

**AMASYA'DA TÜKETİME SUNULAN KIYMA ÖRNEKLERİNDEN  
İZOLE EDİLEN ENTEROBACTERİACEAE ÜYELERİNDE  
 $\beta$ -LAKTAMAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ**

**Tuğçe SAAT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ  
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**MAYIS 2017**

**AMASYA**

Tuğçe SAAT tarafından hazırlanan AMASYA'DA TÜKETİME SUNULAN KIYMA ÖRNEKLERİNDEN İZOLE EDİLEN ENTEROBACTERİACEAE ÜYELERİNDE  $\beta$ -LAKTAMAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ adlı bu tezin yüksek lisans tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Doç. Dr. Tuba YILDIRIM  
Tez Danışmanı, Biyoloji Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği/oy çokluğu ile Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Tuba YILDIRIM  
Biyoloji Anabilim Dalı, A. Ü

.....

Prof.Dr. İbrahim ÖZKOÇ  
Biyoloji Anabilim Dalı

.....

OMÜ

Yrd. Doç. Dr. Arif AYAR

Tıbbi Hizmetler ve Teknikler, A. Ü

.....

Tarih 26/05/2017

Bu tez Amasya Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

**Doç. Dr. Mehmet KARA**

**Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü**

.....

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yaptığımı bildiririm.

Tuğçe SAAT

AMASYA'DA TÜKETİME SUNULAN KIYMA ÖRNEKLERİNDEN  
İZOLE EDİLEN ENTEROBACTERIACEAE ÜYELERİNDE  
β-LAKTAMAZ AKTİVİTELERİNİN BELİRLENMESİ  
(Yüksek Lisans Tezi)

Tuğçe SAAT

AMASYA ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mayıs 2017

ÖZET

Antibiyotik dirençliliğinin hayvansal gıdalar aracılığıyla yayılabilme olasılığı yüksektir ve enfeksiyonların tedavisinde başarı oranını azaltmaktadır. β-laktam antibiyotiklerini hidrolize ederek inaktif hale getiren β-laktamaz enzim üretimi, başta Enterobacteriaceae üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün önemli direnç mekanizmalarından birisidir.

Çalışmamızda, Amasya ilinde tüketime sunulan kıyma örneklerinden elde edilen Enterobacteriaceae izolatlarında β-laktamaz enziminin ve GSBL tipleri olan *TEM*, *SHV* ve *CTX-M* gen bölgelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Kıyma örneklerinden 100 adet Enterobacteriaceae izole edilmiştir. β-laktamaz enziminin varlığı Seftazidim (CAZ), Seftriakson (CRO), Sefotaksim (CTX), Aztreonam (ATM) ve Klavulanik Asit/ Amoksisilin (AMC) antibiyotik diskleri kullanılarak çift disk sinerji yöntemiyle belirlenmiştir. Bu izolatların %68'inin GSBL (+) olduğu bulunmuştur.

Suşların antibiyotik direnç profilleri ise disk difüzyon yöntemiyle aztreonam, ampisilin, sefotaksim, seftriakson, kloromfenikol, gentamisin, imipenem, sulfametoksazol, streptomisin ve tetrasiklin antibiyotikleri kullanılarak tespit edilmiştir.

Disk difüzyon duyarlılık testi sonuçlarına göre ampisilin, aztreonam, kloromfenikol, sefotaksim, seftriakson, tetrasiklin, gentamisin, imipenem, streptomisin ve sulfametoksazol antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; %27,94, %2,95, %25,0, %14,70, %4,42, %1,50, %1,50 %10,29, %22,05, %17,70 olarak bulunmuştur.

$\beta$ -laktamaz pozitif olduğu belirlenen izolatlarda GSBL tipleri olan *TEM*, *SHV* ve *CTX-M* gen bölgeleri varlığı PZR yöntemi uygulanarak doğrulanmıştır. %35,29'unda *CTX-M* tipi , %23,52'sinde *SHV* tipi  $\beta$ -laktamaz varlığına rastlanılırken izolatların hiçbirinde *TEM* tipi  $\beta$ -laktamaz varlığına rastlanılmamıştır.

Sonuç olarak, antibiyotik kullanımının kontrol altına alınması ile GSBL pozitif izolat sıklığının ve GSBL tiplerinin yayılımının azalması beklenmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antibiyotik Direnci, Enterobacteriaceae, Kıyma, GSBL, *CTX-M*, *SHV*, *TEM*

**THE IDENTIFICATION OF  $\beta$ -LACTAMASE ACTIVITIES IN  
ENTEROBACTERIACEAE MEMBERS ISOLATED FROM GROUND  
MEAT PRESENTED FOR CONSUMPTION IN AMASYA**

**(M.Sc.Thesis)**

**Tuğçe SAAT**

**AMASYA UNIVERSITY**

**INSTITUTE OF SCIENCE**

**Mayıs 2017**

**ABSTRACT**

**It is high the probability of to be spreaded by animal foods of antibiotic resistance and is decreased the success ratio of treatment againts to infections. The production of  $\beta$ -lactamase enzyme which inactivates antibiotics by hydrolysis is one of the important resistance mechanisms in many bacterial species mainly Enterobacteriaceae members. Our study aimed to identify  $\beta$ -lactamase enzyme with *TEM*, *SHV* and *CTX-M* gene locations that are ESBL types in Enterobacteriaceae isolates obtained from ground meat presented for consumption in Amasya. We isolated 100 Enterobacteriaceae samples from ground meat. The presence of  $\beta$ -lactamase enzyme was determined by double-disk synergy test with Ceftazidime (CAZ), Ceftriaxone (CRO), Cefotaxime (CTX), Aztreonam (ATM) and Amoxicillin/clavulanic acid (AMC) antibiotic disks. We found that 68% of all samples were ESBL (+). The antibiotic resistance profiles of strains were also identified by disk diffusion method using aztreonam, ampicillin, cefotaxime, ceftriaxone, chloramphenicol, gentamicin, imipenem, sulfamethoxazole, streptomycin and tetracycline antibiotics.**

We found that according to disk diffusion test, the the antibiotics resistance rates of ampicillin, aztreonam, chloramphenicol, cefotaxime, ceftriaxone, tetracycline, gentamicin, imipenem, streptomycin and sulfamethoxazole were 27,94%, 2,95%, 25,0%, 14,70%, 4,42%, 1,50%, 1,50%, 10,29%, 22,05%, 17,70%, respectively.

The presence of the types of ESBL, *TEM*, *SHV* and *CTX-M* gene locations, in  $\beta$ -lactamase positive isolates were also confirmed by PCR. There was no presence of *TEM*-type beta-lactamase in any of the isolates when the presence of *CTX-M* type at 35,29% and *SHV* type beta-lactamase at 23,52% were observed.

As a result, it is expected that the frequency of ESBL positive isolate and the spread of ESBL type will be reduced by controlling antibiotic usage.

**KEYWORDS:** Antibiotic resistance, Enterobacteriaceae, Mince, ESBL, *CTX-M*, *SHV*, *TEM*

## TEŞEKKÜR

Tezimin planlanmasında ve gerçekleşmesinde fikirleri ve katkılarıyla büyük emeği geçen, bu süreç zarfında kendisinden çok şey öğrendiğim, lisans eğitimim boyunca bana destek olan disiplini, hoşgörü ve tecrübesinden yararlandığım tez danışmanım sayın Doç.Dr. Tuba YILDIRIM'a çok teşekkür ederim.

Deneysel çalışma aşamalarında kıymetli bilgileriyle bana yol gösteren Prof.Dr. Belgin SIRIKEN'e katkılarından dolayı en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında bilgisi ve tecrübesiyle destek olan ve değerli zamanını ayıran sayın Dr. Burak YAZGAN'a teşekkür ederim.

Labaratuvar çalışmalarında yardım ve desteğini esirgemeyen Arş.Gör. Ceren YAVUZ'a teşekkür ederim.

Teknik imkanlar sağlayan Merkezi Araştırma ve Uygulama Laboratuvarı uzman ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamın laboratuvar aşamasında beni destekleyen ve yardımlarını esirgemeyen sevgili arkadaşlarıma ve değerli meslektaşım M.Sc.İbrahim TÜRKEL'e teşekkürlerimi sunarım.

Bugünlere gelirken sahip olduğu her şeyi benim geleceğime adayan, tüm kararlarıma saygı ile yaklaşıp hiçbir zaman desteklerini esirgemeyen annem Sevim KURTUCU'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.



## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	ii
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR .....	vi
TABLolar DİZİNİ .....	x
RESİMLER DİZİNİ.....	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİ .....	4
2.1. Enterobacteriaceae Familyası.....	4
2.2. Enterobacteriaceae Sınıflandırılması.....	5
2.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.2.2. <i>Citrobacter</i> .....	7
2.2.3. <i>Enterobacter</i> .....	7
2.2.4. <i>Klebsiella</i> .....	8
2.3. Hayvansal Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Bakterilerdeki Antimikrobiyal Direnç.....	10
2.4. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması ve Temel Antibiyotik Grupları .....	14
2.4.1. Sefalosporinler .....	155
2.4.2. Aztreonam.....	166
2.4.3. Karbapenemler.....	177
2.4.4. Kinolonlar .....	188
2.4.5. Aminoglikozidler .....	188
2.5. Beta Laktam Antibiyotikler.....	199
2.5.1. Bakterilerde $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları.....	20
2.5.2. Beta laktam enzimleri .....	21

2.6. Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz Türleri.....	23
2.6.1. <i>CTX-M</i> .....	24
2.6.2. <i>SHV</i> .....	26
2.6.3. <i>TEM</i> .....	27
2.7. Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Bazı Moleküler Yöntemler .....	31
2.7.1. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	31
3. MATERYAL ve METOD.....	34
3.1. Materyal.....	34
3.1.1. Araç ve gereçler .....	34
3.1.2. Besiyeri ve kimyasallar.....	35
3.1.3. Çözeltiler.....	399
3.1.3.1. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler.....	399
3.1.3.2. Agaroz jel elektroforez için kullanılan çözeltiler.....	40
3.2. Metod.....	41
3.2.1. Örneklerin analize hazırlanması .....	41
3.2.2. Enterobacteriaceae identifikasyonu ve antibiyotik direnç belirlenmesi	
.....	42
3.2.2.1. İzolat teşhisi için kullanılan biyokimyasal testler .....	43
3.2.2.2. Antibiyotik dirençliliği için yapılan testler .....	44
3.2.3. İzolatların genotipik olarak tanımlanması .....	46
3.2.3.1. DNA izolasyonu.....	46
3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu.....	47
3.2.4.1. Direnç genlerinin araştırılması.....	47
3.2.4.2. PZR optimizasyon çalışmaları .....	47
3.2.4.2.1. <i>CTX-M</i> , <i>SHV</i> ve <i>TEM</i> grubu için $MgCl_2$ optimizasyonu .....	48
3.2.4.2.2. <i>CTX-M</i> , <i>SHV</i> ve <i>TEM</i> grubu için dNTP optimizasyonu .....	49

3.2.4.2.3. <i>CTX-M</i> tipi için ısı optimizasyonu .....	49
3.2.5. PZR karışımı hazırlanması.....	50
3.2.6. Amplifikasyon programları.....	51
3.2.6.1. <i>TEM</i> gen bölgesinin amplifikasyon programı.....	51
3.2.6.2. <i>SHV</i> gen bölgesinin amplifikasyon programı .....	51
3.2.6.3. <i>CTX-M</i> gen bölgesinin amplifikasyon programı.....	51
3.2.7. Agaroz jel elektroforez .....	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. Enterobacteriaceae İzolasyonu .....	53
4.2. Enterobacteriaceae Üyelerinin İdentifikasyonu için Yapılan Testler.....	53
4.3. Enterobacteriaceae Üyelerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Aktivitelerinin Belirlenmesi .....	55
4.3.1. Çift disk sinerji testi.....	55
4.3.2. Kirby-Bauer disk difüzyon testi.....	55
4.4. PZR Optimizasyon Çalışmaları (PZR).....	57
4.4.1. <i>CTX-M</i> , <i>SHV</i> ve <i>TEM</i> gen bölgeleri için MgCl <sub>2</sub> optimizasyonu.....	57
4.4.2. <i>CTX-M</i> , <i>SHV</i> ve <i>TEM</i> gen bölgeleri için dNTP optimizasyonu .....	58
4.4.3. <i>CTX-M</i> gen bölgesi için ısı optimizasyonu.....	58
4.5. PZR Yöntemiyle Dirençle İlişkili Genlerin Araştırılması.....	59
4.5.1. <i>CTX-M</i> antibiyotik direnç gen varlığının araştırılması .....	61
4.5.2. <i>TEM</i> antibiyotik direnç gen varlığının araştırılması .....	62
4.5.3. <i>SHV</i> antibiyotik direnç gen varlığının araştırılması.....	63
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	64
6. KAYNAKÇA.....	73
7. ÖZGEÇMİŞ .....	85

## TABLULARIN LİSTESİ

Tablo 2.1. Biyokimyasal direnç mekanizmaları.....	29
Tablo 3.1. İnhibisyon zon çapları kriterleri.....	45
Tablo 3.2. $\beta$ -laktamaz enzim direncini kodlayan genler ve primer dizileri .....	47
Tablo 3.3. <i>CTX-M</i> , <i>SHV</i> ve <i>TEM</i> grubu için $MgCl_2$ optimizasyonu .....	48
Tablo 3.4. <i>CTX-M</i> , <i>SHV</i> ve <i>TEM</i> grubu için dNTP optimizasyonu.....	49
Tablo 3.5. <i>CTX-M</i> tipi için ısı optimizasyonu.....	50
Tablo 3.6. PZR bileşenleri ve miktarları.....	50
Tablo 4.1. IMVIC analiz sonuçları .....	54
Tablo 4.2. Disk difüzyon testi ile antibiyotik duyarlılık değerlendirme sonuçları.....	56
Tablo 4.3. Disk difüzyon antibiyotik direnç yüzdeleri .....	57
Tablo 4.4. <i>CTX-M</i> ve <i>SHV</i> beta laktamaz pozitif izolatlar.....	60

## RESİMLERİN LİSTESİ

Resim 2.1. GSBL üreten Enterobacteriaceae .....	12
Resim 2.2. Bakterilerde farklı etki mekanizmasına sahip antibiyotikler .....	15
Resim 2.3. Penisilin bağlayıcı proteinler .....	17
Resim 2.4. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları .....	18
Resim 2.5. $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları .....	20
Resim 2.6. Bakterilerde $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları.....	20
Resim 3.1. Örneklerin analize hazırlanma aşamaları .....	41
Resim 3.2. IMVIC testi analizi sonuçları.....	44
Resim 3.3. Kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu.....	46
Resim 4.1. Çift disk sinerji testi .....	55

Resim 4.2. <i>CTX-M</i> , <i>SHV</i> ve <i>TEM</i> grubu için $MgCl_2$ optimizasyonu elektroforez görüntüsü .....	57
Resim 4.3. <i>CTX-M</i> , <i>SHV</i> ve <i>TEM</i> grubu için dNTP optimizasyonu elektroforez görüntüsü .....	58
Resim 4.4. <i>CTX-M</i> tipi için ısı optimizasyonu elektroforez görüntüsü .....	58
Resim 4.5. <i>CTX-M</i> tipi $\beta$ -laktamaz üreten izolatların elektroforez görüntüsü .....	61
Resim 4.6. <i>TEM</i> tipi $\beta$ -laktamaz üreten izolatların elektroforez görüntüsü .....	62
Resim 4.7. <i>SHV</i> tipi grup $\beta$ -laktamaz üreten izolatların elektroforez görüntüsü .....	62



## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

<b><u>Simgeler</u></b>	<b><u>Açıklama</u></b>
$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
Bp	Baz çifti
$^{\circ}\text{C}$	Santigrat derece
$\text{CO}_2$	Karbondiyoksit
G	Gram
$\text{H}_2\text{O}_2$	Hidrojen peroksit
$\text{H}_2\text{S}$	Hidrojen sülfür
kDa	Kilo dalton
L	Litre
M	Molar
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
$\text{MgCl}_2$	Magnezyum klorür
$\text{NaCl}$	Sodyum klorür
Nm	Nanometre
Pmol	Pikomol
Rpm	Dakikadaki devir sayısı
$T_m$	Bağlanma sıcaklığı
$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{l}$	Mikrolitre
%	Yüzde

**Kısaltmalar****Açıklama**

β	Beta
GSBL	Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
LPS	Lipopolisakkarit
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
EMB	Eozin Metilen Blue
HE	Hektoenterik
XLD	Xylose Lysine deOxcholate
ECA	Enterobacterial Common Antigen
H	Protein Yapıda Kirpik
K	Kapsül
O	Somatik
M	Mukoid
S	Kapsülsüz
RNA	Ribo Nükleik Asit
rRNA	Ribozomal Ribonükleik Asit
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
EFSA	European Food Safety Authority
PBP	Penisilin Bağlayıcı Protein
NAMA	N-Asetil Muramik Asit
TSA	Tryptic Soy Agar
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
UV	Ultraviyole
VP	Voges-Proskauer
NAGA	N-Asetil Glikozamin

MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
MHA	Müeller Hinton Agar
BHI	Brain Heart Infusion
VRGA	Violet Red Galactose Agar





## 1. GİRİŞ

Antibiyotikler günümüzde en çok tercih edilen ilaçlar arasında yer bulmaktadır. Ayrıca, tıp dünyasında kullanılmasının yanı sıra zirai ve benzeri birçok alanda tercih edilmeleri önemlerini daha fazla artırmaktadır. Antibiyotiklerin fazla kullanımı olumlu yönden ekonomik değerlerinin, olumsuz yönden ise yan etkilerinin ortaya çıkmasında büyük önem taşımaktadır. Bu durum antibiyotiklerin halk sağlığına da etki etmelerine sebep olmaktadır (Oskay ve ark., 2009). Özellikle günümüzde bakteriler arasında antibiyotik direnç genlerinin aktarımının çok fazla olması nedeniyle bilim insanları antibiyotiklerin yetersizliğinden şikâyet etmektedirler.

Gıda güvenliğinde önemli konular arasında yer almakta olan gıdalarda antibiyotik dirençliliğine sahip olan bakteriler, gelişmiş ve gelişmekte olan ülkeleri ciddi sağlık problemi ile tehdit etmektedir (Kartal, 2006). Gıda kaynaklı yangılar, coğrafi bölgelere, toplumsal yaşam kalitesine ve ekonomik şartlara bağlı olarak farklılık göstermekle birlikte tüm dünyada sıklıkla görülmektedir (Civek, 2015).

Antibiyotiklere karşı direnç gelişimi sürekli kendini yenileyerek gelişmekte ve dirençli bakterilerin neden olduğu yangılar önemli bir sağlık sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Bakterilerin antibiyotiklere karşı oluşturdukları dirençte sıklıkla kullandıkları savunma mekanizmalarından biri, sentezlenen enzimler ile ilacın inaktive edilmesidir. Beta-laktam grubu antibiyotikleri hidroliz eden beta-laktamaz enzimleri bakterilerin oluşturdukları savunma mekanizmalarına en iyi örnektir (Livermore, 1995).

Geniş Spektrumlu Beta-laktamaz karakterindeki mikroorganizmaların varlığı sahip oldukları patojenite etkiler nedeniyle tüm dünyada büyük önem taşımaktadır. GSBL'ler, gram negatif çomaklarda bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonama karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir (Akçam ve ark., 2004). İlk olarak 1983 yılında Avrupa'da *Klebsiella pneumoniae* bakterisinde teşhis edilen bu enzimler, daha sonra Enterobacteriaceae ailesinin diğer üyelerinde de görülmüştür (Hoşgör ve ark., 1998).

GSBL karakterindeki organizmalar içinde ilk tanımlananlar sıklıkla Enterobacteriaceae (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) üyeleridir. GSBL enzimlerinin *Klebsiella* türlerinde daha çok bulunma nedenleri ise karkas yüzeylerde daha uzun hayatta kalabilmeleridir (Özsoy ve ark., 2001).

Bu etkende, *CTX-M*, *SHV* ve *TEM* tipindeki direncin yaygın bir şekilde bulunduğu yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (Pitout ve ark., 2005). Bilim insanlarının yapmış oldukları çeşitli deneylerde ise farklı gruplardaki gram (–) ve (+) mikroorganizmalarda da GSBL varlığı tespit edilmiştir.

Enterobacteriaceae üyelerinden *Escherichia coli* daha çok üriner sistem ve gastrointestinal sistem enfeksiyonlarından sorumlu önemli bir bakteri türüdür. Başta *E. coli* olmak üzere bütün gram negatif bakterilerde genel olarak bulunan *TEM-1* ve *TEM-2* ile özellikle *Klebsiella* suşları tarafından sentezlenen *SHV-1* beta-laktamazlar arasında en yaygın olarak bulunmaktadır. Sayıları 600'e ulaşan beta-laktamazların yarısını oluşturan GSBL, çoğunlukla *TEM-1*, *TEM-2* ve *SHV* beta-laktamazlarından bir veya birkaç aminoasit değişikliği ile oluşmuşlardır. Bunun yanında *TEM* veya *SHV* kökenli olmayan GSBL'ler de saptanmaktadır (Mathew, 1979; Qinn, 1994; Sirot, 1995).

GSBL üreten bakteriler tüm penisilinlere, sefalosporinlere ve aztreonama (sefamisin ve karbapenemler hariç) dirençli bulunmaktadır (Paterson ve ark., 2005). Bu enzimler *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* başta olmak üzere Enterobacter, Serratia, Salmonella, Morganella ve Proteus gibi birçok Enterobacteriaceae üyesi tarafından üretilmektedir (Jacoby, 2005). Klasik olarak tanımlanan GSBL'lerin büyük çoğunluğu *TEM* ve *SHV* enzimlerinden köken almıştır (Gür, 2005).

GSBL oluşturan suşlar üzerinde yapılan epidemiyolojik çalışmalarda, bağımsız ve epidemik kökenleri birbirinden ayrı tutmak gereklidir. Moleküler tiplendirme yöntemleri bu amaca hizmet etmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda, özellikle *Klebsiella* suşlarında serotipleme, biyotipleme, faj tipleme, bakteriyosin tiplemesi ve antibiyotik duyarlılık testlerine göre tiplendirmeler yapılmıştır. Günümüzde ise genetik tiplendirme yöntemleri daha fazla tercih edilmektedir (avuřođlu ve ark., 2002).

Avrupa ve Asya'da 10 yılı aşkın bir süredir toplum kaynaklı GSBL'den biri ise *CTX-M* tipidir. Bununla birlikte literatürde farklı tipteki enzimleri (*CTX-M*, *SHV* ve *TEM*) kodlayan genlerin, ülkemiz kökenli *E. coli* izolatlarında bulunma sıklığının araştırıldığı çalışmalara ise daha az sayıda rastlanılmaktadır (Gonullu ve ark., 2008; Nazik ve ark., 2011).

Bu nedenle alışmamızda; Amasya ilinde tüketime sunulan hayvansal gıda kaynaklı olan kıyma örneklerinden fenotipik olarak belirlenen GSBL pozitif izolatlarında, *CTX-M*, *SHV* ve *TEM* tipindeki  $\beta$ -laktamazların üretiminden sorumlu genlerin varlığının Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile tespit edilmesi amaçlanmıştır.

## 2. GENEL BİLGİ

### 2.1. Enterobacteriaceae Familyası

Enterobacteriaceae; insanda enfeksiyona neden olan bakteri cinsini ve türünü barındıran bir bakteri ailesidir. Ancak bu cinsin “enterik bakteriler” olarak adlandırılması hatalı kullanımlara yol açmaktadır. Enterobacteriaceae ailesindeki bakteriler sadece barsakta yaşamaz ya da barsakta yaşayan bakterilerin hepsi Enterobacteriaceae ailesine ait değildir. Bu ailedeki bakterilerin birkaçı insan ve hayvanların kalın barsağında genel olarak bulunurlar fakat normal flora da azami bir biçimde karşımıza çıkmaktadırlar. Yapılan çalışmalarda bu ailedeki bakterilerin birçoğunun, insan ve hayvanların barsak ve barsak dışı floralarında, bitkilerde, toprakta, suda; patojen, kommensal ya da saprofit olarak buldukları ortaya çıkarılmıştır (Töreci, 2002; Donnerberg, 2005; Murray ve ark., 2009).

Enterobakteriler, gram negatif, sporsuz basiller olup genel olarak 0,3 - 1,0 µm eninde 1,0 - 6,0 µm boyunda mikroorganizmalardır. Enterobakterilerin hücre duvarını oluşturan peptidoglikan, lipoprotein, fosfolipit, protein ve lipopolisakkaritler (LPS) çok yapılı tabakalar halindedir. Lipopolisakkaritlere ait özel polisakkarit yan zincirlerle birçok cinsin antijenitesini belirlenmektedir. Ayrıca polisakkarit yan zincirler hücrenin endotoksik aktivitesinden sorumlu olan kısmını oluşturmaktadır. Hücre duvarından dışarı uzanan organeller diğer bakterilere konak hücrelere ve bakteriyofajlara yapışmada yardımcı olmaktadır. Enterobakteriler optimum 35 - 37 °C’de ve CO<sub>2</sub>’siz ortamda çoğalırlar. Koloniler 18 - 24 saatte tespit edilecek hale gelirler. Enterobakterileri çoğaltmak için Kanlı agar, Mac Conkey, Eozin Metilen Blue (EMB), Hektoenterik (HE) agar, Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) agar kullanılmaktadır. Mac Conkey veya EMB agarda laktozu fermente eden türler, laktoz fermentasyon sonucu oluşan asit nedeniyle pembe-kırmızı kolonilerin oluşumu sonucunda tespit edilirler. Kristal viyole çöker ve nötral kırmızısı asit pH’da kırmızıya dönüşür. Laktoz negatifler Mac Conkey agarda saydam koloniler oluşturur. Safra ve kristal viyole gram pozitif bakterilerin üretilmesine engel olurlar. HE agarda laktoz pozitif türler sarı koloniler oluştururken, laktoz negatif olanlar ise yeşil koloni oluşturarak kolayca tespit edilirler (Schito, 2003).

Enterobakter ailesi içindeki bakterilerin çoğu ortak özellikler paylaşırlar. Gram negatif basil, sporsuz, peritrik kirpiklerle hareketli veya hareketsiz, pepton veya et özlü besiyerlerinde, sodyum klorür veya başka madde ilave etmeden üreme özellikleri, Mac Conkey agarda iyi üremeleri, fakültatif üremeleri, katalaz pozitif, oksidaz negatif olmaları, nitratı nitrite çevirme özelliğini barındırmaları, DNA'da G+C oranları %39 - 40 arasında olmaları ve Erwinia cinsi dışındaki tüm enterik bakteri türlerinde ortak Enterbacteria antijeni (ECA= Enterobacterial Common Antigen) bulundurmaları gibi özelliklere sahiptirler (Rottier ve ark., 2012).

