

T. C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**HAZIR BEBEK MAMALARINDA ve BEBEKLER TARAFINDAN TÜKETİLEN
TAHİL BAZLI GIDALARDA ESBİ DİRENÇLİ *Enterobacteriaceae* ve
Cronobacter spp. ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar CAVA GÜMÜŞ

Y1313.210001

Gıda Güvenliği ve Beslenme Ana Bilim Dalı

Gıda Güvenliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

NİSAN 2015

T. C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



HAZIR BEBEK MAMALARINDA ve BEBEKLER TARAFINDAN TÜKETİLEN
TAHİL BAZLI GIDALARDA ESBL DİRENÇLİ *Enterobacteriaceae* ve
Cronobacter spp. ARAŞTIRILMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pınar CAVA GÜMÜŞ
Y1313.210001

Gıda Güvenliği ve Beslenme Ana Bilim Dalı

Gıda Güvenliği Yüksek Lisans Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

NİSAN 2015



T.C.
İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ

Yüksek Lisans Tez Onay Belgesi

Enstitümüz Gıda Güvenliği Ana Bilim Dalı Gıda Güvenliği Tezli Yüksek Lisans Programı Y1313.210001 numaralı öğrencisi Pınar CAVA GÜMÜŞ'ün "HAZIR BEBEK MAMALARINDA VE BEBEKLER TARAFINDAN TÜKETİLEN TAHIL BAZLI GIDALARDA ESLB DİRENÇLİ ENTEROBACTERİACEAE VE CRONOBACTER SPP. ARAŞTIRILMASI" adlı tez çalışması Enstitümüz Yönetim Kurulunun 09.03.2015 tarih ve 2015/06 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından *ayb.ö.g.* ile Tezli Yüksek Lisans tezi olarak *kabul...* edilmiştir.

Öğretim Üyesi Adı Soyadı

İmzası

Tez Savunma Tarihi :17/04/2015

1)Tez Danışmanı: Prof. Dr. Haydar ÖZPINAR

2) Jüri Üyesi : Prof. Dr. Kamil BOSTAN

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

[Handwritten signatures in blue ink, corresponding to the listed names, with dotted lines below them.]

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

YEMİN METNİ

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “Hazır Bebek Mamalarında ve Bebekler Tarafından Tüketilen Tahıl Bazlı Gıdalarda ESBL Dirençli *Enterobacteriaceae* ve *Cronobacter* spp. Araştırılması” adlı çalışmanın, tezin proje safhasından sonuçlanmasına kadar ki bütün süreçlerde bilimsel ahlak ve etik geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurulmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanmış olduğunu belirtir ve onurumla beyan ederim. 17.04.2015

(İmza)

Pınar CAVA GÜMÜŞ

Mahinur'a...

ÖNSÖZ

Yüksek lisans eğitimim boyunca, çalışmanın düzenlenmesi, gerçekleştirilmesi ve değerlendirilmesinde katkılarıyla beni yönlendiren, yol gösteren ve destekleyen, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım tez danışmanım Prof. Dr. Haydar Özpınar'a, tez çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen İsmail Hakkı Tekiner'e, tez yazım sürecim içerisinde yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Burcu Çakmak'a, hayatım boyunca yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen Sevgili Annem ve Babama, yüksek lisans yapmam için beni heveslendiren ve her zaman yanımda olan Eşime, ileride ondan çaldığım zamanlar için beni anlayacağını düşündüğüm kızım Mahinur'a teşekkürlerimi sunarım.

17 Nisan 2015

Pınar CAVA GÜMÜŞ

Biyolog

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖNSÖZ	V
İÇİNDEKİLER.....	vi
KISALTMALAR.....	viii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Bebeklerde Beslenme Yöntemleri ve Önemi.....	3
2.1.1. Anne Sütüyle Beslenme.....	3
2.1.2. Bebek Maması ve Ek Gıdalar İle Beslenme	4
2.2. Bebek Mamaları ve Ek Gıdalarda Mikrobiyolojik Özellikler	7
2.3. <i>Enterobacteriaceae</i>	7
2.3.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Genel Özellikleri	7
2.3.2. <i>Cronobacter</i> spp. (<i>Enterobacter sakazakii</i>) Genel Özellikleri	9
2.3.3. Bebek Mamaları ve Ek Gıdalarda <i>Enterobacteriaceae</i> / <i>Cronobacter</i> spp. 'nin Varlığının Önemi	9
2.4. Bakterilerde Antimikrobiyal Direnç	12
2.5. Beta Laktam Gurubu Antibiyotikler-Sefalosporinler	12
2.6. Geniş-Spektrumlu-Beta-Laktamazlar (ESBL).....	13
2.7. ESBL Tanı Yöntemleri	15
2.7.1. ESBL Tarama Testleri.....	15

2.7.2. ESBL Doğrulama Testleri	16
2.8. Gıdalarda ESBL Üreten <i>Enterobacteriaceae</i> Türleri	16
2.9. VITEK®MS (bioMérieux)	18
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	19
3.1. Gereç	19
3.1.1. Gıda örnekleri	19
3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar	20
3.1.2.1. Besiyeri ve Kimyasal Malzemeler.....	20
3.1.2.2. Cam ve diğer gereçler	22
3.1.2.3. Cihazlar.....	22
3.2. Yöntem.....	23
3.2.1. Numune Hazırlama	23
3.2.2. Kültür-bazlı Çalışma.....	23
3.2.3. ESBL Tarama, Doğrulama ve MİK tespiti	24
3.2.4. VITEK®MS (bioMérieux) ile İdentifikasyon.....	26
4. BULGULAR.....	29
4.1. Kültür-Bazlı Bulgular.....	29
4.2. Oksidaz Testi Bulguları.....	29
4.3. Vitek® MS ile Tiplendirme Bulguları	29
4.4. ESBL Tarama Bulguları	29
4.5. Antibiyogram Doğrulama ve MİK Tayini Bulguları	30
5.TARTIŞMA VE SONUÇ	35
KAYNAKLAR	41
ÖZGEÇMİŞ.....	47

KISALTMALAR

CAC	: Kodeks Alimentarius Komisyonu
CLSI	: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
Dk	: Dakika
EE	: <i>Enterobacteriaceae</i> Ön Zenginleştirme Besiyeri
EFSA	: Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
ESBL	: Extended-Spectrum β -Lactamases; Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar
EUCAST	: Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi
FAO	: Gıda ve Tarım Örgütü
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
ISO	: Uluslararası Standartlık Örgütü
lt	: Litre
ml	: Mililitre
MRD	: Maximum Recovery Diluent
PBP	: Penisilin Bağlayıcı Proteinler
VRBGA	: Violet Red Bile Glucose Agar
TSNA	: Türkiye Sağlık ve Nüfus Araştırması
TOF	: Uçuş Zamanı
UNICEF	: Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

ÇİZELGE LİSTESİ

SAYFA

Çizelge 2.1. Anne sütü içerisindeki enerji ve besin öğeleri	5
Çizelge 2.2. Örnek bebek mamaları içeriği.....	6
Çizelge 2.3. Bebek mamalarında olası enfeksiyon yapabilecek mikroorganizmaların kategorizasyonu.	11
Çizelge 2.4. Sefalosporinlerin etki spektrumlarına göre sınıflandırılması	14
Çizelge 2.5. ESBL Tarama Testleri Zon Çapları.....	16
Çizelge 2.6. <i>Enterobacteriaceae</i> için belirlenen standart zon çapları ve MİK değerleri.....	17
Çizelge 3.1. Örneklem.....	19
Çizelge 3.2. MRD içerik bilgisi	20
Çizelge 3.3. V.R.B.G.A içerik bilgisi.....	20
Çizelge 3.4. BCP Glucose Agar içeriği.....	21
Çizelge 3.5. Nutrient Agar içeriği.....	21
Çizelge 3.6. ESBL Agar içeriği.....	21
Çizelge 3.7. Mueller Hinton Agar içeriği	22
Çizelge 3.8. Kontrol Suşları.....	23
Çizelge 3.9. Kullanılan antibiyotik diskleri.....	26
Çizelge 4.1. Kültür Bazlı-Çalışma Sonuçları.....	31
Çizelge 4.2. VITEK®MS ile tiplendirme sonuçları	31
Çizelge 4.3. Disk Difüzyon ve Doğrulama Sonuçları.....	32
Çizelge 4.4. Fenotipik olarak doğrulanan ESBL Pozitif Numune Sonuçları.....	33
Çizelge 4.5. Antibiyogram Doğrulama ve MİK değerleri Tespiti Sonuçları	34

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>SAYFA</u>
Şekil 2.1. Antibiyotik direncinin taşınma yolları (Anonim,2012)	13
Şekil 3.1. VRBGA besiyerinde gelişen <i>Enterobacteriaceae</i>	24
Şekil 3.2. BCP Glucose Agar.....	25
Şekil 3.3. VITEK®MS cihazı genel görünüşü	27
Şekil 3.4. VITEK®MS cihazı kaset okutma işlemi.....	27
Şekil 3.5. VITEK®MS analiz ekran görüntüsü	28
Şekil3.6. VITEK®MS veri analiz yazılımı ekran görüntüsü	28

**HAZIR BEBEK MAMALARINDA ve BEBEKLER TARAFINDAN TÜKETİLEN TAHIL
BAZLI GIDALARDA ESBL DİRENÇLİ *Enterobacteriaceae* ve *Cronobacter* spp.
ARAŞTIRILMASI**

ÖZET

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (ESBL) üreten *Enterobacteriaceae* suşları antimikrobiyal tedaviye yanıtın ertelenmesi ya da yanıt verilmemesine neden olmakta ve enfeksiyona bağlı morbidite ve mortalite riski artmaktadır. Bebek mamaları ve bebek maması yapımında kullanılan tahıl-bazlı gıdalar *Cronobacter* spp ve diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri ile kontamine olduklarında ciddi tehdit oluşturmaktadırlar. Bu çalışmada, Türkiye'nin farklı bölgelerinden toplanan toplam 115 adet örnekte (40 adet hazır bebek maması, 60 adet tahıl-bazlı gıda ve 15 adet süt tozu) ESBL dirençli *Cronobacter* spp. ve diğer *Enterobacteriaceae* varlıklarının fenotipik yöntemlerle araştırılması amaçlandı. VRBGA agarda gelişen *Enterobacteriaceae* kolonilerine oksidaz testi uygulandı. Oksidaz negatif sonuç veren izolatlar confirmasyon için BCP glikoz agara geçildi. Confirmasyonu yapılan enterik izolatların Vitek® MS cihazı ile tanımlanması yapıldı. ESBL şüpheli izolatlar CLSI (2013) talimatları takip edilerek, seftazidim (CAZ), sefotaksim (CTX), sefpodoksım (CPD) diskleri ile tarandı, bu disklerin klavulanatlı (CLA) türdeşleri kullanılarak disk difüzyon confirmasyonu yapıldı. Antibiyogram doğrulaması ve MİK değeri tespiti için Merlin Micronaut-S beta-lactamase VII kiti kullanıldı. Spektrometre cihazı ile alınan okumalar otomatik olarak Sifin yazılımı ile analiz edildi. . Yapılan değerlendirme sonucunda, ithal bebek mamaları ve süt tozu örneklerinde bakteriyel üreme görülmedi. Ancak, yerli bebek mamalarında *Pantoea agglomerans*, tahıl-bazlı gıda örneklerinde *Cronobacter sakazakii* ve diğer enterobakterlerden *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae/asburiae*, *Klebsiella oxytoca* ve *Leclercia adecarboxylata* tespit edildi. Bu çalışmada, fenotipik analiz sonuçlarına göre *Cronobacter sakazakii* izolatlar arasında ESBL üreten saptanmazken, diğer enterik bakterilerden yerli bebek mamalarında %10, pirinç ununda %10 ve irmikte %5 oranlarında ESBL direnci olduğu görüldü.

Anahtar sözcükler: ESBL, *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter* spp., Bebek Maması.

**INVESTIGATION of EXTENDED SPECTRUM β -LACTAMASE (ESBL)
PRODUCING *Enterobacteriaceae* and *Cronobacter* spp. IN INFANT FORMULAS
AND CEREAL-BASED INFANT FORMULAS**

ABSTRACT

The extended-spectrum-beta-lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* can have un-anticipated adverse effects such as a delay against or failure of antibiotic therapy, resulting in increased risk of infectious morbidity and mortality. The infant formulas and cereal-based infant foods contaminated with *Cronobacter* spp., and other *Enterobacteriaceae* are a deep threat to the infant health. The objective of this study was to investigate the presences of *Cronobacter* spp. and other ESBL producing *Enterobacteriaceae* from a total of 115 specimens (40 infant formula, 60 cereal-based infant formula and 15 milk powder) by phenotypic methods. After culturing on VRBGA media, oxidase testing was performed. The oxidase negative isolates were initially confirmed on BCP Glucose media for the membership of *Enterobacteriaceae*, and subsequently identified by Vitek® MS. Following that, according to the guidelines by CLSI (2013), the ESBL presumptive isolates were screened by a combination of ceftazidime (CAZ), cefotaxime (CTX), and cefpodoxime (CPD) with/without clavulanic (CLA) acid. Finally, antimicrobial susceptibility testing with MIC determination was conducted using Merlin Micronaut-S beta-lactamase VII kit. The readings were analyzed by the Sifin Software integrated with a Spectrometer. The results showed that the domestic infant formula samples contained *Pantoea agglomerans*, while the cereal-based samples included *Cronobacter sakazakii*, *Pantoea agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae/asburiae*, *Klebsiella oxytoca*, *Leclercia adecarboxylata*. The imported infant formulas were free of any bacterial load. The phenotypic screening revealed that the prevalences of ESBL producing enterobacterial was found as 10% in domestic infant formula samples, 10% in the rice flour samples, and 5% in the semolina samples whereas none of the *C. sakazakii* isolates were ESBL producer.

Keywords: ESBL, *Enterobacteriaceae*, *Cronobacter* spp., Infant Food.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Bebek beslenmesinde anne sütünün yeterli olmaması, süt salgısının bazı nedenlerle kesilmesi ve modern yaşamda kadınların çalışmak zorunda kalmaları gibi sebeplerle hazır bebek mamalarına yönelme hız kazanmıştır (TÜİK, 2014).

Türk Gıda Kodeksi'ne göre, bebek beslenmesi amaçlı hazır gıdalar; bebek formülleri (bebeklerin yaşamlarının ilk ayları boyunca tüketimi için üretilmiş ürünler), devam formülleri (genellikle 6 aydan itibaren tüketim için üretilmiş ürünler) ve bebek-küçük çocuk ek gıdaları (36 aya kadar olan bebek ve çocuklar için tamamlayıcı olarak üretilen ek gıdalar) olarak sınıflandırılmıştır (TÜİK, 2014).

TSNA (Türkiye Sağlık ve Nüfus Araştırması) 2013 verilerine göre, bebeklerde yalnızca anne sütü alımı ortalama süresi 1,2 ay olarak belirtilmiştir. Bu duruma ek olarak, 2008 ile 2013 yılları arasında toplanan verilere bakıldığında, bebeklerin yaşamlarının ilk 6 ayında anne sütü alımı azalırken, ek gıdalara geçişin arttığı görülmüştür (TSNA, 2013).

Türkiye İstatistik Kurumunun son 10 yıllık verileri baz alındığında Ülkemizde yılda 1.283.062 bebeğin doğduğu göz önüne alındığında, patojen ve/veya fırsatçı bakteriler ile kontamine olmuş bebek mamalarının tüketilmesiyle infeksiyon riskinin yükseleceği açık şekilde görülmektedir (TÜİK, 2014).

