



**T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PERAKENDE OLARAK SATIŞA SUNULAN KIRMIZI ETLERDE  
GSβL, AMP-C VE KARBAPENEMAZ ÜRETEN *ESCHERICHIA COLI*  
SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL DİRENCİNİN MIC, KLASİK PCR  
VE LAMP PCR ANALİZLERİ İLE ARAŞTIRILMASI**

**VETERİNER HEKİM CEREN HALICI DEMİR  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Sibel KIZIL**

**KIRIKKALE-2023**





T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PERAKENDE OLARAK SATIŞA SUNULAN KIRMIZI  
ETLERDE GSβL, AMP-C VE KARBAPENEMAZ ÜRETEK  
*ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL  
DİRENCİNİN MIC, KLASİK PCR VE LAMP PCR ANALİZLERİ  
İLE ARAŞTIRILMASI

VETERİNER HEKİM CEREN HALICI DEMİR  
VETERİNERLİK MİKROBİYOLOJİSİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN  
Dr. Öğr. Üyesi Sibel KIZIL

KIRIKKALE-2023

Veteriner Hekim Ceren HALICI DEMİR tarafından hazırlanan ‘PERAKENDE OLARAK SATIŞA SUNULAN KIRMIZI ETLERDE GSβL, AMP-C ve KARBAPENEMAZ ÜRETEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL DİRENCİNİN MIC, KLASİK PCR ve LAMP PCR ANALİZLERİ İLE ARAŞTIRILMASI’ adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Veterinerlik Mikrobiyolojisi Anabilim Dalında DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.



## ETİK BEYAN

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,

Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,

Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,

Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,

Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

**Ceren HALICI DEMİR**  
**2023**

## ÖZET

PERAKENDE OLARAK SATIŞA SUNULAN KIRMIZI ETLERDE GSβL, AMP-C VE KARBAPENEMAZ ÜRETEN *ESCHERICHIA COLI* SUŞLARININ ANTİMİKROBİYAL DİRENCİNİN MIC, KLASİK PCR VE LAMP PCR ANALİZLERİ İLE ARAŞTIRILMASI

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veterinerlik Mikrobiyolojisi Ana Bilim Dalı, Doktora Tezi

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Sibel KIZIL

Ocak 2023, 73 sayfa

Antibiyotikler; insanlar ve hayvanlarda, bakteriyel hastalıklara yol açan patojenlerin bertaraf edilmesi için kullanılan ajanlardır. Antibiyotik kullanımıyla birlikte, bakteriyel enfeksiyon kaynaklı ölüm sayılarının azaldığı belirlenmiş, yıllar içinde antibiyotikler enfeksiyon kaynaklı hastalıklarda kullanılan normal bir ilaç haline gelmiştir. Antibiyotiklerin giderek artan kullanımı, antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Bu çalışmada; perakende satışa sunulan kırmızı etlerden izole edilen GSβL, Amp-C ve karbapenemaz üreten *Escherichia coli* (*E. coli*) suşlarının, fenotipik olarak antibiyotik direnç özelliklerinin disk difüzyon ve E-Test ile; antibiyotik direnç genlerinin ise Klasik PCR ve LAMP PCR metodlarıyla belirlenmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda alınan 120 adet kırmızı etten, 12'sinde *E. coli* izole edilmiş ve hızlı idenfikasyon sistemi (BBL Crystal) ile doğrulanmıştır. İzolatların disk difüzyon test sonuçları European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) ve Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)'a göre değerlendirilmiş ve GSβL aktivitesi 10 izolatta belirlenmiştir. Disk difüzyon test sonuçlarına göre; ampisiline ve tetrasikline %91,6, sefotaksime %83,33, kloramfenikole, siprofloksasine ve nalidiksik asite %75, sulfametoksol/trimetopirim ve azitromisine %66, gentamisine %41,6, seftazidime %41,6 ve tigesikline %33,3 oranında direnç görülmüş; meropeneme karşı direnç görülmemiştir. Ayrıca izolatların hepsi (%100) sefoksitine dirençli bulunmuştur. İzolatların E-Test sonuçları EUCAST, CLSI ve E European Union Reference Laboratory-Antimicrobial Resistance (EURL-AR)'a göre değerlendirilmiş ve 1 adet izolatta GSβL bulunmuş; Amp-C ve karbapenemaz aktivitesi izolatların hiçbirinde saptanmamıştır. Antibiyotik direnç genlerinin tespiti için, DNA'lar izole edildikten sonra Klasik PCR ve LAMP PCR testleri yapılmıştır. Klasik PCR ile izolatlar GSβL, Amp-C ve karbapenemaz genleri yönünden analiz edilmiştir. PCR sonrasında, agaroz jel elektroforezde oluşan bantlar değerlendirilmiştir. LAMP PCR metodunda ise

DNA'lar, izotermal şartlarda (65°C), yaklaşık 40 dakika amplifiye edildikten sonra, agaroz jel elektroforezde yürütülerek sonuçlar değerlendirilmiştir.

Klasik PCR sonucunda, GSβL aktivitesi yönünden incelendiğinde 4 izolatta (12B, 1D, 12A, 9D) CTX-M1 geni ve izolatların tamamında SHV geni tespit edilirken; Amp-C ve karbapenemaz geni tespit edilmemiştir. LAMP PCR ile karbapenemaz genleri incelendiğinde, 2 izolat (14D ve 24D) karbapenemaz pozitif tespit edilmiş ve incelenen karbapenemaz genlerinin hepsi (NDM, OXA-48, IMP, VIM, KPC) tespit edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada kırmızı etlerin Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS)'da 24 saatlik ön zenginleştirmesinden, etken izolasyonuna gerek kalmadan, direkt direnç genlerini tespit etmek amaçlanmıştır; Klasik PCR sonucunda, 4 numunede (12B, 1D, 12A, 9D) CTX-M1 ve SHV genleri; diğer numunelerde sadece SHV geni tespit edildiği görülmüştür. Yapılan LAMP PCR'da ise iki numunede (24D ve 14D), tüm karbapenemaz genleri (NDM, OXA-48, IMP, VIM, KPC) tespit edilmiştir. Piyasadan toplanan kırmızı etlerden izole edilen *E. coli*'lerin GSβL, Amp-C ve karbapenemaz genleri halk sağlığı ve hayvan sağlığı açısından riskli olabileceği ve bu konu ile ilgili olarak antibiyotik dirençliliğin ve direnç genlerinin izlenmesi gerektiği kanaatine varılmıştır. Özellikle tüketicileri direkt etkilediği için kırmızı etlerde tespit edilen antibiyotik direnç genlerinin izlenmesi Tek Sağlık konsepti açısından oldukça önemlidir. Antibiyotik kullanımının veteriner sahada uygulanma sıklığının ve hem hayvanlarda hem de insanlarda oluşabilecek antibiyotik direnç yayılımının da azaltılması için gerekli önlemlerin alınması gerekmektedir.

Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 2020/077'dir.

**Anahtar Kelime:** Antimikrobiyal direnç, *E. coli*, PCR, LAMP PCR, GSβL, Amp-C, Karbapenemaz

## ABSTRACT

### RESEARCH OF ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* STRAINS PRODUCING GS $\beta$ L, AMP-C AND CARBAPENEMAS IN RETAIL RED MEATS BY MIC, CLASSIC PCR AND LAMP PCR ASSURANCES

Kırıkkale University

Graduate School of Health Sciences

Department of Veterinary Microbiology, Doctoral Thesis

Supervisor: Asst. Prof. Sibel KIZIL

January 2023, 73 pages

Antibiotics are agents used to eliminate pathogens that cause bacterial diseases in humans and animals. It has been determined that the number of deaths due to bacterial infections has decreased with the use of antibiotics, and antibiotics have become a normal drug used in infectious diseases over the years. The increasing use of antibiotics has led to the emergence of antibiotic-resistant microorganisms. In this study; GS $\beta$ L, Amp-C and carbapenemase-producing *Escherichia coli* (*E. coli*) strains isolated from red meats offered for retail sale were determined phenotypically by disk diffusion and E-Test for antibiotic resistance properties; Antibiotic resistance genes were determined by Classical PCR and LAMP PCR methods. In this context, *E. coli* was isolated in 12 of 120 red types of meat and confirmed by a rapid identification system (BBL Crystal). The disk diffusion test results of the isolates were evaluated according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), and GS $\beta$ L activity was determined in 10 isolates. According to disk diffusion test results; 91.6% resistance to ampicillin and tetracycline, 83.33% to cefotaxime, 75% to chloramphenicol, ciprofloxacin and nalidixic acid, 66% to sulfamethoxazole/trimethoprim and azithromycin, 41.6% to gentamicin, 41.6% to ceftazidime and 33.3% to tigecycline seen; No resistance to meropenem was observed. In addition, all (100%) isolates were resistant to ceftazidime. E-Test results of the isolates were evaluated according to EUCAST, CLSI and European Union Reference Laboratory-Antimicrobial Resistance (EURL-AR) and GS $\beta$ L were found in one isolate; Amp-C and carbapenemase activity were not detected in any of the isolates. Classical PCR and LAMP PCR tests were performed after the DNAs were isolated for the detection of antibiotic resistance genes. By classical PCR, isolates were analyzed for GS $\beta$ L, Amp-C and carbapenemase genes. After having PCR, bands formed in agarose gel electrophoresis were evaluated. In the LAMP PCR method, the DNAs were amplified under isothermal conditions (65°C) for approximately 40 minutes, and the results were evaluated by conducting them in agarose gel electrophoresis. As a result of classical PCR, when examined in terms of



GS $\beta$ L activity, the CTX-M1 gene was detected in 4 isolates (12B, 1D, 12A, 9D) and the SHV gene was detected in all isolates; Amp-C and carbapenemase gene could not be detected. When carbapenemase genes were examined by LAMP PCR, two isolates (14D and 24D) were found to be carbapenemase positive, followed by all of the carbapenemase genes examined (NDM, OXA-48, IMP, VIM, KPC). In addition, this study, it was aimed to determine the resistance genes directly from the 24-hour pre-enrichment of red meats in Buffered Peptone Water (BPW) without the need for agent isolation. As a result of classical PCR, CTX-M1 and SHV genes in four samples (12B, 1D, 12A, 9D); only the SHV gene was detected in other samples. In LAMP PCR, all carbapenemase genes (NDM, OXA-48, IMP, VIM, KPC) were detected in two samples (24D and 14D). It has been concluded that GS $\beta$ L, Amp-C and carbapenemase genes of *E. coli* isolated from red meat collected from the market may be risky in terms of public health and animal health, and antibiotic resistance and resistance genes should be followed in this regard. Monitoring of antibiotic resistance genes detected in red meat is very important in terms of Single Health concept, especially since it directly affects consumers. Necessary measures should be taken to reduce the frequency of antibiotic use in the veterinary field and the spread of antibiotic resistance that may occur in both animals and humans.

This study was supported by Kırıkkale University Scientific Research Projects Coordination Unit. Project Number: 2020/077.

**Keywords:** Antimicrobial resistance, *E. coli*, PCR, LAMP PCR, GS $\beta$ L, Amp-C, Carbapenemase

## TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yürütülmesi sırasında; bana ışık olan, bilgi ve tecrübelerini benden asla esirgemeyen, öğrencisi olmaktan her zaman gurur duyacağım tez danışmanım Dr. Öğretim Üyesi Sibel KIZIL'a en derin saygı ve şükranlarımı sunarım. Tezimde her zaman disiplinli olmam konusunda beni destekleyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat YILDIRIM'a teşekkürlerimi sunarım. Tezin istatistiksel analizlerinin yapılmasında emeği geçen çok kıymetli hocam Kırıkkale üniversitesi Veteriner Fakültesi Dekan'ı Sayın Prof. Dr. Serkan ERAT 'a teşekkür ederim.

Dönem arkadaşlarıma, her zaman beni yüreklendiren ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen çok kıymetli arkadaşım Dr. Öğretim Üyesi Çağrı KALE'ye ve uzaklarda olsada beni hep moral olarak yüksek tutan değerli arkadaşım Dr. Bilge İŞLEK SELVİ'ye teşekkür ederim.

Yoğun çalışmalarım sırasında bana katlanan ve sabır gösteren, her zaman ve her koşulda yanımda olan sevgili eşim Haydar DEMİR'e, canım annem ve canım babama, varlığıyla bana hep destek olan canım kardeşim Enise HALICI'ya, tez yazımında desteklerini esirgemeyen canım kardeşim Hakan HALICI'ya, eşimin ailesine teşekkür ederim.

Canım oğlum Ata DEMİR'e minnettarım.

Karşılıksız destekleriyle çalışmamıza katkısı olan Bioanalyse Firması Genel Müdürü, Dr. Remzi KULEOĞLU'na ve Pharmaline Firması'ndan Cemal KILIÇ'a teşekkürlerimi sunarım.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

ÖZET.....	iv
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	viii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ .....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xii
ŞEKİLLER DİZİNİ .....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xiv
<b>1.GİRİŞ .....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Enterobacteriaceae</i> .....	4
1.1.1. <i>Enterobacteriaceae</i> Ailesinin Genel Özellikleri.....	4
1.1.2. <i>E. coli</i> Genel Özellikleri.....	5
1.1.2.1. İntestinal <i>E. coli</i> patotipleri.....	6
1.1.2.2. Ekstra intestinal <i>E. coli</i> patotipleri.....	7
1.2. Antibiyotiklerin Keşfi .....	7
1.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması .....	8
1.3.1. $\beta$ -laktam Antibiyotikler.....	9
1.3.1.1. B-laktam antibiyotiklerin bakterilere etki mekanizmaları .....	10
1.4. Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Direnç Gelişimi.....	11
1.4.1. Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları .....	12
1.5. Antibiyotik Direncinin Yayılımı.....	16
1.6. $\beta$ -Laktamazların Sınıflandırılması.....	16
1.6.1. Ambler Sınıflandırma .....	16
1.6.2. Bush – Jacoby – Medeiros Fonksiyonel Sınıflandırması.....	17

1.7. GSβL ve Direnç Mekanizmaları .....	19
1.7.1. GSβL Tipleri .....	20
1.7.1.1. SHV grubu GSβL.....	20
1.7.1.2. TEM grubu GSβL .....	21
1.7.1.3. CTX-M grubu GSβL.....	21
1.7.1.4. OXA grubu GSβL .....	22
1.7.1.5. Diğer GSβL gruplar .....	22
1.8. Karbapenemazlar ve Direnç Mekanizmaları.....	23
1.9. Amp-C'ler ve Direnç Mekanizmaları .....	26
1.10. β-laktamaz İnhibitörleri.....	26
1.11. GSβL, Amp-C ve Karbapenemaz Direncinin Dünyadaki Durumuna Genel Bakış.....	27
<b>2. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>32</b>
2.1. Kırmızı Et Numunelerinin Toplanması.....	32
2.2. Kullanılan Ekipmanlar .....	32
2.3. Kullanılan Besi Yerleri ve Solüsyonlar.....	32
2.3.1. Solüsyonların ve Besi Yerlerinin Hazırlanışı.....	33
2.3.1.1. 50X TAE stok solusyonu (Tris-Asetat-Edta) hazırlanışı .....	33
2.3.1.2. Agaroz jelin (%2) hazırlanışı .....	33
2.3.1.3. TE (Tris-Edta) (Primerleri sulandırmak için) .....	33
2.3.1.4. Mueller Hinton Agar (MHA) .....	34
2.4. Kullanılan Antibiyotikler .....	34
2.4.1. Antibiyotik Diskleri .....	34
2.4.2. E-Test Stripleri .....	34
2.4.3. Klasik PCR Primerleri.....	35
2.4.4. LAMP PCR Primerleri.....	35

2.5. Yöntem.....	36
2.5.1. İzolasyon ve İdentifikasyon .....	36
2.5.1.1. İzolasyon .....	36
2.5.1.2. İdentifikasyon.....	37
2.5.2. Fenotipik Olarak Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi.....	38
2.5.2.1. Disk difüzyon testi ve E-test (Elipsomer test).....	38
2.5.3. Moleküler Yöntemlerle Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	40
2.5.3.1. <i>E. coli</i> izolatlarından DNA izolasyonu .....	40
2.5.3.2. <i>E. coli</i> izolatlarının klasik PCR ile GSβL, Amp-C ve karbapenemaz genlerinin belirlenmesi .....	40
2.5.3.3. <i>E. coli</i> izolatlarının LAMP PCR karbapenemaz genlerinin belirlenmesi .....	41
2.6. TPS'den DNA İzolasyonu .....	41
2.7. İstatistiksel Analiz.....	42
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>43</b>
3.1. Disk Difüzyon Test Sonuçları.....	43
3.2. E-Test Sonuçları.....	44
3.3. Klasik PCR ve LAMP PCR Sonuçları.....	45
3.4. İstatistik Sonuçları.....	48
<b>4.TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>49</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>57</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>73</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Antibiyotiklerin keşif kronolojisi.....	9
1.2. Karen Bush gruplandırması .....	24
1.3. Ambler sınıflandırmasına göre karbapenemaz grupları.....	25
2.1. GSBL, Amp-C ve karbapenemazlar için PCR primerleri.....	35
2.2. LAMP PCR primer dizileri .....	35
2.3. Disk Difüzyon değerlendirme zon çapları .....	39
2.4. EUCAST'e göre MIC değerleri, .....	39
2.5. EURL-AR'ye göre MIC sonuçlarının GSβL değerlendirmesi .....	39
2.6. Mc Hugh'a göre istatistik değerlendirmesi .....	42
3.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları.....	44
3.2. E-Test sonuçları .....	45
3.3. Klasik PCR GSβL, Amp-C ve karbapenemaz sonuçları.....	46
3.4. LAMP PCR karbapenemaz sonuçları .....	46
3.5. TPS'den Klasik PCR sonuçları .....	47
3.6. TPS'den LAMP PCR sonuçları .....	47
3.7. Araştırmada Uygulanan Tüm Testlerin Karşılaştırılması .....	47
3.8. Kappa testi sonuçları .....	48

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. $\beta$ - laktam grubu antibiyotikler kimyasal yapıları .....	10
1.2. $\beta$ -laktamların ve $\beta$ -laktamazların Bulunma Zamanları .....	20
1.3. Avrupa'da hayvansal gıdalardan elde edilen izolatlarda GS $\beta$ L enzimlerinin dağılımı .....	28
1.4. Hayvansal gıdalardan elde edilen <i>E. coli</i> izolatlarında sıklıkla (koyu) saptanan GS $\beta$ L enzimlerinin küresel dağılımı .....	28
1.5. Farklı ülkelerde sağlıklı hayvansal gıdalarda bildirilen GS $\beta$ L üreten <i>E. coli</i> suşlarının yüzdesi.....	29
3.1. Disk Difüzyon ve E-Test uygulamaları .....	44
3.2. E-test çalışmaları uygulamaları.....	45

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Derece Santigrat
ART	Antimikrobiyal Duyarlılık Testi (Antimicrobial Resistance Test)
AMR	Antimikrobiyal direnç (Antimicrobial Resistance)
CLSI	Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory Standards Institute)
MRD	Çoklu İlaç Dirençli (Multy Drug Resistance)
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
WHO	Dünya Sağlık Örgütü (World Health Organization, WHO)
EFSA	Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu
EUCAST	Avrupa Antimikrobiyal Direnç Testi Komitesi
EURL-AR	Avrupa Birliği Antimikrobiyal Direnç Referans Laboratuvarı
g	Gram
GSBL	Genişletilmiş Spektrumlu B Laktamaz (Estimated Spectrum beta-Lactamase)
ISO	Uluslararası Standartlar Örgütü (International Organization for Standardization)
IU	Uluslararası Birim (International Unit)
kob	Koloni oluşturan birim (cfu)
L	Litre
mg	Miligram
MHB	Mueller Hinton Broth
MİK	Minimum İnhibe Edici Konsantrasyon (Minimum Inhibitory Concentration-MIC)
ml	Mililitre
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction)
LAMP	Döngü Aracılı İzotermal Amplifikasyon



R	Dirençli (Resistant)
rpm	Dakikadaki Devir Sayısı (Revolutions per minute)
S	Duyarlı (Susceptible)
TPS	Tamponlanmış Peptonlu Su
UV	Ultraviyole
WGS	Tüm Genom Dizileme (Whole Genome Sequencing)
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{l}$	Mikrolitre



# 1.GİRİŞ

Kırmızı et, dengeli beslenmenin zorunlu bir bileşeni ve dünyadaki en iyi protein kaynaklarından biridir. Aynı zamanda, çinko, demir, selenyum, fosfor, A vitamini ve B kompleks vitaminleri kaynağıdır. Kırmızı et, sosyal ve kültürel değeri yüksek olan bir gıdadır. Bu nedenle kırmızı et, insanlar için önemli bir besin kaynağı olmasının yanı sıra, hayatımızın vazgeçilmez parçalarından biridir.

Böylesine önemli bir besin maddesinin üretilmesinde büyük rol oynayan veteriner hekimlerin; enfeksiyöz hastalıklarının sağaltımında tercih ettikleri ajanlardan en çok kullanılanlar antibiyotiklerdir. Antibiyotiklerin kullanımıyla birlikte, enfeksiyöz hastalıkların sağaltımında iyileşmelerin artması, son 30 yıldır beraberinde antibakteriyel direncin oluşmasının en büyük nedenlerinden biri olarak vurgulanmaktadır.

Antibiyotikler; insanlar ve hayvanlarda, bakteriyel hastalıklara yol açan patojenlerin bertaraf edilmesi için kullanılan ajanlardır. Antibiyotik kullanımıyla birlikte, bakteriyel orjinli ölüm sayılarının azaldığı belirlenmiş, sonrasında tüm bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılan normal bir reçete haline gelmiştir.

Antibiyotiklerin giderek artan kullanımı, antibiyotiğe dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına neden olmuştur ve bu sebeple hastalıkların tedavisinde sorunlar yaşanmaya başlanmıştır; antibiyotiklerin yanlış kullanımı, hastane vakalarını artırmış, yoğun bakım ünitelerinde enfeksiyona bağlı, dirençli bakterilerinin yol açtığı ölümlerde artışlar gözlemlenmiştir (Mathur ve Singh, 2005).

İnsanlarda ve hayvanlarda hastalıkların tedavisinde antibiyotik kullanımının giderek artması ile birlikte; hastane ve toplum orjinli enfeksiyonlarda önemli bir yere sahip Gram negatif bakteriler, çiftlik hayvanlarında ve besi hayvanlarında da sıklıkla hastalıklara neden olmaktadır. Çünkü hayvanlarda insanlarda olduğu gibi enfeksiyonlara karşı antibiyotik kullanımının giderek artması sonucunda hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanılan antibiyotiklerin etkinliğinin azalması, hayvanlarda da artan bir antibiyotik direncine işaret etmektedir.

Hayvanlarda, gelişimi etkili bir şekilde artırmak amacıyla da üreticiler tarafından antibiyotikler yaygın olarak tercih edilmiştir (Gyles, 2008; Hendriksen vd., 2008). Hayvanlarda antibiyotikler hastalıkları önlemek ve besi hayvanlarında performanslarını geliştirmek için kullanılmıştır.

Bu şekilde antibiyotiğin bilinçsizce kullanımı, beraberinde hayvan ve insanların mikrobiyotasına zarar vererek, bağışıklık sistemini inhibe eden bir problem haline gelmektedir. Yararlı mikroorganizmaların antibiyotik kullanılarak yok edilmesi, patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç oluşturmaya sebep olmaktadır. (Ammor, Florez ve Mayo, 2007). Antibiyotiğe karşı dirençli bakterilerin, hayvanların dışkılarıyla doğrudan temasla veya bu hayvanlardan üretilen et ve sütlerden insanlara geçtiği; insanlarda kullanılan antibiyotiğin etkisinin azaldığı görülmektedir. Bu durum antibiyotiklerin bilinçsiz ve anabolik amaçlı kullanılmasının neticesinde oluşmaktadır (Jensen, Hammerum, Poulsen, Westh, 1999; Harada ve Asai, 2010; Jong, Stephan ve Silley, 2011).

Antibiyotik direnci insan ve hayvan hekimliği hizmetlerinde karşılaşılan önemli sorunlardan biri olmaya devam etmektedir. Yeni antibiyotiklerin araştırılma ve geliştirilmesinde azalma söz konusu olduğundan, antibiyotik direnci hayvan sağlığını dolayısı ile insan sağlığını tehdit eden bir unsur haline gelmiştir. Bu nedenle toplumda sıklıkla gözlenen hastalıkların tedavisi gittikçe zorlaşmakta ve antibiyotiğe dirençli bakteriler, hastanede yatış süresinin uzaması, ekonomik kayıplar gibi istenmeyen sonuçlara neden olmaktadır (Butler vd., 2006).

Mikroorganizmalarda antibiyotiğe karşı direnç oluşturan birçok mekanizmanın olduğu bilinmektedir.  $\beta$ -laktam grubu antibiyotikleri hidrolize eden  $\beta$ -laktamaz enzim üretimi, direnç mekanizmalarında görülen en önemli etmenlerden biridir.

$\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin yaygınlaşmasıyla birlikte birden fazla  $\beta$ -laktamaz meydana gelmiştir. Genişlemiş Spektrumlu  $\beta$ -laktamazlar (GS $\beta$ L), bu enzimlerin önemli bir bölümünü oluşturmaktadır.

Penisilinler, sefalosporinler ve monobaktamlar gibi  $\beta$ -laktam antibiyotikler, hem insanlarda hem de hayvanlarda en yaygın kullanılan antibakteriyellerdir ve GS $\beta$ L üreten Gram negatif bakterilerin (*E. coli* gibi) çoğu  $\beta$ -laktamı hidrolize etme yeteneğine sahiptir.  $\beta$ -laktam antibiyotikleri inaktive eden GS $\beta$ L ve Amp-C  $\beta$ -laktamazlar, plazmidler ile bakteriler arasında aktarılabilmektedir. *E. coli*, *Klebsiella*

spp., *Enterobacter* spp., gibi türler en sık  $\beta$ -laktamaz üreten mikroorganizmalar olarak kabul görür.

$\beta$ -laktamaz inhibitörlü antibiyotik kombinasyonlarının kliniklerde kullanılmasıyla plazmid kaynaklı Amp-C  $\beta$ -laktamaz sentezleyen mikroorganizmalarda artış gözleendiği vurgulanmaktadır (EFSA, 2011).

