektroforezi uygulanmıştır. Tüm *E.coli* izolatları kloksisiline karşı dirençli bulunmuş (%100); izolatların %50 si sefotaksim, seftazidim ve ampisiline dirençli bulunmuştur. Aynı çalışmada izolatların yaklaşık %70'i en az iki antibiyotiğe dirençli olduğu da saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada *E.coli* izolatlarının; 21 tanesi (%91, 3) sefotaksime, 22 tanesi (%95, 6) sı seftazidim ve 3 tanesi (%13) ü ampisilin dirençli olarak tespit etmiş olmamız literature uygunluk göstermiştir.

(Hadimli ve ark.(2001)); Çalışmalarında mastitisli süt örneklerinden izole edilen 82 koagülaz pozitif ve 25 adet koagülaz negatif toplam 107 sitofilokok suşunun beta laktamaz aktiviteleri ve antibiyotik duyarlılıklarını saptamayı amaçlamışlardır. Bu amaçla sitofilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını Muller-Hinton Agarda Disk Difüzyon yöntemine göre belirlemişler. Antibiyotik testlerine göre 107 sitofilokok suşunun 105'i (%98.1) enrofloksasiline, danofloksasiline ve amoksisilin+klovonik asite, 104'ü (%97.1) sefaperazan+sulbaktama, 98'i (%91.5) kloksasiline duyarlı olduğunu saptamışlar. Ayrıca sitofilokok suşlarının %62.3'nün ampisilin, %61.7'sinin penisilin, %39.3'nün ise amoksisiline dirençli olduğunu tespit etmişler. Yaptığımız çalışmada, koagülaz pozitif yani gram negatif olarak izole ettiğimiz türlerden özellikle *E.coli* türünün beta-laktamaz aktivitesi, sitofilokok suşunun beta laktamaz aktivitesiyle yakın benzerlik göstermiştir.

Hindistan'ın Haydarabad şehrinin 12 farklı bölgesinden aldıkları 30 adet çiğ süt örneklerinin %6.7'sinde GSBL pozitif *E. Coli* tespit ettiklerini bildirmişlerdir **(Rasheed ve diğ.,2014).**

İsviçre’de yapılan bir çalışmada, Nisan 2011 ayında büyük bir süt işleme tesisinden 100 gün süresince toplanan 100 adet çiğ süt örneğinden 67 *E. coli* izole edilmiş; bunların %1.5’ inin GSBL üreticisi olduğu saptanmıştır **(Geser ve ark;2012)**.

İstanbul ve Trakya bölgelerinden topladıkları 700 adet süt ve süt ürünleri örneklerini *L. monocytogenes* yönünden incelemişler ve 20 adet *L. monocytogenes* pozitif örneğin tümünün antibiyotiğe karşı duyarlı olduğunu ortaya koymuşlardır **(Dümen ve ark; 2011)**.

İngiltere ve Galler bölgelerinde yerleşik 103 adet süt üreticisi çiftlikten aldıkları örneklerin yoğun olarak *E. coli* ile kontamine durumda olduğunu ve tüm örneklerin %3.9’unda GSBL pozitif *E. coli* tespit ettiklerini ifade etmişlerdir **(Randall ve ark; 2014)**.

Ankara piyasasında satılan sütlerden, 120 çiğ süt ve 7 ticari firmadan sağlanan 120 pastörize süttten oluşan toplam 240 adet örnekte ampisilin, amoksisilin, danofloksasin, enrofloksasin, eritromisin, florfenikol ve kloksasilin kalıntı analizi gerçekleştirilmiş. Sonuçlara göre 1 pastörize süt örneğinde ampisilin kalıntısına rastlanmıştır. 239 örnekte hiçbir antibiyotik kalıntısı belirlememişler. Örneklerin tümünde ampisilin ile kirlenme sıklığı %0,4 olarak saptamışlar **(Temamoğulları ve ark. 2010)**. Yaptığımız çalışmada süt örneklerinde antibiyotik kalıntılarına bakılmadı, ancak bilindiği üzere sütte bulunan antibiyotik kalıntıları insan sağlığı açısından önemli risk oluşturabilmektedir. Ayrıca süt ve süt ürünleriyle birlikte az miktarda da olsa, devamlı antibiyotik alınması sonucu, bu antibiyotikler vücutta birikmekte, bazı bakteri suşlarında bu antibiyotiğe karşı direnç meydana gelmekte, bu durum antibiyotiklerin insan tedavisindeki etkinliğinin azalmasına neden olabilmektedir **(Uysal ve ark. 1995)**

Ankarada biri kamu, diğeri özel sektöre ait, süt işletmesinden topladıkları 335 süt örneğini antibiyotik varlığı bakımından incelemişler. Kamu ya ait süt örneklerinin %6,04 ünün değişik düzeylerde penisilin içerdiğini saptamışlar. Özel sektöre ait süt işletmesinin ise %14,38 nin penisilin, %1, 31 inin ise penisilin dışında diğeri bir inhibitör madde içerdiği ortaya konulmuştur **(Temiz, 1998)**.