Yeni doğanlarda intestinal mikrofloranın oluşumu doğumdan sonraki ilk 110 gün içerisinde olmaktadır. Hamilelik dönemi boyunca annenin strese maruz kalması *Esherichia*, *Serratia* ve *Enterobacter* gibi patojen bakterilerin artmasına, buna karşın yararlı olan laktik asit ve Bifidobakterlerin miktarının azalmasına neden olmaktadır. Antibiyotik tedavisi alan bebeklerde *Esherichia* ve diğer ilgili patojen mikroorganizmaların daha güçlü olmasına neden olmaktadır. Bu da prematüre doğanlarda nekrotizan enterokolit, yeni doğanlarda ise kolik gelişimine neden olmaktadır (Zijlmans ve ark., 2015).

Bebeklerde, bağışıklık sistemlerinin ve bağırsak florasının tam gelişmemiş olmasından dolayı yeni doğan patojenlerine karşı duyarlılık çok daha fazladır. Hem yeni doğan döneminde hem de sütten kesme süresi içerisinde tüketilen gıdalar

sınırlıdır ve bu gıdalar bir çok besin bileşenini içermekle birlikte yeni doğan patojenlerini taşımaları açısından risk oluşturmaktadır (Kim ve ark., 2011). Çevresel kaynaklı patojen mikroorganizmaların bebek mamalarına bulaşmaları en ciddi enfeksiyona bağlı ölüm nedenleri arasında gelmektedir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ve Dünya Gıda ve Tarım Teşkilatı (FAO) 2007 yılında bebek maması kaynaklı ölümlerin görülme sıklığındaki artış sebebiyle, bebek maması üretiminde uluslararası hijyen uygulamaları yönetmeliği olmasını önermiştir (Arsalan ve ark., 2013).

Antibiyotiklerin yaygın bir şekilde kullanılması ilaca dayanıklı bakteriyal patojenlerin ortaya çıkmasına neden olmuştur. Antibiyotik direncin özellikle Gram negatif enterik bakteriler arasında prevalansı giderek arttığı anlaşılmıştır (Oliphant ve Eroschenko, 2015). Beta laktamaz enzimi beta laktam gurubu antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hale getirmektedir. Bu enzim, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir (Bradford, 2001).

Geniş-spektrumlu-beta-laktamaz (ESBL) üreten *Enterobacteriaceae* türlerinin prevalansı son on yılda giderek artmakta ve bu bakterilerin sebep oldukları hastalıkların insidansı yükselmekte, sonuç olarak enfeksiyonların tedavisi güçleşmektedir. ESBL üreten *Enterobacteriaceae* nedeniyle meydana gelen enfeksiyonlar, duyarlı mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar ile kıyaslandığında hastalığa etki edecek ilgili antimikrobiyal tedavinin etkisinin geç başladığı ve hastaların morbidite, mortalite ve tedavi masraflarının arttığı görülmektedir (Dağlar ve ark., 2012; Stewardson ve ark., 2014).

Bu çalışmada Türkiye'de satışa sunulan hazır bebek mamaları, tahıl bazlı nişasta, pirinç unu ve irmik gibi ikame bebek gıdalarında ESBL üreten *Cronobacter* spp. ve diğer *Enterobacteriaceae* suşlarının varlıklarını fenotipik yöntemlerle araştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bebeklerde Beslenme Yöntemleri ve Önemi

2.1.1. Anne Sütüyle Beslenme

Anne sütü; yeni doğanlarda optimum büyüme ve gelişme için gerekli olan tüm sıvı, enerji ve besin öğelerini içeren, biyo-yararlılığı yüksek, sindirimi kolay doğal bir besindir. Anne sütü ve emzirmenin hem bebek, hem de anne için, başta beslenme olmak üzere, sağlık, bağışıklık ve gelişim yönünden, ayrıca psikolojik, sosyal ve ekonomik yönden çok sayıda yararları vardır (İnci ve Serçekuş, 2015).

Anne sütü benzersiz bileşimi ve besin değeri ile yeni doğanlarda optimal beslenmeyi, büyümeyi ve gelişimi sağladığı için bebeklerin ilk 6 ay boyunca anne sütü ile beslenmesi önerilmektedir. Anne sütü beslenme için gerekli optimal besinleri içermesinin yanı sıra yeni doğanların immün sistemini destekleyici bir çok bioaktif bileşeni de içermektedir. Yapılan çalışmalarda anne sütü ile beslenen çocukların, bebek mamaları ile beslenen çocuklara göre daha sağlıklı olduğu görülmüştür (Jakaitis ve Denning, 2014).

Anne sütündeki besin öğelerinin miktarı; laktasyon süresince bireyler arasındaki biyokimyasal farklılıklara, alınan diyetin içeriğine, laktasyon dönemlerine ve emzirme zamanının uzunluğuna göre değişebildiği için anne sütünün makro ve mikro besin öğelerinin miktarları oldukça geniş bir dağılım göstermektedir. Anne sütü; yağda ve suda çözünebilen 200'den fazla bileşik madde içeren kompleks bir bileşiktir. Bileşimin %88'den fazlası sudan oluşmaktadır. Besin öğeleri bu ortam içinde değişik şekillerde dağılmış haldedir. Anne sütünün besin öğeleri bileşimi Çizelge 2.1. de gösterilmiştir (Samur, 2008).

Bebek beslenmesi ile ilgili uygulamaların tarihsel gelişimi incelendiğinde, bugün bile en önemli besinin hala anne sütü olduğu görülmektedir. Anne sütü ile beslenmenin, bebek morbidite ve mortalite oranlarını azaltması, optimal büyüme ve gelişmeyi sağlamanın yanı sıra aileye ve ülkeye getirdiği ekonomik yararlar iyi bilinmektedir. WHO ve Birleşmiş Milletler Çocuklara Yardım Fonu (UNICEF) anne sütünün yaygınlaşması için tüm dünyada yoğun çaba göstermektedir. WHO ve UNICEF bebeklerin doğumdan itibaren ilk 6 ay sadece anne sütü ile beslenmelerini, yedinci

aydan itibaren ek gıdalara başlanılmasını, iki yaşına kadar emzirmeye devam etmesini önermektedir. Sanayi devrimi ve kadınların iş yaşamına girmesiyle, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde anne sütüne başlansa bile annenin emzirmeye devam etmesinde ciddi sorunlar yaşanmaktadır (Bolat ve ark., 2011) .

Özellikle gelişmekte olan ülkelerin yaygın bir sorunu olan yetersiz ve dengesiz beslenme; bir yandan bireylerin fiziksel, sosyal ve zihinsel gelişimlerini, diğer yandan da toplumun ekonomik ve kültürel gelişimini olumsuz yönde etkilemektedir. Bu olumsuz etkiler en çok bebeklerde ve çocuklarda görülmektedir. Önemli ölçüde anne sütünün yeterli süre verilmemesiyle ortaya çıkan yetersiz ve dengesiz beslenme, gelişmekte olan ülkelerde çocuk ölümlerinin %50'sinin nedenini oluşturmaktadır (Öncü ve ark., 2011). 2014 yılı verilerine göre yetersiz ve dengesiz beslenme çocuk ölümleri sebepleri arasında %45'ni teşkil etmektedir (WHO, 2014).

2.1.2. Bebek Maması ve Ek Gıdalar İle Beslenme

Gıda ürünleri ve üretimi pazarlaması son zamanlarda sağlıklı ve dengeli beslenmesi önemli olan çocuklara yönelmekte ve hızlı bir gelişim göstermektedir. Süt ve süt ürünleri, kahvaltılık tahıllar, dondurulmuş ürünler bu pazar kapsamında değerlendirilmektedir. Ayrıca, kuru bebek mamaları, süt formülleri, hazır bebek formülleri gibi 0-3 yaş bebeklere özel gıda pazarı da giderek gelişim göstermektedir. Bebek başına mama tüketim miktarı Polonya'da 40 kg, Endonezya'da 20 kg iken Türkiye'de 10 kg seviyesindedir. Ülkemizde bebek gıdaları sektörü, bebeklerin %75-85'inin bebek maması kullanabilir duruma gelmesini ve bebek maması tüketiminin bebek başına 2 katına çıkması hedeflenmektedir (Gülcan, 2011).

Bebek mamaları, ilk 4 veya 6 aya kadar normal ağırlıklı ve sağlıklı bebeklerin besin ihtiyaçlarını karşılayabilen, normal büyüme ve gelişmeyi sağlamak amacıyla üretilen, bileşimi anne sütüne yakın olan; protein, yağ, karbonhidrat, vitaminler, mineral maddeler ve katkı maddeleri ile teknolojisine uygun olarak hazırlanan ve ısıtılı işlemlerle dayanıklı hale getirilen tüketime hazır süt esaslı ürünlerdir (TGK, 2014). Örnek bebek maması içerikleri çizelge 2.2.'de gösterilmiştir (Gökçay ve ark., 2012).

Tam olarak *Cronobacter* spp. eradikasyonu sağlamasa da, FAO ve WHO'ya göre bebek mamalarının hazırlama sırasında 70°C su ile hazırlanması ve kullanılmadığında buzdolabına konulması bakteriyel büyümeyi inhibe etmek için gereklidir (Zhu ve ark., 2013; Pablo Huertas ve ark., 2015).

Çizelge 2.1. Anne sütü içerisindeki enerji ve besin öğeleri (Köksal ve Gökmen,2000)

Enerji ve Besin Öğeleri	Anne Sütündeki Miktar (1000 ml)
Enerji (kkal)	700
Protein (g)	8-9
Karbonhidrat (g)	30-50
Yağ (g)	42
Kazein:whey (%)	40:60
Vitaminler	
• E (mg)	2.3
• K (µg)	2.1
• Tiamin (mg)	0,21
• Riboflavin (mg)	0,35
• Niasin (mg)	1.5
• Pantotenik asit(mg)	1.8
• Biotin (µg)	4
• C(mg)	40
• D Vitamini (µg)	0.55
• A Vitamini (µg)	670 (retinol eşdeğeri)
• Mineraller	
• Sodyum (mEq)	7
• Potasyum(mEq)	13
• Klor(mEq/l)	11
• Kalsiyum(mg)	280
• Fosfor(mg)	140
• Magnezyum (mg)	35
• Demir (mg)	0,3
• Bakır (mg)	0,25
• Çinko (mg)	1.2
• İyot (µg)	110
• Manganez (µg)	6
• Selenyum (µg)	20
• Flor (µg)	16
• Krom (µg)	50

Çizelge 2.2. Örnek bebek mamaları içeriği (Gökçay ve ark., 2012)

Doğumdan itibaren önerilen bebek maması (bebek formülü) içeriği
<ul style="list-style-type: none">• Hidrolize whey (peynir altı suyu) konsantresi• Yapılandırılmış bitkisel yağlar• Glukoz şurubu ve mısır nişastası• İnek sütü kaynaklı galakto-oligosakkarid lifleri ya da polifruktoz lifleri• İnek sütü kaynaklı laktoz, soya lesitini ve kalsium D-pantotenat, D-biotin ve fiterolmonoglutamik asit• Potasyum di-hidrojen fosfat, kalsiyum klorür, sodyum klorür• Hayvansal yağ (balık yağı)• L-tirozin, kolin klorür, L-askorbik asit, taurin, sodyum L-askorbat, inositol, demir sülfat, çinko sülfat, bakır sülfat• Üridin 5-monofosfat sodyum tuzu, sitidin 5-monofosfat, DL-alfa tokoferil asetat, adenozin 5-monofosfat, inozin 5 monofosfat• sodyum tuzu• L-karnitin, nikotinamid, Fitomenadyon ve sodyum selenit• Retinil palmitat, DL-alfa tokoferol, riboflavin, tiamin hidroklorür, siyanokobalamin, kolekalsiferol, piridoksin hidrosiklorür, potasyum iyodür, manganez sülfat.
Bir yaşına doğru önerilen bir bebek maması içeriği:
<ul style="list-style-type: none">• Laktoz, palm, hindistan cevizi, ayçiçek ya da kanola şeklinde bitkisel yağlar• Yağsız süt tozu, demineralize serum proteini ve vitamin karışımı• Fitomenadion, biotin, kolekalsiferol, siyanokob alamin, kolin, taurin, inositol, L-karnitin)• Kalsiyum tri-sitrat, emüglatör (yağ asitlerinin mono ve digliseritleri, soya lesitini)• Sodyum tri-sitrat, kalsiyum klorür, magnezyum klorür, kalsiyum difosfat, potasyum trifosfat, potasyum dihidrojen fosfat,• Demir 2-glukonat, antioksidan (soya lesitini), çinko sülfat, potasyum klorür

2.2. Bebek Mamaları ve Ek Gıdalarda Mikrobiyolojik Özellikler

Türk Gıda Kodeksi 2011 yılında yayınlanan Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği'nde, ISO 21528-2 metodu referans alınarak, bebek ve küçük çocuk ek gıdaları için $<10^1$ kob/ml ve süt tozu için en çok 10^1 kob/ml koşulu ile *Enterobacteriaceae*'nin araştırılması bildirilmiştir (TGK,2011).

Cronobacter spp çeşitli gıda maddelerinden izole edilmiş olmasına rağmen, riskli gıda grubunu bebek mamalarının oluşturması sebebiyle, Türk Gıda Kodeksi'nde yapılan değişiklikler ile bebek formülü ve devam formüllerinde *Cronobacter* spp. analizinin yapılması zorunluluğu getirilmiştir ve yine bu yönetmelikte bebek formülleri, ve devam formüllerinde (özel tıbbi amaçlı diyet formüller dahil) *Cronobacter* spp. bulunmaması gerektiği belirtilmektedir (TGK, 2011).

WHO ve FAO nun hazırlamış olduğu CAC (Codex Alimentarius Commission International Food Standarts) komisyonu kriterlerinde bebek mamaları iki gruba ayrılmış ve yeni doğan mamalarında *Cronobacter* spp. nin 10 gr mamada 0 (sıfır) olması gerektiği, devam mamalarında ise yeni doğan sonrasında bu bakteriye karşı duyarlılık olduğu için bakılmasına gerek olmadığı vurgulanmıştır (Buchanan ve Oni, 2012).

Avrupa Birliği'nin Komisyon Regülasyonu 2073/2005 adı altında bebek mamaları için hazırlanan ilk Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde öncelikle bebek mamalarının *Enterobacteriaceae* açısından değerlendirilmesi gerektiği, sonrasında ise tanımlanan *Enterobacteriaceae* var ise ek olarak *Cronobacter* spp. açısından da değerlendirilmesi bildirilmiştir (Buchanan ve Oni 2012). Ancak sonrasında Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu (EFSA) bu iki aşamalı analizi sorgulamış ve incelenen örnek miktarlarının enterobakterler ve patojen mikroorganizmalar açısından farklılık olabileceğini öne sürmüştür (EFSA, 2007; Buchanan ve Oni, 2012). Sonuç olarak, bebek mamaları açısından her bir aşamanın ayrı ayrı değerlendirilmesi şeklinde düzenleme yapılmıştır (Buchanan ve Oni, 2012).