*Enterobacteriaceae* ailesinden olan Gram negatif bakteriler,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı oluşturduğu  $\beta$ -laktamaz enzimiyle inhibe edici rol oynamaktadır. Yaklaşık 400'e yakın  $\beta$ -laktamaz enzimi tespit edilmiştir. Bunların 200'e yakını GS $\beta$ L olup, direnç genleri, plazmidler aracılığı ile bakteriler arasında transfer edilebilmektedirler. Dünya genelinde  $\beta$ -laktam ve genişlemiş spektrumlu sefolasporin antibiyotiklerin kullanımı yaygın olmakla birlikte bu durum GS $\beta$ L üreten *Enterobacteriaceae* ailesinin üyelerinden başta *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* olmakla birlikte *Citrobacter*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Proteus*, *Serratia*, *Acinetobacter*, *Morganella*, *Kluyvera*, *Enterobacter*'lerin yaygınlaşmasını kolaylaştırmıştır (Çelebi, Yüce, Çakır, Hacımustafaoğlu, Özkaya, 2009; Yetkin, Kuzucu, Çalışkan, 2006; Güler, Aktaş, Uslu, 2008).

Antibiyotiklerin hayvanlarda yaygın kullanımının, GS $\beta$ L ve Amp-C gibi antibiyotik direnç genlerinin oluşumuna neden olabileceği ve dirençli suşların besin zinciri, direkt temas ya da kontamine su kaynakları ile de yayılabileceğinin altı önemle çizilmiştir (EFSA Journal, 2011).

Antimikrobiyal direnç (AMR), özellikle birkaç antibiyotiğe eş zamanlı direnci (Çoklu İlaç Direnci, MRD), 21. yüzyılda küresel halk sağlığına yönelik en büyük tehditlerden biri olmuştur (Nadeem vd., 2020). Küresel olarak 2050 yılına kadar, yılda 10 milyon insanın antibiyotiğe dirençli bakterilerden kaynaklanan hastalıklardan öleceği tahmin edilmektedir (O'Neil, 2016).

Türkiye'de de tüm dünyada olduğu gibi antibiyotik direnci üzerinde önemle durulmakta olup, çalışmalar devam etmektedir. Ancak, gıda olarak tüketilen besinlerden olan hayvansal ürünler ile ilgili araştırmalar sınırlı sayıdadır.

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün antibiyotik direnci ile ilgili küresel eylem planında 5 hedeften bahsedilmektedir. Bunlar (WHO, 2015):

-Eğitim ve etkin iletişim ile antibiyotik direnci hakkında farkındalık oluşturmak, - İzleme ve araştırma çalışmaları ile veri toplamak,

-Koruyucu tedaviler, sanitasyon ve hijyen koşullarının sağlanması ile enfeksiyon insidansını azaltmak,

-İnsan ve hayvan sağlığında antibiyotik kullanımını optimize etmek,

-Ülke gereksinimlerini göz önünde bulundurarak yeni ilaçlar, tanı araçları, aşılar ve diğer yatırımlar için gerekli ekonomik alt yapıyı oluşturmaktır.

Planlanmış bir şekilde hastalıkların iyileştirilmesi, komplikasyonların ve hastalığın seyrinin olumlu gitmesi ve antibiyotik kullanımının yeterli olması için biz hekimlere büyük sorumluluk düşmektedir.

## **1.1 *Enterobacteriaceae***

### **1.1.1. *Enterobacteriaceae* Ailesinin Genel Özellikleri**

Bakteriler arasında bahsedilen en önemli aile *Enterobacteriaceae*'dir. *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakteriler, dünya genelinde, çevrede, insan ve hayvanın normal bağırsak florasında bulunan mikroorganizmalardır. Üriner sistem enfeksiyonları, yara enfeksiyonları, sindirim sistemi enfeksiyonları, menenjit, pnömoni gibi birçok hastalığın başlıca kaynağıdır. *Enterobacteriaceae* ailesi yapısal olarak Gram negatif çomak, sporsuz, fakültatif anaerob, glikoz ve diğer şekerleri fermente eden basillerdir. Katalaz pozitif ve oksidaz negatiftir (Tham, 2012). *Enterobacteriaceae* önemli türleri arasında *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Salmonella* spp., *Citrobacter* spp., *Shigella* spp., *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Kluyvera* spp., yer almaktadır.

GSβL ve Amp-C üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin direnç kodlayan genetik elemanlarının, kendilerine has mekanizmalar aracılığıyla, türdeş ve/veya farklı tür bakteriler arasında taşındıkları ve buna bağlı olarak dünya çapında hızlı şekilde yayılış gösterdikleri anlaşılmıştır. GSβL enzimleri, *Enterobacteriaceae* ailesinin çoğu üyesi tarafından oluşturulur ve cefuroxime, cefotaxime, ceftriaxone, ceftizoxime, ceftazidime, cefpirome ve aztreonam gibi oksimino-sefalosporinleri hidrolize aztreonamı hidroliz edebilen ve genellikle klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi β-laktamaz inhibitörleri ile inhiye olan enzimlerdir (WHO, 2013)

### 1.1.2. *E. coli* Genel Özellikleri

*Escherichia* cinsi içinde *E. adecarboxylata*, *E. fergusonii*, *E. hermanii*, *E. vulnaris*, *E. blattae*, *E. albertive*, *E. coli* türleri yer almaktadır (Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, 1984). *E. coli*, 1885 yılında Alman Bakteriyolog Theodore Escherich tarafından keşfedilmiştir. *Enterobacteriaceae* ailesinden, Gram negatif, sporlanmayan, flagellalı, çomak ya da basil şeklinde, kolaylıkla üreyen, glukoz, mannitol ve laktozu fermente eden bir bakteridir (Vandekerchove, 2014; Wasteson, 2001).

*E. coli*, insanlarda ve hayvanlarda ciddi enfeksiyonlara neden olması ve aynı zamanda farklı konakçıların mikrobiyotasının önemli bir bölümünü temsil etmesi nedeniyle, mikrobiyoloji dünyasında özel bir yere sahiptir. Doğrudan temas, hayvan dışkısı ile temas veya besin zinciri gibi çok sayıda yolla hayvanlar ve insanlar arasında virulent ve/veya dirençli *E. coli*'nin olası bir bulaşması büyük endişe kaynağıdır.

*E. coli* ayrıca hem insan hem de hayvanlarda tedavi başarısızlıklarından sorumlu olabilecek önemli direnç genleri kaynağını temsil eder. *E. coli*'de artan sayıda direnç geni tanımlanmıştır (Poirel vd., 2017).

1919 yılında, Dr. Escherich'e ithafen; Castelli ve Calmer tarafından etken, *Escherichia coli* olarak adlandırılmıştır (Töreci, 2002). Bu mikroorganizmayı sınıflandırmak için somatik 'O', flagellar 'H' ve kapsüler 'K' antijenleri alt gruplandırma yapmak için kullanılmaktadır (Zanella, 2017; Demby ve Cunningham, 1986). 'O' antijeni hücre zarını oluşturan, beş ya da daha fazla polisakkaritin meydana gelmesiyle ortaya çıkan, lipopolisakkaritlerden oluşmuş, ısıya dirençli yüzey antijenidir. 1945 yılında, Kaufmann ve Vahlne, kapsül antijenini simgeleyen 'K antijeni' terimini kullanmışlardır. K antijeni, bir depo polisakkarit olan N-asetil-neuramik asit yapısında olup, 60 farklı 'K' antijeni çeşidi olduğu bildirilmektedir. (Kaufmann ve Vahlne, 1945). 'H' antijeni ise hareket organeli ile flagellanın bir parçası olup; hareketli *E. coli* suşlarında gözlemlenebilir. Yaklaşık 56 farklı 'H' antijeni varlığından söz edilmektedir (Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, 1984). Fimbrial antijen olan 'F antijeni' ise daha önceleri 'K' antijeni olarak nitelendirilmiş, protein yapısının çözülmesiyle beraber 'K' antijeninden ayrılmış ve 'F' antijeni olarak tanımlanmıştır. 'F antijeni' ise suşların identifikasyonunda

kullanılmaktadır (Parreira ve Gyles, 2003). *E. coli* patotipleri intestinal ve ekstraintestinal olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadır.

#### 1.1.2.1. İntestinal *E. coli* patotipleri

**Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC):** Bağırsak yapısının içerisinde enterotoksin oluşturarak hafif seyreden hastalıktan ağır seyreden hastalığa kadar gidebilmektedir. Özellikle 2 yaş altındaki çocuklarda, bakteriyel diyarenin öncelikli nedenidir (Bilgehan, 2000; Erdem, 1999).

**Enteropatojenik *E. coli* (EPEC):** Süt çağındaki çocuklarda ağır ishallere neden olmaktadır. Salgın yapma potansiyeli vardır. Patogenezi henüz anlaşılamamıştır (Bilgehan, 2000; Erdem, 1999).

**Enterohemorajik *E. coli* (EHEC):** *E. coli* O157, H7 suşları hastalık sebebidir. Gıda ve su ile bulaşarak ishal yaparlar. Çocukların ishalinde kan görülmesi, ileri aşamalarda anemi ve böbrek yetmezliğine neden olurlar (Bilgehan, 2000).

**Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC):** Mukozada ülserli, salgılı lezyonlara neden olurlar (Bilgehan, 2000). Bağırsak dışı hastalıklarında ise üriner sistem enfeksiyonlarının, hastane kaynaklı pnömonilerin, yeni doğan menenjitinin en önemli sebebi *E. coli*'dir (Bilgehan, 2000; Erdem, 1999).

**Diffuz Adherent *E. coli* (DAEC):** Diyareye neden olmakla birlikte, HEP-2 (Human Epitelial Tip-2) hücrelerine difuz olarak yapışmaktadır (Nataro ve Kaper, 1998). Çocuklarda sıklıkla görülür. Hep-2 adheziv varlığı nedeniyle mikrokoloni oluşturmamaktadır (Dho ve Lafont, 1984). Bu tipte adhezin geni ve intimin varlığı ortaya konulmaktadır (Halkman, Noveir ve Doğan, 2001).

**Enterogregativ *E. coli* (EAEC):** İlk olarak hayvanlarda tespit edilmiştir. Tropikal bölgede yaşayan çocuklarda sık rastlanmaktadır (Halkman, Noveir ve Doğan 2001). AIDS"le bağlantılı olduğu tespit edilmiş; AIDS"te kronik ve yolcu ishalinin ortaya çıkmasında etkili olduğu bildirilmiştir (Huang, Mohanty, Dupont, Okhuysen, Chiang, 2006). Yapılan araştırmalar neticesinde, iki sınıfa ayrıldığı, etkenin agregatif veya difuz yapışma gerçekleştirebildiği bildirilmiştir (Nataro, Kaper, Robins, Prado ve Levin, 1987)

### 1.1.2.2. Ekstra intestinal *E. coli* patotipleri

**Septisemik *E. coli*:** Septisemiden sorumlu olup, invazyonun ilk adımı bağırsak epiteline adhezyondur. Adhezyon; yani tutunmayı, fimbrial adhezinler gerçekleştirir. Septisemik tüm suşlar Colisin V'yi kodlayan bir COL V plazmidi taşımakta olup, aynı zamanda tip IV pilusunuda ifade etmektedir. Bu pilus *Salmonella Typhi*'de oldukça önem taşımaktadır. COL V plazmidi, bu gruptaki *E. coli* suşlarının, canlı kalması açısından oldukça önemlidir (Moulin-Schouleur vd., 2007)

**Üropatojenik *E. coli*:** Köpek, kedi ve insanlarda idrar yolları enfeksiyonuna neden olmaktadır. Köpeklerde daha sık gözlenmektedir (Vanessa ve Carly, 2015). Virülens genlerinin çoğunluğu büyük multigenik kromozomal segment taşımaktadır (Jann K ve Jann BJ, 1977). Virülens faktörleri adhezin, hemolizin, aerobaktin ve sitotoksik nekrotizan faktördür (Omerovic, Müştak ve Kaya, 2017).

**Avian Patojenik *E. coli*:** Kanatlı havanlarda çoğunlukla ölümle sonuçlanan koliseptisemiye neden olan bir patojendir. Broylerde selülitide gözlenebilir ve ciddi ekonomik kayıpları beraberinde getirir. Virülens faktörleri adhezin, sıcaklığa duyarlı hemaglutinin, kolisin, demir kazanım sistemi, serum direnci ve toksinlerdir. UPEC ve 'newborn meningitis-causing *E. coli*'nin sebep olduğu yeni doğan meningitis hastalığında, APEC suşlarının potansiyel zoonotik etken olabileceğini belirtilmiştir (Omerovic, Müştak ve Kaya, 2017; Nagy ve Fekete, 2005).

## 1.2. Antibiyotiklerin Keşfi

Antibiyotik kullanımı günümüz ilaçlarının keşfinden çok daha uzun zaman öncesine dayanmaktadır. Eber papirüsleri (M.Ö. 1550), antibiyotikleri anlatan en eski doküman olarak bilinmektedir. Antik Mısır ve Çin'de, üzerinde mantar oluşmuş ekmeğin yara ve yanık tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (Hutchings, Truman ve Wilkinson, 2019). 19. yüzyılda Sir John Scott Burden-Sanderson, üzeri küf kaplamış sıvı kültüründe bakteri bulunmadığını fark etmiştir. Antibiyotik kullanımının tarihi Çizelgesi 1'de gösterilmiştir.

Selman Waksman, ilk defa antibiyotiği 'Bir bakteri tarafından diğer bakterileri yok etmek için oluşturulmuş bileşik' olarak betimlemiş ve antagonizma tanımını yapmıştır.



Clardy, Fischbach ve Currie, 2009). Waksman'ın çalışmalarında, 1940-1960 yılları arasında, antibiyotikler için altın çağ olarak bildirmektedir (Hutchings vd., 2019). Gelişen teknolojinin aksine, yeni antibiyotik türleri en son 1980'lerde keşfedilmiştir. Son 50 yıldır yeni bir molekül keşfedilmediği bildirilmiştir (Davies ve Behroozian, 2020). Bu durum var olan moleküllerin üzerinde değişiklik yapılarak yenilenmesini zorunlu kılmaktadır. Bu durum antibiyotik direncinin ortaya çıkmasıyla, yeni antibiyotik keşfi yerine kronik hastalıkların tedavisinde kullanılacak moleküllerin geliştirilmesine yön vermiştir. 1980 yılında antibiyotik keşfi üzerine yatırım yapan ilaç firması sayısı 20 iken, 2015 yılında bu sayı 5'e inmiştir (Durand, Raoult ve Dubourg, 2019).

### **1.3. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması**

Antibiyotikler mikroorganizmalar üzerinde etki derecelerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına ve farmakokinetik özelliklerine göre çeşitli kriterlerin yanı sıra vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlara göre de gruplandırılırlar (Aktuğlu, 1997; Anonim 2, 2000; Chambers, 2001).

Antibiyotik direnci konusunda; antibiyotik gruplandırılmasında bakılması gereken sınıf, mikroorganizmalar üzerindeki etkilerine göre olan sınıflandırmadır. Bu sınıflandırma; hücre duvarı sentezini ( $\beta$ -laktamlar, glikopeptidler), protein sentezini (aminoglikozidler, tetrasiklinler, makrolidler, streptograminler) ve nükleik asit sentezini inhibe edenler (Kinolonlar, sülfonamidler, rifamisinler), metabolik yolların veya bakteriyel enzimleri inhibe edenler olmak üzere özetlenebilmektedir (Gangle, 2005).

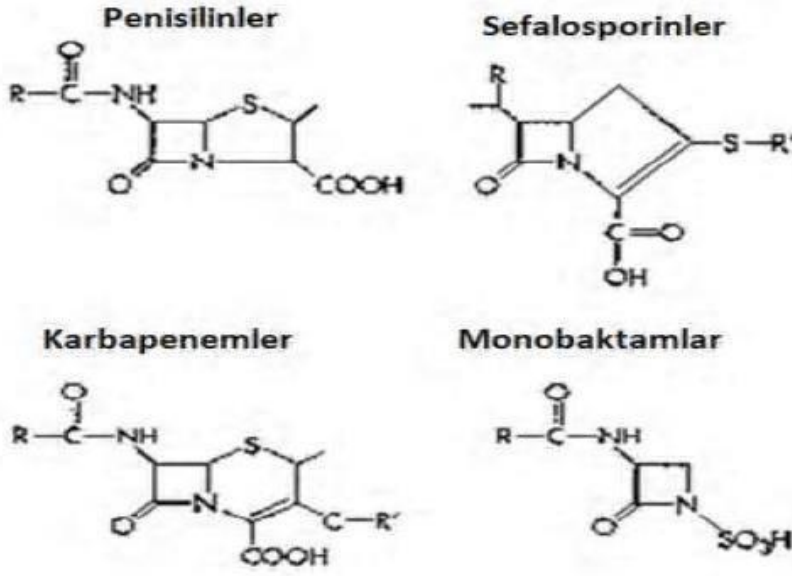
**Çizelge 1.1.** Antibiyotiklerin keşif kronolojisi (Durand, Raoult ve Dubourg, 2019)

Yıl	İsim	Keşif
1871	Joseph Lister	<i>Penicillium glaucum</i> 'un bakteri büyümesi üzerindeki inhibitör etkisini keşfetmiştir
1877	Louis Pasteur ve Jules François Joubert	İdrar numunelerindeki <i>Bacillus anthracis</i> büyümesini incelemiş ve aerobik bakteriler ile ortak kültüre alındığında inhibe olduğunu keşfetmiştir.
1889	Jean Paul Vuillemin	İlk defa 'antibiozis' terimini bularak 'kendi varlığını sürdürebilmek için diğer organizmaların öldürülmesi' anlamında kullanmıştır.
1897	Ernest Duchesne	<i>Penicillium glaucum</i> tarafından <i>E. coli</i> inhibisyonunu Fleming'den yaklaşık otuz yıl önce keşfetmiştir
1909	Paul Ehrlich	İlk kimyasal antimikrobiyal molekülü keşfetmiştir. Arsphenamin, sifilizde <i>Treponema pallidum</i> 'a karşı kullanılan bir moleküldür
1928	Alexander Fleming	<i>Staphylococcus aureus</i> kolonilerinin şans eseri bir küf tarafından inhibe edildiğini keşfetmiştir. <i>Penicillium notatum</i> 'dan saflaştırılan moleküle penisilin adı verilmiştir. Aynı zamanda bir antibakteriyel enzim olan lizozimi keşfetmiştir.
1930	Gerhard Domagk	Sülfanilamid'in antimikrobiyal etkisini keşfetmiştir
1930	René Dubos	<i>Streptococcus pneumoniae</i> parçalayan <i>Bacillus</i> kaynaklı bir enzim keşfetmiştir
1940	Selman Waksman	Kendi geliştirdiği Waksman Platformu adı verilen method ile birçok antibakteriyel ve antifungal bileşiği keşfetmiştir. Bunlar: Aktinomisin, Streptomisin, Neomisin, Fumigasin ve Klavasindir.

### 1.3.1. $\beta$ -laktam Antibiyotikler

$\beta$ -laktam ajanlar bakterilerin hücre duvarını etkileyen antibiyotikler grubunda bulunan güçlü organik asitlerdir (Jehl, Chomarat, Weber, Gérard, Livermore, 2004). Penamlar, penemler, sefemler ve monolaktamlar bunların başlıcalarıdır (Coşkun, 2011; Tekiner, 2016).  $\beta$ -laktamlar, mikroorganizmalar üzerindeki geniş spektrum etkileri ve seçici toksisiteleri ile hemen hemen tüm yaş gruplarında kullanılabilir olmakla birlikte, bütün vücut sıvılarına olan dağılım özellikleriyle, günümüzde en çok tercih edilen antibiyotik sınıfındadırlar. Şekil 1.1'de  $\beta$ -laktam grubu antibiyotiklerin kimyasal yapıları gösterilmektedir.  $\beta$ -laktamların yan etki insidanslarının düşük olması, lisanslı tüm antibiyotik ajanlar arasında kullanım alanını %70'e yaklaştırmıştır (Dağlar ve Öngüt, 2012).

$\beta$ -laktamlar, 4 atomlu  $\beta$ -laktam halkasına sahiptirler (Örnek, 2013; Tekiner, 2016). Klavulanik asit, penisillanik asit, sulbaktam ve tazobaktam  $\beta$ -laktamaz inhibitörleridir. Bu inhibitörler, dahil oldukları antibiyotiğin  $\beta$ -laktamazlar tarafından hidrolize edilmesini engeller ve tek başlarına bakterisid etki göstermezler. Veteriner hekimlikte en çok kullanılan  $\beta$ -laktam antibiyotikler; ampisilin, amoksisilin, benzilpenisilin, kloksasilin, hetasilin, amoksisilin- klavulanat, sefalosporinler ve karbapenemlerdir (Tekiner, 2016).



Şekil 1.1.  $\beta$ - laktam grubu antibiyotikler kimyasal yapıları (Castanheira, Mendes, Walsh, Gales ve Jones, 2004)

### 1.3.1.1. B-laktam antibiyotiklerin bakterilere etki mekanizmaları

$\beta$ -laktamlar, bakteri yapısındaki peptidoglikan tabakasının sentezine etki ederek, bakteriyi etkisizleştirirler. Bakterilerin hücre duvarındaki peptidoglikan yapısı, bakterinin yapısını korur ve zarar gelmesini engeller. Peptidoglikan (mürein) tabakası bakterilerin bütünlüğünü sağlayan, kısa peptid zincirleri ile çapraz bağlanan ve Gram negatif bakterilerde, kalın bir yapıdır.

Mürein katmanı; çapraz şekilde bağlı olan, uzun olmayan peptid zincirlerinden oluşur ve N-asetil muramik asitin yapısındaki D-alanin D-alanin'lerin transpeptidasyonu ile oluşur (Gür, 2002a). Transpeptidazı gerçekleştiren enzimlere penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) denir.  $\beta$ -laktam antibiyotiklerde ana etki, penisilin bağlayıcı proteinlerdir (Gür, 2002). B-laktam antibiyotiklerde D-alanin D-alanin molekülüyle benzerlik bulunur. Buna bağlı olarak  $\beta$ -laktam antibiyotiklerinin,

PBP ile etkileşimlerine ve D-alaninlerin yerini almasıyla transpeptidasyonu engellerler (Gür, 2002a). Böylece bakteride ozmotik direnç kaybı gelişir, hücre duvar yapısı bozulur ve sonuç olarak bakterinin lizisi gerçekleşir (Gülay, 2003). B-laktam antibiyotikler bakterisidal etki göstermektedirler. Bakteriler,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere karşı savunma mekanizması olarak  $\beta$ -laktamaz tipi enzimleriyle, antibiyotikleri inaktive ederler (Aktaş, 2004).

#### 1.4. Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Direnç Gelişimi

*Penicillium*'un 1928'de (Flaming, 2001; Chain vd., 1940) insan sağlığı alanındaki diğer bakterilerin büyümesini engellediği kanıtlandığından beri, antibiyotik endüstrisi hızla gelişti ve binlerce hastanın hayatını başarıyla kurtardı ve bu nedenle insan sağlığındaki en büyük keşiflerden biri olarak kabul edilmektedir. Takip eden yıllarda, birçok farklı antibiyotik türü tanımlanmış ve klinik tedavide başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ancak Penisilin keşfinden birkaç yıl sonra, bakteri direnci olgusu ortaya çıkmaya başladı. 1972'de İngiltere, Amerika Birleşik Devletleri ve diğer ülkelerde Metisilin Dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA) saptandı (Lee vd., 2018). 2008 yılında *K. pneumoniae*'de bir metallo- $\beta$ -laktamaz geni olan NDM-1'nin hidrokarbon antibiyotiklere dirençli olduğu tespit edilmiştir (Yong vd., 2009). 2015 yılında, güney Çin'de domuzlardan alınan örneklerden elde edilen *Enterobacteriaceae* üyelerinden, polimiksinlere karşı dirence sahip, yeni bir direnç geni *mcr-1* tanımlanmıştır (Liu vd., 2011).

2017'de WHO, antibiyotiklere direnç geliştirmiş 12 tehlikeli bakteri ailesini kapsayan, insan sağlığını tehdit eden, en ölümcül süper mikropların ilk listesini yayınladı; burada yer alan 'kritik' bölüm, üç bakteriye atıfta bulunmaktadır: karbapenem dirençli *Acinetobacter baumannii*, karbapenem dirençli *Pseudomonas aeruginosa* ve karbapenem dirençli ve GS $\beta$ L üreten *Enterobacteriaceae*'dir (*Klebsiella*, *E coli*, *Serratia* ve *Proteus* dahil). Hepsinde çoklu ilaç dirençliliği görülmekte ve bir dizi ciddi enfeksiyona neden olabilmektedir (WHO., 2017)

Günümüzde antimikrobiyal direnç, antibiyotik tedavilerinde başarısız olma veya uzun süreli maruz kalma sonucu ortaya çıkan 'modern' bir mikrobiyal özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Bununla birlikte, eski permafrost (donmuş toprak), izole mağaralar ve mumyalarda antimikrobiyal direnç özelliklerinin tanımlanması,

antimikrobiyal özelliklerin çok eski zamanlardan beri var olduğunu göstermekte ve antimikrobiyal özellikler doğuştan gelen ve edinilmiş AMR olarak ayrılmaktadır. Birincisi, mikroorganizmaların değişen çevre koşullarına uyum sağlamak için gerçekleştirdikleri yavaş ve uzun bir evrim sürecinin sonucudur; ikincisi, antimikrobiyal tedavi ile temsil edilen ani bir seçici basınca ‘hızlı’ bir adaptasyonun sonucudur (Giedraitienė, Vitkauskienė, Naginienė ve Pavilonis, 2011; Perry, Waglechner ve Wright, 2016).

#### **1.4.1. Bakterilerin Antibiyotiklere Karşı Direnç Mekanizmaları**

Bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç mekanizmaları 9 şekilde özetlenmiştir (Zhang ve Cheng, 2022). Bunlar:

**-Hedef Değiştirme veya Mutasyon:** Antibiyotiklerin antibakteriyel etki göstermesi için, hedef bölge ile birleşmesi gereklidir; burada hedef bölgedeki mutasyon veya modifikasyon normal kombinasyona müdahale edecek ve böylece antibiyotikleri etkileyecektir. Penisilin Bağlayıcı Proteinler (PBP'ler) (Miyachiro, Contreras-Martel ve Dessen, 2019),  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin hedefi olarak hareket eden, hücre duvarı peptidoglikanının sentezinde rol oynayan, bakteriyel sitoplazmik membran üzerinde bulunur. Mutasyon meydana geldiğinde,  $\beta$ -laktam antibiyotikler ile bunların hedef PBP'leri arasındaki afinite ortadan kalkacak ve buda antibiyotiklerin hedefe bağlanamamasına ve bakteriyel direncin indüklenmesine neden olacaktır.