(Uraz ve diğ. 1998) tarafından yapılan bir araştırmada çeşitli işletmelerden 103’ ü çiğ süt, 52’si pastörize süt ve 42’si beyaz peynir olmak üzere toplam 197 örnekte GSBL üreten bakterilerin varlığı araştırılmış; pozitiflerin %45’i *E.coli*, %40’ı

Klebsiella, %13'ü Enterobacter olarak tanımlanmıştır. Yaptığımız çalışmada direç profili en yüksek bakteri olarak *E. coli* (%79,4) ve takiben %10,3 oranında Enterobacter tespit etmiş olmamız literatürle paralellik göstermiştir

Avrupa Birliği kaynaklı bir rapor (**Liebana ve diğ. 2013**) gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlar ve hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinde mevcut *E. coli* ve *Salmonella* serotiplerinin insanlara ESBL kodlayan suşların bulaşma yollarından birisi olduğunu bildirmiştir. GSBL direncinin *Salmonella* gibi hayvansal gıdalarda yoğun bulunan enterik bakteriden ziyade *E.coli* ve *Klepsiella* gibi hastane kökenli bakterilerde yükselişi dikkat çekicidir.

Görüldüğü gibi Türkiye'de bu alanda yapılan çalışmalar antibiyotiklerin kalıntı riskleri ve fenotipik yöntemlerle antibiyotiklerin direnç durumlarını tespit etmenin ötesine geçememiştir. Klinik alanda yapılan birçok çalışma olsada gıda alanında yapılan çalışmalar sınırlı sayıda kalmıştır.

Çiğ sütlerde antibiyotik direncinin bu kadar yaygın olması hayvancılıkta antibiyotik kullanımının yüksek olduğunun bir göstergesidir. GSBL üreten bakterilere bağlı olarak oluşan enfeksiyonların prevalansının artması toplumda oral olarak uygulanan antimikrobiyal tedavinin etki göstermemesine neden olmaktadır. Bu sebeple, Gram negatif bakterilere bağlı dirençli suşların ortaya çıkması Antimikrobiyal direnç gelişimi konusundaki endişeyi arttırmıştır.

GSBL üreten Enterobacteriaceae' nin prevalansı son yılda giderek artmaktadır ve bunların sebep olduğu hastalıkların giderek artması, enfeksiyonların tedavisinde güçlendirmektedir. GSBL üreten Enterobacteriaceae nedeniyle meydana gelen enfeksiyonlar, duyarlı mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar ile kıyaslandığında hastalığa etki edecek ilgili antimikrobiyal tedavinin etkisinin geç başlamasına, hastaların morbidite, mortalite oranlarının ve tedavi masraflarının artmasına neden olmaktadır (**Stewardson, 2014**).

Günümüzde antibiyotikler, hayvanlarda bakteriyel hastalıkları tedavi etmek, bu hastalıklardan korumak ve gelişmeyi arttırmak amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır (**Wang ve ark. 2008**).

Özellikle çiftlik hayvanlarında antibakteriyel direnç genlerini taşıyan bakterilerin izole edilmesi ve direnç mekanizmasında rol oynayan bu tip enzimlerin varlığı nedeniyle, farklı çevrelerden izole edilen Gram negatif bakteri suşlarında GSBL

aktivitesinin araştırıldığı epidemiyolojik çalışmalar önem kazanmaktadır **(Dinç ve ark. 2012)**.

Gıda mevzuatları bu tür bakterilerin gıdalarda varlıklarını bir hijyen indikatörü kabul etmesine rağmen, antibiyotiklere direnç bir gıda güvenliği kriteri olarak yer almamaktadır **(Dinç ve ark. 2012)**.

