

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ**  
**KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ**  
**SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YEŞİL YAPRAKLI SEBZELERDEN İZOLE EDİLEN *ESCHERICHIA COLI***  
**İZOLATLARINDA ANTİBİYOTİK DİRENÇ DURUMU VE GENİŞLEMİŞ**  
**SPEKTRUMLU BETA - LAKTAMAZ AKTİVİTESİ**

**Ayşegül ŞAHİN BİLEK**

**MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Dr. Öğretim Üyesi Sibel KIZIL**

**2019- KIRIKKALE**

## İÇİNDEKİLER

İçindekiler	i
Önsöz	iii
Tablolar	iv
Fotoğraflar	iv
<b>ÖZET</b>	v
<b>SUMMARY</b>	vi
<b>1. GİRİŞ</b>	1
1.1. <i>E. coli</i> Genel Özellikleri	3
1.2. <i>E. coli</i> 'nin Antibiyotik Direnç Özellikleri	5
1.2.1. Antibiyotikler	5
1.2.2. Beta-Laktam Antibiyotikler	6
1.3. Beta-Laktamazlar	7
1.3.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz	9
1.3.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Tiple	9
1.4. GSBL Tanı Yöntemleri	11
1.4.1. GSBL Tarama Testleri	11
1.4.2. GSBL Doğrulama Testleri	11
1.4.2.1. Kombine Disk Sinerji Yöntemi	11
1.4.2.2. Çift Disk Sinerji Yöntemi	11
1.4.2.3. E-Test Yöntemi	12
1.4.2.4. Mikrodilüsyon Yöntemi	12
1.4.2.5. Üç Boyutlu Test	12

<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM</b>	13
2.1. Örneklerin Toplanması	13
2.2. Kullanılan Besiyerleri	14
2.2.1 mTSB Selective Enrichment Broth (Merck 1.09205)	14
2.2.2. EMB Agar (Eosin Methylene-Blue Agar)	15
2.2.3. Mueller-Hinton Agar (CLSI)	16
2.3. Ön Zenginleştirme	17
2.4. Selektif-Diferensiyel Katı Besiyerine Ekim	17
2.5. Biyokimyasal Testler	18
2.5.1. Oksidaz Testi	18
2.5.2. İndol Testi	19
2.5.3. Methyl-Red ve Voges-Proskauer Testi	20
2.5.4. Citrate Testi	20
2.5.5. Üre Testi	21
2.6. Disk Difüzyon Testi	23
<b>3. BULGULAR</b>	24
3.1. Antibiyotik Direçlilik Test Sonuçları	24
<b>4. TARTIŞMA</b>	26
<b>5. SONUÇ</b>	28
<b>KAYNAKLAR</b>	29
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	35

## ÖNSÖZ

Son yıllarda sağlıklı ve dengeli beslenme amacıyla çiğ sebze tüketimi tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de artış göstermektedir. Tarladan sofraya kadar geçen süreçte sebzeler toprak, sulama yöntemi ve hayvan dışkılarının gübre olarak kullanılması gibi nedenlerle mikrobiyel kontaminasyona uğramakta; gıda kaynaklı enfeksiyonlara ve/veya mikrobiyel intoksikasyonlara neden olmaktadır. Çiğ olarak tüketilen yeşil yapraklı sebzeler, tüketicilerin gıda kaynaklı hastalıklara yakalanma riskini artırmaktadır. *E. coli* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla beta-laktam grubu antibiyotiklerin kullanılması ile birlikte bakterilerde antimikrobiyal direnç oluşmakta, oluşan antibiyotik direnci hızla yayılmakta ve enfeksiyonların prevalansında artış görülmektedir. Bu çalışmada, Beypazarı İlçesi'nde semt pazarlarında tüketime sunulan yeşil yapraklı ve çiğ tüketilen çeşitli sebzelerden, marul (*Lactuca sativa*), kıvırcık (*Crispa sativa*), dereotu (*Anethum graveolens*), maydonoz (*Petroselinum crispum*) ve roka (*Eruca vesicaria ssp*) 20'şer adet olmak üzere toplam 100 adet numune analize alınmış; izole edilen *E. coli* izolatlarının antibiyotik direnç durumu ve genişlemiş beta-laktamaz aktivitesinin araştırılması amaçlanmıştır.

Yüksek Lisans Tez çalışmasının her aşamasında değerli yardım ve ilgilerini esirgemeyen, tez konumun belirlenmesinde ve yürütülmesinde deneyimlerinden yararlandığım, danışmanım Sayın Dr. Öğretim Üyesi Sibel KIZIL ile Doç. Dr. Nilgün ÜNAL'a, sağladıkları imkanlarla araştırmanın yapılmasında katkıda bulunan, desteklerini eksik etmeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Değerli Hocam Sayın Prof. Dr. Murat YILDIRIM ve ayrıca zor anlarımda desteğini esirgemeyen Anneme, Babama ve Eşime teşekkür ederim.

## **TABLolar**

<b>Tablo 1.</b> <i>E. coli</i> suşları ve yaptığı hastalıkların kronolojik özeti	5
<b>Tablo 2.</b> Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri	8
<b>Tablo 3.</b> Semt pazarlarından alınan örnekler	13
<b>Tablo 4.</b> Disk difüzyon testi sonuçları	25

## **FOTOĞRAFLAR**

<b>Fotoğraf 1.</b> Ön Zenginleştirme	17
<b>Fotoğraf 2.</b> EMB Agarda metalik röfle veren <i>E.coli</i> kolonileri	18
<b>Fotoğraf 3.</b> Biyokimyasal Testler	22
<b>Fotoğraf 4.</b> Disk Difüzyon Testi	25

## ÖZET

### Yeşil Yapraklı Sebzelerden İzole Edilen *Escherichia coli* İzolatlarında Antibiyotik Direnç Durumu ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Aktivitesi

Son yıllarda sağlıklı ve dengeli beslenme amacıyla çiğ sebze tüketimi tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de artış göstermektedir. Çiğ olarak tüketilen yeşil yapraklı sebzeler, tüketicilerin gıda kaynaklı hastalıklara yakalanma riskini artırmaktadır. *E. coli* enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla beta-laktam grubu antibiyotiklerin kullanılması ile birlikte bakterilerde antimikrobiyal direnç oluşmakta, oluşan antibiyotik direnci hızla yayılmakta ve enfeksiyonların prevalansında artış görülmektedir. Bu çalışmada, Ankara'nın Beypazarı İlçesi'nde bulunan 4 farklı semt pazarından tüketime sunulan yeşil yapraklı ve çiğ tüketilen çeşitli sebzelerden marul (*Lactuca sativa*), kıvırcık (*Crispa sativa*), dereotu (*Anethum graveolens*), maydonoz (*Petroselinum crispum*) ve roka (*Eruca vesicaria ssp*) 20'şer adet olmak üzere toplam 100 adet numune analize alınmış; izole edilen *E. coli*'lerin antibiyotik direnç durumu ve genişlemiş beta-laktamaz aktivitesi araştırılmıştır. Sadece 2 numunede (roka ve marul) *E. coli* (% 2) izole edilmiş ve *E. coli* izolatlarının Kirby-Bauer Disk Difüzyon Testi ile antibiyogramları yapılmıştır (Klinik Laboratuar Standartlar Enstitüsü (CLSI) [Clinical Laboratory Standarts Institute]). *E. coli* suşlarının gentamisin (10 µg), siprofiloksasin (5 µg), seftazidin (30 µg), seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg), sefotaksim (30 µg), sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg), amoksisilin/klavulanik asit (20/10 µg), aztreonam (30 µg), tetrasiklin (30 µg), sulfametaksazol-trimetropim, nalidiksik asit (30 µg), kloramfenikol (30 µg) ve imipeneme (10 µg) karşı dirençlilikleri araştırılmıştır. Antibiyogram testi sonucunda izole ve tanımlanmış *E. coli*'lerin incelenen antibiyotiklere karşı duyarlı oldukları saptanmış; dirençlilik saptanamamıştır. Sonuç olarak, *E. coli* izolatlarında genişlemiş beta- laktamaz aktivitesi tespit edilememiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *E coli*, Antibiyotik Direnci, Disk Difüzyon, GSBL.

## SUMMARY

### **Antibiotic Resistance Status and Enlarged Spectrum Beta-Lactamase Activity in *Escherichia coli* Isolated from Green Leaf Vegetables**

In recent years, the consumption of raw vegetables for a healthy and balanced diet has increased in our country as well as all over the world. Green leafy vegetables consumed raw increase the risk of food-borne diseases. In addition, the use of beta-lactam group antibiotics in the treatment of *E. coli* infections is caused by antimicrobial resistance in bacteria, the resulting antibiotic resistance is spreading rapidly and an increase in the prevalence of infections is seen. In this study, a total of 100 samples, including 20 green leaves and raw vegetables marul (*Lactuca sativa*), kıvrıcık (*Crispa sativa*), dereotu (*Anethum graveolens*), maydonoz (*Petroselinum crispum*) ve roka (*Eruca vesicaria ssp*) (curly lettuce, lettuce, roquette, dill, parsley) which were offered from 4 different district markets in Beypazarı district of Ankara, were analyzed; antibiotic resistance status and enlarged beta-lactamase activity of *E. coli* isolates isolated from green leafy vegetables were investigated. *E. coli* (2%) was isolated in only 2 samples (arugula and lettuce) and *E. coli* isolates were made by Kirby-Bauer Disk Diffusion Test (Clinical Laboratory Standards Institute). *E. coli* strains of gentamicin (10 µg), ciprofloxacin (5 µg), ceftazidine (30 µg), ceftazidime-clavulanic acid (30/10 µg), cefotaxime (30 µg), cefotaxime-clavulanic acid (30/10 µg), Resistance to amoxicillin / clavulanic acid (20/10 µg), aztreonam (30 µg), tetracycline (30 µg), sulfamethoxazole-trimetropim, nalidixic acid (30 µg), chloramphenicol (30 µg) and imipenem (10 µg) was investigated. *E. coli* isolated and identified were found to be susceptible to antibiotics resistance was not detected. As a result, extended beta-lactamase activity could not be detected in *E. coli* isolates.