Tıp alanında infeksiyonlarıyla en çok savaş verilen grup Enterobacteriaceae olduğu için bu familya bilim insanlarının dikkatini çekmiştir. İnsanlarda septisemi, menenjit, pnömoni, yara ve üriner sistem infeksiyonlarına neden oldukları için önem taşımaktadırlar. Enterobacteriaceae ailesinde bulunan bakteriler aynı zamanda, önemli hastane infeksiyonlarından etken olarak sıklıkla izole edilmektedirler (Tham, 2012).

## **2.2. Enterobacteriaceae Sınıflandırılması**

Enterobacteriaceae cinsleri, türleri, alt türleri, biyogrupları ve serotiplerinin adlandırılması ve sınıflandırılması fikir ayrılıklarına sebep olmuştur. Mikrobiyoloji alanında yapılan ilk sınıflandırmalarda bakterilerin morfolojik ve biyokimyasal özellikleri göz önünde bulundurulmuştur fakat günümüzde yeni tanımlama yöntemlerinin kullanılması ile bakterilerin tanımlanmasında yenilikler ve buna bağlı olarak da sınıflandırmada birtakım değişiklikler oluşmuştur. Moleküler tekniklerin gelişmesini takiben nükleik asit hibridizasyon, DNA dizileme yöntemi gibi yeni tekniklerle aile içindeki bakterilerin evrimsel geçmişini ve diğer kökenlerle akrabalık derecelerini belirlemek daha kolay hale gelmiştir. Bu araştırmalarla birlikte yeni türler tanımlanmış ve birçok bakterinin sınıflandırılması yeniden yapılmıştır (Töreci, 2002; Farmer ve ark., 2005, 2009). Örneğin önceleri *Pasteurella pestis* ve *P. pseudotuberculosis* gibi Pasteurellaceae ailesinde bulunan türler Yersinia cinsi olarak bilinirken moleküler teknikler sonucu Enterobacteriaceae ailesine üye olmuştur (Töreci, 2002; Donnenberg, 2005).

Enterobacteriaceae ailesi; Proteobacteria şubesinin Gammaproteobacteria sınıfında, Enterobacteriales takımının içinde yer alan ailedir. Enterobacteriaceae ailesindeki cins sayısı 1960'larda 10-12 olarak bilinirken, 1985 yılında 22 cins'e ait 69 tür ve 29 adlandırılmamış biyogrup tanımlanmıştır. Günümüzde bu ailede 50'den fazla cins tanımlanmıştır (URL-1, 2013).

### 2.2.1. *E.coli*

1885 yılında, süt çağı çocuklarının ishallerinde *E. coli* bakterisine rastlanılmıştır. Daha sonraki yıllarda bağırsak dışı enfeksiyonlarda *E. coli*'nin patojen olduğu ortaya çıkartılmıştır. Chalmer ve Castellani 1919'da tür adı olarak *Bacterium coli* ismini kullanmışlardır ve bu isim daha sonradan *E. coli* olarak kullanılmaya devam edilmiştir (Unat, 1986; Töreci ve ark., 2002).

Gram (-), fakültatif anaerob, sporsuz bir bakteri olan *E. coli* yaklaşık olarak 2-6 µm boyunda, 1-1,5 µm eninde, düz, uçları yuvarlak, çomak şeklinde pigmentsiz bakterilerdir. Peritris kirpikleri ile hareket etme özelliğine sahipken hareketsiz kökenlerinin de var olduğu bilinmektedir ve bazı suşları da kapsüllüdür (Erdem, 1999).

*E.coli*, adi besiyerlerinde kolay üretimi sağlanabilen bir bakteridir. Optimum üreme sıcaklığı 37°C ancak 20-44°C'de üretimleri gerçekleşmiştir. Besiyerlerinde düzgün koloniler yapan *E. coli*, Mac Conkey agarda laktozu fermente ettiğinden kırmızı renkte, safrayı presipite ettiğinden etrafında zon oluşan 2-3 mm çapında koloniler ile kolayca tespit edilebilmektedir. Laktoz, D-mannitol, D-sorbitol, L-arabinoz, L-ramnoz, maltoz, D-ksiloz, trehaloz ve D-mannozu fermente ederken nositol, sellobioz, eritol ve D-arabitolü fermente etmez. Katalaz, metil kırmızısı, lizin dekarboksilaz da pozitif reaksiyon gösterirken oksidaz, Voges-Proskauer, fenilalanin deaminaz, lipaz, 25°C'de DNaz aktiviteleri negatiftir. İndol testinde triptofanı ayrıştırarak indol oluştururken, H<sub>2</sub>S ve üreaz oluşturmazlar. *E. coli*'nin somatik (lipopolisakarit-O), protein yapıda kirpik (H), kapsül (K) antijenleri bulunmaktadır. 170'ten fazla O grubu, 60'a yakın H grubu, 90 civarında K grubu tespit edilmiştir. Serotiplendirme yapılırken öncelikle O ve H antijenleri kullanılmaktadır (Bilgehan, 2002; Murray ve ark., 2005).

Farklı alanlarda karşımıza çıkan *E. coli*, gıda sektöründe de hijyen ve sanitasyon göstergesi olan bir indikatör bakteridir. İnsan bağırsak florasında doğal olarak 10<sup>6</sup> ile 10<sup>9</sup> kob/g arasında bulunabilmektedir (Tham, 2012).

### **2.2.2. *Citrobacter***

Gram negatif bakteri cinsi olan *Citrobacter* idrar ve solunum sistemi hastalıklarının başlıca sebebi olan kommensal bir bakteridir (Hodges ve ark., 1978; Gupta ve ark., 2003).

*Citrobacter spp.* bilim insanları tarafında tercih edilmesinin diğer bir nedeni, bu cinse ait suşların kontamine ettiği gıdaların tüketiminden sonra sağlıklı bireylerde gastrointestinal enfeksiyonlar oluşturmasıdır.

En sık gıda kontaminasyonuna sebep olan türler *C. freundii* ve *C. braakii* bakterileridir (Urbanov, 1997). Bu tür suşların, toksisiteye neden olan genleri kodladığı bilinmektedir (Guarino ve ark., 1989; Schmidt ve ark., 1997).

### **2.2.3. *Enterobacter***

Enterobacter cinsindeki bakterilere en çok toprak ve sularda rastlanırken nadir olarak insan ve bazı hayvanların bağırsak florasında bulunurlar. Kirpikleri ile hareket eden, yaklaşık 0,6 – 1 µm en ve 1,2 – 3,1 µm boyutlarında düzgün çomakcıklardır. Karşımıza çoğu kez kapsülsüz olarak çıkan bu bakterinin, yapılan araştırmalar sonucu ince kapsüle sahip olduğu durumlarda tespit edilmiştir. *Enterobacter* türleri, gram negatif, antimikrobiyal maddelere ve dezenfektanlara Enterobacteriaceae ailesinin diğer türlerine göre daha dirençlidirler (Wade ve ark., 1991).

Fırsatçı patojen olma özelliği nedeniyle yeni doğmuş ve prematüre bebeklerde, immün yetmezliği olan ve immün süpresifli kimselerde, idrar yolları, üst solunum yolları, yara ve yanık enfeksiyonları başta olmak üzere, menenjit ve sepsisler gibi çeşitli hastalıklara yol açmaktadırlar (Avcı, 2012).

Cins içindeki genetik heterojeniteden dolayı *Enterobacter* sınıflandırılmasında farklılıklar görülmektedir. Başlangıç olarak iki yeni tür (*E. radicincitans* ve *E. ludwigii*) sınıflandırılmaya eklenmiştir (Murray ve ark., 2009). *Enterobacter agglomerans* artık *Pantoea* cinsi içinde *Pantoea agglomerans* olarak yer almaktadır. *E. cloacae* içindeki iki organizma günümüzde *E. hormaechei*'nin alt türleri olarak keşfedilmiştir. Daha önce *E. hormaechei* olarak bilinen suşlar günümüzde subsp. *hormaechei* olarak adlandırılmış ve yeni oluşturulan iki tür, subsp. *oharae* ve subsp. *steigerwaltii* olarak tanımlanılmaktadır. Her üç alt tür farklı bölgelerden, insan klinik örneklerinden ve bitkilerden izole edilebilirler. Daha önce *E. cloacae*'ye ait olduğu düşünülen *E. dissolvens* artık *E. cloacae* subsp. *dissolvens*'tir. Daha önce *E. cloacae* olarak bilinen suşlar ise *E. cloacae* subsp. *cloacae*'dir. *E. cloacae*, içinde *P. agglomerans* grubu gibi çok sayıda DNA grubu barındıran heterojen bir grup olarak kalmıştır ve isimlendirilememiştir (Murray ve ark., 2009).

Enterobakterilerin, antibiyotik kullanımının olmadığı dönemde ismi duyulmazken, 1970'li yıllardan itibaren antibiyotik kullanımının başlangıcıyla enfeksiyonlarda görülmeye ve önem taşımaya başlamıştır (Çağlayangil ve ark., 1991; Ahmet ve ark., 1995).

#### **2.2.4. Klebsiella**

1885'te Escherich'in dışkıdan izole ettiği ve öncelikle *Bacterium lactis aerogenes* olarak adlandırdığı bakterinin *K. pneumoniae* olduğundan şüphe edilmektedir. 19. yy'ın sonlarında Alman mikrobiyolog Edwin Klebs'in anısına *Klebsiella* cinsinin ortaya çıkması sonucunda *B.aerogenes*, *Klebsiella aerogenes* adını almış daha sonra bu ad *K. pneumoniae* olarak günümüze kadar gelmiştir (Erdem, 1999).



*Klebsiella* sporsuz, kısa uçları yuvarlak, gram (-), hareketsiz ve fakültatif anaerop özelliğe sahip bir bakteridir (Erdem, 1999). Eni 0,3-1 µm, boyu ise 0,6-6 µm arasındadır. Asit ve gaz oluşturarak karbonhidratları fermente eder, üre ve eskülini hidrolize eder, Voges-Proskauer ve lizin dekarboksilaz reaksiyonları pozitifdir, ancak indol ve H<sub>2</sub>S oluşturmazlar. Oksidaz, fenilalanin deaminaz, arjinin dehidrolaz, ornitin dekarboksilaz, eskülin fermentasyonu ve DNaz oluşturma reaksiyonları negatif olmakla beraber jelatini de eritmezler. *Klebsiella* kökenlerinin çoğunda, karbonhidratlı besiyerinde izolasyonu yapılan kültürde, bakteri çevresinde geniş bir kapsül oluşturdıkları gözlenmiş olsada kapsülsüz veya slime tabakası gibi az kapsül oluşturan kökenlerin de varlığı tespit edilmiştir (Erdem, 1999; Töreci, 2002). Bazı kökenlerde kapsül oluşturma virulansla orantılı olmadığı, kapsülsüz bazı suşların da oldukça virulan olduğu görülmektedir. *Klebsiella* kökenleri buyyon jeloz, kanlı jeloz, Mac Conkey agar, EMB gibi besiyerlerinde fakültatif olarak en iyi 37°C'de üreyen bakterilerdir. 55°C gibi yüksek sıcaklıkta 30-45 dakika kadar bekletildiklerinde ise ölürlür. Kapsül bulunduran türleri katı besiyerinde büyük (3-4 mm) mukoid koloniler (M koloni) oluştururken, kapsülsüz olan türleri ise S kolonileri oluşturmaktadır (Töreci, 2002).

Solunum yollarından izole edilen *K. pneumoniae* kökenleri genel olarak mannoza duyarlı birinci tipte pili oluşturmaları ile karakterize edilirler. Diğer kaynaklardan izole edilen kökenlerde mannoza dirençli üçüncü tipte pili de bulunabileceği bildirilmiştir. *Klebsiella* cinsinde O antijenleri (hücre duvarındaki LPS molekülleri) diğer gram negatif bakterilerdeki gibi bakterinin endotoksitesine neden olmaktadır. O antijenlerine göre 12 serogrup tespit edilmiştir. *Klebsiella*'ların en önemli antijenleri kapsül (K) antijenleridir. Kapsül materyali polisakkarit bir yapı göstermektedir. *Klebsiella*'da 80'e yakın K antijeni tipi bildirilmiştir. K antijenleri, fagositozu ve infeksiyon bölgesine fagositlerin göçünü engelleyen virulans faktörüdür. Bu antijenler O antiserumları ile çökelmeye engel olmaktadır. Fimbriyalı kökenlerde protein yapıda fimbriya antijenlerinin varlığına rastlanılmıştır (Erdem, 1999; Töreci, 2002).

*Klebsiella*'lar fimbriyaya adezin kolonizasyonunun sağlanmasında yardımcı olmaktadır. Plazmid tarafından kodlanan aerobaktin gibi proteinler, yaygın sistemik infeksiyon oluşturmada temel bir faktör olan demirin bakteri metabolizmasına katılmasını sağlar, üremedeki verimin artmasında da görev almaktadır. *Klebsiella*'ların dokulara hasar vermesinde bakterinin oluşturduğu ve hücre dışına salgıladığı çeşitli toksin maddeler de rol oynamaktadır. *K. pneumoniae*, lobar pnömoni, üriner sistem enfeksiyonları, safra kesesi enfeksiyonu, cerrahi yara enfeksiyonu, bakteriyemi ve çeşitli organ abseleri gibi birçok enfeksiyona yol açmaktadır (Erdem, 1999; Töreci, 2002).

*K. pneumoniae* antibiyotiklere karşı çok dirençli bir yapı göstermektedir. *Klebsiella* cinsi bakteriler aminopenisilinlere ve karboksipenisilinlere doğal dirençlidirler. *Klebsiella* türlerinin çoğunlukla plazmid ile ürettiği karbapenemaz, bilim dünyasında KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) olarak bilinir ve diğer beta-laktam antibiyotiklerin dışında karbapenemleri de hidrolize eder (Nordmann ve ark., 1993; Nicasio ve ark., 2008).

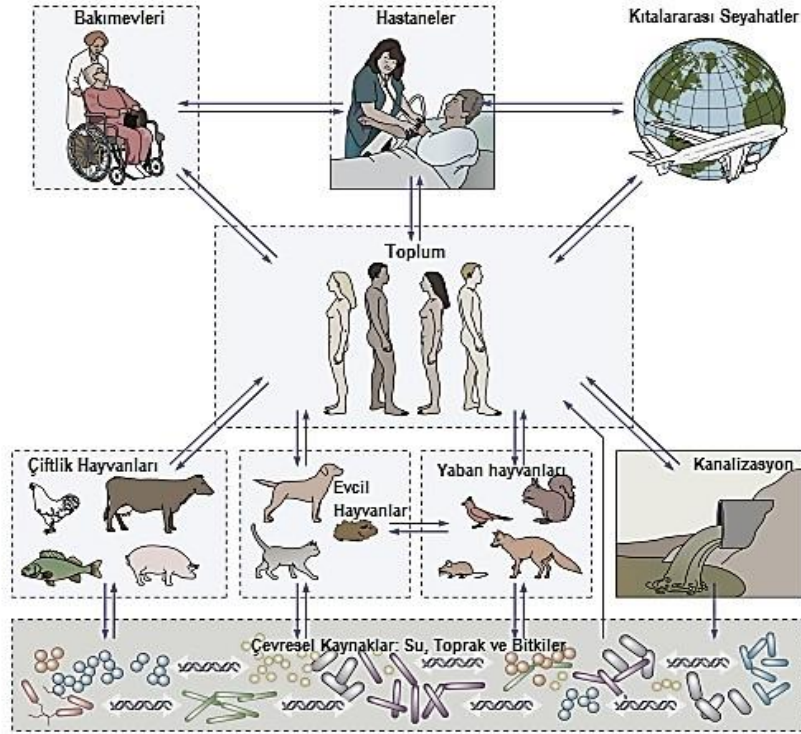
Kromozomal direnç sağlamanın yanı sıra R plazmidinden kaynaklanan ve başka bakterilere transforme olabilen GSBL direncine bu türde çok sık rastlanmaktadır. Tüm Enterobacteriaceae ailesinde GSBL oluşturmaya en yatkın cins olarak bilinmektedir.

### **2.3. Hayvansal Gıda Kaynaklı Bazı Patojen Bakterilerdeki Antimikrobiyal Direnç**

Hayvansal gıdaları tedavi etmek için kullanılan antimikrobiyal ajanlara direncin çok yüksek miktarlarda bulunduğu çeşitli çalışmalar sonucunda gösterilmiştir (Aarestrup, 2004). Antimikrobiyal ajanların öldürücü veya üremeyi sınırlandırıcı etkisine karşın, bakterilerin kendini savunma mekanizması direnç olarak adlandırılmaktadır (Yüce, 2001).

Antimikrobiyal ajan olan antibiyotiklerin keşfi 1930'lu yıllara dayanmaktadır. Abraham ve Chain tarihteki ilk direnç mekanizmasını bir *Esheria coli* suşunda penisilini parçalayan bir enzimin varlığında rastlamışlardır. Kirby, 1944 yılında *Staphylococcus aureus* suşlarından benzer özelliklerde bir başka enzim elde etmiştir. Penisilin sık olarak kullanılmaya başlanmadan önce, hem gram negatif hem de gram pozitif mikroorganizmalarda bu ajana karşı direnç varlığı saptanmıştır. Antibiyotiklerin hiç kullanılmadığı bazı adalarda toprak ve dışkı örneklerinde tetrasiklin ve streptomisine dirençli bakterileri bulan bilim insanları ise Gardner ve arkadaşlarıdır. Tüm bu bilgiler, antibiyotiklerin sıklıkla kullanılmasının antibiyotik direncine etkisi olmadığı, bakterinin olumsuz çevre koşullarında yaşamını sürdürebilmek için kullandığı savunma sürecinin bir parçası olduğunu göstermektedir ( Marino ve ark., 2000).

Birçok yeni antibiyotik çeşidinin kullanılmasıyla birlikte Enterobacteriaceae gram (-) bakteriler, antibiyotiğe karşı farklı dirençler oluşturarak yapılan tedavilerin uzaması gibi sağlık sorunları oluşturmaya devam etmişlerdir (Levy, 1982; Collignon, 2009). Bu bakteriler, birçok bakteriyel hastalığın tedavisinde çözüm odaklı kullanılan antimikrobiyal ajanlarla birlikte antimikrobiyal direnç mekanizmasını oluşturarak tüm dünyayı tehdit eder hale gelmiştir. Antibiyotikler hayvanları tedavi etme amacıyla kullanılırken aynı zamanda normal ve patojen flora bakterilerinde antibiyotik direncinin oluşumuna neden olurlar. Dirençli olan bu bakteriler gıda kontaminasyonu ile insan barsak mikroflorasına kolonize olurlar (Barton, 2000).



**Resim 2.1.** GSBL-üreten Enterobacteriaceae (Woerther ve ark., 2013)

Günümüz koşullarındaki ihtiyaçlardan dolayı çiftlik hayvanlarında ölümleri en aza indirmek amacıyla bilinçsiz antibiyotik tüketimi artmıştır. Bu durum hayvanlarda oluşabilecek dirençli bakterilerin insanlara daha kolay geçmesini sağlamaktadır. Hayvansal gıdalardan insanlara transforme olan dirençli bakteriler, insanların doğal floralarını da bozarak çeşitli hastalıklara yakalanmalarına ve tedavi sırasında kullanılan antimikrobiyal ajanların etkisine direnç göstermelerine neden olmaktadır. Toplum sağlığı açısından bilinçsiz antibiyotik tüketilmesi insanlarda doktor, çiftlik hayvanlarında ise veteriner gözetiminde olmalıdır (Franklin ve ark., 2001; Aarestrup, 2004; McEwan ve ark., 2006).

Antibakteriyal direnç, çeşitli mekanizmalar ile gelişimini sürdürebilmektedir. Bazı mikroorganizmalar birkaç mekanizmayı bünyesinde barındırarak birden çok ilaca direnç gösterme potansiyeli taşırlar. Bu dirence sahip gram negatif enterik bakterilerin oluşması hem nozokomiyal hem de toplum kökenli infeksiyonların yönetilmesinde büyük bir problem oluşturmaktadır (Collignon, 2009).

Yıllar boyunca Enterobacteriaceae üyeleri arasındaki sefalosporinlere olan direnç, genişlemiş spektrumlu beta laktamazların (GSBL) yayılmasından dolayı artmıştır (Rasheed ve ark., 2014). *E.coli*'deki antibiyotik direnç oranları hızlı bir şekilde artış göstermektedir (Collignon, 2009). Harakeh ve ark.(2005) direnç gösteren bakterilerin kontamine olan gıdalar aracılığı ile insanlara bulaşabileceğini saptamıştır. Lei ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada, *E. coli* izolatlarında antibiyotik direncinin Enterobacteriaceae grubu arasındaki yüksek antibiyotik direnci ile ilişkili olabileceğini belirtmiştir.

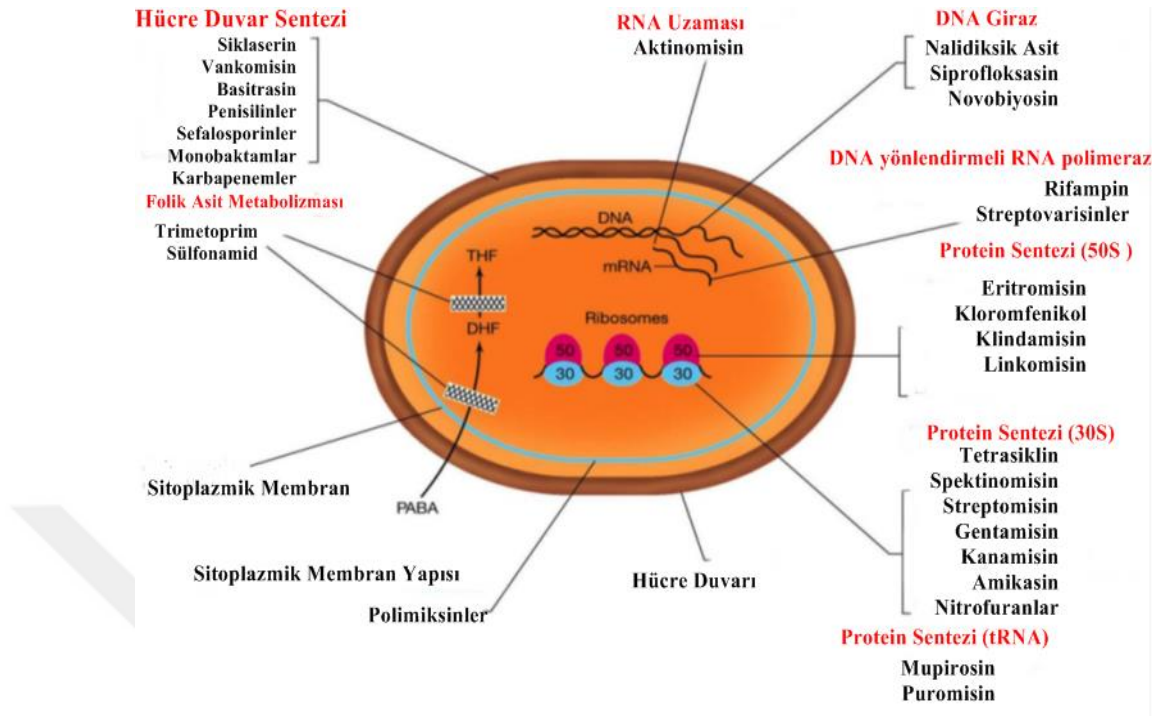
Antibiyotik kullanımı, dirençli bakteriler ile çevreye ve insana farklı kaynaklardan yayılıp direnç genlerinin aktarılmasına ve böylece küresel bir tehdit olarak direncin yayılımına neden olabilir. Birbirine bağlı olan mikrobiyal ekosistemler göz önüne alındığında dirençli bakteriler hayvanlardan gıda zincirine sonra da insanlara geçebilir. Gıda yoluyla direnç genlerinin yayılımı çeşitli bilim insanları ve European Food Safety Authority (EFSA) tarafından da belgelenmiştir (Threlfall, 2002; White ve ark., 2002; EFSA, 2008).

*E. coli*, gıda kaynağı olarak kullandığımız hayvanlarda rastlanan patojenitesi en yüksek enterik bakterilerden biridir. Avrupa'da yapılan çalışmalar sonucunda *E. coli* ile ilgili maksimum oranda antibiyotik dirençliliği tespit edilmiştir (Mac Kinnon,1993; Baquero, 1996). Bu direnç tetrasiklinlere, sulfanamitlere ve streptomisine karşı %50'den fazla, ampiciline karşı %20-50 ve trimetoprim-sulfanamide karşı %18-46 oranındadır. Örneğin İsveç'te son on yılda yapılan çalışmalarda antibiyotik kullanımı azaltılmasına rağmen *E. coli*'nin antibiyotik direncinde özellikle de tetrasikline olan direncinde azalma olmadığı tespit edilmiştir (Bjornerot ve ark., 1996; Odensvik ve ark., 1998).

Zaman içerisinde hayvanlarda görülen bakteriyel enfeksiyonlar ya tedavi edilemez bir hale gelecek ya da zorunlu olarak en son geliştirilen antibiyotikler (florokinolonlar ve üçüncü jenerasyon sefalosporinler gibi) kullanılacaktır. Antimikrobiyal ajanların hayvanlar ve insanlar üzerinde kullanımı, antibiyotik dirençliliğin artmasına neden olmakla birlikte antibiyotik seçimini de zorlaştırmaktadır. Antibiyotiğe direnç seviyesi sabit kalabileceği gibi antimikrobiyal ilaç kullanımından bağımsız olarak da artabilmektedir (Khachatryan ve ark., 2004). Hayvansal gıdaların sağlandığı evcil hayvanlarda, antibiyotik dirençli *E. coli* suşları tespit edilmiş (Guerra ve ark., 2003) ve bu patojenlerin gıda zinciri ile insanlara bulaşarak insan sağlığı için potansiyel risk oluşturacağı bildirilmiştir (Johnson ve ark., 2007). Kommensal *E. coli* izolatları dirençli patojenlerin potansiyel kaynağı olarak düşünülmüş ve bunların farklı çevrelerde antibiyotik direnci için uygun bir indikatör olarak kullanılabilmesi değerlendirilmiştir (O'Brien, 2002; Dolejska ve ark., 2008).