**-Geçirgenlik azaltma:** Gram negatif bakterilerde, hücre duvarı esas olarak, hidrofilik bileşiklerin lipit çift tabakasından geçmesinin zor olduğu ve porin kanalları veya dış zar porinleri (Omps) tarafından kolaylaştırılması gereken proteinler ve lipopolisakaritlerden oluşur (Nikaido, 2003; Chevalier vd., 2017).

Antibiyotiklere maruz kaldıktan sonra, edinilen ilaç direnci, bakterilerin zar geçirgenliğini azaltmak için, porin özellikleri ve miktarı değiştirilerek üretilebilir. Normal olarak, bakteriyel dış zarın kanal proteinleri, OmpF ve OmpC ile spesifik olmayan transmembran kanalları oluşturarak, antibiyotik ve diğer ilaç moleküllerinin bakterilere girmesine izin verir (Moya-Torres vd., 2014; Ziervogel ve Roux., 2013, Bafna vd., 2020). Fakat bakteriler antibiyotiklere daha sık maruz kaldığında, OmpF proteinini kodlayan yapısal gende mutasyonlar indüklenecek, bu da OmpF kanal proteininin azalmasına veya kaybına neden olacak ve böylece  $\beta$ -laktamlar veya kinolonlar gibi antibiyotiklerin bakterilere girmesi engellenecektir.

**-Aktif dışa atım pompalar:** Bakterilerde gelişen, bakteriyel dışa atım pompası sistemi (Amaral., 2014), bu zararlı molekülleri bakterilerin dışına pompalayabilen, toksik bileşiklerin hücrelerde birikmesini önleyen, kendini koruma mekanizmasıdır. Bakterilerin plazma zarında bulunan bakteriyel akış pompaları (Eps), çeşitli substratları, sitoplazmadan aktif olarak çıkarmak için taşıyıcı olarak görev yapar (Blanco vd., 2016).

**-Hidrolaz veya inaktive edici enzim:** Hidrolazlar veya inaktive edici enzimler gibi, bakteriler tarafından üretilen etkisizleştirici enzimler, hücreye giren antibiyotikleri hedef bölgeye ulaşmadan önce etkisiz hale getirmek için hidrolize edebilir veya değiştirebilir. Bakterilerde, antibiyotiklerin yapısını dönüştürmek için sırasıyla asetilat, fosforilat veya adenilat aminoglikozit antibiyotikleri olan N-asetiltransferaz, O-fosfotransferaz ve O-adenosiltransferaz gibi bol miktarda aminoglikozit değiştirici enzim vardır. Bakteriler tarafından üretilen inaktive edici enzimler başlıca şunları içerir:  $\beta$ -laktamaz, aminoglikozit inaktive edici enzimler, kloramfenikol asetiltransferaz, vb. (Tooke vd., 2019).  $\beta$ -laktamaz, antibiyotiğin siklik yapısını bozmak için karbonil kısmına kovalent olarak bağlanabilir ve hedefe ulaşmadan önce  $\beta$ -laktam antibiyotiğinde bozulmaya neden olur. Ayrıca hidroliz yapmama yoluyla  $\beta$ -laktam antibiyotiklere hızlı ve sıkı bir şekilde bağlanabilir ve antibiyotiklerin hedef bölgeye bağlanarak ilaç direnci göstermesini önler.  $\beta$ -laktamazlar birçok bakteri tarafından her biri spesifik  $\beta$ -laktam halkalarını hidrolize edebilen sekiz farklı tipte salgılanır (Ghafourian, Sadeghifard, Soheili ve Sekawi, 2015). Karbapenemazlar ve GS $\beta$ L'ler, en önemli iki  $\beta$ -laktamazdır. Karbapenem antibiyotiklerine karşı *Enterobacter* direncinin ana mekanizması, karbapenemi hidrolize eden enzimlerin üretilmesidir. Karbapenemaz enzimleri üretebilen *Enterobacteriaceae* bakterilerine, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* (CPE) adı verilir.

GS $\beta$ L'ler, penisilin ve sefalosporinler gibi çoğu  $\beta$ -laktam antibiyotiği yok edebilir; ancak karbapenem antibiyotiklerini yok edemez ve genellikle *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii* ve diğer bakteriler tarafından üretilir (Sawa, Kooguchi ve Moriyama, 2020; Sköld, 2021).

**-Metabolik değişiklik veya oksotrofi:** antibiyotik direnci mutasyonları metabolizmanın antibiyotik direncine aktif olarak katkıda bulunduğu gösterilmiş olsada, yalnızca metabolik genlerde tanımlanır ve metabolik düzensizlik, yaygın olarak bahsedilen bir antibiyotik direnci mekanizması olarak tanımlanmaz. 2021'de,

bazı metabolik yollarda, genlerdeki mutasyonların, klinik olarak patojenik *E. coli* genomunda yaygın olarak bulunan antibiyotik direncini indükleyebileceğini ilk kez bulmuştur (Zampieri, 2021). Bu mutasyona sahip gen, antibiyotikler tarafından ortaya çıkan trikarboksilik asit döngüsünün aktivitesini inhibe ederek, metabolik toksisitenin oluşmasını önleyerek, antibiyotiklerin öldürücü etkisini inhibe ederek ve sonunda antibiyotik direncine yol açarak bazal solunumu azaltır (Mee, Collins, Church ve Wang, 2014).

**-Hedef koruyucu proteinler:** Bakteriyel proteinler, bazı antibiyotik hedeflerini bir antibiyotik birleşimlerinden koruyarak, antibiyotiklerin bakteriyostatik etkilerini ortadan kaldırır. Daniel N. Wilson (Sharkey, Edwards ve O'Neill, 2016) hedef korumayı etki tarzına göre üç türe ayırmıştır. Tip I hedef koruma, tetrasiklin ribozomal koruma proteinlerinin (TRPP' ler) ribozomlara bağlanmasının yanısıra, bozulmuş ribozomal yapıyı tersine çevirerek ribozom konfigürasyonunda değişikliklere yol açabilir ve tetrasiklin D-halkası ile 16S rRNA bazı C1054'ün etkileşimine doğrudan müdahale edebilir. Tetrasiklin sınıfı ilaçlar bu yapıya bağlanamaz ve bağlanma yerinin 30S alt biriminden ayrılarak, 13 TRPP sınıfının tanımlandığı ribozomu korur (Zampieri, 2021; Mee vd., 2014). Tip II hedef korumada, antibiyotikler hedef birimlerle yapılan uyumlu değişikliklerle dolaylı olarak uzaklaştırılır. Antibiyotiğe dirençli ABC-F proteinlerinin aracılık ettiği protein grubu, linkomisinler, makrolidler, azadonlar, fenoller, pleuromutilinler ile A ve B gruplarının stroopograminleri dahil olmak üzere ribozom 50S alt birimlerinin antimikrobiallerine karşı birincil klinik direnç kaynağıdır (Su vd., 2018). Tip III hedef koruma proteinleri, hedef yapısındaki değişikliklere neden olur; böylece antibiyotiklere bağlanma durumunda etkinleşebilir.

**-Kendi kendini onaran sistemlerin başlatılması:** Enterik bakterilerin çoklu antibiyotik direnci operonu, antibiyotik direncini artırmaya katkıda bulunan DNA onarımını ve dış zar bütünlüğünü manipüle eder. *E. coli* çoklu antibiyotik direnci lokusu, tetrasiklinler, kinolonlar ve  $\beta$ -laktamlara karşı çapraz direncin bir belirleyicisi olarak kabul edilmiştir (Zhang ve Cheng, 2022). Kendi kendini onaran sistemlerin başlatılması sonucunda ilgili genlerin regüle edilerek; genlerin ekspresyonunun azaltılması ile, hücrelere giren antibiyotik oranı azalır böylece antibiyotiğin, hücre yapısı ile hücre metabolizması üzerindeki etkisini azaltır. Bu

yöntem antibiyotiklerin bakteriyostatik etkisini tamamen ortadan kaldıramaz, ancak bakterilerin antibiyotiklere karşı toleransını artırmasını sağlayabilir.

**-Hücre morfolojisindeki değişiklikler:** Hücre hacmindeki artış bakterilere giren antibiyotiklerin azalmasına katkıda bulunurken hem bükülme hem de genişleme yüzey hacim oranını düşürerek, bakterilerin yüzeyinden daha az antibiyotik geçmesini sağlayabilir. Bakterilerin antibiyotiklerin hedefi olmaktan kaçınmak için şekil değiştirdiği bildirilmiştir (Zhang ve Cheng, 2022). Tek hücre deneyleri ve teorik modeller kullanarak, hücre morfolojisindeki değişikliğin, hücrenin antibiyotik ortamına uyum sağlamasına ve hayatta kalmasına olanak tanıyan bir geri bildirim stratejisi olduğunu saptamışlardır. Hücre morfolojideki değişikliklerden sonra bakterilerin, antibiyotiklerin baskısını yenebildiği ve hızlı büyüme durumuna geri dönebildiği bildirilmiştir (Banerjee., 2021).

**-Biyofilm koruması:** Bakterilerin büyük çoğunluğu, biyofilm korumasını, antibiyotiklerin etkilerine karşı toplu bir şekilde bulunmasıyla sağlarlar. Bakteriyel biyofilm, tıbbi malzemeler gibi nesnelere veya proteinin bir otokrin polimer matrisi ile çevrelediği, vücut mukozasının yüzeyine adsorbe edilen bakteriler tarafından oluşturulan, özel bir hayatta kalma formudur (Høiby vd., 2010). Yoğun biyofilmler, antibiyotiklerin; bakteri popülasyona yayılmasını sınırlamak ve antibiyotik inaktivasyonu ile sağlanan korumayı arttırmak için fiziksel engeller oluşturarak bakterilerin antibiyotiklere maruz kalmasını engeller.

Bakteriyel topluluklar, türler arası etkileşim yoluyla antibiyotik maruziyetinden kurtulabilir:

a) Kolektif ilaç direnci; topluluk içindeki etkileşimi, antibiyotiklerin büyümeye devam etmesine karşı direnç gösterme yeteneğini artırabilir; böylece bakteri topluluğunun MIC'ini yükseltebileceği bildirilmiştir.

b) Kolektif tolerans; topluluk içindeki etkileşimleri MIC'yi arttırmadan, antibiyotik tedavisi sırasında hücre ölüm oranını geçici olarak azaltarak metabolizmayı yavaşlatmak gibi hücresel durumları değiştirebileceği bildirilmiştir.

c) Topluluktaki etkili antibiyotik konsantrasyonunu azaltarak, bakterilerin etkileşimini korumak için temas kurduğu bildirilmiştir (Vega ve Gore., 2014; Orazi ve O'Toole., 2017)



## 1.5. Antibiyotik Direncinin Yayılımı

İlaç direncinin hızlı ve geniş şekilde yayılmasında, bakterilerin yatay gen transfer yeteneği vardır. Antibiyotik direnç genleri, transpozonlar, integronlar ve plazmidler gibi aynı tür içinde veya farklı türler arasında transfer için vektör görevi gören, mobil genetik materyaller üzerinde taşınır; konjugasyon, transformasyon ve transdüksiyon ile gerçekleşir. (Maiden., 1998; Beceiro, Tomás ve Bou., 2013)

## 1.6. beta-Laktamazların Sınıflandırılması

Sayısı gittikçe artan beta-laktamazların tanımlanması, protein, nükleotit ve sekans bilgileri ile birleştiğinde, bu enzimlerin tek bir homojen grup içermediğini, bunun yerine birçok sınıfa ayrıldığını ortaya koydu. Farklı beta-laktam substratlarına karşı enzim aktivitesi bildirilmeye başladıkça, beta-laktamazların birçok biyokimyasal özelliği de saptandı. Sekans bilgilerinin artmasıyla birlikte, tanımlanan beta-laktamazların sayısı daha da artmıştır (Tooke vd., 2019). beta-laktamazların veri tabanında (www.bldb.eu ), 4300'den fazla enzim olduğu bildirilmiştir.

Enzim dizilerini sınıflandırmak için iki sistem kullanılmaktadır: dizi bilgisine dayalı Ambler sistemi ve Bush-Jacoby-Medeiros'un, aktivite tabanlı sistemidir.

### 1.6.1. Ambler Sınıflandırma

1980 yılında, Ambler tarafından yapılan, amino asit ve enzimleri kodlayan nükleotid dizilerine dayalı moleküler sınıflandırmadır (Ambler, 1980). Amino asit dizilerine temel olarak yapılan bu moleküler gruplandırmada, beta-laktamazlar A, B, C ve D olarak dört grupta toplanmıştır. A, C ve D grupları serin enzimleri içermekte, B grubunda ise çinko enzimleri yer almaktadır. Bütün grupların kromozomal ve plazmid esaslı temsilcileri bulunmaktadır (Livermore, 1998). A sınıfı serin penisilinazları, B sınıfı metalloenzimleri, C sınıfı serin sefalosporinazları ve D sınıfı oksasilini hidrolize eden serin beta-laktamazları içermektedir (Ambler, 1980).

Bu sınıflamaya göre beta-laktamazlar dört gruba ayrılır:

A Sınıfı: Penisilinleri hidrolize eden, genel olarak plazmid kontrollü penisilinazlar,

B Sınıfı: Karbapenemazlardan oluşan metallo-beta-laktamazlar,

Sınıf C: Kromozomal Amp-C geni tarafından kodlandıkları için, Amp-C enzimleri olarak da adlandırılan, sefalosporinazlardan oluşan enzimler,

D Sınıfı: Oksasilinazlar.

### 1.6.2. Bush – Jacoby – Medeiros Fonksiyonel Sınıflandırması

Bu sınıflandırma yönteminde enzimin etkilediği yüzey, diğer bir ifadeyle substrat-inhibitör yapısı ve fonksiyon benzerliklerine göre 4 ana gruba ve bunların alt gruplarına ayrılmıştır (Görgeç, 2012).

1995 yılında Bush, Jacoby ve Medeiros tarafından yapılmıştır. Substrat şekilleri ve  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine hassasiyet gibi biyokimyasal özelliklere dayandırılan bir sınıflandırmadır. Günümüz için en güncel sınıflandırma olarak görülmektedir (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995).

Bu sınıflandırma dört gruba ayrılmıştır:

Grup 1. Moleküler sınıflandırmada C sınıfındadırlar; birçoğu kromozomal olarak kodlanmış sefalosporinazlardır. FOX-1, LAT-1, MIR-1 ve BIL-1 gibi kromozomal Amp-C enzimleri ve plazmid kontrollü  $\beta$ -laktamazlar da bu gruba dahildir (Livermore, 1995).

Grup 2. Bu grup, serin  $\beta$ -laktamazların en büyük kategorisidir. Hepsi moleküler sınıflandırmaya göre A ve D sınıflarına girer. Penisilinler, sefalosporinler, kloksasilin, karbenisilin, karbapenem ve monobaktamların hidroliz oluşuna göre alt gruplara ayrılmaktadırlar (Medeiros, 1997). GS $\beta$ L'ler türler arasında kolaylıkla iletebilen en kalabalık bölümü oluşturur. Gram negatif bakterilerde,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç, büyük oranda plazmid kontrollü  $\beta$ -laktamazlarla ilgilidir (Gür, 1997).

Grup 2a: Bu grup penisilini hidrolize eder ve klavulanik asit vasıtasıyla inhibe ederler. Bu grup enzimler *S.aureus*, *Bacillus cereus* ve *Fusobacterium nucleatum*'da bulunur (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995)

Grup 2b: Penisilin ve sefalosporinleri hidrolize ederler ve klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam gibi  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine duyarlıdırlar (Gür, 1997). TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 bu grupta yer alır ve 'geniş spektrumlu enzimler' olarak adlandırılır. Bu  $\beta$ -laktamazlar genellikle *Enterobacteriaceae* familyasında bulunur.

Bu enzimler *Klebsiella* spp., suşlarında yaygındır (Livermore., 1995; Podschun ve Ullmann., 1998).

Grup 2be: TEM veya SHV  $\beta$ -laktamazlardan kaynaklanan GS $\beta$ L'leri içeren gruptur. Dar spektrumlu sefalosporinlerin (sefuroksim, seftriakson, seftazidim, sefpirome, sefotaksim) yanı sıra, 2b grubundaki penisilin türevleri de oksimino sefalosporinlere direnç oluşturur. Sefamisinler ve karbapenemler bu enzimlere dirençlidir. *Klebsiella* spp. ve *E. coli*'de yaygındırlar (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995; Livermore ve Woodford., 2006).

Grup 2br: Yapısal olarak grup 2b enzimleri TEM veya SHV  $\beta$ -laktamazlardan köken alan ve klavulanik asit gibi  $\beta$ -laktamaz inhibitörlerine karşı düşük afinite gösteren GS $\beta$ L enzimleridir. TEM-30'dan TEM-36'ya kadar, TEM ve TRC-1 enzimi bu gruptadır (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995; Shah, Hasan, Ahmed, Hameed, 2004).

Grup 2c: Benzil penisilinlere ek olarak karbenisilinleri de hidrolize uğratarak, grup 2b enzimlerinden ayrılırlar. Klavulanik asit tarafından inhibe edilirler. PSE-1, PSE-3 ve PSE-4 bu gruptadır (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995; Shah vd., 2004).

Grup 2d: Kloksasilini penisiline göre daha hızlı hidrolize eden  $\beta$ -laktamazlar içerir. OXA enzimleri bu gruptadır. Klavulanik asit tarafından inhibisyonları değişkendir. 2. grubun diğer alt gruplarındaki tüm enzimler, A moleküler sınıfındayken, sadece bu alt grup, D moleküler sınıfındadır (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995; Shah vd., 2004).

Grup 2e: Sefalosporin olmalarına rağmen monobaktamları da hidrolize ederler ve klavulanik asit tarafından inhibe edilirler (Shah vd., 2004).

Grup 2f: Karbapenemleri inaktive eden metallo enzim olmayan serin  $\beta$ -laktamazlar barındırır ve hepsi indüklenebilirdir. Klavulanik asit vasıtasıyla zayıf bir şekilde inhibe edilirler. *Enterobacter cloacae* kromozomal NMC-A enzimi ve *Serratia marcescens*'in SME-1 enzimi bu gruptadır (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995; Shah vd., 2004).

Grup 3. Moleküler sınıflandırmada B sınıfındadırlar. Penisilinleri, sefalosporinleri ve karbapenemleri hidrolize ederler. Aktif olmaları için çinko iyonlarına ihtiyaçları vardır. B-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmezler ve EDTA ile inaktive olurlar (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995)

Grup 4. Klavulanik asit ve inhibe edilmemiş penisilinazlar içerir. Henüz moleküler olarak sınıflandırılmamışlardır. *Burkholderia cepacia*'daki (*B.cepacia*)  $\beta$ -laktamazlar bu grubun üyeleridirler (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995).

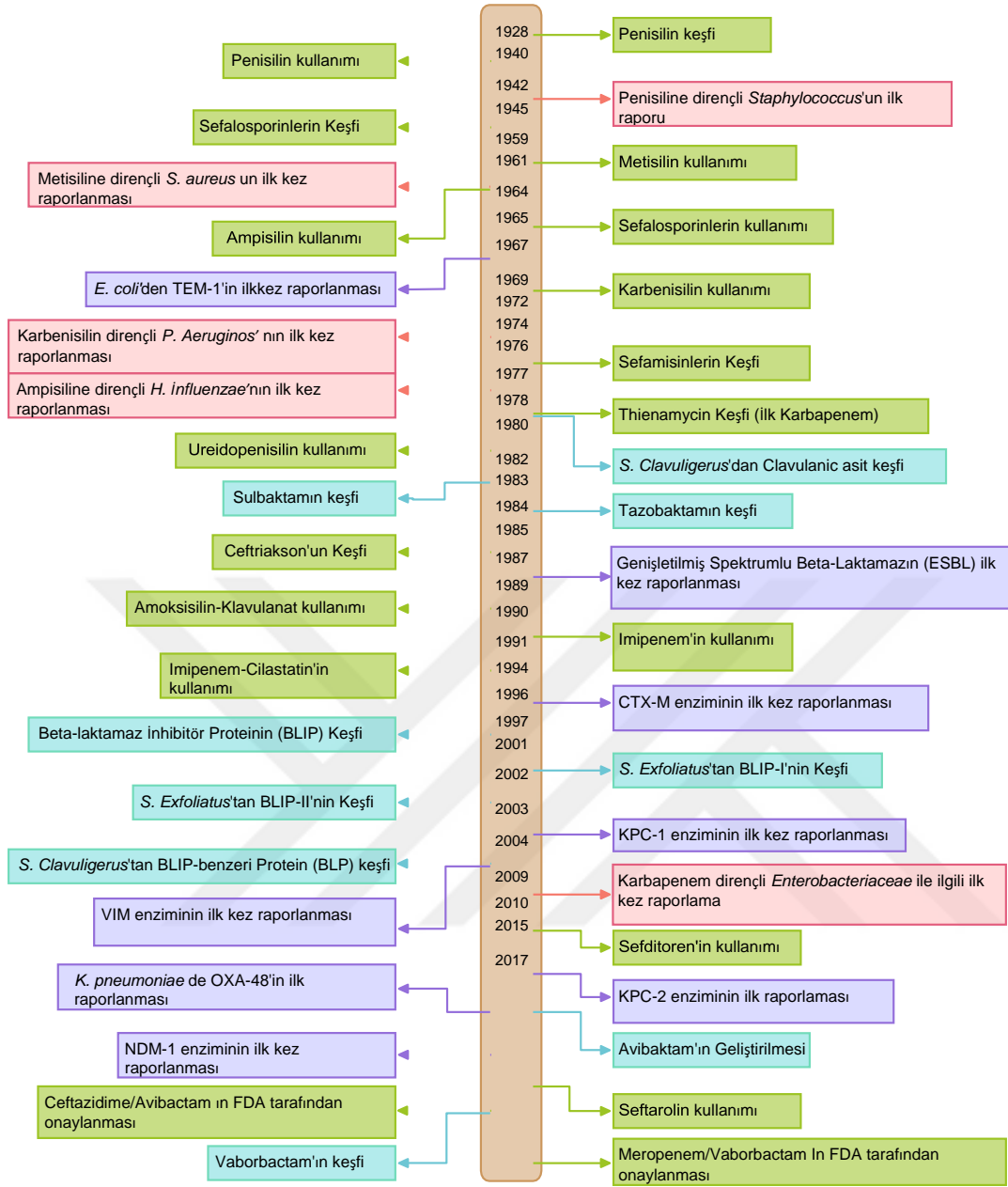
### 1.7. GS $\beta$ L ve Direnç Mekanizmaları

GS $\beta$ L'ler, benzil penisiline eşit veya %10 daha fazla oksimino-sefalosporinleri hidrolize edebilen, aktif bölgelerinde serin içeren, plazmidler tarafından kodlanan ve klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe edilen enzimlerdir. GS $\beta$ L üreten bakteriler amino penisilinler, karboksipenisilinler ve asilüreido penisilinlere dirençli iken; karbapenemlere ve sefamisinlere (sefoksitin ve sefotetan) duyarlıdır. Dış zarda porin proteininin kaybı ile direnç gelişir (Martinez-Martinez vd., 1996). GS $\beta$ L; penisilinleri, geniş spektrumlu sefalosporinleri ve monobaktamları hidrolize edebilen  $\beta$ -laktamazlar olarak tanımlanır ve klavulanik asit tarafından inhibe edilirler. Bu özellikleri, GS $\beta$ L'leri, geniş spektrumlu sefalosporine dirençli, Gram negatif bakterilerden izole edilen başka bir enzim grubu olan Amp-C tipi  $\beta$ -laktamazlardan ayırır (Rupp & Fey, 2003).

GS $\beta$ L tipi enzimler, Ambler'in moleküler sınıflandırmasında, A sınıfında ve Bush Jacoby Medeiros sınıflandırmasında 2be grubundadır (Bush, Jacoby ve Medeiros, 1995). GS $\beta$ L'lere en yaygın olarak *Klebsiella* spp. ve *E. coli*'de yaygındır; ancak diğer birçok enterik bakteride de olduğu bildirilmiştir.

$\beta$ -laktamazların aktif bölgesi etrafındaki amino asit konfigürasyonunu değiştiren mutasyonlar yoluyla, TEM-1, TEM-2 veya SHV-1 genlerinden türetilirler. Bu olay, bu enzimler tarafından hidrolize duyarlı olan  $\beta$ -laktam antibiyotiklerin spektrumunu genişletir.

Son zamanlarda, TEM veya SHV soyundan olmayan, fazla sayıda GS $\beta$ L tanımlanmıştır. GS $\beta$ L'lerin varlığı klinik olarak önemlidir. GS $\beta$ L'ler sıklıkla plazmid tarafından kodlanır. GS $\beta$ L üretiminden sorumlu olan plazmidler, sıklıkla diğer ilaç sınıflarına (örneğin aminoglikozidler) direnci kodlayan genler taşırlar. Dolayısıyla GS $\beta$ L üreten organizmaların tedavisinde, antibiyotik seçenekleri oldukça sınırlıdır (Paterson ve Bonoma, 2015).  $\beta$ -laktamların ve  $\beta$ -laktamazların bulunma zamanları çizelgesi Şekil 1.2'de verilmektedir.



Şekil 1.2.  $\beta$ -laktamların ve  $\beta$ -laktamazların Bulunma Zamanları (Eiamphungporn ve Warawan, 2022)

## 1.7.1. GS $\beta$ L Tipleri

### 1.7.1.1. SHV grubu GS $\beta$ L

SHV tipi GS $\beta$ L'ler, klinik izolatlarda, diğer GS $\beta$ L'lardan daha fazla oranda bulunabileceği bildirilmiştir (Jacoby, 1997). SHV simgesi, sülfat hidril değişkenini ifade ettiği ve SHV aktivitesinin *p*-kloro cıva benzoat tarafından inhibisyonunun substratla ilişkili olduğu için kullanılan substrata göre değişken olduğu

düşünüldüğünden dolayı bu isim verilmiştir (Gorman ve Morin, 1982). Almanya’da 1983 yılında, sefotaksimi ve daha az derecede seftazidimi etkili bir şekilde hidrolize eden,  $\beta$ -laktamaz içeren *Klebsiella ozaenae* keşfedilmiştir (Knothe, Shah, Krcmery, Antal ve Mitsunashi, 1983). Bu enzimin keşfedilmesinden sonraki 15 sene süresince, yerleşik her kıtada SHV-2 içeren organizmalar bulunmuştur (Paterson vd., 2003). Bu durum, kullanımlarının ilk on yılında, üçüncü kuşak sefalosporinlerin fazla kullanılmasından kaynaklandığı bildirilmiştir. SHV tipi GS $\beta$ L’ler çok çeşitli *Enterobacteriaceae* üyesinde tespit edilmiştir (Huang, Mao, Chen, Wu ve Wu, 2004; Poirel vd., 2004).