Avrupa Birliği kaynaklı bir rapor gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlar ve hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinde mevcut E.coli ve Salmonella serotiplerinin GSBL kodlayan suşların bulaşma yollarından birisi olduğunu bildirmiştir **(Liebana ve ark. 2013)**.

Süt örneklerinden izole ettiğimiz GSBL direnç üreten, gram negatif enterik bakterilerin tip ve direnç profilleri bakımından diğer dünya ülkelerinde ve ülkemizde elde edilen bulgularla yakın benzerlikler taşıdığını göstermektedir.

Sonuç olarak bu çalışmada çiğ süt örneklerinden izole edile enterobakterilerin fenotipik yöntemlerle antibiyotik direnci saptanmış ve Vitek Maldiif ile tiplendirmesi yapılarak antibiyotik doğrulama, MİK değerleri tespit edilmiştir. Çıkan sonuçlara bağlı olarak çiğ süt örneklerinin GSBL prevalansı tespit edilmiştir. Bu izolatların direnç kodlayan beta-laktamaz genleri tanımlanacak şekilde gen bazlı incelenmesi gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından sadece önemli görülmüştür.

Antimikrobiyal direnç geliştirmiş bakterilerin ısı işlemler ile inaktif oldukları gerçeğine rağmen, serbest kalan ve direnç kodlayan gen bölgelerinin hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinde olma olasılığı ve bu tür ürünlerin insan organizmasına geçme olasılığı göz ardı edilmemelidir. Bu noktadan hareketle, süt üreticilerinin antibiyotik kullanımı bakımından denetlenmesi ve firmaların bu konuda rekabet ve marka politikalarını koruyacak tedbirler alması ve hayvanlarda bilinçsiz antibiyotik kullanımı ile ilgili mücadele etmesi gerekmektedir.

KAYNAKLAR:

Akan, E. (1993): Acinetobacter baumannii’de Antibiyotik Direnci ve AdeABC Aktif Pompa Sistemleri: Literatürün Gözden Geçirilmesi Tıbbi Mikrobiyoloji, Saray Tıp Kitapevleri, İzmir, s: 80-82.

Akova M. Ulusoy S, Leblebicioğlu H, Arman D. (2004): Genişletilmiş spektrumlu Beta-laktamazlar ve klinik önemi. Önemli ve sorunlu gram-negatif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 85-95.

Akova, M.; Sungur, C.; Uzun, Ö.; Hayran, M.; Gür, D. ve Akalın, H. (1992). “Hastane İnfeksiyonu Etkeni Oportunist Gram Negatif Çomaklar”, I. Türk Hastane İnfeksiyon Kongresi, Kongre kitabı, S:32,

Alkan, P. (2007): The Conformation of the Commercial Kits Used in the Detection of Antibiotics in Milk with HPLC. Master of Science, İzmir Institute of Technology, İzmir.

Al-Wabel NA. (2008): Mineral contents of milk of cattle, camels, goats and sheep in the central region of Saudi Arabia. Asian J. Biochem. 3: 373–5.

Amenu B, Deeth HC. (2007): The impact of milk composition on cheddar cheese manufacture. Aust. J. Dairy Tech. 62: 171–84.

Ammor, M. S., Gueimonde, M., Danielsen, M., Zagorec, M., van Hoek, A. H. A. M. De Los Reyes Gavila’n, C. G., et al. (2008): Two Different Tetracycline Resistance Mechanisms, Plasmid Carried tet(L) and Chromosomally Located Transposon-Associated tet(M), Coexist in Lactobacillus sakei Rits 9. Applied and Environmental Microbiology. 74. 1394-1401.

Ata, Z., Dinç, G. Yılbar, A., Müştak, H., Şahan, Ö., (2015): Extended Spektrum beta-laktamaz aktivitesi ve multidrug direnci salmonella serovörleri izolasyonu farklı bölgelerden gelen tavuk karabeseni. Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg. 62, 119-123

Temiz A, Öner Z: Ankara’daki iki ayrı süt işletmesine gelen çiğ sütlerde antibiyotik varlığı belirlenmesi. Gıda, 13 (4): 289-295, 1988.

Bakırcı, İ., Akyüz, N. (1996): Süt ve mamüllerinde antibiyotik kalıntı problemi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 6(19): 119-131

Baskın H. (2005): Mikroorganizmanın çevreye uyumu ve biyofilm: “Quorum Sensing”(Çoğunluğu Algılama). XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Kongresi. *Klinik Dergisi* , 18 (Özel Sayı): 9-10.