#### **2.4. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması ve Temel Antibiyotik Grupları**

Bazı mantar ve bakteri türleri tarafından sentezlenen ve diğer mikroorganizmaların gelişimlerini durduran ya da ölümüne neden olan kemoterapötik maddelere antibiyotik denir (Waksman, 1947). Antibiyotik terimi günümüzde patojenlerin tahribatına neden olan her türlü kimyasal madde için kullanılmaya başlanmıştır. Bu nedenle, mikroorganizmalar, hayvanlar ve bitkilerden izole edilen bu tür kimyasallar da antibiyotik olarak adlandırılmaktadır. Antibiyotiklerde aranılan en önemli özellik seçici toksisite olup, konak hücre tahribatına neden olmadan hedef aldığı mikroorganizmaya etki etmesidir. Penisilin ve sefalosporin gibi antibiyotikler, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan tabakasını hedef alarak hücreye zarar vermektedirler ancak insan hücrelerinde peptidoglikan tabakası var olmadığından bu durum insanları etkilememektedir. Antibiyotikler, genellikle mikroorganizmalar üzerinde hücre duvarı, sitoplazmik membran, protein veya nükleik asit sentezlerine engel olarak ya da bu sentezleri bozarak etki ederler. Yine günümüzde, doğal olarak üretilen birçok antibiyotik madde, yapay yollardan daha çok etki gösterebilmeleri açısından sürekli olarak değişime uğratılmaktadır.



**Resim 2.2.** Bakterilerde farklı etki mekanizmasına sahip antibiyotikler (Madigan ve Martinko, 2010).

### 2.4.1. Sefalosporinler

Sefalosporinlerin ilk kaynağı olan *Cephalosporium acremonium* mantarı 1945 yılında Giuseppe Brotzu tarafından Sardunya sahillerinde bir kanalizasyon çıkışına yakın yerden izole edilmiştir (Lawrence, 1998). Sefalosporinler yapıları ve etki mekanizmaları bakımından penisilinlere benzemektedirler. Penisilinler gibi bakteri hücre duvarının peptidoglikan sentezini inhibe ederek etkili olurlar (Çolak, 1999). Fakat penisilinlerin aksine penisilinazlara daha az duyarlıdırlar. Sefalosporinler, bir beta-laktam halkası ve buna bağlı altılı dihidrotiazin halkasından oluşmaktadır. Bu durum sefalosporinlerin antibakteriyel aktivite ve farmakokinetik özelliklerini değiştirmektedir (Gülay, 2003).

Her kuşaktaki sefalosporinlerin  $\beta$ -laktamazlardan etkilenme durumu farklılık göstermektedir. 1. kuşak sefalosporinler  $\beta$ -laktamazlarca yıkıma uğrarken, 2. kuşak sefalosporinlerin çoğu  $\beta$ -laktamazdan etkilenmemektedir. 3. kuşak sefalosporinler ise  $\beta$ -laktamazlara karşı dirençlidirler (Petri, 2006).

**1. kuşak sefalosporinler:** Sefalotin, sefalozin ile temsil edilmektedirler. *Streptococcus* ve *Staphylococcus* gibi gram pozitif bakterilere karşı en etkili sefalosporin grubudur. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella* ve *Shigella* gibi gram negatif bakterilere karşı etkileri ise sınırlıdır (Sarı, 2005).

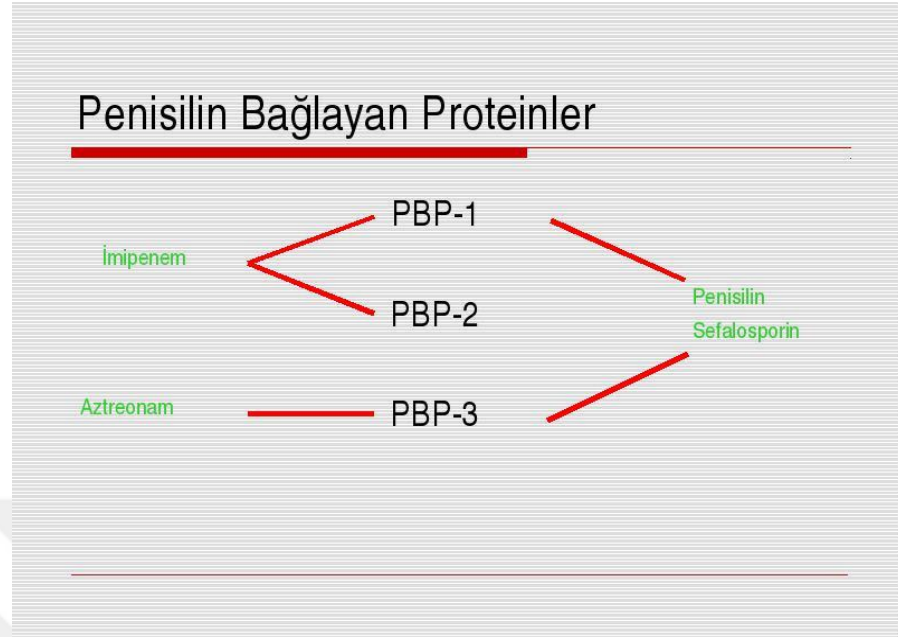
**2. kuşak sefalosporinler:** Sefaklor, sefiksim, sefprozil, lorakarbef ve sefuroksim ile temsil edilmektedirler. 1. kuşak sefalosporinlere benzemekle birlikte daha geniş spektruma sahip olmaları ile ayrı tutulmaktadır. Aynı zamanda 1. kuşak sefalosporinler eşit bir gram (+) etkinliğine de sahiptirler. Aerobik organizmalar ve *Enterobacter spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* ve *Neisseria meningitidis* gibi gram negatif bakterilerde daha etkili oldukları bilinmektedir (Sarı, 2005).

**3. kuşak sefalosporinler:** Sefotaksim, sefoperazon, seftriakson, seftizoksim, seftazidim ve sefodizim ile temsil edilmektedirler. Sefiksim, oral yolla kullanılabilen tek 3. kuşak sefalosporin olması nedeniyle çoğu bilim insanının araştırmalarında genişçe yer almıştır (Sarı, 2005).

#### **2.4.2. Aztreonam**

Beta-laktam antibiyotiklerle aynı etki mekanizmasına sahiptir fakat yapısında bir beta-laktam halkasına ekli başka bir halka olmaması nedeniyle diğer beta-laktamlardan farklı bir alanda sınıflandırılırlar (Gülay, 2003). Penisilin Bağlayıcı Protein Üç (PBP3) bağlanarak etkili olurlar (Alp ve ark., 2003). Beta-laktamaz enzimlerinin indüksiyonuna neden olmaz ve bu enzimlerin çoğuna karşı dirençli bir yapı göstermektedir (Giamarellou ve ark., 2001; Yao ve ark., 2003).





**Resim2.3.** Penisilin Bağlayıcı Proteinler (PBP) (Karadaş, 2017).

### 2.4.3. Karbapenemler

Karbapenemler  $\beta$ -laktam ailesi içerisindeki en geniş etki spektrumuna sahip antibiyotiklerdir. Gram-pozitif ile gram-negatif bakterilerdeki PBP'lere bağlanarak hücre lizisine neden olurlar (Yao ve ark., 2003).

Karbapenemleri diğer  $\beta$ -laktamlardan farklı kılan özellik kimyasal yapısındaki  $\beta$ -laktam halkasının tiyozolidinik ekinde 4. pozisyonda sulfon yerine karbon atomu içermeleridir. Karbapenem grubunun ilk örneklerini imipenem ve meropenemler oluşturmaktadır (Pommerville, 2007; Mülazimoğlu, 2010). İmipenem ve meropenemler benzer yapılar oluşturmakla birlikte imipenem gram (+) bakterilere karşı etki gösterirken, meropenemler gram (-) bakterilere özellikle de *P. aeruginosa*'ya karşı etki gösterirler (Piddock ve ark., 1992; White ve ark., 1996; Yao ve ark., 2003).

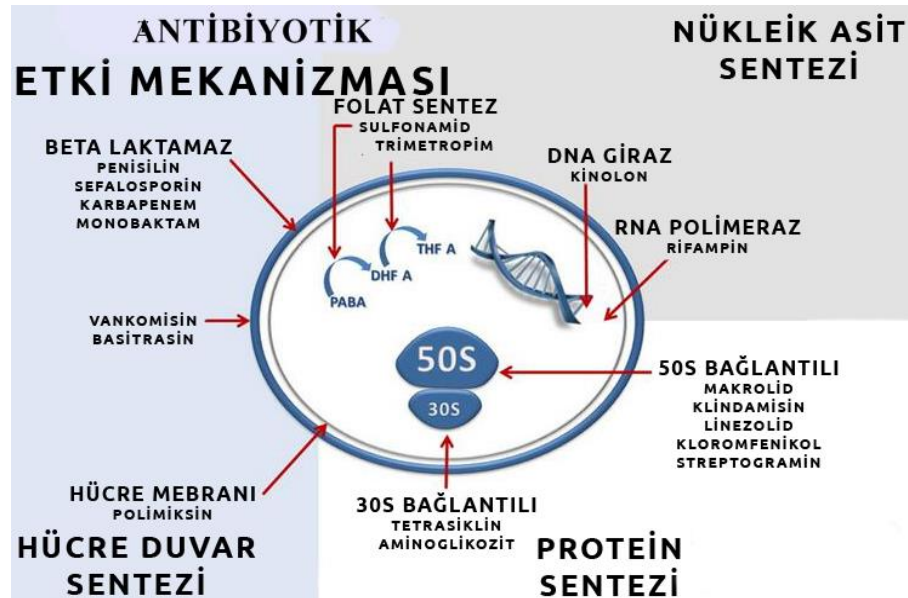
*P. aeruginosa*'ların beta-laktamlara karşı son yıllarda artmakta olan direnci nedeniyle hastane infeksiyonları ve özel hasta popülasyonlarında karbapenemlerin ilk seçenekler arasında yer alması ile bilim dünyasında sıklıkla gündeme gelmiştir (Bradley ve ark.,1999; Akçay ve ark., 2003; Oh E-J ve ark., 2003).

#### 2.4.4. Kinolonlar

Kinolonlar bakterisidal ajan olarak tanımlanan antibiyotiklerdir. DNA giraz ve topoizomerez enzimlerinin inhibasyonuna neden olarak DNA sentezinin baskılanmasına neden olmaktadır (Gülay, 2002). *P. aeruginosa* 'ya karşı geliştirmiş oldukları dirençle kendilerinden söz ettiren ve birçok makalede yer alan siprofloksasin ve trovafloksasin kinolonlardandır (Yao ve ark., 2003).

#### 2.4.5. Aminoglikozidler

Aminoglikozidler; bilinen en eski antibiyotik olarak literatürde yer almaktadır (Wright, 2003). Tüm aminoglikozidlerin etki mekanizmaları benzer olmakla birlikte hücre içindeki yerleri hem 30S, hem de 50S alt ünitelerde bağlanma yerine sahip ribozomlardır. GSBL etkinlikleri olan bakteriyal translasyonun katyonik inhibitörleridir. Bilim insanları zehir etkisini azaltmak amacıyla doğal fermente aminoglikozidleri değiştirmeyi amaçlamışlardır fakat bu değişim esnasında ribozom kodonunda ki değişiklikler 16SrRNA'nın bağlanmasını baskılamaktadır (Bishop, 1996; Kaya, 1997; Şanlı, 1999; Kayaalp, 2000).



Resim 2.4. Antibiyotiklerin etki mekanizmaları (URL, 2004).

## 2.5. Beta Laktam Antibiyotikler

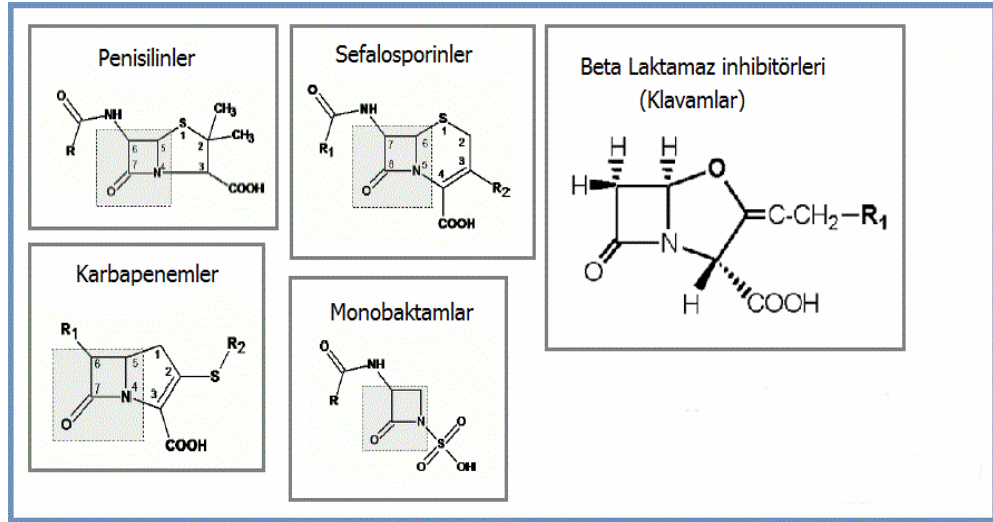
Beta laktam antibiyotikler, hücre duvar yapısını inhibe ederek antimikrobiyal etki gösteren çoğunlukla hastane kökenli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibakteriyel ajanların başında bulunmaktadır (Öncül, 2007).

Beta-laktam antibiyotiklerin ortak özellikleri, kimyasal yapılarında beta-laktam halkası bulundurmalarıdır. Beta laktam halkasına bağlanan yan zincire göre beta laktam antibiyotiğin çeşitliliği sağlanmaktadır (Katzung, 1998).

Tüm beta-laktam antibiyotikler, bakterilerin sitoplazmik membranı üzerinde bulunan ve bakteri hücre duvarında peptidoglikan (müreïn) sentezinden sorumlu olan, aynı zamanda PBP adı verilen proteinlere bağlanarak etkilerini göstermektedirler. Antibiyotik, bu moleküle bağlandıktan sonra PBP transpeptidaz aktivitesini bloke ederek bakterinin hücre duvar sentezini inhibe etmektedir ve bakteri osmotik şartlar altında yapısı ve bütünlüğünü sağlayamadığı için parçalanarak ölmektedir (Gerard, 2003).

Peptidoglikan zinciri N-asetil muramik asit (NAMA) ve N-asetil glikozamin (NAGA) yapılarından oluşmaktadır. Bu yapılar tetrapeptid bağlarla çapraz bağlanarak kafes yapısını oluşturmaktadır. Bu bağlanma N-asetil muramik asitin yapısında yer alan D-alanin moleküllerinin transpeptidasyon reaksiyonu sonucunda gerçekleşmektedir (Bayram, 2013).

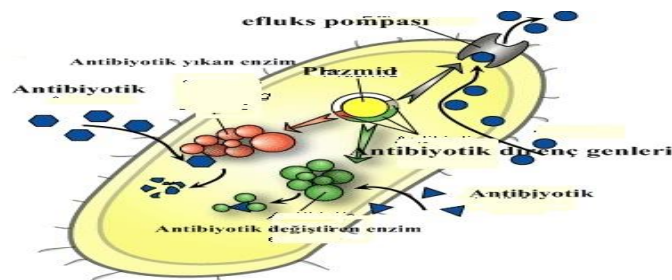
Beta-laktam antibiyotikler bakterisidal etki göstermektedir ve bu etki çok yavaş olduğu için öldürme gücü, verilen dozdan ziyade süreye bağımlı olarak gerçekleşmektedir. Üreme dönemindeki bakterilerde etkinlikleri daha fazladır ve minimum inhibisyon konsantrasyon (MİK) değerleri dört katına ulaştığında maksimum etkileri görülebilmektedir (Cengiz, 2004).



**Resim 2.5.** Beta laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları (Tärnberg, 2012).

### 2.5.1. Bakterilerde $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları

$\beta$ -laktam antibiyotiklerine karşı mikroorganizmalarda görülen direnç farklı şekillerde görülmektedir.  $\beta$ -laktam antibiyotiği konsantrasyonunun hücre içinde azalması, antibiyotik girişinin kısıtlanması (porin kaybı) ya da dışarı atılması (efluks mekanizması) ile gerçekleşmektedir. Penisilinlerin değişken afiniteye sahip olarak bağlandığı görülmektedir. Bu durumun bakterilerin peptidoglikan sentezinin son aşamasında görev alan PBP’de meydana gelebilecek mutasyonlardan kaynaklandığı bilinmektedir.  $\beta$ -laktam antibiyotiğin parçalanmasını sağlayacak  $\beta$ -laktamazların üretimi ile beta laktam antibiyotiklere karşı farklı dirençler oluşmaktadır (Livermore, 1995; Poole, 2004).



**Resim 2.6.** Bakterilerde  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları (<http://textbookofbacteriology.net>).

### 2.5.2. Beta laktam enzimleri

Genellikle penisilinler, sefalosporinler ve benzeri antibiyotikleri yıkıma uğratan,  $\beta$ -laktam halkasında bulunan karbonil grubu ile ester köprüsü kurarak siklik amid bağı denatüre eden enzimlerdir (Forbes ve ark., 2002). Dolayısıyla  $\beta$ -laktamazlar,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir ve gram pozitif-negatif bakterilerin çoğu tarafından salgılanmaktadır. Aynı zamanda kromozom, plazmid veya transpozonlar üzerindeki genler tarafından sentezlenebilmektedir (Hall ve ark., 1993). Plazmidde bulunan genetik bilgiler sağlık açısından büyük tehdit oluşturmaktadır. Çünkü plazmidler, direnç genlerinin farklı gen aktarım mekanizmalarıyla mikroorganizmalar arasında kolayca transforme olmalarını sağlayarak,  $\beta$ -laktamazlara bağlı dirençin patojen suşlar arasında kolay yayılmasına sebep olmaktadır (Bush, 1995; Sturenburg, 2003). Enzimlerin substrat ve inhibitör profilleri gibi çeşitli fonksiyonel özellikleri dikkate alınarak yapılan Bush-Jacoby-Mederios sınıflaması dört ana grup ile çeşitli alt gruplardan oluşmaktadır.

#### **A-sınıfı $\beta$ -laktamazlar**

Aktif bölgelerinde bir serin molekülü bulunan, birçoğu klavulanik asit ile yıkıma uğrayan ve plazmid gibi hareketli genetik kasetlerle kodlanan enzimlerdir (Rice ve ark., 2003). Enterobacteriaceae üyelerinde sıklıkla karşımıza çıkan A sınıfı betalaktamazlar, *TEM-1* ile *SHV-1*'dir. Bu enzimler, temel olarak penisilinaz aktivitesine sahiptirler. Sefalosporinlere karşı etkinlikleri çok azdır ve GSBL'lerin kökenleridir. *TEM* ve *SHV*'den köken almayan birçok A sınıfı beta-laktamaz da bilinmektedir. Bunlardan en önemlileri *CTX-M* ve *PER* grubu (*PER-1* ve *PER-2*) enzimlerdir. Birçok *TEM* ve *SHV* türevi GSBL'nin aksine *CTX-M* grubu, sefotaksim ve seftriaksonu, seftazidimden daha iyi hidrolize eder ve ayrıca tazobaktam varlığında klavulanik asit ile olduğundan daha kolay yıkıma uğramaktadır (Bradford, 2001).

### **B sınıfı $\beta$ -laktamazlar**

Aktif bölgelerinde “serin” bulunan sınıf B sınıfı beta-laktamazlar metallo enzimler olarak bilinmektedir. Aktiviteleri için çinko veya diğer ağır metal iyonlarına gereksinim duymaktadır. Birkaç istisna hariç tüm B sınıfı beta-laktamazlar, sefamisinler ve karbapenemler dahil birçok sefalosporine direnç geliştirmektedirler. Klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi inhibitörlerden etkilenmemektedirler (Pitout ve ark., 2005).

### **C sınıfı $\beta$ -laktamazlar**

C sınıfı beta-laktamazlar, kromozomal ampC geni tarafından kodlanması nedeniyle AmpC tipi enzimler olarak da adlandırılırlar. *Salmonella spp.* haricinde tüm gram-negatif basillerde bulunmaktadır (Gülay, 2004). C sınıfı beta-laktamazlar, geniş spektrumlu sefalosporinler de dahil olmak üzere tüm sefalosporinleri, penisilinlere oranla daha iyi hidroliz ederler ancak birçok C sınıfı enzim, beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmemektedir (Rice ve ark., 2003).

### **D sınıfı $\beta$ -laktamazlar**

D sınıfı beta-laktamazlar, serin proteazlar olup oksasilini hızla hidrolize ederler. Oksasilini hidrolize edebilen (*OXA*) beta-laktamazlara daha çok Enterobacteriaceae üyelerinde ve *P. aeruginosa*'da rastlanmaktadır. *OXA* enzimleri penisilinlere, kloksasiline, oksasiline ve metisiline karşı direnç oluşturur ve klavulanik asit ile çok az inhibasyona uğramaktadır. Plazmid veya integron gibi hareketli kasetler üzerinde bulunmaları bakteriler arasında aktarıma sebep olmaktadır (Rice ve ark., 2003).

## 2.6. Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz Türleri

Geniş spektrumlu beta laktamazlar, mikrobiyolojik olarak oksiiimino sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimlerdir (Akova, 2004; Paterson ve ark., 2005).

GSBL'ler sınıf A'da yer alan grup 2be, grup 2e ve sınıf D (grup 2d)  $\beta$ -laktamazlardan oluşmaktadır. Bazı enzimler (MIR-1, CMY-1, FOX-1 ve LAT-1 gibi) metoksisefalosprinleri (sefoksitin ve sefotetan) ve oksiiimino- $\beta$ -laktamları değişime uğratabilmektedir (Jacoby, 1994).

GSBL üreten bazı *K. pneumoniae* suşları, sefoksitin ve sefotetana karşı etki mekanizmaları gelişimi göstermektedir (Martinez-Martinez ve ark., 1996). Buna ek olarak, klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri ile inhibasyona uğramaktadırlar. GSBL üretebilme yeteneğindeki tüm mikroorganizmalar GSBL pozitif karakter olarak değerlendirilmektedir. GSBL üretiminden sorumlu olan genler organizmalarda farklı yerleşim alanlarına sahiptirler. Bu genler kromozom, plazmid veya genomun taşınabilir kısımlarını içeren integron veya transpozonlar üzerine yerleşmektedirler (Al-Jasser, 2006). GSBL'ler Enterobacteriaceae'nin birçok üyesinde (*Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens* ve *Shigella dysenteriae*) ayrıca *P. aeruginosa* ve *Acinetobacter baumannii*'de bulunmaktadır. Ancak *Klebsiella pneumoniae* ve *E. coli* bakterilerinde daha fazla üretim elde edildiği bildirilmiştir (Agrawal ve ark., 2008).

GSBL üreten mikroorganizmalar başlarda nozokomiyal hastane infeksiyonlarından izole edilirken günümüzde toplum kaynaklı da üretimi yapılabilmektedir (Pitout ve ark., 2008). Dar spektrumlu  $\beta$  laktamazlardan köken alan ve bir-iki amino asit değişimi nedeniyle geniş spektrumlu beta laktam ajanlarını inaktive edebilen türler de GSBL olarak tanımlanabilmektedir (Philippon ve ark., 1994). Enzimin yapısında ki bu değişiklik, enzim-substrat uyumunun sağlandığı aktif bölgede yeni bir model oluşumuna yol açarak geniş spektrumlu sefalosporinlerin ve aztreonamın da bu enzimlerin etki spektrumuna girmesine neden olmaktadır (Akova, 2004). Günümüzde  $\beta$ -laktamazların amino asit değişimi esas alındığında çok fazla tipi (170 adet *TEM* ve 130 adet *SHV* gibi) ile karşılaşılmaktadır (<http://www.lahey.org/Studies>).

GSBL çeşitliğine neden olan amino asit değişimlerine rağmen topolojilerinin aynı olması nedeniyle ortak özellikleri de bulunmaktadır (Perez ve ark., 2007). GSBL sentezleyen bakterilerin hızlı bir şekilde yayılması son yıllarda ciddi sağlık problemleri oluşturmaktadır. Hasta tedavisinde kullanılan yeni sınıf ilaçlar da kendisine dirençli yeni beta-laktamazların ortaya çıkmasına neden olmuştur (Bradford, 2001). Uzun süre hastanede yatış, yoğun bakım ünitesinde bulunma, idrar, venöz vb. kateter uygulamaları gibi çeşitli girişimler GSBL üreten kökenlerde enfeksiyon riskini artırmaktadır. Tedavi için geniş spektrumlu beta laktam antibiyotikleri kullanılmaktadır ve büyük çoğunluğu çoklu ilaç direncine sahip olduklarından tedavi sürecinde zorluklarla karşılaşılmaktadır (Paterson ve ark., 2005).

### **2.6.1. CTX-M**

İlk *CTX-M* beta laktamaz 1989 yılında Almanya'da *E.coli*'de bildirilmiş, o tarihten bugüne kadar *Salmonella spp.* başta olmak üzere birçok Enterobacteriaceae türünde saptanmıştır. 1995 yılından itibaren *CTX-M* varlığı büyük bir artış göstermiştir (Bradford, 2001; Akova, 2004). GSBL üreten, *CTX-M* olarak adlandırılan substrat olarak sefotaksimi tercih eden sefotaksim tedavisine direnen *E. coli* suşları rapor edilmişlerdir (Bauernfeind ve ark., 1990).



*CTX-M* ailesi diğer GSBL'lerden farklı olarak komplike ve heterojen bir enzim grubudur. *CTX-M* ilk aminoasit dizi analizlerinin yapımı sonucunda beş gruba ayrılmıştır. Daha sonradan yapılan araştırmalar sonucunda bu ailedeki gruplara yenileri eklenmiştir (Mugnaioli ve ark., 2006)

*CTX-M*'lerin plazmid aracılı beta laktamazlardaki mutasyonlar sonucu oluştuğu düşünülürken yapılan son filogenetik analizler sonucunda *Kluyvera spp.*'deki kromozomal *bla* genlerinin alınması sonucu ortaya çıktığı öne sürülmektedir (Canton ve ark., 2012). *Kluyvera ascorbata* türünde *CTX-M-1* ve *CTX-M-2*, *Kluyvera georgiana* türünde ise *CTX-M-8* ve *CTX-M-9* gruplarına rastlanılmıştır. Araştırmacılar *CTX-M-25* ve *CTX-M-45* sub gruplarındaki beta laktamazın kaynağına henüz ulaşamamış olsalar da bu gruptaki enzimlerin *Kluyvera* cinsindeki başka türler olabileceğini düşünmektedirler (URL, 2007).

Günümüzde *CTX-M* ailesinde 40 enzim bulunmaktadır. *CTX-M-14*, *CTX-M-3*, *CTX-M-2* bu grupta en yaygın olan enzimlerdir. Bu enzimler hem insanlardan hem de sağlıklı hayvanlardan izole edilmişlerdir. Yayılmaları hem plazmid hem de hareketli genetik elementlere bağlıdır. *CTX-M* enzimleri çoğunlukla hastane enfeksiyonlarından izole edilen mikroorganizmalarda bulunmaktadır, ancak *SHV* ve *TEM* enzimlerinden farklı olarak *Vibrio cholerae*, tifo dışı *Salmonella* ve *Shigella spp.* gibi toplumdaki enfeksiyonlara da etki ettikleri bilinmektedir (Akova, 2004; Bradford, 2001).