### 1.7.1.2. TEM grubu GS $\beta$ L

TEM-1 geni, ilk olarak Temoneriae isimli hastadan izole edildiği için, kişiye ithafen, TEM olarak anılmaktadır. Başta *E. coli* olmak üzere *Enterobacteriaceae* familyasında bulunan bakterilerde gözlenmektedir (Görgeç, 2012). Ampisilin, penisilin ve sefalotin gibi, birinci nesil sefolosporinlere karşı direnç geni taşımaktadır (Rupp ve Fey, 2003).

*E. coli*’nin ampisiline olan direnci, genelde TEM-1’den köken almaktadır (Görgeç, 2012). Tanımlanan ilk varyant olan TEM-2, 39. pozisyonda glutamin yerine, lizin geldiği için TEM-1’den farklıdır. Bununla birlikte, substrat profili, yani etki ettiği yüzey, TEM-1 ile aynı olduğundan, TEM-2 bir GS $\beta$ L olarak kabul edilmez (Rupp ve Fey, 2003).

### 1.7.1.3. CTX-M grubu GS $\beta$ L

1989 yılında Almanya’da *E. coli*’de ilk kez CTX-M enzimi tespit edilmiş; daha sonra ise *Salmonella* spp. ve birçok *Enterobacteriaceae* suşunda kaydedilmiştir. GS $\beta$ L genlerinden CTX-M, sefotaksimi yüksek miktarda lize eder ve bu nedenle Cefotaksimase-Munih, yani CTX-M olarak adlandırılır (Düzgün ve Saral, 2018). Diğer GS $\beta$ L genlerinden farklı olarak CTX-M sıklıkla *E. coli* tarafından taşınmaktadır (Qi, Pilla, Yu, ve Reed, 2010). CTX-M beta laktamazları bulunduran *E. coli* izolatları genellikle aminopenisilinlere (ampisilin ve amoksisilin), karboksi penisilinlere (karbenisilin veya tikarsilin), üreidopenisilinlere (piperasilin) ve dar spektrumlu sefalosporinlere (sefaloridin, sefalotin ve sefuroksim) fazla oranda dirençlidir. Türkiyede en yaygın GS $\beta$ L geninin CTX-M olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Düzgün ve Saral, 2018). CTX-M üreten *E. coli*’nin çoklu ilaç direncine sebep olması nedeniyle, antimikrobiyal direnç ve enfeksiyonların

kontrolünde dikkat edilmesi gereken bir konudur (Mathers, Peirano ve Pitoutb, 2015). Günümüze kadar, 50'den fazla CTX-M enzimi belirlenmiştir. CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-14 en yaygın bulunan enzimler olup; plazmid yoluyla iletilmektedirler. CTX-M hastane enfeksiyonu, SHV ve TEM toplum enfeksiyonu olarak bildirilmektedir (Bonnet, 2004).

CTX M-1 grubu (CTX-M-1, 3, 10, 11, 12, 15, 22, 23, 28, 29, 30, 32, 33, 36, 54, UOE-1)

CTX M-2 grubu (CTX-M-2, 4, 6, 7, 20, 31, 44) önceden TOHO-1 olarak adlandırılmıştır ve FEC-1),

CTX M-8 grubu (CTX-M-8 ve CTX-M-40),

CTX M-9 grubu (CTX-M-9, 13, 14, 16, 17, 18, 19, 24, 27, 45 (önceden TOHO-2 idi), 46, 47, 48, 49 ve CTX-M-50) ve

CTX M-25 grubu (CTX-M-25, 26, 39 ve CTX-M-41) olarak özetlenebilir (Cantón ve Coque, 2006).

#### **1.7.1.4. OXA grubu GSβL**

OXA grubu, amino asit dizilerindeki evrimleşme sonucunda; OXA grubu oksiminio sefalosporin antimikrobislerini sentezleyen, geniş etki alanına sahip enzim boyutuna dönüşmüştür. OXA-11, 14, 15, 16, 33, 34 grupları seftazidim direnci oluştururken, OXA-17 seftotaksime dirençli olup, OXA-24 ise karbapenemaz aktivitesi göstermektedir. OXA-31 sefepime dirençli, seftazidime duyarlı gruptur (Aubert, Poirrel, Chevalier, Leotard ve Pages, 2001).

#### **1.7.1.5. Diğer GSβL gruplar**

PER grubu GSBL, ilk defa Fransa'da Türk bir hastadan izole edilmiş ve *P. aeruginosa* suşunda belirlenmiştir. PER-1 enzimi penisilin ve sefasporinleri hidrolize eder, klavulanik asitle inhibe olur (Nordmann, 1993) VEB-1 ilk defa Vietnam'da bir *E. coli*'de saptanmıştır. Seftazidim, seftotaksim ve aztreonama önemli dercede direnç gösterir, klavulanik asit ile inhibe olurlar (Poirrel vd., 1999). Bu grupta yer alan GES-1, ilk kez Fransa'da *Enterobacteriaceae* ailesinden olan *K. pneumoniae*'da görülmüştür (Poirrel vd., 2000). BES, BES-1, TLA, TLA-1, TOHO-1, 2, SFO ve IBC

gibi geniş spektrumlu sefolosporinleri hidroliz edebilen GSβL'ler olarak tanımlanmıştır (Naas, Poirel ve Nordmann, 2008).

## 1.8. Karbapenemazlar ve Direnç Mekanizmaları

Karbapenemazlar, karbapenemleri hidrolize etme özelliği gösteren β-laktamazlardır. Ambler sınıfı A, B ve D' ye aittirler. Karbapenemler, doğal olarak kromozom kökenlidir ya da sonradan edinilirler. Karbapenemleri hidrolize eden karbapenemazlar, karbapenem reçetelendirilmesindeki artışa paralellik göstererek son yıllarda yükselen şekilde artmaya devam etmektedirler (Poirel vd., 2004).

Edinilmiş karbapenemazlar muhtemelen, karbapenemlerin (varsa) az miktardaki seçicilik baskısının sonucudur: Çünkü bu antimikrobiyal maddeler, veteriner hekimler tarafından reçete edilmez; insan tüketimi için kullanılmayan hayvanlarda, nadir durumlarda reçete edilirler. Bununla birlikte, son yıllarda karbapenemaz üreten *E. coli* dahil olmak üzere, bu bakteriler dünyada birçok hayvandan izole edilmiştir (Köck vd., 2018; Woodford, Wareham, Guerra, Teale, 2014).

Hayvandan elde edilen ilk *E. coli* izolatında tanımlanan, ilk karbapenemaz determinantı, Almanya'da bir domuzdan elde edilen VIM-1'dir (Fischer, 2012). O tarihten beri, aynı ülkede, farklı domuz çiftliklerinde, başka VIM-1 üreten *E. coli* izolatları da tanımlanmıştır (Fischer vd., 2017; Guerra vd., 2014).

Karbapenemazlar, Ambler Moleküler Sınıflandırması'na göre dört ayrı grupta incelenmektedir. Bu gruplar A, B, C, D gruplarıdır.

A, B grubu karbapenemazlar, aktiviteleri için, serin aminoasiti içerirken, D grubu karbapenemazlar çinko içerir ve etkinliğini bu maddelere bağlı olarak ortaya koyarlar. Bu nedenle 'Metallo β-laktamazlar' adını alırlar (Bush, 1998).

A grubu karbapenemazlar: Kromozomal kökenli *Serratia marcescens* enzimi, non-metallo enzim karbapenemaz, imipenem yıkıcı, hidrolize edici β-laktamaz enzimi bulunmaktadır (Walther-Rasmussen ve Høiby, 2006). KPC ve GES enzimleri plasmidle kodlanırken, diğer enzimler kromozomal kökenlidir (Diene ve Rolain, 2014).



B grubu karbapenemazlar: Doğal olarak üretilen metalo  $\beta$ -laktamazlar ve bir türden başka bir türe plasmidler vasıtasıyla aktarılabilen enzimleri içerir. Bunlar IMP, VIM, GIM, SIM, NDM-1 enzimleridir.

D grubu karbapenemazlar, oksasilini lize edebilirler. Bu nedenle 'OXA tip enzim' olarak da anılırlar. Kromozomal kökenli olan OXA-51; plasmidler aracılığıyla taşınabilenler ise OXA-23, OXA24/40, OXA-48, OXA-58 şeklindedir (Walther-Rasmussen ve Høiby, 2006).

*Enterobacteriaceae* ailesine dahil olan, Ambler sınıflandırmasına göre A grubu karbapenemaz enzimlerinden KPC ve GES sınıfı; B grubu genlerinden VIM ve NDM sınıfı; D grubu enzimlerinden ise OXA-23, OXA-24 (OXA-48, OXA-58 kullanımı uygundur (Karaaslan ve Soysal, 2017).

Bu gruplandırma ile birlikte, karbapenemazlar, hedef metaryalin yıkımı ve engellenmesi özelliklerine göre de gruplandırılır. Bu gruplandırma Çizelge 1. 2'de gösterilmiş; Karen Bush gruplandırması adını almıştır (Rasmussen ve Bush, 1997).

**Çizelge 1.2.** Karen Bush gruplandırması (Rasmussen ve Bush, 1997).

Moleküler Sınıf	İşlevsel Küme	Enzim adı	Hedef Yıkımı Özelliği					Engellenme özelliği	
			Penisilin	1.SS	GSS	Azitroneam	Karbapenem	EDTA	Klavulanik asit
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	±	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	+	-	+
		GES	+	+	+	-	±	-	+
B1	3	IMP	+	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	+	-	+	+	-
		VIM	+	+	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	±	-	±	-	±

SS: Birinci kuşak sefalosporin, GSS: Geniş spektrumlu sefalosporinler.

Gram negatif bakterilerde, karbapenemlere direnç kazandıran dört ana mekanizma tanımlanmıştır. Bunlar, karbapenemazların üretimini, diğer  $\beta$ -laktamazlar ve porin modifikasyonları arasındaki sinerjii, akış pompalarını ve PBP'lere yönelik

modifikasyonları içerir. Bu mekanizmalar karbapenemlere bu mekanizmalardan herhangi biri ile dirençli olabilen, geniş karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* kategorisi ile daha spesifik karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* grubu arasındaki ayrımın temelini oluşturur (Anderson ve Boerlin, 2020).

**Çizelge 1.3.** Ambler sınıflandırmasına göre karbapenemaz grupları (Karaaslan ve Soysal, 2017)

	Karbapenemaz Genleri	En sık bulunduğu etken	Gen yerleşimi
<b>A sınıfı Karbapenemaz</b>	SME-1, SME-2, SME-3	<i>S. marcescens</i>	Kromozom kökenli
	IMI-1, IMI-2	<i>E. cloacae</i>	Kromozom kökenli
	NMC	<i>E. cloacae</i>	Kromozom kökenli
	KPC-1, KPC-2, KPC3, KPC-4	<i>K. pneumoniae</i> <i>K. oxytoca</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>P. aeruginosa</i> , <i>C. freundii</i>	Plazmid
	GES 2,4,5,6	<i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i>	Plazmid
<b>B sınıfı Karbapenemaz</b>	IMP (Imipenemases)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Plazmid
	VIM (Verona integro metalo-β-lactamase)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Plazmid
	SPM-1 (Sao Paulo metalo-β-lactamases)	<i>P. aeruginosa</i>	Plazmid
	GIM (German imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. marcescens</i> , <i>E. cloacae</i>	Plazmid
	SIM-1 (Seoul imipenemase)	<i>P. aeruginosa</i> , <i>A. baumannii</i>	Plazmid
	NDM (New Delhi metalo-β-lactamase)	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>A. baumannii</i>	Plazmid
<b>D sınıfı Karbapenemaz (en sık görülenler)</b>	OXA-51	<i>A. baumannii</i>	Kromozom kökenli
	OXA-23, OXA-24(OXA40),		
	OXA-48, OXA-58	<i>A. baumannii</i> , <i>Enterobacteriaceae</i>	Plazmid

## 1.9. Amp-C'ler ve Direnç Mekanizmaları

Penisilini yok ettiği bildirilen ilk bakteriyel enzim, 1940'ta, bu haliyle adlandırılmamasına rağmen, *E. coli*'nin Amp-C  $\beta$ -laktamaz'ı idi. Amp-C, Bush-Mederios-Jcoby sınıflandırmasında, Grup 1'de yer almaktadır. Amp-C  $\beta$ -laktamazlar, *E. coli* gibi, birçok *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakterinin kromozomlarında bulunan bir sefalosporinazdır. Aynı zamanda sefazolin, sefoksitin, sefalotin ve  $\beta$ -laktamları baskılayan;  $\beta$ -laktam ve  $\beta$ -laktamaz baskılayıcı kombinasyonlara ve birçok penisilin türevine karşı direnç gösterir (Jacoby, 2020). Amp-C  $\beta$  laktamazlar, Ambler sınıflandırmasına göre C grubunda yer almaktadır. A, C, D grupları gibi olmayıp; bir  $\beta$ -laktam grubu olan sefoksitine karşı aktiftir. Ancak A sınıfı enzimleri için, inhibitör etkisi gösteren klavulanik asit tarafından inhibe edilemezler (Bush ve Jakoby, 2010; Njage ve Buys 2015). Amp-C kromozomal ve plazmid kökenli olup; plazmid kökenli olan grup indüklenebilme özelliği göstermez (Mezzatesta, Gona ve Stefani, 2012). Plasmidlerde bulunan Amp-C  $\beta$ -laktamaz genleri ise 6 aileye ayrılmışlardır ve bunlar; ACC, CIT, DHA, EBC, FOX ve MOX olarak kodlanmışlardır (Pehlivanoglu, 2019). Plasmid kökenli Amp-C tipi  $\beta$ -laktamazlar, özellikle GS $\beta$ L'ler ile birlikte ortaya çıkmaktadır (Fadare, Adefisoye ve Okoh, 2020; Thomson, 2010). Porin modifikasyonları, antibiyotiklerin Gram negatif dış zar boyunca difüzyon hızında, GS $\beta$ L'lerin ve Amp-C enzimlerinin kalan antibiyotiği yeterince parçalayarak tamamen dirençli bir fenotip ile sonuçlanmasına izin verdiği oranda azalmaya neden olabilir (Logan ve Weinstein, 2017).

Akış pompalarındaki modifikasyonlar, ilaç PBP'lere bağlanmadan önce, hücreden antibiyotik atılımında artışa neden olabilir, böylece hücreye zarar veremez hale getirir (Logan ve Weinstein, 2017).

Son olarak, PBP'lerin kendi içindeki modifikasyonlar,  $\beta$ -laktamların hedeflenen proteinlere uygun şekilde bağlanmasını engelleyerek onları işe yaramaz hale getirir (Logan ve Weinstein, 2017).

## 1.10. $\beta$ -laktamaz İnhibitörleri

$\beta$ -laktamlardaki kullanımların artışına paralel olarak bu antibiyotiklerin  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri ile kombinasyonları,  $\beta$ -laktamaz aracılı dirençle mücadelede en önemli noktadır (Dwarz ve Bonomo, 2010). Klavulanik asidin en geniş dağılıma sahip A

sınıfı enzimlerin (örneğin TEM, SHV and CTX-M sınıfları) geri döndürülemez bir inhibitör olarak keşfedilmesi ve geliştirilmesinden bu yana, penisilin-inhibitör kombinasyonları (amoxicillin– clavulanate, ampicillin–sulbactam, piperacillin–tazobactam) hem toplum hem de özellikle sağlık hizmetleri ile ilişkili  $\beta$ -laktamaz üreten organizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde geniş uygulama alanı bulmuştur (Tooke vd., 2019). KPC'yi içermeyen A sınıfı enzimlerin bir alt kümesiyle sınırlı olan klinik olarak faydalı spektrumları, duyarlı olmayan  $\beta$ -laktamaz tiplerinin ortaya çıkması ve yayılması ile birleştiğinde,  $\beta$ -laktamaz üreten organizmalar için daha iyi tedavi seçenekleri gerektirmektedir (Papp-Wallace vd., 2010). Daha yaygın olarak etkili  $\beta$ -laktamaz inhibitörleri arayışına, Gram negatif bakteriler için antibiyotik keşfinin devam etmesi ek bir ivme kazandırmaktadır (Falagas, Mavroudis ve Vardakas, 2016; Theuretzbacher vd., 2019). Son yıllarda, klinikte yeni inhibitör sınıfının temsilcileri ve geliştirilmekte olan başka bileşikler ve kombinasyonları ile bu süreç başarılı olmuştur (Tooke vd., 2019).

### **1.11. GS $\beta$ L, Amp-C ve Karbapenemaz Direncinin Dünyadaki Durumuna Genel Bakış**

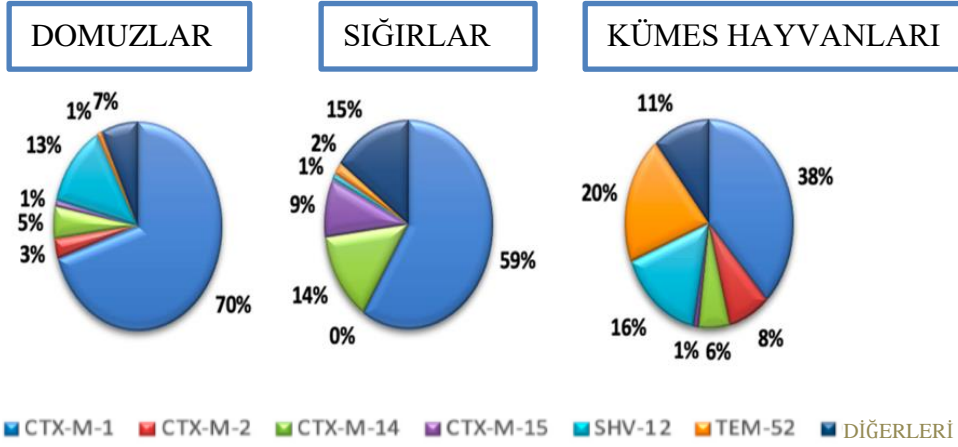
GS $\beta$ L üreten organizmalar, 1980'lerin başlarında, Avrupa'da tanımlanmalarından bu yana, dünya çapında giderek daha fazla rapor edilmektedir (Cantón vd., 2008). GS $\beta$ L'lerin varlığı ve bunların birleşik direnci, ciddi bir halk sağlığı sorunudur.

GS $\beta$ L enzimlerinin sağladığı dirence ek olarak, diğer antibiyotik sınıflarına karşı ortak direnç sıklıkla görülmektedir; bu da mevcut terapötik seçenekleri büyük ölçüde sınırlandırır ve insan sağlığını tehlikeye sokar (Müller vd., 2019).

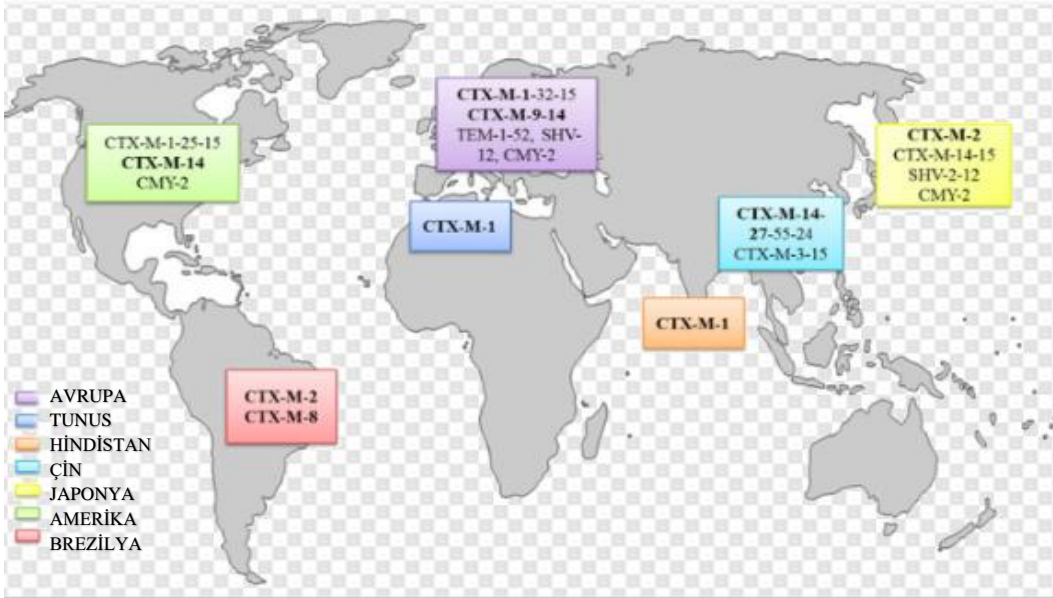
Ayrıca bu fenomen, karbapenemaz üreten *Enterobacteriaceae* üyelerinin daha fazla yayılmasını destekleyerek, karbapenem kullanımının artmasına yol açabilir (Adler, Anjum, Andersson ve Sandegren, 2016).

Hayvanlarda bu dirençle ilişkili en yaygın genler *bla*CTX-M-1 , *bla*CTX-M-2 , *bla*CTX-M-14 , *bla*CTX-M-15 , *bla*TEM-52 ve *bla*SHV-12'dir (Silva vd., 2019).

Şekil 1.3 ve Şekil 1.4 'de sırasıyla, Avrupa'da domuz, sığır ve kümes hayvanlarında tespit edilen GS $\beta$ L enzimlerinin dağılımını ve hayvanlardan üretilen gıdalardan elde *E. coli* izolatlarında en sık tespit edilen GS $\beta$ L enzimlerinin, küresel dağılımını göstermektedir.



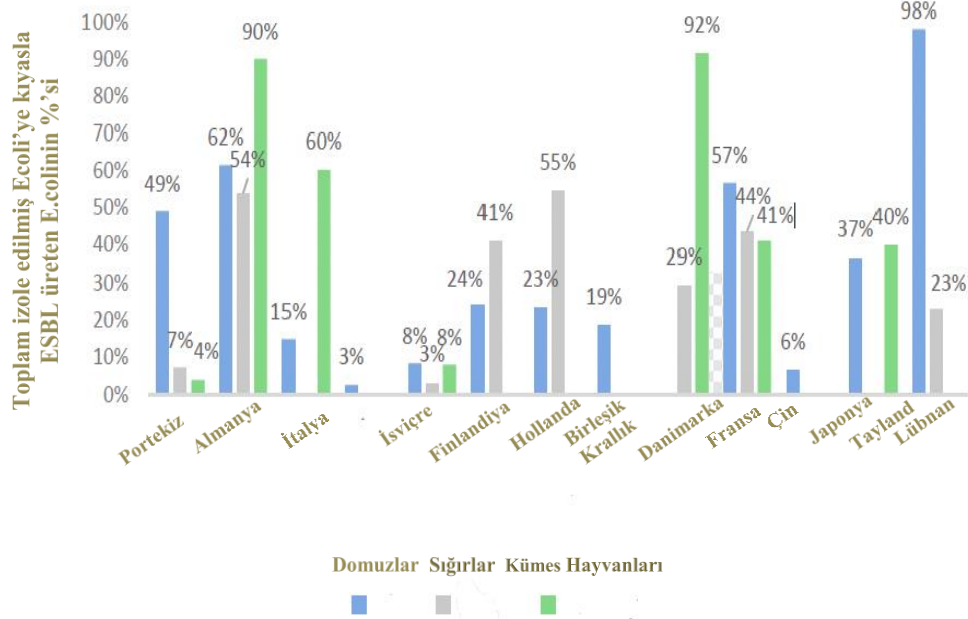
Şekil 1.3. Avrupa'da hayvansal gıdalardan elde edilen izolatlarda GSβL enzimlerinin dağılımı (Ramos vd., 2020)



Şekil 1.4. Hayvansal gıdalardan elde edilen *E. coli* izolatlarında sıklıkla (koyu) saptanan GSβL enzimlerinin küresel dağılımı (Ramos vd., 2020)

Genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere dirençten sorumlu genlerin dünya dağılımına bakıldığında, Avrupa ülkelerinde CTX-M-1 grubu (CTX-M-1 ve -15) baskındır. Ek olarak, CTX-M-9 grubu (CTX-M-9 ve -14) İspanya, Portekiz ve Birleşik Krallık'tan gelen hayvanlarda sıklıkla tanımlanmıştır. CTX-M-2 grubu esas olarak Güney Amerika ve Japonya'da tanımlanırken, Çin'de CTX-M-9 grubunun enzimleri yaygındır; Amerika Birleşik Devletleri veya Kuzey Afrika'da CTX-M enzimleri yaygındır. CTXM-1 grup sıklıkla tanımlanır. Bu genel bakışın dışında, CTX-M-15 ve CTX-M-14, hayvansal gıdalarda ve insanlarda yaygın olarak

dağıldıkları ve klinik olarak önemli patojenlerde yaygın olarak tespit edildikleri için en önemli olanlardır (Day vd., 2019).



**Şekil 1.5.** Farklı ülkelerde sağlıklı hayvansal gıdalarda bildirilen GSβL üreten *E. coli* suşlarının yüzdesi (Ramos vd.,2020).

Şekil 1.5 de Farklı ülkelerde sağlıklı hayvansal gıdalarda bildirilen GSβL üreten *E. coli* suşlarının yüzdesi verilmiştir. Veriler arasında görülen farklılıklar, hayvancılık uygulamaları, antibiyotik kullanımı ve hatta deneysel metodolojilerdeki farklılıklarla açıklanabilir. Bununla birlikte, çoğu raporda, antibiyotik kullanımına ilişkin veriler dahil edilmemiştir; bu durum konu ile ilgili sonuçların ortaya konmasını engellemektedir (Ramos vd., 2020). Ayrıca, izolasyon yöntemleri (örnek olarak; farklı zenginleştirme sıvılarının ve/veya seçici ortamların kullanımı) ve örnek büyüklükleri, ülkeler arasında büyük farklılıklar göstermekte ve bu da farklı tarama hassasiyetleriyle sonuçlanmaktadır. Bu nedenle, bazı durumlarda verilerinin karşılaştırılması, dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Örneğin, EFSA'nın 2019 tarihli raporunda, ülkelerde sefotaksim ve seftazidime karşı genel direnç seviyeleri hem domuzlarda hem de sığırlarda genel olarak düşüktür (<%4) (EFSA, 2019). Avrupa'daki bir araştırmada (Cassini vd., 2019), GSβL üreten *E. coli* enfeksiyonlarının 300.000 civarında olduğu ve 9.000 ölüme neden olduğu tahmin edilmektedir.