BAŞTÜRK, S., (2005): Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter baumannii Suşlarında Çeşitli Kinolon Grubu Antibiyotiklerin Duyarlılıklarının Araştırılması. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi, 61:7

Batt, C.A. (2000): Escherichia coli. In Encyclopedia of Food Microbiology. 633-640. (RK Robinson, CA Batt, PD Patel eds). Academic Press, NY.

Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S. and Casellas, J.M. (1996): Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTXM-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other betalactamases. Antimicrob. Agents Chemother, 40; 509-513.

Türk Gıda Kodeksi, 2002-30 sayılı Hayvansal Kökenli Gıdalarda Veteriner İlaçları Maksimum Kalıntı Limitleri Tebliği (Resmi Gazete: 28.04.2002–247739);

Berzeg, D., (2005). Çeşitli Klinik Materyallerden İzole Edilen Enterokok Suşlarında Antibiyotik Direnci, Yüksek Düzey Aminoglikozid Direnci ve E Test ile Vankomisin MİK Değerlerinin Değerlendirilmesi. Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği Uzmanlık Tezi, 95:5-6

IFT (2006). Antimicrobial Resistance: Implications for the Food System. An Expert Report, Funded by the IFT Foundation. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 1(3): 71–137.

Lee K, Lee WG, Uh Y, et al.(2003); VIM- ve IMP- tipi metallo-beta-lactamase producing Pseudomonas spp. and Acinetobacter spp. in Korean Hospitals. Emerg Infect Dis 2003;9:868-71.

Bilgehan, H. (2004). Klinik Mikrobiyolojik Tanı. Barış Yayınları, Fakülteler Kitabevi, İzmir, s: 182-184

Bozkaya, E. (2002).Tıbbi Mikrobiyoloji 1.istanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Nobel Tıp Kitapevi,107-133.

Bush, K. (2000). Beta-laktamazları evrimi. Mikrobiyoloji Bülteni, 34; 7-21.

Bülent Beşirbellioğlu, (2012). Gülhane Askeri Tıp Akademisi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Gulhane Military Medical Academy, Ankara, Turkey Yoğun Bakım Dergisi 9(4):173-181

Carattoli, A. (2008). Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(Suppl. 1),117-123.

CLSI (formerly NCCLS) Document M22. Quality assurance for commercially prepared microbiological culture media (Refer to latest version) Clinical Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, USA.

Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D. and Livermore, D.M. (1995): OXA-14, another extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39; 1881-1884.

Danel, F., Hall, L.M.C., Gur, D. and Livermore, D.M. (1998): OXA-16, further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, from two *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42; 3117-3122. Nordmann, P. and Quentin, C. 2004. SHV-49, a novel inhibitorresistant beta-lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 48; 4466-4469.

Demirtürk N, Demirdal T, Eldemir H, İnce R, Altındış M. (2005): İdrar örneklerinden izole edilen bakterilerin antibiyotiklere duyarlılıkları, *Türk Mikrobiyol Cem Der* ;35(2):103-6.

Demirtürk, N. Ve Demirdal, T. (2004): Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5(2):17.

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

Dümen, E., Issa, G., İkiz, S., Bağcıgil, F., Özgür, Y., Kahraman, T., Ergin, S. ve Yeşil, O. (2011): Determining Existance and Antibiotic Susceptibility Status of *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy Products, Serological and Moleculer Typing of the Isolates. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 17, 111-119.

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

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.

FAO Gıda ve Tarım Örgütü. Status Report on Antimicrobial Resistance, 2015.

Erişim: <http://www.fao.org/3/a-mm736e.pdf>, erişim tarihi 6-13 Haziran 2015.

Falagas ME, (2009): Karageorgopoulos DE. Extendedspectrum beta-lactamase-producing organisms, *J Hosp Infect* ;73(4):345-54.

Fusun Temamoğulları, Sezai Kaya, (2010): Ankara Piyasasında Satılan Sütlerde Bazı Antibiyotik Kalıntılarının İnce Tabaka Kromatografisi ve Biyootografik Yöntemle Saptanması. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 16 (2): 187-191, 2010 DOI:10.9775/kvfd.2009.416

Gazouli, M., Tzelepi, E., Marcogiannakis, A. and Legakis, N.J. (1998): Two novel plasmid-mediated cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *S. Typhimurium*. *FEMS Microbiol. Ltr.* 165; 289-293.

Geser, N., Stephan, R., ve Hächler H. (2012): Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Veterinary Research*, **8**, 21. doi:10.1186/1746-6148-8-21.