**Key Words:** *E. coli*, Antibiotic Resistance, Disc Diffusion, ESβL

## 1. GİRİŞ

Sebze ve meyveler, folat, beta-karoten, E, C, B2 vitamini, kalsiyum, demir, magnezyum, posa ve güçlü antioksidan etkinlik gösteren bileşenler içermektedirler (Kris ve ark. 2002). WHO'nun 2018 raporunda; sağlıklı bir diyet, diyabet, kalp hastalığı, felç ve kanser de dahil olmak üzere bulaşıcı olmayan hastalıklardan (NCD'ler) ve yetersiz beslenmeden korunmaya yardımcı olduğu bildirilmektedir. Diyetlerde yeterli miktarda sebze tüketilmemesinin, başta kalp ve damar hastalıkları olmak üzere Tip 2 diyabet ve obezite gibi birçok sağlık sorununa yol açtığı belirtilmektedir (WHO 2018). Bu nedenle son yıllarda insan sağlığına olumlu etkileri nedeniyle çiğ sebze tüketimine ilgi oldukça artmıştır.

Beypazarı İlçesi farklı arazi kullanım şekillerine sahip bir yapıdadır. Uygun yer şekli özellikleri, elverişli iklim koşulları ve verimli toprakları insanların doğal ortamda aradıkları önemli özelliklerdir (Türkan 2013).

Analiz için kullanılan sebze çeşitleri ise mevsimsel olarak çeşitliliğin bol olduğu bir zaman da olması bakımından ve sebze örneklerinin ortak bir özelliği olan fosfor, bakır, magnezyum, A ve C vitaminleri ile potasyum, kalsiyum, demir ve çinko yönünden çok zengin besin ürünlerdir. Fosfor özellikle kemiklerin yapısında bulunur. Yetişme çağındaki çocukların fosfor tüketmesi gerekmektedir. Marul ve kıvırcık fosfor bakımından zengin gıdalardır. Roka ve dereotu, kemiklerin esas yapı maddesini oluşturan kalsiyumca oldukça zengindir. Kanın yapımında rol alan potasyumca zengin sebzeler ise maydonoz, kıvırcık ve maruldur (El 2008). Yapılan çalışmalarda bu sebzelerin tüketimiyle ortaya çıkan 'Glaziovianin A' adlı maddenin kanseri engellediği de belirtilmektedir (Shigihara ve ark. 2014).

Tarladan sofraya kadar geçen süreçte sebzeler toprak, sulama yöntemi ve hayvan dışkılarının gübre olarak kullanılması gibi nedenlerle mikrobiyel kontaminasyona uğramakta; gıda kaynaklı enfeksiyonlara ve/veya mikrobiyel intoksikasyonlara neden olmaktadır. Ayrıca *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella spp.* gibi fekal kökenli *Enterobacteriaceae* türleri genellikle suda, toprakta ve bitkilerde bulunabilirler (Ülker 2011).

*E. coli*, insan ve hayvanların normal barsak florasında bulunmakla birlikte, bir çok hastalık vakasından primer veya sekonder etken olarak izole edilmektedir. Bakteri



sahip olduğu flagella, kapsül, hücre duvarı, fimbria antijenleri; sentezlediği kolisinler, enterotoksinler, sitotoksinler, hemolizinler ve aerobactin gibi virülens faktörleriyle hayvan türlerinde değişik patogenezi ile seyreden çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Bu hastalıklar arasında çeşitli septisemi, üriner sistem enfeksiyonları, enterik enfeksiyonlar ve mastitisler örnek olarak verilebilir (Carlton ve ark. 2010).

*E. coli* O157:H7, ilk kez 1982 yılında, kanlı ishal nedeni olarak, iyi pişirilmemiş ve kontamine olmuş hamburger etinden tespit edilmiştir. O tarihlerden bugüne *E. coli* O157:H7 salgınları, pastörize edilmemiş süt, elma suyu, marul, ıspanak, kuyu suları ve hayvanların bir şekilde temasta bulunduğu yüzey suları ile ilişkilendirilmiştir (Bolton ve ark. 2009).

Antibiyotikler başta olmak üzere veteriner ilaçları, ülkemiz ve dünyada hayvansal gıda üretiminin en gerekli ve etkili unsurlarındandır. Gıda üretiminde kullanılan hayvanların yaklaşık % 80'inde yaşamlarının belli bir kısmında ilaçla tedavi uygulanmaktadır (Pavlov ve ark. 2008).

Antibiyotikler, diğer veteriner ilaçları ile beraber hastalıkları önlemek ve kontrol altına almak için ilk olarak 1950'lerde yem katkı maddesi olarak kullanılmaya başlanmıştır. Günümüze kadar 40.000'in üzerinde antibiyotik keşfedilmiş olup, bunlardan da 80 kadarı veteriner, tarım ve balıkçılık alanında kullanılmaktadır (Filazi 2009).

Antibiyotik direnci, günümüz küresel sağlığı, gıda güvenliği ve gelişimi için en büyük tehditlerden biridir. Antibiyotik direnci doğal olarak oluşmakta, fakat insanlarda ve hayvanlarda antibiyotiklerin yanlış kullanımı bu süreci hızlandırmaktadır. Bu durum daha uzun hastane yatışlarına, daha yüksek tıbbi maliyetlere ve ölümlerin artmasına yol açmaktadır (<http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>). Giderek artan antibiyotik direnci tüm dünyayı tehdit altına almaktadır (Duman ve ark. 2010 ).

Aşırı ve bilinçsiz antibiyotik kullanımı mikroorganizmalarda direnç gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Antibiyotiklere dirençli bakteri türleri arasındaki ilişkiler anlaşılmaya çalışılmaktadır (Seiffert ve ark. 2013). Bu nedenle, WHO, FAO ve EFSA gibi Uluslararası otoriteler antibiyotiklere direnci 'Biyolojik Tehlike' sınıfına alarak,

yayıllı yollarının anlaşılması ve önleyici tedbirlerin belirlenmesi için epidemiyolojik araştırmaları teşvik etmektedir (EFSA 2011).

*Enterobacteriaceae* familyasında yer alan bakteriler nedeniyle gelişen enfeksiyonlarda en sık kullanılan antibiyotikler beta-laktamlardır. Yaygın olarak kullanılmaları sonucu beta-laktam antibiyotiklere direnç giderek artmaktadır. *Enterobacteriaceae*'da beta-laktam antibiyotiklere karşı oluşan dirençte en önemli mekanizma beta-laktamazlardır (Yetkin ve ark.2009). Yeni antibiyotikler geliştirildikçe, bakteriler de aynı hızla yeni direnç yöntemleri geliştirmektedir. Bu direnç mekanizmalarının en önemlilerinden biri genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlardır (GSBL). *E.coli* tüm beta-laktam antibiyotiklere duyarlı iken, ilk olarak 1987'de genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üreten *E.coli* suşları bildirilmiştir. Bugüne kadar 350'ye yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bunların yaklaşık 150'si genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar olarak bildirilmiştir (Bush 2010).

Tüketimi yaygınlaşan çiğ tüketilen yeşil yapraklı sebzelerden izole edilen *E. coli*'lerde antibiyotik dirençliliğinin araştırılması amacıyla bu çalışma yapılmıştır. Bu çalışmada 2018 yılının Eylül ayında Ankara'nın Beypazarı İlçesinde bulunan 4 farklı semt pazarından çiğ olarak tüketilen yeşil yapraklı sebze örneklerinden (marul, kıvırcık, dereotu, maydonoz, roka) olmak üzere izole edilen *E.coli* suşlarının çeşitli antibiyotiklere direnç durumu ve GSBL varlığı araştırılmıştır.

### **1.1. *E. coli* Genel Özellikleri**

*Enterobacteriaceae* familyasında olan *Escherichia* cinsi içerisinde altı türden (*E. adecaroxylate*, *E. blatttae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* ve *E. vulneris*) birisi olan *E. coli* koliform bakterisi olup, fekal kirlilik indikatörü olarak kullanılmaktadır. Sıcakkanlı hayvanların ve insanların gastrointestinal sisteminde bulunur ve genellikle zararsız olarak bilinir. Birçok *E. coli* serotipi barsaklarda kommensal bir yaşam sürer ve dışkıda  $10^6$ - $10^9$  kob/g düzeylerinde bulunur. Diğeri *Enterobacteriaceae* üyeleriyle birlikte bağırsaktaki zararlı mikroorganizmalara karşı, bağırsağın ve vücudun immun sisteminin düzenlenmesinde rol oynar (Ding ve ark. 2013).

*E. coli*, *Enterobacteriaceae* familyasında yer alan en önemli türdür. Gram negatif, kısa çomak şeklinde, fakültatif anaerob, sporsuz bir bakteri olan *E. coli*'nin bazı suşları peritrik flagelları ile hareketlidir. Mezofilik bir bakteri olan *E. coli*, 4°C ile 45°C arasında üreme gösterir (PHE 2016).

Patojenik *E. coli* farklı gruplara ayrılır. Bunlar enteropatojenik (EPEC), enterohemorajik (EHEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroagregatif (EAEC), enteroinvansiv (EIEC), ve diffusely adherent *E. coli* (DAEC)'lerdir. EHEC'lerden olan *E. coli* O157:H7 etkeni, shiga toksin üreten *E. coli*, (STEC)/verotoksin üreten *E. coli* (VTEC) özelliklerine sahiptir (Ding ve ark. 2013). EHEC etkenleri ile insanlarda enfeksiyonun meydana gelebilmesi için gerekli minimal infektif doz 10<sup>1</sup> olarak bildirilmektedir. Enfeksiyonlarda; hemorajik kolitis, hemolitik üremik sendrom ve trombotik trombositopenik purpura olmak üzere üç temel klinik bulgu dışında; hemorajik sistitis, konvülziyonlar, sepsis ve anemi gibi komplikasyonlar da görülebilmektedir (Karmali ve ark. 2010).

Çevrenin *E. coli* O157 ile kontamine olması halk sağlığı problemlerine neden olabilmektedir. Bakteri, aerosol yolla da kontaminasyon oluşturabilmektedir. *E. coli* O157, çevrede 10 aydan fazla sürede canlı kalabilmekte ve insanlar için uzun bir süre enfeksiyon riski oluşturabilmektedir (Washington ve ark. 2006).

