



**T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**İSTANBUL'DAN ELDE EDİLEN TAVUK YUMURTALARINDA Escherichia coli
VARLIĞI ile GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ POZİTİF E. coli
SUŞLARI ve KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI**

Ali Anıl SÜLEYMANOĞLU

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Harun AKSU**

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI PROGRAMI

Haziran, 2023

TEZ KABUL VE ONAYI

Ali Anıl SÜLEYMANOĞLU tarafından, Prof. Dr. Harun AKSU danışmanlığında hazırlanan " İSTANBUL'DAN ELDE EDİLEN TAVUK YUMURTALARINDA ESCHERİCHİA COLİ VARLIĞI ile GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ POZİTİF E. COLİ SUŞLARI ve KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI" başlıklı bu çalışma, jürimiz tarafından 26/07/2023 tarihinde yapılan sınav sonucunda oy birliği ile başarılı bulunarak **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

	İmza	Sonuç
DANIŞMAN	Prof. Dr. Harun AKSU	☒ Kabul
	İstanbul Üniversitesi- Cerrahpaşa, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Prof. Dr. Ali AYDIN	☒ Kabul
	İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı	☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Ghassan İSSA	☒ Kabul
	Kocaeli Sağlık ve Teknoloji Üniversitesi, Tıbbi Laboratuvar Teknikleri Bölümü	☐ Ret
ÜYE	Doç. Dr. Dilek DÜLGER ALTINER	☒ Kabul
	Kocaeli Üniversitesi Turizm Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü	☐ Ret
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Zeki ÖZDEMİR	☒ Kabul
	İstanbul Arel Üniversitesi, Güzel Sanatlar Fakültesi, Gastronomi ve Mutfak Sanatları Bölümü	☐ Ret





Kıymetli aileme ithaf ediyorum.

BÜTÇE DESTEKLERİ

Bu tez çalışması için herhangi bir kurumdan bütçe desteği alınmamıştır.



TEŞEKKÜR

Her daim yanımda olan ve her türlü desteklerini benden esirgemeyen, emeklerini ödeyemeceğim, çok kıymetli, sevgili annem ve babam; Uğur SÜLEYMANOĞLU ve Mahir Kemal SÜLEYMANOĞLU'na canı gönülden sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her aşamasında yardımcı olan, desteklerini esirgemeyen saygıdeğer danışmanım Prof. Dr. Harun AKSU'ya ve tez aşamamdaki her türlü problemi aşmamda yardımcı olan, teşviklerini ve sabrını içtenlikle eksik etmeyen saygıdeğer Prof. Dr. Ali AYDIN'a teşekkürlerimi sunar; verdiği fikirler ile beni aydınlatan, tecrübelerini paylaşan kıymetli Uzman Mert SUDAĞIDAN' a teşekkür ederim.

Tez sürecinde beraber çalıştığım, birçok problemi beraber aştığımız doktora arkadaşım Veteriner Hekim Zhanylbubu MAMATOVA'ya, kıymetli arkadaşım Veteriner Hekim Oğuzhan BAYGÜL'e ve yardımlarını esirgemeyen Veteriner Hekim Sezer ÖZKAN'a çok teşekkür ederim.

Kars, Akyaka İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğündeki çalışma arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Haziran 2023

Ali Anıl SÜLEYMANOĞLU

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

TEZ KABUL VE ONAYI.....	ii
BEYAN.....	iv
BÜTÇE DESTEKLERİ.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
TABLO LİSTESİ.....	xiv
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	xv
ÖZET.....	xvii
ABSTRACT.....	xix
1. GİRİŞ.....	1
2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE.....	4
2.1. Yumurta.....	4
2.2. Yumurtanın Besin Değerleri.....	4
2.3. Yumurtadaki Proteinler.....	5
2.3.1. Yumurta Sarısındaki Protein Çeşitleri.....	5
2.3.1.1. Livetinler.....	5
2.3.1.2. Fosvitin.....	5
2.3.1.3. Yüksek Dansiteli Lipoprotein.....	6
2.3.1.4. Lipovitelleninler.....	6
2.3.2. Yumurta Beyazındaki Protein Çeşitleri.....	6
2.3.2.1. Ovalbümin.....	6
2.3.2.2. Ovotransferin.....	6
2.3.2.3. Lizozim.....	7
2.3.2.4. Ovomusin.....	7
2.3.2.5. Sistatin.....	7
2.3.2.6. Ovomukoid ve Ovoinhibitör.....	7
2.3.2.7. Avidin.....	7
2.4. Yumurtadaki Lipidler.....	8
2.4.1. Yağ Asitleri.....	8
2.4.2. Kolesterol.....	8

2.4.3. Fosfolipidler.....	9
2.5. Yumurtada Vitamin ve Mineraller.....	9
2.6. Türkiye'de Yumurta Üretimi.....	9
2.7. Yumurta ve Mikroorganizma Kontaminasyonu.....	10
2.8. Yumurta Kabuğu ve Bakteri Penetrasyonu.....	11
2.9. Türkiye'de Yumurta ile İlgili Yasal Mevzuat.....	11
2.10. Türkiye'de Yumurta Ürünleri Mikrobiyolojik Kriterler.....	12
2.11. <i>Escherichia coli</i>	12
2.11.1. <i>E. coli</i> Virulansı.....	14
2.11.2. Salgılanan Virulans Faktörler.....	14
2.11.3. Yüzey Virulans Faktörler (Adezin).....	15
2.11.4. Patojenik <i>E. coli</i> Türleri.....	16
2.11.4.1. Enterotoksijenik <i>E. coli</i>	16
2.11.4.2. Enteropatojenik <i>E. coli</i>	17
2.11.4.3. Enteroinvaziv <i>E. coli</i>	17
2.11.4.4. Enterohemorajik <i>E. coli</i>	17
2.11.4.5. Enteroaggregatif <i>E. coli</i>	18
2.11.4.6. Diffüz Adherent <i>E. coli</i>	18
2.11.5. <i>E. coli</i> Kaynaklı Enfeksiyon Semptomları.....	20
2.11.6. Yumurta ve <i>E. coli</i>	20
2.12. Antibiyotik Direnci.....	21
2.12.1. Gıdalarda Antibiyotik Direnci.....	22
2.12.2. <i>E. coli</i> 'de Antibiyotik Direnci.....	24
2.12.3. Bakteri Hücre Duvarı.....	25
2.13. Beta Laktam Grubu Antibiyotikler.....	25
2.13.1. Penamlar.....	27
2.13.2. Sefemler.....	27
2.13.3. Karbapenemler.....	28
2.13.4. Monobaktamlar.....	28
2.13.5. Beta Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç ve Genişlemiş Spektrumlu β laktamazlar.....	28
2.13.5.1. Beta Laktamaz.....	29
2.13.5.2. Ambler Sınıflandırma.....	30
2.13.5.3. Fonksiyonel β Laktamaz Sınıflandırması.....	31
2.13.5.4. Plazmid ve β Laktamazlar.....	32
2.14. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz.....	33
2.14.1. TEM Grubu.....	33
2.14.2. SHV Grubu.....	34
2.14.3. CTX-M Grubu.....	34
2.14.4. OXA Grubu.....	35
2.14.5. Diğer Beta Laktamazlar.....	35
2.15. <i>Enterobacteriales</i> 'de GSBL Tanı ve Teşhis Yöntemleri.....	36
2.15.1. <i>E. coli</i> 'de GSBL Tarama Yöntemleri.....	36

2.15.2. GSBL Doğrulama Yöntemleri.....	37
2.16. GSBL Fenotipik Doğrulama.....	37
2.16.1. Çift Disk Sinerji Yöntemi.....	37
2.16.2. Kombine Disk Difüzyon Testi.....	37
2.16.3. Gradyent Test.....	37
2.16.4. Broth Mikrodilüsyon.....	38
2.17. Genetik Doğrulama.....	38
2.18. Kümes ve Yumurtalarda GSBL Üreten <i>E. coli</i> Varlığı.....	38
2.19. Kolistin.....	40
2.19.1 Kolistinin Kimyasal Özellikleri.....	40
2.19.2. Kolistinin Etki Mekanizması.....	41
2.20. <i>E. coli</i> 'de Kolistin Direnci.....	42
2.20.1. Kromazomal Direnç Gelişimi.....	42
2.20.2. Plazmid Aracılı Direnç.....	42
2.20.3. Kolistine Karşı Heterodirenç.....	44
2.21. Kolistin Direnci Saptama Yöntemleri.....	44
2.21.1. Disk Diffüzyon.....	44
2.21.2. Gradyent Test.....	44
2.21.3. Agar Dilüsyon.....	44
2.21.4. Sıvı Mikrodilüsyon.....	45
2.21.5. Disk Elüsyon Yöntemi.....	45
2.21.6. Kolistin Agar.....	45
2.21.7. Otomatize Sistemler.....	45
2.21.8. MALDI-TOF.....	45
2.21.9. Moleküler Genetik Analizler.....	45
2.22. Yumurta ve Tavuklardan Elde Edilen <i>E. coli</i> Suşlarında Kolistin Direnci.....	46
3. YÖNTEM.....	48
3.1. Gereç.....	48
3.1.1. Tavuk Yumurtası Örnekleri.....	48
3.1.2. Kalite Kontrol Suşları.....	48
3.1.3. Analiz için Laboratuvarda Kullanılan Ekipmanlar ve Aletler.....	48
3.1.4. Analizlerde Kullanılan Besiyerleri.....	49
3.2. Yöntem.....	52
3.2.1. <i>E. coli</i> İzolasyonu.....	52
3.2.2. EMB Agarda <i>E. coli</i> Doğrulama.....	53
3.2.3. Saflaştırma ve Stoklama.....	54
3.2.4. DNA Ekstraksiyonu.....	54
3.2.5. Polimer Zincir Reaksiyonu.....	57
3.2.6. 16S rRNA (<i>E. coli</i> spesifik) Varlığının Araştırılması.....	57
3.2.7. gyrB gen (<i>E. coli</i> spesifik) Varlığının Araştırılması	60
3.2.8. GSBL Gen Varlığının Araştırılması.....	61
3.2.9. MCR 1-5 Gen Varlığının Araştırılması.....	63
3.2.10. Antibiyotik Duyarlılık Testleri.....	65