2.3. *Enterobacteriaceae*

2.3.1. *Enterobacteriaceae* Genel Özellikleri

İnsan tıbbındaki en önemli bakteri ailesi; özellikle hastane kaynaklı enfeksiyonlara neden olan *Enterobacteriaceae*'dir. Bu ailenin üyeleri Gram-negatif, basil, fakültatif anaerob, glukoz ve diğer şekerleri fermente eder, nitratı nitrite indirger, nadiren oksidaz olmakla birlikte katalaz üretirler. Pek çoğu çevrede yaygın olarak

bulunmasına rağmen, bir çok *Enterobacteriaceae* insan ve hayvan gastrointestinal sistem florasının bileşenleridir. Ayrıca, bu bakteriler septisemi, üriner sistem enfeksiyonları, pnömoni, kolesistit, kolanjit, peritonit, yara enfeksiyonları, menenjit, gastroenterit gibi birçok hastalığa neden olmaktadır (Tham,2012). *Enterobacteriaceae* familyasına ait sıklıkla görülen türler aşağıda bahsedilmektedir.

Escherichia (E.) coli

E. coli fakültatif anaerobik bir gram negatif ve memeli hayvanların kalın bağırsağında yaşayan bakteri türlerinden biridir. Normalde bağırsakta yaşadığı için, *E. coli*'nin çevresel sularda varlığı fekal kontaminasyonun bir belirtisidir. İnsan sindirim sisteminde 10^6 ile 10^9 kob/g arasında bulunmaktadır (Tham, 2012). Bağırsak florasının normal bir üyesi olan *E. coli* ile konak organizma arasında uyumlu bir ilişki olduğundan bakteri normalde hastalık yapmaz. Ancak, ortama geçmesi halinde, örneğin; aynı organizmada başka bir organa geçmesi (idrar yolu enfeksiyonu ile mesaneye geçmek gibi) veya başka bir konak organizmanın bağırsağına geçmesi durumunda, *E. coli* bir hastalık etmeni olabilir. Bazı *E. coli* tipleri ise, içinde buldukları hayvan için zararsız olmalarına rağmen insana geçtiklerinde hastalık yapabilirler. Bu hastalıklar arasında başlıca ishalleri hastalıklar olmakla beraber idrar yolu enfeksiyonları, menenjit, peritonit, mastit, septisemi sayılabilir. *E.coli*'nin, Enterotoksijen *E. coli* (ETEC), Enteroinvazif *E. coli* (EIEC), Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Enterohemorajik *E. coli* (EHEC), EnteroAggregatif *E. coli* (EAEC), Diffusely Adherent *E. coli* (DAEC) olmak üzere 6 çeşidi vardır. *E. coli* tipleri içerisinde en önemlisi olan EHEC'in sıklıkla ölümlü gıda kaynaklı enfeksiyonlarından sorumlu tutulan serotipi O157:H7 gıdada ilk kez 1982 yılında tanımlanmıştır (Shabana,2014; Su ve ark., 2014).

Klebsiella spp.

Klebsiella (K.) pneumonia, *Klebsiella (K.) oxytoca* ve *Klebsiella (K.) granulomatis* bu cinsin üç önemli türüdür. *E. coli* gibi, *Klebsiella spp.* de insan gastrointestinal sisteminde 10^4 kob/g/dışkı olarak bulunur. *K. pneumonia* insan enfeksiyonlarından en sık izole edilen türdür ve üriner sistem enfeksiyonları gibi bir çok çeşit enfeksiyona neden olabilir. Eski türlerin bir çok salgında yer almasından beridir *Klebsiella spp.*'nin *E. coli*'den daha önemli olduğu görülmektedir ve yayılması endemikten çok epidemiktir (Tham, 2012).

Pantoea (P.) agglomerans

P. agglomerans (önceki adıyla *Enterobacter agglomerans*) *Enterobacteriaceae* familyasına ait, hareketli, peritrik, sporsuz, gram-negatif, aerobik basildir. Genellikle

su, toprak, kanalizasyon, tohum, sebze, tortulu malzeme ve gıda maddeleri gibi ekolojik nişlerde bulunmaktadır. Ek olarak, hayvanlarda ve insanlarda hem fırsatçı hem de kommersal bir patojendir. Bu fırsatçı patojen kan, yara, ürin, boğaz ve iç organlar gibi klinik örneklerden izole edilebilmektedir. *P.agglomerans* bitkisel bir patojen olarak kabul edilmektedir ve 1960'lı yılların ortalarında hastane kaynaklı enfeksiyonlarda tanımlanmıştır (Mardaneh ve Dallal, 2013).

2.3.2. *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) Genel Özellikleri

Enterobacter (E.) sakazakii çok sayıda bakteri türüne sahip *Enterobacteriaceae* ailesinin bir üyesi olup gram negatif, peritrik flagellalı, hareketli, sporsuz, fakültatif anaerob basildir. Araştırmacılar bu türe bakteriyolojiye yaptığı katkı dolayısıyla japon bakteriyolog Riichi Sakazakii'nin adını vermişlerdir (Koluman, 2011). 2007 yılında yayınlanan bir çalışmada *E. sakazakii* olarak tanımlanmış 210 suşun DNA profilleri ve fenotipik özellikleri incelenmiş ve yeni bir cins olarak tanımlanmış ve bu bakterinin taksonomik sınıflandırılmasında değişiklik yapılması önerilmiştir. Buna göre *E.sakazakii* suşlarının tamamına *Cronobacter* adı verilmiştir. Günümüz bilimsel literatüründe, bakteri tanımlanırken hem *Cronobacter* spp. hem de *E.sakazakii* ismi kullanılmaktadır (Koluman, 2011). Bu cins yedi alt gruba düzenlenmiştir: *Cronobacter sakazakii*, *Cronobacter malonaticus*, *Cronobacter muytjensii*, *Cronobacter turicensis*, *Cronobacter dubliniensis*, *Cronobacter condimenti* ve *Cronobacter universalis* (Li ve ark.,2014).

Cronobacter spp. fırsatçı bir insan patojeni ve yenidoğanlarda hayatı tehdit eden bakteriyal enfeksiyonlara neden olan etiyolojik bir patojen olarak kabul edilmektedir. *Cronobacter* spp. ilk kez 1958 yılında, İngiltere'de iki yeni doğanın ölümü ile sonuçlanan bir salgında, neonatal menenjit ile ilişkilendirilmiştir. *Cronobacter* spp enfeksiyonları yenidoğanlarda menenjit, septisemi ve nekrotizan enterokolit gibi hayatı tehdit eden enfeksiyonlardır. Prematüre, 28 günden küçük ve düşük doğum ağırlığına sahip yeni doğanlardaki risk, büyük yenidoğanlara göre daha fazladır (Drudy ve ark., 2006). Bundan sonraki bölümlerde bakteri *Cronobacter* spp. olarak tanımlanacaktır.

2.3.3. Bebek Mamaları ve Ek Gıdalarda *Enterobacteriaceae* / *Cronobacter* spp. 'nin Varlığının Önemi

Bulaşma yolu tam olarak bilinmemekle birlikte, kontamine toz bebek mamaları ve onun hazırlanmasında kullanılan ekipmanlar *C. sakazakii*'nin başlıca kaynağı olarak bilinir. Dolayısıyla sulandırılmış toz bebek mamalarındaki *C. sakazakii* kontaminasyonu; pastörizasyon sonrası kontamine olan bileşimin kullanımı,

paketleme öncesi üretim ortamlarından, mamanın sulandırılması sırasında ve hazırlama işlemlerinin diğer aşamaları sırasında oluşan harici kontaminasyonlardan kaynaklanmaktadır (Güner ve Telli, 2011).

Bebek mamalarının kontaminasyonu; üretim esnasında (dahili) ya da hazırlama sırasında (harici) kullanılan aletler kaynaklı olabilir. Genel olarak *Cronobacter* spp. nin üretim aşamasında pastörizasyon sırasında hayatta kalamadıkları düşünülmektedir. Bu nedenle üretim aşamasındaki kontaminasyonun ısıtma işlemleri sonrasında olabileceği düşünülmektedir. Ek olarak *Cronobacter* spp. nin endüstriyel kurutma sırasında hayatta kalabildiği, hazır bebek mamalarında 2,5 yıla kadar canlılığını koruyabildiği bilinmektedir. Yine kontamine olmuş blender ya da kaşık gibi aletler ile mamanın hazırlanması sırasında da *Cronobacter* spp. kontaminasyonu olabileceği, bu aletlerin üzerinden bakterinin izole edilmesi ile anlaşılmaktadır (Pablo Huertas ve ark.,2015).

Prematüre bebeklerde ve yeni doğanlarda *Cronobacter* spp enfeksiyonlarının önlenmesinde en büyük katkının bebek süt formüllerinin üretimi ve şişelenmesi sırasındaki kontaminasyonunu önlemek olduğu bilinmektedir (Aigbekaen ve Oshomo, 2010).

FAO ve WHO tarafından organize edilerek Temmuz 2004'te İsviçre'de yapılan toz ve hazır bebek mamaları hakkındaki toplantıda; *Cronobacter* spp'nin ekolojisi, taksonomisi ve karakterinin daha iyi anlaşılması gerektiği, bulaşmayı önlemek için alınacak önlem çalışmalarının devamının ve ilgili standartlarda bu mikroorganizmaya da yer verilmesi kararı verilmiştir. Yine aynı toplantıda bebek mamalarında olası enfeksiyon yapabilecek mikroorganizmalar 3 grupta (A,B,C) kategorize edilmiştir. A gurubunda olan mikroorganizmaların hastalık yaptığı kesinleşmiş, B grubundakiler muhtemel hastalık yapanlar ya da tam kanıtlanmamış olanlar, C grubundakiler ise hastalık yapma ihtimalleri düşük olan fakat daha kanıtlanamamışlar. Çizelge 2.3. 'de bu grupta yer alan bakteriler yer almaktadır (Forsythe, 2005; Anonim, 2004).

Cronobacter spp.'nin ekolojik ve etiyolojik karakteristikleri hakkındaki bilgiler azdır ve bebek formülleri üreten fabrikalarda, hastane mutfaklarında *Cronobacter* spp. oluşumuyla ilgili çalışmalar derinlemesine incelenmemiştir (Shaker ve ark, 2007). Bu organizmanın bebek mamalarının dışında tahıl, darı, ekmeke, pirinç, tohum, bitki, et, peynir, sebze ve yumurta gibi gıdalarda da bulunabildiği de bilinmektedir (Çetinkaya ve ark, 2012).

Çizelge 2.3. Bebek mamalarında olası enfeksiyon yapabilecek mikroorganizmaların kategorizasyonu (FAO ve WHO, 2004).

Kategori	Bakteri Çeşidi
Kategori A	<i>Salmonella, E. sakazakii</i>
Kategori B	<i>E. vulnaris, C. koseri, E. cloacae, H. alvei, P. agglomerans, K. pneumonia, K.oxytoca</i>
Kategori C	<i>C. botulinum, S.aureus, L. monocytogenes, B. cereus</i>

A:hastalık yaptığı kesinleşmiş mikroorganizmalar, B:muhtemel hastalık yapanlar ya da tam kanıtlanmamış mikroorganizmalar, C: hastalık yapma ihtimalleri düşük olan fakat daha kanıtlanamamışlar.

Cronobacter spp. nedeni ile oluşan enfeksiyonların insidansı azdır ancak, bu patojenle enfekte olan yeni doğanlarda %40 dan fazla mortalite oranı olduğu ve hayatta kalanların ise şiddetli nörolojik komplikasyonlara maruz kaldığı bilinmektedir. Toz bebek formüllerinin kontaminasyonu ile oluşan *Cronobacter* spp. salgınları Amerika ve Avrupa'da rapor edilmiştir (Li ve ark., 2014).

Bebek formüllerinde *Enterobacteriaceae* ve özellikle *Cronobacter* spp. (*E.sakazakii*) araştırılması üzerine bir çok çalışma yapılmıştır.

Muytjens ve ark. (1988) 35 ülkeden topladıkları 141 toz bebek maması örneğinin %52,2 sinin *Enterobacteriaceae* ile kontamine olduğunu, bunlardan %25 inin *E.agglomerans*, %21 inin *E.cloacae* ve %14 ünün *E.sakazakii* içerdiğini belirtmişlerdir.

Nazarowec-White ve Farber (1997), Kanada'daki 5 farklı şirketten alınan 120 bebek maması kutusunu test ederek bunlardan %6,7 sinin *E.sakazakii* içerdiğini tespit etmişlerdir.

Iversen ve Forsythe (2004) 82 toz bebek maması örneğini ve 404 gıda ürününü *E.sakazakii*, *Salmonella* ve *Enterobacteriaceae* varlığı açısından incelemişlerdir. *E.sakazakii*, 82 mamanın 2 sinde (%2,4), 49 kurutulmuş bebek gıdasının 5'inde (%10,2), 72 süt tozunun 3'ünde (%4,1) , 62 peynir ürününün 2'sinde (%3,2) ve 122 bitki ve baharatın 40 ında (%37,8) izole edilmiştir. Mama ve süt tozunun *Salmonella* kontrolü yapılarak hijyenik üretildiği ancak, *Enterobacteriaceae* tespiti ile *E.sakazakii*'nin kontrol altına alınamadığı sonucuna varılmıştır.

2.4. Bakterilerde Antimikrobiyal Direnç

Alexander Fleming penisilini bulduğunda bakteriyal enfeksiyonlardan korunma ve tedavilerinde etkili ve güvenilir aşama kaydedilmiştir. Ancak, antimikrobiyal direnç mekanizmasının gelişmesi ve bakterilerde bu direncin tespit edilmesi dünya çapında sağlık adına önemli bir tehdit oluşturmuştur.

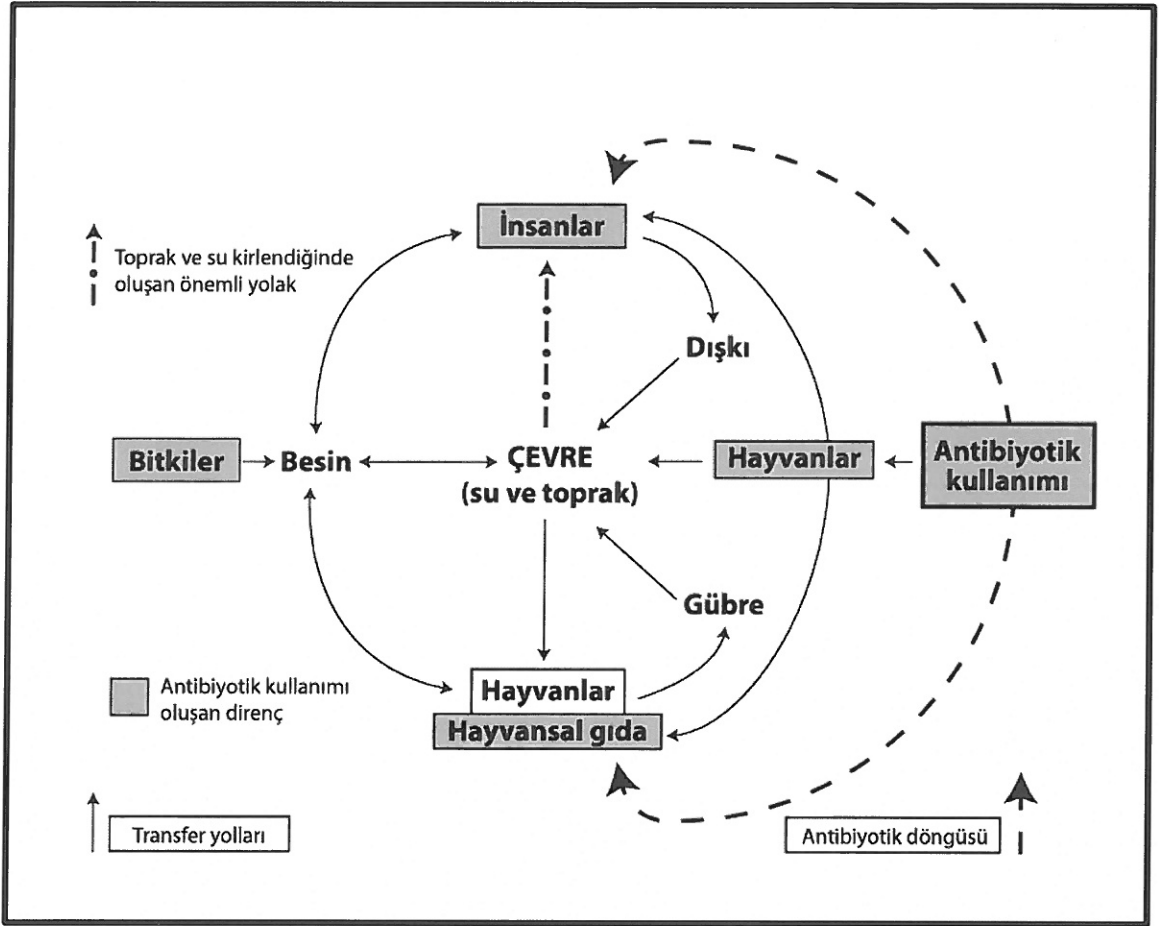
Hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı etki eden ve sıklıkla tercih edilen antibiyotikler olan betal-laktam grubu antibiyotiklere karşı oluşan direnç mekanizması en önemli direnç mekanizmalarından biridir (Tang ve ark., 2014).