*CTX-M* grubu beta laktamazlar 1989 yılında keşfedilmelerine rağmen 2000'li yıllara kadar bu enzimlerin yayılımına rastlanılmamıştır. Geçen bu süre zarfında enzimlerin sadece hastane kaynaklı suşlarda olduğu düşüncesi çürütülmüş ve toplum kaynaklı suşlarda da rastlanabildiği kanıtlanmıştır (URL, 2007). Özellikle belirli *CTX-M* genotiplerinin coğrafik bölgelerle ilişkili olduğu bildirilmiştir. *CTX-M-15* Hindistan'da bulunan tek genotip olmasına rağmen tüm dünyada hızlı bir şekilde yayıldığı gözlenmektedir. Hızlı yayılım göstermelerinin su veya gıdalar gibi çevresel etmenlerin yanı sıra ülkeler arasındaki seyahatlerin de neden olduğu yapılan çalışmalar ile desteklenmiştir (Stürenburg ve ark., 2003).

### 2.6.2. SHV

*SHV* tipi GSBL'ler Enterobacteraceae'de yaygın olarak belirlenmiştir (Morris ve ark., 2003). Bunlar *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella ozaenae*, *Acinetobacter spp.*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter diversus*, *Morganella morganii*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marcescens* ve *Burkholderia cepacia* bakterilerinde bulunabilmektedir ( Vakulenko, 2003; Willke, 2008).

*SHV* grubu enzimlerin öncüsü olan *SHV-1* enzimi en sık *K. pneumoniae*'da bulunmaktadır. Bu türde plazmid kökenli ampisilin direncinin %20 olduğu kanıtlanmıştır. *K. pneumoniae* dışında *Citrobacter diversus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa*'da da bu enzimlere sıklıkla rastlanmıştır. *SHV* türü enzimlerin geniş spektrumlu ilk türeği 1983 yılında bulunmuş ve *SHV-2* olarak tanımlanmıştır (Gür, 2004).

*TEM* ve *CTX-M* tipi beta laktamazların aksine, *SHV-1* tipinin daha az türeği vardır. GSBL fenotipindeki *SHV* varyantlarının birçoğu, 238'inci pozisyondaki glisin yerine serin amino asidi girmesiyle karakterizedir. *SHV-5* ile bağıntılı bazı türevlerde ise 240. pozisyondaki glutamat yerine lizin amino asidinin geçişi ile karakterize olmuştur. 238. pozisyondaki serin, seftazidim yıkımı, 240. pozisyondaki lizin ise sefotaksim yıkımı için önem arz etmektedir. *SHV-10* varyantı inhibitöre dirençli yapı göstermesi nedeniyle tüm araştırmalarda sıklıkla rastlanmaktadır (Bahçeci, 2002). *SHV* tipi enzim dünya çapında 50'den fazla tanımlanmıştır (Jasser-Al, 2006). Son yıllarda *SHV-2*'den *SHV-26*'ya kadar isimlendirilen *SHV* tipi GSBL enzimlere rastlanılmıştır (Randegger ve ark.,2001).

### 2.6.3. TEM

TEM tipi GSBL'ler, TEM-1 ve TEM-2'den köken almaktadırlar. TEM enziminde oluşan aminoasit değişimleri sonucunda GSBL'lerin fenotiplerinde birçok değişiklikler olmaktadır. Örneğin belirli oksimino-sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri ile izoelektrik noktaları değişime uğrayabilmektedir (Sturenburg ve ark., 2003). Bu değişimler, enzimin oksimino-beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesine sebep olurlar. Enzimin 104, 164, 238 ve 240'ncü pozisyonunda bulunan bir aminoasidin GSBL fenotipini belirlediği ortaya çıkarılmıştır. Bununla birlikte enzimin geniş spektrumlu antibiyotik etkinliği için birden fazla aminoasidin yapısal olarak değişime uğraması gerekmektedir. Farklı kombinasyonları ele aldığımızda günümüzde sayıları her geçen gün artmakta olan TEM enzim türleriyle karşılaşmaktadır. TEM-10, TEM-12 ve TEM-26 ABD'de bilinen en yaygın GSBL türleri arasındadır (Dean ve ark.,1988).

Ampisiline direnç gösteren *E.coli*'lerin %90'unda dirençten bu enzim sorumludur. Ayrıca *H. influenzae* ve *N. gonorrhoeae*'de gittikçe artış gösteren ampisilin ve penisilin direncinden de sorumludur. TEM grubu beta laktamazlar, *E. coli* ve *K. pneumoniae* başta olmak üzere *E. aerogenes*, *M. morgani*, *P. mirabilis*, *P. rettgeri* ve *Salmonella spp.* gibi Enterobacteriaceae üyelerinde sıkça rastlanmaktadır (Bradford, 2001; Akova, 2004). Ayrıca Enterobacteriaceae ailesi içinde bulunmayan diğer gram negatifler de TEM tipi beta laktamazlar arasında gösterilmiştir ve bunlardan TEM-42 *P. aeruginosa*'da bulunmuştur (Ensari, 2002).

TEM-1 ilk olarak 1965 yılında Atina'da Temoneira adındaki bir hastanın *E. coli* izolatından keşfedilmiştir (Chaudhary ve ark., 2004). TEM-1 gram negatif bakterilerde sık bulunmaktadır (Marchandin ve ark., 1999). TEM-1'den ilk köken alan enzim TEM-2, orjinal beta laktamazdan tek bir aminoasit yerleşimi ile farklı olarak sınıflandırılırlar. Tek bir aminoasit değişimi izoelektrik noktanın 5,4'ten 5,6'ya kaymasına yol açar fakat substrat profilinde herhangi bir etkisi görülmemiştir. TEM-1 ile benzer yapılar bulunduran TEM-2 enzimleri dar spektrumlu enzimlerdir. Penisilin ve birinci kuşak sefalosporinleri hidrolize edebilir ancak oksimino-sefalosporinlere karşı aktivite gösteremezler (Bush, 1995; Sturenburg, 2003).

GSBL fenotipi gösteren bir diğer *TEM* türevidir ise 1987 yılında bulunan *TEM-3*'tür ve günümüze kadar 90 dolaylarında *TEM* türevidir tanımlanmıştır. Bu beta laktamazlardan bazıları "inhibitöre dirençli" enzimler olup çoğunluğu GSBL karakterindedir. *TEM 3* tipi beta laktamazlar, sıklıkla *E. coli* ve *K. pneumoniae*'de bulunmakla birlikte diğer gram negatif bakteri türlerinde de rastlanılmıştır. Fransa'da 1984 yılında *K. pneumoniae* izolatlarının sefotaksime karşı artan aktivitesi nedeniyle *CTX-1* olarak isimlendirilen plazmid kaynaklı yeni bir beta-laktamaz taşıdığı bulunmuştur ve bu enzim *TEM-3* olarak adlandırılmaktadır. İki aminoasidin yer değiştirmesiyle *TEM-2*'den yapısal olarak farklılık göstermektedir. *TEM* tipi beta-laktamazların sayısı günümüzde yüzden fazla olarak bilinmekte ve bunların birçoğu da GSBL pozitif karakterindedir (Jasser-Al, 2006).

**Tablo 2.1.** Biyokimyasal direnç mekanizmaları (Rice ve ark.,2003; Wright ve ark., 2005; Chen ve ark., 2011).

Antibiyotik Sınıfı	Direnç Tipi	Direnç Mekanizmaları	Örnekler
Aminoglikanlar	Azalma  Enzimatik modifikasyonlar (AME'ler)	Dış zar geçirgenliğindeki değişiklikler  Fosfotransferaz  Adeniltransferaz  Asetiltransferaz  Çift fonksiyonlu enzim	<i>P. aeruginosa</i>  Enterik (-) bakteriler  Enterik (-) bakteriler  Enterik (-) bakteriler  <i>S. aureus, E. faecium, E. faecalis</i>
$\beta$ - laktamlar	Değiştirilmiş PBP'ler Enzimatik değişimler	Ek PBP  PBP2x, PBP2b, PBP1a, PBP5 (nokta mutasyonu)  Ambler sınıfı A           Ambler sınıfı B       Ambler sınıfı C      Ambler sınıfı D	<i>S. aureus</i> 'taki mecA ve koagülaz (-) stafillokok <i>S. pneumoniae</i>  <i>E. faecium</i> Tem-1, <i>E. coli</i> , <i>H. influenzae</i> ve <i>N. gonorrhoeae</i>  <i>K. pneumoniae</i> 'de SHV-1 <i>K. oksitoca</i> 'da K-1 (OXY-1)  Genişlemiş spektrumlu $\beta$ - laktamazlar (TEM-3+, SHV-2+ ve CTX-M türleri) <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i>  <i>M. catarrhalis</i> 'de BRO-1  <i>S. aureus</i> 'taki PC1  <i>P. aeruginosa</i> PSE-1 <i>C. koseri</i> ve <i>P. vulgaris</i> 'in $\beta$ -laktamazları  <i>S. maltophilia</i>     <i>B. fragilis</i> Ccr-A <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> 'de Amp C     <i>S. marcescens</i> , <i>M. morgani</i> <i>P. stuartii</i> ve <i>P. rettgeri</i>    <i>E. coli</i> OXA-1
Kloromfenikol	Efluks	CAT  Yeni membran taşıyıcıları	<i>S. pneumoniae</i> 'da CAT, cmlA ve flo kodlanmış efüzler <i>E.coli</i> ve <i>Salmonella spp.</i>

Glikopeptitler	Değişik hedef	Kompleks gen kümesi tarafından kodlanmış peptidoglikan çapraz bağ hedefi (D-Ala ile D-Ala-D-Lac veya D-Ala, D-Ser) değiştirildi.	<i>E. faecium</i> ve <i>E. faecalis</i> 'teki Van A ve Van B gen kümeleri
Fosfomisin	Enzimatik degradasyon	Thioltransferaz	Negatif bakterilerde FosA ve <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Staphylococci</i> ve <i>B. subtilis</i> 'deki FosB
Fusidik Asit	Değişik hedef  Azalan kullanılabilirlik	Aktif bölgeye bağlanmanın azalmasına neden olan mutasyon  Kloromfenikol asetiltransferaz	<i>S. aureus</i> 'taki FusA'da mutasyon  <i>S. aureus</i> 'taki FusB'de mutasyon
Makrolitler	Eflüks	Mef tipi pompa	<i>S. pneumoniae</i> ve <i>S. pyogenes</i> 'de mefkodlu efüzler
Kinolonlar	Değişik hedef  Eflüks	Aktif bölgeye bağlanmanın azalmasına neden olan mutasyonlar  Yeni membran taşıyıcıları	Enteral gram (-) bakterilerde <i>gyrA</i> mutasyonları ve <i>S. aureus</i> <i>gyrA</i> ve <i>parC</i> 'deki mutasyonlar  <i>S. pneumoniae</i> , <i>S. aureus</i> 'taki <i>NorA</i>
Tetrasiklinler	Eflüks  Değişik hedef	Yeni membran taşıyıcıları  Ribozoma bağlanan ve aktif bölgenin konformasyonunu değiştiren proteinlerin üretimi	Gram (-) ve Gram (+) bakterilerdeki etkin proteinleri kodlayan tet genleri  Çeşitli gram (+) ve gram (-) gruplarda tet (M) ve tet (O) canlı bakteri türleri

## 2.7. Bakterilerin Tanımlanmasında Kullanılan Bazı Moleküler Yöntemler

Bakteriler fenotipik ve genotipik olarak iki temel kategoride değerlendirilmektedir. Fenotipleme yöntemi; serotip, bakteriyosin, bakteriyofaj tiplene ve antibiyotik dirençliliğini içermektedir. Genotipleme yöntemi ise; protein profilleri, plazmid ve kromozomal DNA'ya dayalı analizlere dayanmaktadır. DNA dizi analizi, nükleik asit parmak izi identifikasyonu yapılan suşlarda uygulanabilmektedir. Fenotipik yöntemler için harcanan zamanın uzun olması, elde edilen sonuçların tutarsız oluşu ve diğer fenotipik dezavantajlar nedeniyle fenotipik yöntemlerin standard olmasına engel oluşturmaktadır (Avşar, 2013). Moleküler yöntemler; tekrar edilebilir olması, kolay uygulanabilmesi, güvenilir yüksek ayırım gücünün olması gibi nedenlerden dolayı günümüzde sıklıkla tercih edilmektedir (Kıran ve ark., 2011). Bu moleküler yöntemler arasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) öncelikli olarak kullanılan analiz yöntemidir.

### 2.7.1. Polimeraz zincir reaksiyonu

Saiki ve arkadaşları tarafından 1985 yılında bir anemi geninde Polimeraz Zincir Reaksiyonu keşfedilmiştir. PZR, DNA'nın belli bir kısmının *in vitro* yöntemlerle hızlı ve çok sayıda çoğaltılmasına olanak sağlayan bir tekniktir (Erol, 1998). Bu teknik, moleküler klonlama, DNA'nın *in vitro* mutagenesi, parmak izi, mikroorganizmaların saptanması, genetik hastalıkların teşhisi ve değişik hayvanlara ait proteinlerin saptanması ile DNA analizlerinde kullanılmaktadır (Jones ve ark., 1993).

PZR tekniği, selektif sıvı ve katı besiyerlerine ekim ile biyokimyasal ve serolojik testleri gerektirmeksizin, primerler aracılığı ile hedef DNA'nın amplifikasyonu yapılarak gıdalardan patojenlerin büyük bir çoğunluğunun tespit edilmesinde kullanılmaktadır. PZR tekniği ile DNA amplifikasyonunun prensibi, çift sarmallı kalıp DNA'nın ısı ile denatürasyonu, tek sarmallı DNA'lara primerlerin bağlanması ve polimeraz enzimi yardımıyla primer uzatılması aşamalarından oluşmakta ve bu üç aşama bir döngüyü oluşturmaktadır (Ergin, 1998).

Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz ürettiğinden şüphelenilen suşlarda PZR reaksiyonları kullanılarak GSBL gen varlığı araştırılmaktadır. Fenotipik yöntemlere göre özgüllüğü daha yüksektir. Aynı zamanda bu yöntem ile üretilen enzimin genotipi de belirlenmektedir. Bu teknik diğer yöntemlere göre birçok bakımdan üstünlük sağlamasının yanı sıra, yüksek maliyeti ve nitelikli eleman gerektirmesi, hatalara karşı aşırı hassasiyeti nedeniyle rutin uygulamalarda sık kullanılmamaktadır (Randegger ve ark., 2001).

PZR; kalıp DNA, primer, polimeraz enzimleri ve deoksinükleotit-trifosfat (dNTP) bileşenlerinden oluşmaktadır.

**Kalıp DNA:** Başlangıçta çoğaltılacak olan baz dizisine sahip genetik materyaldir. Bu amaç için DNA yerine RNA kullanılacaksa reaksiyondan önce ters transkriptaz enzimi kullanılarak RNA, komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülmelidir. Bu cDNA daha sonra PZR için kalıp DNA olarak kullanılmaktadır (Arda, 1995; Miwa vd. 1997; Rodriguez 1997).

**Primerler:** 4-10 işaretlenmiş nükleotitten meydana gelen, DNA'yı çoğaltmak için kullanılan kısa ve tek sarmallı DNA molekülleridir. Bunlar hedef DNA'ya özgü oldukları için ortamdaki başka DNA'lar ile çapraz reaksiyona girmezler (Persing, 1991; Wolcott, 1992; Arda, 1995).

**Polimeraz enzimleri:** *Thermus aquaticus*'tan elde edilmiştir. Sıcaklığa direnç gösteren DNA polimeraz enzimleri, en yaygın kullanılan polimeraz enzimidir. Bu enzimin diğer enzimlerden daha fazla tercih edilmesinin nedeni, her denatürasyon döngüsünde ortama yeni enzim eklenilmemesidir. Bununla beraber primerlerin bağlanması, yüksek sıcaklıkta daha özgül olmaktadır (Persing, 1991; Wolcott, 1992; Arda 1995).

**Deoksinükleotit-trifosfat:** Yeni DNA sarmalının tamamlanmasında kullanılan; dATP, dTTP, dGTP ve dCTP olarak bilinen dört tip dNTP'nin nötralize edilmiş ve molaritesi belirlenmiş setlerinden oluşmaktadır.



DNA'nın PZR ile çoğaltılması; zaman, sıcaklık ve döngü sayısı düzenlenerek üç aşamada gerçekleştirilmektedir.

**Denatürasyon:** Çift iplikli kalıp DNA ile denatüre edilmektedir.

**Bağlanma:** Tek iplikli hale gelen DNA dizilimlerinden her birinin, 3' uçlarındaki nükleotitlere optimum sıcaklıkta primer bağlanmaktadır.

**Uzama:** Yüksek sıcaklığa dayanabilen polimeraz enzimi, primerler ve kalıp DNA'yı kullanarak yapay ortamda çift iplikli DNA sentezlenmektedir (Türkyılmaz ve ark., 2002).

### **Polimeraz zincir reaksiyonu-restriksiyon fragment uzunluk polimorfizmi (PZRRFLP)**

*TEM* beta-laktamaz geninin moleküler karakterizasyonuna diğer bir yaklaşım PZR'ye restriksiyon parça uzunluk polimorfizminin kullanılmasıdır. Bu denemede, çoğaltılan PZR ürünleri çeşitli restriksiyon endonükleazlar ile kesilmekte ve elektroforezle parçaların sayısı ve büyüklüğüne göre ayrımı yapılmaktadır. Her bir restriksiyon enzimi ile oluşan parçaların büyüklükleri *blaTEM* yapısal genindeki nokta mutasyonlarının varlığını bildirmektedir. *SHV* türevlerinin belirlenmesi ve tanımlanması birçok yöntem kullanılabilmeyle beraber, bu yöntemlerin en kolayı ise PZR-RFLP yöntemidir (Shah ve ark., 2014).

### **Polimeraz zincir reaksiyonu-tek iplikli konformasyonel polimorfizm (PZR-SSCP)**

*SHV* tip beta laktamazları tanımlayabilmek için tercih edilen bir başka yöntem PZR-SSCP analizidir (Bradford,2001; Chaudhary, 2004). PZR-SSCP, ilk kez Orita ve arkadaşları tarafından (1989) insan genlerindeki mutasyonları belirlemek amacıyla bu genlerin karakterize edilmesinde kullanılmıştır. PZR-SSCP'ın temel prensibi; tek iplikli DNA'nın kısa dizilerinde tek nükleotit mutasyonlarını tespit etme amacına dayanmaktadır (Paterson, 2006).

### 3. MATERYAL ve METOD

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Araç ve gereçler

**Hassas terazi:** Kimyasal maddelerin tartımında UW1020H, Shimadzu marka cihaz kullanılmıştır.

**Vorteks (Mekanik karıştırıcı):** PZR işlemleri sırasında örneklerin ve PZR komponentlerinin karıştırılması için Vortex 4, IKA marka cihaz kullanılmıştır.

**Santrifüj:** Örneklerin santrifüj edilmesi ve PZR işlemleri sırasında santrifüj işleminin gerekli olduğu durumlarda çözelti ve karışımların çöktürülmesi için Z216 MK, Hermle marka cihaz kullanılmıştır.

**İnkübatör:** Ekimi yapılan besiyerlerinin inkübasyonu için Thermo Scientific marka cihaz kullanılmıştır.

**Otoklav:** Besiyerlerinin ve solüsyonların sterilizasyonu için Hiclave Hv-110L, Hirayama marka cihaz kullanılmıştır.

**Biyogüvenlik (sınıf II) kabin:** DNA ekstraksiyonu ve PZR'nin steril bir ortamda gerçekleştirilebilmesi için UVP marka cihaz güvenlik kabini olarak kullanılmıştır.

**Mikrodalga fırın:** Elektrofrezde kullanılan agarozun, solvent içerisinde çözülmesinde Vestel marka cihaz kullanılmıştır.

**Derin dondurucu:** DNA ekstraksiyonu ve PZR sonucu elde edilen ürünlerin saklanması için -20°C derin dondurucu Vestel, -80°C derin dondurucu Forma 8800 Series, Thermo Scientific marka cihaz kullanılmıştır.

**Thermal cycler:** PZR işlemlerinin yapılmasında gradiyent programlı Techne Prime marka cihaz kullanılmıştır.

**Elektrofrez tankı ve güç kaynağı:** Agaroz jel elektrofrez işlemlerini gerçekleştirmek amacıyla EC1000XL, Thermo marka güç kaynağı ve OWL Easycast B1, Thermo marka elektrofrez tankı cihazları kullanılmıştır.

**Jel görüntüleme ve analiz sistemi:** UV translüminatörlü bilgisayarlı jel dokümantasyon sistemi, elde edilen jeldeki bantların görüntülenmesinde Fusion FX, Vilber Lourmat marka cihaz kullanılmıştır.

**Otomatik pipetler:** Tek kanallı 0,5-10 µl, 2-20 µl, ve 100-1000 µl' lik eppendorf pipetler kullanılmıştır. Steril pipet ucu olarak, 10 µl, 100 µl ve 1000 µl'lik filtrelili Thermo Scientific marka plastik pipet uçları kullanılmıştır.

### **3.1.2. Besiyeri ve kimyasallar**

#### **Violet Red Galactose Bile Agar (VRGA) (Oxoid)**

Violet Red Galactose Bile: 34 g

Distile su: 1000 ml

pH: 7,0±0,2

Besiyeri 34 g/l olacak şekilde tartılıp 1 litre distile su içerisinde çözündürülmüştür. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu sağlandıktan sonra steril petri kutularına dökülmüş ve katı hale gelmesi beklenmiştir.

#### **Mueller-Hilton Agar (MHA) (Merck)**

Mueller-Hilton agar: 34 g

Distile su: 1000 ml

pH: 7,0±0,2

Besiyeri 34 g/l olacak şekilde tartılıp 1 litre distile su içerisinde çözündürülmüştür. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu sağlandıktan sonra steril petri kutularına dökülmüş ve katı hale gelmesi beklenmiştir.

**Tryptic Soy Agar (TSA) (Oxoid)**

Tryptic soy: 40 g

Distile su: 1000 ml

pH: 7,0±0,2

Besiyeri 40 g/l olacak şekilde tartılıp 1 litre distile su içerisinde çözündürülmüştür. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu sağlandıktan sonra steril petri kutularına dökülmüş ve katı hale gelmesi beklenmiştir.

**Nutrient Agar (Merck)**

Nutrient Agar: 20 g

Distile su: 1000 ml

pH: 7,0±0,2

Besiyeri 20 g/l olacak şekilde tartılıp 1 litre distile su içerisinde çözündürülmüştür. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu sağlandıktan sonra steril petri kutularına dökülmüş ve katı hale gelmesi beklenmiştir.

**Mac Conkey Agar (Merck)**

Mac Conkey: 50 g

Distile su: 1000 ml

pH: 7,0±0,2

Besiyeri 50 g/l olacak şekilde tartılıp 1 litre distile su içerisinde çözündürülmüştür. 121 °C'de 15 dakika sterilizasyonu sağlandıktan sonra steril petri kutularına dökülmüş ve katı hale gelmesi beklenmiştir.

**Tripton (İndol) Broth (Merck)**

Tripton: 3 g

Sodyum klorür: 0,3 g

Distile su: 1000 ml

pH: 7,0±0,2

Gerekli miktarlarda tartılıp 100 ml distile suda süspanse edilmiştir. Tüplere dağıtılma işleminden sonra otoklavda 121 °C’de 15 dakika strelizasyonu sağlanmıştır.

**MR-VP Broth (Oxoid)**

MR-VP: 17 g

Distile su: 1000 ml

pH: 7,0±0,2

Gerekli miktarlarda tartılıp 1 litre distile suda süspanse edilmiştir. Tüplere dağıtılma işleminden sonra otoklavda 121 °C’de 15 dakika strelizasyonu sağlanmıştır.

**Sitrat Agar (Oxoid)**

Sitrat Agar: 25 g

Distile su: 1000 ml

pH: 7,0±0,2

Gerekli miktarlarda tartımı yapıldıktan sonra 1 litre distile suda agar çözününceye kadar kaynatılmıştır. Ağzı kapaklı tüplere 2 ml dağıtıldıktan sonra otoklavda 121 °C’de 15 dakika strelizasyonu sağlanmıştır. Sterilazyon işlemi tamamlandıktan sonra tüpler yatık bir durumda konumlandırılmış ve besiyeri katılaştıktan sonra +4°C’de saklanmıştır.

**Brain Heart Infusion Agar (BHI) (Merck)**

Brain Heart: 52 g

Distile su: 1000 ml

pH: 7,0±0,2

Besiyeri 52,0 g/L olacak şekilde distile su içinde ısıtılarak çözündürülüp, otoklavda 121 °C'da 15 dakika sterilize edilmiş ve steril petri kutularına 12,5'er mL dökülmüştür.

**Besiyerlerinin kalite kontrolü**

Hazırlanmış olan tüm besiyerlerinin pH ölçümleri petrilere veya tüplere dökülmeden önce yapılmıştır. Besiyerleri bir gece etüvde bekletildikten sonra ekim için kullanıma hazırlanmıştır. Standart bakteri ekimi yapılarak besiyerlerinin kalite kontrolü yapılmıştır.

**Peptonlu su**

Ticari olarak elde edilen peptondan 1 g alınarak 1 litre distile su içerisinde çözülmüştür. İzolasyon basamağı için vidalı cam tüplere 9 ml aktarılmış ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika steril edilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

**Kovak kimyasalı**

Para-dimetilaminobenzaldehit: 5 g

n-Amil alkol: 75 ml

Konsantre HCl: 25 ml

5 g p-dimetilaminobenzaldehit, 75 ml amilalkolde çözündürülmüş ve üzerine 25 ml HCl ilave edilmiştir.

**Metil kırmızısı kimyasalı**

Metil red: 0,02 g

Etil alkol: 60 ml

Distile su: 40 ml

0,02 metil kırmızısı 60 ml alkolde çözüldürülmüş ve üzerine 40 ml distile su ilave edilmiştir.

**Voges Proskauer-I**

5 g naftol 100 ml'den az absolute alkolde çözüldürülmüş ve 100 ml'ye distile su ile tamamlanarak 5°C'de muhafaza edilmiştir.

**Voges Proskauer-II**

40 g KOH hızlı bir şekilde 100 ml'den az dH<sub>2</sub>O'da çözüldürülmüş ve soğuduktan sonra dH<sub>2</sub>O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. Hazırlandıktan 7-8 saat sonra kullanıma hazır hale gelmiştir.

**3.1.3. Çözeltiler****3.1.3.1. DNA izolasyonu için kullanılan çözeltiler****Tris HCl (1 M)**

80 ml distile su üzerine 15,7 gr Tris HCl eklenmiş ve çözüldükten sonra pH 8,0 olarak ayarlanmıştır. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda sterilizasyonu sağlanmıştır.