Giuliano, L., (2003): Bacterial diversity in the Mediterranean and the Black seas: a comparative approach. International Conference on the Sustainable Development of the Mediterranean and Black Sea Environment 1-3, Greece

Gökçen Dinç , Zafer Ata , Seran Temelli., (2012): Sığır mas itişlerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz aktivitesi ve antibiyotik dirençlilik profilinin incelenmesi *Ankara Üniv. Vet Fak. Derg*, **59**, 85-88

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.

Güven Uraz, Seza Arslan. (1998): Beyaz peynir, Çiğ ve Pastörize Süt Örneklerinden İodometrik Test ve Kromojenik Sefalosporin Test Yöntemleriyle Beta Laktamaz Araştırması. GIDA 23 (2) : 147-155

Hadimli HH, Ateş M, Güler L, Kav K, Öncel T. (2001): Mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilocokların β -Laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. Vet Bil Derg, 17, 21-25.

Hartman, P. A., and S. A. Minnich. (1981). Automation for rapid identification of salmonellae in foods. J. Food Prot. 44:385-386

Huber, T.W. (2000): Enterobacter. In Encyclopedia of Food Microbiology. 598-603. (RK Robinson, CA Batt, PD Patel eds). Academic Press, NY.

I.I. Shabana, (2014): American Journal of Animal and Veterinary Sciences 9 (3): 155-161, 2014 ISSN: 1557-4555

Kattan JN, Villegas MV, Quinn JP. (2008): New developments in carbapenems, Clin Microbiol Infect ;14(12):1102-11.

Kınık, Ö., Akbulut, N., Karagözlü, C. (2002): Süt ve Süt Ürünlerinde Kalıntı ve Kontaminantlar (Tercüme), Bölüm 4, Antimikrobiyaller, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Korten V, Ulusoy S, Zarakolu P, Mete B. (2000-2003): in Turkey: results of the MYSTIC Program. Diagn Antibiotic resistance surveillance over a 4-year period Microbiol Infect Dis. 2007 Dec;59(4):453-7.

Kosikowski F.(1982): Cheese and Fermented milk products. S. 31, 587-593 second ed. Edwards Brother, Inc, Ann Arbor , Michigan.

Lavilla, S., Gonzalez-Lopez, J.J., Miro, E.,Dominguez, A., Llagostera, M., Bartolome, R.M., Mirelis, B., Navarro, F., Prats, G. (2008): Dissemination of extended-spectrum beta -lactamase -producing bacteria:the food-borne outbreak lesson.The Journal of Antimicrobial Chemotherapy 61, 1244-1251.

Le J, Castanheira M, Burgess DS, McKee B, Iqbal R, Jones RN. (2005): Clonal dissemination of Klebsiella pneumoniae carbapenemase KPC-3 in Long Beach, California, J Clin Microbiol 2010;48(2): 623-5.. Uzmanlık tezi, İstanbul

Leblebicioğlu H, Öztürk R, Köksal İ. (2004): Yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar; Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi; 5-13

Li, X.H., Li, Y.L., Alvarez, A., Harper, W.J. ve Wang, H.H. (2011): Antibiotic resistance mitigation in dairy fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **77**, 7093-7095.

Liebana, E., Carattoli, A., Coque, TM., Hasman, H., Magiorakos, AP., Mevius, D., Peixe, L., Poirel, L., Schuepbach-Regula, G., Torneke, K., Torren-Edo, J., Torres, C. ve Threlfall, J. (2013): Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum β -Lactamases or AmpC β -Lactamases in Food and Food-Producing Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors, and Control Options. *Clinical Infectious Diseases*, **56**, 1030–1037.

Liguoro Md., Cibir V., Capolongo F., Sorensen BH., Montesissa C., (2003). Use of oxytetracycline and tylosin in intensive calf farming: evaluation of transfer to manure and soil. *Chemosphere*, **52**, 203-212.

Lopez-Cerrero, L., Egea, P., Torres, E., Gomez-Sanchez, M.C., Serrano, M., Sanchez-Ortiz, M.D.N., Rodriguez-Bano, J., Pascual, A. (2012): Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the South of Spain :international Journal of Food Microbiology, **159**, 69-73.

MacFaddin, J.F. (1985): Media for isolation-cultivation- identification-maintenance of medical bacteria, vol. 1, Williams & Wilkins, Baltimore.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker J. (1997): Prokaryotik diversity:bacteria. Brock Biology of Microorganisms. 710-711. Prentice Hall International, Inc. 986 p.