Amerika'nın çeşitli eyaletlerinde marul ve ıspanak kaynaklı gastroenterit salgınları meydana gelmiş, ajan olarak da *E. coli* O157:H7 gösterilmiştir. Çiğ olarak tüketilen gıdalardan *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *S. aureus* ve *B. cereus* izole edilmiştir. Tüm dünyada çiğ ürünlerin tüketimi ile meydana gelen salgınlar kaygı verici boyutlara ulaşmıştır (Seow ve ark. 2012).

Yine Amerika'da, 1995 yılından günümüze kadar ölümlerle sonuçlanan önemli *E. coli* salgınları bildirilmiştir (Ding ve ark. 2013). Almanya'da 2011 yılında EHEC ve EAEC özelliklerine sahip olan *E. coli* O104:H4 ile kontamine soya filizi kaynaklı kanlı ishal ve HUS vakalarının görüldüğü büyük salgınlar rapor edilmiştir (Ding ve ark. 2013). İtalya'da 2012 yılında yine sebze ve meyvelerden *E. coli* O157, O26, O111, O103, O145 ve O104:H4 kaynaklı vakalar bildirilmiştir (Bardasi ve ark. 2015). Amerika'da 2013 yılında; ithal salatalıktan *E. coli* O157:H7 kaynaklı 33 vaka, 11 hospitalizasyon; 2014 yılında yoncadan *E. coli* O121 kaynaklı 19 vaka, 8

hospitalizasyon; İngiltere’de 2016 yılında ithal salatalıktan *E. coli* O157 kaynaklı 161 vaka, 60 hospitalizasyon ve 2 ölüm bildirilmiştir (Wadamori ve ark. 2016). **Tablo 1’** de *E. coli* suşları ve yaptığı hastalıkların kronolojik özeti verilmiştir.

**Tablo 1’** *E coli* suşları ve yaptığı hastalıkların kronolojik özeti.

Amerika’da 2013 yılında	İthal salatalıktan <i>E. coli</i> O157: H7 Kaynaklı	33 vakada, 11 hospitalizasyon
Amerika’da 2014 yılında	Yoncadan <i>E. coli</i> O121 Kaynaklı	19 vakada, 8 hospitalizasyon
İngiltere’de 2016 yılında	İthal salatalıktan <i>E. coli</i> O157 kaynaklı	161 vakada,60 hospitalizasyon ve 2 ölüm
Almanya’da 2011 yılında	<i>Soya filizi</i> <i>E. coli</i> O104:H4 kaynaklı	Kanlı ishal ve HUS vakalarında görülür
İtalya’da 2012 yılında	Sebze ve meyvelerden <i>E.</i> <i>coli</i> O157	Kanlı ishal, hospitalizasyon

## 1.2. *E coli*’nin Antibiyotik Direnç Özellikleri

Gram negatif bakterilerin beta-laktam halkası içeren antibiyotiklere karşı direnci, beta-laktamaz enzim üretimi ile olmaktadır (Duman ve ark. 2010). Beta-laktamaz, beta-laktam antibiyotikleri hidrolize ederek inaktif hâle getiren, başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından biridir. Bir çok beta-laktamaz enzimi, kromozomal olarak, plasmid veya transpozonlarda lokalize olan transfer edilebilir genlerce kodlanabilmektedirler. *E. coli*’lerde beta-laktam antibiyotikleri hidrolize eden genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) üretimi de güncelliğini yitirmeyen önemli bir konudur (Heward ve ark. 2018).

### 1.2.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bazı bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bakterileri öldüren veya üremesini durduran ilaçlardır. Antibiyotikler elde

edilişine göre doğal, sentetik ya da yarı sentetik, uygulanış şekillerine göre de oral, topikal ve parenteral olarak sınıflandırılırlar. İnsan ve hayvan hastalıklarında tedavi, evcil hayvanlarda gelişmeyi artırmak amacıyla kullanılmaktadır. 19. yüzyılın ortalarında Louis Pasteur bazı mikroorganizmaların, diğerlerini öldürdüğü şeklinde gözlemlerde bulunmuştur. Daha sonra 1928 yılında, Londra'da St. Mary's Hastanesi'nde stafilokok varyantları üzerinde çalışmalar yapan Alexander Fleming, bir rastlantı sonucu kültür ortamına bulaşmış bir küf mantarının çevresinde stafilokokların üreyemediklerini, tersine öldüklerini görmüştür. Bu mantarın kültür filtratları, deneysel enfeksiyonlarda birçok bakteriye karşı güçlü biçimde etkin bulunmuş ve Fleming, üreyen küf mantarlarına *Penicillium* türünden esinlenerek, 'penicillin' adını vermiştir. Böylece ilk antibiyotik 1928 yılında Sir Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir (Türkoğlu 2008) .

Antibiyotikler yüksek değerli meyvelerin, sebzelerin ve süs bitkilerinin belirli bakteriyel hastalıklarını kontrol etmek için 1950'lerden beri kullanılmaktadır. Bugün, bitkiler üzerine yaygın olarak kullanılan çoğu antibiyotik, küçük boyutta oksitetrasiklin ile streptomisindir. Birincil kullanım elma ve armut üzerinedir. Antimikrobisidallerin çoğu, esasen, streptomisin ve oksitetrasiklin içerir ve meyve ağaçlarının bakteriyel hastalıklarını kontrol etmekte kullanılır. Enfeksiyon UV ışını, yağmur ve yüksek sıcaklıklara toleranslı olmalıdır (Saygı ve ark. 2012).

Antibiyotik direnci antibiyotikler kadar eskidir. Beta-laktam ajanlar, Gram negatif enfeksiyonlarda dünyada en sık kullanılan antibiyotiklerdir. Beta-laktam antibiyotikler önemli direnç mekanizmasını oluşturmaktadır (Philippon ve ark. 2004).

### **1.2.2. Beta-Laktam Antibiyotikler**

Antibiyotiklere karşı direncin artması uygun antibiyotiğin seçiminde ve tedavinin sürecinde sorunlara neden olmaktadır. Beta-laktam antibiyotikler başlıca 5 grupta toplanırlar: Penisilinler, Sefalosporinler, Monobaktamlar, Karbapenemler, Beta-laktamaz inhibitörleri (klavulonat, sulbaktam, tazobaktam). Bu gruptaki antibiyotiklerin ortak özellikleri yapılarında beta-laktam adı verilen 4 atomlu halka taşımalarıdır. Her grup beta-laktam antibiyotiğin özelliği bu halkaya bağlanan başka halkalar ve yan zincirlerle belirlenir. Sadece Monobaktamlarda beta-laktam halkasına

bağlanan başka halka bulunmamaktadır. Beta-laktam antibiyotikler bakterisid etkili ve toksisiteleri düşük olan ilaçlardır (Karademir 2007).

Gram negatif bakteriler başlıca üç yolla beta-laktam antibiyotiklere karşı direnç geliştirirler:

a) Dış membran proteinlerinde (OMP) oluşan değişiklikler ile ilacın hücre içine girişini önleyerek,

b) Beta-laktam antibiyotikleri inaktive eden beta-laktamaz enzimlerinin sentezleyerek,

c) Penisilin bağlayıcı protein'de oluşan değişiklikler ile antibiyotiğin hedefine bağlanmasını engelleyerek.

### **1.3. Beta-Laktamazlar**

Beta-laktamazları kodlayan genler, bakteri kromozomlarında, plazmidlerde veya transpozonlarda yerleşmiş olabilirler. Pek çok beta-laktamaz geni integronlar üzerinde tanımlanmışlardır. Gram negatif bakterilerde direnç genleri, genellikle plazmidler aracılığı ile konjugasyonla yayılmaktadır. Antibiyotik kullanımı ile direnç gelişimi arasındaki en iyi örneklerden birisi, yeni beta-laktam antibiyotiklerin geliştirilerek klinik kullanıma sunulması ve yaygın kullanımını takiben bakterilerin bu antibiyotiklere karşı direnç geliştirmesidir. Direnç gelişen antibiyotikler arasında oksimino aminotiozil sefalosporinler; sefotaksim, seftriakson, seftazidim ve aztreonam başta gelmektedir. Hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilerce üretilmelerine karşın, beta-laktamaz üretimi başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere, gram negatif bakteri türlerinde beta-laktamlara bağlı dirençte, sıklıkla ilaç geçirgenliği ile ilgili mekanizmalarda rol oynamaktadırlar (Bush ve ark. 2010).

Beta-laktamazlar amino asit dizilerine dayanılarak A, B, C ve D olmak üzere 4 moleküler sınıf içerisinde toplanırlar. Bunlar; Class **A** serin penisilinazlar, Class **B** metalloenzimler, Class **C** serin sefalosporinazlar ve **D** oksasilini hidroliz eden serin beta-laktamazları içermektedirler (Bush ve ark.2010).

Bu antibiyotiklerin etki spektrumlarının genişliği nedeniyle, bunların hidrolizine yol açan beta-laktamazlar genişlemiş spektrumlu olarak adlandırılmışlardır (GSBL) (Livermore ve ark. 2007). **Tablo 2.**'de Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri belirtilmiştir.