**EDTA (0,5 M)**

80 ml distile su üzerine 29,2 gr EDTA eklenmiş ve çözüldükten sonra pH 8,0 olarak ayarlanmıştır. Toplam hacim 100 ml'ye tamamlandıktan sonra otoklavda sterilizasyonu sağlanmıştır.

### **TE tamponu**

Son konsantrasyonları 10 mM Tris HCl ve 1 mM EDTA olacak şekilde Tris HCl (1 M) stok solüsyonundan 1ml, EDTA (0,5 M) stok solüsyonundan 200 µl alınarak 98,8 ml distile suya eklenmiştir.

### **3.1.3.2. Agaroz jel elektroforez için kullanılan çözeltiler**

#### **10X TBE (Tris-Borik asit-EDTA) tamponu pH:8,4 (Sigma)**

Trisma base	107,81 g
Borik asit	55,02 g
EDTA	7,444 g

Kimyasal maddelerin hepsi tartılıp bir şişeye koyulduktan sonra 1 litre distile su içinde çözülmüştür. İyice çözünen karışımın pH'sı 8,4'e ayarlanarak çözelti hazır hale getirilmiştir.

#### **1X TBE tamponu pH:8.4 (Sigma)**

10X TBE çözeltisinden 100 ml alınıp saf suyla 1 litreye tamamlanarak hazırlanmıştır. Agaroz jelin hazırlanmasında ve jele yüklenen PZR ampikonlarının yürütülmesinde kullanılmıştır.

#### **Etidyum bromür solüsyonu (Sigma)**

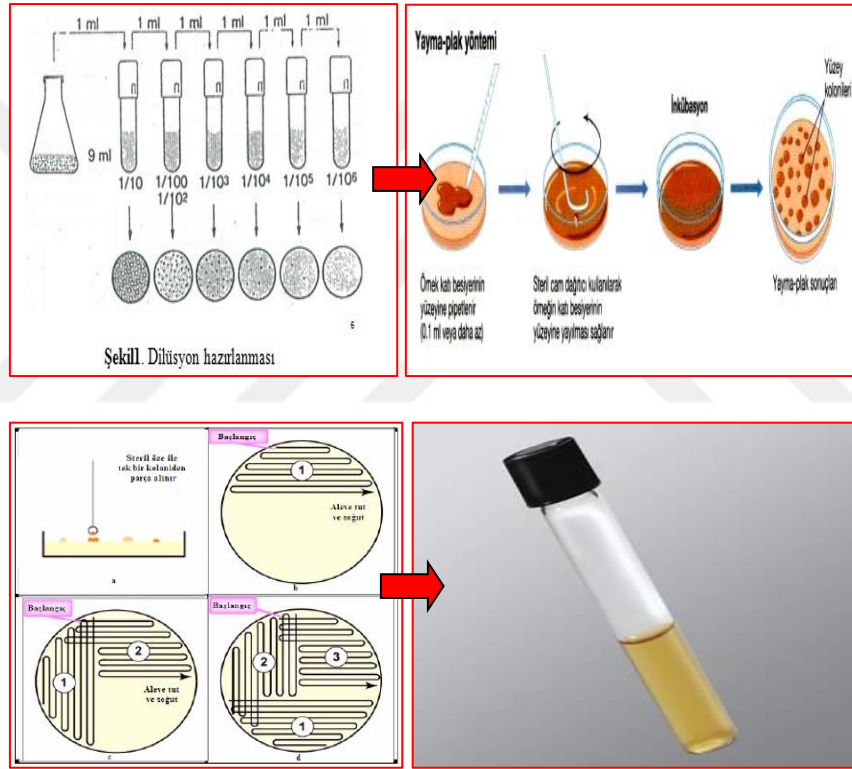
DNA'nın jelde görünür hale gelebilmesi etidyum bromürün DNA bağları arasına bağlanarak, 300-360 nm'de ışığı absorblaması sonucunda floresan etki göstermesiyle oluşmaktadır. Bu nedenle 200 ml distile su içerisine, 20 µl etidyum bromür (5 µg/ml) eklenerek %10'luk etidyum bromür çözeltisi hazırlanmış ve jel boyama işlemi için kullanılmıştır.



## 3.2. Metod

### 3.2.1. Örneklerin analize hazırlanması

Bu çalışmada, Amasya ilinde satışa sunulan hayvansal gıdalardan toplam 100 adet kıyma örneği kullanılmıştır. Kıyma örnekleri, aseptik koşullar altında +4°C'deki buzlukta korunarak, kısa süre içerisinde Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilmiştir. Aynı gün içerisinde Enterobacteriaceae familyası varlığı yönünden analiz edilmiştir.



**Resim 3.1.** Örneklerin analize hazırlanma aşamaları

### 3.2.2. Enterobacteriaceae identifikasyonu ve antibiyotik direnç belirlenmesi

FEF Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen kıyma örneklerinin her biri aseptik şartlarda homojenize edilmiş ve takiben 10'ar gr/ml steril polietilen poşetlerde tartılıp, 90'ar ml peptonlu su ilave edilerek stomaker-homojenizatörde 1-3 dakika boyunca homojenize edilmiştir. %0,1'lik peptonlu su ile desimal dilüsyonları yapılarak Violet Red Bile Galactose Agar yayma plak yöntemiyle (0,1 ml) ekimleri yapılmıştır. Plaklar 35°C'de 24-48 saat süreyle inkübasyona bırakılmış ve plaklarda üreyen şüpheli kolonilerden (koyu pembe 1-2 mm çapında safra asitlerinin koloni etrafında çökelti oluşturması ile presipitat zonu ile çevrili kırmızı koloniler) seçilerek Enterobacteriaceae grubu olarak belirlenmiştir. Bu koloniler önce Tryptone Soya Agar (TSA)'a çizme yöntemiyle geçilerek subkültüre elde edilmiştir. İzole edilen suşlar %20'lik gliserol içeren Brain Heart Infusion (BHI) broth içerisinde daha sonra yapılacak olan çalışmalar için -20°C'de ve -80°C'de dondurularak saklanmıştır. İzole edilen suşlara IMVIC testi uygulanmış ve aynı zamanda Genişlemiş Beta Laktamaz (GSBL) fenotipik olarak değerlendirilmesi için Seftazidim (CAZ), Seftriakson (CRO), Sefotaksim (CTX), Aztreonam (ATM) ve Klavulanik Asit/ Amoksisilin (AMC) antibiyotikleri kullanılmış ve sefalosporin grubu antibiyotiklerin zonunun amoksisilin asit diskine doğru genişlemesi fenotipik olarak Beta Laktamaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

Çift disk sinerji testi sonucunda beta laktamaz pozitif olan izolatlara Ampisilin (AM), Aztreonam (ATM), Kloramfenikol (C), Sefotaksim (CTX), Seftriakson (CRO), Tetrasiklin (TE), Imipenem (IMP), Gentamisin (CN), Streptomisin (S), ve Sulfametoksazol (RL) antibiyotikleri kullanılarak antibiyotik disk difüzyon testi yapılmış ve sonuçlar Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2014) kriterlerine göre değerlendirilmiştir.

### 3.2.2.1. İzolat teşhisi için kullanılan biyokimyasal testler

#### **İndol testi**

Bakterilerin ortamdaki triptofanı enzimatik olarak hidrolize uğratması sonucunda indol oluşmaktadır. Bakterilerin triptofan bulunan besiyerlerinde indol oluşturup oluşturmadığını ortaya koymak amacıyla indol testi uygulanmıştır. Bakteri kültüründen tüpteki Tryptone besiyerine ekim yapılarak 37°C’de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından tüpe 0,5 ml Kovak’s ayıracı eklenecek besiyerinin üst kısmında kırmızı renk oluşumu pozitif, sarı renk oluşumu ise negatif olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

#### **Metil kırmızısı testi**

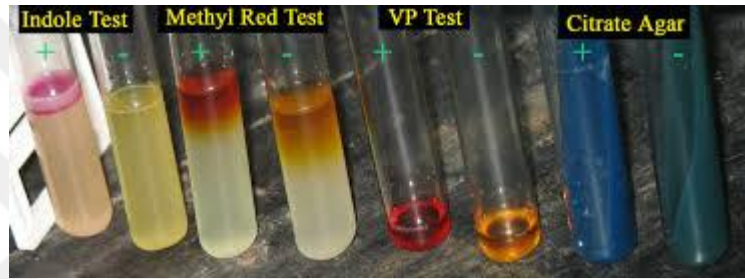
Metil kırmızısı testi, besi yerinde bakterilerin glukozu fermente ederek pH’ı 4,4’ün altına düşürecek olan asiti üretilip üretilmediği esasına dayanmaktadır. İçerisinde MR-VP broth olan tüplere test edilecek mikroorganizmanın aktif sarı kültüründen (18-24 saatlik) ekim yapılarak en az 48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda tüplere 5 damla Metil Kırmızısı ayıracı ilave edilmiştir. Besiyeri yüzeyindeki kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

#### **Voges-Proskauer testi**

VP testi ile bazı bakterilerin glikozdan asetil metil karbinol (aseton) meydana getirip getirmediği esasına dayanmaktadır. Aseton Potasyum Hidroksit (KOH) ilavesiyle diasetile oksitlenir ve  $\alpha$ -naftol ile birleşerek kırmızı renk verir. İçerisinde MR-VP broth olan tüplere incelenecek bakteri kültürünün aktif saf kültüründen (18-24 saatlik) ekim yapılarak 37°C’de 1-5 gün inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından tüplere 0,6 ml %5’ lik  $\alpha$ -naftol ve 0,2 ml %40’lık KOH eklendikten sonra tüpler iyice çalkalanarak 15-30 dk bekletilmiştir. Kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirilmeye alınmıştır.

### **Sitrat testi**

Bazı bakteriler karbon ve enerji kaynağı olarak sitratları (sodyum sitrat gibi) azot kaynağı olarak ise amonyum tuzlarını kullanabilirler. Bu test bakterinin karbon kaynağı olarak sitratı kullanıp kullanmadığını belirlemek amacıyla yapılmaktadır. İncelenen bakterinin taze saf kültüründen tüpte yatık olarak hazırlanan Simmon's Sitrat Agar besiyerine iğne öze yardımıyla ekimleri yapılmış ve 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakılmıştır. Besiyerinin renginin maviye dönüşmesi pozitif, besiyerinin renginin değişmemesi ise negatif olarak değerlendirilmeye alınmıştır.



**Resim 3.2.** IMVIC testi analizi sonuçları

#### **3.2.2.2. Antibiyotik dirençliliği için yapılan testler**

##### **GSBL saptanması**

Çalışmaya alınan suşların GSBL üretimi Çift Disk Sinerji yöntemi ile araştırılmıştır. Steril serum fizyolojik içerisinde Mc Farland 0,5 bulanıklıkta hazırlanan bakteri süspansiyonu, Mueller-Hinton Agar yüzeyine yayılmıştır. Ortada amoksisilin/klavulanik asit (AMC 20+10µg) diski ve çevresinde, aralarındaki uzaklık 25 mm olacak şekilde seftazidim (CAZ 30µg), sefotaksim (CTX 30µg) ve aztreonam (ATM 30µg) diskleri yerleştirilmiştir. Bir gece 35°C'de inkübasyondan sonra sefalosporin veya aztreonam etrafındaki inhibisyon zonunun amoksisilin-klavulanik asit diskine doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL (+) olarak değerlendirilmiştir.

### **Antibiyotik duyarlılık testleri**

Kültür plaklarında üremiş olan bakteri kolonilerinden steril bir eküvyon yardımıyla bir miktar alınarak steril serum fizyolojik içerisinde 0,5 Mc Farland bulanıklık sağlanacak şekilde süspanse edilmiştir. Bu süspanسیون yine steril pamuklu eküvyon yardımıyla Mueller-Hington agar üzerine yayılmıştır. Plakların kuruması beklendikten sonra üzerlerine antibiyotik emdirilmiş kağıt disklerden yerleştirilmiştir. 35°C’de 18-24 saatlik inkübasyonu takiben antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zonlarının çapları ölçülmüştür. CLSI (2014) kriterlerine göre elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

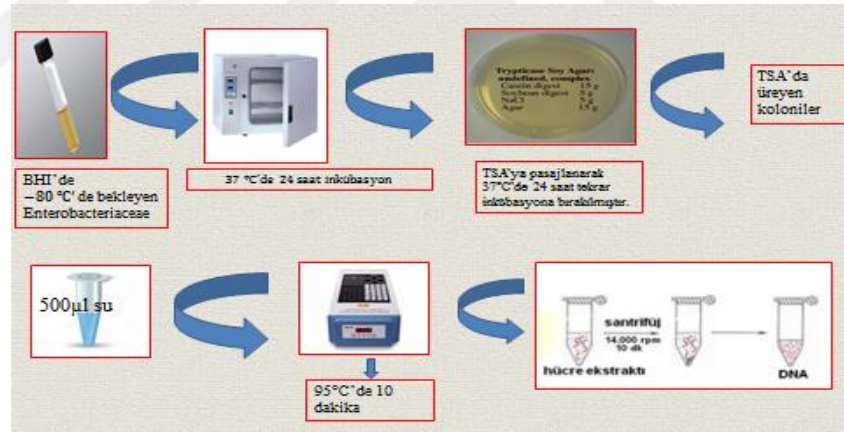
**Tablo 3.1.** İnhibisyon zon çapları kriterleri

Antibiyotik adı	Kodu ve disk içeriği	Zon çapı (mm)		
		S	I	R
Ampisilin	AM30-30 µg	≥17	14-16	≤13
Aztreonam	ATM30-30 µg	≥21	18-20	≤17
Sefotaksim	CTX30-30 µg	≥26	23-25	≤22
Seftriakson	CRO30-30 µg	≥23	20-22	≤19
Kloramfenikol	C30- 30 µg	≥18	13-17	≤12
Gentamisin	CN10-10µg	≥15	13-14	≤12
Imipenem	IPM10-10 µg	≥23	20-22	≤19
Streptomisin	S10-10 µg	≥15	12-14	≤11
Sulfametoksazol	RL25-25 µg	≥16	11-15	≤10
Tetrasiklin	TE30-30 µg	≥15	12-14	≤11

### 3.2.3. İzolatların genotipik olarak tanımlanması

#### 3.2.3.1. DNA izolasyonu

Kaynatma yöntemi kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. Analize kadar gliserinli BHI sıvı besiyeri içerisinde  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan Enterobacteriaceae izolatları tekrar BHI sıvı besiyeri içerisinde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edilerek zenginleştirilmiştir. Zenginleştirme sıvısından TSA'ya pasajlanarak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Üreyen koloniler öze ile toplanarak içinde 500  $\mu\text{l}$  steril distile su bulunan ependorf tüplerine inoküle edilmiş ve tüpler homojenize edilmiştir. Daha sonra ependorf tüpler, kuru blok ısıtıcıda ( $95^{\circ}\text{C}$ 'de) 10 dakika bekletilmiştir. Soğutmalı santrifüjde 14000xg'de 10 dakika süreyle santrifüj edilmiş ve üstteki süpernatant kısım ayrı bir ependorf tüpe aktararak kalıp DNA olarak kullanılmıştır.



**Resim 3.3.** Kaynatma yöntemi ile DNA izolasyonu (URL,2015).

### 3.2.4. Polimeraz zincir reaksiyonu

Çalışmamızda, kıyma örneklerinden elde edilen Enterobacteriaceae izolatlarından kaynatma yöntemi ile hazırlanan DNA'lar kullanılmıştır. GSBL ürettiği saptanan izolatların,  $\beta$ -laktamaz enzim direncini kodlayan genlerden *TEM*, *SHV* ve *CTX-M* varlığı geleneksel PZR yöntemi ile araştırılmıştır.

#### 3.2.4.1. Direnç genlerinin araştırılması

Primerlerin tüm alt tipleri tanıyabilmesi için *TEM*, *SHV* ve *CTX-M* genlerinin korunmuş bölgelerine özgül primerler kullanılmıştır. Amplifikasyon için Tablo 3.2'de verilen primerler kullanılmıştır.

**Tablo 3.2.**  $\beta$ -laktamaz enzim direncini kodlayan genler ve primer dizileri

Gen	Primer Dizileri
<i>CTX-M-Y1-F</i>	5'- ATGGTTAAAAAATCACTGCGC -3'
<i>CTX-M-Y2-R</i>	5'- TTACAAACCGTCGGTGACGAT -3'
<i>blaTEM-F2</i>	5'- TAACCATGAGTGATAAACACT -3'
<i>blaTEM-R2</i>	5'- CCGATCGTTGTCAGAAGTAA -3'
<i>blaSHV-F2</i>	5'- ACTGCCTTTTTGCGCCAGAT -3'
<i>blaSHV-R2</i>	5'- CAGTTCCGTTTCCCAGCGGT -3

#### 3.2.4.2. PZR optimizasyon çalışmaları

Jel fotoğraflarındaki bant profili görüntülerini daha net elde etmek için PZR karışım konsantrasyon oranlarının belirlenmesinde, farklı optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

### 3.2.4.2.1. CTX-M, SHV ve TEM grubu için MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu

En iyi MgCl<sub>2</sub> konsantrasyon oranını tespit etmek için yapılmıştır. Reaksiyon karışımı Tablo 3.3.' deki gibi hazırlanmıştır.

**Tablo 3.3.** CTX-M, SHV ve TEM grubu için MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu

Reaksiyon karışımı (25µl)	Saf su (µL)	10X PZR tamponu (µL)	25 mM MgCl <sub>2</sub> (µl)	10 mM dNTPmix (µl)	Primer F (20 µM) (µl)	Primer R (20 µM) (µl)	Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	DNA (µl)
1.kuyu	36	5	0,5	1	1	1	0,5	5
2.kuyu	35,5	5	1	1	1	1	0,5	5
3.kuyu	35	5	1,5	1	1	1	0,5	5
4.kuyu	34,5	5	2	1	1	1	0,5	5
5.kuyu	34	5	2,5	1	1	1	0,5	5
6.kuyu	33,5	5	3,0	1	1	1	0,5	5
7.kuyu	33	5	3,5	1	1	1	0,5	5
8.kuyu	32,5	5	4,0	1	1	1	0,5	5
9.kuyu	32	5	4,5	1	1	1	0,5	5
10.kuyu	31,5	5	5,0	1	1	1	0,5	5



### 3.2.4.2.2. CTX-M, SHV ve TEM grubu için dNTP optimizasyonu

En iyi dNTP konsantrasyon oranını tespit etmek için yapılmıştır. Reaksiyon karışımı Tablo 3.4 'deki gibi hazırlanmıştır.

**Tablo 3.4.** CTX-M, SHV ve TEM grubu için dNTP optimizasyonu

Reaksiyon karışımı (25µl)	Saf su (µL)	10X PZR tamponu (µL)	25 mM MgCl <sub>2</sub> (µl)	10 mM dNTP (µl)	Primer F (20 µM) (µl)	Primer R (20 µM) (µl)	Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	DNA (µl)
1.kuyu	34,3	5	3	0,2	1	1	0,5	5
2.kuyu	34,1	5	3	0,4	1	1	0,5	5
3.kuyu	33,9	5	3	0,6	1	1	0,5	5
4.kuyu	33,7	5	3	0,8	1	1	0,5	5
5.kuyu	33,2	5	3	1	1	1	0,5	5
6.kuyu	33	5	3	1,2	1	1	0,5	5
7.kuyu	32,8	5	3	1,4	1	1	0,5	5
8.kuyu	32,6	5	3	1,6	1	1	0,5	5
9.kuyu	32,4	5	3	1,8	1	1	0,5	5
10.kuyu	32,2	5	3	2,0	1	1	0,5	5

### 3.2.4.2.3. CTX-M tipi için ısı optimizasyonu

PZR yönteminde her bir örnek için 25 µl toplam hacimde karışım hazırlanmıştır. Tüm PZR çalışmaları biyogüvenlik kabini içerisinde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan reaksiyon karışımı ve farklı bağlanma sıcaklıkları Tablo 3.5'te verilmiştir. Primerlerin bağlanma sıcaklığı  $T_m=2(A+T)+4(G+C)$  formülü ile hesaplanmıştır. En iyi bağlanma sıcaklığını belirlemek için gradientli PZR uygulaması yapılmış ve 54-62°C arasında çalışılmıştır.

**Tablo 3.5.** *CTX-M* tipi için ısı optimizasyonu

Reaksiyon karışımı (25µl)	Bağlanma sıcaklığı (°C)	Saf su (µL)	10X PZR tamponu (µL)	25 mM MgCl <sub>2</sub> (µl)	10 mM dNTP mix (µl)	Primer F(20 µM) (µl)	Primer R(20M) (µl)	Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	DNA (µl)
1.kuyu	54	33,5	5	3	1	1	1	0,5	5
2.kuyu	55	33,5	5	3	1	1	1	0,5	5
3.kuyu	56	33,5	5	3	1	1	1	0,5	5
4.kuyu	57	33,5	5	3	1	1	1	0,5	5
5.kuyu	58	33,5	5	3	1	1	1	0,5	5
6.kuyu	59	33,5	5	3	1	1	1	0,5	5
7.kuyu	60	33,5	5	3	1	1	1	0,5	5
8.kuyu	61	33,5	5	3	1	1	1	0,5	5
9.kuyu	62	33,5	5	3	1	1	1	0,5	5

### 3.2.5. PZR karışımı hazırlanması

PZR karışımı hazırlanmasında kullanılan bileşenler ve miktarları Tablo 3.6' da verilmiştir.

**Tablo 3.6.** PZR bileşenleri ve miktarları

PZR Bileşenleri	Hacim (µl)
Saf su	16,75 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µl
10X PZR tamponu	2,5 µl
dNTP mix (10 mM)	0,5 µl
Primer F (20 µM)	0,5 µl
Primer R (20 µM)	0,5 µl
Taq DNA polimeraz (5U/ µl)	0,25 µl
PZR karışımının toplam hacmi	22,5 µl
Bakteri DNA'sı	2,5 µl
Toplam hacim	25,0 µl

### 3.2.6. Amplifikasyon programları

#### 3.2.6.1. TEM gen bölgesinin amplifikasyon programı

Reaksiyon aşamaları	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	94	5 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	35
Primer bağlanması	58	40 saniye	35
Zincir uzaması	72	1 dakika	35
Son uzama	72	5 dakika	1

#### 3.2.6.2. SHV gen bölgesinin amplifikasyon programı

Reaksiyon aşamaları	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	94	10 dakika	1
Denatürasyon	94	40 saniye	35
Primer bağlanması	57	40 saniye	35
Zincir uzaması	72	1 dakika	35
Son uzama	72	5 dakika	1

#### 3.2.6.3. CTX-M gen bölgesinin amplifikasyon programı

Reaksiyon aşamaları	Sıcaklık	Süre	Döngü
Ön denatürasyon	94	5 dakika	1
Denatürasyon	94	30 saniye	35
Primer bağlanması	56	40 saniye	35
Zincir uzaması	72	1 dakika	35
Son uzama	72	5 dakika	1

### 3.2.7. Agaroz jel elektroforez

PZR amplikonlarının incelenmesi ve boyutlarının belirlenmesi için konsantrasyonu %2 olacak şekilde 1X TBE tamponu ile agaroz jel hazırlanmıştır. Mikrodalga fırında eritilen agaroz, yatay elektroforez jel kabına dökülmüş ve soğumaya bırakılmıştır. Agaroz jel kuyucuklarına 10 µL amplifikasyon ürünü ile 2 µL 6X yükleme tamponu karıştırılarak uygulanmıştır. 2 saat süresince 100 volt elektrik akımı altında moleküler boyutlarına göre DNA bantları ayrıştırılmıştır. Elektroforez programı tamamlandıktan sonra elde edilen jel, 5 µl/ml etidyum bromür içeren 400 ml ultra saf su içine alınarak 20 dakika süreyle boyanma işlemine tabi tutulmuştur. Görüntüleme cihazı kullanılarak 100 bp DNA markırla karşılaştırılan DNA bantları analiz edilmiştir.

## **4. BULGULAR**

Bu çalışmadan elde edilen bulgular, Amasya ilinde çeşitli kasap ve süper marketlerden aseptik kurallara uygun olarak satın alınan kıymalardan elde edilen Enterobacteriaceae suşlarının izolasyon, identifikasyon, antibiyotik direnci ve beta laktamaz aktivitelerinin belirlenmesini kapsamaktadır.

### **4.1. Enterobacteriaceae İzolasyonu**

FEF Biyoloji Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarına getirilen 100 adet kıyma örneklerinden klasik kültür yöntemiyle Enterobacteriaceae'lar izole edilmiş ve çeşitli biyokimyasal testler uygulanmıştır.

### **4.2. Enterobacteriaceae Üyelerinin İdentifikasyonu için Yapılan Testler**

İzolatlarla Bergey's of Manuel Systematic Bacteriology ve Manual of Clinical Microbiology'de belirtilen biyokimyasal testler esas alınarak indol üretimi, Metil-Kırmızısı, Voges-Proskauer, sitrat testleri uygulanmıştır ve test sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir.

**Tablo 4.1.** IMVIC analiz sonuçları

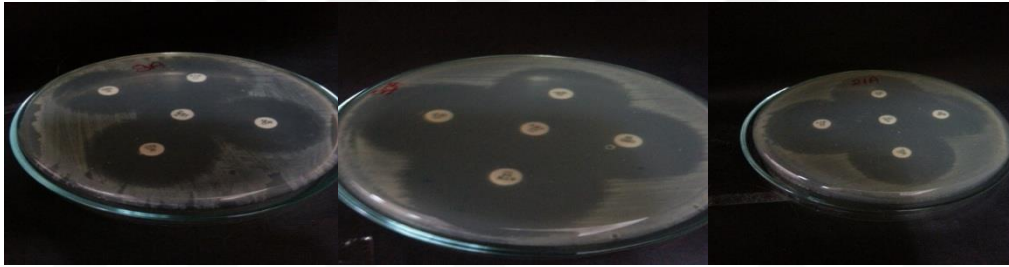
NUMUNE	INDOL	METİL- KIRMIZISI	VOGES PROSKAUER	SİTRAT
1 VGA	+	+	—	—
8 VGA	—	+	—	+
9 VGA	—	+	—	+
10 VGA	—	+	—	+
3 VGB	—	+	—	+
4 VGB	—	+	—	+
8 VGB	—	+	—	+
11 VGB	—	+	—	+
20 VGB	—	+	—	+
22 VGB	—	+	—	+
24 VGB	—	+	—	+
25 VGB	—	+	—	+
26 VGB	—	+	—	+
29 VGB	—	+	—	+
32 VGB	—	+	—	+
38 VGB	—	+	—	+
40 VGB	—	+	—	+
45 VGB	+	+	—	—
46 VGB	—	+	—	+
47 VGB	+	+	—	—
49 VGC	—	+	—	+
7 VGD	—	+	—	+
45 VGD	—	+	—	+
28 VGE	—	+	—	+
33 VGE	—	+	—	+
34 VGE	—	+	—	+
38 VGE	—	+	—	+
39 VGE	—	+	—	+
44 VGE	—	+	—	+

### 4.3. Enterobacteriaceae Üyelerinin Antibiyotik Dirençliliklerinin ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Aktivitelerinin Belirlenmesi

Çalışmamızda Enterobacteriaceae üyelerinin antimikrobiyal antibiyotik duyarlılıkları CLSI da (Clinical and Laboratory Standarts Institute) (CLSI, 2014) belirtilen kriterlere göre Kirby-Bauer disk difüzyon, GSBL aktiviteleri ise çift disk sinerji yöntemi ile belirlenmiştir.