3.2.11. GSBL Fenotipik Doğrulama Testi.....	68
3.2.12. Fenotipik Kolistin Direncinin Saptanması.....	69
4. BULGULAR.....	70
4.1. <i>E. coli</i> İzolatlarının Toplanması.....	70
4.2. Yumurtada Elde Edilen <i>E. coli</i> İzolat Sayıları.....	70
4.3. <i>E. coli</i> izolatlarında Disk Diffüzyon Yöntemi ile Antibiyotik Duyarlılık Sonuçları.....	72
4.4. Çift Disk Sinerji Testi.....	75
4.5. Kolistin Agar ile Kolistin Direncinin Belirlenmesi.....	75
4.6. DNA Ekstraksiyon Kalitesi.....	76
4.7. Multipleks PZR ile GSBL Gen Varlığının İncelenmesi.....	77
4.8. Multipleks PZR ile Kolistin Direnç Gen Varlığının Araştırılması.....	77
5. TARTIŞMA.....	78
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	84
KAYNAKLAR.....	86
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI.....	122
ETİK KURUL İZİN YAZISI.....	123
KURUM İZNİ YAZILARI.....	124
ÖZGEÇMİŞ.....	125

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa No

Şekil 1: Yumurtanın yapısı	12
Şekil 2: Peptodoglikan yapısı.....	25
Şekil 3: β laktam molekül yapısı.....	26
Şekil 4: β laktam grubu antibiyotiklerin yapısı.....	26
Şekil 5: Beta laktamazlar ile antibiyotikler arasında etkileşim.....	30
Şekil 6: CTX-M tipi beta laktamaz grubu.....	35
Şekil 7: GSBL üreten <i>E. coli</i> 'lerin tahmini oranları.....	36
Şekil 8: Kolistinin kimyasal yapısı.....	41
Şekil 9: Kolistin etki mekanizması.....	42
Şekil 10: Mcr-1 ve Mcr-3 genlerinin akdeniz havzasında dağılımı.....	43
Şekil 11: TBX agarda <i>E. coli</i> karışık suş görüntüsü.....	53
Şekil 12: EMB agarda <i>E. coli</i> suşu görüntüsü.....	53
Şekil 13: TSA agarda saf <i>E. coli</i> suşu.....	54
Şekil 14: Su banyosunda DNA ekstraksiyon aşaması.....	56
Şekil 15: DNA ekstraksiyon aşamasında bakteri pelet görüntüsü.....	56
Şekil 16: Toplu iğne başı büyüklüğünde DNA görüntüsü.....	57
Şekil 17: Eco 1-2 PZR jel görüntüsü.....	59
Şekil 18: Eco 1-2 PZR jel görüntüsü.....	59
Şekil 19: gyrB PZR jel görüntüsü.....	61
Şekil 20: GSBL multipleks PZR jel görüntüsü.....	63
Şekil 21: Mcr1-5 multipleks PZR jel görüntüsü.....	65
Şekil 22: Disk diffüzyon görüntüsü.....	67
Şekil 23: Çift disk sinerji testi görüntüsü.....	68
Şekil 24: Disk diffüzyon görüntüleri.....	74
Şekil 25: İstanbul Asya ve Avrupa yakasından elde edilen <i>E. coli</i> suşlarında antibiyotik direnç sayıları.....	74
Şekil 26: Çift disk sinerji testi pozitif izolat görüntüsü.....	75

Şekil 27: GSBL direnç genlerinin Asya ve Avrupa yakasında tespit edilen sayıları.....77



TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1: Yumurtanın çeşitli bölümlerindeki bazı besin maddeleri ve miktarları.....	5
Tablo 2: Türkiye yıllara göre tavuk yumurtasına ait veriler.....	10
Tablo 3: İntestinal patojenik <i>E. coli</i>	19
Tablo 4: Sefalosporin grubu antibiyotiklerin kuşaklara göre sınıflandırılması.....	27
Tablo 5: Karbapenem grubu antibiyotiklerin sınıflandırılması.....	28
Tablo 6: Bakteriyel beta laktamaz sınıflandırma tablosu.....	31
Tablo 7: Plazmid kaynaklı GSBL.....	33
Tablo 8: CLSI 2020 GSBL üreten <i>E. coli</i> disk diffüzyon zon kriterleri.....	37
Tablo 9: GSBL gen varlığının incelenmesi için kullanılan primer dizileri.....	62
Tablo 10: Mcr 1-5 gen varlığının incelenmesi için kullanılan primer dizileri.....	64
Tablo 11: Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri EUCAST (2021)- CLSI(2022).....	66
Tablo 12: Avrupa yakasından yumurtaların toplandığı satış yerleri ve alınan yumurta sayıları.....	70
Tablo 13: Avrupa yakasındaki örneklerde tespit edilen <i>E. coli</i> sayısı.....	71
Tablo 14: Asya yakasından yumurtaların toplandığı satış yerleri ve alınan yumurta sayıları.....	71
Tablo 15: Asya yakasındaki örneklerde tespit edilen <i>E. coli</i> sayısı.....	72
Tablo 16: Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları.....	73
Tablo 17: DNA ekstraksiyonu kalite ölçümü.....	76

SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ

Simgeler	Açıklama
----------	----------

MgCL ₂	: Magnezyum Klorür
-------------------	--------------------

KCL	: Potasyum Klorür
-----	-------------------

µg	: Mikrogram
----	-------------

µl	: Mikrolitre
----	--------------

dH ₂ O	: Distile Su
-------------------	--------------

NACI	: Sodyum Klorür
------	-----------------

Kısaltmalar	Açıklama
-------------	----------

CDC	: Centers for Disease Control and Prevention
-----	--

WHO	: World Health Organization
-----	-----------------------------

EFSA	: European Food Safety Organization
------	-------------------------------------

ECDC	: European Centre for Disease Prevention and Control
------	--

EUCAST	: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
--------	--

HACCP	: Hazard Analysis and Critical Control Points
-------	---

ISO	: International Organization for Standardization
-----	--

GMP	: Good Manufacturing Practice
-----	-------------------------------

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
----------------	---------------------------

DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
-----	---------------------------

dNTP	: Nükleotit Trifosfat
------	-----------------------

TEM	: Temoniera
-----	-------------

CTX-M	: A Plasmid-Mediated Cefotaximase
-------	-----------------------------------

SHV	: For Sulphydral Variable
-----	---------------------------

OXA	: Oxacillinases
-----	-----------------

GSBL	: Genişletilmiş Spektrumlu Beta Laktamaz
------	--

EHEC	: Enterohemorojik <i>E. coli</i>
------	----------------------------------

EIEC	: Enteroinvaziv <i>E. coli</i>
------	--------------------------------

EAEC	: Enteroaggregativ <i>E. coli</i>
------	-----------------------------------

ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
------	-----------------------------------

TAE	: Tris-Acetate-EDTA
Rpm	: Revolutions Per Minute
Bp	: Base Pair
EDTA	: Etilendiamin Tetraasetik Asit
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
NGS	: Next Generation Sequencing
WGS	: Whole Genome Sequencing
PFGE	: Pulsed-Field Gel Electrophoresis
SDS	: Sodyum Dodesil Sülfat
dATP	: Deoxyadenosine Triphosphate
dTTP	: Deoxythymidine Triphosphate
dGTP	: Deoxyguanosine Triphosphate
dCTP	: Deoxycytidine Triphosphate
HHS	: US Department of Health and Human Services
Kob	: Koloni Oluşturan Birim

ÖZET

DOKTORA TEZİ

İSTANBUL'DAN ELDE EDİLEN TAVUK YUMURTALARINDA *Escherichia coli* VARLIĞI ile GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ POZİTİF *E. coli* SUŞLARI ve KOLİSTİN DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