**Tablo 2.** Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri

Beta-Laktamaz Grup	Molekül Sınıfı	Tercih Edilen Substrat	Klavulanik Asit	Örnek Enzimler
1	C	Sefalosporinler	-	Gram negatif bakterilerin Amp C enzimleri; MIR-1
2a	A	Penisilinler	+	Gram pozitif bakterilerin penisilinazlar
2b	A	Sefalosporinler	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar	+	TEM-3 ila TEM-26, SHV-2 ile SHV- <i>Klebsiella axytoca</i> K 1.
2br	A	Penisilinler	±	TEM-30 ile TEM-36,TRC-1
2c	A	Penisilinler, Karbenisilin	+	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penisilinler, Kloksasilin	±	OXA-1(OXA11),PSE2(OXA10)
2e	A	Sefalosporinler	+	<i>Proteus vulgaris</i> 'in İndüklenebilir sefalosporinaz
2f	A	Penisilinler, Sefalosporinler, Karbapenemler	+	<i>Enterobacter cloacae</i> 'nin NMC- <i>Serratia marcescens</i> 'in Sme-1
3	B	Bir çok beta-laktam karbapenemler dahil	-	<i>Stenotrophomonas maltophila</i> 'nınL1, <i>Bacteroides fragilis</i> 'in CcrA
4	nD	Penisilinler	-	<i>Pseudomonas cepacia</i> 'nin penisilinazı

### 1.3.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz

GSBL'ler mikrobiyolojik olarak oksomino sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanmaktadır. Ancak son yıllarda GSBL olarak değerlendirilen bazı enzimlerin tam olarak bu grupta yer almadığı saptanmıştır. Çoğu GSBL'in, enterik gram negatif bakterilerin klasik plazmid kökenli beta-laktamazları olan TEM-1, TEM-2 ve SHV-1'den köken aldığı bildirilmiştir (Livermore ve ark. 2007).

*K. pneumoniae*, *E. coli*, *P. mirabilis* ve *Salmonella* türleri gibi pek çok bakteri, genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (GSBL) enzimini kodlayan genlere sahiptir. Avrupa'da GSBL üreten *E.coli* ve *Klebsiella* prevalansı oldukça yüksektir. GSBL üreten bakteriler sıklıkla yoğun bakım ünitelerinde ciddi enfeksiyonlara neden olmaktadır. Bununla birlikte GSBL üreten mikroorganizmalarla oluşan toplum kaynaklı enfeksiyonlara da rastlanmaktadır (Canton ve ark. 2008).

Araştırmalar, GSBL üreten enterobakterilerin ilk identifiye edildikleri 1983 yılından bu yana, farklı coğrafik bölgelerde geniş şekilde yayılma olduğunu göstermektedir. EFSA, 25 üye ülkenin verilerine dayanarak, antibiyotiklere karşı en çok direnç geliştiren türlerin enterobakteriler olduğunu bildirmektedir (EFSA 2010).

Son yıllarda çok sayıda araştırmacı GSBL üreten enterobakterilerin ekonomik ve sağlık boyutları, gelişimi, yayılımı ve etki mekanizmalarını inceleyen araştırmalara ilgi göstermektedir (Capita ve ark. 2013). GSBL üreten *E. coli* hakkında duyulan kaygılar gittikçe artmaktadır. Dirençli *E. coli* kaynaklı enfeksiyonların neden olduğu ölüm oranı, GSBL üretmeyen *E. coli* kaynaklı enfeksiyonların neden olduğu ölüm oranına göre üç katı daha yüksek oranda gerçekleşmektedir. Ayrıca, 2000'li yıllardan itibaren dirençli *E. coli* bulunma sıklığı dikkat çekici şekilde artış göstermektedir (Rao ve ark. 2014).

### 1.3.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz Tipleri

**2a-Tem GSBL:** Klavulonik asite duyarlı enzimleri bulunmaktadır. *S. aureus* enzimleri bu gruptadır. Ayrıca *B. cereus*'un kromozomal beta-laktamazları, *Citrobacter amalonaticus*, *Eikenella corrodens* ve *Fusobacterium nucleatum*'da tanımlanan enzimler de bu gruptadır. GSBL'ler beta-laktamaz inhibitörleri (Örneğin;



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

**2be-Shv GSBL:** Oksiminino beta-laktamlar ve monobaktamlar gibi antibiyotiklerin yaygın kullanımı sonucunda TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi ana enzimlerden 1-4 aminoasit değişikliği ile genişlemiş spektrumlu beta-laktamlara (seftazidim, seftriakson, sefotaksim veya aztreonam) da etki eden yeni TEM- ve SHV- enzimleri geliştirmişlerdir. GSBL olarak adlandırılmaktadır. Sefoksitin, sefotetan ve klavulanik asit gibi beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır. Özellikle *Klebsiella* ve *E. coli* suşlarında yaygındır. Bu grupta yer alan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir. Bu enzim ilk kez Türkiye'den izole edilen bakteriyel suşlarda saptanmıştır (Bush ve ark. 1995).

**2br GSBL:** Klavulanik asitten etkilenmeyen, geniş spektrumlu beta-laktamazlar TEM-30 dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ve TRC-1 enzimi grubundadır (Bush ve ark. 1995).

**2c-Ctx-m GSBL:** Karbenisilini hidroliz eden, klavulanik asite duyarlı enzimler yer almaktadır. PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta-laktamazları, *Aeromonas hydrophilia*'nın AER-1 enzimi, *M. catarrhalis*'in BRO-1 ve BRO-2 enzimleri, *V. cholerae*'nin SAR-1 enzimi grubundadır ( Bush ve ark. 1995).

**2d-Oxa GSBL:** Kloksasilini penisilinden daha hızlı hidroliz eden beta-laktamazlar OXA enzimleri grubundadır. Bunlardan OXA-11 enzimi, Türkiye'de izole edilen bir suşta saptanmıştır. Klavulanik asit ve sulbaktama dirençlidirler (Bush ve ark. 1995).

**2e-Per GSBL:** *B. fragilis*'in CepA enzimi, *B. uniformis* ve *B. vulgatus*'un kromozomal CblA ve CfxA, *E. coli*'den izole edilen FEC-1 ile *S. maltophilia*'nın L2 ve *Y. enterocolitica*'dan izole edilen Blal enzimi, klavulanik asitle inhibe olmaktadır (Bush ve ark. 1995).

**2f GSBL:** *E. cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi, *E. cloacae*'nin kromozomal NMC-A enzimi ve *S. marcescens*'in Sme-1 enzimi, Karbapenemleri hidroliz etmekte, klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (Bush ve ark. 1995).

## **1.4. GSBL Tanı Yöntemleri**

GSBL tayini fenotipik ve genotipik olarak yapılabilmektedir. GSBL tayininde fenotipik yöntemler; tarama testi ve doğrulama testi olarak iki kısımda incelenmektedir (CLSI 2011).

### **1.4.1. GSBL Tarama Testleri**

CLSI önerilerine göre; disk difüzyon veya dilüsyon yöntemleriyle sefotaksim seftriakson ,seftazidim ,aztreonam veya sefpodoksime karşı duyarlılığın azaldığının saptanması halinde doğrulama testleri uygulanır (CLSI 2002).

### **1.4.2. GSBL Doğrulama Testleri**

GSBL varlığını belirlemede çeşitli yöntemler önerilmektedir: Bunlar üç boyutlu test, çift disk sinerji testi, dilüsyon yöntemleri, otomatize sistemler (Phoenix, Vitek vb.) ve E-testi'dir (CLSI 2009).

#### **1.4.2.1. Kombine Disk Sinerji Yöntemi**

McFarland 0.5 standart yoğunluğundaki bakteri süspansiyonunun yayıldığı Mueller-Hinton besiyerine klavulanik asit (10 µg) içeren ve içermeyen seftazidim (30 µg) ile sefotaksim (30 µg) diskleri yerleştirilir. 24 saat 35C°'de inkübasyondan sonra, klavulanik asit içeren ve içermeyen disklerin etrafındaki inhibisyon zonları ölçülerek karşılaştırılır. Kombinasyon diskleri etrafındaki inhibisyon zonu, klavulanik asit içermeyen disk etrafındaki inhibisyon zonundan  $\geq 5$  mm daha geniş olan suşlar, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilir (CLSI 2011).

#### **1.4.2.2. Çift Disk Sinerji Yöntemi**

McFarland 0,5 bulanıklık standardına eşdeğer olacak şekilde hazırlanan bakteri süspansiyonu Mueller-Hinton besiyerine yayılır. Plağın ortasına bir amoksisilin-klavulanik asit diski (AMC 20/10µg) ile disk merkezleri arasındaki uzaklık 30 mm olacak şekilde seftazidim (CAZ), seftriakson (CRO) veya sefotaksim (CTX), aztreonam (ATM) veya sefpodoksime (POD) diskleri yerleştirilir. On sekiz saat 35 C°'de inkübasyondan sonra test edilen sefalosporin veya aztreonam etrafındaki

inhibisyon zonunun AMC diskine doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir sinerji alanının bulunması GSBL varlığını gösterir (Ünal ve ark. 2004).

#### **1.4.2.3. E-Test Yöntemi**

Disk difüzyon için bildirilen standartlarda hazırlanan plaklarda inkübasyondan sonra, eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği değer MİK değerini vermektedir. ve MİK değerleri birbirine oranlandığında MİK değerinde  $\geq 8$  kat fazla azalma olması GSBL varlığını gösterir. Benzer şekilde sefotaksim ve sefotaksim-klavulanik asit içeren E-test stripleri de bulunmaktadır (Ünal ve ark. 2004).

#### **1.4.2.4. Mikrodilüsyon Yöntemi**

Sefotaksim ve seftazidim MİK değerleri, hem tek başına hem de klavulanik asit varlığında saptanır. Klavulanik asit varlığında MİK değerlerinde  $\geq 8$  kat azalma GSBL göstergesi olarak kabul edilir (Ünal ve ark. 2004).

#### **1.4.2.5. Üç Boyutlu Test**

McFarland 0,5 bulanıklığındaki süspansiyonları Tryptic Soy Broth (TSB) besiyerine ekilerek 35C°'de dört saat inkübe edilir. Bu süre sonunda hücreler santrifüj edilerek ve ardından beş kez dondurulup çözülerek enzim ekstraksiyonu yapılır. Standart disk difüzyon testi için Mueller-Hinton agara ATCC 25922 *E.coli* suşu inoküle edilerek plağın ortasına sefoksitin (30 µg) diski konulur. Diskten 5 mm uzaklıkta olacak şekilde steril bistüriyle yarıklar açılır ve yarıklara pipet yardımıyla 25-30 µL elde edilen enzimlerden konulur. Petriler 35C°'lik etüvde yirmi dört saat inkübasyona bırakılır. Ertesi gün inhibisyon zonuyla kesişen yarıklardaki suşlardan 3 mm'ye eşit ve 3 mm'den fazla distorsiyona neden olanlar "üç boyutlu test pozitif" olarak kabul edilir (Ünal ve ark. 2004).