Gram negatif bakterilerde beta-laktam direnci; penisilin bağlayıcı proteinlerin (PBP) değişimi, beta-laktamaz üretimi ve PBP'lere erişimin engellenmesi olacak şekilde muhtemel üç mekanizma ile meydana gelmektedir. Gram pozitif bakterilerle kıyaslandığında gram negatif bakterilerde PBP'lerin periplazmik alanda olması beta laktam antibiyotiklerin bakterilerin dış membranından girip hedeflerine bağlanabilmelerini sağlamaktadır. Bu nedenle beta-laktam gurubu antibiyotiklerin girişini ya da çıkışını kısıtlayan herhangi bir değişim antibiyotiğe karşı direnç gelişimine neden olmaktadır. Gram negatif bakterilerde beta laktamaz üretimi ile oluşan direnç en yaygın görülen direnç mekanizmalarındandır (Tang ve ark., 2014).

Antibiyotikler ve antibiyotik direnci, farklı mikroorganizmalar arasında sonsuz bir yarışmanın parçasıdır. Şekil 2.1. de antibiyotik direnci genlerinin insan, hayvan, gıda ve çevre arasındaki taşınma yolları gösterilmiştir.

2.5. Beta Laktam Gurubu Antibiyotikler-Sefalosporinler

Düşük yan etkilerinin olması ve bakterisit etkiye sahip beta-laktam gurubu antibiyotikler günümüzde sıklıkla tercih edilen antibiyotik gurubudur. Bakterilerin hücre duvarlarında bulunan ve mikroorganizmaların yapı bütünlüğünü sağlayan peptidoglikan tabaka yapımını bozarak etki gösterirler. Hücre duvar yapısında bozulma olan bakterilerde ozmotik direnç kaybı gerçekleşir ve inaktif olurlar (Ayaz ve ark., 2008). Sefalosporinler etki spektrumları açısından 4 guruba ayrılmaktadırlar her bir guruptaki antibiyotik türleri Çizelge 2.4' te gösterilmiştir (Saran ve Karahan, 2010).



Şekil 2.1. Antibiyotik direncinin taşınma yolları (Anonim,2012)

2.6. Geniş-Spektrumlu-Beta-Laktamazlar (ESBL)

Geniş spektrumlu beta laktamaz terimi 1989 yılında Philippon tarafından ortaya atılmıştır. ESBL'ler aşağıdaki özelliklere sahip beta laktamazlar olarak bilinmektedirler: transfer edilebilirler, penisilinleri, birinci, ikinci, üçüncü kuşak sefolasporinleri ve aztreonamı (sefamisin hariç) hidrolize edebilirler, klavulanik asit gibi beta laktamaz inhibitörleri tarafından bloke edilebilirler.

Enterobacteriaceae direncine bağlı oluşan enfeksiyonların insidansı son 10 yılda hızlıca artmış ve dünya çapında bir salgın haline gelmiştir. Kolonizasyon ya da ESBL üreten *Enterobacteriaceae* ile oluşan enfeksiyon başlangıcı için bilinen risk faktörleri: antibiyotik kullanımı, uzun süreli ve/ve ya yakın zamanda hastanede kalmak, şiddetli hastalıklar, yakın zamanda ameliyat, mesane kateterizasyonu, invaziv medikal cihaz kullanımı, uzun süreli bakımlar, uluslararası seyahatler ve 65 yaş üstü olmak olarak belirlenmiştir (Tham ve ark., 2012).

Çizelge 2.4. Sefalosporinlerin etki spektrumlarına göre sınıflandırılması
(Saran,2010)

Antibiyotik Sınıfı	Antibiyotik Türleri
I. Kuşak Sefalosporinler	sefadroksil, sefradin, sefalekssin, sefalotin sodyum, sefazolin, sefapirin
II. Kuşak Sefalosporinler	sefuroksim, sefoksitin, sefamandol, sefonisid, sefonarid, sefaklor, sefotiam, sefmetazol, sefotetan.
III. Kuşak Sefalosporinler	sefotaksim, seftizoksım, sefoperazon, seftriakson, moksolaktam, seftazidim, sefsulodin, sefmenoksım, sefpiramid
IV. Kuşak Sefalosporinler	sefepim, sefpirom

Özellikle *Enterobacteriaceae* familyasına ait türlerin insanlarda antibiyotik dirençliliğinin yayılmasında aktif rol oynadığı görülmektedir. Gıda mevzuatları bu tür bakterilerin gıdalarda varlıklarını bir hijyen indikatörü olarak kabul etmesine rağmen; antibiyotiklere dirençlilik henüz gıda güvenliği kriteri olarak yer almamaktadır. Bu olgunun karmaşıklaşarak ve artarak süreceğinin anlaşılmasıyla birlikte, takibi ve önlenmesine dönük mültidisipliner işbirliği çabalarında dikkat çekici artış görülmektedir. Dirençli bakterilerin yayılmalarında gıdaların oynadıkları roller henüz net şekilde ortaya konulamamıştır

ESBL'lerin epidemiyolojisi oldukça karışıktır ve ESBL'nin ortaya çıkışı değerlendirildiğinde bulunduğu ülke ile birlikte geniş coğrafik alanlar, bulunduğu topluluk, hastane ya da konak (çoğu zaman tek bir hasta ya da sağlıklı taşıyıcı) bakterinin aktarılmasında önem taşıyan faktörlerden bazılarıdır. Spesifik tipteki bakterilerin (*E.coli* daha endemik, *K.pneumonia'* nin daha epidemik olması gibi) incelenmesinde farklı faktörlerde mevcuttur. Ek olarak, çevre (örneğin, toprak ve su), yırtıcı hayvanlar, çiftlik hayvanları ve ev hayvanları bakterilerin çoğunlukla bulunduğu rezervuarlardandır. Sonuç olarak bakterilerin transferi su ve gıdadan olabileceği gibi doğrudan ya da dolaylı (insandan insana) temas üzerinden olabilmektedir (Tham ve ark., 2012).

Avrupa'da farklı ülkelerin yoğun bakım ünitelerinden elde edilen izolatlarda ESBL sentezleyen *K.pneumonia* suşları ortalama %25 sıklıkta saptanmıştır. Bu oran ülkemizdeki izolatlarda %60'a varan oranlara çıkabilmektedir (Akova,2004).

ESBL tespitinin önemli olduğunu vurgulayan bir çalışmada ESBL pozitif *E.coli* ile oluşan enfeksiyonlarda mortalite oranının %24,3 ve ESBL negatif *E.coli* ile oluşan enfeksiyonlarda mortalite oranının %8 olması ESBL üretiminin enfeksiyon tedavisinin başarısız olmasında ne denli önemli olduğunu göstermektedir (Öcal, 2012).

2.7. ESBL Tanı Yöntemleri

Beta laktam antibiyotiklerin ve bu antibiyotiklerin inhibitör konsantrasyonlarının sık kullanımı, var olan direnç mekanizmalarını arttırmakla birlikte yeni direnç mekanizmalarının ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Öcal, 2012).

ESBL üreten bakteriler nedeni ile enfekte olan hastalara genel bir antibiyotik tedavisi uygulandığında tedavide başarı sağlamamaktadır. Bu nedenle mikrobiyoloji laboratuvarlarında bu enzimleri saptamak için geliştirilmiş standart tarama ve testlerinin uygulanması ve sonuçların doğru yorumlanması gerekmektedir (Akova, 2004).

Antimikrobiyal duyarlılık testleri Clinical and Laboratory Standarts Institute (CLSI), British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), Deutsches Institut für Normung (DIN) ve Comite de l'Antibiogramme de la Societe Française de Microbiologie (CA-SFM) 'da belirtilen uluslararası kabul görmüş prosedürlere yapılmalıdır.

Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) ve Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST) gibi Uluslararası kuruluşlar ESBL üreten *Enterobacteriaceae* familyası içinde *E. coli*, *P. mirabilis* ve *Klebsiella* spp. dışında diğer türlerin tespitiyle ilgili metot önerisinde bulunmamaktadır.

ESBL üreten suşların rutin antibiyotik duyarlılık testlerinde sefalosporinlere duyarlı görünseler bile bütün sefalosporinler, penisilinler ve aztreonama dirençli olarak bildirilmesini önermektedir. Yanlış ESBL pozitif bildirimler, günümüzde en etkili ve en önemli tedavi seçeneği olan karbapenemlere karşı direnç gelişimine, maliyet artışına, aynı zamanda yanlış negatif bildirimler ise tedavide başarısızlığa yol açmaktadır. (CLSI,2013; Henshke Bar Meir ve ark., 2006).

2.7.1. ESBL Tarama Testleri

CLSI talimatları ESBL tarama yöntemi olarak disk difüzyon testini önermektedir. Bu yöntemde göre zon çapı seftazidim için ≤ 22 mm, sefotaksim için ≤ 27 mm ve sefpodoksım için ≤ 17 mm'dir. Bir izolatın bu üç tip antibiyotikten en az birisine ait

inhibisyon zonu çapının belirtilen değerin altında kalması durumunda ESBL şüpheli olarak dűşünülmektedir.

CLSI, *E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* türlerini kullanarak ESBL üretiminin doğrulanması standartlarını oluşturmuştur. Buna göre, disk difüzyon testinde ESBL üretimi için sefpodoksim (CPD), seftazidim (CAZ) ve sefotaksim (CTX) antibiyotiklerine karşı duyarlılığının saptanması gerekmektedir.

Çizelge 2.5. ESBL Tarama Testleri Zon apları (CLSI, 2013)

Antibiyotik	İnhibisyon Zonu (mm)
Sefotaksim	≤ 27
Seftazidim	≤ 22
Sefpodoksim	≤ 17

Belirlenen zon çapları çizelge 2.5.'de gösterilmiştir. Duyarlılığının azaldığı durumlarda ise doğrulama testi yapılmalıdır (CLSI, 2013).

2.7.2. ESBL Doğrulama Testleri

Fenotipik doğrulama testleri klavulanik asit ve indikatör sefalosporin arasındaki sinerjinin gösterilmesi temeline dayanmaktadır. Doğrulama amacıyla değişik yöntemler tanımlanmıştır. Bunlar; klavulanik asit içeren kombinasyon disklerinin kullanımı, çift disk sinerji yöntemi, üç boyutlu yöntem, inhibitörle güçlendirilmiş disk difüzyon testi, minimum inhibisyon konsantrasyonunun (MİK) saptandığı dilüsyon yöntemleri, E-test stripleri ile MİK' in saptanması gibi yöntemlerdir (CLSI,2013).

Klavulanik asit içeren diskler ticari olarak bulunmakta ya da CLSI önerilerine göre laboratuvarında hazırlanabilmektedir. Bu amaçla klavulonik asit içeren ve içermeyen seftazidim ve sefotaksim diskleri kullanılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki zon, klavulonik asit içermeyen disk etrafındaki zona kıyasla differansiyle ölçüm farkı en az ≥ 5 mm ise, izolat ESBL üretimi açısından pozitif kabul edilir (CLSI, 2013). *Enterobacteriaceae* için belirlenen standart zon çapları ve MİK değerleri Çizelge 2.5'te gösterilmiştir.

2.8. Gıdalarda ESBL Üreten *Enterobacteriaceae* Türleri

Bilinçsiz antibiyotik kullanımı ile birlikte, enfeksiyon tedavisinde oldukça etkili olan 3. jenerasyon antibiyotiklere karşı bile bakteriyel direncin hızla arttığı bilinmektedir.

Mikroorganizmaların oluşturduğu bu direnç FAO, WHO gibi uluslararası kurumlar tarafından biyolojik tehlike (Bio-Hazard) olarak kabul edilmektedir. ESBL üreten mikroorganizmaların gıdalara karışması ile birlikte insan sağlığı da olumsuz yönde etkilenmektedir.

ESBL üreten mikroorganizma bulaşmış bir gıdanın tüketilmesi, vücuda alınan bu mikroorganizmalar insanların yakalandıkları herhangi bir enfeksiyon durumunda alınacak antibiyotiğin işe yaramamasına neden olmakta, bu da insan sağlığının negatif yönde etkilenmesine neden olmaktadır. Bir çok *Cronobacter* izolatu sıklıkla kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlı olduğu halde bazı gıda örneklerinde dirençli izolatların olduğu bildirilmiştir (Lui,2014).

Çizelge 2.6. *Enterobacteriaceae* için belirlenen standart zon çapları ve MİK değerleri (CLSI, 2013)

Antimikrobiyal ajan adı	Disk içeriği	Zon Çapı (mm)			MİK (µg/ml)		
		S	I	R	S	I	R
CAZ	30 µg	≥21	18-20	≤17	≤4	8	≥16
CAZ CLA	30 µg + 10 µg	≥26	23-25	≤22			
CPD	10 µg	≥21	18-20	≤17	≤2	4	≥8
CPD CLA	10 µg + 10 µg						
CTX	30 µg	≥26	23-25	≤22	≤1	2	≥4
CTX CLA	30 µg + 10 µg	≥31	28-30	≤27			

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

Son zamanlarda toz bebek formüllerinin mikrobiyolojik güvenliğine dikkat çekilmektedir. Güvenliğe dikkat edilmesi, kontamine olan toz bebek formülleri sebebiyle oluşan *E.sakazakii* ve *K.pneumonia'* yı içeren *Enterobacteriaceae* ailesi kaynaklı yenidoğan enfeksiyonlarının artması sebebi ile olmaktadır. Bu ürünler steril değildir fakat uluslararası mikrobiyolojik standartlara uyum sağlaması gerekmektedir (Zhou ve ark., 2011).

2.9. VITEK®MS (bioMérieux)

MASS Spektrometre (MALDI-TOF MS; Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry-Matriks Yardımlı Lazer İyonizasyon Kütle Spektrometresi) yöntemi bakteri hücrelerinden protein profilini çıkararak referans bir spektra ile karşılaştırma üzerine dayalı bir identifikasyon (tanımlama) yöntemidir (Rıfaat ve ark.,2014).