ALİ ANIL SÜLEYMANOĞLU

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

Danışman : Prof. Dr. Harun AKSU

Yumurta, içerdği besin maddeleri açısından oldukça faydalı, insanlar tarafında sıklıkla tüketilen bir gıda maddesidir. Yumurta; üretimi, depolanma koşulları ve satış şartları göz önünde bulundurulduğunda kendi doğası veya kontaminasyon sonucu çeşitli patojen mikroorganizmaları ihtiva etmektedir. Söz konusu patojen bakterilerden olan *Escherichia coli* doğada ve bağırsak florasında sıklıkla bulunabilmektedir. Ayrıca, bazı *E. coli* suşları çeşitli antibiyotiklere karşı direnç geliştirmektedir. Antibiyotik direnci, insan ve hayvan sağlığı açısından oldukça önemli bir konu olup, söz konusu antibiyotik direnç mekanizmaları giderek ön plana çıkmaktadır. Günümüzde, direnç mekanizmaları ile ilgili olarak GSBL ve kolistin direncinin toplum sağlığını tehdit eden boyutlara ulaştığı bilinmektedir. Bu çalışma kapsamında, 120 adet tavuk yumurtası yüzeyinde *E. coli* varlığı klasik mikrobiyolojik teknikler ile araştırılmış olup, suşların doğrulamasında Polimeraz Zincir Reaksiyonu tekniği kullanılmıştır. Analizler sonucunda toplam 15 (15/120, % 12,5) adet *E. coli* pozitif suş elde edilmiştir. Söz konusu *E. coli* suşları üzerinde disk difüzyon yönetimi ile çeşitli antibiyotik

gruplarına karşı direnç saptanarak, çift disk sinerji testi ile GSBL pozitif varlığı ve kolistin agar kullanılarak ise kolistin direnci fenotipik yünden araştırılmıştır. Toplam 11 (11/15, % 73,3) adet suşta çoklu antibiyotik direnci tespit edilmiş olup, bunlardan 3 (3/15, % 20) adet suşun fenotipik olarak GSBL pozitif olduğu saptanmış ve suşların hiçbirinde kolistin direnci bulunamamıştır. Suşlardaki ilgili antibiyotik dirençlerin genotipik doğrulaması için uygulanan multiplex PZR analizleri sonucu toplam 15 adet *E. coli* suşunun TEM-1 geni (15/15, % 100) bakımından, 3 adet *E. coli* suşunun (3/15, % 20) ise CTXM-1 geni bakımından pozitif olduğu belirlenmiştir. İncelenen *E. coli* suşlarının hiçbirinde SHV-1 OXA-2 ve mcr1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 ve mcr-5 genleri tespit edilememiştir. Sonuç olarak, çalışma kapsamında yumurtalardan izole edilen ve çoklu antibiyotik direncine sahip olabilen *E. coli* varlığının halk sağlığı açısından önemli risk oluşturabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Haziran 2023 , [144] sayfa.

Anahtar kelimeler: [Yumurta, *Escherichia coli*, Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz, Kolistin Direnci, Halk Sağlığı

ABSTRACT

[Ph.D. THESIS]

[INVESTIGATION of THE PRESENCE of *Escherichia coli* and COLISTIN RESISTANCE with EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE POSITIVE *E. coli* STRAINS in CHICKEN EGGS OBTAINED from ISTANBUL.]

[Ali Anıl SÜLEYMANOĞLU]

Istanbul University-Cerrahpaşa

Institute of Graduate Studies

Department of Food Hygiene and Technology

Food Hygiene and Technology Programme

[Supervisor : Prof. Dr. Harun AKSU]

Egg is a very useful food in terms of the nutrients grown, consumed within a lot of people. Egg; Considering the production, storage conditions, and sales conditions, there is the possibility of carrying various pathogens by their own nature or as a result of contamination. *Escherichia coli*, one of these pathogenic bacteria, can be found in nature and in the intestinal flora. Some strains of *E. coli* have developed resistance to various antibiotics. Antibiotic resistance is a very important issue in terms of human and animal health, and some antibiotic resistance mechanisms come to the fore. ESBL and Colistin resistance are among the antibiotic resistance issues that threaten public health. In this study, the presence of *E. coli* on the surface of 120 chicken eggs was investigated microbiologically and the ECO1-2 - gyrB primers for spesific of *E. coli* were used by polymer chain reaction. As a result of the analysis, 15 (15/120, 12,5 %) *E. coli*- positive strains were obtained. On positive *E. coli* strains, their resistance against various antibiotic groups was measured by disc diffusion management, ESBL positive presence with double disc synergy test, and colistin resistance with colistin agar were investigated.

Multiple antibiotic resistance was detected in 11 (11/15, 73,3 %) strains, 3 (3/15, 20 %) strains were observed phenotypically as ESBL- positive strains, and no colistin resistance was detected. As a result of multiplex Polymerase Chain Reaction performed for confirmation, all strains were found to be (15/15, 100 %) TEM-1 positive, 3 (3/15, 20 %) strains CTXM-1 positive, and SHV-1 OXA-2 and mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 genes were not detected. It has been concluded that investigating the presence of *E. coli*, which is food-borne and can have multiple antibiotic resistance, is important for public health. |

June 2023, |144| pages.

Keywords: | Egg, *Escherichia coli*, Extended Spectrum Beta Lactamase, Colistin Resistance, Public Health|



1. GİRİŞ

Sürdürülebilir sağlık konsepti çerçevesinde besleyici ve güvenilir gıda temini oldukça önem taşımaktadır. Söz konusu sağlık konsepti ile güvenli gıda tüketicileri birçok riskten korunmaktadır (WHO, 2015). İlave olarak gıda güvenliği; gıdaların tüketici sağlığına zarar vermemesi açısından güvence altına alınması olarak bildirilmektedir (WHO, 2022).

Birçok gıda maddesi çeşitli sağlık riskleri içerebilmektedir. Mikrobiyolojik riskler, söz konusu sağlık riskleri arasında ön sıralarda yer almaktadır. Günümüzde, gıda kaynaklı birçok patojen mikroganizmanın insanları enfekte ettiği bilinmektedir. Bu bağlamda, dünyada her 10 kişiden biri gıda kaynaklı patojen mikroorganizma ile kontamine olmakta ve patojen mikroorganizma kaynaklı her yıl 5 yaş altı çocuklarda 125.000 ölüm vakası meydana gelmektedir (WHO, 2022).

Yumurta, beslenmede birçok makro ve mikro besin maddelerini içeren oldukça önemli bir besin maddesi olarak bilinmektedir (Miranda ve diğ. 2015). İnsan beslenmesinde, hemen hemen tüm besin unsurlarını en uygun oranda içeren yumurta, çağımızın büyük sağlık problemlerinden olan dengesiz beslenme sorununun çözümünde öne çıkması gereken gıda kaynaklarından birisi olarak önerilmektedir. Özellikle esansiyel amino asitlerce zengin olmasından dolayı balık, et ve süt gibi önemli protein kaynağı olarak değerlendirilmektedir (Açıkgöz ve Özkan, 1996).

Sağlıklı bir tavuk yumurtasının iç kısmı; yumurta kabuğunun doğal bir bariyer oluşturmasından ötürü steril kabul edilmektedir. Ancak, bu özelliğine rağmen yeni oluşan yumurta; yüzeyin mevcut çeşitli enterik mikroorganizmalar ya da yumurtanın bırakıldığı çevredeki mikroorganizmalarla kontamine olabilmektedir (Roberts, 2005). Yumurtayı kontamine eden bakterilerden biri de *Escherichia coli* (*E. coli*)'dir. Patojenik suşları da bulunabilen *E. coli* kanatlıların doğal bağırsak florasında yer almaktadır. Yumurtlama bölgesinde yüksek miktarda bulunan *E. coli*'nin, yumurtanın satış noktasına getirilmesi sürecine kadar sayısı düşmektedir (Adesiyun ve diğ. 2005).

E. coli Gram negatif, çubuk şeklinde, sporsuz ve bazıları hareketsiz bir bakteridir. Ayrıca bazıları hareketli peritriş flagellaya sahip olan *Enterobacteriaceae* üyesi bir bakteridir türüdür (Murray ve diğ. 2009). Enterik enfeksiyonlara neden olan *E. coli*'nin alt tipleri olan EHEC, EIEC, EAEC ve ETEC ishale seyreden hastalıkların oluşumundan sorumlu tutulmaktadır (Guentzel, 1996).

Günümüzde sağlık biliminin önemli problemlerinden biri olan antibiyotik direnci, bir mikroorganizmaya antibiyotiğin etki etmemesi veya antibiyotiğe duyarlı bir mikroorganizmanın çeşitli direnç mekanizmalarından biri ile direnç kazanması olarak ifade edilmektedir (Gold, 1996). Günümüzde küresel sağlığın ve gıda güvenliğinin en büyük tehditlerinden olan antibiyotik direnci doğal olarak gelişir ancak antibiyotiklerin yanlış kullanımı bu süreci hızlandırmaktadır. Bu durum, daha yüksek tıbbi maliyetlere, daha uzun hastane yatışlarına hatta insan ve hayvan ölümlerinin artmasına sebep olmaktadır (WHO, 2020).