## 2. GEREÇ VE YÖNTEM

### 2.1. Örneklerin Toplanması

Araştırma için Ankara'nın Beypazarı İlçesi'nde bulunan 4 farklı semt pazarından, çiğ olarak tüketime sunulan yeşil yapraklı sebzelerden, Eylül ayında marul (*Lactuca sativa*), kıvırcık (*Crispa sativa*), dereotu (*Anethum graveolens*), maydonoz (*Petroselinum crispum*) ve roka (*Eruca vesicaria ssp*) analiz için toplandı. Semt pazarlarından alınan bu örnekleri belirlemek için alınan tezgahlara 1' den 20'ye kadar numara verildi. Aldığım bu tezgahlardan herbirinden analizde kullandığım 5 çeşit örnekler temin edildi.

Bu sebzeler her biri 20'şer adet olmak üzere toplam 100 adet örnek, ortam sıcaklığı 22-23°C'de bulunan tezgahlardan direk alınarak tek kullanımlık steril poşetlerde, +4 °C'de muhafaza edilerek zaman kaybedilmeden soğuk zincir altında laboratuvara ulaştırıldı.. Beş farklı sebze örneklerinden herbiri için dördü grup oluşturuldu. Her grup kendi içinde beş örnek olacak şekilde birleştirildi. Toplanan örneklerin her biri 25 gr gelecek şekilde tartıldı. 100 örnek için 20 grup oluşturuldu. Sebzelerin tezgahta sulanıp sulanmadığı ile ilgili bilgi bulunmamaktadır. Ayrıca tezgahlardan su örnekleri toplanarak mikrobiyolojik analiz yapılmamıştır **Tablo 3.**'de semt pazarlarından alınan örneklerin sayıları ve dağılımları verilmiştir.

**Tablo 3.** Semt pazarlarından alınan örnekler

Semt pazarları	Roka	Kıvırcık	Dereotu	Maydonoz	Marul
1. Semt pazarı	1'den 5'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	1'den 5'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	1'den 5'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	1'den 5'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	1'den 5'e kadar numaralandırılmış tezgahlar
2.Semt pazarı	6'dan 9'a kadar numaralandırılmış tezgahlar	6'dan 9'a kadar numaralandırılmış tezgahlar	6'dan 9'a kadar numaralandırılmış tezgahlar	6'dan 9'a kadar numaralandırılmış tezgahlar	6'dan 9'a kadar numaralandırılmış tezgahlar
3.Semt pazarı	10'dan 15'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	10'dan 15'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	10'dan 15'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	10'dan 15'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	10'dan 15'e kadar numaralandırılmış tezgahlar
4.Semt pazarı	16'dan 20'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	16'dan 20'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	16'dan 20'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	16'dan 20'e kadar numaralandırılmış tezgahlar	16'dan 20'e kadar numaralandırılmış tezgahlar

## 2.2. Kullanılan Besiyerleri

### 2.2.1. mTSB Selective Enrichment Broth (Merck 1.09205)

Sebze örneklerinde *E.coli* izolasyonu amacıyla ön zenginleştirme besiyeri olarak Novobiocin (Oxoid SR0181) katkılı mTSB (Oxoid CM989) kullanıldı.

#### Temel Besiyeri

Peptone from caseine	17,0 g/L;
Peptone from soymeal	3,0 g/L;
Sodium chloride	5,0 g/L;
Bile salts no.3	1,5 g/L;
D(+)-glucose	2,5 g/L;
d-Potassium hydrogen phosphate	4,0 g/L;
Novobiocin	0,02 g/L.
Distile su	1000 ml

pH= 7,4±0,2

#### Hazırlanışı

Temel besiyeri 20 örnek için 7.425gr / 225 ml olacak şekilde hazırlanarak pH'sı 7,4'e ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk sterilize edildi. Bileşimdeki besin maddeleri uygun bir gelişme sağlarken, safra tuzları ve novobiyosin, Gram pozitif bakterilerin gelişmesini baskılar.(MERCK 2014)

### 2.2.2. EMB Agar (Eosin Methylene-Blue Agar)

Sebze örneklerinde *E. coli* amacıyla selektif-diferansiyel besiyeri olarak EMB Agar Eosin Methylene-blue Agar ve 0.4 ml sefotoksin içeren EMB Agar Eosin Methylene-blue Agar hazırlandı.

### Temel Besiyeri

Peptone	10,0 g/L;
di-Potassium hydrogen phosphate	2,0 g/L;
Lactose	5,0 g/L;
Sucrose	5,0 g/L;
Eosin Y yellowish	0,4 g/L;
Methylene Blue	0,07 g/L;
Agar-agar	13,5 g/L.
Distile su	1000 ml
pH	7,1±0,2

### Hazırlanışı

Temel besiyeri 28,8g / 800 ml olacak şekilde hazırlanarak pH'sı 7,1'e ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk sterilize edildi. Besiyeri 50°C olduğunda 2 ml steril distile su içinde çözülen sefotoksin 0,2 µm çaplı steril filtreden süzülerek, 400 ml olacak şekilde 0,4 ml sefotaksim besiyerine eklendi Temel besiyeri 20 örnek için 7.425gr / 225 ml olacak şekilde hazırlanarak pH'sı 7,4'e ayarlandı ve 121 °C'de 15 dk sterilize edildi. Bileşimdeki besin maddeleri uygun bir gelişme sağlarken, safra tuzları ve novobiyosin, Gram pozitif bakterilerin gelişmesini baskılar (MERCK 2014).

Besiyerindeki boyalar, başta Gram pozitif bakteriler olmak üzere refakatçi floranın gelişimini baskılar. Bu besiyeri, bileşimindeki laktoz ve sakkaroz nedeni ile asıl olarak her iki karbohidrat bakımından da negatif olan *Salmonella* ve *Shigella*'nın ayrımı için geliştirilmiş olmakla beraber, yaygın olarak koliform grup bakterisi sayımında ve *E. coli* tanımlanmasında kullanılmaktadır. 35-37°C'ta 24 saat inkübasyon sonunda saydam ve amber renkli koloniler *Salmonella* ve *Shigella* gibi laktoz ve sakkaroz negatif bakterileri; menekşe renkli, yansıyan ışıpta yeşilimsi metalik parlak görülen koloniler *E. coli*'yi gösterirken; pembe-menekşe renkli ve gri

kahverengi merkezli koloniler diğer koliformları gösterir. Metalik parlaklığın izlenebilmesi için sürme ya da yayma yöntemi ile ekim yapılmalıdır. Bu besiyerinin Levine tarafından modifiye edilmiş formu olan Levine EMB Agar (Merck 1.01342), yukarıdaki özelliklere ilaveten *Candida albicans*'ın hızlı tanımlanmasında da kullanılmaktadır (MERCK 2014).

### 2.2.3. Mueller-Hinton Agar (CLSI)

Sebze örneklerinde *E.coli* için disk difüzyon yöntemiyle antibiyotik duyarlılığının belirlenmesi için kullanılan katı besiyeridir.

#### Temel Besiyeri

Meat infusion	2,0 g/L;
Casein hydrolysate	17,5 g/L;
Starch	5 g/L;
Agar-agar	7,0 g/L.
Distile su	1000 ml
pH	7,3±0,2

#### Hazırlanışı

Temel besiyeri 19 g/500 ml, olacak şekilde damıtık su içinde kaynatılarak eritilip, otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. pH'sı 7,3±0,2 ayarlandı.

Gerekli miktardaki kalsiyum ve magnezyum iyonları ile düşük konsantrasyonda thymine ve thymidine içerir. Thymine ve thymidine konsantrasyonu, disk difüzyon yöntemiyle trimethoprim ve sulfamethoxazole kullanılarak *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ile belirlenir. Kalsiyum ve/veya magnezyum konsantrasyonları, aminoglikozit antibiyotikleri ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 ile doğru zon çapı vermesi ile kontrol edilir (NCCLS 1993 ).

### 2.3. Ön Zenginleştirme

Sebze örneklerinin *E. coli* izolasyonu amacıyla hazırlanmış ön zenginleştirme besiyeri mTSB Selective Enrichment Broth'dan 225 ml steril gıda poşetlerinde homojenize edilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı.

**Fotoğraf 1. Ön Zenginleştirme**

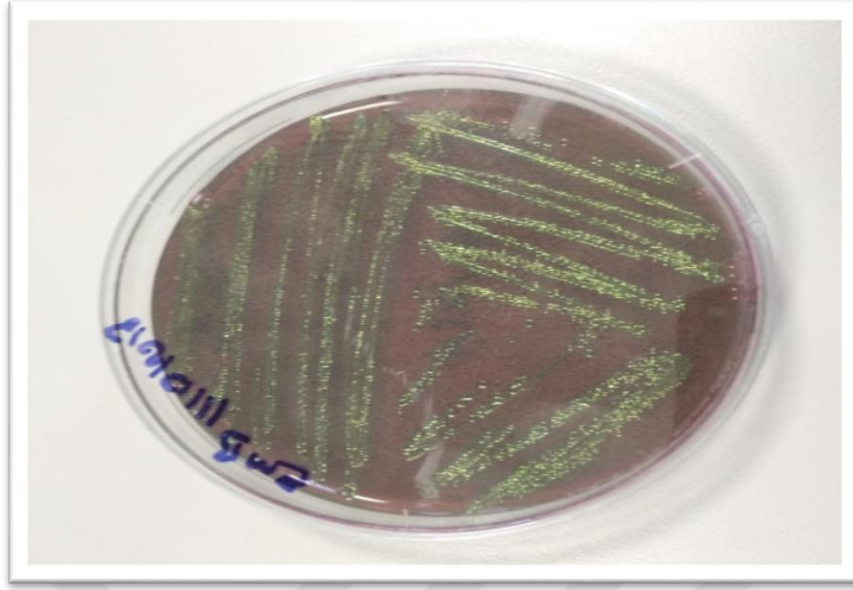


### 2.4 Selektif-Diferensiyel Katı Besiyerine Ekim

Selektif katı besiyeri olarak 2 adet EMB Agar hazırlandı. Bunlardan birine 2µg/ml sefotaksimli EMG agarlar hem de sefotaksimsiz EMB agarlara petrilere eşit biçimde dağıtıldı. Ön zenginleştirme sıvısından 1 öze dolusu alınarak sürme yöntemi ile ekim yapıldı. 37°C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonucunda *E. coli*'ye benzer parlak yeşil metalik röfle oluşturan koloniler belirlendi. Bu kolonilerden saf koloni elde etmek için öze yardımı ile EMB agara tekrar ekim yapıldı. 37°C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi. Şüpheli kolonilerin *E. coli* olduğunu saptamak için biyokimyasal testler uygulandı.