Mehmet Parlak, Aytekin Çıkman, Abdullah Bektaş, Mustafa Berktas.,(2012): Extended spectrum beta-lactamase production and antibiotic resistance in Escherichia Coli and Klebsiella pneumoniae strains: five-year follow up results Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Van doi:10.5505/sakaryamj.2012.57441

Mossel D. A. A., Vissar M. and Cornellsen A. M. R., (1963) J. Appl.Bacteriol., **26**(3):444.

- Naas, T., Sougakoff, T.W., Casetta, A. and Nordmann, P.** (1998): Molecular characterization of OXA-20 a novel class D beta-lactamase and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*, 42; 2074- 2083.
- Nash, P., ve M.M. Krenz.** (1991): Culture media. In: A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, and H.J. Shadomy (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 5th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Neşe Demirtürk, Tuna Demirdal.** (2004): Afyon Kocatepe Üniversitesi Antibiyotiklerde Direnç Sorunu The Problem of The Antimicrobial Drug Resistance Kocatepe Tıp Dergisi The Medical Journal of Kocatepe 5: 17- 21
- Nicolas-Chanoine, M.H.** (1996): Impact of beta-lactamases on the clinical use of betalactams antibiotics. *Int. Antimicrob. Agents*, 7; 21-26.
- Özsoy, F.** (2001): Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk GSBL: Klinik Önemi ve Getirdiği Sorunlar. *Flora dergisi*, 6 (Ek 1); 3- 21.
- Pais, P., Khurana, R., George, J.** (2002): Urinary tract infections: a retrospective survey of causative organisms and antibiotics prescribed in a tertiary care setting. *Indian J. Pharm.*, 34:278-280.
- Palucha, A., Mikiewicz, B., Hryniewicz, W. and Gniadkowski, M.** (1999): Concurrent outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms of the family *Enterobacteriaceae* in a Warsaw Hospital. *Antimicrob. Agents Chemother*, 44(4); 489-499.
- Paterson DL. Am J Med.** (2006): Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. Jun;119(6 Suppl 1):S20-8; discussion S62-70.
- Paterson, D.L. ve Bonomo, R.A.** (2005): Extended-spectrum β -lactamases: A clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18, 657-686.
- Philippon, L.N., Naas, T., Bouthors, A.T., Barakett, V. ve Nordmann, P.** (1997): OXA- 18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother*,41(October); 2188-2195.
- Randall, L., Heinrich, K., Horton, R., Brunton, L., Sharman, M., Bailey-Horne, V., Sharma, M., McLaren, I., Coldham, N., Teale, C., ve Jones, J.** (2014):

Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-producing bacteria in waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011. *Res Vet Sci.*, **96**, 15-24.

Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z. Ve Jamil, K. (2014): Antimicrobial Drug resistance in Strains of Escherichia coli Isolated from Food Sources. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, **56**, 4, 341-346.

Reuland E. A., Al N. N., Raadsen S. A., Savelkoul P. H., Kluytmans J. A., Vandenbroucke-Grauls C. M. (2014): Prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in raw vegetables. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **33**, 1843–1846.

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

Sercan Ulusoy, Hakan Leblebicioğlu ve, Dilek Arman. (2004): Önemli ve Sorunlu Gram Negatif Bakteri İnfeksiyonları. Bilimsel Tıp Yayınevi . S85-94

Shapton, D.A. ve Shapton, N.F. (1994): Safe Processing of Foods. 384-385. Butterworth-Heinemann, Boston.

Shen, D.; Winohur, P. ve Jones, R.N. (2001): “Characterization of Extended Spectrum Üriner Sistem Enfeksiyonlarından İzole Edilen Klebsiella pneumoniae’ların... 49 B-Lactamase-Producing Klebsiella pneumoniae from Beijing China”, *Intern. J. Antimicrob. Ag.*, **18**: 185-188.

Stewardson AJ, Renzi G, Maury N, Vaudaux C, Brossier C, Fritsch E, Pittet D, Heck M, van der Zwaluw K, Reuland EA, van de Laar T, Snelders E, Vandenbroucke-Grauls C, Kluytmans J, Edder P, Schrenzel J, Harbarth S. (2014): Extended spectrum beta-laktamase producing Enterobacteriaceae in hospital food: a risk assessment. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2014 Apr;35(4):375-83. doi: 10.1086/675609.