Gıda amacıyla üretilen hayvanlarda, hastalıkları engellemek ve verimi teşvik etmek üzere, antibiyotikler insanlardan yaklaşık 2 kat daha fazla kullanılmaktadır (Boeckel ve diğ. 2015). Antibiyotik kullanımının ekonomik kaygılar nedeniyle etkin olarak denetlenmemesi, hem insan hem de hayvan sağlığını tehdit etmektedir (Yıbar ve Soyutemiz, 2013).

Gram-negatif bakterilerde çoklu ilaç direnci küresel bir tehdit olarak görülmektedir. Çoklu antibiyotik direncine sahip Gram-negatif bakteriyel enfeksiyonlar, en çok zorlanılan enfeksiyon vakalarından olmaktadır (Lukac ve diğ. 2015).

Tıp ve Veteriner Hekimlikte sıklıkla kullanılan beta-laktam grubu antibiyotikler, yan etkilerinin az olmasıyla günümüzde en sık kullanılan antibiyotik grubudur (Gülay, 2001). *E. coli*'nin sahip olduğu antibiyotik direnç mekanizmalarından en önemlilerinden biri de beta-laktamazlardır. Gram negatif bakteriler tarafından genelde sentezlenen β laktamazlar, beta-laktam halkası taşıyan antibiyotiklere karşı dirençte rol oynayan olan enzimlerdir (Bradford, 2001).

Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL); oksomino sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olan enzimlerdir (Livermore ve diğ. 2006). Bilim dünyasında popülerliği artan GSBL pozitif *E. coli* suşlarının epidemiyolojisini çeşitli açılardan inceleyen araştırmalara ilgi her geçen gün artmaktadır (Capita ve diğ. 2013). *E. coli* ve

Klebsiella türleri bu enzimi en fazla üreten bakteri türleri arasında yer almaktadır (Vercauteren ve diğ. 1997).

Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten çoklu ilaca dirençli bakterilerin neden olduğu hastalıklarda karbapenem grubu antibiyotikler, karbapenemlere dirençli olan bakteri tedavisinde ise kolistin son çare antibiyotiği olarak kullanılmaktadır (Rhouma ve diğ. 2016). Kolistine dirençli *E. coli* suşlarında plazmit aracılığıyla mcr-1 geni ile birlikte GSBL direnç genlerinin aktarılabildiğini belirten çalışmaların bulunması, kolistin direncinin saptanmasının önemini arttırmaktadır (Poirel ve diğ. 2016).

Bu çalışma kapsamında tavuk yumurtasında *E. coli* varlığı, elde edilen *E. coli* suşlarının sık kullanılan antibiyotiklerden bazılarına karşı direnç mevcudiyeti ile suşların genişlemiş spektrumlu β laktamaz üretimi ve kolistin direncinin fenotipik ve genotipik analiz yöntemleriyle araştırılması amaçlanmıştır.

2. KAVRAMSAL ÇERÇEVE

2.1. YUMURTA

Yumurta; yüksek kaliteli proteinler başka olmak üzere toplam 13 adet önemli vitamin ve mineral içeren doğal bir fonksiyonel gıda maddesidir (Hasler, 2000). Milattan önceki devirlerden bu yana insan gıdası olarak kullanılan yumurta, her yaş grubundan insan için özellikle gelişme döneminde olan çocuklar açısından önemli bir hayvansal gıda olarak bilinmektedir. Sağlıklı ve normal boyutlarda bir yumurta; 90 gram (gr) et ve 160 gr süte eş değer besin maddeleri içermektedir (Dede ve diğ. 2005). Diğer hayvansal kaynaklı gıdalar ile karşılaştırıldığında ucuz bir protein kaynağı olan yumurta, aynı zamanda protein bakımından biyolojik değeri en yüksek proteine sahiptir (Shallo, 2001).

2.2. YUMURTANIN BESİN DEĞERLERİ

Yumurta iyi bir besin kaynağı olup birçok besin maddesini içermektedir. Bu besin maddelerinin oranı yumurtanın akı ve sarı kısmında farklılık göstermektedir. Yumurta akı, yumurtanın üçte ikisini oluşturmakta ve yumurta albumini olarak da bilinmektedir. Yumurta akının besin değerleri; % 88 su, % 0,02-0,2 lipid, % 11-11,5 protein, ve % 0,8-0,9 kül'dür. Yumurta sarısının besin değerlerini ise % 51-52 su, % 31-35,5 lipidler, % 2 kül ile % 16-17 protein ile kolesterol ve yağda çözünen vitaminler ve oluşturmaktadır. Yumurta sarısının ana bileşeni olan lipidlerin % 62-65'i trigliseritler, % 28-33 fosfolipidler ve daha az miktarda da kolesterol oluşturmaktadır (Guilmineau ve Kulozik, 2006; Parkinson, 1966).

Yumurtanın besin kalitesinde tavuğun ırkı, yaşı, yaşam ortamı ile beslenme rasyosu etkili olmaktadır (Scott ve Sliversides, 2000).

Tablo 1: Yumurtanın çeşitli bölümlerindeki bazı besin maddeleri ve miktarları (Şenköylü, 2001).

Besinler	Yumurta Sarısı	Yumurta Akı	Tam Yumurta
Protein(%)	16	10,9	12,9
Karbonhidrat(%)	1	0,8	0,9
Yağ(%)	30,6	eser	11,5
Kalori(kcal)	348	51	16,3
Kollesterol (mgr)	1500	0	550
A vitamini (IU)	3400	0	1180
Riboflavin	0,44	eser	0,3
Demir (mg)	5,5	0,1	2,3
Magnezyum (mg)	16	9	11
Potasyum (mg)	98	139	129

2.3. YUMURTADAKİ PROTEİNLER

2.3.1. Yumurta Sarısındaki Protein Çeşitleri

Yumurtada bulunan protein çeşitleri yumurta sarısı ve yumurta akında farklılık göstermektedir. Yumurta sarısında bulunan proteinler; fosvitin (% 8), lipovitellinler (% 36) ve livetinler (% 38) adlı proteinler bulunmaktadır (Abeyrathne ve diğ. 2013).

2.3.1.1. Livetinler

Livetin bir glikoprotein olup suda çözünmekte ve yumurtadaki enzimlerin çoğunun taşınmasında görev almaktadır. Bu proteinin % 15'ini azot ve % 1,8'ini kükürt oluşturmaktadır. İlave olarak, livetinler yumurta sarısının katı kısmının % 4 - % 11'ini oluşturmaktadır (Causeret ve diğ. 1991).

2.3.1.2. Fosvitin

Fosvitin yumurta sarısında metallerin ana taşıyıcısı olup katyonları şelatlama özelliğine sahiptir (Castellini ve diğ. 2005). Fosfoprotein olan fosvitinin % 12'si azot ve % 10'u fosfordan

oluşmaktadır. Yumurta sarısı kuru maddesinin % 5'i ve yumurta sarısının protein kısmının % 11'i bu protein yapısındadır (Causeret ve diğ. 1992).

2.3.1.3. Yüksek Dansiteli Lipoprotein

Yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) yumurta sarısında bulunan iki lipoproteinden bir tanesidir. Antioksidan ve patojen mikroorganizmaları inhibe edici özelliği olan HDL esas olarak lipid, kolesterol, minör lipitler ve proteinden oluşmaktadır. Bu proteinin yaklaşık % 80'i protein ve % 20'si lipidden oluşmaktadır (Yamamoto ve diğ. 1990).

2.3.1.4. Lipovitelleninler

Lipovitelleninler düşük dansiteli bir protein olup, yumurta sarısının kuru maddesinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (Anton ve diğ. 2003). Bu protein, yumurta sarısının dışında yumurtada mevcut olmayıp, emülsifikasyon özelliğinden dolayı gıda endüstrisinde kullanılmaktadır (Juneja ve diğ. 1997; Kiosseoglou, 2003).

2.3.2. Yumurta Beyazındaki Protein Çeşitleri

2.3.2.1. Ovalbümin

Yumurta akında proteinlerinin yaklaşık yarısını oluşturan ovalbümin, serin proteaz inhibitörlerinden protein grubuna dahil olmasına rağmen inhibitör özelliği bulunmamaktadır (Huntington ve Stein, 2001).

2.3.2.2. Ovotransferrin

Isı ile en kolay denatüre olabilen yumurta proteini olan ovotransferrin metal iyonlarına bağlanabilmektedir. Demir iyonlarını bağlayarak demir elementini kullanan mikroorganizmalara karşı etki etmektedir (Vadehra ve diğ. 1972). Gıda kaynaklı doğal antimikrobiyal madde olarak kabul edilen bu protein *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis (*S. Enteritidis*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ve *Bacillus cereus* (*B. cereus*) gibi farklı özellikteki bakterilere karşı etki göstermektedir (Valenti ve diğ. 1983).

2.3.2.3. Lizozim

Bakteriyolitik etki gösteren lizozim yumurta akı proteininin % 3,5'ini oluşturur (Strixner ve Kulozik, 2011). İnsan için zararsız olan lizozim peptidoglikan içeriği yüksek olan Gram pozitif bakterilere Gram negatif bakterilere göre daha çok etki etmektedir (Losso ve diğ. 2000).