**Fotoğraf 2.** EMB Agarda metalik r fle veren *E.coli* kolonileri



## 2.5. Biyokimyasal Testler

Şüpheli izolatların ve standart suŐun biyokimyasal aktivitelerinin belirlenmesi amacıyla oksidaz testi, üre testi, kısaca IMVIC (indol, metil red,voges proskauer, sitrat) testi yapıldı. Bu test sonuÇları indol pozitif, metil red pozitif, voges proskauer negatif, sitrat negatif, üre testi pozitif. Gram negatif ve oksidaz negatif sonuŐlar *E.coli* olarak değerlendirildi. Hızlı identifikasyon sistemi (Kristal) ile de identifikasyon doğrulandı.

### 2.5.1. Oksidaz Testi

Sitokrom oksidaz, oksidatif fosforilasyon yapan bakterilerin kullandıkları enzimdir. Bu bakteriler tarafından elektron transportu ve nitrat metabolik yollarında kullanılır. Oksidaz testi bu enzimin aktivitesini ölçmeye yönelik bir testtir. Steril bir petri kutusu içerisine yerleŐtirilmiŐ kurutma kağıdına 2-3 damla oksidaz ayıracı (dimetil veya tetrametil fenilendiamin dihidroklorid) damlatıldı.  zerine,  ze ile Şüpheli koloniden bir miktar alınarak sürülür. 10–60 saniye içerisinde mor veya kahverengi-siyah bir renk oluŐması testin pozitif olduğunu gösterir.

Agar yüzeyinden alınan bakteri kolonisi tercihen 24 saatten eski olmamalıdır; koloniyi almak için platin ya da plastik  ze kullanılmalıdır; demir  ze yanlış pozitif

sonuca yol açar. Benzer şekilde MacConkey besiyeri gibi karbonhidrat fermentasyon besiyerlerinden alınan koloniler de kullanılmamalıdır; pH düşüklüğüne bağlı yanlış negatif sonuç alınabilir. Oksidaz testi esas olarak Gram negatif bakterilerin ayırımında kullanılır (Temiz 2000).

### 2.5.2. İndol Testi:

#### 2.5.2.a. Tryptone Water Tryptone (İndol) Besiyeri

Sebze örneklerinde *E. coli* için mikrobiyolojik analizlerde, özellikle indol testi yapılması için kullanılan genel sıvı besiyeridir.

#### Temel Besiyeri

Peptone from casein 10,0 g/L;

Sodium chloride 5 g/L.

#### Hazırlanışı

Temel besiyeri, 15,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde çözüldü tüplere 10 mL olarak dağıtılıp otoklavda 121 C°'de 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanmış besiyeri berrak ve sarımsıdır, 25°C'de pH'sı 7,3±0,2'dir. *Vibrio* analizinde kullanılacağı zaman besiyerine 25 g/L NaCl ilave edilerek hazırlanır.

Sıvı ve yüksek oranda triptofan içeren buyyon içerisine sebze örneklerinden ekimi yapıldı ve 24 saatlik enkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süresi sonunda Kovacs ya da Ehrlich ayracından 0,5 ml eklendi. Besiyerinde bulunan triptofan'ı indol'e dönüşmesi sonucu tüp üzerinde kırmızı/mor halka oluşur. Bu durumda test sonucu pozitifdir (Temiz 2000).

### 2.5.3. Methyl-Red ve Voges-Proskauer Testi

Sebze örneklerinde *E. coli* mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakterilerin tanımlama testlerinden Metil Red (MR) ve Voges Proskauer (VP) testleri kullanılır.

#### Temel Besiyeri

Peptone from meat	7,0 g/L;
D (+) Glucose	5,0 g/L;
Phosphate buffer	5,0 g/L.

#### Hazırlanışı

Temel besiyeri 17,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde eritilip, standart deney tüplerine 5'er mL olarak dağıtıldı ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Hazırlanan besiyeri berrak, sarımsı-kahverenkdedir ve 25 °C'de pH'sı 6,9±0,2'dir.

#### Metil Kırmızısı (MR)

Sebze örneklerinde *E.coli* için glikozu fermente edebilme yetisini gösteren testtir. *E.coli* için besiyerinde bulunan glikozu fermente ederek kuvvetli asit oluşturur. Bu testte de pozitif sonuç elde edilir. Deney için Clark Lubs besiyerine ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonucunda Metil Kırmızısı (MR) ayracı eklendi. Kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Temiz 2000).

#### Voges-Proskauer (VP)

Sebze örneklerinde *E. coli* için bakterinin glikozu parçalayarak asetoin (acetyl methyl carbinol) oluşturmasını tayin etmektir. Deney için Clark Lubs besiyerine ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonrasında alfa naftol ve KOH içeren ayraç eklendi. Renk değişimi olmaması negatif sonucu gösterdi (Temiz 2000).

### 2.5.4. Citrate Testi

Sebze örneklerinde *E. coli* mikrobiyolojik analizlerde koliform grup bakterilerin tanımlama testlerinden sitrat testi için kullanıldı.

### **Temel Besiyeri**

Ammonium dihydrogen phosphate	1,0 g/L;
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,0 g/L;
NaCl	5,0 g/L;
Sodium citrate	2,0 g/L;
MgSO <sub>4</sub>	0,2 g/L;
Bromothymol blue	0,08 g/L;
Agar-agar	13,0 g/L,

### **Hazırlanışı**

Temel besiyeri, 22,3 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak su banyosunda 5-10 dakika tutularak ve sürekli karıştırılarak tam olarak eritildi. Besiyeri sıvı halde iken, standart 16x160 mm tüplere 7'şer ml olarak dağıtıldı, 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Otoklav çıkışında besiyeri henüz sıvı iken tüpler 1-1,5 cm yüksekliğinde bir çubuğa yatırılarak (tüpün dibinde 2-2,5 cm yüksekliğinde bir besiyeri kalınlığı olacak şekilde) besiyerinin katılaşması beklendi. Hazırlanmış besiyeri berrak ve yeşil renkte olup, 25 °C'de pH'sı 6,6±0,2'dir.

Sebze örneklerinde *E. coli* için bakterilerin karbon kaynağı olarak sitrat'ı, azot kaynağı olarak da amonyum tuzlarını kullanabildiğini gösteren testtir. Test için saf kültürden Simon's Sitrat besiyerine çizgi ekim yapıldı. 24 saatlik inkübasyon sonucunda besiyerinin mavi/lacivert renk alması testin pozitif sonuç verdiğini gösterdi (Temiz 2000).

### **2.5.5. Üre Testi**

Sebze örneklerinde *E.coli* mikrobiyolojik analizlerde üre testi ile mikroorganizma tanımlanmasında kullanılan katı besiyeridir.

### Temel Besiyeri

Peptone from meat	1,0 g/L;
D (+) Glucose	1,0 g/L;
Sodium chloride	5,0 g/L;
Potassium dihydrogen phosphate	2,0 g/L;
Phenol red	0,012 g/L;
Agar-agar	12,0 g/L.

### Hazırlanışı

Temel besiyeri, 21,0 g/L olacak şekilde ısıtılarak damıtık suda eritildi ve otoklavda 121 °C'de 15 dakika süre ile sterilize edildi. Otoklav sonrası 45 °C'e soğutulup, üzerine 50 mL/L filtre ile sterilize edilmiş % 40 üre çözeltisi eklendi, karıştırılıp ve steril tüplere 7'şer mL dağıtılıp, dip kısmı yaklaşık 2,5 cm olacak şekilde yatık agar hazırlandı. Hazırlanmış besiyeri berrak ve kırmızı renklidir. pH'sı 25 C°'ta  $6,8 \pm 0,2$ 'dir.

Sebze örneklerinde *E. coli* için üre, urease enzimi ile CO<sub>2</sub> ve amonyağa parçalanır. Oluşan amonyak pH'yı yükseltir ve sonuçta pH indikatörü aracılığı ile renk kırmızıdan sarı-pembeye dönüşür. Besiyerinin yüzeyine yoğun şekilde sürme yapılır. İnkübasyon 35 °C'de 5-48 saat sonra *E. coli* için ürez kırmızıdan sarıya döner. *E. coli* pozitifdir (Temiz 2000).

### Fotoğraf 3.Biyokimyasal Testler



## 2.6. Disk Difüzyon Testi

Her biri saf olduğu düşünölen kolonilerden steril öze yardımı ile Nutrient Agar'a sürme yöntemi ile ekim yapıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Nutirent Agar'da oluşın koloniler, disk difüzyon testi için kullanıldı. Kolonilerin antimikrobiyal duyarlılıkları CLSI talimatına göre yapıldı. Nutrient Agar'da oluşın koloniler steril tuzlu su çözeltisinde (% 0,85 NaCl<sub>2</sub>) süspanse edildi. Yapılan bu süspanسیون 0,5 McFarland standardına göre ayarlandı. Süspanسیونdan Mueller Hinton Agar (MHA) hazır besiyerine steril bir eküvyon yardımıyla ekildi.

Antibiyotik dirençliliklerinin saptanması için gentamisin (10 µg), siprofloksin (5 µg),seftazidim (30 µg), sefotaksim (30 µg), seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg), sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg), amoksisilin-klavulanik asit (20/10 µg), aztreonam (30 µg), tetrasiklin (30 µg), sulfametaksazol trimethoprim, nalidikisik asit(30 µg), kloramfenikol (30 µg) ve imipenem (10 µg) antibiyotikleri kullanıldı. Bu işlemin sırasında diskler de oluşacak zonların birbiri üzerine gelmemesi için, disk merkezleri arasında eşit aralıklarda yerleştirildi. 37°C'de 24 saat süreyle inkübe edildi ve sonrasında oluşın zonlarının çapları ölçölerek kaydedildi.