#### 4.3.1. Çift disk sinerji testi

Çalışmamızda 100 kıyma örneğine de çift disk sinerji testi uygulanmış ve %68'nin beta laktamaz pozitif olduğu tespit edilmiştir.



Resim 4.1. Çift disk sinerji testi

#### 4.3.2. Kirby-Bauer disk difüzyon testi

Disk difüzyon duyarlılık testi için ampisilin, aztreonam, kloramfenikol, sefotaksim, seftriakson, tetrasiklin, gentamisin, imipenem, streptomisin ve sulfametoksaz olan antibiyotikleri kullanılmıştır.

Disk difüzyon duyarlılık testi sonuçlarına göre, ampisilin, aztreonam, kloramfenikol, sefotaksim, seftriakson, tetrasiklin, gentamisin, imipenem, streptomisin ve sulfametoksazol antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; %27,94, %2,95, %25,0, %14,70, %4,42, %1,50, %1,50, %10,29, %22,05, %17,70 olarak bulunmuştur.

**Tablo 4.2.** Disk difüzyon testi ile antibiyotik duyarlılık değerlendirme sonuçları

NUMUNE	AM	ATM	CTX	CRO	C	CN	IMP	S	TE	RL
1 VGA	18(S)	25(S)	14(R)	33(S)	26(S)	23(S)	32(S)	—(R)	—(R)	33(S)
8 VGA	11(R)	31(S)	36(S)	17(R)	18(S)	22(S)	33(S)	21(S)	23(S)	25(S)
9 VGA	—(R)	32(S)	17(R)	29(S)	22(S)	20(S)	33(S)	—(R)	21(S)	—(R)
10 VGA	—(R)	35(S)	34(S)	19(R)	24(S)	21(S)	29(S)	19(S)	—(R)	—(R)
3 VGB	18(S)	33(S)	21(R)	30(S)	27(S)	21(S)	29(S)	22(S)	24(S)	—(R)
4 VGB	—(R)	34(S)	33(S)	33(S)	27(S)	20(S)	31(S)	21(S)	—(R)	22(S)
8 VGB	—(R)	35(S)	20(R)	27(S)	22(S)	20(S)	31(S)	18(S)	23(S)	21(S)
11 VGB	—(R)	33(S)	29(S)	19(R)	25(S)	23(S)	32(S)	19(S)	19(S)	—(R)
20 VGB	18(S)	35(S)	19(R)	32(S)	23(S)	22(S)	31(S)	21(S)	20(S)	14(I)
22 VGB	—(R)	31(S)	32(S)	16(R)	24(S)	22(S)	29(S)	16(S)	18(S)	—(R)
24 VGB	—(R)	32(S)	22(R)	29(S)	28(S)	22(S)	29(S)	19(S)	26(S)	21(S)
25 VGB	18(S)	—(R)	—(R)	11(R)	21(S)	22(S)	30(S)	21(S)	—(R)	20(S)
26 VGB	19(S)	32(S)	11(R)	29(S)	27(S)	21(S)	27(S)	18(S)	24(S)	—(R)
29 VGB	8(R)	17(R)	16(R)	16(R)	—(R)	22(S)	32(S)	13(I)	24(S)	—(R)
32 VGB	—(R)	40(S)	12(R)	24(S)	25(S)	20(S)	24(S)	19(S)	17(S)	20(S)
38 VGB	18(S)	35(S)	35(S)	16(R)	29(S)	20(S)	30(S)	16(S)	24(S)	16(S)
40 VGB	8(R)	33(S)	16(R)	32(S)	22(S)	21(S)	31(S)	19(S)	—(R)	20(S)
45 VGB	—(R)	35(S)	29(S)	19(R)	27(S)	22(S)	25(S)	20(S)	—(R)	20(S)
46 VGB	13(R)	35(S)	21(R)	30(S)	24(S)	22(S)	31(S)	20(S)	—(R)	27(S)
47 VGB	9(R)	32(S)	31(S)	17(R)	18(S)	22(S)	32(S)	19(S)	—(R)	17(S)
49 VGC	—(R)	31(S)	18(R)	29(S)	—(R)	22(S)	30(S)	21(S)	—(R)	21(S)
7 VGD	20(S)	37(S)	33(S)	27(S)	27(S)	23(S)	29(S)	17(S)	9(R)	25(S)
45 VGD	—(R)	21(S)	14(R)	16(R)	—(R)	23(S)	31(S)	12(I)	—(R)	17(S)
28 VGE	—(R)	36(S)	37(S)	30(S)	28(S)	22(S)	30(S)	—(R)	—(R)	—(R)
33 VGE	16(I)	34(S)	21(R)	32(S)	26(S)	21(S)	31(S)	—(R)	24(S)	—(R)
34 VGE	—(R)	35(S)	35(S)	37(S)	28(S)	—(R)	—(R)	—(R)	—(R)	—(R)
38 VGE	—(R)	33(S)	22(R)	31(S)	22(S)	20(S)	29(S)	—(R)	—(R)	—(R)
39 VGE	16(I)	36(S)	35(S)	31(S)	30(S)	23(S)	29(S)	—(R)	24(S)	—(R)
44 VGE	15(I)	30(S)	17(R)	30(S)	24(S)	21(S)	33(S)	—(R)	—(R)	29(S)



Enterobacteriaceae izolatlarının disk difüzyon antibiyotik direnç yüzde sonuçları Tablo 4.3.'de gösterilmiştir.

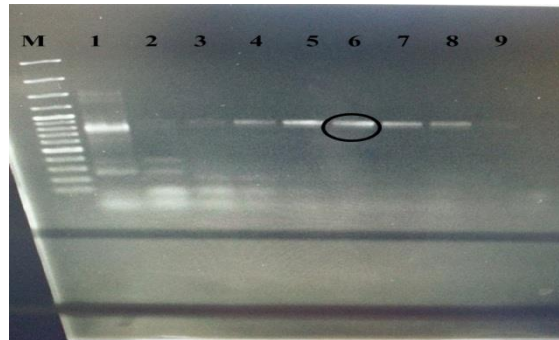
**Tablo 4.3.** Disk difüzyon antibiyotik direnç yüzdeleri

Antibiyotik	Duyarlı (S)	Orta Dirençli (I)	Dirençli (R)
AM	%67.64	%4.42	%27.94
ATM	%97.05	—	%2.95
CTX	%75.0	—	%25.0
CRO	%85.30	—	%14.70
C	%95.58	—	%4.42
CN	%98.5	—	%1.50
IMP	%98.5	—	%1.50
S	%86.77	%2.94	%10.29
TE	%77.95	—	%22.05
RL	%80.8	%1.50	%17.70

#### 4.4. PZR Optimizasyon Çalışmaları

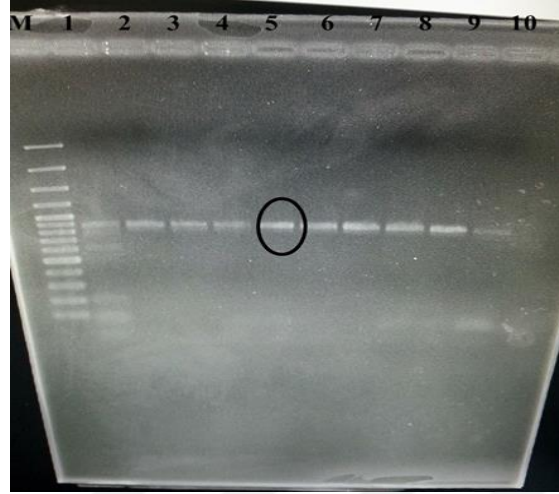
Jel fotoğraflarındaki bant görüntülerini daha net elde etmek için PZR karışım konsantrasyon oranlarının belirlenmesinde, farklı optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

##### 4.4.1. CTX-M, SHV ve TEM gen bölgeleri için MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu



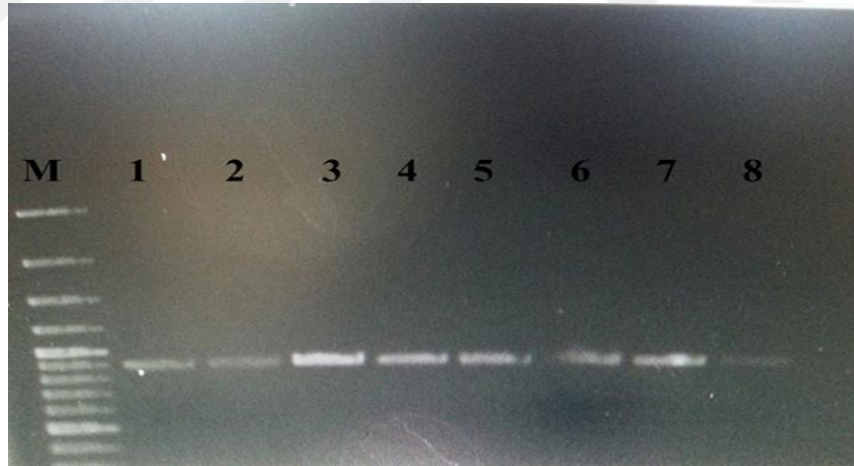
**Resim 4.2.** CTX-M, SHV ve TEM grubu için MgCl<sub>2</sub> optimizasyonu elektroforez görüntüsü. **M:** Marker, **1:** 0,5 µl, **2:** 1,0 µl, **3:** 1,5 µl, **4:** 2,0 µl, **5:** 2,5 µl, **6:** 3,0 µl, **7:** 3,5 µl, **8:** 4,0 µl, **9:** 4,5 µl, **10:** 5 µl.

#### 4.4.2. *CTX-M*, *SHV* ve *TEM* gen bölgeleri için dNTP optimizasyonu



**Resim 4.3.** *CTX-M*, *SHV* ve *TEM* grubu için dNTP optimizasyonu elektroforez görüntüsü. **M:** Marker, **1:** 0,2  $\mu$ l, **2:** 0,4  $\mu$ l, **3:** 0,6  $\mu$ l, **4:** 0,8  $\mu$ l, **5:** 1,0  $\mu$ l, **6:** 1,2  $\mu$ l, **7:** 1,4  $\mu$ l, **8:** 1,6  $\mu$ l, **9:** 1,8  $\mu$ l, **10:** 2,0  $\mu$ l.

#### 4.4.3. *CTX-M* gen bölgesi için ısı optimizasyonu



**Resim 4.4.** *CTX-M* tipi için ısı optimizasyonu elektroforez görüntüsü **M:** Marker, **1:** 54°C, **2:** 55°C, **3:** 56°C, **4:** 57°C, **5:** 58°C, **6:** 59°C, **7:** 60°C, **8:** 61°C, **9:** 62°C.

#### **4.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR) Yöntemiyle Dirençle İlişkili Genlerin Araştırılması**

Çalışmamızda beta laktamaz enzim direncini PZR ile tespit etmek amacıyla kaynatma yöntemi ile elde edilen DNA'lar kullanılmıştır.

*TEM*, *SHV* ve *CTX-M* genlerine özgül primerler kullanarak hedef bölge PZR yöntemi ile amplifiye edilmiştir. *CTX-M* ve *SHV* beta laktamaz pozitif izolatlar Tablo 4.4.' de verilmiştir.

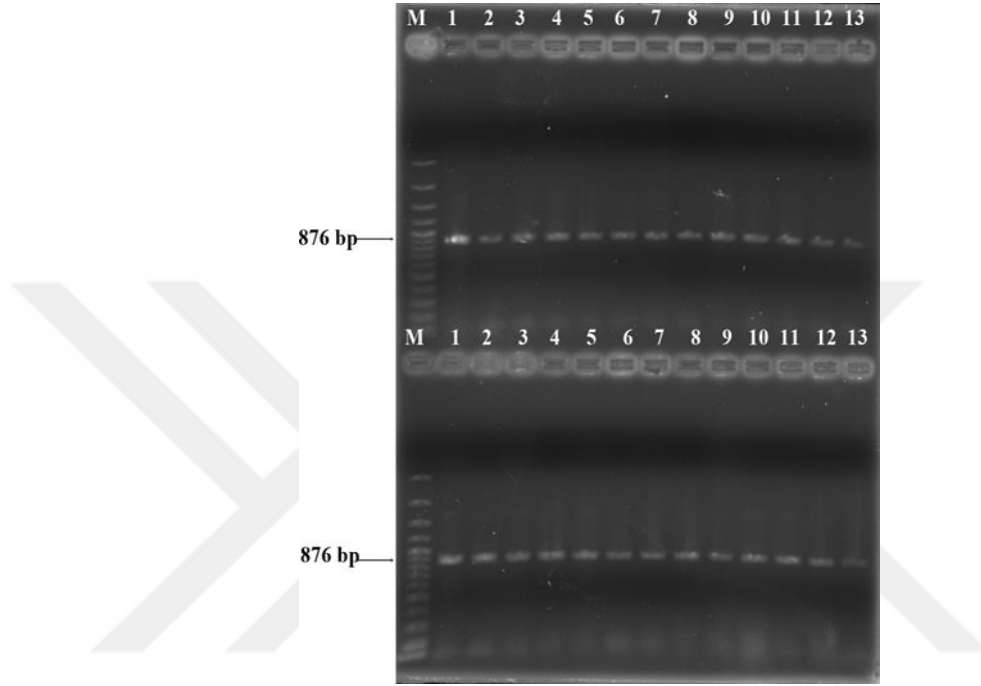


**Tablo 4.4.** CTX-M ve SHV beta laktamaz pozitif izolatlara

NUMUNE	<i>CTX-M</i>	<i>SHV</i>
1 VGA	+	—
8 VGA	—	+
9 VGA	+	+
10 VGA	—	+
3 VGB	+	—
4 VGB	—	+
8 VGB	+	+
11 VGB	—	+
20 VGB	+	—
22 VGB	—	+
24 VGB	+	+
25 VGB	+	—
26 VGB	+	—
29 VGB	+	+
32 VGB	+	+
38 VGB	—	—
40 VGB	+	+
45 VGB	—	+
46 VGB	+	+
47 VGB	—	+
49 VGC	+	+
7 VGD	—	—
45 VGD	+	+
28 VGE	—	—
33 VGE	+	—
34 VGE	—	—
38 VGE	+	—
39 VGE	—	—
44 VGE	+	—

#### 4.5.1. *CTX-M* antibiyotik direnç gen varlığının araştırılması

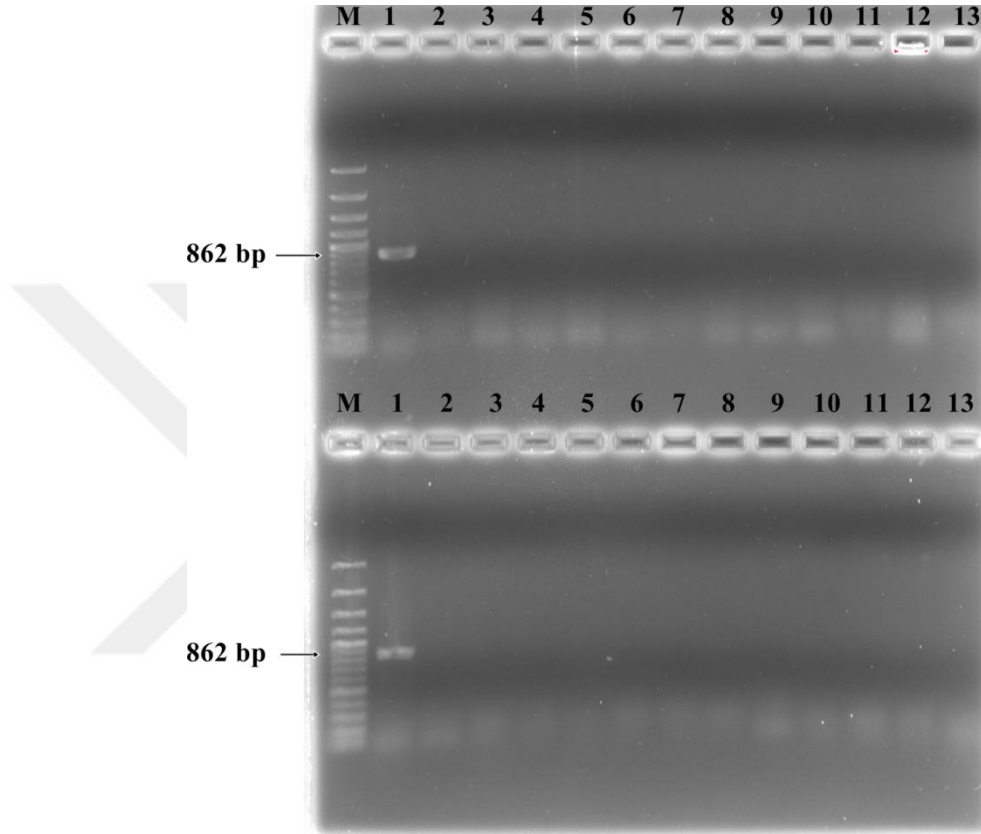
*CTX-M* gen bölgelerinin varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır ve %35,29'un da *CTX-M* tipi beta laktamaz bulunmuştur. Pozitif izolatlar Resim 4.5.'de verilmiştir.



**Resim 4.5.** *CTX-M* tipi beta laktamaz üreten izolatların elektroforez görüntüsü (M:Marker, 1. kuyu GSBL pozitif klinik izolat, 2-13. kuyular *CTX-M* grup tipi beta laktamaz üreten izolatlar)

#### 4.5.2. *TEM* antibiyotik direnç gen varlığının araştırılması

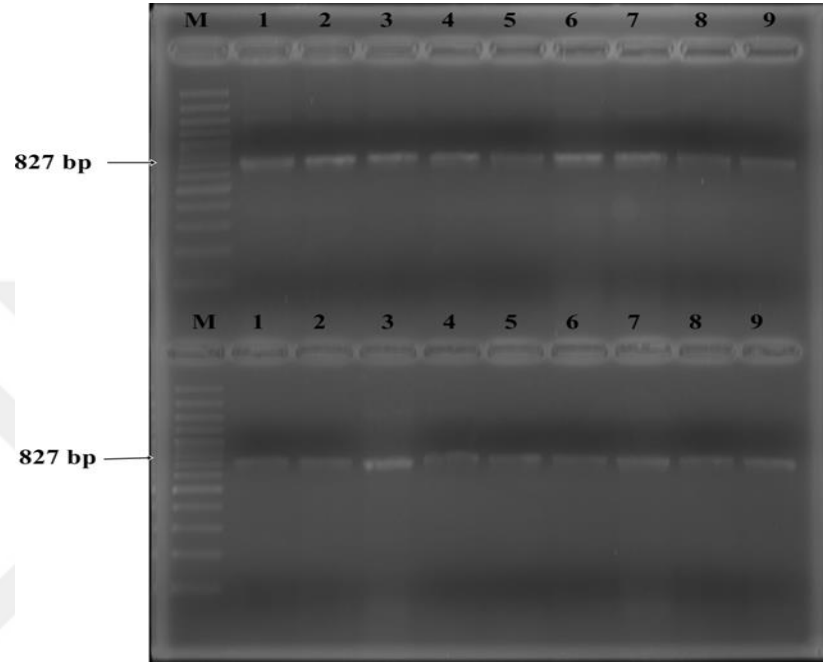
*TEM* gen bölgelerinin varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır ve hiçbir izolatta *TEM* tipi beta laktamaza rastlanılmamıştır (Resim 4.6.).



**Resim 4.6.** *TEM* tipi beta laktamaz üreten izolatların elektroforez görüntüsü (M:Marker, 1. kuyu GSBL pozitif klinik izolat, 2-13. kuyular *TEM* tipi beta laktamazlar)

#### 4.5.3. *SHV* antibiyotik direnç gen varlığının araştırılması

*SHV* gen bölgelerinin varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır ve %23,52 'inde *SHV* tipi beta laktamaz bulunmuştur. Pozitif izolatlar Resim 4.7.'de verilmiştir.



**Resim 4.7.** *SHV* tipi beta laktamaz üreten izolatların elektroforez görüntüsü (M.Marker, 1. kuyu GSBL pozitif klinik izolat, 2-9. kuyular *SHV* tipi beta laktamaz üreten izolatlar).

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO), gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde en yaygın sağlık sorunlarından birinin kontamine gıdalardan kaynaklanan hastalıklar olduğunu kabul etmektedir. Hatta bu sorunların bebek ve yaşlılarda sıklıkla ölüm ile sonuçlandığını açıklamaktadır (Kalafatoğlu, 1995).

Genel bir gıda hijyeni yaklaşımı ile gıdalarda patojen mikroorganizma görülmesi uygun bulunmamaktadır. Benzer şekilde patojen olmayan mikroorganizmalar da dahil olmak üzere fekal kontaminasyon göstergesi olan bakterilerin de gıdalarda bulunması sakıncalıdır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Toplam aerobik mezofilik bakteri sayımı gıda işletmelerinde sanitasyon yeterliliği ile gıdanın işlenmesi, ulaşımı ve depolanması sırasında gereken sıcaklıklarda tutulup tutulmadığının bir göstergesi olması bakımından önem taşımaktadır. Bu sayımlar ayrıca gıdada bozulma başlangıcı, gıdanın raf ömrü, dondurulmuş gıdaların kontrolsüz çözündürülmesi, soğutmanın yetersiz olması ve üretim aşamasındaki kontaminasyon konularında da bilgi vererek gerekli önlemlerin alınmasında fayda sağlamaktadır. Bu çerçevede toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı ve toplam koliform bakteri sayısı gıdalarda mikrobiyolojik kalitenin belirlenmesinde indikatör olarak yaygın şekilde kullanılan kriterler arasındadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1998).

Enterobacteriaceae familyasında yer alan mikroorganizmalar, indikatör mikroorganizmalar arasında en sık rastlanan mikroorganizma grubunu oluşturur. Bu nedenle Enterobacteriaceae grubu mikroorganizmalar gıda mikrobiyolojisinde oldukça önemlidir. Gıdada Enterobacteriaceae mikroorganizma bulunması ise o gıda maddesinin hijyenik olmayan koşullar altında üretimini, yetersiz sanitasyon koşullarının, yanlış pastörizasyon uygulamalarının, pişirme ve pastörizasyon sonrası tekrar bulaşma olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Tunail, 1999).

Düzensiz, kontrolsüz ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı, antibiyotiklere direnç seviyesinin yükselmesindeki en önemli faktördür. Bununla birlikte, hayvan yetiştiriciliği ve kültürlerde yaygın olarak kullanılan antibiyotikler de direnç seviyesinin hızla artmasına sebep olmaktadır (Baylan, 2010).



Hayvancılıkta kullanılan çeşitli antibiyotikler; hastalıkların sağaltımı ve hastalıklardan koruma amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda ve Tarım Örgütü (FAO) raporlarına bakıldığında, hayvanların % 80'inin yaşamlarının belli dönemlerinde veya tamamında, tedavi esnasında, içme suları ve yemleri ile bu tür ilaçlara sıklıkla maruz kaldıkları belirtilmektedir. Alınan ilaçlar başta hayvanların kısa süreli tedavi edilmesine olanak sağlarken bu hayvanların böbrek ve karaciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularında biriktiği bilinmektedir. Fazla antibiyotiğe maruz kalmış hayvanları tüketen insanlarda üründeki antibiyotik çeşit ve dozajına bağlı olarak hafif alerjiden başlayıp anafilaktik şoka kadar gidebilen olumsuz birçok etki gözlenmiştir. Bilinçsiz antibiyotik kullanımının besin endüstrisinde üretim hatalarına yol açtığı bilinmektedir. Ayrıca profilaktik ve gelişmeyi hızlandırıcı olarak kullanılan antibiyotiklerin çoğu insan ve hayvanlarda patojen bakteri türleri arasında ortaya çıkan dirençli suşların hızla artmasına yol açmaktadır. Bunun nedeninin, hayvanlara uygulanması gereken dozlardan daha fazla ilaç verilmesi ve özellikle de ilaç uygulanan hayvanların ilacın yasal bekletme süresine uyulmadan kesime sevk edilmesi olarak bildirilmektedir. Tüm bu bilgiler neticesinde, antibiyotiklerin tamamen metabolize olmaması veya vücuttan tamamen atılmaması sonucunda hayvanların doku ve organları ile bunlardan elde edilen hayvansal ürünlerde antibiyotik kalıntısına rastlanılmaktadır (Baylan, 2010). Antibiyotiklerin yaygın ve bilinçsiz kullanımı bakteriyal enfeksiyonların tedavisinde başarısızlığa neden olmakla birlikte aynı zamanda dirençli bakterilerin artmasıyla sonuçlanmaktadır. Bakterilerdeki bu antibiyotik direnç yapıları doğal seçim ile ortaya çıkmaktadır (Wegener, 2003).

Bu bilgilere dayanarak yaptığımız çalışmada öncelikle, Amasya ilinde satışa sunulan 100 kıyma örneğine biyokimyasal testler uygulanarak identifikasyonları yapıldı. Bu suşlarda antibiyotik dirençlilik ve direnç genlerinin varlığı tespit edildi.

Antibiyotik direnci, dünyada insan ve hayvanlar açısından önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır. Tıp ve tarım alanlarında antibiyotiklerin kontrolsüz kullanılması bakteriler arasında antibiyotik direncin yayılmasına yol açmaktadır (Rasheed ve ark., 2014).

Araştırmamızda hayvansal gıdalardan (kıyma örneklerinden) izole edilen Enterobacteriaceae suşlarının çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları ve antibiyotik direnç genleri tespit edilmiştir. İzole edilen toplam 68 izolatta ampisilin, aztreonam, kloromfenikol, sefotaksim, seftriakson, tetrasiklin, gentamisin, imipenem, streptomisin ve sulfametoksazol antibiyotiklerine direnç gözlenmiştir. İzolatların ampisiline, % 27,94'ü, aztreonama % 2,95'i, kloromfenikole %4,42'si, sefotaksime %25'i, seftriaksona % 14,70'i, tetrasikline % 22,05'i, gentamisin ve imipeneme % 1,50'si, sulfametoksazole ise % 17,70'i dirençli oldukları belirlenmiştir.