2.3.2.4. Ovomusin

Yumurta akı proteininin % 3,5'ini oluşturan ovomusin viskoz yapıdadır (Strixner ve Kulozik, 2011). Ovomusin yumurta akı içerisinde fibril ağ oluşturarak bakteri hareketini engelleyen antimikrobiyel bir maddedir (Yokota ve diğ. 1999). Bu protein glikoprotein yapısındaki β alt yapısı ile aynı zamanda hemaglutasyon özelliğide içerir (Tsuge ve diğ. 1996).

2.3.2.5. Sistatin

Yumurta akı proteinlerinden olan sistatinin proteinazları inhibe edici özelliği ile antiviral etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Li-Chan ve diğ. 2017). Aynı zamanda antimikrobiyal etkisi ile *S. Typhimurium* ve *Streptococcus* spp. üzerinde de etkilidir (Björck, 1990).

2.3.2.6. Ovomukoid ve Ovoinhibitör

Ovomukoid ve ovoinhibitör serin proteinaz inhibitörleridir ve bu özellikleri ile antifungal ve antimikrobiyal özellikleri vardır (Vered ve diğ. 2009). Ovomukoid oldukça stabil bir madde olup yumurta alerjenleri arasında yer almaktadır (Cooke ve Sampson, 1997).

2.3.2.7. Avidin

Avidin bir glikoprotein olup biotine karşı yüksek affiniteye sahiptir (Bayer, 1994). Bu özelliği ile avidin biotin kullanan bakterilere karşı antibakteriyel etki gösterir. Ayrıca biotinün bağlanma seviyesinden bağımsız olarak *S. epidermidis*, *S. aerus*, *E. coli*'de dahil olmak üzere çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakterilere karşı etkilidir (Korpela ve diğ. 1984).

2.4. YUMURTAĞI LİPİDLER

Yumurta sarısında bulunan lipidlerin, yumurta sarısındaki yaklaşık oranı % 32 olarak bildirilmektedir. Yumurta sarısı lipidleri bulunma miktarı ile; trigliserit, fosfolipidler, kolesterol ve karotenoidlerden oluşmaktadır (Xiao ve diğ. 2020). Kompleks lipidlere ilaveten beslenme açısından değerli yağ asitleri de bulunmaktadır (Weihrauch ve Son, 1983).

Lipidler farklı partiküler yapılarda bulunup proteinler ile bağ kurmakta ve yumurta akındaki lipidlerin oranı % 0,02- 0,2'dir. Söz konusu lipidlerin önemli kısmı, fosfolipidler ile triağılglicerolden oluşmaktadır. Ayrıca, yumurta akı lipidlerinin yarısından fazlası yumurta akına bağlanmaktadır (Sato ve diğ. 1973).

Yumurta kabuğunun kuru maddesi, kütikula kısmında % 0,045 ve kabuk membranı kısmında % 1,35 lipid içermektedir. Yumurta kabuğu lipidlerine örnek olarak sfingomiyelinler, diağılgliceroller ve kolesterol verilebilmektedir (Ternes ve diğ. 2011).

2.4.1. Yağ Asitleri

Yumurta yağ asitleri kabaca % 30- 35 doymuş yağ asitleri, % 38- 46 tekli doymamış yağ asitleri ve % 13- 18 çoklu doymamış yağ asitlerinden oluşmaktadır (Cherian ve diğ. 2002).

Yumurtadaki en önemli omega 3 yağ asidi Dokosaheksaenoik asittir (DHA). DHA, kardiyovasküler hastalıklarda iyileşme, kan basıncı regülasyonu, sinir sistemi sağlığına olumlu etkileri mevcuttur. Yumurta sarısı lipidleri DHA ve araşidonik asit içeriğı ile bebek mamasında tercih edilen lipid kaynağı olmaktadır (Makrides ve diğ. 2002).

2.4.2. Kolesterol

Kolesterol yağda çözünen ve D vitamini öncüsü, hücre duvarlarında geçirgenlik gibi önemli fonksiyonları olan bir steroldür. Çiğ yumurta sarısının % 1,6'sını oluşturur (Okubo ve diğ. 2018). Yumurta çoğı hayvansal gıdaya göre daha fazla kolestrole sahiptir ve bu da tartışmalara neden olmaktadır (Fernandez ve Andersen, 2016). Ancak yumurta diğeri hayvansal ürünlere göre yüksek miktarda doymuş yağ asidi içermemesi ile gerekli düzeyde tüketilmesinde zarar olmadığı fikri hakimdir (WHO, 2003).

2.4.3. Fosfolipidler

Fosfolipidler yumurta sarısında daha çok bulunan bir gliserofosfolipiddir ve yumurta sarısı lipidlerinin yaklaşık % 30'unu oluşturmaktadır. Yumurta sarısındaki fosfolipidlerin çoğunluğu fosfatidilkolinden meydana gelmektedir. Bu fosfolipidi ise fosfatidiletanolamin, lizofosfatidilkolin, lizofosfatidiletanolamin takip etmektedir (Parkinson, 1966).

2.5. YUMURTADAKİ VİTAMİN ve MİNERALLER

Yumurtada C vitamini dışında diğer tüm vitamin grupları bulunur. Yumurta sarısı, yağda çözünen vitaminleri yoğun miktarda içerir. Yağda çözünen vitaminlerden özellikle A, D ve E vitamini yumurta sarısında bulunur (Sunwoo ve Gujral, 2015). Günlük beslenme programına alınacak bir veya 2 yumurta ile vitamin A ve B12 vitamini olmak üzere birçok vitaminin insan beslenmesi için gerekli konsantrasyonunun önemli bir kısmı karşılanabilmektedir (Zeidler, 2002).

Yumurta çinko, demir, kalsiyum, fosfor, selenyum, magnezyum dahil olmak üzere çeşitli mineraller ihtiva eder. Çeşitli mineraller içermesine rağmen yumurta insan diyetindeki mineral ihtiyacını karşılamaya yeterli olmaz. Çünkü tavuk beslenme rasyosunda mineral miktarı arttırılsa bile embriyo için toksik olmaması adına mineral miktarı fizyolojik olarak arttırılmaktadır (Whitehead ve diğ. 1993).

2.6. TÜRKİYE'DE YUMURTA ÜRETİMİ

Türkiye yumurta üretiminde dünya ticaretinde önemli bir yere sahip, kendisine yetebilen bir ülke olarak bilinmektedir ve ilgili istatistikler Tablo 2'de yer almaktadır. 2021 yılı verilerine göre, Türkiye'den en çok ihracat Birleşik Arap Emirlikleri'ne gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde 2021 yılında en çok yumurta üretimi yapan 3 il sırasıyla Afyonkarahisar, Manisa ve Konya olarak bildirilmektedir (Çiçekgil, 2022).

Tablo 2: Türkiye’de yıllara göre tavuk yumurtasına ait veriler (Çiçekgil, 2022).

Türkiye tavuk yumurtası verileri (1.000 ton)	2017	2018	2019	2020	2021
Yumurta tavuğu sayısı (1.000 ad.)	121.556	124.055	120.725	121.303	121.001
Üretim	1.205	1.228	1.244	1.237	1.206
Tüketim	870	889	993	1.050	1.019
İhracat	350	365	275	218	221
İthalat	2	6	2	0	0
Kişi başı tüketim (kg)	172	173	191	200	191

2.7. YUMURTA ve MİKROORGANİZMA KONTAMİNASYONU

Kabuklu yumurtada mikroorganizma kontaminasyonu, vertikal veya horizontal yolla olabilmektedir. Vertikal bulaşma, kabuk zarları şekillenmeden önce üreme organlarının enfeksiyonu sonucu oluşmaktadır. Yumurta kanalı yolundaki mikroorganizmalar da yumurtayı kontamine edebilmektedir. Diğer bir kontaminasyon yolu olan horizontal yolla kontaminasyon ise yumurta yüzeyinin kontaminasyonu olarak bilinmektedir. Horizontal yolla bulaşmayı takiben yumurta akı ve nadiren yumurta sarısında kontaminasyon görülmektedir. Yeni oluşan yumurtanın yüzeyi çeşitli enterik mikroorganizmalarla veya bırakıldığı ortamdaki mikroorganizmalarla kontamine olabilmektedir. Yumurta kabuğunun yüzeyi neredeyse her mikroorganizma ile kontamine olabilmektedir. Bu kontaminasyonda üretim ortamı, dışkı, kümes materyali, toz, yem maddeleri, nakliye ve saklama kapları, insanlar, kemirgenler ve omurgasızlarla temas da dahil olmak üzere yumurta dış yüzeyindeki etkili olmaktadır (Roberts ve diğ. 2005).

Yumurta kabuğu florası kontaminasyonu, yumurta başına yaklaşık 4,5 log₁₀ bakteri olarak tespit edilmiştir. Yumurta ve yumurta ürünlerinde kontaminasyon kaynaklı tespit edilen bakteri çoğunlukla *S. Enteritidis*’dir. Aynı zamanda *E. coli*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*), *Campylobacter* ve *B. cereus* gibi diğer patojenlerin kontaminasyonu da söz konusu olmaktadır (EFSA, 2014).