GSBL varlığını belirlemede çift disk sinerji testi kullanıldı. *E. coli* suşlarında GSBL varlığının ortaya konması amacıyla sefotaksim zon çapı ≤ 27 mm ve/veya seftazidim zon çapı ≤ 22 mm bulunanların fenotipik doğrulama testi yapılmaktadır (CLSI, 009). CLSI'nin kriterleri doğrultusunda klavulanik asit içeren diskin inhibisyon zonunun diğeri diskin inhibisyon zonundan 5 mm veya daha büyük olması GSBL varlığı yönünde yorumlandı (CLSI 2011).

**Fotoğraf 4. Disk Difüzyon Test**



### 3. BULGULAR

Bu çalışmada Ankara'nın Beypazarı İlçesi'nde bulunan 4 farklı semt pazarında tüketime sunulan, çiğ tüketilen yeşil yapraklı sebzelerden (20 adet kıvırcık, 20 adet marul, 20 adet roka, 20 adet dereotu, 20 adet maydonoz) toplam 100 numuneden sadece 2'sinde *E. coli* (% 2) izole ve identifiye edilmiştir. Bu iki etken 2 ve 20 no'lu örneklerden, Beypazarı'nın 1 no'lu ve 4 no'lu semt pazarlarından toplanan 1'er adet roka (2 no) ve maruldan (20 no) tespit edilmiştir.

#### 3.1. Antibiyotik Direçlilik Test Sonuçları

Sefotoksin (% 2) içeren ve içermeyen her iki EMB agarda iki adet *E. coli* suşu izole edilmiştir.

Antimikrobiyal Disk Duyarlılık Testleri için CLSI referans standartları göz önüne alınarak zon çapları değerlendirildi. Sebze örneklerinden izole edilen *E. coli* suşlarında yapılan antibiyotik direnç testleri sonucunda kullanılan antibiyotiklere karşı dirençlilik saptanamamıştır. Dolayısıyla izolatlarda GSBL varlığı tespit edilmemiştir. **Tablo 4.**'te Disk Difüzyon Testi Sonuçları verilmiştir.

**Tablo 4.** Disk Difüzyon Testi Sonuçları

Antibiyotikler		CLSI Kriterlerine Göre Antimikrobiyal Duyarlılık			Zon Çapları		Değerlendirme	
		S	I	R	No 2	No 20	No2-	No20-
AmC 30	Amoxicillin Clavulanic Acid	≥ 18	14–17	≤ 13	23	24	S	S
ATM 30	Aztreonam	≥ 21	18–20	≤ 17	29	30	S	S
C 30	Chloramphenicol	≥ 18	13–17	≤ 12	26	28	S	S
CAZ 30	Ceftazidime	≥ 21	18–20	≤ 17	29	30	S	S
CAZ CLA	Ceftazidime Clavulonic Acid	≥ 21	18–20	≤ 17	26	28	S	S
CIP 5	Ciprofloxacin	≥ 21	16–20	≤ 15	35	38	S	S
CTX 30	Cefotaxime	≥ 26	23–25	≤ 22	29	30	S	S
CTX CLA	Cefotaxime Clavulanic Acid	≥ 26	23–25	≤ 22	27	30	S	S
GM 10	Gentamicin	≥ 15	13–14	≤ 12	24	23	S	S
IPM 10	Imipenem	≥ 23	20–22	≤ 19	28	28	S	S
NA 30	Nalidixic Acid	≥ 19	14–18	≤ 13	24	26	S	S
SXT	Sulfamethozole Trimethoprim	≥ 16	11–15	≤ 10	26	28	S	S
TE 30	Tetracycline	≥ 15	12–14	≤ 11	21	25	S	S



#### 4. TARTIŞMA

Günümüzde antibiyotik kullanımının artışı ile antibiyotik dirençliliği de artış göstermektedir. Antibiyotiğe dirençlilik gram negatif ve gram pozitif bakterilerde sıklıkla görülmekte; özellikle gram negatif bakterilerde GSBL üretimi dirençliliği arttırmaktadır. Buna paralel olarak *E. coli*'lerde de tüm dünyada direnç oranlarında artış görülmektedir.

Finlandiya'da 1996 yılının Aralık ayında 28 çeşit 137 adet yerel, ithal ve dondurulmuş sebzelerden (domates, salatalık, brüksel lahanası, havuç, brokoli vb.) alınan örneklerle yapılan bir çalışmada 535 suş izole edilmiş ve bunların 22'sinin *E. coli* olduğu tespit edilmiştir. 14 adet farklı antibiyotiğe karşı direnç testleri yapılmış; test sonucunda % 30-90'ının ampisilin ve sefalotine karşı dirençli oldukları saptanmıştır (Monica ve ark. 1999 ). Yeşil yapraklı sebzelerden kıvırcık, marul, roka, dereotu ve maydonoz örneklerinde yapılan bu çalışmada sadece 2 adet *E. coli* izole edilmiş ve antimikrobiyal dirence rastlanılamamıştır

Avrupa ülkelerinde *E. coli* direncinin izlendiği EARSS çalışmasında *E. coli* suşlarında aminopenisilin direnci İsveç, Norveç, Finlandiya'da % 35 oranında iken Bulgaristan, Romanya, İsrail ve Türkiye'de %70'in üzerinde saptanmıştır. EARSS yıllık raporuna göre, 2001-2007 yılları arasında aminopenisilinlerde direnç oranında önemli artış gözlenmiştir. *E. coli*'lerde aminoglikozid direnci beş Avrupa ülkesinde % 5'in altındayken, on dört ülkede % 5- 10 arasında saptanmıştır. Türkiye'nin de içinde olduğu Güney ve Doğu Avrupa'da aminoglikozid direnci % 20-38 gibi çok yüksek oranda bulunmuştur (<http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoringreports>). Bu çalışmada, Ankara'nın Beypazarı İlçesi'nde yeşil yapraklı sebzelerden izole edilen *E. coli*'lerde antibiyotik direnci saptanamamıştır.

Schwaiger ve ark.'nın 2011 yılında yaptıkları çalışmada, pazarlama aşamasındaki (süpermarket ve çiftlik) sebzelerden izole edilen bakterilerin antibiyotik direnci araştırılmıştır. *E. cloacae*, *E. gergoviae*, *P. agglomerans*, *P. aeruginosa*, *P. putida* ve *E. faecalis* türlerinin 30 kadar antibiyotiğe karşı fenotipik dirençleri mikro-dilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Köklü sebzelerde *E. cloacae*, soğanlı sebzelerde *E. gergoviae*, hububat ve salatalarda *P. agglomerans*'ın yüksek prevalansa sahip olduğu bildirilmektedir. Beta-laktamlara karşı direncin en sık *P. agglomerans*'ta ve

Sefaklara karşı ise *E. gergoviae*'ta (% 41 ve % 29) olduğu ifade edilmiştir (Schwaiger ve ark. 2011). Yeşil yapraklı sebzelerden bu çalışmada *E. coli* izolasyon oranı düşük bulunmuş (%2); antibiyotik direnci de saptanamamıştır.

Toplumsal kaynaklı GSBL-pozitif enterobakterilerin başlıca yayılım yolları fekal bulaşma ve uluslararası seyahat ağlarıdır (Woerther ve ark 2013). İsveç'te yapılan bir araştırma aralarında Türkiye olmak üzere Asya ve Orta Doğu Ülkelerine seyahat edecek kişiler için üriner infeksiyon veya septisemi riski olduğunu, dirençli *Klebsiella* suşlarının küresel dağılımına bakıldığında en yüksek bulunma oranına Türkiye'de rastlandığını raporlamıştır (Taham 2012). Ankara'nın Beypazarı İlçesi'nde yapılan bu çalışmada izole edilen *E. coli*'lerde ESBL varlığı tespit edilememiştir.

Başka bir çalışmada Türkiye, Bahreyn, Irak, İsrail, Yemen, Ürdün, Katar, Lübnan, Umman, Filistin, Suudi Arabistan, Suriye, Birleşik Arap Emirlikleri (BAE) ve Kıbrıs'a seyahat eden Federal Almanya Cumhuriyeti vatandaşlarının % 11'inin GSBL üreten *E. coli* ile enfekte olduğu ve % 5'inin ise bu dirençli bakteri tipi ile kolonize oldukları saptanmıştır (Leistner ve ark. 2013). Bu çalışmada yeşil yapraklı sebzelerden *E. coli* izolasyon oranı daha düşük bulunmuş (% 2), dirençlilik hiç saptanamamıştır.

Smalla ve ark, 2018 yılında Almanya'da marketlerden, tüketimi sunulmuş hazır paketlenmiş salata karışımlarından örnekler almış ve bu örneklerde *E. coli*'ye karşı antibiyotik direnç genleri araştırılmıştır. Araştırma sonucunda tetrasikline karşı direnç saptanmış, bunun nedeninin çiftlik hayvanlarında antibiyotik kullanılması ve bu hayvanlardan elde edilen gübrelerin tarlaya verilmesi ve bunun sonucunda bitkilerin toprak ve gübre ile etkileşim olabileceği bildirilmiştir (Smalla ve ark. 2018). Bu çalışmada ise yeşil yapraklı sebzelerden izole edilen *E. coli*'lerde antibiyotik direnci saptanamamıştır.

## 5. SONUÇ

Ankara'nın Beypazarı İlçesi'nde iki farklı semt pazarından alınan yeşil yapraklı sebzelerden yalnızca birer adet örnekte (roka ve marul) *E. coli* saptanmış, düşük oranda (% 2) tespit edilmiştir.

Çiğ tüketilen yeşil yapraklı sebzelerden izole ve identifiye edilen *E. coli* izolatlarında, incelenen antibiyotiklere karşı direnç tespit edilmemiş; GSBL varlığı tespit edilememiştir.