Ayrıca, GSβL üreten bakterilerin sebep olduğu enfeksiyonlar, hastanelerdeki yatış sürelerindeki yükselişe ve sağlık hizmetlerinin yükünün artması ile ilişkilendirilmiştir (Schwaber ve Carmeli, 2007). Çiftlik hayvanlarında GSβL üreten *E. coli* enfeksiyonlarının genel küresel yükü henüz tahmin edilmemiştir; ancak insanlar için bu mikroorganizmaların bir rezervuar olarak potansiyel rolleri nedeniyle, kontrol altında tutmak için Tek Sağlık konsepti ile birlikte disiplinler arası bir yaklaşım gerektirmektedir (Mughini-Gras vd., 2019).

Günümüzde, *E. coli* 'deki CTX-M enzimlerinin küresel yayılımı ve yüksek prevalansı hem beşeri hem de veteriner ilaçların kullanımı konusunda endişe yaratmaktadır. CTX-M'lerin baskın varyantları coğrafi olarak farklı olabilsede insanlarda CTX-M-15 ve CTX-M-14, klinik olarak önemli patojenlerde, dünya çapında saptanan en yaygın varyantlar arasındadır (Ewers, Bethe, Semmler, Guenther, Wieler, 2012; Day vd., 2019). Genel olarak, hayvansal gıdalarda, en yaygın olarak bildirilen genler CTX-M tipi enzimler (örneğin, CTX-M-1, -2, -9, -14, -15, -32 ve -55), ardından SHV-12 ve TEM-52 GSβL'lerdir (Ewers vd., 2012; Silva vd., 2019). Özellikle CTX-M-1, Avrupa'da hayvansal gıdalar arasında geniş çapta yayılmıştır. Ancak, diğer bölgelerde ve ortamlarda nadiren bildirilmektedir (Day vd., 2019). CTX-M-15, insanlarda pandemik tarzda yayılmasına rağmen, Avrupa ülkelerinde, kümes hayvanlarında tesadüfen tespit edilmiş; evcil hayvanlarda %15, sığır ve domuzlarda %8 sıklıkla bu enzim tipiyle ilişkilendirilmektedir (Ewers vd., 2012). Ayrıca, GSβL üreten bakterilerin zoonoz olması ve CTX-M ekspresyonunun sıklıkla diğer 'kritik önemli antibiyotiklere' karşı birlikte dirençe yol açması nedeniyle, tedavi seçeneklerini azaltarak insan sağlığı üzerine doğrudan etkili olmaktadır (Ramos vd., 2020).

Sepp vd. tarafından (2019), yapılan bir çalışmada, Estonya, Letonya, Litvanya, Norveç ve St. Petersburg'da hastanelerden toplanan örneklerden GSβL, Amp-C ve kapbapenamaz üreten *E. coli* suşlarının genel prevalansının, fenotipik teste göre %4,7 ve sekanslamaya göre %3,9 olduğu bilirlenmiştir. St. Petersburg ve Letonya'da diğer ülkelerden daha fazla GSβL/Amp-C fenotipi ve genotipi bulduklarını ve fenotipik *E. coli* suşlarının %85' inin doğrulanmış GSβL (*bla*CTX-M, *bla*TEM-29, *bla*TEM-71 dahil), Amp-C (*bla*CMY-59, *bla*ACT-1215-20, *bla*ESC-6, *bla*FEC-1, *bla*DHA-1) veya karbapenamaz genleri (*bla*NDM-1) içerdiği belirtilmiştir. *bla*CTX-M-1, *bla*CTX-M-14 ve *bla*CTX-M-15'in tüm ülkelerde bulunduğu; ancak

*bla*CTX–M–15 yaygınlığının, Letonya, St. Petersburg (Rusya), Estonya, Norveç ve Litvanya'dakinden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Gauthier vd. (2018) tarafından yayınlanan bir diğer çalışmada, 2012-2013 tarihleri arasında, hastanedelerden alınan örneklerde, 140 karbapenemaz üreten *E. coli* saptanmış ve bunların %74' ünün OXA-48 benzeri karbapenemaz ve %21'inin NDM karbapenemaz üreten *E. coli* olduğu bildirilmiştir.

Li vd. (2019) tarafından, Çin'in 12 köyünde yapılan bir araştırmada, insanlardan ve hayvanlardan dışkı örnekleriyle birlikte ortamdaki sineklerden de numuneler toplanmıştır. 746 haneden 65'inde; insanların 17'sinde, domuzların 44'ünde, tavukların 12'sinde, sığırların 1'inde ve köpeklerin 2'sinde olmak üzere toplam 88'inde karbapenemaz üreten *E. coli* (NDM) izole edildiği ve kalan 12 *E. coli* 'ninde bahçedeki sineklerden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, bu çalışmanın karbapenemaz üreten *E. coli*'nin insanlar ve hayvanlar arasında doğrudan bulaştığına dair kanıtları ilk defa gösteren çalışma olduğu bildirilmektedir.

Bu çalışmada; kırmızı etlerden izole edilen GSβL, Amp-C ve karbapenemaz üreten *E. coli* suşlarının antibiyotik direnç özelliklerinin; disk difüzyon ve E-test yöntemleriyle fenotipik olarak belirlenmesi ve klasik PCR, LAMP PCR ile moleküler olarak antibiyotik direnç genlerinin tespiti amaçlanmaktadır. Çalışmada ayrıca, numuneler TPS'da 24 saat ön zenginleştirmeden sonra, etken izolasyonu yapılmadan, direkt PCR ve LAMP PCR yapılarak direnç genlerinin analizi hedeflenmektedir.



## **2. GEREÇ VE YÖNTEM**

### **2.1. Kırmızı Et Numunelerinin Toplanması**

Çorum İli'nde, perakende olarak satış yapan kasaplardan, birer haftalık periyotlarla, dana (n=62) ve kuzu (n=58) etlerinden, toplam 120 adet (n=120) numune alındı ve steril numune torbaları içine koyularak, 4°C soğuk zincirde, en kısa süre içerisinde laboratuvara ulaştırıldı. 100 adet kırmızı et numunesi, aynı yerlerden TPS'dan klasik PCR ve LAMP PCR analizi için toplandı.

### **2.2. Kullanılan Ekipmanlar**

İnkübatörler,

Vortex cihazı,

Dansitometre,

Magnet balıklar,

LAMP PCR (Nova Amp, Çin),

Klasik PCR (Boeco, Almanya),

Nano-Drop Spektrofotometre (Inovia, Türkiye),

Isıtıcı blok,

Elektroforez cihazı.

### **2.3. Kullanılan Besi Yerleri ve Solüsyonlar**

Mac Conkey Agar (Oxoid, İngiltere),

Sefotaksim içeren Mac Conkey Agar,

Meropenem içeren Mac Conkey Agar,

Müller Hinton Agar (BD, Almanya),

Nutrient Agar (Oxoid, İngiltere),  
BHI (Brain Heart İnfüzyon) Buyyon,  
Agaros (Moleküler Grade) (Biomax, Avrupa),  
Tamponlanmış Peptonlu Su (TPS),  
Antimikrobiyal Duyarlılık Testi Diskleri (Oxoid, İngiltere),  
E-Test Stripleri (Bioanalyze, Türkiye),  
TE (Tris-Edta) ve TAE (Tris-Asetat-Edta) kullanıldı.

### **2.3.1. Solüsyonların ve Besi Yerlerinin Hazırlanışı**

#### **2.3.1.1. 50X TAE stok solusyonu (Tris-Asetat-Edta) hazırlanışı**

Tris base.....242 gram  
Glicial asetik asit.....57.1 ml  
EDTA (0,5 mol).....100 ml

Erlen içerisine, toplam hacim 1lt olana kadar distile su ile tamamlandı. Manyetik karıştırıcı ve balık yardımı ile çözültideki maddelerin homojenizasyonu sağlandı. Otoklavda 121°C’de, 1 atm. basınçta, 15 dakika sterilizasyonu yapıldı. Agaroz jel hazırlanmasında ve elektroforez buffer olarak 1X TAE kullanıldı.

#### **2.3.1.2. Agaroz jelin (%2) hazırlanışı**

2 gram agaroz tartıldı ve 100 ml olacak şekilde 1X TAE solüsyonu ile tamamlandı. Tampon içindeki agaroz iyice çözünene kadar mikrodalgada kaynatıldı. Agaroz çözültisi yaklaşık 40°C’ye kadar soğuması için bekletildi. Soğuduktan sonra %10 oranında ethidium bromide katılarak kalıba döküldü.

#### **2.3.1.3. TE (Tris-Edta) (Primerleri sulandırmak için)**

Tris (1 mol).....10 ml  
Edta (0,5 mol).....2 ml

Distile su ile 1000 ml ye tamamlandı ve otoklavda sterilize edildi.

Tris base hazırlanışı:

Tris base (1 mol).....121 gram

HCL.....60 ml

Distile su.....800 ml eklenecek, pH

7,4'e ayarlandı.

#### **2.3.1.4. Mueller Hinton Agar (MHA)**

34 g toz Mueller Hinton Agar (Merck-1.05437) 1 litre distile su ile karıştırılır. Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı ile topaklanması engellenir. Çözelti otoklavda 115°C'de, 10 dk bekletilir. Steril çözelti 45°C'ye soğutulup, tek kullanımlık steril plastik petri kaplarına aktarılır. 4°C'de buzdolabında saklanır.

### **2.4. Kullanılan Antibiyotikler**

#### **2.4.1. Antibiyotik Diskleri**

İzolatların fenotipik direncini test etmek (Kirby-Bauer disk diffüzyon testi) amacıyla; Ampisilin (AM, 10 µg), Azitromisin (AZM, 15 µg), Kloramfenikol (CHL, 30 µg), Siprofloksasin (CIP, 5 µg), Gentamisin (CN, 10 µg), Meropenem (MEM, 10 µg), Nalidiksik Asit (NA 30 µg), Tetrasiklin (TE 30 µg), Tigesiklin (TGC, 15 µg), Trimetoprim/sulfametazol (SXT, 25 µg), Sefoksitin (FOX, 30 µg), Sefotaksim (CTX, 30 µg), Sefotaksim/Klavulanik Asit (CTC, 40 µg), Seftazidim (CAZ, 30 µg), Seftazidim/Klavulanik Asit (CZC, 40 µg) olmak üzere, 15 tane antibiyotik diski kullanılmıştır.

#### **2.4.2. E-Test Stripleri**

İzolatların minimum inhibisyon değerini (MİK) belirlemek amacıyla ise (E-Test) Meropenem (MP, 0,02-32 µg), İmipenem (IMP, 0,02-32 µg), Colistin (CO, 0,016-256 µg), Sefoksitin (FX, 0,016-256 µg), Sefotaksim (CT, 0,016-256 µg), Sefotaksim/Klavulanik Asit (CT+CLA, 0,016-1 µg), Seftazidim (TZ, 0,016-256 µg), Seftazidim/Klavulanik Asit (TZ+CLA, 0,064-4 µg) olarak toplamda 8 tane E-test stribi kullanılmıştır.

### 2.4.3. Klasik PCR Primerleri

Çizelge 2.1’de GSβL, Amp-C ve karbapenemazlar için primerlerin listesi verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** GSBL, Amp-C ve karbapenemazlar için PCR primerleri (Dallenne, Costa, Decre, Favier ve Arlet vd., 2010).

Gen adı (GSBL için)	5'- 3' primer
<i>blaCTXM-9</i>	(F) TCAAGCCTGCCGATCTGGT
<i>blaCTXM-1</i>	(F)TTAGGAARTGTGCCGCTGYA
<i>blaSHV</i>	(F) AGCCGCTTGAGCAAATTAAAC
<i>blaTEM</i>	(F) CATTTCCTGTGCGCCCTTATTC
<i>blaOXA-1</i>	(F) GGCACCAGATTCAACTTTCAAG
Gen adı (Amp-C için)	5'- 3' primer
<i>blaFOX</i>	(F) CTACAGTGCGGGTGGTTT
Gen adı (Karbapenemaz için)	5'- 3' primer
<i>blaKPC</i>	(F) CATTCAAGGCTTTCTTGCTGC
<i>blaNDM1</i>	(F)GATGCCGACACTGAGCACTA
<i>blaOXA-48</i>	(F)GCTTGATCGCCCTCGATT
<i>blaVIM</i>	(F) GATGGTGTITGGTTCGCATA
<i>blaIMP</i>	(F) TTGACACTCCATTTACDG

### 2.4.4. LAMP PCR Primerleri

Çizelge 2.2.’de GSβL, Amp-C ve karbapenemazlar için LAMP PCR primerlerinin listesi yer almaktadır.

**Çizelge 2.2.** LAMP PCR primer dizileri (Lahiri vd., 2019)

Gen adı	Gen Dizisi
NDM1 F3	GCTTGCCCCGCAAGAG
NDM1 B3	AGCCACCAAAAAGCGATGTC
NDM1 FIP	CGGTTGCTGGTTCGACCCATTTTGGTTGCGGCGCAACAC
NDM1 BIP	GCCCAACTTTGGCCGCTCATTTTGGCGTGCATCCCAACG
NDM1 FLP	GCGGCGAAAGTCAGGCT
NDM1 BLP	GGTATTTTACCCCGGCCCG
KPC F3	TGGGCAGTCGGAGACAA
KPC B3	GTTGACGCCCAATCCCTC
KPC FIP	ATAGGTGCGCGCCAGTGGTTTTTCGGAACCTGCGGAGTGT
KPC BIP	CGTCTACACCCGGGCGCTATTTTAGCGCGAGTCTAGCCG
KPC FLP	GGCATAGTCATTTGCCGTGC

## Çizelge 2.2. (Devam). LAMP PCR primer dizileri

KPC BLP	ACAAGGATGACAAGCACAGCG
OXA-48 like F3	AATAGCTTGATCGCCCTC
OXA-48 like B3	CCATAATCGAARGCRTGYAGC
OXA-48 like FIP	GATTCCAAGYGGCGATATCRCTTTTGGCGTGGTTAAGGATGAAC
OXA-48 like BIP	TAATYACCGCGATGAARTAYTCAGTTTTYTRCTCATACGTGCCTC
OXA-48 like FLP	TGTCCATCCCCTTAAAGACTTG
OXA-48 like BLP	TGCCTGTTTATCAAGAATTTGCCCG
VIM F3	CCTGTAACGCGTGCAGTC
VIM B3	GCAGACCAGGATAGAAGAG
VIM FIP	GATGCGTACGTTGCCACCCCTTTTCCACGCACTTTCATGACG
VIM BIP	GGAACGAGATTCCCACGCACTTTTTTCTACTGGACCGAAGCGC
VIM FLP	ACATCAACGCCGCGGAC
VIM BLP	CTCTAGAAGGACTCTCATCGAGCG
IMP F3	GCAGAGTCTTTGCCAGAT
IMP B3	GTCGCTATGAAAATGAGAGG
IMP FIP	GCCCCACCCGTTAACTTCTTTTTTGAAAAGCTTGATGAAGGCG
IMP BIP	TGCTGAGGCTTACCTAATTGACACTTTTTATAGCCACGCTCCACAA
IMP FLP	CAAACGAAGTATGAACATAA
IMP BLP	CGGCTAAAGATACTGAAAAGTTAG

PCR ve Lamp PCR analizleri için negatif kontrol suş olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanılmıştır.

## 2.5. Yöntem

Tüm analizler, steril koşullarda çalışıldı. Numune almak için kullanılan kesici, pens ve spatula gibi bütün araçlar, dikkatli bir şekilde %70' lik etanol (24102 Sigma-Aldrich) içine daldırılarak, bek alevinde yakılarak, sterilize edildi. Laboratuvara analize getirilen numuneler 25 g olacak şekilde tartıldı.

### 2.5.1. İzolasyon ve İdentifikasyon

#### 2.5.1.1. İzolasyon

EUARL-AR protokolü (Isolation of ESBL-, AmpC-, carbapenemase- producing *E. coli* from fresh meat, December 2019, version 7) doğrultusunda, ön zenginleştirme için, 1/10 oranında; 25 gr numune, 225 mL TPS içerisinde, stomacher poşetlerine koyularak homojenize edildikten sonra 37°C'de 18-22 saat inkübasyona bırakıldı.

GSβL aktivitesini belirlemek amacıyla sefotaksim (1mg/L) içeren Mac Conkey Agar'a ekimi gerçekleştirilerek, 44°C'de 18-22 saat inkübasyona bırakıldı. Daha sonra metodun önerdiği şekilde, 3 kez antibiyotik içeren Mac Conkey Agar'a

37°C’de 18-22 saat inkübasyonda kaldı ve *E. coli*’ye ait koloniler görülünceye kadar pasajlanmıştır.

Ön zenginleştirmeye tabi tutulan numunelerden bir öze dolusu alınarak, karbapenemaz aktivitesinin tespiti için meropenem (0,5 µg/ml) içeren Mac Conkey Agar’a ekim yapıldı ve 44°C’de 18-22 saat inkübasyona tabi tutuldu. Protokol gereği, tekrar antibiyotikli Mac Conkey Agar’a, 37°C’de 18-22 saat inkübasyona bırakıldı ve bu işlem 3 kez tekrar edildi (EUARL-AR).

### **2.5.1.2. İdentifikasyon**

#### **➤ Gram Boyama**

Bakteriler yayma tekniği ile preparat hazırlanır. Preparatın üzerine kristal viyol boya çözeltisi (üzerini kapsayacak şekilde) eklenir 1 dakika sonra suyla yıkanır. Üzerine Lugol solüsyonu eklenir ve 1 dakika ardından distile suyla yıkanır ve üzerine %95’lik etanol veya asit-alkol karışımı eklenerek 10-15 saniye sonra tekrar distile suyla yıkanır; preparata sulu fuksin veya safranin boya çözeltisi eklenerek kaplanır. Preparat havada ya da kurutma kâğıdı ile kurutulur. Mikroskopta incelenir. Mor renkte görülen mikroorganizmalar gram pozitif, pembe-kırmızı renkte görülenler ise gram negatif olarak değerlendirilir. 12 adet şüpheli izolatın gram negatif çomak olduğu tespit edildi.

#### **➤ Oksidaz Testi**

Oksidaz testi, sitokrom oksidaz enziminin varlığının göstergesidir. NA’da 24 saat sonra üreyen kolonilerden steril swab ile, bir filtre kağıdı üzerine sürülerek, bir damla %1’lik oksidaz ayırıcı (TMpPD, N, N, N’, N’-tetra-metil-p-fenilen diamin dihidroklorid) eklenir, 10-15 saniye içerisinde kolonilerin koyu mor renge dönüşmesi oksidaz (+), dönüşmemesi oksidaz (-) olarak değerlendirilmiştir (UMS, 2015). İzolatların 12 adedinin oksidaz (-) olduğu tespit edildi.

#### **➤ BBL Crystal Hızlı İdentifikasyon Sistemi**

Tipik *E. coli* karakteristik özelliği gösteren, şüpheli 12 izolat, identifikasyon için 37°C’de 18-22 saat inkübasyona tabi olmuş ve Enterik-Non fermentatif bakterilere uygun kit ile identifikasyonu yapıldı. Daha sonra kullanılmak üzere *E. coli* izolatları, %50 Gliserinli Brain Heart Infüzyon Buyyon’da, -20°C’de, derin dondurucuda saklandı.

## 2.5.2. Fenotipik Olarak Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

### 2.5.2.1. Disk difüzyon testi ve E-test (Elipsomer test)

Agarda oluşan saf koloniden pamuklu eküvyon çubukla alınarak, steril % 0,85'lik, 5 ml fizyolojik tuzlu suya, (NaCl<sub>2</sub>), süspansiyon yoğunluğu 0,5 Mc Farland (BBL McFarland Turbidity Standard) ( $10^8$  kob/ml) olacak şekilde aktarıldı. Süspansiyon yoğunluğu dansitometre kullanılarak ayarlandı. Mueller Hinton Agar yüzeyine süspansiyon, petrinin her yerine eşit yayılacak şekilde, steril pamuklu çubukla sürüldü. 3-5 dk besiyerinin sıvıyı absorbe etmesi için beklendi.

Steril pensle çıkarılan diskler ve E-Test stripleri, Mueller Hinton Agar üzerine, antibiyotik disk etrafında oluşacak zonlar birbirini engel olmayacak şekilde, disk kullanım talimatlarına uyularak yerleştirildi. Disklerin konumlandırıldığı petriler, 37°C'de, 18-24 saat inkübasyonda bırakıldı ve inkübasyon sonrası disk etrafında oluşan zonlar cetvelle ölçülerek kaydedildi. Diak difüzyon ölçüm sonuçları EUCAST ve CLSI (Çizelge 2. 3.) kriterlerine göre değerlendirildi.

İnkübasyon sonunda, E-Test'te eliptik inhibisyon zonunun stripi kestiği ölçüt, MIC sonucunu bildirir. MIC okunarak EUCAST ve CLSI kriterlerine (Çizelge 2.4.) göre değerlendirildi (Bioanalyzer Protokolü, 2020). Çizelge 2. 5.'te EURL-AR'ye göre MIC sonuçlarının GSβL değerlendirmesi yapıldı.

Ölçüm sonuçları, öncelikle EUCAST kriterlerine göre değerlendirildi. EUCAST'te kriteri olamayanlar, CLSI kriterlerine göre değerlendirildi.

**Çizelge 2.3.** Disk Difüzyon değerlendirme zon çapları (EUCAST 2021),

Antibiyotik Disk Kodları	Antibiyotik İsimleri	Disk Difüzyon Zon Limitleri
AM	Ampisilin	S $\geq$ 14 R<14
AZM*	Azitromisin	S $\geq$ 13, R $\leq$ 12
C*	Kloramfenikol	S $\geq$ 18 I=13-17 R<12
CIP	Siprofloksasin	S $\geq$ 25 R $\leq$ 22
CN	Gentamisin	S $\geq$ 17, R<17
MEM	Meropenem	S $\geq$ 22, R<16
NA*	Nalidiksik Asit	S $\geq$ 19, I=14-18, R $\leq$ 13
TE*	Tetrasiklin	S $\geq$ 15, I=12-14, R $\leq$ 11
TGC	Tigesiklin	S $\geq$ 18, R<18
SXT	Trimetoprim/Sulfametokzol	S $\geq$ 14, R<11
FOX	Sefoksitin	S $\geq$ 19, R<19
CTX*	Sefotaksim	S $\geq$ 26 I=23-25 R $\leq$ 12
CAZ*	Seftazidim	S $\geq$ 21 I=18-20 R $\leq$ 17

\*CLSI zon çapları değerlendirme M100-ED 32

**Çizelge 2.4.** EUCAST'e göre MIC değerleri,

E-Test Stripleri	İçerdiği Antibiyotik Miktarı ( $\mu$ g/ml)	MIC Değerleri (mm)
MP (Meropenem)	0,02-32	S $\leq$ 2 R >8
CT (Sefotaksim)	0,016-256	S $\leq$ 1 R >2
TZ (Seftazidim)	0,016-256	S $\leq$ 1 R >4
IPM (İmipenem)	0,02-32	S $\leq$ 2 R >4
CO (Kolistin)	0,016-256	S $\leq$ 2 R>8
FX (Sefoksitin)* CT+CLA (Sefotaksim-Klavulanik Asit)	0,016-256 0,016-1	S $\leq$ 8 16=I R $\geq$ 32
TZ+CLA (Seftazidin-Klavulanik Asit)	0,064-4	

\*CLSI zon çapları değerlendirme M100-ED 32

**Çizelge 2.5.** EURL-AR'ye göre MIC sonuçlarının GS $\beta$ L değerlendirmesi

GS $\beta$ L	MIC Değeri	Değerlendirme
Pozitif	CT $\geq$ 0.5 ve CT /CTL $\geq$ 8 veya TZ $\geq$ 1 ve TZ /TZL $\geq$ 8 veya PM $\geq$ 0.25 ve PM (PML $\geq$ 8	GS $\beta$ L pozitif Tüm penisilin, sefolosporin ve azitronema karşı dirençlidir.
Negatif	CT <0.5 veya CT /CTL < 8 ve TZ < 1 veya TZ /TZL < 8	GS $\beta$ L negatif
Değerlendirilemiyor	CT > 16 ve CTL > 1; TZ > 32 ve TZL > 4; PM > 16 ve PML > 4	Değerlendirme yapılamıyor.

Disk difüzyon testinde, CTX ve CTX-CLA ve CAZ ve CAZ-CLA kombinasyonları arasındaki zon farkı, 5mm ve daha fazlaysa GS $\beta$ L pozitif olarak



değerlendirilmektedir. FOX'a karşı var olan direnç, Amp-C pozitifliğini göstermektedir (EUCAST, 2021). E-Test'te ise MEM'e karşı dirençlilik mevcutsa, karbapenemaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmektedir (EUCAST, 2021). Ayrıca araştırmada çoklu antibiyotik dirençliliği (Multy-Drug Resistance-MRD) indeksi de hesaplanmıştır. MDR indeksi, test organizmalarının dirençli olduğu antibiyotik sayısının toplam kullanılan antibiyotik sayısına oranı ile bulunmuştur. Hesaplanan MDR indeksi sonucunda 0,2'den daha büyük olan suşların 3'den fazla antibiyotiğe direnç göstermesi MDR pozitif olarak değerlendirilmiştir (Krumperman, 1983).

### **2.5.3. Moleküler Yöntemlerle Direnç Genlerinin Belirlenmesi**

#### **2.5.3.1. *E. coli* izolatlarından DNA izolasyonu**

Bakterilerden DNA izolasyonu kaynatma metodu ile yapılmıştır. Bu metoda göre, her bir suş için, 2 ml'lik eppendorflara, 100 µl steril distile su konulmuştur. Ekim yapılan petrideki taze kültürlerden, 1 koloni bakteri alınarak, steril distile suda homojenize edildi (Kaur ve Aggarwal, 2013).

Bakteri örneklerinin her biri 95°C'de 10 dakika kaynatıldı; daha sonra 10.000 rpm'de ve 2 dk. santrifüj edildi. Süpernatant temiz tüpe alındı ve nano-drop spektrofotometre ile elde edilmiş DNA'ların miktarları ng/mL olarak ölçüldü (Dallenne vd., 2010). Mililitrede 1 ng /mL olacak şekilde; nano-drop spektrofotometre'de ölçülen DNA'lar hazırlandı (Dallenne vd., 2010). Bu hazırlık  $M1.V1=M2.V2$  kütle ve hacim denkleminde çıkan değere göre yapıldı.