2.8. YUMURTA KABUĞU ve BAKTERİ PENETRASYONU

Tavuk yumurta kabuğu yumurta kabuğu membranı ile kaplı olup kireçli bir dış katmandır (Cordeiro ve Hincke, 2011). Diğer bir tanımla kalsiyum karbonattan oluşan doğal gözenekli, fiziksel etkenlere karşı embriyoyu koruyan bir yapıya sahiptir (Yongchen ve diğ. 2013).

Bakterilerin embriyoya ulaşmasını ve penetrasyonu engelleyen katmanlar kütikül, iç zar, kabuk ve dış zar olarak bilinmektedir. Bazı mikroorganizmalar bu tabakaları geçebilmektedir. Kabuğun kirli olması, mikroorganizmaların penetre olma olasılığını arttırmakta ve mikroorganizmaların kısa sürede ve fazla sayıda penetre olmasına sebep olmaktadır. Yumurta kabuğunun dış yüzeyi, ince bir glikoprotein tabakası olan kütikül ile kaplıdır. Bu katman zarar gördüğünde penetrasyon daha rahat olmaktadır. Yumurta kabuğunda oluşan bölgesel bir hasarla bile bakterilerin yumurta içerisine penetre olabilmesine imkan vermektedir (Roberts ve diğ. 2005).

Yumurtada mikroorganizma penetrasyonunu etkilediği gözlemlenen kriterler esas olarak; yumurta kabuğundaki çatlaklar, yumurta kabuğu yüzeyindeki kontaminasyon seviyesi, veya anormal yumurta kabuğu kalsifikasyonu olarak sıralanmaktadır (Chen ve diğ. 1996).

Yumurta kabuğu yüzeyindeki mikroorganizmaların yumurtanın iç kısmına geçişini kolaylaştıran faktörlerden birisi de ortamdaki su varlığıdır. Özellikle yumurta içi ve dışı arasındaki sıcaklık farkı fazla olduğunda penetrasyon artmaktadır (Bruce ve Drysdale, 1994).

Mikroorganizmaların penetrasyon metodu birbirinden farklıdır. *E. coli*, *S. Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) Gram negatif ve hareketli bakteriler olup yumurta içeriğine daha kolay erişebilmektedir. *S. aureus* hareketsiz bir bakteri olup nemli koşullarda veya ortamda sıvı bulunduğunda daha kolay yumurtaya penetre olabilmektedir (Grijnspeerdt, 2001).

2.9. TÜRKİYE’DE YUMURTA ile İLGİLİ YASAL MEVZUAT

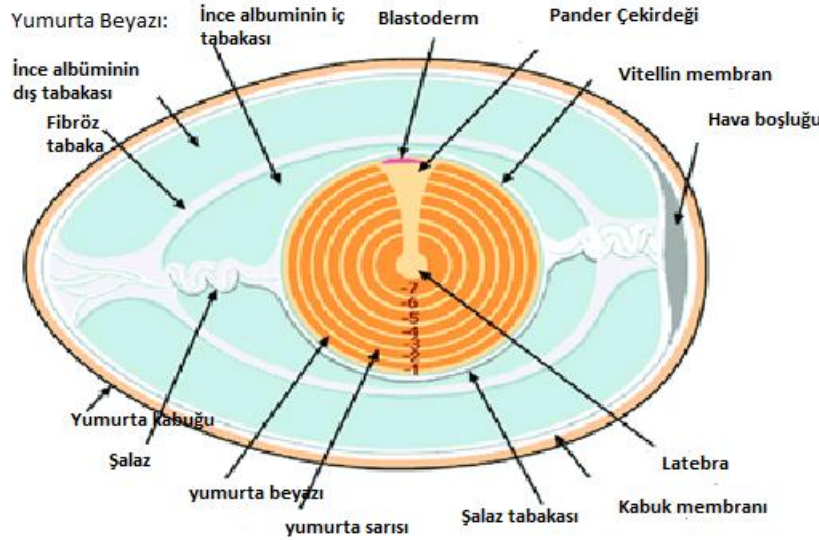
Türkiye’de Gıda Hijyeni’nin sağlanmasına yönelik Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği Resmi Gazete’de yayınlanmıştır. Yumurta ile bölümünün adı “Türk Gıda Kodeksi Yumurta Tebliği”dir. Bu tebliğ Resmi Gazete Sayı: 29211’de 20.12.2014 tarihinde yayımlanarak

yürürlüğe girmiştir. Söz konusu Yönetmeliğin uygulanmasından sorumlu olan bakanlık, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı'dır.

Yürürlükte olan Yumurta Tebliği doğrultusunda; yumurta sağlıklı hayvanlardan elde edilmeli, kendine has tat-koku ve rengi olmalı, kırık yumurta satışa sunulmamalı ve kuluçka işlemi uygulanmış yumurta satışa sunulmamalıdır (Türk Gıda Kodeksi Yumurta Tebliği, 2014).

2.10. TÜRKİYE'DE YUMURTA ÜRÜNLERİ MİKROBİYOLOJİK KRİTERLER

29 Aralık 2011/ Resmî Gazete Sayı: 28157 Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğine göre *Enterobacteriaceae* varlığı yumurta ürünlerinde araştırılması gerekmektedir. *Enterobacteriaceae* sayısının 10 kob/gr–mL düzeyini aşmaması gerekmektedir.



Şekil 1: Yumurtanın yapısı (Adegbenjo ve diğ. 2020).

2.11. *Escherichia coli*

E. coli taksonomik olarak; Bacteria aleminin, Proteobacteria bölümü, Gamma proteobacteria sınıfı, Enterobacteriales takımı, *Enterobacteriaceae* ailesi, *Escherichia* cinsinin alt türü (Winn ve diğ. 2006) olarak sınıflandırılmaktadır.

E. coli; gram negatif, fakültatif anaerob, çomak şeklinde, sporsuz bir bakteri olup sıcakkanlı canlıların doğal bağırsak florasında bulunmaktadır (Ünlütürk ve Turantaş, 1993). Çoğu kommensal olan bu bakteri türünün az sayıya alt tipi patojenik tiptedir (Donnenberg, 2013).

1885 yılında Dr. Theodor Escherich tarafından keşfedilen *Escherichia coli*, gıda hijyeninde indikatör olarak kabul edilmekte ve fekal kontaminasyon indikatörü olarak kabul edilmektedir (Cliver, 1994). 1919 yılında Castelli ve Calmer Dr. Escherich'e ithafen bu bakteriyi "*Escherichia coli*" olarak adlandırmışlardır (Töreci ve Topçu, 2002).

E. coli, diğer koliform grubu bakterilerinden farklı olarak spesifik fekal kontaminasyon indikatörü olarak bilinmektedir. *E. coli* analizlerinin çoğunda önce koliform bakteri varlığı tespit edilmekte ve sonra *E. coli* suşları saptanmaktadır (Bonadonna ve diğ. 2007).

E. coli doğumdan hemen sonra bağırsak mikrobiyotasına yerleşebilen, hem insan hem de hayvanlarda bulunabilen bir bakteri türü olarak bilinmektedir (Hewitt ve Rigby, 1976).

E. coli'nin agarda çoğunlukla 2–3 mm çapında, gri-beyaz renkte, parlak, konveks ve S tipi koloniler oluşturmaktadır. Bu bakterinin kapsüllü suşlarında mukoid koloniler görülebilmektedir (Ray ve Ryan, 2010).

E. coli suşlarının laktozu fermente edip gaz oluşturmaması, *Shigella* dahil birçok enterik bakteriden ayrımında önemli bir özelliktir. Çeşitli besiyerlerinin çalışma prensibi bu özelliğe dayanmakta ve laktoz ayıraç olarak kullanılmaktadır. Bu özelliği kullanan Eosin Metilen Blue (EMB) agar laktoz ve eozin metilen mavisi içermektedir. Benzer şekilde Endo Agar içinde laktoz, sodyum sülfid, diyament füksin içermekte ve eğer *E. coli* pozitif suş mevcut ise mavi-siyah yeşilimsi parlaklık veren koloniler oluşmaktadır (Baron ve diğ. 1994). MacConkey agarda laktozla beraber pepton, sodyum klorür, kazein içermekte ve laktozu fermente eden *E. coli* kolonileri kırmızı renk oluşturmaktadır (MacConkey, 1905). *E. coli* serotiplerinin büyük çoğunluğunun sahip olduğu -D-glucuronidase enziminin önemli özelliği methylumbelliferyl- β -D-glucuronide substratını parçalamasıdır ve Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) Agar bu mekanizmayla çalışmaktadır (Bonadonna ve diğ. 2007).

E. coli çeşitli biyokimyasal özelliklere sahiptir. Bazı özellikleri diğerlerinden daha ayırt edici olarak bilinmektedir. Bu özelliklerden bazıları; besiyeri yapımında da kullanılan laktozu

fermente etme ve glikozu kullanarak asit ve gaz oluşturmasıdır (Töreci, 2002). *E. coli* analizlerinde sıklıkla kullanılan IMVIC testinde; Triptofandan indol oluşturma “pozitif”, Metil kırmızısı testi “pozitif”, Voges Proskauer testi “negatif”, sitratı kullanma “negatif” olarak görölmektedir.(Baron ve diğ. 1994). Tip 1 *E. coli* IMVIC sonuçları +, +, -, - iken tip 2 *E. coli* -, +, -, - olabilmektedir (Huang ve diğ. 1997).