Matriks destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyonunda (MALDI) ışığı absorbe eden bir matriks varlığı söz konusudur. Bu matriks varlığında analizi yapılacak molekülün yüzeyden kopması ve iyonizasyonu için gereken enerjiyi lazer ışımından alan bir çarpışma iyonizasyonu tekniğidir. Bu teknikte, her bir lazer atışında meydana gelen iyonların çözülmesi ve ayrılması için atış analizörüne ihtiyaç duyulmaktadır. Bu sebeple MALDI ile birlikte kullanılan iyon ayırıcı kütle analizörü "time of flight" ya da "Uçuş zamanı" (TOF) analizörüdür. TOF, iyonların ağırlıkları ile doğru orantılı bir süre içinde dedektöre ulaşmasını sağlamaktadır (Karataylı ve Bozdayı, 2008).

MALDI; proteinler, peptitler ve şekerler gibi biyomoleküllerin ve eski iyonizasyon yöntemleriyle iyonize edildiğinde kırılıp parçalanmaya eğilimli olan polimerler, dendrimerler gibi büyük organik moleküllerin analizine olanak sağlayan, kütle spektrometresinde kullanılan hassas bir tekniktir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Gereç

3.1.1. Gıda örnekleri

Bu çalışmada zincir marketlerde satışa sunulan farklı markalardan 40 adet hazır bebek maması, 60 adet bebek maması olarak kullanılan tahıl bazlı gıda ve 15 adet süt tozu örnekleri olmak üzere toplam 115 adet gıda materyali Haziran-Ağustos 2014 döneminde toplanmıştır. Örneklem dağılımı Çizelge 3.1 'de sunulmuştur.

Çizelge 3.1. Örneklem

Numune Cinsi	Örnek sayısı (n)	Özelliği
Bebek maması	20	Yerli kapalı paket
	20	İthal kapalı paket
İrmik	10	Açık satılan
	10	Kapalı paket
Nişasta	10	Açık satılan
	10	Kapalı paket
Pirinç Unu	10	Açık satılan
	10	Kapalı paket
Süt Tozu	15	Açık satılan

3.1.2. Kullanılan Alet ve Cihazlar

3.1.2.1. Besiyeri ve Kimyasal Malzemeler

- Maximum Recovery Diluent (M.R.D.)

Çizelge 3.2. MRD içerik bilgisi

Formül	İçerik (g/lt)
Pepton	1.0
Sodyum klorür	8.5

9.5 gr M.R.D. toz besiyeri (LABM LAB103, İngiltere) 1 litre distile suda çözününceye kadar karıştırılır. Hazırlanan çözelti otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilir. Kullanılana kadar ışık görmeyen bir ortamda oda sıcaklığında saklanır (TS 62 35 En ISO 6887-1).

- Violet Red Bile Glucose Agar (V.R.B.G.A.)

Çizelge 3.3. V.R.B.G.A içerik bilgisi

Formül	İçerik (g/lt)
Maya Ekstresi	3.0
Dengelenmiş Peptonlu Su	17.0
Sodyum Klorid	5.0
Safra Tuzları No.3	1.5
Glukoz	10.0
Nötral Kırmızı	0.03
Kristal Viyole	0.002
Agar No.2	12.0

38.5 gr toz V.R.B.G.A. (LABM LAB88, İngiltere) besiyeri 1 litre distile su ile karıştırılır. Elde edilen karışım için 100°C'lik su banyosunda bekletilerek iyice çözünmesi beklenir. Agar iyice eridikten sonra soğumaya bırakılır ve 45°C ye kadar soğutularak petrilere dökülür ve 3 saat içerisinde kullanılır (ISO 21528-2).

- BCP Glucose Agar

41.5 gr toz BCP Glukoz Agar (Conda, Catno 1320, İspanya) 1 litre distile su ile karıştırılır. Hazırlanan çözelti, tamamen çözünmesi için 100 °C'lik su banyosunda iyice çözünmesi beklenir.

Çizelge 3.4. BCP Glucose Agar içeriği

Formül	İçerik (g/lt)
Tripton	10
D-glukoz	10
Sodyum klorür	5
Maya ekstraktı	1.5
Bromokresol moru	0.015
Bakteriyolojik Agar	15

Agar iyice eridikten sonra tüplere 10 ml dağıtılır. Dağıtım yapıldıktan sonra otoklavda 121°C'de 15 dakika steril edilir (ISO 21528-2).

- Nutrient Agar

Çizelge 3.5. Nutrient Agar içeriği

Formül	İçerik (g/lt)
Pepton	5.0
Sığır Eti ekstraktı	3.0
Sodyum klorür	8.0
Agar No.2	12.0

28 gr toz Nutrient agar (LABM LAB8, İngiltere) tartılarak 1 litre distile su ile karıştırılır. Elde edilen çözelti otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilir. Steril edilen çözelti petrilere dökülür. Agar donduktan sonra 4-6°C'deki buzdolabında kullanılabileceği kadar saklanır. (ISO 21528-2).

- ESBL Agar

Çizelge 3.6. ESBL Agar içeriği

Formül	İçerik (g/lt)
Pepton karışımı	43.2
Kromojenik karışım	1
Agar	15
Selektif karışım	0.5

59,2 gr toz Kromatik ESBK Agar (Liofilchem 610629, İtalya) tartılarak 1 litre distile su ile karıştırılır. Hazırlanan çözelti otoklavda 121°C'de 15 dk steril edilir. Steril edilen çözelti 50°C'ye kadar soğutulur. Soğutulan besiyeri içine toz kromatik vial supleman (Liofilchem 81090, İtalya) eklenerek, çözelti petri plaklarına dökülür. Kullanılana kadar 4-6°C'lik buzdolabında saklanır (CLSI,2013).

- Mueller Hinton Agar

Çizelge 3.7. Mueller Hinton Agar içeriği

Formül	İçerik (g/lt)
Sığır eti ekstraktı	2.0
Kazeik asit hidrolizatı	17.5
Nişasta	1.50
Agar No.1	17.0
Kalsiyum İyonları	50-100 mg/litre
Magnezyum İyonları	20-35 mg/litre

38 gr toz Mueller Hinton Agar (LABM LAB39, İngiltere) tartılarak 1 litre distile su ile karıştırılır. Elde edilen çözelti 121 °C'de 15 dk steril edilir. Steril edilen çözelti 47 °C ye kadar soğutulur petri plaklarına dökülür. Kullanılana kadar 4-6°C buzdolabında saklanır.

3.1.2.2. Cam ve diğer gereçler

- Otomatik Pipet: 1 ml (Brand)
- Petri: 90 mm, plastik, tek kullanımlık, steril
- Öze, plastik, tek kullanımlık, steril
- Deney tüpü
- Vidalı Kapaklı Schott Şişe: Cam, 250, 500 ve 1000 ml'lik, plastik kapaklı,
- Steril poşet
- Steril tuzlu su çözeltisi (% 0,85 NaCl₂)
- 0,5 McFarland referans Kontrol Solüsyonu
- Steril pamuklu eküvyon çubuğu

3.1.2.3. Cihazlar

- İnkübatör (37°C lik- Binder, Almanya)
- Otoklav (Hirayama, Japonya)
- Su banyosu (Stuart, İngiltere)

- Hassas Terazî (AND GF6100, Japonya)
- Stomacher (Easy Mix, Almanya)
- Buzdolabı (4-6°C)
- Distile su cihazı (Aquatron A4000)

3.2. Yöntem

Çalışmada gıda numunelerinde *Enterobacteriaceae* türlerinin varlıklarının tespiti için ISO 21528-2 (Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* — Part 2: Colony-count method) talimatı takip edildi. Araştırmada CLSI tavsiyeli kontrol suşları *E. coli* ATCC 25922 ESBL negatif kontrol ve *K. pneumoniae* ATCC 700603 ESBL pozitif kontrol suşları kullanılmıştır (Çizelge 3.8).

Çizelge 3.8. Kontrol Suşları (CLSI,2013)

No	Tanımı	Kod	Marka	Kullanım amacı
1	<i>E. coli</i>	ATCC 25922	Oxoid CL7050	ESBL negatif suş
2	<i>K. pneumonia</i>	ATCC 700603	Oxoid CL3074	ESBL pozitif suş

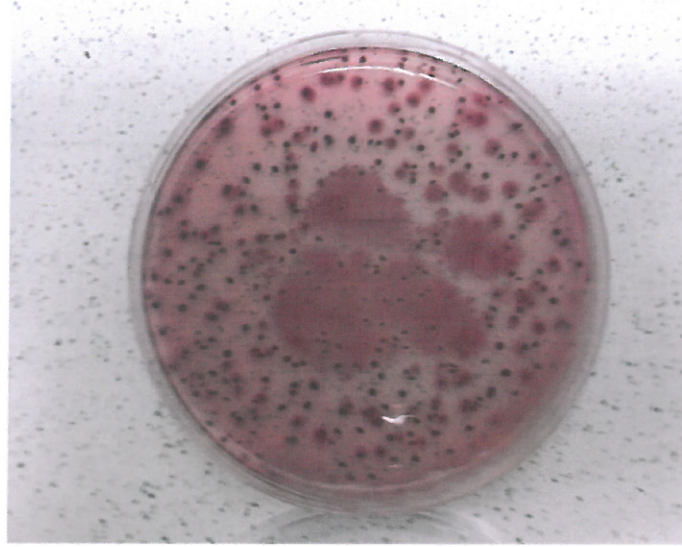
3.2.1. Numune Hazırlama

Farklı satış noktalarından alınan numuneler analiz için laboratuvara getirildi. 10 gr örnek filtreli ve ağzı kilitli steril örnek hazırlama torbasına konuldu. Torbanın darası alındı ve örneğin tartımı yapıldı. Tartımı tamamlanan örneğin üzerine Madde 3.1.1.1. de belirtildiği şekilde hazırlanan 90 ml M.R.D. steril mezür kullanılarak eklendi. Süspansiyon 1 dk stomacher' de homojenize edildi.

3.2.2. Kültür-bazlı Çalışma

Madde 3.2.1'de hazırlanan karışımdan 1 ml petri kabına pipetlendi. Üzerine Madde 3.1.1.1.de belirtilen 45°C sıcaklığında olan 15 ml V.R.B.G.A. boşaltıldı ve elle sağa sola doğru hareket ettirerek iyice karışmaları sağlandı. Besiyerinin donması beklendi. Katılaştıran besiyeri üzerine tekrar 15 ml daha VRBGA döküldü. Petri kabı donduktan sonra 37°C de 24 saat inkübasyona alındı (ISO 21528-2).

İnkübasyon sonunda VRBGA agarda gelişen ve tipik koloniler Nutrient Agara çizgi ekim metodu ile ekildi. Ekimi yapılan petri plağı 37°C de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda Nutrient Agarda oluşan kolonilere Merck Bactident® Oxidase kiti (Merck, Darmstad, Almanya) kullanılarak oksidaz negatif testi yapıldı.



Şekil 3.1. VRBGA besiyerinde gelişen *Enterobacteriaceae*

Test sonucu negatif veren Gram negatif kolonilerden BCP Glucose Agara tüp ekim yapılarak, 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda BCP Glukoz Agarda gözlenen renk değişimi ile (mordan sarı renge dönüşüm) izolatların enterik bakteri olduğu sonucuna varıldı. BCP agarda oluşan renk değişimleri Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Sarı renk veren Gram negatif enterik bakterilerin geliştikleri Nutrient Agar petri plakları parafilm ile sarılarak ileri analizlerde kullanılmak üzere 4-6°C'de buzdolabına kaldırıldı.

3.2.3. ESBL Tarama, Doğrulama ve MİK tespiti

BCP Glucose Agarda sarı renge dönüşüm gösteren örnekler ESBL kromojen agara (LiofilChem, İtalya) azaltma yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan örnekler 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda ESBL agarda pembe üreyen koloniler *E.coli* şüpheli ve mavi üreyen koloniler *Klebsiella* şüpheli olarak kabul edilmiştir.

Disk difüzyon ve disk difüzyon doğrulama testlerine geçildi. Gelişen ESBL şüpheli pembe veya mavi kolonilerden steril izotonik solüsyonuna bulaş yapıldı ve dansitesi 0.5 Mc Farland standardına ayarlandı. Bu süspansiyondan steril bir eküvyon yardımıyla sürme yöntemiyle Mueller Hinton agara (LabM, İngiltere) yayma yöntemiyle ekim yapıldı. Ekimi yapılan örnekler – çizelge 3.9' da belirtilen türdeş antibiyotik disklerinden CAZ±CLA, CTX±CLA ve CPD±CLA CLSI (2013) talimatlarına göre steril bir forsep yardımıyla yerleştirildi. Disk yerleştirilen petri ters çevrilerek, 37°C de 24 saat inkübasyona bırakıldı.



Şekil 3.2. BCP Glucose Agar

CLSI talimatına göre ESBL tarama testinde en az bir cins diskin zon çapı altında kalan izolat ESBL şüpheli kabul edilerek, disk difüzyon doğrulama testine alındı. Sefotaksim (CTX), seftazidim (CAZ) ve sefpodoksim (CPD) ve bu disklerin 10 µg klavulanik asit içeren türdeşleri ile yapıldı. Klavulanatlı ve klavulanatsız disklerin zon ölçüm değerleri arasındaki diferansiyel fark CLSI talimatına göre her üç antibiyotik için ≥ 5 mm olması durumunda fenotipik olarak kesin ESBL pozitif Gram negatif enterik bakteri olarak kabul edildi.

0.5 Mc Farland eşliğine göre bulanıklığı ayarlanan bakteri süspansiyonundan 100 mikrolitre solüsyon steril bir mikropipet yardımıyla alınarak 10 ml Mueller Hinton Buyyon (Merck, darmstad, Almanya) tüpüne pipetlendi. Süspansiyon 5-10 saniye vortekslenerek iyice karışması sağlandı. Bu karışımdan 100 mikrolitre Micronaut-S beta-laktamaz VII hazır pleytindeki kutuculara (96 adet) pipetlendi. Pleytin üstü steril etiket ile dikkatlice kapatıldı. Üstü kapatılan pleyt 35-37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonu tamamlanan pleytler antibiyogram doğrulama ve MİK değeri tespiti amacıyla Termoscientific Multiskan FC Spektrometre ile okumaya alındı. Veriler Sifin yazılımı ile analiz edildi.

Çizelge 3.9. Kullanılan antibiyotik diskleri

Antibiyotik Diski	İçeriği
CAZ CV	seftazidim 30 µg klavulanat 10 µg
CAZ 30	seftazidim 30 µg
CTX CV	sefotaksim 30 µg klavulanat 10 µg
CTX 30	sefotaksim 30 µg
CPD CV	sefpodoksım 10 µg klavulanat 1 µg
CPD 10	sefpodoksım 10 µg

3.2.4. VITEK®MS (bioMérieux) ile İdentifikasyon

Bu çalışmada identifikasyon işlemi VITEK® MS Maldi Tof cihazı talimatı takip edilerek yapılmıştır. ESBL şüpheli oksidaz negatif kolonilerin varlığını doğrulamak ve karakterize etmek için bioMérieux firmasından VITEK® MS cihazı kullanılmıştır. VRBGA agarda üreme olan numuneler Nutrient Agara geçilerek VITEK® MS (bioMérieux) aracılığı ile tanımlanmıştır.

Slaytlar hazırlanırken, slayt üzerinde bulunan matriks merkezindeki pozitif kontrol kuyucuğuna *E.coli* ATCC 8739 referans suşu ve diğer kuyucuklara Nutrient Agar'a geçilen şüpheli koloniler steril bir öze yardımıyla bulaştırıldı.