Smoot, L.M. ve Pierson, M. D. (1997): Indicator microorganisms and microbiological criteria. In *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers.* 66-80. (MP Doyle, LR Beuchat, TJ Montville, eds) ASM Press, Washington D.C.

Song W, Bae IK, Lee YN, Lee CH, Lee SH, Jeong SH.(2007): Detection of extended-spectrum beta-lactamases by using boronic acid as an AmpC-lactamase inhibitor in clinical isolates of *Klebsiella* spp. and *Escherichia coli*. J Clin Microbiol; 45(4): 1180-4.

Steven Z Kassakian ve Leonard A. Mermel. (2014): Changing epidemiology of infections due to extended spectrum beta-lactamase producing bacteria Kassakian and Mermel Antimicrobial Resistance and Infection Control 3:9

Süer, İ.; Anter, C. (1969): A.O.Ç Pastörize Süt Fabrikasına gelen sütlerde antibiyotik araştırılması. Etlik Veteriner Bakteriyoloji Enstitüsü Dergisi, 3(7-8) 66-75

Temamoğulları F, Dinçoğlu A.H. (2010): Şanlıurfa ve Çevresindeki Kuyu Sularında Çinko ve Selenyum Düzeyleri. Kafkas Veteriner Fakültesi Dergisi. Volume:16, Number:2 S: 199- 203.

Tham,J. (2012): “Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Enterobacteriaceae*: Epidemiology, Risk Factors and Duration of Carriage” Department of Clinical Sciences, Malmö, *Infectious Disease Research Unit, Lund University*.

Uraz, G., Arslan, S., Gündoğan, N. (1996): “Çiğ Süt, Pastörize Süt ve Beyaz Peynir Örneklerinden İzole Edilen ve İodometrik Test Yöntemiyle Beta-Laktamaz Varlığı Saptanan Bacillus Türleri”. Gıda Teknolojisi Derneği Yayın Organı, Cilt 21, Sayı 4, 275-280.

Uysal, H., Kınık, Ö., Gönç, Z. (1995): Yoğurda işlenecek sütün özellikleri ve antibiyotiklerin yoğurt kalitesine ve teknolojisine etkileri. 3. Milli Süt Ürünleri Sempozyumu Kitabı, Milli Prodüktivite Merkezi Yayınları, Ankara, no. 548, 26-37.

VAHABOĞLU, H., (2004). Antibiyotiklerde Direnç Sorunu. Türkiye Klinikleri Farmakoloji Özel, 2: 92-96.

Velioğlu, S. D. (2006): Sütteki Antibiyotik Kalıntılarının Isıl İşlem Etkisiyle ve Depolama Süresince Değişimi. Yüksek Lisans Tezi, Trakya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Edirne.

WHO. (2013): Integrated surveillance of antimicrobial resistance: guidance from a WHO Advisory Group. ISBN 978 92 4 150631 1, Switzerland.

- Wang S., Xu B., Zhang Y. ve, He JX.,** (2009): Development of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of neomycin residues in pig muscle, chicken muscle, egg, fish, milk and kidney. *Meat Sci.*, 82, 53–58.
- Wang Y, Wu CM, Lu LM, Na Ren GW, Cao XY, Shen JZ** (2008). Macrolide–lincosamide-resistant phenotypes and genotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine clinical mastitis. *Vet Mic* 2008; 130: 118-25.
- Weldhagen GF. (2004):** Sequence-selective recognition of extended-spectrum beta-lactamase GES-2 by a competitive, peptide nucleic acid-based multiplex PCR assay. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:3402–6
- Wickramasinghe NH, Xu L, Eustace A, Shabir S, Saluja T, Hawkey PM.** (2012).:High community faecal carriage rates of CTX-M ESBL-producing *Escherichia coli* in a specific population group in Birmingham, UK. *J Antimicrob Chemother.* ;67(5):1108-13. doi: 10.1093/jac/dks018.
- Yang S., Carlson K.,** (2004). Routine monitoring of antibiotics in water and wastewater with a radioimmunoassay technique. *Wat. Res.*, 38, 3155-3166.
- Yaochi Su, Chang-You, Yilin Tsai, Shao-Hung Wang, Chihan Lee, Chishih Chu,** (2014): Fluoroquinolone-resistant and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from the milk of cows with clinical mastitis in Southern Taiwan Received: February 22, 2014; Received in revised form: October 1, 2014; Accepted: October 7, 2014
- Yaygın, H** (1977): Süt ve mamüllerinde antibiyotikler. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi yayınları. No:327 Ege Üniversitesi Matbaası , İzmir 42 s.
- Yemen, O.Ş.** (2010): Tıbbi Mikrobiyoloji, Nobel Tıp Kitabevi, 160-254.
- Yeşim Taşova.** (2011): Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve İnfeksiyon Hastalıkları Anabilim Dalı, ADANA ANKEM Derg;25(Ek 2):34-44
- Zeynep Gülay** (2004): Gram Negatif Çomaklarda Antibiyotik Direnci: 2003-2004 Türkiye Haritası. *Ankem Derg.* 2005;19(Ek 2):66-77.