E. coli’nin sınıflandırılması için somatik “O” - flagellar “H” - kapsüler “K” antijenleri, alt gruplandırma yapmak için kullanılmaktadır (Demby ve Cuhinningham, 1980).

E. coli suşları fenotipik özellikleri bakımından birbirinden ayrışmaktadır. Bu farklılıklar suşların görünümelerini ve insanlarda hastalık oluşturma kabiliyetlerinde çeşitliliğe neden olmaktadır (Donnenberg, 2013). Fenotipik çeşitliliğin yanı sıra *E. coli* suşları, genetik olarak da oldukça fazla çeşitliliğe sahiptir. Ek olarak *E. coli* suşları az sayıda ortak gen bölgeleri içermektedir (Rasko ve diğ. 2008).

E. coli kanatlı yetiştiriciliğinde yaygın olan enfeksiyon etkenlerinden biri olarak bilinmektedir. Bu etkenin neden olduğu hastalık kolibasilloz olarak adlandırılmakta ve her yaşta kanatlılarda gözlemlenmektedir (Nolan ve diğ. 2013).

2.11.1. *E.coli* Virulansı

E. coli’nin hastalık yapabilen suşları, bu enfeksiyonları gerçekleştirirken çeşitli virulans faktörlerini kullanmaktadır (Chambers ve Metcalf, 2017). Virulans faktörlerine bakılarak patojenik *E. coli* türleri sınıflandırılabilir (Manges ve diğ. 2004). Bu sınıflandırma ise karmaşık yapısı ile dikkat çekmektedir ve sınıflandırmanın temeli; O (hücre duvarındaki liposakkaritlerdeki spesifik polisakkarit), H (flagella-kamçı) ve K (kapsül) yapılarına dayanmaktadır (Bilgehan, 2000).

2.11.2. Salgılanan Virulans Faktörler

Ototransporter toksini, serin proteaz ototransportörüdür ve konakçı hücre morfolojilerine zarar vermektedir (Guyer ve diğ. 2002).

Shiga toksinin (STX) zarar mekanizması kısaca protein sentezini engelleyerek hücre ölümüne neden olmasıdır (Tarr ve diğ. 2005). Shiga toksin üreten *E. coli*, STEC olarak kısaltılmaktadır. Çünkü salgıladığı sitotoksin, *Shigella dysenteriae* tarafından üretilen Shiga

toksin ile oldukça benzer yapıdadır. STEC bakterisinin başka isimlendirilmeleri de mevcuttur (CDC, 2014).

Sitolethal genişlemiş toksin (CDT) 1987 yılında diyare şikayeti olan *E. coli* ile enfekte olan bir hastada keşfedilmiştir (Johnson ve Lior, 1988). Bu toksinin ayırt edici özelliği hedef hücrenin genomuna saldırarak hücrenin ölümüne sebep olmasıdır (Agarwal ve diğ. 2012).

Isıya dayanıklı ve ısıya dayanıksız toksinler, Enterotoksinejik *E. coli* tarafından üretilmektedir (Sack, 2011). Isıya dayanıklı toksinler termostabil enterotoksinler (STI) olarak isimlendirilir ve 2 gruba ayrılmaktadır. Isıya dayanıksız olan toksinler de genel olarak 2 sınıfa ayrılır ve termolabil enterotoksin (LTI) olarak adlandırılır. LTI-2 sadece hayvanlar için patojen olan *E. coli* suşlarından salgılanırken LTI-1 hem insan hem de hayvan kaynaklı patojen *E. coli* suşlarından elde edilebilmektedir (Nataro ve diğ. 1987).

Sitotoksik nekrotizan faktör 1 (CNF1) idrar yolu enfeksiyonlarına neden olur ve enfekte ettiği hücrenin apoptozuna neden olmaktadır (Sussman, 1997).

Sidereforlar ferrik (Fe^{+3}) demire yüksek afinitesi olan, düşük molekül ağırlığına sahip bakterinin demir ihtiyacını karşılamak için salgılanan moleküllerdir (Johnson, 1991). *E. coli*, demir ile bağ kuran sidereforları spesifik dış membran reseptörleri ile hücre içine alıp kullanabilmektedir (Hagan ve Mobley, 2009).

Hemozilin *E. coli* tarafından alfa ve beta olmak üzere 2 farklı yapıda üretilen toksindir. Hemolizin ifadesi genellikle alfa hemolizin için kullanılır ve alfa hemolizin konak hücre proteinlerine zarar vererek etkisini göstermektedir (Ørskov ve Ørskov, 1985).

2.11.3. Yüzey Virulans Faktörler (Adezin)

E. coli'nin dokuları enfekte edebilmesi hedef dokulara tutunabilmesi gerekmektedir (Nataro ve diğ. 2009).

Kapsül, *E. coli*'yi savunma hücrelerinden koruyan adezin faktörlerinden biridir (Lewinson ve Jawetz, 2000). Kapsüller polisakkarit yapıdadır ve K antijenleri olarak adlandırılmaktadır (Jann ve Jann, 1983).

E. coli yüzey virulans faktörleri denince genellikle fimbrialar anlaşılmaktadır. Bu yapılar ince, proteinlerden oluşan ve bakteriye yapışma özelliğini kazandıran yapılardır (Emody

ve diğ. 2003). Fimbrialar genellikle mannoz duyarlı Tip 1, mannoz dirençli P, S fimbria olarak sınıflandırılmaktadır (Wurpel ve diğ. 2013). Tip 1 fimbria *E. coli* suşlarının büyük çoğunluğunda mevcuttur (Vigil ve diğ. 2011). P fimbria pap geni tarafından sentezlenir ve P kan grubu antijenlere spesifik bağlanabilmektedir (Källeneus ve diğ. 1981; Jann ve Jann, 1992).

2.11.4. Patojenik *E. coli* Türleri

E. coli suşları toplum sağlığı açısından 3 gruba ayrılabilir. Bunlar; kommensal *E. coli*, extraintestinal patojenik *E. coli* (EXPEC) ve intestinal patojenik *E. coli* (IPEC) suşlarıdır (Johnson ve Russo, 2005).

İntestinal patojenik *E. coli* (IPEC) enfekte ettikleri hastalarda neden oldukları semptomlar ve virülans genlerine göre 6 grupta toplanılmaktadır. Ciddi rahatsızlıklara neden olabilen bu türler; enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), enterohemorajik *E. coli* (EHEC), enteropatojenik *E. coli* (EPEC), enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve diffüze ve adere olabilen *E. coli* (DAEC) dir (CDC, 2014).

2.11.4.1. Enterotoksijenik *E. coli*

Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC) 1950'li yıllarda önce kolera olarak şüphelenilen ancak hastalardan alınan örneklerde *E. coli* suşlarının olduğunun görülmesiyle keşfedilmiştir. Bu suşlar kolera toksinine benzer toksin üretmişler ve böylece ETEC tespit edilmiştir (Sack, 2011).

ETEC gelişmiş ülkelerde az görülmekle beraber gelişmekte olan ülkelerde turist ishalinin en önemli nedenidir. Bu *E. coli* suşu gelişmekte olan ülkelerde diyare vakalarının yaklaşık % 20-30'unda rol oynar (Arslan, 2008). İnsanlar ETEC'in ana rezervuar kaynağıdır ve özellikle süt emen bebeklerde ciddi diyare ile seyreden enfeksiyonlara neden olur (Meng ve Schroeder, 2007). İnsan sağlığını tehdit eden bu etken, evcil hayvan ishallerinin de en önemli nedenidir (Nataro ve diğ. 1998).

ETEC'ler başlıca 2 tip toksin üretirler. Bunlar: 60°C'de 30 dk'da inaktive olan ısıya karşı hassas labil toksin ve 100°C'ye 15 dk dirençli olan ısıya dayanıklı stabil toksindir. Labil toksin, insan veya hayvan kaynaklı *E. coli* suşlarında genellikle plazmidlerce kodlanmaktadır. Ayrıca bu toksin *Vibrio cholerae* tarafından üretilen kolera toksinine oldukça benzemektedir (Hossain ve diğ. 1970).

ETEC salgıladığı toksinler ile virülans özelliği kazandığı gibi bağırsak epiteline yapışmasını sağlayan kolonizasyon faktör antijenleride bir diğer virülans faktörüdür (Nataro ve diğ. 1987).

2.11.4.2. Enteropatojenik *E. coli*

Çocuk ishalleri olarak bilinen Enteropatojenik *E. coli*'nin sık görülen semptomları kusma, hafif ateş ve kansız bol miktarda sulu ishaldir. Bu suş *E. coli*'nin tanımlanan ilk patotipi olması ile önem arz etmektedir (Kaplan ve Keusch, 2004).