Sonraki adımda 1 µl matriks solüsyonu (bioMérieux, Fransa) kuyucuklara pipetlendi. Oda koşullarında kuruyana kadar 1-2 dk bekletildi. Bu işlemler 2. sınıf biyogüvenlik kabini içinde yapıldı. Cihaz yazılımındaki ana menüye giriş yapılarak, hazırlanmış slayt barkodu okutuldu ve örneklerin olduğu kuyucuklar işaretlendi. Hazırlanan slayt kasete yerleştirildikten sonra okuma başlatıldı. Ana menü girişinden VITEK® MS Review kısmı ile sonuçlar gözden geçirilerek ve tanımlama sonuçları onaylandı.



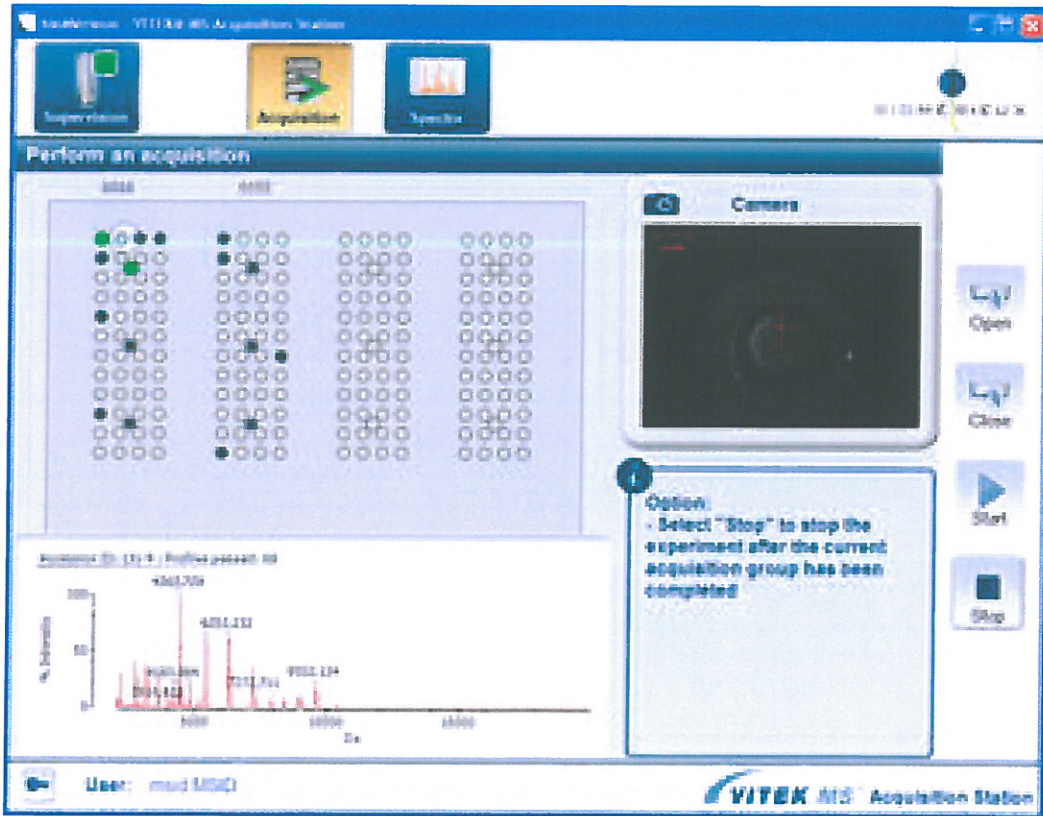
Şekil 3.2. VITEK®MS (bioMérieux) cihazı genel görünüşü



Şekil 3.4. VITEK®MS(bioMérieux) cihazı kaset okutma işlemi



Şekil 3.3. VITEK@MS (bioMérieux) veri analiz yazılımı ekran görüntüsü



Şekil 3.6. VITEK@MS (bioMérieux) analiz ekran görüntüsü

4. BULGULAR

4.1. Kültür-Bazlı Bulgular

VRBGA besiyerine ekimi yapılan 115 adet gıda örneğinin 18'inde (%16) üreme görüldü. 3 adet (%15) yerli hazır bebek maması, 6 adet (%30) irmik, 1 adet (%5) nişasta, 8 adet (%40) pirinç unu örneğinde koloni gelişimi olduğu saptanmıştır. Ancak, ithal bebek maması ve süt tozu örneklerinde üreme görülmemiştir. Sonuçlar Çizelge 4.1.'de verilmiştir.

4.2. Oksidaz Testi Bulguları

VRBGA besi yerinde üreme görülen tipik kolonilere Merck Bactident® Oxidase (Merck, Almanya) kiti talimatı takip edilerek yapılan test sonucuna göre VRBGA besi yerinde üreme görülen 18 izolatın tümü oksidaz negatif sonuç vermiştir. Oksidaz negatif testi sonucu negatif olan izolatlar kesin enterik bakteri olup olmadıklarının doğrulaması için BCP Glikoz besiyerinde incelemeye alınmıştır. İnceleme sonucu oksidaz negatif sonuç veren tüm izolatların kesin enterik bakteri oldukları teyit edilmiştir.

4.3. Vitek® MS (bioMérieux) ile Tiplendirme Bulguları

Gram negatif Enterik bakteriler bir sonraki aşama için VITEK®MS (bioMérieux) cihazı ile tiplendirmeye alındı. İnceleme sonucu yerli hazır toz bebek mamalarından izole edilen 3 koloni *P. agglomerans*, açık pirinç unu örneklerinden izole edilen 2 koloni *P. agglomerans*, kapalı pirinç unu örneklerinden izole edilen 6 adet izolatın 1'i *C. sakazakii*, 1'i *P. agglomerans*, 1'i *E. aerogenes* ve 3'ü *Cloacae/asburiae*; kapalı nişasta örneğinden izole edilen 1 koloni *C. sakazakii/maloniticus* ile açık irmik örneğinden izole edilen 1 adet koloni *C. sakazakii*, kapalı irmik örneğinden izole edilen 5 adet izolatın 2'si *K. oxytoca*, 2'si *L. adecarboxylata* ve 1'i *P. agglomerans* olarak tanımlandı. Sonuçlar Çizelge 4.2' gösterilmiştir. VITEK®MS (bioMérieux) ile tanımlanan *Enterobacteriaceae* familyasına türlerinden en fazla *P. agglomerans* (n=7) karşılaşılmıştır.

4.4. ESBL Tarama Bulguları

İdentifikasyonu yapılan toplam 18 adet Gram negatif enterik bakteri izolatı ESBL varlığı bakımından tarama testine alındı. CLSI (2013) talimatına göre sefotaksim

(CTX), seftazidim (CAZ) ve sefpodoksim (CPD) içeren diskler (MAST Group, Almanya) kullanılarak tarandı. Sonuçlar CLSI (2013) talimatına göre yorumlandı.

ESBI tarama testi sonucunda; hazır toz bebek mamasından izole edilen 2 *Pantoea agglomerans* kolonisi, kapalı paket pirinç unundan izole edilen *Enterobacter cloacae/asburiae* ve *Enterobacter aerogenes* ve kapalı paket irmik örneğinden izole edilen *Pantoea agglomerans* izolatları en az bir disk CLSI kriterlerine göre belirlenen zon çapı altında kaldığından ESBL şüpheli olarak bulunmuştur.

4.5. Antibiyogram Doğrulama ve MİK Tayini Bulguları

CLSI talimatına göre ESBL şüpheli olarak kabul edilen izolatlar disk difüzyon doğrulama testine alınmıştır.

Disk difüzyon konfirmasyonu test sonucuna göre disk difüzyon taraması sonuçları konfirme edildi. Sonuçlar Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir.

Elde edilen izolatlardan yerli bebek mamalarında bulunan *P.agglomerans*, pirinç ununda bulunan *E. cloacae/ asburiae*, *E. aerogenes* ve irmikten izole edilen *P. agglomerans* türlerinin ESBL dirençli oldukları fenotipik olarak doğrulanmıştır. Doğrulanan pozitif koloni sayıları Çizelge 4.4. te gösterilmiştir.

Yeni doğanlarda ciddi komplikasyonlara yol açabilecek olan *Cronobacter sakazakii* nişasta, pirinç unu ve irmik örneklerinden izole edilmiş fakat ESBL direnci tespit edilmemiştir.

CLSI (2013) talimatına göre ESBL şüpheli kolonilerin Micronaut-S beta-lactamase VII kiti (Merlin, Almanya) talimatı uygulanarak mikrodilüsyon yöntemiyle disk difüzyon konfirmasyonu ve MİK değeri tespiti spektrometre kullanılarak konfirme edildi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.5.'te gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Kültür Bazlı-Çalışma Sonuçları

Gıda cinsi	Örnek sayısı (n)	<i>Enterobacteriaceae</i> varlığı olan Örnek Sayısı (n)
Yerli hazır bebek maması	20	3 (%15)
İrmik	20	6 (%30)
Nişasta	20	1 (%5)
Pirinç unu	20	8 (%40)
İthal hazır bebek maması	20	0
Süt Tozu	15	0

Çizelge 4.2. VITEK®MS (bioMérieux) ile tiplendirme sonuçları

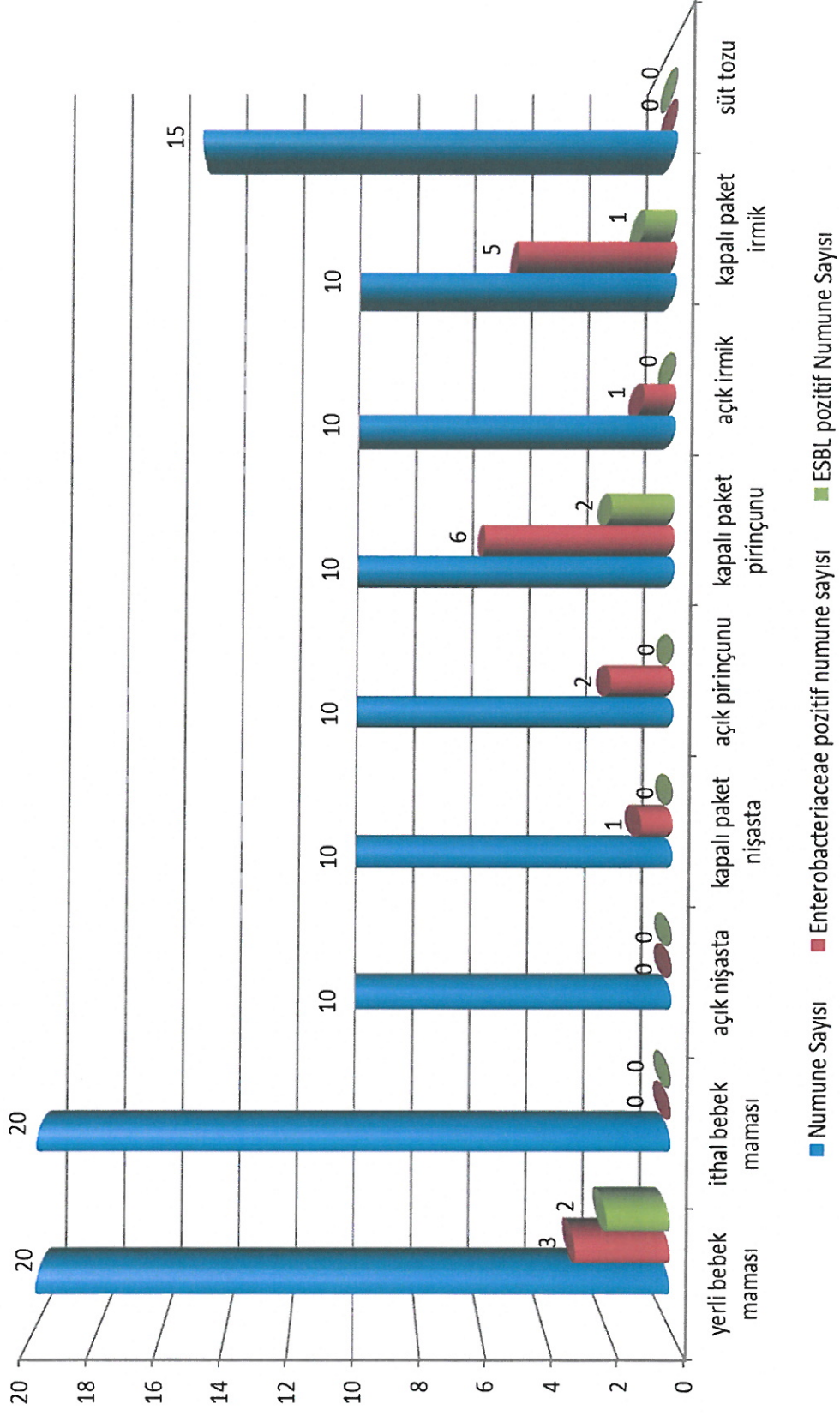
Gıda Cinsi	VRBGA'da Üreme Görülen Örnek Sayısı (n)	Bakteri tipi
Yerli hazır bebek maması	3	<i>P. agglomerans</i>
Nişasta	1	<i>C. sakazakii/maloniticus</i>
Pirinç unu	2	<i>P. agglomerans</i>
	1	<i>C. sakazakii</i>
	1	<i>P. agglomerans</i>
	1	<i>E. aerogenes</i>
	3	<i>E. cloacae/asburiae,</i>
İrmik	1	<i>C. sakazakii</i>
	2	<i>K. oxytoca</i>
	2	<i>L. adecarboxylata</i>
	1	<i>P. agglomerans</i>

Çizelge 4.3. Disk Difüzyon ve Doğrulama Sonuçları (mm)

Bakteri Tipi	Numune Cinsi	CAZ	CAZ CV	Δ	CTX	CTX CV	Δ	CPD	CPD CV	Δ
<i>P. agglomerans</i>	Yerli Hazır Toz Bebek Maması-1	23	32	9	35	35	0	30	30	0
<i>P. agglomerans</i>	Yerli Hazır Toz Bebek Maması-2	27	32	5	22	27	5	22	28	6
<i>E. cloacae/asburiae</i>	Kapalı Paket Piring Unu-1	26	32	6	30	36	0	13	19	6
<i>E. aerogenes</i>	Kapalı Paket Piring Unu-2	24	30	6	30	36	6	21	26	5
<i>P. agglomerans</i>	Kapalı Paket İrmik- 1	30	-	8	28	33	18	22	23	1

CAZ: Sefotaksim, CAZ CV: Sefotaksim Klavulanatlı, CTX: Sefotaksim, CTX CV: Sefotaksim Klavulanatlı, CPD: Sefpodoksim, CPD CV: Sefpodoksim Klavulanatlı; Δ: Klavulanatlı ve klavulanatsız türdeş disk zonu ölçüm farkı.