#### **2.5.3.2. *E. coli* izolatlarının klasik PCR ile GSβL, Amp-C ve karbapenemaz genlerinin belirlenmesi**

GSβL üreten *E. coli* izolatlarının; GSβL enzimlerini kodlayan, (*bla*CTXM-9, *bla*CTXM-1, *bla*SHV, *bla*TEM, *bla*OXA-1) Amp-C üreten *E. coli* izolatlarının genlerine özgü (*bla* FOX), karbapenemaz üreten *E. coli*'nin; genlerine özgü, (*bla*OXA-48, *bla*IMP, *bla*VIM, *bla*KPC, *bla*NDM-1) enzimlerin, primerleri kullanılarak klasik PCR ile tarandı. Klasik PCR yönteminde 25 µl PCR reaksiyon hacmi; 12,5 µl master mix, 1 µl DNA, 5µl primer ve 6,5 µl steril distile su bileşenlerinden elde edildi.

PCR protokolü; ilk denatürasyon 94°C'de 10 dk, denatürasyon 94°C'de 40 sn, annealing (bağlanma) 60°C'de 40 sn, elongasyon (uzama) 72°C'de 1dk olacak şekilde, 30 siklus olarak gerçekleştirildi. Devamında ise; 72°C'de 7 dk. olarak protokol tamamlandı (Dallenne vd., 2010). Elektroforez için %2'lik agaroz jel kalıba döküldü, taraklar yerleştirildi ve baloncuk oluşturmamaya dikkat edildi. Jelin katılaşması için 30 dakika kadar beklendi.

**Yükleme işlemi:** Elektroforez tankı, yeterli miktarda 1XTAE ile dolduruldu. Rulo parafilm üzerine amplifikasyon ürünü 5 µl ve 1 µl 6XLoading Dye (Jel yükleme boyası) pipetaj yöntemiyle homojenizasyonu sağlandı ve ilk kuyucuğa 10 µl DNA-Ladder, sonraki kuyucuklara amplikon DNA 5 µl ve 1 µl 6XLoading Dye yüklendi. Yükleme tamamlandıktan sonra, 100 Volt'ta, 1 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu.

**Jelin Görüntülenmesi:** Jel UV ışığı altında jel görüntüleyici cihaza yerleştirildi ve jelin görüntüleri kayıt altına alındı.

### **2.5.3.3. *E. coli* izolatlarının LAMP PCR karbapenemez genlerinin belirlenmesi**

Karbapenemez üreten *E. coli* izolatlarının karbapenemaz enzimlerini kodlayan primerler kullanılmıştır. LAMP PCR'da sadece karbapenemaz varlığı test edildi.

LAMP PCR yönteminde toplam reaksiyon hacmi 25 µl olacak şekilde; 15 µl master mix, 5 µl DNA, 5µl primer ile hazırlanmıştır.

LAMP PCR aşamaları; Isıtıcı blokda, 65°C'de 30 dakika kadar bekletildi ve elektroforez işlemine tabi tutuldu. Elektroforez tankı, yeterli miktarda 1XTAE ile dolduruldu. Rulo parafilm üzerine amplifikasyon ürünü 5 µl ve 1 µl 6XLoading Dye (Jel yükleme boyası) pipetaj yöntemiyle homojenizasyonu sağlandı ve ilk kuyucuğa 10 µl DNA-Ladder, sonraki kuyucuklara amplikon DNA 5 µl ve 1 µl 6XLoading Dye yüklendi. Yükleme tamamlandıktan sonra, 100 Volt'ta, 1 saat elektroforez işlemine tabi tutuldu. Jelin Görüntülenmesi: Jel UV ışığı altında jel görüntüleyici cihaza yerleştirildi ve jelin görüntüleri kayıt altına alındı.

## **2.6. TPS'den DNA İzolasyonu**

Araştırmada, ayrıca *E. coli* tespit edilen numunelerden, 9 ml TPS'ye; 1 gr numune tartılarak 37°C'de 18-22 saat inkubasyona tabi tutulduktan sonra, TPS'den, direkt

DNA izolasyonu yapıldı. Enzim aracılı izolasyon için, ependorf tüplerine 1 µl enzim, 10 µl buffer ve 20 µl ilgili numuneye ait TPS'dan alındı ve üzerine 69 µl steril distile su konularak, bileşim 100 µl'ye tamamlandıktan sonra, 75°C'de 15 dakika ve 95°C'de 5 dakika kaynatılarak DNA'lar izole edildi. İzole edilen DNA'lar nano-drop spektrofotometre ile ölçülerek yeniden Klasik PCR ve LAMP PCR testine tabi tutuldu.

## 2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmada kullanılan yöntemlerin GSβL, Amp-C ve karbapenemaz genleri açısından fenotipik ve genotipik analiz sonuçlarının karşılaştırılmasında KAPPA testi kullanıldı. Çizelge 2.6'ya göre değerlendirilmesi yapıldı.

**Çizelge 2.6.** Mc Hugh'a göre istatistik değerlendirmesi (2012)

Değerler	Sonuç
0,00-0,20	Uyum yok
0,21-0,39	Minimal düzeyde uyum
0,40-0,59	Zayıf düzeyde uyum
0,60-0,79	Orta düzeyde uyum
0,80-0,90	Güçlü düzeyde uyum
0,90<	Nerdeyse mükemmel uyum

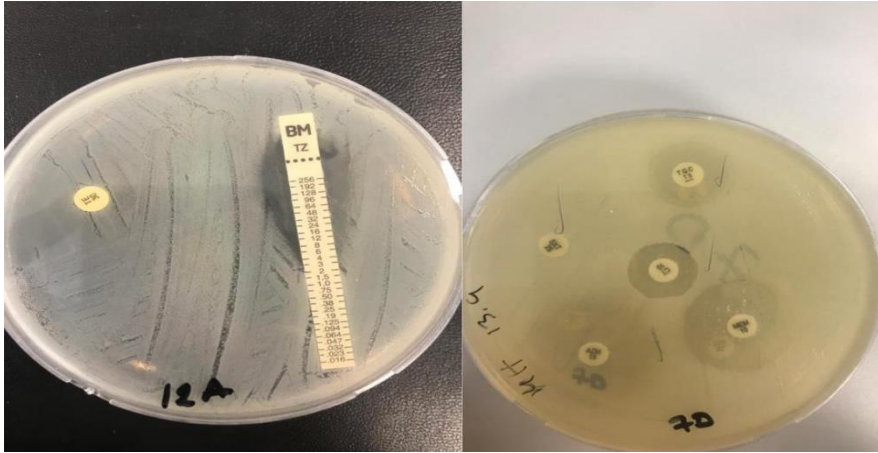
### 3. BULGULAR

Çalışmada kullanılan 120 örnekten (62 dana ve 58 kuzu) 14 adedinde şüpheli GSβL, Amp-C ve karbapenemaz üreten *E. coli* izole edildi. İzolasyondan sonra uygulanan gram boyama, oksidaz testi ve BBL kristal hızlı test sistemi ile identifikasyon sonucunda 2 örneğin *E. coli* olmadığı; 12 (5 dana ve 7 kuzu) tanesinin *E. coli* olduğu tespit edildi.

#### 3.1. Disk Difüzyon Test Sonuçları

Disk difüzyonda kullanılan antibiyotikler ve sonuçları Çizelge 3.1.'de gösterilmiştir. Disk Difüzyon ve E-Test uygulamaları şekil 3.1 de gösterilmektedir. Sonuçlar değerlendirildiğinde GSβL direncinin CTX-CA (sefotaksim/kalvilanik asit)'a 9 izolatta (4 izolat kuzu etinden, 5 izolat dana etinden), CAZ-CA (seftazidim/klavikuanik asit)'a ise 1 izolatta (kuzu etinden) ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Amp-C direncini belirlemek için kullanılan sefoksitin antibiyotiğine ise tüm izolatların (5 kuzu eti ve 7 dana eti) dirençli olduğu tespit edilmiştir. Karbapenemaz direnci için kullanılan meropenem karşı ise hiçbir izolatta direnç görülmemiştir; fakat 2 izolat ise kriter aralığında olmadığından değerlendirilememiştir (Çizelge 3.1). MDR indeksine göre araştırmada izolatların kullanılan antibiyotiklere dirençlilik, hassasiyet durumları değerlendirilmiş olup 11 izolatın MDR indeksi 0,2'nin üzerinde olduğu; 1 izolatın (OXA18=0,15) 0,2'nin altında olduğu hesaplanmıştır. Yani izolatların fenotipik olarak %91,6'sında çoklu antibiyotik direnci mevcuttur.

Ampisiline %91,6, azitromisine %66, kloramfenikole ve siprofloksasine %75, gentamisine %41,6, nalidiksik asite %75, tetrasikline %91,6, tigesikline %33,3, sulfametoksol/trimetoprim %66, cefotaksime %83,33 ve seftazidime %41,6 oranında direnç görüldü.



Şekil 3.1. Disk Difüzyon ve E-Test uygulamaları

Çizelge 3.1. Disk Difüzyon Testi Sonuçları

	Kuzu eti	Kuzu eti	Kuzu eti	Dana eti	Kuzu eti	Dana eti	Kuzu eti	Dana eti	Dana eti	Kuzu eti	Kuzu eti	Dana eti
	22B	24D	13A	1D	OXA18	14D	12A	9	7C	18	7D	12B
AM	0/R	0/R	0/R	0/R	14/S	0/R	0/R	0/R	0/R	0/R	0/R	0/R
AZM*	8/R	0/R	0/R	0/R	0/R	0/R	20/S	24/S	25/S	0/R	27/S	0/R
C*	0/R	0/R	0/R	27/S	30/S	0/R	0/R	0/R	0/R	0/R	30/S	0/R
CIP	9/R	17/R	12/R	22/R	35/S	10/R	9/R	12/R	27/S	9/R	25/S	0/R
GM	0/R	21/S	20/S	24/S	21/S	10/R	23/S	20/S	13/R	0/R	24/S	0/R
MEM	21/-	20/-	22/S	25/S	25/S	23/S	24/S	22/S	22/S	23/S	23/S	30/S
NA*	0/R	0/R	0/R	18/I	21/S	0/R	0/R	0/R	20/S	0/R	0/R	0/R
TE*	0/R	0/R	0/R	0/R	13/I	0/R	0/R	0/R	0/R	0/R	0/R	0/R
TGC	18/S	17/R	20/S	17/R	18/S	20/S	19/S	18/S	18/S	16/R	17/R	30/S
SXT	0/R	19/S	0/R	0/R	30/S	30/S	0/R	0/R	23/S	0/R	0/R	0/R
FOX	0/R	0/R	11/R	8/R	10/R	18/R	10/R	16/R	0/R	0/R	0/R	01/R
CTX*	0/R	20/R	8/R	8/R	35/S	11/R	0/R	9/R	22/R	25/S	13/R	0/R
CTX+CA	26 ESBL	23	30 ESBL	30 ESBL	35	31 ESBL	30 /ESBL	30 ESBL	30 ESBL	27	30 /ESBL	55 ESBL
CAZ*	16R	13/R	17 R	19/I	30/S	21/S	16/R	22/S	16/R	21/S	25/S	43/S
CAZ+CA	12	0 ESBL	16	18	27	20	15	17	18	11	21	0

\*CLSI M100 –DT32, ‘-’ değerlendirilmesi yapılamayan, ‘R’ dirençli, ‘S’ duyarlı ve ‘I’ orta derecede duyarlı olarak belirtilmiştir

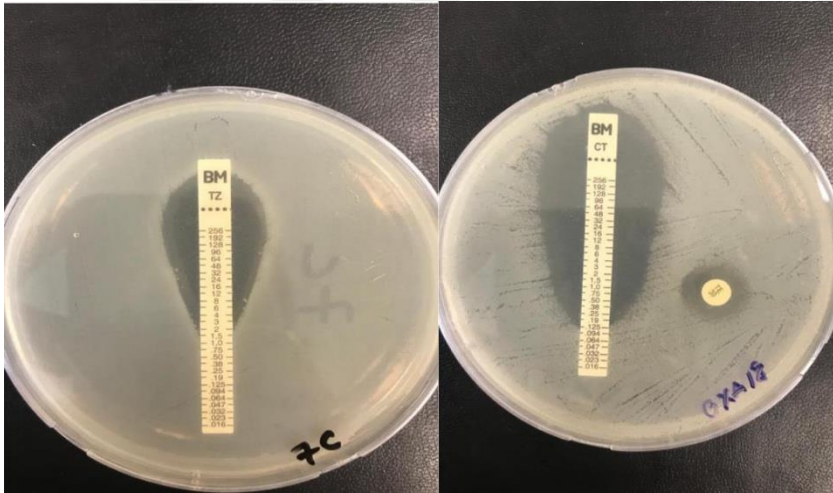
### 3.2. E-Test Sonuçları

MIC değerlerinin araştırıldığı E-Test’te; GSβL aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan CTX-CA (sefotaksim/kalvilanik asit)’a karşı direnç bulunamazken, CAZ-CA (seftazidim/klavikuanik asit)’a ise 1 izolatta direnç tespit edilmiştir. Amp-C ve Karbapenemez aktivitesi ise hiçbir izolatta tespit edilememiştir (Çizelge 3.2).

Çizelge 3.2. E-Test sonuçları

Anti biyotikler	Kuzu eti	Kuzu eti	Kuzu eti	Dana eti	Kuzu eti	Dana eti	Kuzu eti	Dana eti	Dana eti	Kuzu eti	Kuzu eti	Dana eti
	CO	22B	24D	13A	1D	OXA18	14D	12A	9	7C	18	7D
	0,75 S	0,75 S	0,75 S	0,75 S	0,75 S	0,75 S	24 R	0,75 S	0,75 S	-	0,75 S	0,75 S
MP	0,032 S	0,047 S	0,047 S	0,023 S	0,016 S	0,032 S	0,032 S	0,032 S	0,032 S	0,023 S	0,032 S	0,002 S
IMP	0,094 S	0,094 S	0,094 S	0,125 S	0,032 S	0,094 S	0,125 S	0,094 S	0,094 S	0,064 S	0,094 S	-
FX*	3 S	-	1,5 S	3 S	2 S	1 S	16 I	1 S	24 S	-	2 S	12 S
CT	-	6 R	-	-	0,125 S	-	-	-	1,25 S	1 S	-	-
CT/ CA	1,064	-	1,0123	1,19	1,042	1,094	1,125	1,01	1,032	-	1,064	1,032
TZ	0 S	12 R	8 R	3 S	1,50 S	2 S	5 R	3 S	3 S	4 S	1,75 S	4 S
TZ/ CA	1,094	1,5 GSBL	1,064	1,19	1,125	1,19	1,19	1,06	1,064	1	1,125	1,094

\*CLSI kriterine göre değerlendirilenler., Diğerlerinin EURL-AR kriterlerine göre yapılmıştır. '-' değerlendirmesi yapılamayanlar, 'R' dirençli, 'S' duyarlı



Şekil 3.2. E-test çalışmaları uygulamaları

### 3.3. Klasik PCR ve LAMP PCR Sonuçları

Yapılan Klasik PCR ve LAMP PCR çalışmaları ile moleküler yöntemlerle GS $\beta$ L, Amp-C ve karpemaz varlığını saptanmıştır. Klasik PCR ile dirençlilik genleri araştırıldığında, 4 izolatta (12B, 1D, 12A, 9D) CTX-M1 geni ve izolatların tamamında SHV geni tespit edilirken; karbapenemaze geni ve Amp-C geni tespit

edilmedi (Çizelge 3.3). LAMP PCR ile karbapenemaze genleri incelendiğinde, 2 izolat pozitif olarak tespit edildi (Çizelge 3.4).

Direkt TPS'dan alınan örneklerden (n=10) klasik PZR sonuçlarında ise, 4 numunede (12B, 1D, 12A, 9D) CTX-M1; 10 numunede (12B, 1D, 12A, 9D, 7D, 7C, 24D, 14D, 13A, 22B) SHV geni tespit edildiği görüldü. LAMP PCR ile ise 2 numunede tüm karbapenemaz genleri tespit edildi (Çizelge 3.5).

Araştırmada uygulanan testlerin karşılaştırılması Çizelge 3.7'de gösterilmiştir.

**Çizelge 3.3.** Klasik PCR GSβL, Amp-C ve karbapenemaz sonuçları

İzolatlar	GSBL Genleri					Amp-C Geni	Karbapenemaz Genleri				
	CTX-M1	CTX-M9	SHV	TEM	OXA-1		FOX	NDM	OXA-48	IMP	VIM
22B	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
24D	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
13A	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
1D	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
OXA18	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
14D	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
12A	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
9D	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
7C	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
18	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
7D	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
12B	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK

**Çizelge 3.4.** LAMP PCR karbapenemaz sonuçları

İzolatlar	NDM	OXA-48	Karbapenemaz Genleri		
			IMP	VIM	KPC
22B	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
24D	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR
13A	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
1D	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
OXA18	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
14D	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR
12A	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
9D	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
7C	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
18	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
7D	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
12B	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK

**Çizelge 3.5.** TPS'den Klasik PCR sonuçları

Klasik PCR (GSBL)						AmpC	KLASİK PCR (Karbapenemaz)				
İzolatlar	CTX-M1	CTX-M9	SHV	TEM	OXA-1	FOX	NDM	OXA-48	IMP	VIM	KPC
12B	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
1D	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
12A	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
9D	VAR	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
7D	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
7C	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
24D	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
14D	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
13A	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
22B	YOK	YOK	VAR	YOK	YOK	YOK	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR

**Çizelge 3.6.** TPS'den LAMP PCR sonuçları

LAMP PCR (Karbapenemaz)					
İzolatlar	NDM	OXA-48	IMP	VIM	KPC
12B	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
1D	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
12A	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
9D	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
7D	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
7C	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
24D	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR
14D	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR
13A	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
22B	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK

**Çizelge 3.7.** Araştırmada Uygulanan Tüm Testlerin Karşılaştırılması

	DİSK DİFÜZYON	E-TEST	PCR GSBL	PCR KARBA	LAMP PCR	TPS PCR	TPS LAMP PCR
12B	GSBL+Amp-C		GSBL			GSBL	
1D	GSBL+Amp-C		GSBL			GSBL	
12A	GSBL+Amp-C		GSBL			GSBL	
9D	GSBL+Amp-C		GSBL			GSBL	
7D	GSBL+Amp-C		GSBL			GSBL	
7C	GSBL+Amp-C		GSBL			GSBL	
24D	GSBL+Amp-C	GSBL	GSBL		Karba	GSBL	Karba
14D	GSBL+Amp-C		GSBL		Karba	GSBL	Karba
13A	GSBL+Amp-C		GSBL			GSBL	
22B	GSBL+Amp-C		GSBL			GSBL	
OXA18	Amp-C		GSBL				
18	Amp-C		GSBL				



### 3.4. İstatistik Sonuçları

SPSS programında yapılan, Kappa testinin sonuçları (Mc Hugh, 2012) değerlendirildi (Çizelge 3.8). Disk Difüzyon ve PCR (GSβL) arasında minimal düzeyde uyum, disk difüzyon ve klasik PCR (CTXM1-GSBL) arasında neredeyse mükemmel uyum, disk difüzyon ve klasik PCR (SHV-GSBL) arasında neredeyse mükemmel uyum tespit edilirken, diğer karşılaştırmalarda uyum olmadığı belirlenmiştir. Genler yönünden bakıldığında disk difüzyon test sonuçları ile klasik PCR sonuçları arasında neredeyse mükemmel uyum olması dikkat çekicidir.

**Çizelge 3.8.** Kappa testi sonuçları

Testler	K	Değerlendirme
DD-E-Test (GSβL)	0,05	Uyum yok
DD-PCR (GSβL)	0,32	Minimal düzeyde uyum
DD-PCR (CTXM1-GSβL)	1,52	Neredeyse mükemmel uyum
DD-PCR (SHV-GSβL)	1	Neredeyse mükemmel uyum
DD-E-Test (Amp-C)	0	Uyum yok
DD- LAMP PCR (Karba)	0	Uyum yok
E-Test-PCR (GSβL)	0	Uyum yok
E-Test-PCR (CTXM-1-GSβL)	0,05	Uyum yok
E-Test-PCR (SHV-GSβL)	0	Uyum yok
E-Test-PCR (Amp-C)	0	Uyum yok
E-Test- LAMP PCR (Karba)	0	Uyum yok

## 4.TARTIŞMA VE SONUÇ

Antibiyotikler dünyada, hayvancılık sektöründe 2010 yılında yaklaşık 63.000 ton olarak kullanıldığı tahmin edilmektedir; bu sayının 2030 yılında, 105.000 tona çıkması beklenmektedir. Bu uygulamalar insanlarda, sığırlarda ve çevrede AMR'li patojenlerin aşırı artmasına, daha uzun süreli hastanede yatışlara, toplum üzerinde mali bir yüke ve ölümcül sonuçlara sebebiyet vermektedir (Van Boeckel vd., 2015). İlaça dirençli *Enterobacteriaceae* etkenlerinin neden olduğu hastalıklar, dünya çapında ciddi bir tehdit haline gelmiştir. Özellikle,  $\beta$ -laktam antibiyotiklere direnç, Tıp ve Veteriner Hekimlikte önemli bir risk yaratmaktadır.

Bu tez çalışmada, kırmızı etlerden izole edilen GS $\beta$ L, Amp-C ve karbapenemaz üreten *E. coli* suşlarının fenotipik olarak antibiyotik direnç özellikleri; disk difüzyon ve E-Test yöntemleri ile belirlendi. Klasik PCR ve LAMP PCR ile antibiyotik direnç genlerinin tespiti hedeflendi. Ayrıca TPS'de 24 saatlik ön zenginleştirmeden sonra, etken izolasyonuna gerek kalmadan, direkt direnç genlerini tespit etmek amaçlandı.

Elde edilen sonuçlara göre; 12 *E. coli* suşunun disk difüzyon yöntemi ile 10 tanesinde; E-Test yöntemi ile de yalnızca 1 tanesinde GSBL aktivitesi görüldü. *blaCTX-M1*, *blaCTX-M9*, *blaSHV*, *blaTEM*, *blaOXA-48* genlerinin Klasik PCR ile genotipik olarak GS $\beta$ L aktivitesi incelenmiş ve 12 izolatan tamamında *blaSHV* ve 4 izolatta ise *blaCTX-M1* geni bulunmuştur. CTX-M gen grubunun sefotaksimi yüksek oranda lize ettiği ve CTX-M üreten *E. coli*'nin çoklu ilaç direncine sebep olduğu bildirilmiştir (Mathers, Peirano ve Pitoutb, 2015). TEM ve SHV genlerinin GS $\beta$ L'lerin ampisilin, karpenisilin, sefalotin ve genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere karşı dirençten sorumlu olduğu bildirilmiştir (Helfand ve Bonomo, 2005). Çalışmada genotipik olarak 12 *E. coli* GS $\beta$ L pozitif izolatan; disk difüzyon testinde, 10 adedinin, E-Testte ise 1 adedinin pozitif olduğu tespit edilmiştir. Fenotipe GS $\beta$ L pozitif olarak yansımamasının olası nedeni, mevcut genlerin yeteri kadar eksprese edilmemesi, yani fenotipe etki edecek kadar ifade edilmemeleri olarak açıklanabilir. GS $\beta$ L üretimi için fenotipik olarak pozitif olan, ancak GS $\beta$ L genleri yönünden negatif olan *E. coli* izolatlarının da GS $\beta$ L üreticisi olarak kabul

edilebileceği bildirilmiştir. Çünkü fenotipik olarak pozitif izolatların çoğunun, mevcut tüm direnç genlerini barındırmadığı bildirilmiştir (Schmid vd., 2013).

12 adet *E. coli* izolatının tamamında disk difüzyon yöntemi ile Amp-C pozitifliği bulunmuş; ancak E-Test yöntemi ile Amp-C pozitifliği bulunamamıştır. Genotipik olarak ise klasik PCR'da Amp-C (*blaFOX*) genine rastlanamamıştır. Amp-C'nin genotip olarak yansımamasının nedeni, Amp-C'nin farklı bir gen grubu ile ifade edilmesi olasılığıdır. Yani çalışmada Amp-C aktivitesi, araştırılan *blaFOX* geninden farklı bir genle ifade edilmiş olabilir.

Karbapenemaz aktivitesi; disk difüzyonda, E-Test'te ve klasik PCR'da; hiçbir numunede, tespit edilmemiş; LAMP PCR'da ise 14D ve 24D nolu izolatlarda pozitif olarak görülmüştür. İki izolatta da *blaNDM*, *blaOXA-48*, *blaIMP*, *blaVIM*, *blaKPC* genlerinin hepsine rastlanılmıştır. Karbapenemaz genlerinin LAMP PCR'da bulunmasının nedeni, bu yöntemin klasik PCR'dan daha özgül olması olarak açıklanabilir (Parida vd., 2008).

TPS'den etken izolasyonu yapılmadan direnç genlerinin tespitinde ise 4 numunede (12B, 1D, 12A, 9D) CTX-M1 ve SHV genleri; diğer numunelerde sadece SHV geni tespit edildiği görüldü. LAMP PCR'da ise 2 numunede (24D ve 14D), tüm karbapenemaz genleri (NDM, OXA-48, IMP, VIM, KPC) tespit edildi. TPS'den elde edilen bu sonuç etken izolasyonuna gerek olmadanda, daha kısa sürede direnç genlerinin saptanabileceğini göstermektedir. Belirlenen direnç genlerinin *Enterobacteriaceae* ailesine ait (primerler nedeniyle) olan herhangi bir bakteriden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.

Bu sonuçlar, belirli bir fenotipik direnç modeline sahip olmanın bir direnç geni ile her zaman doğru bir şekilde ilişkili olmadığını göstermektedir. Antibiyotik direnç genleri mutasyona uğramış veya ifade edilmemiş olabilir; çoklu ilaç akış pompaları, dış zar porinlerindeki mutasyonlar veya diğer bilinmeyen direnç genleri gibi diğer direnç mekanizmalar, fenotipik direnci etkileyebilir (Davis vd., 2011; Smith vd., 2014).

Burdur'da sağlıklı sığır ve koyunlardan alınan fekal örneklerinden yapılan bir çalışmada, fenotipik olarak sığır örneklerinin %15,5'inde, koyun örneklerinin ise %1,5'inde GSβL varlığı tespit edildiği bildirilmiştir. Ayrıca genotipik olarak incelendiğinde araştırmacılar rastladıkları genlerin *blaCTX-M*, *blaTEM*, *blaSHV*

olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmada ayrıca antibiyotik dirençliliklerine bakıldığında *E. coli* izolatlarında, aminoglikozitler, fenikoller, kinolonlar, folat yolu inhibitörleri ve tetrasiklinler dahil olmak üzere birçok antibiyotik sınıfına birlikte direnç gösterdiği bildirilmiştir. (Pehlivanoglu, Turutoğlu, Öztürk ve Yardımcı, 2016).