Literatür incelendiğinde, bu çalışmadan elde edilen sonuçlara benzer bulguları rapor eden araştırmaların da bulunduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalarda biri (Avcı, 2012) tarafından yapılmış ve Ankara'da tüketime sunulan 90 hayvansal gıda örneğinde, tetrasikline % 20,5, aztreonama % 7,8, seftriaksona % 6,8, kloromfenikole %6,6, sefotaksime % 5,6, gentamisine % 2,3 ve imipenem antibiyotiklerine % 0,2 direnç gösterdiği rapor edilmiştir.

Österblada ve ark. (1999) yaptıkları çalışmada; kıyma örneklerinden elde ettikleri izolatların antibiyotiklere direnç durumlarını araştırmışlardır. Tetrasiklin ve kloramfenikol antibiyotiklerine sırasıyla % 1,5 ve % 0,8 oranında direnç tespit etmişlerdir. Bizim çalışmamızdan ve son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen bulgular karşılaştırıldığında, gıdalardan izole edilen Enterobacteriaceae türlerinde kloramfenikol ve tetrasiklin direncin giderek arttığı görülmektedir.

Lei ve ark. (2010) yaptıkları çalışmada; hayvansal gıdalardan elde ettikleri izolatlarda tetrasiklin (%86,5), ampisilin (%64), kloramfenikol (%47,8), gentamisin (%32,6), siprofloksasin (%30,7), amikasin (%2,8) ve seftriakson (%1,7) antibiyotiklerine direnç saptamışlardır.

Amodor ve ark, (2016) yaptıkları çalışmalarda; şarküteride satılan etlerden elde ettikleri Enterobacteriaceae izolatlarının %15,4 sefotaksime ve %7,7 aztreonama dirençli olduğunu saptamışlardır.

Araştırmada elde edilen sonuçların daha önce yapılan diğer çalışmalarla benzerlik göstermesiyle birlikte antibiyotiklere karşı dirençlilik oranları arasında farklılıkların bulunmasının; bölgesel suş dağılımdan, farklı kaynaklardan izole edilmelerinden, izolatların farklı çevresel şartlara maruz kalmaları ve farklı bölgelerde farklı antibiyotiklerin öncelikli kullanımından dolayı olduğu düşünülmektedir (Stürenburg ve ark., 2003).

Geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotikler bakterisidal etkili olup yan etkileri az olması nedeniyle tedavilerde sıklıkla tercih edilmektedir. Bunun yanında bu ilaçların klinikte kullanımının artmasıyla birlikte bu antibiyotiklere özellikle beta laktam grubundakilere bağlı direnç de artmaktadır. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar, geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerine direnç gösterdiklerinden dolayı enfeksiyonların tedavisinde büyük sorunlar oluşturmaktadır (David ve ark., 1995).

GSBL, plazmidler aracılığıyla taşınan bakteriyel enzimlerdir. Bu enzimler üçüncü kuşak oksimino-sefalosporinleri ve monobaktamları (aztreonam) hidrolize ederek bakterinin bu antibiyotiklere karşı dirençli olmasını sağlarlar ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz ile inhibe olurlar (Kaçmaz ve ark., 2010).

GSBL üreten bakterilerin epidemiyolojisi konusunda dünyada ve ülkemizde birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar GSBL üreten bakterilerin hızla yayılmakta olduğunu göstermektedir (Gülay ve ark., 2005).

Çalışmamıza paralel olarak (Avcı, 2012) yapmış olduğu araştırmada gıda örneklerinden elde ettiği izolatların %22,9 GSBL (+) ve %77,1 GSBL (-) olduğunu tespit etmiştir.

Al-Muhtaseb ve Kaygusuz (2008) yaptıkları çalışmada; 59 izolatın çift disk sinerji testi ile GSBL özelliğini araştırmışlar, bu izolatların %34 oranında GSBL (+) özellik gösterdiklerini belirlemişlerdir.

Gündoğan ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada; et örneklerinden izole ettikleri izolatların % 59 oranında GSBL (+) özellik gösterdiklerini bulmuşlardır. Yavaş (2015) gıdalardan izole edilen 206 Enterobacteriaceae izolatının %29,6 GSBL (+) olduğunu tespit etmiştir.

Fırat Üniversitesi Fırat Tıp Merkezin’de, 2000 yılında yapılan bir araştırmada; *E. coli* ve *Klebsiella* suşlarında GSBL sıklığı % 61 oranında saptanmıştır (Demirdağ ve ark., 2001). Dünyada ve ülkemizde yapılan çalışmalarda GSBL üretiminin Enterobacteriaceae familyası içinde *K.pneumoniae*’da daha fazla olduğunu göstermiştir. GSBL enzimlerinin *Klebsiella* türlerinde yaygın olmalarının nedeni bu mikroorganizmaların deri ve yüzeylerde diğer enterik bakterilere göre daha uzun süre canlı kalabilmeleri ve spontan mutasyonların daha sık görülmesi olarak bildirilmektedir (Petrosino ve ark., 1996; Özsoy ve ark., 2001).

Yaptığımız araştırma sonucunda ise 100 adet kıyma örneğinin çift disk sinerji testi ile GSBL özelliği araştırılmıştır. Bu izolatların %68’sinin GSBL (+) olduğu belirlenmiştir ve elde edilen veriler diğer bulguları destekler niteliktedir.

Gram negatif patojenler arasında geniş spektrumlu beta-laktamlara direnç büyük ölçüde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar ile ilişkilidir. Bu enzimler üçüncü kuşak sefalosporinlere direnç gibi ciddi klinik problemlere neden olurlar (Kimura ve ark., 2007). Enterobacteriaceae’de GSBL’ler esas olarak *Klebsiella spp.* ve *E. coli* suşlarında bulunmakla birlikte diğer cinslerde de rapor edilmektedir. GSBL’ler, coğrafik bölgelere bağlı olarak yayılışı ve enterobakteriyel türlerin dağılımı ile dünya çapında yaygındır. Enterobacteriaceae suşları GSBL tipleri açısından ülkeler arasında farklılık göstermektedir (Timko ve ark., 2004).

GSBL’ler 1980’lerin başlarında ilk Almanya’da ve kısa bir zaman sonra Fransa’da önem kazanmaya başlamıştır. *E. coli* ve *K. pneumoniae* arasında geniş yayılış gösteren *TEM-1*, *TEM-2* ve *SHV-1* enzimleri olan bu ilk GSBL’ler genel penisilinazların yapısal mutasyonlarıdır. 1990’larda GSBL’ler ile ilgili birçok rapor Fransa’dan gelmekle beraber Şili, Tunus, İngiltere ve Amerika’da da GSBL rapor edilmiştir. Sonradan 1990’larda *TEM* ve *SHV* kökenli GSBL’ler ile ilgili giderek artan sayıda rapor bulunmaktadır (Delton, 2007).

GSBL enzimleri Enterobacteriaceae ailesinin birçok üyesinde görülmekle birlikte en sık *K.pneumoniae* suşlarından izole edilmiştir (Bradford, 2001). 2003 yılında Paterson ve arkadaşlarının Amerika, Tayvan, Avustralya, Güney Afrika, Türkiye, Belçika ve Arjantin'deki on iki hastaneden izole edilen *K.pneumoniae* suşları ile yaptıkları araştırmada en yaygın *SHV* tipi GSBL'leri %67,1 oranında, *TEM* tipi GSBL'leri %16,4 oranında, *PER* tipi GSBL'leri Türkiye'den izole edilen dokuz izolatan dördünde ve iki izolatta *SHV-2* ve *SHV-5* tipi GSBL'lerle birlikte tespit etmişlerdir. *CTX-M* tipi GSBL'ler %23,3 oranında Amerika hariç diğer ülkelerin hepsinde görülmüştür (Paterson ve ark., 2005).

Çin'de 2007 yılında yapılan Yunsong Yu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada; GSBL üreten *E. coli* ve *K. pneumoniae* suşlarında GSBL tipleri araştırılmış ve 509 izolatanın 447'sinde GSBL genotipleri belirlenmiştir. 339 izolatta *TEM* tipi, 27 izolatta *SHV* tipi ve 341 izolatta *CTX-M* tipi GSBL tespit edilmiştir. 30 izolatanın iki veya üç GSBL tipini birlikte taşıdığı, *CTX-M-14* ve *CTX-M-3* üretiminin yaygın olduğu saptanmıştır (Yu ve ark., 2007).

Livermore ve ark., (1999), 1980'li yıllardakinden farklı olarak günümüzde *E. coli* ve *Klebsiella spp.* izolatlarında *CTX-M* tipi beta-laktamazların daha yaygın olduğunu belirtmektedirler. Ahu Kamburoğlu (2011) çalışmasında; GSBL pozitif olan izolatlarında *TEM*, *SHV*, *CTX-M* enzimleri kodlayan genlerin prevalansının sırasıyla %54,2, %14,6, %95,8 olduğu belirlenmiş ve *CTX-M*'in en sık rastlanan gen olduğu saptanmıştır.

Yaptığımız çalışmamızda ise; izolatların GSBL geni taşıyıp taşımadıkları ve ayrıca GSBL tiplerinden *TEM*, *SHV* ve *CTX-M* gen bölgeleri varlığı PZR yöntemi uygulanarak doğrulanmıştır.

Bu çalışmada hayvansal gıda kaynaklı kırmızı et ürünlerinde GSBL varlığı ve tiplerinin belirlenmesi ilk kez gerçekleştirilmiştir. *CTX-M*, *SHV* ve *TEM* gen bölgelerinin varlığı PZR yöntemi ile araştırılmıştır ve %35,29 'unda *CTX-M* tipi, %23,52 'sinde *SHV* tipi beta laktamaz varlığına rastlanılırken izolatların hiçbirinde *TEM* tipi beta laktamaz varlığına rastlanılmamıştır.

Elde edilen bulgular insan ve hayvan kaynaklı izolatlardaki verileri desteklemesi açısından önem teşkil etmektedir ve diğer çalışmalara paralellik göstermektedir. Ayrıca ÇDST ve PZR yöntemi uygulanarak alınan sonuçlarda büyük oranda benzerlik dikkat çekmektedir.

### **SONUC ve ÖNERİLER**

1. Kıyma örneklerinden 100 adet Enterobacteriaceae izole edilmiştir.
2.  $\beta$ -laktamaz enziminin varlığı Seftazidim (CAZ), Seftriakson (CRO), Sefotaksim (CTX), Aztreonam (ATM) ve Klavulanik Asit/ Amoksisilin (AMC) antibiyotik diskleri kullanılarak çift disk sinerji yöntemiyle belirlenmiştir. Bu izolatların %68'sinin GSBL (+) olduğu bulunmuştur.
3. Suşların antibiyotik direnç profilleri ise disk difüzyon yöntemiyle tespit edilmiştir. Sonuçlar CLSI (2014) kriterlerine göre değerlendirilmiştir. Disk difüzyon duyarlılık testi sonuçlarına göre ampisilin, aztreonam, kloromfenikol, sefotaksim, seftriakson, tetrasiklin, gentamisin, imipenem, streptomisin ve sulfametoksazol antibiyotiklerine direnç oranları sırasıyla; %27,94, %2,95, %25,0, %14,70, %4,42, %1,50, %1,50 %10,29, %22,05 ve %17,70 olarak bulunmuştur.
4.  $\beta$ -laktamaz pozitif olduğu belirlenen izolatlarda GSBL tipleri olan *TEM*, *SHV* ve *CTX-M* gen bölgeleri varlığı PZR yöntemi uygulanarak doğrulanmıştır. %35,29 'inde *CTX-M* tipi, %23,52 'inde *SHV* tipi beta laktamaz varlığına rastlanılırken izolatların hiçbirinde *TEM* tipi beta laktamaz varlığına rastlanılmamıştır.

**Sonuç olarak;** Amasya ilinde tüketime sunulan hayvansal gıdaların çiğ ya da yeterince ısıl işlem görmeden tüketilmesi, diğer çevresel etmenlerle kontaminasyonların yüksek oranda olmasının sağlık açısından önemli bir potansiyel risk oluşturabileceği, bazı bakterilerin tespit edilmesiyle birlikte, hayvan kesim işleminin olduğu ve hayvansal gıdaların hazırlandığı ortamdaki hijyen ve sanitasyon koşullarının yeterli olmadığını kanıtlayan niteliktedir. Bu nedenle hayvansal gıdaların kesim ve dağıtımda veteriner hekim kontrolünden geçmiş gıda değeri olan hayvanların kullanılması, genel hijyen kurallarına uyulması gerektiği, gıda üretiminin çeşitli aşamaları ile satış sürecinde uygulanabilecek olan işlemlerin gıdayı olumsuz yönde etkilememesi ile birlikte tüketicilerin bilinçlendirilmesinin yanı sıra yasal denetimlerin daha fazla olması ve yeterli önlemlerin alınması gerektiği düşünülmektedir.

Gıda endüstrisindeki antibiyotiğe dirençli bakterilerin ve antibiyotikle ilişkili genlerin kontrolü sağlanmalı, temel gıda üretiminde antimikrobiyal dirençli bakterilerin ortaya çıkması ve yayılması önlenmelidir. Bunun için; mikrobiyal gıda kontaminasyonu ve antibiyotik dirençli bakterilerin ortaya çıkması ya da seçilimin önlenmesini içeren araştırma ve gözetim programlarının olması gerekmektedir.

Tarımda ve hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotiklerin bilinçsiz olarak kullanılması, bakterilerin antibiyotiklere direnç kazanmasına, ortamda bulunan az sayıdaki dirençli mutantların seçilmesine neden olmaktadır. Bakterilerdeki direnç mekanizmalarının aydınlatılmasının uygun antibiyotik seçimini kolaylaştıracağı, kullanılan ilaçlara direnç gelişiminin önlenmesinde yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Beta laktam antibiyotiklerin yaygın olarak kullanımı var olan direnç mekanizmalarının artışına sebep olmakta ve bu da tedavide sorunlara yol açmaktadır. GSBL pozitif mikroorganizmaların sıklıkla diğer antibiyotiklere de direnç göstermesi ve bu enfeksiyonlarda tedavi seçeneklerinin kısıtlı olması nedeniyle izole edilen mikroorganizmaların GSBL üretilip üretilmediğinin doğru olarak ve mümkün olduğunca kısa sürede saptanması gerekmektedir.

GSBL salgınlarının kontrol altına alınmasında, GSBL pozitif izolat sıklığının ve GSBL tiplerinin yayılımının belirlenmesi önemlidir.

PZR yönteminin fenotipik testlerle GSBL varlığı saptanamayan izolatlarda kullanılması daha elverişlidir. Çalışmamızda elde edilen verilere dayanarak, PZR ile ÇDST sonuçlarının duyarlılığı birbirine çok yakın olmasına rağmen, PZR'ın ÇDST'ye göre daha güvenilir bir yöntem olduğunu göstermektedir. PZR yönteminin kullanımının zor ve zahmetli olması, ayrıca bu yöntemin maliyetinin yüksek olması nedeniyle genellikle ÇDST gibi kolay, pratik, ucuz ve duyarlılığı yüksek bir yöntemin kullanılması tercih edilmektedir.

İleride bu konuyla ilgili yapılacak olan çalışmalarda, GSBL saptanan izolatların direnç profilinin plazmid aracılı olması yönünden araştırılması önem taşımaktadır ve bu plazmitlerin GSBL üretimine neden olup olmadıkları dizi analizi yöntemleriyle saptanabilir. Bu konuyla ilgili ülkemizde yapılan moleküler çalışmaların çok kısıtlı olması nedeniyle daha detaylı çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Türkiye açısından değerlendirildiğinde hastane kaynaklı dirençli Enterobakteriler hakkında veriler bulunurken, maalesef gıda kaynaklı epidemiyolojik verilere ulaşamamaktadır. Bu nedenle hastane ve gıda kaynaklı dirençli türlerin ayırt edilebilmeleri için özellikle moleküler epidemiyolojik analizler yapılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır.



## 6. KAYNAKÇA

Aarestrup, F.M., “Association Between the Consumption of Antimicrobial Agents in Animal Husbandry and The Occurrence of Resistant Bacteria Among Food Animals”, *Int J Antimicrob AG.*, 12: 279-285 (1999).

Aarestrup, F.M.,” Monitoring of Antimicrobial Resistance Among Food Animals: Principles and Limitations “, *J Vet Med SCI.*,51: 380-388 (2006).

Agrawal, P., Ghosh, A., Kumar, S., Basu, B., Kapil, K.,. “Prevalence of Extended Spectrum Beta-Lactamases Among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Tertiary Care Hospital” , *Indial J. Pathol Micr.*, 51:139-142 (2008).

Ahmet, Z., Houang, E., Hurley, R.,. “Pyrolysis Mass Spectrometry of Cephalosporin-Resistant *Enterobacter cloacae*”, *J Hosp Infect.*, 31:99 (1995).

Akçam, F.Z., Gönen, İ. Kaya, O., Yaylı, G.,. “Hastane İnfeksiyonu Etkeni Enterobakterilerde Beta-Laktam Antibiyotiklere Duyarlılık ve ESBL Sıklığının Araştırılması”, *SDÜ. Tıp Fakültesi Dergisi*, 11:6-9 (2004).

Akçay, S.S., Topkaya, A., Oğuzoğlu, N.,. “Hastane İnfeksiyonu Etkeni *Pseudomonas aeruginosa* Suşlarında İmipenem ve Meropenem Duyarlılığı”, *İnfeksiyon Dergisi*, 17:465-469 (2003).

Akova, M., ” Dikkat: Genişlemiş Spektrumlu Beta- laktamaz (GSBL) Var”, *Ankem Dergisi*,18(2): 98-103 (2004).

Al-Jasser, A.M., “Extended-Spectrum Beta-lactamases (ESBLs), a Global Problem”, *Kuwait Med J.*,38: 171-185 (2006).

Al-Muhtaseb, M., Kaygusuz, A.,. “Kan Kültürlerinden İzole Edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) Sıklığı”, *Ankem Dergisi*,22:175-182 (2008).

Alp, E., ve Doğanay, M.,. (Ed.). “*Monobaktam antibiyotikler*”, *Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi*, (2003).

Arda, M. “*Biyoteknoloji (Bazı temel ilkeler)*”, *Ankara: Kükem Derneği Bilimsel Yayınları*, (1995).

Avcı, E. “Gıdalardan İzole Edilen Enterobacteriaceae Türlerinde Genişletilmiş Spektrumlu Beta-laktamaz Üretimi ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara ,(2012).

Avşar, C. “Sinop İli Deniz Suyu ve Kara Midye (*Mytilus galloprovincialis* LAMARCK,1819)’nin Mikrobiyolojik Analizi ve İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarının Moleküler Karakterizasyonu”, Yüksek Lisans Tezi, *Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Sinop, (2013).

Bahçeci, Z. “Moleküler Biyoloji 2. Baskı. “ *Kırşehir: Öğrenci Kitabevi Yayınları*, (2002).

Baquero, F. "Antibiotic Resistance in Spain: What Can Be Done? Task Force of the General Direction for Health Planning of the Spanish Ministry of Health", *Clin Infect Dis.*, 23: 819-823 (1996).

Barton, M.D., "Antibiotic Use in Animal Feed and Its Impact on Human Health", *Nutrition Research Reviews.*, 13:279-299 (2000).

Bauernfeind, A., Schweighart, S., Grimm, H.,. "A New Plasmidic Cefotaximase in a Clinical Isolate of *Escherichia coli*", *J. Infection*, 18:294-298 (1990).

Bbosa, G.S., Mwebaza, N., Odda, J., Kyegombe, D.B., Ntale, M.,. "Antibiotics/antibacterial Drug Use, Their Marketing and Promotion During the Post-Antibiotic Golden Age and Their Role in Mergence of Bacterial Resistance", *Health*, 6: 410-425 (2014).

Bilgehan, H. (Ed). "Klinik Mikrobiyolojik Tani", *Ankara: Barış Yayınları*, (2002).

Bishop, Y.M. (Ed). "The Veterinary Formulary", *London*, (1996).

Björnerot, L., Franklin, A., Tysen, E.,. "Usage of Antibacterial and Antiparasitic drugs in Animals in Sweden Between 1988 and 1993", *Vet Rec.*, 139: 282-286 (1996).

Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J., Ogbolu, D.O., Piddock, L.J.V.,. "Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance", *Nat Rev Microbiol.*, 13: 42-51 (2015).

Blair, J.M.A., Webber, M.A., Baylay, A.J. Ogbolu, D.O. Piddock, L.J.V.,. "Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance", *Nat Rev Microbiol.*, 13: 42-51 (2015).

Bover-Cid, S., Hugas, M. Izquierdo-Pulido, M., Vidal-Carou, M.C.,. "Amino Acid-Decarboxylase Activity of Bacteria Isolated From Fermented Pork Sausages", *Int. J. Food Microbiol.*, 66:185-189 (2000).

Bradford, P.A., " Extended-Spectrum Beta-lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology and Detection of this Important Resistance Threat" , *Clin Microbiol Rev.*, 14 (4): 933-951 (2001).

Bradley, J.S., Garau, J. Lode, H. Rolston, K.V. Wilson, S.E., Quinn, J.P.,. "Carbapenems in Clinical Practise: A Guide to Their Use in Serious Infection", *Int. J. Antimicrob. Ag.*, 11:93-100 (1999).

Bush, K., Jacoby, G., Medeiros, A.,." A Functional Classification Scheme for Beta-Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure", *Antimicrob Agents CH.*, 39:1211-1233 (1995).

Canton, R., Gonzalez-Alba, J.M., Galan, J.C.,." CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion", *Front Microbiol.*, 3(110):1-19 (2012).

Cengiz, T. “Antibiyotik ve Kemoteropatiklerin Etki Mekanizmaları I-II. Tıp ve Diş Hekimliğinde Özel Mikrobiyoloji 1. Baskı”, **Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti.**, (2004).

Chaudhary, U., Aggarwal, R., “Extended Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) an Emerging Threat to Clinical Therapeutics”, **Indian J. of Med. Microbi.**, 22:75-80 (2004).

Chen, C.M., Huang, M., Chen, H.F., Ke, S.C., Li, C.R., Wang, J.H., Wu, L.T., “Fusidic Acid Resistance Among Clinical Isolates of Methicillin- Resistant *Staphylococcus aureus* in a Taiwanese Hospital”, **BMC Microbiol.**, 11:98 (2011).

Civek, S., “Sinop İlinde Satışa Sunulan Gıdalardan İzole Edilen Bakterilerin Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi”, (Yüksek Lisans Tezi), **Sinop Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**, Sinop (2015).

Collignon, P., “Resistant *Escherichia coli* – We are what eat”, **Clin Infect Dis.**, 49:195-201 (2009).

Çağlayanlı, A., Sümerkan, B., Doğanay, M., “Enterobacter Sepsisi: 35 Olgunun Klinik ve Epidemiyolojik Özellikleri”, **Flora**, 2: 91 (1991).

Çavuşoğlu, C., Dibek, M.A., Saydam, C.Ç., Göksel, S., Özkalay, N., Tümbay, E., “Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten *K. pneumoniae* İzolatlarında Plazmid Analizi ve Beta Laktamaz Tiplendirmesi”, **Flora.**, 7(1): 38-43 (2002).

Çelebi, S., Yüce, N., Çakır, D., Hacımustafaoğlu, M., Özkaya, G., “Çocuklarda Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* Enfeksiyonlarında Risk Faktörleri ve Klinik Sonuçları”, **J Pediatr Infect.**, 3:5-10 (2009).

Çelebi, S., Yüce, N., Çakır, D., Hacımustafaoğlu, M., Özkaya, G., “Çocuklarda Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *E. coli* Enfeksiyonlarında Risk Faktörleri ve Klinik Sonuçları; Beş Yıllık Çalışma”, **J Pediatr Inf.**, 3: 5-10 (2009).

Çolak, D. (Ed). “Antimikrobiyal ilaçlar ve etki mekanizmaları. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji” **Ankara: Güneş Kitabevi**, (1999).

David, G., Livermore, D.M., “Beta-lactamases in Laboratory and Clinical Resistance”, **Clin Microbiol Rev.**, 8:557-584 (1995).

Dean, D., Ferrero, D., McCharthy, M., “Comparison of Performance and Costeffectiveness of Direct Fluorescent-Antibody, Ligase Chain Reaction, and PCR Assays for Verification of Chlamydial Enzyme Immunoassays Result For Populations with a Low to Moderate Prevalance of *Chlamydia trachomatis* infection”, **J. Clin. Microbiol.**, 36:94-99 (1998).

Delton, M., “Enterobacteriaceae”, **Int J Antimicrob AG.**, 29(3): 9-22 (2007).

Demirdağ, K., Kizirgil, A., Özden, M., Kalkan, A., Felek, S., Toraman, Z.A.,  
“Hastane ve Toplum Kökenli *Klebsiella pneumoniae* ve *Escherichia coli* Suşlarında  
Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Sıklığının Araştırılması”, **Ankem  
Dergisi**,15:748-752 (2001).

Doğanay, M. (Ed). “*İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*”, **İstanbul: Nobel Tıp  
Kitabevleri**, (2002).

Donnenberg, M.S. (Ed). “*Enterobacteriaceae.Mandell, Douglas and Bennett's  
Principles and Practice of Infectious Diseases*”, **Philadelphia: Elsevier Churchill  
Livingstone**, (2005).

EFSA., “Technical Guidance Update of the Criteria Used in the Assessment of  
Bacterial Resistance to Antibiotics of Human or Veterinary Importance Prepared by  
the Panel on Additives and Products or Substances Used in Animal Feed”, **The  
EFSA Journal**, 732: 1-15 (2008).

Emborg, H.D., Andersen, J.S., Seyfarth, A.M., Boel, J., Weneger, H.C.,. “Relations  
between the Occurance of Resistance to Antimicrobial Growth Promoters Among  
*Enterococcusfaecium* Isolated From Broilers and Broiler Meat”, **Int. J. Food  
Microbiol.**,84:273-284 (2003).

Ensari, N. Y.” *Moleküler Biyoloji 1. Baskı*”, **Diyarbakır:Dicle Üniversitesi Basımevi  
Müdürlüğü**, (2002).

Erdem, B. “*Enterobacteriaceae*” , **Ankara: Güneş Kitabevi**, (1999).

Ergin, S. “Türkiye’nin Değişik Bölgelerinden Toplanan Çeşitli Su Örneklerinde  
Hepatit E Virüsü RNA’larının Araştırılması”, **İstanbul: Cerrahpaşa Tıp Fakültesi  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı**, (1998).