Çizelge 4.4. Fenotipik olarak doğrulanan ESBL Pozitif Numune Sonuçları



Çizelge 4.5. Antibiyogram Doğrulama ve MİK değerleri Tespiti Sonuçları

TİPİ	CTX	MİK	CTB	MİK	C/C	MİK	GAZ	MİK	CZC	MİK	MER	MİK	MEB	MİK	MEE	MİK	COX	MİK	ERT	MİK	CEP	MİK	CMC	MİK
P. aggl mera ns	R	128		32		0,25/ 4	R	28		6	S	1		0,25		0,25	S	4	S	0,5	R	128	R	0,25/ 4
P. aggl mera ns	R	128		32		0,25/ 4	R	6		6	S	1		,5		0,25			S	0,50	R	64		0,5/4
E. cloac ae/as buria e	R	128		32		0,25/ 4	R	128		32	S	1		0,25		0,25	S	4	S	0,5		2		0,25/ 4
E. aerog enes							R	16			S	0,5						S	S	0,5		1		
P. aggl mera ns	R	128		32		0,25/ 4	R	6			S	1		0,25		0,25	S	4	S	0,5		4	R	0,25/ 4

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Enfeksiyon tedavisinde çığır açan antibiyotiklere karşı direnç olgusu antibiyotiklerin kullanımının başlamasından hemen sonraları ilk kez 1940'lı yıllarda fark edilmiştir (Gradman, 2011). Antimikrobiyal direnç günümüzde halk sağlığı açısından ‘‘Biyolojik Tehlike’’ olarak kabul edilmektedir. Bilinçsiz antibiyotik kullanımının gut mikroflorada yarattığı seleksiyon baskısı, dirençli suşların kalıcı olması ve bakteriler arasında dirençlilik gelişiminin aktarılması gibi etmenler konuyu yeni boyutlara taşımaktadır (EFSA,2008).

Özellikle *Enterobacteriaceae* familyasına ait türlerin insanlarda antibiyotik dirençliliğinin yayılmasında aktif rol oynadığı görülmektedir. Gıda mevzuatları bu tür bakterilerin gıdalarda varlıklarını bir hijyen indikatörü olarak kabul etmesine rağmen; antibiyotiklere dirençlilik henüz gıda güvenliği kriteri olarak yer almamaktadır.

Bu olgunun karmaşıklaşarak ve artarak süreceğinin anlaşılmasıyla birlikte, takibi ve nlenmesine dönük mültidisipliner işbirliği çabalarında dikkat çekici artış görülmektedir. Dirençli bakteriler ve direnç genlerinin yayılmalarında gıdaların oynadıkları roller henüz net şekilde ortaya konulamamıştır.

Bu suşlar için en önemli direnç mekanizması beta-laktamaz enzimi üretebilme kabiliyetine sahip olmalarıdır. Bu enzimler geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hle getirmektedir. İnaktivasyon sonucunda enfeksiyon tedavisi çoğu zaman başarısız olabilmektedir (Bradfort, 2001; Tang ve ark., 2014).

Antimikrobiyal direnç halk sağlığını direkt ilgilendirmekte ve sonuçları önemsenen bir olgu olarak dikkat çekici şekilde yükselmektedir. Bu sorun gıda güvenliğini yakından ilgilendirmektedir. Dirençli bakterilerin gıdalar yoluyla direkt olarak insana bulaşma riski taşımaktadır. Bu sebeple konuya geniş perspektiften bakılmasını ve mültidisipliner işbirliğini gerektirmektedir (WHO,2015).

Üriner sistem enfeksiyon etmeni *Enterobacteriaceae* suşları Dünya' da her yıl 130-175 milyon kişinin hastalanmasına neden olmakta ve yüksek tedavi maliyetleri getirmektedir. Bu patojen suşların beta laktam antibiyotiklere karşı beta-laktamaz enzimleri üretebilme kabiliyeti kazanmaları en önemli direnç mekanizması olarak bilinmektedir (Nordstorm ve ark., 2013).

Bebek mamaları; anne sütünün olmadığı ya da annenin çeşitli nedenlerle süt veremediği durumlarda, bebeğin tüm besin ihtiyaçlarını karşılamak üzere formüle edilmiş ürünlerdir. Ayrıca bebekler anne sütü ile beslense bile 6. aydan sonra tek başına anne sütü yeterli olmamaktadır ve ek besinler ile beslenme programına devam edilmesi gerekmektedir (Köksal ve Özel, 2008).

Türkiye Sağlık ve Nüfus Araştırması (TSNA) 2013 verilerine göre bebeklerde sadece anne sütü alımı doğumdan sonra ortalama 1,2 aydır. Ek olarak 2008 ile 2013 yılları arasındaki veriler değerlendirildiğinde yaşamın ilk 6 ayı sadece anne sütü alımı azalırken ek gıdalara geçişin arttığı görülmüştür (TSNA, 2013).

Son zamanlarda hazır toz bebek mamalarının mikrobiyolojik güvenliğine dikkat çekilmektedir. Kontamine olan toz bebek formülleri sebebiyle oluşan *C. sakazakii* ve *K. pneumonia*'yı içeren *Enterobacteriaceae* ailesi kaynaklı yenidoğan enfeksiyonlarının artması bu konudaki güvenlik önlemlerinin artmasını sağlamaktadır (Zhou ve ark., 2011). Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi uluslararası kuruluşlar bu sorunun üzerinde önemle durmaktadırlar.

Kontamine toz bebek mamaları ve onun hazırlanmasında kullanılan ekipmanlar *C. sakazakii*'nin başlıca kaynağı olarak bilinir. Dolayısıyla sulandırılmış toz bebek mamalarında *C. sakazakii* kontaminasyonu, kontamine olan süspansiyonun pastörizasyon sonrası kullanımı, mamanın sulandırılması ve hazırlama işlemlerinin diğer aşamaları sırasında oluşan harici bulaşmalardan kaynaklanmaktadır (Güner ve Telli, 2011).

Cronobacter spp. nedeni ile oluşan enfeksiyonların insidansı az olmakla birlikte bu patojenle enfekte olan yeni doğanlarda %40'dan fazla mortalite oranı olduğu ve hayatta kalanların ise şiddetli nörolojik komplikasyonlara maruz kaldığı bilinmektedir. Toz bebek formüllerinin kontaminasyonu ile oluşan *Cronobacter* spp. salgınları Amerika ve Avrupa'da rapor edilmiştir (Li, 2014).

Avrupa ve Amerika'da bebek mamaları için oluşturulan mikrobiyolojik kriterlere bakıldığında, bebek mamalarında bulunan *Enterobacteriaceae* üyelerinin ve özellikle *Cronobacter* spp. nin bebeklerin sağlığı açısından öneminin giderek arttığını göstermektedir (Buchanan ve Oni, 2012).

Bu çalışmada temel olarak *Enterobacteriaceae* ve *Cronobacter* spp. varlığı ISO 21528-2 standartları takip edilerek araştırılmış ve elde edilen izolatlar VITEK®MS (bioMérieux) ile tiplendirilmiştir.

Ergün ve ark (1999) Türkiye'de yaptıkları bir çalışmada yerli mamaların genel mikrobiyolojik kıstaslarının ithal mamalara göre daha düşük olduğunu belirtmişlerdir.

Bizim çalışmamızda da ithal mamalarda herhangi bir mikrobiyolojik üreme olmaması ancak, yerli mamalarda *Enterobacteriaceae* üyelerinin bulunması Ergün ve ark. (1999)' nın sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Ankara'nın farklı marketlerinden toplanarak yapılan çalışmada, pirinç unu, çavdar unu, yulaf unu, irmik, çiğ süt, kıyma, rezene, anason, maydanoz, papatya, ıspanak brokoli gibi gıda bileşenlerinde *Cronobacter* spp. araştırılması yapılmış ve toplanan 12 çeşit gıda örneğinin 4 çeşidinde (pirinç unu, çavdar unu, yulaf unu, rezene) *Cronobacter* spp. izole edilmiştir (Çetinkaya ve ark., 2012).

Türkiye'nin çeşitli illerinden toplanmış bebek maması yapımında kullanılan tahıl bazlı gıdaların değerlendirildiği bu çalışmamızda pirinç unu örneklerinde *Cronobacter sakazakii* bulunmuş olması Çetinkaya ve ark.'nın (2012) çalışması ile uyumluluk gösterirken, irmik örneklerinde de *Cronobacter* spp. ye rastlanması bu konuda daha detaylı araştırmaların yapılması gerektiğini düşündürmektedir.

Gurtler ve ark. (2005) yaptığı çalışmada *Cronobacter sakazakii* 'yi pirinç nişastası, pirinç unu ve yumurtadan izole etmişlerdir. Bu çalışmada da pirinç unundan *Cronobacter sakazakii*'nin izole edilmiş olması Gurtler ve ark. çalışması ile benzerlik göstermektedir.

Mardaneh ve Dallal (2013)'in yaptığı çalışmada incelenen 125 bebek maması örneğinden 8'inde *Pantoea agglomerans* pozitif olarak bulunmuştur. Çalışmamızdan elde edilen sonuçlarda ise özellikle yerli bebek mamalarından *Pantoea agglomerans*'in izole edilmiş olması bebek mamalarının bu patojen bakteri açısından da değerlendirmesi gerektiğini düşündürmektedir.

Ayrıca Madaneh ve Dallal (2013)'nin yaptıkları çalışmada bebek mamalarından izole edildin *P.agglomerans*'in antimikrobiyal duyarlılıklarının incelenmiş olması ve CLSI kriterlerine göre elde edilen izolatların %50'sinin antibiyotik dirençli olarak bulunması, bizim çalışmamızda elde ettiğimiz *P.agglomerans* izolatlarının da CLSI kriterlerine göre ESBL dirençli olması ile uyumluluk göstermektedir.

Li ve ark.'nın 2014 yılında yaptıkları çalışmada *Cronobacter prevelansını* en fazla tahıl ve tahıl bazlı gıdalarda bulurken, toz bebek formüllerinde *Cronobacter* izolatına rastlamamıştır. Bizim çalışmamız da özellikle bebek mamalarında *Cronobacter* spp bulunmazken nişasta, pirinç unu ve irmik (tahıl bazlı gıdalar) örneklerinde tanımlanmış olması Li ve ark.'nın çalışması ile paralellik göstermektedir.

ESBL üreten *Enterobacteriaceae*'nin prevalansı son on yılda giderek artmaktadır ve bunların sebep olduğu hastalıkların giderek artması, enfeksiyonların tedavisini de güçleştirmektedir. ESBL 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 ve ark., 2014).

ESBL üreten bakterilere bağlı olarak oluşan enfeksiyonların prevalansının artması özellikle toplumda oral olarak uygulanan antimikrobiyal tedavinin etki göstermemesine neden olmaktadır (Kassakian ve Mermal, 2014).

Bu çalışmada yerli hazır toz bebek mamalarında *Pantoea agglomerans*, pirinç unu örneklerinde *Pantoea agglomerans*, *Cronobacter sakazakii*, *Enterobacter aerogenes* ve *Enterobacter cloacae/asburiae*, nişasta örneklerinde *Cronobacter sakazakii/maloniticus*, irmik örneklerinde *C. sakazakii*, *Klebsiella oxytoca*, *Leclercia adecarboxylata*, *Pantoea agglomerans* türleri tanımlanmıştır. Tanımlanan türlerden hazır toz bebek mamasından izole edilen *Pantoea agglomerans* kolonileri, kapalı paket pirinç unundan izole edilen *Enterobacter cloacae/asburiae* ile *Enterobacter aerogenes* ve kapalı paket irmik örneğinden izole edilen *Pantoea agglomerans* kolonilerinde ESBL direnci fenotipik olarak doğrulanmıştır.

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı *in-vitro* etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir. Antibiyotik Duyarlılıklarına Göre Tipleme yöntemleri arasında disk difüzyon, broth mikrodilüsyon, agar dilüsyon ve E test (MIK tespiti) bulunmaktadır.

Fenotipik yöntemlerden biyotipleme suş tanımlama ve tiplendirmede en eski metottur. Suşların morfolojik, biyokimyasal özellikleri ve çevresel etkenlere karşı duyarlılıklarına dayalı bir tiplendirme yöntemidir. API, Vitek MS Maldi tof ve BD Phoenix örnek verilebilir. Ayrım gücü test sayısına bağlı olup; test, metabolik aktivite ve büyüme şartlarından etkilenmekte ve biyolojik özellikleri değiştiren random mutasyonlar ve gen ekspresyonundaki varyasyonlardan dolayı ayrım gücü zayıf kalmaktadır.

Bu yöntemler ile standardizasyon ve tekrarlanabilirlik yüksek, uygulama ve yorumlama kolay, düşük maliyetli, direnç, plasmid, transpozon gibi genetik mobil elementlerle geçiş yapılabilir. Ancak, aynı klondan gelen epidemiyolojik ilişkili türler aynı duyarlılık paterni gösterebilmekte ve ayrım gücü zayıftır. Antibiyotik duyarlılık testlerinde "difüzyon" ve "dilüsyon" olmak üzere başlıca iki metod kullanılır. Difüzyon testleri içinde tarama amaçlı disk difüzyon testi tercih edilmektedir. Elde edilen bulgular broth (sıvı) mikrodilüsyon testi ile doğrulanmaktadır. Hangi metod kullanılırsa kullanılsın, kullanılan testin Clinical and Laboratory Standards Institute

(CLSI), British Society for Antimicrobial Chemotherapy (BSAC), Deutsches Institut für Normung (DIN) ve Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CA-SFM)'da belirtilen uluslararası kabul görmüş bir prosedüre göre yapılmış olması gerekmektedir.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), ESBL üreten *Enterobacteriaceae* familyası içinde *E. coli*, *Proteus mirabilis* ve *Klebsiella* spp ve plazmid aracılı AmpC beta-laktamazlar dışında bu familyaya ait diğer türlerin tespitiyle ilgili tavsiyelerde maalesef bulunmamaktadır. Bu sebeple, diğer türlerin tespitini de içine alacak şekilde geliştirilecek diyagnostik yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. ESBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının otoanalizör cihazlar ile tespiti fenotipik yöntemlerin doğrulanması olarak tercih edilmektedir.

ESBL üreten *Enterobacteriaceae*'nin gıdalar yoluyla bebeklere geçmesi hakkında daha önce araştırma yapılmamıştır. Bu nedenle bu çalışma bebek mamaları için hazırlanan mikrobiyolojik kriterlerde ESBL direnci olan bakterilerin de değerlendirilmesi gerektiği konusuna ışık tutacaktır.

Bununla birlikte bebek maması yapımında sıklıkla kullanılan nişasta, pirinç unu, irmik gibi tahıl bazlı gıdalarda da *Cronobacter sakazakii* tanımlanmış olması bu mikroorganizmaların bebeklere geçmesine ve bebeklerin ciddi enfeksiyonlara yakalanmalarına neden olabilmektedir. Tanımlanan *Enterobacteriaceae* familyasına ait türlerin fenotipik değerlendirmesi sonucunda ESBL üreten türleri de içeriyor olması, bu mikroorganizmalar nedeniyle hastalığa yakalanan bebeklerin antimikrobiyal tedaviye geç yanıt vermelerine ya da verememeleri nedeni ile ölümlerine neden olabilir.

ESBL üreten mikroorganizmaların gıdalar yoluyla bebeklere bulaşma hakkında kapsamlı epidemiyolojik araştırmalar maalesef Türkiye'de yapılmamaktadır. Bebek mamaları ya da bebek maması yapımında kullanılan tahıl bazlı gıdalar (nişasta, pirinç unu, irmik) ile ilgili yapılan çalışmalarda; sadece mikrobiyal kontaminasyon değerlendirilmiş olup elde edilen izolatların antimikrobiyal dirençliliklerine bakılmamıştır. Bu nedenle de gıdalarla ilgili tebliğlerde mikrobiyolojik kriterler belirlenirken mikroorganizmaların bulunabileceği miktarlar bildirilmiş, ancak bu mikroorganizmaların dirençliliklerine bir gıda güvenliği parametresi olarak değinilmemiştir. Bebek mamalarına kontamine olmuş mikroorganizmaların ESBL dirençliliklerinin tebliğlerde yer almaması, bir güvenlik parametresi olarak değerlendirilmemesi, özellikle bebek maması ve ek gıda kullanımının yaygınlaştığı bu dönemde bebek sağlığını riske atmaktadır.