ÖZGEMİŞ



Fatma GÖKALP

Yeşilkent Mah. Ozanlar Cad. G/72 Sok. No:36

İstanbul-Avcılar

Tel: 530 243 00 74

G-mail :fatmagokalp2@gmail.com

KİŞİSEL BİLGİLER

Doğum Tarihi 03.01.1989
Medeni Durum Bekar
Doğum Yeri İstanbul
Uyruğu: T.C

Yabancı Diller :

İngilizce : İyi Derecede

EĞİTİM BİLGİLERİ

2013-2015 Yüksek Lisans: İstanbul Aydın Üniversitesi
Gıda Güvenliği ve Beslenme Anabilim Dalı

2007-2011 Lisans: Sinop Üniversitesi /Su Ürünleri Fakültesi
Su Ürünleri Mühendisliği

2003-2007 Lise: Mehmet Akif Ersoy Anadolu Lisesi
Fen Bilimleri / İstanbul

STAJ:

2009 Kuzey Su Ürünleri/ Samsun
4 haftalık Yaz Pratiği (Tesis Kalite Kontrol Mühendisi)

2010 Kızılırmak Su Ürünleri / Samsun
6 haftalık Yaz Pratiği (Su Ürünleri Mühendisi)

KATILDIĞI KONFERANS VE SEMPOZYUMLAR:

2. ULUSLARARASI GIDA, TARIM ve GASTRONOMİ KONGRESİ , ANTALYA / Belek-2015

ULUSLARARASI BİLİMSEL TOPLANTILARDA SUNULAN BİLDİRİLER:

Gökalp F, Tekiner İH, Özpınar H. Antimicrobial-Resistant and Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Raw Cow's Milk. *II. International Agriculture Food and Gastronomy Congress, 8-12 April 2015, Belek-Antalya, Turkey.*

KATILDIĞI SEMİNERLER:

OHSAS 18001 İŞ SAĞLIĞI VE GÜVENLİĞİ	İSTANBUL 2015
ISO 9001 : 2015 REVİZYONU	İSTANBUL 2015
ISO 9001 : 2008 İÇ TETKİKÇİ	İSTANBUL 2015
ISO 9001 : 2008 KALİTE YÖNETİM SİSTEMİ	İSTANBUL 2015
ENTEGRE YÖNETİM SİSTEMİ	İSTANBUL 2015
STRATEJİK YÖNETİM	İSTANBUL 2015
ISO 22000 GIDA GÜVENLİĞİ YÖNETİM SİSTEMİ	SİNOP 2009
ISO 14001 ÇEVRE YÖNETİM SİSTEMİ	İSTANBUL 2015
İNTERAKTİF NLP PRACTİTIONER	İSTANBUL 2015
INNOVATIC Yenilikçi Düşünce ile Yöneticiliğin, Liderlik Teknikleri	İSTANBUL 2015

BİLGİSAYAR BİLGİSİ:

Office, Word, Excel

GÖNÜLLÜ ÇALIŞMA ve AMAÇLAR:

LÖSEV EĞİTİM GÖNÜLLÜSÜ / Temmuz 2013-Halen
LÖSEV-Lösemili Çocuklar Vakfı

TEMA, Türkiye Erezyonla Mücadele, Ağaçlandırma ve Doğal Kaynakları Koruma Vakfı
İnsani Yardım Gönüllüsü / Ocak 2013- Halen

REFERANS

Kuzey Su Ürünleri Yönetim Kurulu Başkanı
Osman Parlak Tel : 533-772-79-85

İstanbul Aydın Üniversitesi
Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Kamil Bostan
Tel : 542-532-60-61

İstanbul Aydın Üniversitesi
Öğretim Üyesi : Prof. Dr. Candan Varlık
Tel : 535-354-64-73