Hatay'da (Aslantaş, Elmacıoğlu ve Yılmaz, 2017) sığırlardan alınan rektal swap örnekleri üzerine yapılan bir araştırmada, GSβL ve/veya Amp-C üreten *E. coli*'nin fenotipik olarak GSβL varlığı %8,3 (26 izolat) olarak bildirilmiş ve genotipik olarak da 12 adet *blaCTX-M-15*, 11 adet *blaCTX-M-1,2* adet *blaCTX-M-3* ve 1 adet *blaCMY-2* genleri bildirilmiştir.

Bu çalışmada ise GSβL varlığının genotipik olarak *blaSHV* geninde %100, *blaCTX-M1* geninde ise %33; fenotipik olarak disk difüzyonda %83,3 belirlenmiştir. Burdur'da ve Hatay'da yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında, antibiyotik kullanımının ve fenotipik olarak GSβL direncinin giderek arttığı görülmektedir. Genotipik olarak ise CTX grubu genlerin varlığı ve SHV geninin varlığı bu çalışmayla benzer şekildedir.

Amasya'da (Saat, 2017) yapılan bir araştırmada *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakterilerin GSβL oranı %68 olarak belirlenmiş, %35,29' unda CTX-M tipi, %23,52' sinde SHV tipi β-laktamaz varlığına rastlanmıştır. İzolatların hiçbirinde TEM tipi β-laktamaz varlığına rastlanılmamıştır. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında uyumlu olan sonuçların, illerin birbirine yakın olması ve Veteriner Hekimlerin uyguladıkları antibiyotiklerin aynı grup olmasıyla açıklanabilir.

Burdur İli'nde (Yıldırım ve Pehlivanoğlu, 2017), buzağuların dışkı örneklerinden alınan numunelerde, 44 adet GSβL üreten *E. coli* bulunmuş ve bunların 36 adedinde fenotipik olarak GSβL varlığı bildirilmiştir. Ayrıca genotipik olarak CTX-M (grup 1) genleri tüm izolatlarda belirlenmiş ve TEM geni 33 izolatta tespit edilirken, SHV genine izolatların hiçbirinde rastlanmadığı rapor edilmiştir.

Bursa, Tekirdağ ve Yalova'dan toplanan 110 adet çiğ kırmızı et numunelerinde (65 dana ve 45 koyun), GSβL üreten Enterobakterilerin fenotipik olarak 23 adedinde (%20,9) GSβL tespit edilmiştir. İzole edilen başlıca mikroorganizmaların *E. coli* (%30), *C. braakii* (%22), *E. cloacae* (%17), *K. pneumoniae* (%9), *C. freundii* (%9), *S. fonticola* (%4), *K. intermedia* (%4) ve *Moellerella wisconsensis* (%4) olduğu

bildirilmiştir (Öndeş, 2015). Bu tez çalışmasında ise izole edilen GSβL üreten *E. coli* oranı %10'dur.

Türkiye'de (Pehlivanlar Önen, Aslantaş, Yılmaz ve Kürekçi, 2015) perakende satışa sunulan etlerde (tavuk ve sığır eti) GSβL ve/veya Amp-C üreten *E. coli*'nin varlığını araştıran bir çalışmada; kırmızı et örneklerinden elde edilen 7 sefotaksim (2 µg/mL) dirençli *E. coli* izolatu (n = 100) bulunmuş; hepsinin de disk difüzyon yöntemiyle GSβL özelliği gösterdiği belirtilmiştir. *BlaCTX-M-3* (n = 1), *blaCTX-M-15/blaTEM-1b* (n=1) ve *blaTEM-1b/ blaCMY-2* (n = 1) genlerine 3 izolatta rastlanırken; 4 fenotipik GSβL-pozitif suşta ise test edilen genleri bulamamışlardır. Sığır etinden izole edilen GSβL üreten *E. coli*'lerde (n=7/100) sefuroksim (%85,7), nalidiksik asit (%85,7), tetrasiklin (%100), streptomisin (%100) ve trimetoprim-sülfametokzol (%85,7) direnç gözlenmiştir. Tüm izolatların amikasin, imipenem ve sefepime duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Aynı şekilde bu çalışmada da imipenem karşı direnç bulunamamış; tetrasikline, nalidiksik aside, trimetoprim-sülfametoksazole, yüksek oranda direnç görülmüştür. Araştırmada Amp-C direncinin tüm izolatlarda pozitif olduğu ve genotipik olarak bulunmamasının sebebi, *blaCMY-2* geninin bu çalışmada kullanılmaması, Amp-C'nin genotipik olarak *blaFOX* geniyle ifade edilememesi olabilir.

Çin'in Sichuan-Chongqing Bölgesi'nde, sağlıklı besi sığırlarından alınan 222 rektal sürüntüden 102 *E. coli* izolatu (%45,9) GSβL fenotip göstermiştir. PCR ile ayrıca GSβL üreten tüm suşlarda, *blaCTX-M*, *blaSHV* ve *blaTEM* genlerinin olduğu tespit edilmiştir (Zhang vd., 2021). Benzer şekilde bu çalışmada da tüm izolatlarda *blaSHV* geni ve 4 izolatta da *blaCTX-M1* geni tespit edildi.

Endonezya'da yapılan bir çalışmada, 10 adet geleneksel pazardan 60 adet sığır eti numunesi toplandı ve bildirilmiştir. İzole ve tanımlanan *E. coli* izolatları sefotaksim, seftazidim, seftriakson ve aztreonam kullanılarak dört disk difüzyon testi ile GSβL aktivitesinin saptanması için incelenmiştir. MIC değerleri ölçülmüş, GSβL üreten *E. coli* oranı %43,3 bulunmuş; izolatların en yüksek direncinin sefotaksim (%46,1), seftazidim (%23,1), seftriakson (%19,2) ve aztreonam (%38,4) için gözlemlendiği bildirilmiştir (Wardhana vd., 2021). Bu çalışmada MIC değeri, E-Test ile değerlendirildiğinde %8,3 oranında GSβL tespit edildi ve GSβL'nin kullanılan antibiyotiklerden CAZ-CA (seftazidim/klavulanik asit)'te olduğunu tespit edilmiştir.

Mısır'da yapılan bir araştırmada, perakende koyun eti örneklerinden elde edilen toplam 101 bakteri izolatından 93'ü *E. coli*, 6 adedi *Enterobacter cloacae* ve 2 adedinin *Proteus mirabilis* olduğu ve 100 izolatın %17'sinin GSβL üreten *E. coli* olduğu tespit edilmiştir.

Genotipik olarak incelendiğinde ise *blaCTX-M*, *blaCTX-M-15*, *blaCTX-M-14*, *blaTEM*, *blaSHV* bulunmuştur (Abdallah vd., 2022). Genotipik olarak çalışılan gen grupları bu çalışmada da mevcuttur; ancak *blaTEM* geni bulunamamıştır.

Yine Mısır'da yapılan başka bir araştırmada (Nossair vd., 2022), GSβL üreten *Enterobacteriaceae* prevalansı insanlarda, sığırlarda ve kümes hayvanlarında sırasıyla %30, %20 ve %25 olduğu ve genotipik olarak baskın genin *blaSHV* olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca GSβL üreten *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakterilerin çoğunun, çoklu ilaca direnç gösterdiği bildirilmiştir. Bu çalışmada da genotipik olarak baskın genin *blaSHV* olduğu, ayrıca çoklu antibiyotik direnci de tespit edilmiştir.

İran'da yapılan bir araştırmada (Rajaei, Moosavy, Gharajalar ve Khatibi, 2021), iğ kebab ve hamburgerden alınan numunelerde, gıda kaynaklı patojenler ve antibiyotik direnç genleri araştırılmıştır. *E. coli*'nin kebab numunelerinde %70 ve hamburger örneklerinde %48 oranında olduğu ve incelenen patojenik bakteriler arasında en yüksek prevalansı gösterdiği tespit edilmiştir. *E. coli* (%52,54) ve *Salmonella* izolatlarında en yaygın direnç geninin *blaTEM* (%44,11) olduğu bulunmuş; ayrıca 14 izolatta (%23,72) *E. coli* ve 10 izolatta da (%29,41) *Salmonella* spp.'nin *blaSHV* geni olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada ise *blaTEM* genine rastlanılmamıştır.

Gana'da (Dsani vd., 2020) yapılan bir araştırmada, çiğ etten elde edilen 98 *E. coli* izolatından 14 izolatta, kombine disk testinin sonuçlarına göre GSβL ürettiği tespit edilmiştir. Bunlardan 4 *E. coli* izolatının *blaTEM* genine sahip olduğu bulunmuş ve *blaTEM* genine (3/4) sahip olduğu saptanan *E. coli* izolatlarının büyük çoğunluğunun ampisilin, amikasin, tetrasiklin, sulfometakzol/trimetoprim ve sefuroksime karşı fenotipik direnç gösterdiği bildirilmiştir. İzolatlarda *blaSHV* ve *blaCTX-M* geni saptanmamıştır. Bu çalışmada ise benzer şekilde 10 adet GSβL aktivitesi disk difüzyonda, 1 adet de E-Test'te elde edilmiştir ve izolatlarımızın en çok direnç gösterdiği antibiyotikler ampisilin ve tetrasiklin (%91,6) olarak tespit edilmiştir. Bu durum, hayvansal kaynaklı gıdalarda %50' den fazla β-laktam antibiyotik direnci

oranlarının yaygın olarak rapor edildiğini onaylamıştır (Trongjit, Angkittitrakul ve Chuanchuen, 2016).

Tetrasiklinler, insanlarda ve çiftlik hayvanlarında tedavi için, hayvanlarda ise yem yoluyla büyümeyi desteklemek için yaygın olarak kullanılmaktadır (Palmieri, Di Cerbo ve Laurino, 2014). Çiftlik hayvanlarının bağırsak bakterilerinde tetrasiklin direnci belirleyicilerinin yüksek düzeyde aktarılabirliğinin, çiğ et, et ürünleri ve çevreden izole edilen *E. coli*'lerde gözlemlenen tetrasiklin direncini artırdığı belirtilmiştir (Shin, Shin, Jung, Belaynehe ve Yoo, 2015).

Musul'da yapılan bir araştırmada (Mahmood ve Ahmed, 2017) GSβL ve Amp-C üreten *E. coli*'lerin varlığını araştırmak için koyunlardan ve kuzularından süt, dışkı örneği ve mastitisli süt toplanmış; örneklerde toplam %31 GSβL aktivitesi tespit edilmiş ve ampisiline direnç bildirilmemiştir. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında GSβL aktivesinin varlığı ve Amp-C direncinin genotipik olarak bulunamamış olması aynı doğrultudadır.

ABD'de Kuzey Karolina'da (Atlaw vd., 2021) sağlıklı koyunlardan ve onların mezbaha ortamlarından alınan örneklerden izole edilen *E. coli etkenleri*, genotipik (WGS) ve fenotipik (Çift disk diffüzyon testi) olarak incelenmiştir. Koyunlardan (n = 65) ve onların mezbaha ortam örneklerinden (n = 48) toplam 113 GSβL *E. coli* izolatu tespit edilmiş ve tam genom dizilemesine (WGS) tabi tutulmuştur. Koyunlardan ve mezbaha ortamlarından elde edilen 113 ESβL *E. coli*'den 7 tane CTX-M-tipi GSβL geni rapor edilmiştir. Bunlar CTX-M-1 (%28,3, 32/113), CTX-M-14 (%1,8, 2) /113), CTX-M-15 (%11,5, 13/113), CTX-M-27 (%2,7, 3/113), CTX-M-32 (%25,7, 29/113), CTX-M- 55 (%13,3, 15/113) ve CTX-M-65 (%12,4, 14/113) genleridir. Baskın genin CTX-M1 geni olduğu vurgulanmıştır. Tespit edilen diğer β-laktamaz genleri, TEM-1 (%46,9, 53/113), CARB-2 (%14,2, 16/113) ve Amp-C β-laktamaz geni ise, CMY-2 (%9,7, 11/113)'dir. Hemen hemen tüm izolatların (%98,2, 111/113), çoklu antibiyotiğe dirençli olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında, CTX-M1 geni bu çalışmada bulunmuş ve baskın gen olarak ikinci sırada yer almaktadır. Çoklu antibiyotik direnci ise izolatlarımızın neredeyse tamamında vardır.

Kuzey İspanya'da (Tello, Ocejó, Oporto ve Hurtado, 2020) sağlıklı sığırlardan ve sağlıklı koyunlardan elde edilen verilere göre GSβL/Amp-C üreten *E. coli* süt sığıri sürülerinin %32,9'unda, besi sığıri sürülerinin %9,6'sında ve koyun sürülerinin %7,0'ında

izole edilmiştir. Karbapenemaz üreten *E. coli* izole edilememiştir. En yaygın bulunan genler sırasıyla CTX-M-14 CTX-M-1 CTX-M-15 CTX-M-32 dir. SHV geninin sporadik olarak bulunduğu tespit edilmiştir. Amp-C genleri ise CMY-2 ve CMY-4 olduğu tespit edilmiştir. Broth mikrodilüsyon yöntemi ile tetrasiklin, sülfametoksazol, trimetoprim/siprofloksasine karşı yaygın bir direnç tanımlanmıştır. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında ise ülkeler arası baskın genlerin benzer olduğu açıkça görülmektedir.

Bu çalışmada Amp-C direncinin fenotipik olarak bulunup, genotipik olarak bulunamamasının sebebi kullandığımız farklı primerlerden kaynaklanabileceğini düşündürmektedir.

Solanki vd. (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, geleneksel PCR ve mevcut fenotipik yöntemlerle karşılaştırmalı olarak karbapenem dirençli Gram negatif bakteriler arasında *blaNDM-1* ve *blaKPC* genlerinin tespiti için LAMP testi kullanılmıştır. LAMP testi, geleneksel PCR tarafından kaçırılan dört izolatta *blaNDM-1* ve *blaKPC* genlerinden birini veya her ikisini saptadığı belirtilmiştir. Bu çalışmayla karşılaştırıldığında, fenotipik olarak ve klasik PCR’da belirleyemediğimiz karbapenem direncinin LAMP PCR yoluyla belirlenmiş olmasıdır. LAMP PCR’da 14D ve 24D nolu numunelerimizde karbapenemaz direnci tespit edilmiştir (VIM, IMP, KPC, OXA-48, NDM genlerinin hepsi).

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında kırmızı et kaynaklı *E. coli*’ye karşı yüksek oranda çoklu antibiyotik dirençliliği (%91,6) ile birçok antibiyotiğe karşı artan direnç oranları tespit edilmiştir. EURL-AR’nin protokolüne göre ilk defa kırmızı etlerden izole edilen *E. coli* izolatlarının GSβL, Amp-C ve karbapenemaz aktivitesi incelenmiş ve yüksek oranda (%83,3) GSβL aktivitesi saptanmıştır. Çalışmada GSβL, Amp-C ve karbapenemaz aktivitesi yönünden fenotipik ve genotipik olarak farklı yöntemler kullanılmış; istatistik sonuçlarına göre disk difüzyon testi ile klasik PCR testleri sonuçları arasındaki ilişki anlamlı bulunmuştur. Karbapenemaz aktivitesi yönünden yapılan testlerde LAMP PCR testinin, daha duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Karbapenemaz aktivitesi yönünden tüm genler açısından pozitif tespit edilen bir örnek olması, karbapenemaz aktivitesinin ileri zamanlarda risk teşkil edebileceğini göstermektedir. Genler bazında incelendiğinde ise Türkiyede SHV ve CTX-M1 geninin yaygın olduğu saptanmıştır. Ayrıca TPS’den yapılan 1 günlük ön zenginleştirmeden sonra direnç genlerinin saptanabileceği ve bu nedenle daha kısa sürede direnç genleri yönünden test edilebileceği sonucuna varılmıştır.



Antibiyotik direnç genleri Türkiye’de diğer ülkelere göre daha az oranda olmakla birlikte artan bir eğilim göstermektedir. Ülke olarak antibiyotik dirençliliğinin yayılımını önlemek için gerekli olan tedbirlerin alınması halk sağlığı ve hayvan sağlığı açısından oldukça önem arz etmektedir.



## KAYNAKLAR

- Abdallah, H. M., Al Naiemi, N., Elsohaby, I., Mahmoud, A. F., Salem, G. A., & Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E. (2022). Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacterales in retail sheep meat from Zagazig city, Egypt. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 1-7.
- Adler, M.; Anjum, M.; Andersson, D.I.; Sandegren, L. Combinations of mutations in *envZ*, *ftsI*, *mrda*, *acrB* and *acrR* can cause high-level carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J. Antimicrob. Chemother.* 2016, 71, 1188–1198.
- Aktaş, F. (2004). B Laktam- B Laktamaz İnhibitörü Antibiyotiklerin Klinik Kullanımı (II). Piperasilin- Tazobaktam, Tikarsilin- Klavulanik Asit ve Sefoperazon? Sulbaktam'ın Klinik Kullanımları. *Türkiye Klinikleri J Pharmacol-Special Topics*, 2, 2, 123-127.
- Aktuğlu, Y. 1997. Giriş ve Genel Bilgiler Ed: Aktuğlu Y. *Pratikte Antibiyotik Kullanımı. Sempozyum Dizisi Yayın*, 1: 11-53.
- Amaral, L.; Martins, A.; Spengler, G.; Molnar, J. Efflux pumps of Gram-negative bacteria: What they do, how they do it, with what and how to deal with them. *Front. Pharm.* 2014, 4, 168.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331.
- Ammor M. S, Florez A. B, Mayo B. (2007). Antibiotic Resistance in NonEnterococcal Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Food Microbiology*, 24, 559-570.
- Anderson, R. E., & Boerlin, P. (2020). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in animals and methodologies for their detection. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 84(1), 3-17.
- Anonim 2, Antibiyotik Kullanımı. Enfeksiyon Kontrol Komitesi Yayını, Ankara Gata Basımevi, No.3
- Aslantaş, Ö., Elmacıoğlu, S., & Yılmaz, E. Ş. (2017). Sığırlarda GSBL ve AmpC sentezleyen *Escherichia coli*'nin prevalansı ve karakterizasyonu. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 23(1), 63-67.
- Atlaw, N. A., Keelara, S., Correa, M., Foster, D., Gebreyes, W., Aidara-Kane, A., ..Cray, P. J. F. (2021). Identification of CTX-M Type ESBL *E. coli* from Sheep and Their Abattoir Environment Using Whole-Genome Sequencing. *Pathogens*, 10(11), 1480.
- Aubert D, Poirel L, Chevalier J, Leotard S, Pages JM. (2001). Oxacillinase-mediated resistance to cefepime and susceptibility to ceftazidime in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents Chemother*; 45: 2615-20.

- Bafna, J.A.; Sans-Serramitjana, E.; Acosta-Gutiérrez, S.; Bodrenko, I.V.; Hörömpöli, D.; Berscheid, A.; Brötz-Oesterhelt, H.; Winterhalter, M.; Ceccarelli, M. Kanamycin Uptake into Escherichia coli Is Facilitated by OmpF and OmpC Porin Channels Located in the Outer Membrane. *ACS Infect. Dis.* 2020, 6, 1855–1865.
- Banerjee, S.; Lo, K.; Ojkic, N.; Stephens, R.; Scherer, N.F.; Dinner, A.R. Mechanical feedback promotes bacterial adaptation to antibiotics. *Nat. Phys.* 2021, 17, 403–409.
- Beceiro, A., Tomás, M., & Bou, G. (2013). Antimicrobial resistance and virulence: a successful or deleterious association in the bacterial world?. *Clinical microbiology reviews*, 26(2), 185-230.
- Bergey's manual of systematic bacteriology. (1984) Ørskov F. In N.R. Krieg. and Holt J.G. (eds): vol 1., Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A. 420-423.
- Beta-Lactamase DataBase (BLDB): Structure and Function (2022)- <http://bladb.eu/>
- Bilgehan H. (2000). Escherichia. Prof. Dr. Hakkı Bilgehan, klinik mikrobiyoloji Özel Bakterioloji ve Bakteri Enfeksiyonları, Barış yayınları, 2000, 10. baskı: Sayfa 3-17.
- Blanco, P.; Hernando-Amado, S.; Reales-Calderon, J.A.; Corona, F.; Lira, F.; Alcalde-Rico, M.; Bernardini, A.; Sanchez, M.B.; Martinez, J.L. Bacterial Multidrug Efflux Pumps: Much More Than Antibiotic Resistance Determinants. *Microorganisms* 2016, 4, 14.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.
- Bush K, Jacoby GA. (2010) Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 54: 969–976.
- Bush K. (1998). Metallo- $\beta$ -lactamases: a class apart. *Clin Infect Dis*; Suppl 1: S48-53.
- Bush, K., & Jacoby, G. A. (2010). Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 969-976.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1211-1233.
- Butler Cc, Hillier S, Roberts Z, Dunstan F, Howard A, Palmer S (2006). Antibiotic-resistant infections in primary care are symptomatic for longer and increase workload: outcomes for patients with E.Coli UTIs. *Br J Gen Pract*, 56: 686-92.
- Cantón R, Coque TM. (2006). The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*, 9:466-75.

- Cantón, R.; Novais, A.; Valverde, A.; Machado, E.; Peixe, L.; Baquero, F.; Coque, T.M. Prevalence and spread of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2008, 14, 144–153.
- Cassini, A., Högberg, L. D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G. S., ... & Hopkins, S. (2019). Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *The Lancet infectious diseases*, 19(1), 56-66.
- Castanheira, M., Mendes, R. E., Walsh, T. R., Gales, A. C., & Jones, R. N. (2004). Emergence of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(6), 2344-2345.
- Chain, E.; Florey, H.W.; Gardner, A.D.; Heatley, N.G.; Jennings, M.A.; Orr-Ewing, J.; Sanders, A.G. Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet* 1940, 236, 226–228
- Chambers, F.H., 2001. Goodman LS, Gilman A. Goodman and Gilman's Pharmacological Basis of Therapeutics 10th edition. The McGraw-Hill Company, USA. Antimicrobial Agents. 1143-1169.
- Chevalier, S., Bouffartigues, E., Bodilis, J., Maillot, O., Lesouhaitier, O., Feuilloley, M. G., ... & Cornelis, P. (2017). Structure, function and regulation of *Pseudomonas aeruginosa* porins. *FEMS microbiology reviews*, 41(5), 698-722.
- Clardy J, Fischbach Ma, Currie Cr (2009). The Natural History Of Antibiotics. *Current Biology*, 19 (11): R437-41.
- Clinical and Laboratory Standards Institute,(2022 february) <http://em100.edaptivedocs.net/GetDoc.aspx?doc=CLSI%20M100%20ED32:2022&x ormat=SPDF&src=BB>
- Coşkun S., & Altanlar, N. (2011). Comparison of Antibiotic Resistance Patterns Between AmpC Producers, ESBL Producers, AmpC and ESBL Coproducers of Cefoxitin-insusceptible Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *ANKEM Derg*, 25(4), 244-249.
- 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* 2009; 3: 5-10.
- Dağlar, D., & Öngüt, G. (2012). Genişlemiş Spektrumlu B-Laktamazlar GSBL ve Tanı Yöntemleri. *Annals of Health Sciences Research*, 1(1), 1-9.
- Dallenne C, Costa A, Decre D, Favier C and Arlet G. (2010) Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 490–495.

- Davies Je, Behroozian S (2020). An Ancient Solution To A Modern Problem. *Molecular Microbiology*, 113: 546–549.
- Davis, M. A., Besser, T. E., Orfe, L. H., Baker, K. N., Lanier, A. S., Broschat, S. L., ... & Call, D. R. (2011).
- Day, M.J.; Hopkins, K.L.; Wareham, D.W.; Toleman, M.A.; Elviss, N.; Randall, L.; Teale, C.; Cleary, P.; Wiuff, C.; Doumith, M.; et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* in human-derived and food chain-derived samples from England, Wales, and Scotland: An epidemiological surveillance and typing study. *Lancet Infect. Dis.* 2019, 19, 1325–1335.
- Demby JH, Cunningham FE. (1986) Factors Affecting Composition of Chicken Meat. A Literature Review. *World Poult Sci J.* 36:- 25-67.
- Dho M, Lafont JP. (1984) Adhesive properties and iron uptake abilities in *E. coli* lethal and non-lethal for chicks. *Avian Dis.* 28: 1016-1025.
- Diene S, Rolain JM. (2014). Carbapenemase Genes and Genetic Platforms in Gram-Negative Bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* And *Acinetobacter Species*. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 831-838.
- Drawz, S. M., & Bonomo, R. A. (2010). Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. *Clinical microbiology reviews*, 23(1), 160-201.
- Dsani, E., Afari, E.A., Danso-Appiah, A. et al. Antimicrobial resistance and molecular detection of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* isolates from raw meat in Greater Accra region, Ghana. *BMC Microbiol* 20, 253 (2020)
- DTU Food National Food Institute Isolation of ESBL, ampC and carbapenemase-producing *E. coli* from fresh meat - December 2019 , <https://www.eurl-ar.eu>
- Durand Ga, Raoult D, Dubourg G (2019). Antibiotic Discovery: History, Methods And Perspectives. *International Journal Of Antimicrobial Agents*, 53: 371–382.
- Düzgün, A. Ö., & Saral, A. (2018). Investigation of Antibiotic Resistance Genes and Class 1 Integron in Multi-Drug Resistant *P. aeruginosa* and *E. coli* Strains. *Cumhuriyet Science Journal*.
- EFSA. 2011. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); scientific opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and foodproducing animals. *EFSA J* 9:2322–2417
- Eiamphungporn, W., Schaduangrat, N., Malik, A. A., & Nantasenamat, C. (2018). Tackling the antibiotic resistance caused by class A  $\beta$ -lactamases through the use of  $\beta$ -lactamase inhibitory protein. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8), 2222.