Bebek mamalarının mikrobiyolojik kontrollerinde var olan patojenlerin miktarlarının değerlendirilmesine ek olarak ESBL dirençliliklerinin de araştırılması önerilmelidir.

Tahıl-bazlı gıdaların ESBL üreten *Enterobacteriaceae* içermesi ve bebeklerin bu gıdaları tüketmeleri durumunda sağlıkları açısından antibiyotik tedavisinin başarısı olumsuz etkileyebileceğini göstermiştir. Bu nedenle antibiyotik dirençleriyle ilgili çalışmaların genotipik yöntemler de kullanılarak direnç genlerinin karakterizasyonunu kapsayacak şekilde geliştirilmesi gerekmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışmada fenotipik sonuçlar bebek mamaları ve tahıl-bazlı bebek bebek mamalarında ESBL üreten enterik bakteriler ve *Cronobacter sakazakii* varlıkları tespit edilmiştir. Bu izolatların direnç kodlayan beta-laktamaz genleri tanımlayacak şekilde incelenmesi insan sağlığı ve gıda güvenliği konuları bakımından son derece önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Akova, M.** (2004): Dikkat: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Var! *ANKEM Derg.* 18, 98-103.
- Aigbekaen, B.O. ve Oshoma C.E.** (2010): Isolation of *Enterobacter sakazakii* from Powdered Foods Locally Consumed in Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 9,(7): 659-663.
- Anonim.** (2004): *Enterobacter sakazakii* and other microorganism in powdered infant formula: Meeting Report. World Health Organization and Food and Agriculture Organization Microbiological Risk Assessment Series 6.
- Anonim.** (2012): ESBLs – A threat to human and animal health? Report by the Joint Working Group of DARC and ARHAI.
- Arsalan A., Naqvi S.B.S., Ali S.I. ve Anwar Z.** (2013): Contamination of Microorganism in pediatric infant formula marketed in Karachi. *Annals Food Science and Technology*, 14(2):318-326.
- Ayaz C., Topçu A.V., Söyletir, G. ve Doğanay, M.**(2008): Beta laktamların genel özellikleri ve penisilinler. 3. Baskı Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi sistemlere göre enfeksiyonlar ed: İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi p. 266-78
- Bradford, P. A.** (2001): Extended-Spectrum β -Lactamases in 21 st Century Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance. *Threat Clinical Microbiology Reviews*, 14 (4):933–951.
- Bolat, F., Uslu, S., Bolat G., Bülbül A., Arslan, S., Çelik, M., Cömert, S. ve Nuhoğlu, A.** (2011): İlk Altı Ayda Anne Sütü ile Beslenmeye Etki Eden Faktörler *Çocuk Dergisi* 11(1): 5-13.
- Buchanan R. L. ve Oni, R.** (2012): Use of Microbiological Indicators for Assessing Hygiene Controls for the Manufacture of Powdered Infant Formula. *Journal of Food Protection*, 75(5):989-997.
- CLSI.** Clinical and Laboratory Standards Institute (2013). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement, CLSI Document M100-S23, CLSI, Wayne PA.

- Çetinkaya, E., Josept,S., Ayhan, K. ve Forsythe, J.** (2012): Comparison methods for the microbiological identification and profiling of *Cronobacter* species from ingredients used in preparation of infant formula. *Molecular and Celular Probes*, 27(1):60-4.
- Çetinkaya, E. ve Ayhan K.** (2012): Mikrobiyolojide Kullanılan Bazı Moleküler Teknikler. *Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi*, 2(1): 53-62.
- Dağlar, D., Eres Sarıtaş, Z., Özhak Baysan B., Öngüt, G., Ögünç, D. ve Çolak, D.** (2012): Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarının Tanımlanmasında ChromID ESBL Agar Besiyerinin Değerlendirilmesi. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi*, 42(1):39-42.
- Drudy, D., Mullane, N. R., Quinn, T., Wall, P. G. ve Fanning, S.** (2006): *Enterobacter sakazakii*: An Emerging Pathogen in powdered Infant Formula. *Clinical Infection Disease*, 42(7):996-1002
- Ergün, F. ve Ergün, Ö.** (1999): Ülkemizde tüketime sunulan yerli ve ithal bebek mamalarının genel mikrobiyolojik kriterleri ve abzi patojenlerin varlığı yönünden incelenmesi. *İstanbul Üniv. Vet. Fak. Derg.* 25, 57-64
- EC.** (2007): Commission Regulation (EC) No 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* L 322:12–29.
- EFSA.** (2007): *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in food stuffs. *EFSA J.* 175:1–18.
- EFSA.** (2008): Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal*, 765, 1-87
- FAO ve WHO.** Workshop on *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula, Geneva 2-5 February 2004.
- Forsythe, S. J.** (2005): *Enterobacter sakazakii* and other bacteria in powdered infant milk formula. *Maternal and Child Nutrition*,1(1):44-50.
- Gökçay, G., Eren, T. ve Devecioğlu, E.** (2012): Bebek Mamalarındaki Katkı Maddeleri. *Çocuk Dergisi*,12(2):60-65
- Gradman, C.** (2011) "Magic bullets and movingtargets: antibiotic resistance and experimental chemotherapy 1900-1940." *Dynamis*, 31(2):305-321
- Gurtler, J.B., Kornacki, J.L. ve Beuchat, L.R.,** (2005): *Enterobacter sakazakii*: a coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology*, 104(1):1-34
- Gülcan,S.** (2011): Çocuk kitleye yönelik gıda pazarlaması uygulamalarının değerlendirilmesi. *Dünya Gıda Dergisi*, Erişim 14.02.2014.
- <http://www.dunyaqida.com.tr/haber.php?nid=3057>

- Güner, A. ve Telli, G.** (2011): *Cronobacter sakazakii*'nin Gıda Mikrobiyolojisindeki Önemi. *Atatürk Üniversitesi veteriner Bilimleri Dergisi*,6(3): 251-263.
- Henshke Bar Meir R., Yinnon A.M., Rudensky B., Attias D., Schlesinger Y. ve Raveh D.,** (2006): Assessment of the clinical significance of production of extended spectrum beta lactamases (ESBL) by *Enterobacteriaceae*. *Infection*, 34, 66-74.
- ISO 21528-2: 2004:** Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*. International Organization for Standardization
- ISO 6887-1:1999:** Microbiology of food and animal feeding stuffs-Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination-Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions. International Organization for Standardization
- Iversen C. ve Forsythe S.** (2004): Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology*,21, 771–777.
- İnci, F. H. ve Serçekuş, P.** (2015): Anne sütü ve emzirme ile ilgili web-tabanlı eğitim materyallerinin değerlendirilmesi. *Pamukkale Tıp Dergisi* , 8(1): 45-50.
- Jakaitis, B.M. ve Denning P.W.** (2014): Human Breast Milk and the Gastrointestinal Innate Immune System. *Clinical Perinatology*, 41,423–435
- Kassakian, S.Z., Mermal, L.A.** (2014): Changing epidemiology of infections due to extended spectrum beta-lactamase producing bacteria. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 3(9):1-6.
- Kim, S.A., Oh S.W., Lee Y.M., Imm J.Y., Hwang I.G., Kang D.H. ve Rhee M.S.** (2011): Microbial contamination of food products consumed by infant and babies in Korea. *Letters in Applied Microbiology*, 53, 532-538.
- Koluman, A.** (2011): Çeşitli gıdalardan *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) izolasyon ve identifikasyonu. *Electronic Journal of Food Technologies*, 6(2):16-19.
- Köksal, G. ve Özel, H.** (2008): Bebek Beslenmesi. Ankara. Klasmat Yayınevi.1.Baskı
- Köksal, G. ve Gökmen, H.** (2000): Çocuk Hastalıklarında Beslenme Tedavisi. Hatiboğlu Yayınevi.1. Baskı
- Li, Y., Chen Q., Zhao, J., Jiang, H., Lu, F. ve Lu, Z.** (2014): Isolation, identification and antimicrobial resistance of *Cronobacter* spp. isolated from various foods in China. *Food Control*, 37, 109-114

- Lu, Y., Chen, Y. et al.** (2014): Comparison of methods for the microbiological identification and typing of *Cronobacter* species in infant formula” *American Dairy Science Association*, 97, 632-641
- Mardaneh, J. ve Dallal, M. M.**(2013): Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Pantoea (Enterobacter) agglomerans* isolated from consumed powdered infant formula milk (PIF) in NICU ward: First report from Iran” *Iran Journal of Microbiology*, 5(3):263-267.
- Muytjens HL, Roelofs-Willems H. ve Jaspar GH.** (1988): Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*, 26, 743-746.
- Nazarowec-White M. ve Farber JM.** (1997): Incidence, survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *Journal of Food Protection*, 60, 226-230.
- Nordstrom, N., Liu, C.M. ve Price, L.B.** (2013): Foodborne urinary tract infections: a new paradigm for antimicrobial-resistance foodborne illness. *Frontiers in Microbiology*, 4, 1-6.
- Oliphant, C. M. ve Eroschenko, K.** (2015): Antibiotic Resistance, Part 2: Gram-negative Pathogens. *The Journal for Nurse Practitioners*, 11(1):79-86.
- Öcal, D.** (2012): Gram Negatif Bakterilerde Antibakteriyal Direncin Fenotipik Yöntemler İle Tayin ve Bildirimi. *ANKEM Dergisi*, 26(3):154-164
- Öncü, Ü., Nalbantoğlu, B., Güzel, E., Nalbantoğlu, A., Demirsoy, U. ve Çakan, M.** (2011): Bir-Beş Yaş Arası Çocukların Persantillerine Ailenin Sosyoekonomik Düzeyinin ve Annenin Beslenme Konusundaki Bilgisinin Etkisi. *Çocuk Dergisi*, 11(2):64-72.
- Özen, Karataylı, S.C. ve Bozdayı, A.M.** (2008): Proteomiks ve Gastroenteroloji. *Güncel Gastroenteroloji*, 12(2):72-76
- Pablo-Huertas, J., Álvarez-Ordóñez, A., Morrissey, R., Ros-Chumillas, M., Esteban, M., Mate, J., Palop, A. ve Hill, C..** (2015): Heat resistance of *Cronobacter sakazakii* DPC 6529 and its behavior in reconstituted powdered infant formula. *Food Research International*, 69, 401–409
- Rifaat E.A., Tekiner İ.H. ve Özpınar, H.** (2014): Halk Sağlığı Açısından İçme ve Kullanma Sularında Koliform ve Fekal Koliform Bakterilerin Varlıklarının Klasik ve MASS Spektrometresi Yöntemleriyle İncelenmesi. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi*, 9(2):20-32.
- Samur, G.** (2008): Anne Sütü. Hacettepe Üniversitesi-Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü. Ankara.

Saran, B., ve Karahan, Z.C. (2010): Antimikrobiyal Ajanlara Genel Bakış. *Turk Urol Sem.* 1,216-220

Shaker, R., Osaili, T., Al-Omaray, W., Jaradat, Z. ve Al-Zuby, M. (2007): Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacter* sp. From food and food production environment. *Food Control* 18, 1241-1245

Shabana, I.I., (2014): *Escherichia coli* Pathotypes Associated with Diarrhea in human and domestic animals. *American Journal of Animal and Veterinary Sciences*,9(3):153-161.

Stewardson A.J., Renzi, G., 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. ve Harbarth, S. (2014): Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Hospital Food: A Risk Assessment. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 35(4):375-83.

Su,Y., Yu C., Tsai Y., Wang,S., Lee,C. ve Chu,C. (2015): Fluoroquinolone resistant and extended spectrum β -Lactamase 2 (ESBL)-producing *Escherichia coli* from milks of Cow with clinic 3 mastitis in southern Taiwan. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*.1,1-15.

Tang, S.S., Apisarnthanarak, A. ve Hsu,L.Y. (2014): Mechanisms of β -lactam antimicrobial resistance and epidemiology of major community-and healthcare-associated multidrug-resistance bacteria. *Advanced Drug Delivery Reviews*.78,3-13

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

Tham, J., Walder, M., Melander, E. ve Odenholt, I. (2012):Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in food. *Infection and Drug Resistance* 5, 143-147.

TSNA, (2014): Türkiye Sağlık ve Nüfus Araştırması. Ulusal Toplantı TNSA-2013 Sonuçları.

TÜİK (2014): İstatistiki Bölge Birimleri Sınıflaması ve aya göre doğumlar. Erişim 22.01.2015.

<http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=16048>

TGK (2014): Türk Gıda Kodeksi Bebek Formülleri Tebliği. T.C. Resmi Gazete 15.08. 2014, Sayı 29089.

TGK (2011): Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği. T.C. Resmi Gazete 29.12.2011, Sayı: 28157.

WHO (2014): Dünya Sağlık Örgütü. Children: reducing mortality. Erişim 18.01.2015
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs178/en/>

WHO (2015): Dünya Sağlık Örgütü. Antimicrobial Resistance (AMR) from a food safety perspective. Erişim 22.04.2015

<http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/food-safety/areas-of-work/building-national-capacity-in-food-safety/antimicrobial-resistance-amr-from-a-food-safety-perspective>

Zhou, X., GAO, J., Huang, Y., Fu, S. ve Chen, H. (2011): Antibiotic resistance pattern of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter sakazakii* isolates from powdered infant formula. *African Journal of Microbiology Research*, 5(19): 3073-3077.

Zhu, S., Schnell, S. ve Fischer, M. (2013): Growth inhibition of *Cronobacter* spp. strains in reconstituted powdered infant formula acidified with organic acids supported by natural stomach acidity. *Food Microbiology*, 35(2):121-128.

Zijlmans, M. A.C., Korpela K., Riksen-Walraven J.M., de Vos W.M. ve de Weerth C. (2015): Maternal prenatal stress is associated with the infant intestinal microbiota. *Psychoneuroendocrinology*, 53,233-245.

ÖZGEÇMİŞ



Ad-Soyadı: Pinar CAVA GÜMÜŞ- Biyolog/ Medikal Eğitimci

Doğum Yeri ve Tarihi: İstanbul-10.06.1985

Cep Telefonu :90 (537) 730 72 62

E-Posta :pinar.cava@hotmail.com

Eğitim Bilgileri

Lisans: Trakya Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji,2007

Yüksek Lisans: İstanbul Kültür Üniversitesi, Sosyal Bilimler Enstitüsü, İşletme,2011

Yüksek Lisans: İstanbul Aydın Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Güvenliği,2015

Mesleki Deneyimler

Çalışma Durumu : Çalışıyor

03.2012-devam : **Solgar Vitamin ve Mineral Sağlık ürünleri**
Medikal Eğitim Uzmanı

06.2008 - 03.2012 : **Celtis İlaç Tanıtım ve Paz Tic A.Ş**
Medikal Uzman/Ürün Sorumlusu

07.2007 - 06.2008 : **İSKİ-Temiz Su Kalite Kontrol Laboratuvarı**
Mikrobiyoloji Analisti

Sertifika bilgileri : 1. Etkili Satış ve İlişki Yönetimi Eğitimi

SOLGAR VİTAMİN-Ocak 2015

2. Ürün Müdürlüğü ve Yöneticiliği Eğitimi

Celtis İlaç - 22.05.2010

52 saatlik ürün müdürlüğü ve yöneticiliği eğitimi aldım.

Bireysel Çalışmalar ile eğitimimi tamamladım