Erol, İ. “Gıdalarda *Salmonella*’ların Saptanmasında İmmuno Manyetik Separasyon  
(IMS) ve Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) Tekniklerinin Kullanılması” **Ankara:  
T.S.K. ’leri 1. Gıda Kontrol Sempozyumu**,

Farmer, J.J., Boatwright, K.D., Janda, J.M., “Enterobacteriaceae: Introduction and  
Identification” ,(eds), **Manual of Clin Microbiol.**, 9th ed. Washington DC: ASM  
Press; 649–669 (2009).

Forbes, B.A., Sahm, D.F., Weissfeld, A.S.,. “ Pseudomonas, Burkholderia, and  
Similar Organisms”, **Bailey/Scott’s Diagnostic Microbiology.**, 385-398 (2002).

Franklin, A., Acar, J., Anthony, F., Gupta, R., Nicholls, T., Tamura, Y., Thompson,  
S., Threlfall , E.J. , Vose, D., Van Vuuren, M., White, D.G., Wegener, H.C.,  
Costarrica, M.L.,. “Antimicrobial Resistance: Harmonisation of National  
Antimicrobial Resistance Monitoring and Surveillance Programmes in Animals and  
in Animal-Derived Food”, **Rev Sci Tech.**,20: 859–870 (2001).

Giamarellou, H., and Antoniadou, A., “Antibiotic therapy. Antipseudomonal  
antibiotics”, **Med Clin North America.**, 85, 19-42 (2001).

- Gonullu, N., Aktas, Z., Kayacan, C.B., Salcioglu, M., Carattoli, A., Yong, D.E., Walsh, T.R., Dissemination of CTX-M-15 Beta-Lactamase Genes Carried on Inc FI and FII Plasmids Among Clinical Isolates of *Escherichia coli* in a University Hospital in Istanbul, Turkey”, **J. Clin. Microbiol.**,46:1110-1112 (2008).
- Guarino, A., Giannella, R., Thompson, M.R., “*Citrobacter freundii* Produces an 18-Amino-Acid Heat-Stable Enterotoxin Identical to the 18-Amino-Acid *Escherichia coli* Heat-Stable Enterotoxin (ST Ia)”, **Infect Immun.**,57: 649–652 (1989).
- Guerra, B., Junker, E., Schroeter, A., Malorny, B., Lehmann, S., Helmuth, R., Phenotypic and Genotypic Characterization of Antimicrobial Resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry”, **J. Antimicrob. Chemoth.**,52: 489–492 (2003).
- Gupta, R., Rauf, S.J. Singh, S. Smith, J., Agraharkar, M.L., “Sepsis in a renal transplant recipient due to *Citrobacter braakii*”, **Southern Med. J.**,96:796–798 (2003).
- Gülay, Z. (Ed). “İndüklenebilir Beta-laktamazların Önemli ve Sorunlu Gram-Negatif Bakteri İnfeksiyonları, Birinci Baskı”, **Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi**, (2004).
- Gülay, Z. (Ed). “Gram Olumsuz Bakterilerdeki Direncin Moleküler Temelleri 1. Baskı”, **İzmir: Hastane infeksiyonları**, (2003).
- Gülay, Z., “Gram Negatif Çomaklarda Antibiyotik Direnci, 2003-2004 Türkiye Haritası”, **Ankem Dergisi**,19(2): 66-77 (2005).
- Gülay, Z., “Hücre Duvar Sentezini Etkileyen Antibakteriyaller”, **Ankem Dergisi**, 17: 192-204 (2003).
- Gündoğan, N., Çıtak, S., Yalçın, E., “Virulence Properties of Extended Spectrum Beta- Lactamase-Producing *Klebsiella* species in Meat Samples”, **J. Food Protect.**,74:559-564 (2011).
- Gür, D. “Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar (GSBL) İçinde Beta -laktamazlar ve Klinik Önemi. Mezuniyet Sonrası Eğitim Dizisi 2”, **Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi**, (2005).
- Gür, D. “GSBL’lerin Genel Özellikleri ve GSBL Tipleri: Genişlemiş Spektrumlu Beta laktamazlar, Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar”, **Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi**, (2004).
- Gür, D., “Gram Negatif Bakterilerde Antibiyogram Yorumu”, **Ankem Dergisi**, 23: 188-192 (2009).
- Hall, L.M., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M., Akalin, H.E., “OXA-11, an Extended Spectrum Variant of OXA-10 (PSE-2) Beta-Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*” **Antimicrob Agents Chemother.**, 37(8):1637- 1644 (1993).

Harakeh, S., Saleh, I., Zouhairi, O., Baydoun, E., Barbour, E., Alwan, N.,.. “Antimicrobial Resistance of *Listeria monocytogenes* Isolated from Dairy-Based Food Products”, *Science of the Total Environment.*, 407: 4022-4027 (2009).

Harekeh, S., Yasmine, H., Gharios, M., Barbour, E., Hajjar, S., El-Fadel, M., Toufeili, I., Tannous, R.,.. “ Isolation, Molecular Characterization and Antimicrobial Resistance Patterns of *Salmonella* and *Escherichia coli* Isolates from Meat-Based Fast Food in Lebanon”, *Science of the Total Environment.*, 341: 33-44 (2005).

Hodges, G.R., Degener, C.E., Charlene, C.E., Barnes, W.G.,.. “Clinical Significance Of *Citrobacter* Isolates” *AM J Clin Pathol.*,70:37-40 (1978).

Hoşgör, M., Özkan, F., Yapar, N., Tünger, A., Özinel, M.A.,.. “Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Belirlenmesinde Çift Diskli Sinerji Testi İle Üç Boyutlu Yöntemin Karşılaştırılması”, *Klinik Dergisi*,11:59-60 (1998).

<http://lup.lub.lu.se/luur/download?func=downloadFile&recordOId=3045564&fileOId=3045665>Erişim tarihi: 10.04.2015

<http://www.lahey.org/Studies> Erişim:06.02.2015.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=543> Erişim: 26.02.2013.

<https://hipokratinyeri.wordpress.com> antibiyotiklerin-etki-mekanizmaları Erişim: /2014/05/01.

İnternet: Sanger DNA dizi analizi, <http://www.mcb.mcgill.ca/~hallett/> GEP/ Lecture15/Image31.gif (2007).

Jacoby, G.A., “Genetics of Extended–Spectrum Beta- lactamases”, *Eur J Clin Microbiol.*,13 (1): 2-11 (1994).

Jacoby, G.A., Munoz-Price, L.S.,.. “The New Beta-Lactamases”, *N. Engl. J. Med.*,380-391 (2005).

JEHL, F., Chomarat, M., Weber, M., and Gerard, A.,.. “Antibiyotik Duyarlılık Testinden Reçeteye”, *Biomerieux Yayınları*, (2004).

Johnson, J.R., Sannes, M.R., Croy, C., Johnston, B., Clabots, C., Kuskowski, M.A., Bender, J., Smith, K.E., Winokur, P.L., Belongia, E.A.,..” Antimicrobial Drug-Resistant *E. coli* from Humans and Poultry Products, Minnesota and Wisconsin, 2002–2004”, *Emerging Infectious Diseases.*,13: 838–846 (2003).

Jones, D.D., Law, R., Bej, A.K.,.. “Detection of *Salmonella spp.* in Oyster Using Polymerase Chain Reactions (PCR) and Gene Probes”, *J. Food Sci.*,58:1191 (1993).

Kaçmaz, B., Ece, G.,.. “Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Saptanmasında İkinci, Üçüncü Ve Dördüncü Kuşak Sefalosporinlerin Çift Disk Sinerji Testinde Kullanılması ve Sefoksitin Duyarlılığı”, *Ankem Dergisi*,24:61-64 (2010).

- Kalafatoğlu, H., “Gıda Endüstrisinde Mikrobiyal Kaynaklı Kontaminasyonlar ve Önlemleri”, *Gıda.*, 20(3):137-141 (1995).
- Kartal, E.D. “Gıda Kaynaklı İnfeksiyonlar”, *Ankara: Zoonotik Hastalıklar Sempozyumu*, (2006).
- Kayaalp, S.O. “Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 9. Baskı”, *Ankara: Hacettepe-Tıp*, (2000).
- Khachatryan, A.R., Hancock, D.D., Besser, T.E., Call, D.R.,. “Role of Calf- Adapted *Escherichia coli* in Maintenance of Antimicrobial Drug Resistance in Dairy Calves”, *APPL Environ Microb.*, 71: 752–757 (2004).
- Kıran, F., Osmanağaoğlu, Ö.,. “Laktik Asit Bakterilerinin (LAB) İdentifikasyonunda, Tiplendirilmesinde Kullanılan Moleküler Yöntemler”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*,27:62-74 (2011).
- Kimura, S.S., Ishii, Y., Tateda, K., Yamaguchi, K.,. “Predictive Analysis of Ceftazidime Hydrolysis in CTX-M-type Beta-Lactamase Family Members with a Mutational Substitution at Position 167”, *Int. J. Antimicrob. Ag.*,29:326-331 (2007).
- Kumar, S., Varela, M.F., “ Molecular Mechanisms of Bacterial Resistance to Antimicrobial Agents”, *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*, (2013).
- Lavilla Lerma, L., Benomar, N., Galvez, A., Abriouel, H.,. “Prevalence of Bacteria Resistant to Antibiotics and/or Biocides on Meat Processing Plant Surfaces Throughout Meat Chain Production”, *Int. J. Food Microbiol.*,161: 97-106 (2013).
- Lawrence, P.M. “Cures Out of Chaos: How Unexpected Discoveries Led To Breakthroughs in Medicine and Health”, *Harwood Academic Publishers*, (1998).
- Lei, T., Tian, W., He, L., Huang, X.H., Sun, Y.X., Deng, Y. T., Sun, Y., Lv, D.H., Wu, C.M., Huang, L.Z., Shen, J.Z., Liu, J.H., “Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Food Animals, Animal Food Products and Companion Animals in China”, *Vet Microbio.*, 146: 85-89 (2010).
- Levy, S.B., “ Microbial Resistance to Antibiotics, An Evolving and Persistent Problem”, *Lancet*, 10:83-88 (1982).
- Livermore, D.M., “Beta-lactamases in Laboratory and Clinical Resistance”, *Clin Microbiol Rev.*, 8: 557-584 (1995).
- Mac Kinnon, J.D., “The Proper Use and Benefits of Veterinary Antimicrobial Agents in Swine Practice”, *Vet Microbio .*, 35: 357-367 (1993).
- Marchandin, H., Carriere, C., Sirot, D., Jean-Pierre, H., Darbas, H.,. “ TEM-24 Produced by Four Different Species of Enterobacteriaceae Including *Providencia rettgeri*, in a Single Patient “, *Antimicrob Agents Chemother.*, 43: 2069-2073 (1999).

Marino, M., Maifreni, S., Moret, S., and Rondinini, G., “The Capacity of Enterobacteriaceae Species to Produce Biogenic Amines in Cheese” *Lett Appl Microbiol.*, 32: 169-173 (2000).

Martinez-Martinez, L., Hernandez-Alles, S., Alberti, S., Tomas, J., Benedi, V., Jacoby, G., “ In vivo Selection of Porin-Deficient Mutants of *Klebsiella pneumoniae* with Increased Resistance to Cefoxitin and Expanded Spectrum Cephalosporins ”, *Antimicrob Agents Chemother.*, 40: 342-348 (1996).

Matthew, M., “Plasmid-Mediated Beta-lactamases of Gram-Negative Bacteria: Properties and Distribution”, *J Antimicrob Chemoth.*,5: 349-358 (1979).

Morris, D., O’Hare, C., Glennon, M., Maher, M., Corbett-Feeney, G., Cormican, M., “Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Ireland, Including a Novel Enzyme, TEM-102” *Antimicrob Agents Chemother.*, 47 (8): 2572– 2578 (2003).

Mugnaioli ,C., Luzzaro, F., Filomena, L., Gioconda, M., Brigante, S., Perili, M., “CTX-M-Type Extended Spectrum Beta-Lactamases in Italy: Molecular Epidemiology of an Emerging Countrywide Problem”, *Antimicrob Agents Chemother.*, 50: 2700–2706 (2006).

Murray, P., Rosenthal, K., Pfaller, M.,. “ Medical Microbiology”, *Pennsylvania: Elseiver Mosby.*,323-339 (2005).

Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., and Pfaller, M.A.,. “*Klinik Mikrobiyoloji (1)*”, *Ankara: Atlas Kitapçılık*, (2009).

Mülazimoğlu, L., “1986’ dan Günümüze Karbapenemler” , *Ankem Dergisi*, 24: 33-35 (2010).

Nazik, H., Öngen, B., Yildirim, E.E., Ermiş, F.,. “High prevalence of CTX-M-type Beta-Lactamase in *Escherichia coli* Isolates Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) and Displaying Antibiotic Co-Resistance”, *AFR J Microbiol Res.*, 5:44-49 (2011).

Nicasio, A.M., Kuti, J.L., Nicolau, D.P.,. “The Current State of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli in North America”, *Pharmacotherapy*, 28:235-49 (2008).

Nordmann, P., Ronco, E., Naas, T., Duport, C., Michel-Briand, Y., Labia, R.,. “Characterization of a Novel Extended-Spectrum Beta-Lactamases from *Pseudomonas aeruginosa*”. *Antimicrob Agents Chemother.*, 37: 962-969 (1993).

O’Brien, T.F., “ Emergence, Spread and Environmental Effect of Antimicrobial Resistance: How Use of An Antimicrobial Anywhere Can Increase Resistance to Any Antimicrobial Anywhere Else” , *Clin Infect Dis.*, 34, S78–S84 ( 2002).

Oh, E-J., Seungok, L., Park, Y-J.,. “Prevalance of Metallo-Beta-Lactamase Among *Pseudomonas* and *Acinetobacter baumannii* in a Korean University Hospital and Comparison of Screening Methods for Detecting Metallo-Beta-Lactamase”, *J Microbiol Meth*, 54:411-418 (2003).



Oskay, M., Tamer, A.U., “Streptomyces Kökenli Antibiyotiklerin Dünyü, Bugünü ve Yarını”, *Journal of New World Sciences Academy*, 4:48-60 (2009).

Öncül, O.” *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Enfeksiyonları ve Tedavisi”, *Ankara: Klinik 2007 XIII.Türk klinik mikrobiyoloji ve enfeksiyon hastalıkları kongresi*, (2007).

Österblada, M., Kilpia, E., Hakanena, A., Palmub, L., Huovinena, P., “Antimicrobial Resistance Levels of Enterobacteriaceae Isolated From Minced Meat”, *J. Antimicrob. Chemoth.*,44:298-299 (1999).

Özsoy, M.F., Öncül, O., Yıldırım, A., Pahsa, A.,” Genişlemiş Spektrumlu Beta - Laktamazlar: Klinik Önemi ve Getirdiği Sorunlar”, *Flora*, 6(Ek 1): 03-23 ( 2001).

Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B., Bonomo, R. A., “Extended-Spectrum Beta -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M- Type  $\beta$ -Lactamases”, *Antimicrob Agents Chemother.*, 47 (11): 3554–3560 (2003).

Paterson, D.L., Bonomo, R.A., “ Extended-Spectrum Beta-lactamases: A Clinical Update”, *Clin Microbiol Rev.*, 18(4):657-686 (2005).

Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K.M., Bonomo, R.A. “The Continuing Challenge of ESBLs”, *Curr Opin Pharmacol.*, 7: 459-469 (2007).

Persing, H.D., “Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches”, *J Clin Microbiol.*, 29: 1281-1285 (1991).

Petri, W.A. Jr., “Penicillins, Cephalosporins, and Other  $\beta$ -lactam Antibiotics”, *The Pharmacological Basis of Therapeutics.*, New York, USA, 11th edition, pp 1127-1154 (2006).

Petrosino, J., Palzkill, T.,. “Systematic Mutagenesis Of The Active Site Omega Loop of TEM-1 Beta-Lactamase”, *J. Bacteriol.*,7:1821-1828 (1996).

Philippon, A., Arlet, G., Lagrange, P.H., “Origin and Impact of Plasmid Mediated Extended-Spectrum Beta-Lactamases”, *EUR J Clin Microbiol.*,13:17-29 (1994).

Piddock, LJV., Turner, H.L.,. “Activity of Meropenem Against Imipenem-Resistant Bacteria and Selection *In Vitro* of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae”, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 11:1186-1190 (1992).

Pitout, J.D., and Laupland, K.B.,. “ Extended-Spectrum Beta-lactamase-Producing Enterobacteriaceae: An Emerging Public-Health Concern” , *Lancet Infect Dis.*, 8: 159-166 (2008).

Pitout, J.D., Nordmann, P., Laupland, K.B., Poirel, L.,. “Emergence of Enterobacteriaceae Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) in the Community”, *J. Antimicrob. Chemoth.*,56:52-59 (2005).

Pommerville, J.C., “Alcarno’s Fundamentals of Microbiology”, ***Eight Edition, Jones and Bartlett Learning***, (2007).

Poole, K., “Efflux-Mediated Multiresistance in Gram Negative Bacteria”, ***Clin Microbio Infect.***, 10: 12-26 (2004).

Qinn, J.P., “Clinical Significance of Extended-Spectrum Beta-lactamases”, ***Eur J Clin Microbiol.***,13 (Suppl 1): 39 (1994).

Randegger, C. C., Hachler, H., “Real-Time PCR and Melting Curve Analysis for Reliable and Rapid Detection of SHV Extended-Spectrum Beta-Lactamases”, ***Antimicrob Agents Chemother.***, 45 (6): 1730-1736 (2001).

Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z., Jamil, K., “Antimicrobial Drug Resistance in Strains of Escherichia coli Isolated from Food Sources”, ***Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo***, 56: 341-346 (2014).

Rice, L.B., Sahm, D., Binomo, R.A., “ Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents “ , ***Manual of clinical microbiology.***, Washington ASM Press p. 1074-101 (2003).

Rice, L.B., Sahm, D., Bonomo, R.A., “ Shiga-Like Toxin II-Related Cytotoxins in *Citrobacter freundii* Strains from Humans and Beef Samples”, ***Infect Immun.***, 61:534–543 (2003).

Rottier, W.C., Ammerlaan, H.S., Bonten, M.J.,. “Effects Of Confounders and Intermediates on the Association of Bacteraemia Caused by Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and Patient Outcome: A Metaanalysis”, ***J. Antimicrob. Chemoth.***,67:1311–1320 (2012).

Sarı, H. “Karbapenemlere Dirençli Gram-Negatif Basil İzolatlarında İmipenem-EDTA / Meropenem-EDTA Disk Yöntemi ve Modifiye Hodge Testi ile Metallo-Beta- Laktamaz Varlığının Araştırılması”, Uzmanlık tezi, ***Kartal Dr.Lütfi Kırdar Eğitim ve Araştırma Hastanesi İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği***, İstanbul, (2005).

Schito, G.C., “Why Fosfomycin Trometamol as First Line Therapy for Uncomplicated UTI? “ , ***Int J Antimicrob AG.***, 22: 79-83 (2003).

Sharma, P., Tomar, S.K., Goswami, P., Sangwan, V., Singh, R., “ Antibiotic Resistance Among Commercially Available Probiotics”, ***Food Res Int.***, 57: 176-195 (2014).

Sirot, D.,” Extended- Spectrum Plasmid-Mediated Beta-lactamases“, ***J Antimicrob Chemoth.***,36 (Suppl A): 19-34 (1995).

Stürenburg, E., Mack, D.,. “Extended- Spectrum Beta-Lactamases Implications for the Clinical Microbiology Laboratory, Therapy And Infection Control”, ***J. Infection***,47:273-295 (2003).

- Şanlı, Y., Tuncer, Ş. D., Küçükersan, K., ve Filazi, A., “Stabilize Rumen Ekstraktının Broyler Rasyonlarında Kullanılması”, **İstanbul:Uluslararası tavukçuluk fuarı ve konferansı 3-6 Haziran bildiriler kitabı**, (1999).
- Tärnberg, M., “Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing Enterobacteriaceae: Aspects on Detection, Epidemiology and Multi-Drug Resistance”, **Linköping University medical dissertations.**, No. 1300, ISBN 978-91-7519-938-2, Sweden (2012).
- Tham, J., “Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Epidemiology, Risk Factors, and Duration of Carriage,” **Department of Clinical Sciences/Malmö Infectious Disease Research.**, Sweden , (2012).
- Threlfall, E.J “Antimicrobial Drug Resistance in Salmonella: Problems and Perspectives in Food- and Water-Borne “ , **İstanbul: Infections FEMS Microbiology Reviews, Tıp Kitabevleri**, (2002).
- Timko, J. , “Changes of Antimicrobial Resistance and Extended-Spectrum Beta-lactamase Production in *Klebsiella spp.* Strains”, **J Antimicrob Chemoth.**,10 (4): 212-215 (2004).
- Töreci, K. (Ed). “Enterobacteriaceae Genel Özellikleri İçindeİnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi”, **İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri**, (2002).
- Töreci, K. (Ed). “Klebsiella Türleri İçinde İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Cilt 2”,**İstanbul: Nobel Matbaacılık**, (2002).
- Tunail, N., ve Köşker, Ö., “Süt Mikrobiyolojisi”, **Ankara: Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınlanmamış Ders Kitabı**, (1989).
- Türkyılmaz, S., Esendal, Ö.,. “Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve Mikrobiyolojide Kullanım Alanları”, **Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.**,8:71-76(2002).
- Unat, E.K (Ed). “Tıp Bakteriyolojisi ve Virolojisi”, **İstanbul: Dergah Yayınları**, (1986).
- Urbanov, E., Pacova, Z., “Identification of Citrobacter Species and Their Occurrence in Raw Products and Foods (in Czech)”, **Vet Med (Praha).**, 42:87–91 (1997).
- Ünlütürk, A., ve Turantaş, F.,. “Gıda Mikrobiyolojisi”, **İzmir: Mengi Tan Basımevi**, (1998).
- Vakulenko, S.B., Mobashery, S., Van Hoek.,. “Antimicrobial Resistance Gene Detection in Beneficial and Pathogenic Food Related Bacteria.”, **Front Microbiol.**, (2009).
- Wade, J.J., Desai, N., Casewall M.W.,. “Hygienic Hand Disinfection for the Removal Epidemic Vancomycin Resistant *Enterococcus faecium* and Gentamisin Resistant *Enterobacter cloacae*”,**J Hosp Infect.**,18:211 (1991).
- Waksman, S.A., "What is an Antibiotic or an Antibiotic Substance?", **Mycologia.**, 39: 565-569 (1947).

- Wegener, H.C., “ Antibiotic in Animal Feed and Their Role in Resistance Development”, *Curr Opin Microbiol.*,6: 439-445 (2003).
- White, D.G., Zhao, S., Wagner, D.D., Mcdermott, P.F., “Antimicrobial Resistance of Foodborne Pathogens.”, *Microbes and Infection.*, 4: 405-412 (2002).
- White, R.L., Friedrich, L., Burgess, D., Warkentin, D., Bosso, J.,. “ Comparative in Vitro Pharmacodynamics of Imipenem and Meropenem Against *Pseudomonas aeruginosa*,”*Antimicrob Agents Chemother.*, 40, 904-908 (1996).
- Willke Topçu, A. , Söyletir, G. ,Wolcott, J.M., Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methods”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 5: 370-386 (1992).
- Woerther, P.L., Burdet, C., Chachaty, E. and Andremont, A.,. “Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M”, *Clinical Microbiology Reviews.*,26, 4, 744 –758 (2013).
- Wolcott, J.M., “Advances in Nucleic Acid-Based Detection Methods”, *Clin. Microbiol. Rev.*, 5: 370-386 (1992).
- Wright, G.D., “Bacterial r-Resistance to Antibiotics: Enzymatic Degradation and Modification”, *Adv Drug Delivery Rev.*, 57(10):1451-70 (2005).
- Yu, Y., Ji, S., Chen, Y., Zhou, W., Wei, Z., Li, L., Ma, Y.,. “Resistance of Strains Producing Extended-Spectrum Beta-Lactmases And Genotype Distribution in China”, *J Infection.*,54 (1), 53-57 (2007).
- Yüce, A., “Antimikrobik İlaçlara Direnç Kazanma Mekanizmaları” , *Klinik Dergisi*, 14: 41-46 (2001).

## 7. ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı: SAAT, Tuğçe

Uyruğu: T.C

Doğum tarihi ve yeri: 14.08.1990, Karabük

Medeni hali: Bekar

Telefon: 0 (506) 954 29 46

e-mail: [tugcesaat@hotmail.com](mailto:tugcesaat@hotmail.com)

Eğitim Derecesi	Eğitim Birimi	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	AMASYA Üniversitesi/ Biyoloji	2017
Lisans	AMASYA Üniversitesi/ Biyoloji	2014
Lise	Karabük 75.yıl Anadolu Lisesi	2009

### İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2016	Kariyer Özel Öğretim Kursu	Biyoloji Öğretmeni
2017	Karabük Bahçeşehir Koleji	Biyoloji Öğretmeni
Yabancı Dil	İngilizce	

### Yayınlar

1. Saat, T., Yıldırım, T., Amasya'da tüketime sunulan kıyma örneklerinden izole edilen Enterobacteriaceae türlerinde  $\beta$ -laktamaz aktivitelerinin belirlenmesi. 5. Ulusal Moleküler Biyoloji ve Biyoteknoloji Kongresi, 18-21 Temmuz 2016, Konya.

2. Ceren Yavuz, Tuba Yıldırım, Belgin Sırıken, Tuğçe Saat “Kıyma Örneklerinden İzole Edilen Koliform Grubu Bakterilerin Antibiyotik Direnci ve İntegriz Gen Varlığının Saptanması” 8. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi, 4-7 Haziran 2014, Ankara

### **Kurs ve Sertifikalar**

Amasya Üniversitesi Merkezi Araştırma Uygulama Laboratuvarı Uygulama ve Araştırma Merkezi PZR Temelli Moleküler Tiplendirme Yöntemleri Çalıştayı /05.2016

Amasya Üniversitesi Eğitim Fakültesi Pedagojik Formasyon Sertifikası /01.2015

Hospita-train Acıbadem Üniversitesi Tükenmişlik Sendromu ve Başa Çıkma Yolları Eğitim Sertifikası /12.2012

Hospita-train Acıbadem Üniversitesi Stres Yönetimi Eğitim Sertifikası /12.2012

Hospita-train Acıbadem Üniversitesi Hasta ve Hasta Yakını İlişkileri Yönetimi Eğitim Sertifikası /12.2012

Hospita-train Acıbadem Üniversitesi Profesyonizm Eğitim Sertifikası /12.2012

Hospita-train Acıbadem Üniversitesi Hasta Odaklı Hizmet Eğitim Sertifikası /12.2012

Hospita-train Acıbadem Üniversitesi Hasta Odaklı Hizmet Eğitim Sertifikası /12.2012

Hospita-train Acıbadem Üniversitesi Sağlıkta İSO, HKS ve JCI Standartları Eğitim Sertifikası /12.2012

### **Hobiler**

Film izlemek, kitap okumak, seyahat etmek