- Erdem B. Enterobacteriaceae. Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi, Temel ve Klinik mikrobiyoloji, Güneş Kitabevi, 1999, 1. baskı: sayfa 471-515.
- EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance External Quality Assurance System (EQAS) 2021. [https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/23-eqas/597\\_protocol-eqas-matrix-bilag4d-2021.pdf](https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/23-eqas/597_protocol-eqas-matrix-bilag4d-2021.pdf)
- EU Reference Laboratory for Antimicrobial Resistance External Quality Assurance System (EQAS) 2021. [https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/23-eqas/597\\_protocol-eqas-matrix-bilag-4d-2021.pdf](https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/23-eqas/597_protocol-eqas-matrix-bilag-4d-2021.pdf)
- EURL-AR. [https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/25-resourcer/361\\_ab-biodisk-conf-of-esbl.pdf](https://www.eurl-ar.eu/CustomerData/Files/Folders/25-resourcer/361_ab-biodisk-conf-of-esbl.pdf). Cefotaxime/cefotaxime + clavulanic acid, Ceftazidime/ceftazidime + clavulanic acid, Cefepime/cefepime + clavulanic acid Guidelines for interpretation of E test ESBL
- European Food Safety Authority, & European Centre for Disease Prevention and Control. (2018). The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA Journal, 16(2), e05182.
- Ewers, C.; Bethe, A.; Semmler, T.; Guenther, S.; Wieler, L.H. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: A global perspective. Clin. Microbiol. Infect. 2012, 18, 646–655.
- Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases and AmpC  $\beta$ -lactamase-Producing Enterobacteriaceae among Human, Cattle, and Poultry. Pathogens, 11(8), 852.
- Fadare, F. T., Adefisoye, M. A., & Okoh, A. I. (2020). Occurrence, identification, and antibiogram signatures of selected Enterobacteriaceae from Tsomo and Tyhume rivers in the Eastern Cape Province, Republic of South Africa. Plos one, 15(12), e0238084.
- Falagas, M. E., Mavroudis, A. D., & Vardakas, K. Z. (2016). The antibiotic pipeline for multi-drug resistant gram negative bacteria: what can we expect?. Expert review of anti-infective therapy, 14(8), 747-763.
- Fischer J, San José M, Roschanski N, Schmoger S, Baumann B, Irrgang A, Friese A, Roesler U, Helmuth R, Guerra B. 2017. Spread and persistence of VIM-1 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in three German swine farms in 2011 and 2012. Vet Microbiol 200:118–123
- Fischer, J., Rodríguez, I., Schmoger, S., Friese, A., Roesler, U., Helmuth, R., & Guerra, B. (2012). *Escherichia coli* producing VIM-1 carbapenemase isolated on a pig farm. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67(7), 1793-1795.

- Fleming, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae. 1929. Bull. World Health Organ. 2001, 79, 780–790.
- Gangle, B. J. (2005). Sources and occurrence of antibiotic resistance in the environment. University of Maryland, College Park.
- Gauthier, L., Dortet, L., Cotellon, G., Creton, E., Cuzon, G., Ponties, V., ... & Naas, T. (2018). Diversity of carbapenemase-producing Escherichia coli isolates in France in 2012-2013. Antimicrobial agents and chemotherapy, 62(8), e00266-18.
- Genotypic-phenotypic discrepancies between antibiotic resistance characteristics of Escherichia coli isolates from calves in management settings with high and low antibiotic use. Applied and environmental microbiology, 77(10), 3293-3299.
- Ghafourian, S.; Sadeghifard, N.; Soheili, S.; Sekawi, Z. Extended Spectrum B-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. Curr. Issues Mol. Biol. 2015, 17, 11–21.
- Giedraitienė, A., Vitkauskienė, A., Naginienė, R., & Pavilionis, A. (2011). Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. Medicina, 47(3), 19.
- Gorman, M., & Morin, R. B. (Eds.). (1982). Chemistry and Biology of-lactam Antibiotics. Academic Press
- Görgeç S. (2012). Genişlemiş Spektrumlu B-Laktamaz Üreten Nozokomiyal Escherichia Coli İzolatlarında B-Laktamaz Genleri Ve Klonal İlişkinin Araştırılması. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi.
- Guerra B, Fischer J, Helmuth R. 2014. An emerging public health problem: acquired carbapenemase-producing microorganisms are present in food-producing animals, their environment, companion animals and wild birds. Vet Microbiol 171:290–297.
- Gülay, Z., 2003, Hücre duvar sentezini etkileyen antibakteriyeller, Ankem Dergisi, 17 (3), 192-204.
- Güler Ö, Aktaş O, Uslu H. (2008). Klinik örneklerden izole edilen bakterilerde  $\beta$ -laktamaz varlığının ve çeşitli antibiyotik gruplarına karşı duyarlılıklarının araştırılması. Ankem Derg. 22:72-80.
- Gür D. Hastane enfeksiyonlarında önem kazanan gram olumsuz bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane İnfeksiyonları Dergisi 1997; 1: 38-45.
- Gür D. B-laktamazlar. Hacettepe Tıp Dergisi 2002; 33: 102-109.
- Gür, D., 2002a, B-laktamazlar, Hacettepe Tıp Dergisi 33, 102-109.

- Gyles CL. (2008). Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim Health Res Rev.* 9: 149-58.
- Halkman AK, Noveir MR, Doğan HB. *Escherichia coli* O157:H7 serotipi. *Orkim Ltd şti.* Ankara; 2- 3
- Harada K, Asai T. (2010). Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. *J Biomed Biotechnol*; doi:10.1155/2010/180682.
- Helfand, M. S., & Bonomo, R. A. (2005). Current challenges in antimicrobial chemotherapy: the impact of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and metallo- $\beta$ -lactamases on the treatment of resistant Gram-negative pathogens. *Current opinion in pharmacology*, 5(5), 452-458.
- Hendriksen RS, Mevius DJ, Schroeter A, Teale C, Meunier D, Butaye P, Franco A, Utinane A, Amado A, Moreno M, Greko C, Stärk K, Berghold C, Myllyniemi AL, Wasyl D, Sunde M, Aarestrup FM. (2008). Prevalence of antimicrobial resistance among bacterial pathogens isolated from cattle in different European countries: 2002-2004. *Acta Vet Scand*; 50: 28.
- Høiby, N.; Bjarnsholt, T.; Givskov, M.; Molin, S.; Ciofu, O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010, 35, 322–332.
- Huang DB, Mohanty A, Dupont HL, Okhuysen PC, Chiang T. (2006) A review of an emerging enteric pathogen: enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol*; 55: 1303-1311.
- Huang, Z. M., Mao, P. H., Chen, Y., Wu, L., & Wu, J. (2004). Study on the molecular epidemiology of SHV type  $\beta$ -lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Zhonghua liu xing bing xue za zhi= Zhonghua liuxingbingxue zazhi*, 25(5), 425-427.
- Hutchings M<sub>1</sub>, Truman Aw, Wilkinson B (2019). Antibiotics: Past, Present And Future. *Current Opinion In Microbiology*, 51:72–80.
- Jacoby GA (2020). Amp-c  $\beta$  Laktamases. *American Society for Microbiology Journals Clinical Microbiology Reviews* Vol:22 No:1.
- Jann K, Jann BJ. (1977) Capsules of *Escherichia coli*, p.113-143. In: Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*. Cambridge University Press, Cambridge, UK
- Jehl, F., Chomarar, M., Weber, M., Gérard, A., & Livermore, D. (2004). From antibiogram to prescription. Ed. Biomérieux.
- Jensen L.B, Hammerum A.M, Poulsen R.L, Westh H. (1999). Vancomycinresistant *Enterococcus faecium* strains with highly similar pulsed field gel electrophoresis patterns containing similar Tn-1546-like elements isolated from a hospitalized patient and pigs in Denmark. *Antimicrob Agents Chemother*, 43:724-729.



- Jong A, Stephan B, Silley P. (2011). Fluoroquinolone resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* from healthy livestock and poultry in the EU. *J Appl Microbiol*; 112: 239-45.
- Karaaslan A, Soysal A. (2017) Karbapenemazlar. *Journal of Pediatric Infection (Review)* 2017; 11: 23-28.
- Kauffmann F, Vahlne G. (1945) Ueber die Bedeutung des serologischen Formenwechsels fMr die Bakteriophagenwirkung in der Coli-Gruppe. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 22: 119-137.
- Knothe, H., Shah, P., Krcmery, V., Antal, M., & Mitsuhashi, S. (1983). Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11(6), 315-317.
- Köck R, Daniels-Haardt I, Becker K, Mellmann A, Friedrich AW, Mevius D, Schwarz S, Jurke A. 2018. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in wildlife, food-producing, and companion animals: a systematic review. *Clin Microbiol Infect.* Epub ahead of print. doi:10.1016 /j.cmi.2018.04.004.
- Krumperman, P. H., 1983, Multiple Antibiotic Resistance Indexing of *Escherichia coli* to Identify High-risk Sources of Fecal Contamination of Foods, *Applied and Environmental Microbiology*, 46 (1), 165-170
- Lahiri, S., Venkataraman, R., Jagan, A., Deshmukh, G., Patra, S., Reddy, V., ... & Rangarajan, R. (2019). Evaluation of LAMP-based assays for carbapenemase genes. *Journal of Medical Microbiology*, 68(10), 1431-1437.
- Lee, A.S.; de Lencastre, H.; Garau, J.; Kluytmans, J.; Malhotra-Kumar, S.; Peschel, A.; Harbarth, S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat. Reviews. Dis. Primers* 2018, 4, 18033.
- Li, J., Bi, Z., Ma, S., Chen, B., Cai, C., He, J., ... & Wang, Y. (2019). Inter-host transmission of carbapenemase-producing *Escherichia coli* among humans and backyard animals. *Environmental health perspectives*, 127(10), 107009.
- Liu, Y.Y.; Wang, Y.; Walsh, T.R.; Yi, L.X.; Zhang, R.; Spencer, J.; Doi, Y.; Tian, G.; Dong, B.; Huang, X.; et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *Lancet. Infect. Dis.* 2016, 16, 161–168.
- Livermore DM, Woodford N. The  $\beta$ -lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *TRENDS in Microbiology* 2006; 14 (9): 413-420.
- Livermore, D. M. (1995).  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical microbiology reviews*, 8(4), 557-584.
- Livermore, D. M. (1998). B-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 41(suppl\_4), 25-41.

- Logan, L. K., & Weinstein, R. A. (2017). The epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the impact and evolution of a global menace. *The Journal of infectious diseases*, 215(suppl\_1), S28-S36.
- Mahmood, F. R. R., & Ahmed, I. M. (2022). Molecular detection of ESBL/AmpC  $\beta$ -Lactamase *Escherichia coli* isolated from sheep in Mosul city. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 36(2), 387-392.
- Maiden, M. C. (1998). Horizontal genetic exchange, evolution, and spread of antibiotic resistance in bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 27(Supplement\_1), S12-S20.
- Martinez-Martinez, L., Hernández-Allés, S., Albertí, S., Tomás, J. M., Benedi, V. J., Jacoby, G. A. (1996). In vivo selection of porin-deficient mutants of *Klebsiella pneumoniae* with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(2), 342-348.
- Mathers A, Peirano G, Pitout J. (2015) The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International High-Risk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3).
- Mathur, S., & Singh, R. (2005). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of food microbiology*, 105(3), 281-295.
- McHugh, M. L. (2012). Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochemia medica*, 22(3), 276-282.
- Medeiros A. Evolution and dissemination of  $\beta$ -lactamases accelerated by generations of  $\beta$ -lactam antibiotics. *Clin Infect Dis* 1997; 24: 19-45.
- Mee, M.T.; Collins, J.J.; Church, G.M.; Wang, H.H. Syntrophic exchange in synthetic microbial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014, 111, E2149–E2156.
- Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. (2012) Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol*; 7: 887–902.
- Miyachiro, M. M., Contreras-Martel, C., & Dessen, A. (2019). Penicillin-binding proteins (PBPs) and bacterial cell wall elongation complexes. *Macromolecular Protein Complexes II: Structure and Function*, 273-289.
- Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C. (2007) Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3366-3376
- Moya-Torres, A., Mulvey, M. R., Kumar, A., Oresnik, I. J., & Brassinga, A. K. C. (2014). The lack of OmpF, but not OmpC, contributes to increased antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. *Microbiology*, 160(9), 1882-1892.

- Mughini-Gras, L.; Dorado-García, A.; van Duijkeren, E.; van den Bunt, G.; Dierikx, C.M.; Bonten, M.J.M.; Bootsma, M.C.J.; Schmitt, H.; Hald, T.; Evers, E.G.; et al. Attributable sources of community-acquired carriage of *Escherichia coli* containing  $\beta$ -lactam antibiotic resistance genes: A population-based modelling study. *Lancet Planet Health* 2019, 3, e357–e369
- Naas T, Poirel L, Nordmann P. (2008). Minor extended spectrum  $\beta$ lactamases. *Clin Microbiol infect*; 14(S1): 4
- Nadeem, S. F., Gohar, U. F., Tahir, S. F., Mukhtar, H., Pornpukdeewattana, S., Nukthamna, P., ... & Massa, S. (2020). Antimicrobial resistance: more than 70 years of war between humans and bacteria. *Critical Reviews in Microbiology*, 46(5), 578-599.
- Nagy B, Fekete PZ. (2005) Enterotoxigenic *Escherichia coli* in veterinary medicine. *Int J Med Microbiol*; 295(6- 7):443-54.
- Nataro JP, Kaper JB, Robins BR, Prado V, Levine MM. (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells, *Pediatric Infection Diseases Journal* 6: 829-831.
- Nataro JP, Kaper JB. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*; 11:142-201.
- Nikaido, H. (2003). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 593-656.
- Njage, P. M., & Buys, E. M. (2015). Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC  $\beta$ - lactamases determinants to isolates from lettuce. *Microbial Biotechnology*, 8(3), 462-473.
- Nordman P, Ronco E, Naas T, Duport C, Michel- Briand Y, Labia R. (1993). Characterization of a novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*; 37: 962–9.
- Nordmann P, Ronco E, Naas T, et al. Characterization of a novel extended- spectrum  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 962-9.
- Nossair, M. A., Abd El Baqy, F. A., Rizk, M. S., Elaadli, H., Mansour, A. M., El-Aziz, A. H. A., ... & Shaaban, S. I. (2022). Prevalence and Molecular Characterization of
- Omerovic M, Müştak K, Kaya İ. (2017) *Escherichia coli* Patotiplerinin Virülens Faktörleri. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, 28 (1): 1-6.
- O'Neill, J. (2016). Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.

- Orazi, G.; O'Toole, G.A. *Pseudomonas aeruginosa* Alters *Staphylococcus aureus* Sensitivity to Vancomycin in a Biofilm Model of Cystic Fibrosis Infection. *mBio* 2017, 8, e00873-17.
- Öndeş, N. (2015). Kırmızı Et Örneklerinden Genişlemiş Spektrumlu B Laktamaz (Gsbl) Üreten Enterobacteriaceae İzolatlarında Antibiyotik Dirençlilik Durumlarının İncelenmesi (Doctoral Dissertation, İSTANBUL AYDIN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ).
- Örnek G., 2013. Atların Dışkılarından İzole Edilen *Escherichia coli* İzolatlarında Antimikrobiyal Direnç ve Genişlemiş Spektrumlu B Laktamaz Üretiminin Fenotipik Olarak Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Palmieri B, Di Cerbo A, Laurino C. Antibiotic treatments in zootechnology and effects induced on the food chain of domestic species and, comparatively, the human specie. *Nutr Hosp.* 2014;29(6):1427–33.
- Papp-Wallace, K. M., Bethel, C. R., Distler, A. M., Kasuboski, C., Taracila, M., & Bonomo, R. A. (2010). Inhibitor resistance in the KPC-2  $\beta$ -lactamase, a preeminent property of this class A  $\beta$ -lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(2), 890-897.
- Parida, M., Sannarangaiah, S., Dash, P. K., Rao, P. V. L., & Morita, K. (2008). Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology*, 18(6), 407-421.
- Parreira VR, Gyles CL. (2003) A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect. Immun.* 64:3118-3126.
- Paterson DL, Bonomo RA. (2005) Extended spectrum  $\beta$ -lactamases: A clinical update, *Clin Microbial Rev*18(4):657-86.
- Paterson, D. L., Hujer, K. M., Hujer, A. M., Yeiser, B., Bonomo, M. D., Rice, L. B.,... & International Klebsiella Study Group. (2003). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(11), 3554-3560.
- Pehlivanlar Önen, S., Aslantaş, Ö., Şebnem Yılmaz, E., & Kürekci, C. (2015). Prevalence of  $\beta$ -lactamase producing *Escherichia coli* from retail meat in Turkey. *Journal of food science*, 80(9), M2023-M2029.
- Pehlivanoglu, F., Turutoglu, H., Ozturk, D., & Yardimci, H. (2016). Molecular characterization of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cattle and sheep. *Acta Veterinaria*, 66(4), 520-533.
- Pehlivanoglu, F. (2019) Gram Negatif Bakterilerin B-Laktamaz Enzim Çeğitliliği ve Türkiye'deki Hayvan Orjinli Bakterilerdeki Durum. *F.Ü. Sağ. Bil. Vet. Derg.*, 33(2), 113-122.

- Perry, J.; Waglechner, N.; Wright, G. The prehistory of antibiotic resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2016, 6, a025197.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 11 (4): 589-603.
- Poirel L, Heritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 15-22.
- Poirel L, Madec J-Y, Lupo A, Schink A-K, Kieffer N, Nordmann P, and Schwarz S. 2018. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiol Spectrum* 6(4): ARBA-0026-2017. doi: 10.1128/microbiolspec. ARBA -0026-2017
- Poirel, L., Lebessi, E., Castro, M., Fèvre, C., Foustoukou, M., & Nordmann, P. (2004). Nosocomial outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 48(6), 2277-2279.
- Poiril L, Naas T, Guibert M, Chaibi B, Labia R, Nordmann P. (1999). Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended spectrum  $\beta$ -lactamase encoded by an *E. coli* integron gene. *Antimicrob Agents Chemother*; 43: 573-81.
- Qi C, Pilla V, Yu J, Reed K. (2010). Changing Prevalence Of *Escherichia Coli* With Ctx-M-Type Extended-Spectrum B-Lactamases in Outpatient Urinary *E. Coli* Between 2003 And 2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 67, 87-91.
- Rajaei, M., Moosavy, M. H., Gharajalar, S. N., & Khatibi, S. A. (2021). Antibiotic resistance in the pathogenic foodborne bacteria isolated from raw kebab and hamburger: phenotypic and genotypic study. *BMC microbiology*, 21(1), 1-16.
- Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M. D. L. E., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). *Escherichia coli* as commensal and pathogenic bacteria among food-producing animals: Health implications of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) production. *Animals*, 10(12), 2239.
- Rasmussen BA, Bush K. (1997) Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*;41: 223-32.
- Rasmussen BA, Bush K. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41: 223-32. doi: 10.1128/AAC.41.2.223.
- Rupp, M. E., & Fey, P. D. (2003). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*. *Drugs*, 63(4), 353-365.
- Saat, T. (2017). Amasya'da tüketime sunulan kıyma örneklerinden izole edilen *Enterobacteriaceae* üyelerinde B-laktamaz aktivitelerinin belirlenmesi (Master's thesis, Amasya Üniversitesi).

- Sawa, T.; Kooguchi, K.; Moriyama, K. Molecular diversity of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and carbapenemases, and antimicrobial resistance. *J. Intensive Care* 2020, 8, 13.
- Schmid, A., Hörmansdorfer, S., Messelhäusser, U., Käsbohrer, A., Sauter-Louis, C., Mansfeld, R. (2013). Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Applied and environmental microbiology*, 79(9), 3027-3032.
- Schwaber, M.J.; Carmeli, Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: A systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* 2007, 60, 913–920.
- Sepp, E., Andreson, R., Balode, A., Bilozor, A., Brauer, A., Egorova, S., ... & Naaber, (2019). Phenotypic and molecular epidemiology of ESBL-, AmpC-, and carbapenemase-producing *Escherichia coli* in Northern and Eastern Europe. *Frontiers in microbiology*, 10, 2465.
- Shah AA, Hasan F, Ahmed S, Hameed A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of gram negative bacilli producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Research in Microbiology* 2004; 155(6): 409-421.
- Sharkey, L. K., Edwards, T. A., & O'Neill, A. J. (2016). ABC-F proteins mediate antibiotic resistance through ribosomal protection. *MBio*, 7(2), e01975-15.
- Shin SW, Shin MK, Jung M, Belaynehe KM, Yoo HS. Prevalence of antimicrobial resistance and transfer of tetracycline resistance genes in *Escherichia coli* isolates from beef cattle. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81(16):5560–6.
- Silva, N.; Carvalho, I.; Currie, C.; Sousa, M.; Igrejas, G.; Poeta, P. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in food-producing animals in Europe. *Antibiot. Drug Resist.* 2019, 12, 261–273.
- Sköld, O. Aminoglycosides. In *Antibiotics and Antibiotic Resistance*; John Wiley & Sons: Hoboken, NJ, USA, 2011; Volume 6, pp. 103–113.
- Smith, M., Do, T. N., Gibson, J. S., Jordan, D., Cobbold, R. N., & Trott, D. J. (2014). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and genotypes in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Australian and Vietnamese pigs. *Journal of global antimicrobial resistance*, 2(3), 162-167.
- Solanki, R., Vanjari, L., Ede, N., Gungi, A., Soory, A., & Vemu, L. (2013). Evaluation of LAMP assay using phenotypic tests and conventional PCR for detection of blaNDM-1 and blaKPC genes among carbapenem-resistant clinical Gram-negative isolates. *Journal of medical microbiology*, 62(10), 1540-1544.
- Su, W., Kumar, V., Ding, Y., Ero, R., Serra, A., Lee, B. S. T., ... & Gao, Y. G. (2018). Ribosome protection by antibiotic resistance ATP-binding cassette protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(20), 5157-5162.

- Tekiner İ.H., 2016. Gıdalardan İzole Edilen Enterobacteriaceae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu B-Laktamazların Moleküler Yöntemle Araştırılması. Doktora Tezi. İstanbul Aydın Üniversitesi, Türkiye.
- Tello, M., Oejo, M., Oporto, B., & Hurtado, A. (2020). Prevalence of cefotaxime-resistant *Escherichia coli* isolates from healthy cattle and sheep in northern Spain: phenotypic and genome-based characterization of antimicrobial susceptibility. *Applied and environmental microbiology*, 86(15), e00742-20.
- Tham J. (2012). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing enterobacteriaceae: epidemiology, risk factors, and duration of carriage. Sweden: Department of Clinical Sciences/Malmö Infectious Disease Research Unit/Lund University; Available from: <http://lup.lub.lu.se/luur/download?func=downloadFile&recordOid=3045564&fileOid=3045665> Erişim tarihi: 10.04.2015
- Theuretzbacher, U., Gottwalt, S., Beyer, P., Butler, M., Czuplewski, L., Lienhardt, C.,... & Harbarth, S. (2019). Analysis of the clinical antibacterial and antituberculosis pipeline. *The Lancet Infectious Diseases*, 19(2), e40-e50.
- Thomson KS. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. (2010) *J Clin Microbiol*. 48: 1019–1025.
- Tooke, C.L.; Hinchliffe, P.; Bragginton, E.C.; Colenso, C.K.; Hirvonen, V.H.A.; Takebayashi, Y.; Spencer, J.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -Lactamase Inhibitors in the 21st Century. *J. Mol. Biol.* 2019, 431, 3472–3500.
- Töreci K, Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M. *Escherichia* türleri. Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitabevleri, 2002; cilt 2, ss 1564-1574.
- Trongjit S, Angkittitrakul S, Chuanchuen R. Occurrence and molecular characteristics of antimicrobial resistance of *Escherichia coli* from broilers, pigs and meat products in Thailand and Cambodia provinces. *Microbiol Immunol*. 2016;60(9):575–85.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS) 2015. Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Cilt 1,2, 3 Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., ... & Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649-5654
- Vandekerchove D. (2014) Colibacillosis in BatteryCaged Layer Hens: Clinical and Bacteriological Characteristics, and Risk Factor Analysis. University of Gante. [http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/000/826/734/RUG01000826734\\_2010\\_0001\\_AC.pdf](http://lib.ugent.be/fulltxt/RUG01/000/826/734/RUG01000826734_2010_0001_AC.pdf).
- Vanessa S, Carlyn JH. (2015) Enterohemorrhagic *E. coli* and Other *Shiga Toxin* – Producing *E. coli*, p.23.
- Vega, N.M.; Gore, J. Collective antibiotic resistance: Mechanisms and implications. *Curr. Opin. Microbiol*. 2014, 21, 28–34.

- Walther-Rasmussen, J., & Høiby, N. (2006). OXA-type carbapenemases. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 57(3), 373-383.
- Wardhana, D. K., Safitri, D. A., Annisa, S., Harijani, N., Estoepangestie, A. T. S., & Maghfiroh, L. (2021). Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in producing *Escherichia coli* in beef sold in traditional markets in Surabaya, Indonesia. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 22(5).
- Wasteson Y. (2001) Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Vet Scand.* 95: 79-84.
- WHO (2015). Global Action Plan On Antimicrobial Resistance, World Health Organization, WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.
- Who Publishes List Of Bacteria for Which New Antibiotics Are Urgently Needed. *Saudi Med. J.* 2017, 38, 444–445.
- Woodford N, Wareham DW, Guerra B, Teale C. 2014. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: an emerging public health risk of our own making? *J Antimicrob Chemother* 69:287–291.
- Yetkin G, Kuzucu Ç, Çalışkan A, Ay S. (2006). Kan kültürlerinde üreyen *Escherichia coli*' lerin antibiyotik duyarlılıkları, GSBL oranları ve hastane birimlerine göre dağılımı. *İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*; 13: 147-150.
- Yıldırım, D., & Pehlivanoğlu, F. Buzağuların Genişlemiş Spektrumlu B Laktamaz Üreten *Escherichia coli* Taşıyıcılığı.
- Yong, D.; Toleman, M.A.; Giske, C.G.; Cho, H.S.; Sundman, K.; Lee, K.; Walsh, T.R. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, bla (NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53, 5046–5054.
- Zampieri, M. The genetic underground of antibiotic resistance. *Science* 2021, 371, 783–784.
- Zanella A. (2007). Poultry Disease Manual Characteristics and Control of Infections. *FATRO.* 56-57.
- Zhang, F., & Cheng, W. (2022). The Mechanism of Bacterial Resistance and Potential Bacteriostatic Strategies. *Antibiotics*, 11(9), 1215.
- Zhang, Y. L., Huang, F. Y., Gan, L. L., Yu, X., Cai, D. J., Fang, J., ... & Zuo, Z. C. (2021). High prevalence of blaCTX-M and blaSHV among ESBL producing *E. coli* isolates from beef cattle in China's Sichuan-Chongqing Circle. *Scientific reports*, 11(1), 1-9.
- Ziervogel, B.K.; Roux, B. The Binding of Antibiotics in OmpF Porin. *Structure* 2013, 21, 76–87. WHO. (2013): Integrated surveillance of antimicrobial resistance: guidance from a WHO Advisory Group. ISBN 978 92 4 150631 1, Switzerland.





## ÖZGEÇMİŞ

Adı – Soyadı

Doğum Tarihi

Yabancı Dil

Eğitim Durumu

Çalıştığı Kurum ve Kurumlar

Yayımları