Yapılan çalışmalar incelendiğinde Türkiye'de sebzelerden izole edilen bakteriler üzerine yapılan antibiyotik direnç çalışmalarının yok denecek kadar az olduğu görülmüştür. Ancak çiğ tüketilen bu ürünlerin antibiyotik dirençliliğinin yayılmasında önemli bir kaynak olabileceği düşüncesi ile çalışmaların farklı bölgelerde, farklı ürünlerde de yapılması gerektiği, halk sağlığının korunması ve antibiyotik dirençliliğinin takibi açısından faydalı olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

ANTİBİYOTİK DİRENÇ (2016) ; <http://www.who.int/news-room/factsheets/detail/antibiotic-resistance> .

BARDASI L, TADDEI R, NOCERA L, RICCHI M, MERIALDI G. (2015) Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in meat and vegetable products in Emilia Romagna Region, years 2012-2013.

BOLTON DJ, ENNIS C, BRAIN B, MONAGHAN A. (2009) Serogroups and virulence genes in verocytotoxigenic *Escherichia coli* on beef farms and in the beef abattoir. An international conference organised by ProSafeBeef, March 25th to 26th, Dublin, Advancing Beef Safety through Research and Innovation, p: 59.

BUSH K, JACOBY GA, MEDEIROS AA. (1995) Functional classification scheme for  $\beta$ - lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 1211-33.

BUSH K. (2010) Bench-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections.

BUSH K ,GEORGE A. (2010) Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases *Antimicrob Agents Chemother* March 54(3) 969-976.

CARLTON LG, JOHN FP, GLENN S , CHARLES OT. (2010) Pathogenesis of Bacterial Infections in Animalsp.267 – 307.

CANTON R, NOVAIS A, VALVERDE A. (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect*; 14(Suppl 1):144-53.

CAPITA R. and ALONSO-CALLEJA C. (2013) Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53 11-48.

CLSI (2002) Clinical and Laboratory Standards Institute (Çeviri editörü D Gür),Onbirinci Bilgi Eki, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara .

CLSI (2009) Clinical and Laboratory Standards Institute Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları Antimikrobik Duyarlılık Testleri İçin Uygulama Standartları, Ondokuzuncu Bilgi Eki, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara .

CLSI (2009) Clinical Laboratory Standards Institute Clinical Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, edition. supplement, M100-S19.

CLSI ( 2011) Clinical and Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, Twenty-first Informational Supplement, CLSI Document, M100-S20.

DİNG T, SUO Y, XIANG Q, ZHAO X, CHEN S, XINGQIAN Y, LIU D .(2013) Significance of viable but nonculturable E.coli: Induction, Detection, and Control.

DUMAN Y, GÜÇLÜER N, SERİNDAĞ A ve TEKEREKOĞLU MS (2010). Escherichia coli Suşlarında Antimikrobiyal Duyarlılık ve Genişlemiş Spektrumlu-Beta Laktamaz (GSBL) Varlığı, Cilt 15, Sayı 4, Sayfalar 197-200.

EARSS (2007) AnnualReport([http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring\\_reports/147-58](http://www.rivm.nl/earss/result/Monitoring_reports/147-58)).

EFSA (2010) The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in EFSAJournal, 8, 1658 .

EFSA (2011) Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food producing animalsJournal, 9, 2322-2417.

EL SN.(2008) Gıda Bileşenlerinin Beslenme Açısından Önemi <http://food.ege.edu.tr/files/gidabeslenmedersnotu.pdf> erişim tarihi ( 13.07.2015).

FİLAZİ A. (2009) Kanatlılarda akılcı antibakteriyel ilaç kullanımı. Vet. Tav. Dern. Mekt. Ankara, sayfa 7, 3-8.

HEWARD E, CULLEN M and HOBSON J. (2018 ) Microbiology and antimicrobial susceptibility of otitis externa: a changing pattern of antimicrobial resistance, pp. 314-31 erişim tarihi (Nisan).

ILSI (2011) International Life Sciences Institute The Enterobacteriaceae and Their Significance to the Food Industry, 10.996/30.

KARMALI MA, GANNON V, SARGEANT JM. (2010) Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol*, 140: 360-370 .

KARADEMİR F.( 2007) Yenidoğanda Akılcı Antibiyotik Kullanımı .

KRIS-ETHERTON PM, HECKER KD and BONANOME A Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am J Med* 113;71S-88S.

LEISTNER R, MEYER E, GASTMEIER P, PFEIFER Y, ELLER C, DEM P VE SCHWAB F. (2013) Risk Factors Associated with the Community Acquired Colonization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Positive *Escherichia Coli*. An Exploratory Case-Control Study. *PLoS ONE*, 8, 9, e74323. doi:10.1371/journal.pone.0074323

LIVERMORE D, CANTON R, GNIAKOWSKI M. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother* 59: 165-74 .

MERCK GÜVENLİK BİLGİ FORMU .(2014) EMG agar for the detection and isolation of pathogenic Enterobacteriaceae EC direktifi, 91/155.

MONICA O, OLLI P, MARGARETA P, HANS H. and PENTTI H. (1999) Antimicrobial susceptibility of Enterobacteriaceae isolated from vegetables. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 43:503–509.

NCCLS (1993) National Committee for Clinical Laboratory Standards Approved Standard. Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests, 5th ed. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

PAVLOV A, LASHEV L, VACHIN I, RUSEV V. (2008) Residues of antimicrobial drugs in chicken meat and offals. *Trakia J. Sci* , 6 23-25.

PHILIPPON A, ARLET G, JACOBY GA. (2004) Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*; 46:1-11.

PHE (2016) Public Health England UK Government, E. coli O157 National Outbreak <https://www.gov.uk/government/news/updata-as-e.coli-o157-investigation-continues> (25 October ).

RAO SPN, RAMA PS, GURUSHANTHAPPA V, MANIPURA R and SRINIVASAN K. (2014) Extended-Spectrum Beta-Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* A Multi-Centric Study Across Karnataka. *J Lab Physicians* , 17–13.

SAYGI Ş , BATTAL D, ÖZLEN Ş. (2012) Çevre ve İnsan Sağlığı Yönünden İlaç Atıklarının Önemi, *Marmara Pharmaceutical Journal*, 16, 82-90.

SCHWAIGER K, HELMKE K, HOLZEL C, BAUER J. (2011) Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal of Food Microbiology*, 148:191–196.

SEOW J, AGOSTON R, PHUS L, YUK H. (2012) Microbiological quality of fresh vegetables and fruits sold in Singapore. *Food Control*, 25: 39-44.

SEIFFERT S, HILTY M ,PERRETEN V and ENDIMIANI A. (2013) Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock an emerging problem for human health *Drug Resist Updat* 16, 22-45.

SHIGIHARA M, OBARA T, NAGAI M, SUGAWARA Y, WATANABE T, KAKIZAKI M, NISHINO Y, KURIYAMA S and TSUJII, I. (2014) Consumption of fruits, vegetables, and seaweeds (sea vegetables) and pancreatic cancer risk: The Ohsaki Cohort Study. *Cancer Epidemiology* 38 129–136

SMALLA K, BLAU K, BETTERMANN A, JECHALKE S, FORNEFELD E, VANROBAEYS Y, STALDER T, TOP EM. (2018) Joint press release of the Julius Kühn Institute (JKI) and the BfR on a study of antimicrobial-resistant bacteria with multiple transferable resistance genes on fresh produce The transferable resistome of produce, mBio 9:e01300-18 .

TAHAM J.(2012) Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Epidemiology, Risk Factors, and Duration of Carriage. Department of Clinical Sciences, Malmö Infectious Disease Research Unit Lund University, ISBN 978-91-87189-28-9, Lund Sweden.

TEMİZ A. (2000) Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri, Hatipoğlu Yayınevi, Ankara .

TERKURAN M, ERGİNKAYA Z, ÜNAL E, GÖKMEN T, KIZILYILDIRIM S, KÖKSAL F. (2014) Comparison of Genotypic Diversity and Vancomycin Resistance of Enterococci Isolated From Foods and Clinical Sources in Adana Region of Turkey. Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg, 20 (1). 121-128 .

TÜRKOĞLU FK. (2008) Pediatri Kliniğine Başvuran Annelerin Çocuklarda Antibiyotik Kullanımı Konusundaki Bilgi ve Tutumların Araştırılması. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi Aile Hekimliği, Uzmanlık tezi, İstanbul. s.120.

TÜRKAN O. (2013) Beypazarı ilçesi'nde Jeomorfolojik Birimler ile Arazi Kullanım ilişkisi Coğrafi Bilimler Dergisi 11 (1); 53-68

ÜNAL S, VAHABOĞLU H, LEBLEBİCİOĞLU H, ÖZTÜRK R, KÖKSAL İ GÜLAY Z. (2004) ESBL'lerin tanı yöntemleri. Yeni ve Yeniden Gündeme Gelen İnfeksiyonlar: Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara.

ÜLKER SABRİ VAKFİ (2011) SabriUlkerVakfi Sabri Ülker Gıda Araştırmaları Enstitüsü Vakfi editör ; Sığav Yayın No 062011.



WASHINGTON W, ALLEN S, JANDA J, KONEMAN E (2006). Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 6th. Ed, Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins.

WOERTHER PL, BURDET C, CHACHATY E and ANDREMONT A. (2013) 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.

WHO (2018) <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>  
Erişim Tarihi 5 February.

WHO (2018) World Health Organization Some rights reserved. This work is available under the CC BY-NC licence  
<http://who.int/dietphysicalactivity/fruit/en/print.html>

YETKİN G, KUZUCU Ç, ÇALIŞKAN A. (2009) Kan kültürlerinde üreyen *Escherichia coli*'lerin antibiyotik duyarlılıkları, GSBL oranları ve hastane birimlerine göre dağılımı. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, 13: 147-150.

## ÖZ GEÇMİŞ

### **Bireysel Bilgiler**

**ADI:** Ayşegül

**SOYADI:** ŞAHİN BİLEK

**DOĞUM yeri / tarihi:** Muş/1992

**Uyruğu:** T.C.

**Medeni Durumu:** Evli

**İletişim Adresi:** Özgül Termal Turizm İnşaat Gıda A.Ş

**Eğitim:** Cumhuriyet Üniversitesi 2010

### **Meslek Deneyimi:**

- Enfes Unlu Mamüller 2014
- Kırıkkale Belediyesi 2015
- Özgül Termal Turizm İnşaat Gıda A.Ş.