Etkenin patolojisi bağırsak mukozasındaki spesifik hücelere bağlanıp epitelyum hücreler ile mikrovilluslara zarar vermesidir (Sperandio ve diğ. 2015). EPEC, kendi reseptörlerini konak hücre zarlarına sentezlemeleri, salgılamaları ve yerleştirmeleri bakımından oldukça farklı bir patojenetik mekanizmaya sahiptir (Vallance ve Finley, 2000).

2.11.4.3. Enteroinvaziv *E. coli*

Dizanteriye yol açan Enteroinvaziv *E. coli* (EIEC) 1970 yılında tanımlanmış olup suşların % 70'inin laktozu fermente etmemesi ile genel *E. coli* özelliğinden ayrılmaktadır (Silva ve diğ. 1980). EIEC, *Shigella dysenteriae*'nin neden olduğu dizanteri ile benzer hastalığa neden olmaktadır. Bunun nedeni ise *Shigella* ile aynı virülens genlerine sahip olmasıdır. Bu *E. coli* suşları dekarboksilaz aktivitelerinin negatif olması ile *Shigella* spp.'ye benzerlik göstermektedir (Donnenberg, 2013). Genellikle gelişmekte olan ülkelerde görülen EIEC, salgın hastalıklara da neden olabilmektedir (Rachtrachenchai ve diğ. 2004).

EIEC hedef konakçısını, "invaziv" olarak adlandırılan virulans proteinleri aracılığıyla bağırsak hücrelerine penetre olmaktadır. Etken hücre içinde çoğalması, bir süre sonra hücrelerin ölümüne neden olmaktadır (Poolman, 2017). İnvazyona imkan veren bu virulans protein "O" antijeni bakımından *Shigella* spp. benzeyen EIEC'nin bir diğer benzer özelliği ise hareketsiz bir bakteri olmasıdır (Svennerholm, 2011).

2.11.4.4. Enterohemorojik *E. coli*

Enterohemorojik *E. coli* (EHEC) 1982 yılında keşfedilen ve gıdalardan bulaşan bir insan patojenidir. EHEC'in en bilinen serotipi *E. coli* O157:H7 olup hastalık insidensi düşüktür. 2011 yılında *E. coli* O104:H4' ün neden olduğu en ölümcül EHEC salgını nedeniyle 3800 kişi enfekte olup, toplam 53 kişi ölmüştür (NAS, 2002).

EHEC, Shiga toksini üreten *E. coli*'nin (STEC) patojenik bir alt grubudur. Enfekte ettiği hastalarda ekstraintestinal komplikasyonlara ve hemorajik üremik sendroma neden olmaktadır. EHEC'in 200'den fazla serotipi bildirilmiştir (Pennington, 2010).

EHEC etkeninin ana rezervuar kaynağı sığır eti ve kıyması olmasına rağmen son yıllarda salgınlar sığır eti kaynaklı değil kontamine ürünler ile ilişkilendirilmektedir. Kontaminasyon çoğunlukla dışkı ile kontamine gıda ürünlerinden kaynaklanmaktadır (Anonim, 2002).

EHEC suşlarının temel patolojenik özelliği shiga toksin olarak adlandırılan sitotoksin (Stx1, Stx2) üretmesidir. Bu toksinler shiga toksin ile yakından ilişkili olup Stx2 daha virulent bir toksindir. Ayrıca Stx2 neredeyse tüm *E. coli* O157:H7 tarafından üretilmektedir (Bahrani-Mougeot ve diğ. 2009).

2.11.4.5. Enteroaggregatif *E. coli*

Enteraggregatif *E. coli* (EAEC) 1983 yılında keşfedilmiştir (Nataro ve diğ. 1987). EAEC semptomları sporadik olarak mukoid diyare ve çoğunlukla sulu ishaldir. Bazı vakalarda ishal görülmeyip gelişim bozukluğu da görülebilmektedir (Hebbelstrup ve diğ. 2014).

EHEC ve EPEC'ten daha az şiddetli diyare vakalarına neden olan EAEC son yıllarda dehidrasyona neden olan kalıcı ishale sebep olması ile dikkat çekmektedir. Bu özelliği etkenin biyofilm özelliği ile ilişkilidir (Weintraub, 2007).

EAEC'nin ayırt edici özelliği epitelyum hücre tabakası üzerinde yığılmış tuğla şeklinde bir yapı oluşturmaktır. Etken enterositlere bağlanmak ve biyofilm oluşturmak için aggregatif adezin fimbriaları üretmektedir (Hebbelstrup ve diğ. 2014).

2.11.4.6. Diffüz Adherent *E. coli*

Diffüz adherent *E. coli* (DAEC) HeLa veya HEp-2 epitel hücre kültürlerinde diffüz olarak yapışma özelliği ile karakterizedir (Servin, 2005).

DAEC insan veya hayvan dışkısı ile kontamine olmuş su veya gıdaların tüketilmesi ile bulaşmaktadır. DAEC ile enfekte olan insanlarda klinik semptomlar; karın ağrısı, dehidrasyon, ateş ve kanlı ishaldir (Gunzburg ve diğ. 1993).

DAEC patogeneğinde ilk aşama bağırsak mukozasına bağlanmasıdır. Daha sonra α -hemolizini kullanarak proinflatuar sitokin salgılanmasını teşvik eder ve mikrovillus kaybına neden olur. Ek olarak hedef hücrelerin hücre geçirgenliğini arttırmaktadır. α - hemolizin aktivitesi fazla olan DAEC suşlarının ülseratif kolitin patolojisinde rol oynayabileceği öne sürülmüştür (Mirsepasi-Lauridsen ve diğ. 2016).

Tablo 3: İntestinal patojenik *E. coli* (Clements ve diğ. 2012).

<i>E.coli</i> türü	Serogruplar	Toksin	Adhezin tipi	SPATE	Neden olduğu semptomlar
Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC)	O6, O8, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O128ac, O139, O148, O153, O159, O167	Isıya dayanıklı ve ısıya duyarlı toksin, Sitolizin A (ClyA)	Kolonizasyon faktörü (CF), Adhezin ile ilişkili porsin A/E (Paa)	ETEC ototransporter A (EatA)	Akut sulu diyare, gezgin ishali
Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC)	O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125, O126, O127, O128, O142, O158	–	Intimin, Bundle-forming pili (BFP), Paa, LPF, Iha, EhaA	EspC	Bebek diyaresi
Enterohemorjik <i>E. coli</i> (EHEC)	O26, O91, O111, O157	Stx	Intimin, Paa, Toxin B (ToxB), <i>E. coli</i> adherent faktör (Efa)-1, LPF, STEC otoaglutinasyon adhezin (Saa), <i>E. coli</i> immunoglobulin-binding protein (EibG), EHEC gen A tarafından kodlanan ototransportör (EhaA), Dış membran proteini A (OmpA), Iha	EspP	Hemorojik kolit, kanlı diyare, gıda zehirlenmesi
Enteroagregatif <i>E. coli</i> (EAEC)	O3, O15, O44, O77, O126	EAEC ısıya dayanıklı enterotoksin 1 (EAST1), Shigelle enterotoksin (ShET)1, Hemolizin E (HlyE)	Agregatif adhezin fimbria (AAF) (I, II, III, Hda), Toxigenic invasion loci A (Tia)	Plazmidle kodlanan toksin (Pet), Protein involved in intestinal colonization (Pic), Dışarı ototransportör ile salgolana toksin (Sat), Shigella IgA-like homolog proteaz (SigA), <i>E.</i>	Gezgin ve bebek idyaresi

				<i>coli</i> tarafından salgılanan protein (Esp)P	
Shigatoksin üreten Enteroagregatif <i>E. coli</i> (STEAEC)	O114	Stx	AAF, IrgA homolog adhezin (Iha)	Pic Pet	Gıda zehirlenmesi
Enteroinvaziv <i>E. coli</i> (EIEC)	O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O164, O167	ShET1/2	–	<i>Shigella</i> hücre dışı proteini (Sep)A, SigA	Shigellozis
Diffüz adherent <i>E. coli</i> (DAEC)	O86, O127, O142, O158	–	Afimbrial (Afa) veya fimbrial (Dr) adhezin	Sat	Akut diyare

Spate: *Enterobacteriaceae* 'nin serin proteaz ototransportörü

2.11.5. *E. coli* Kaynaklı Enfeksiyon Semptomları

E. coli genel olarak sindirim kanalı ile ilişkili enfeksiyonlara neden olsa da yaptığı hastalıklar intestinal ve ekstraintestinal olarak ikiye ayrılmaktadır (Dobrindt ve diğ. 2003)

İntestinal enfeksiyonlarda *E. coli*; diyare, ateş, kusma, karın ağrısı, bulantı, dehidrasyon, hemolitik üremik sendrom ile trombo trombositopenik purpuraya neden olmaktadır. Bu semptomlara intestinal bölgede hastalığa neden olan *E. coli* (IPEC) sebep olmaktadır (Ustaçelebi, 1999).

Ekstraintestinal enfeksiyonlarda başta üriner sistem hastalıkları olmak üzere menenjit, bakteriyemi ve solunum yolu enfeksiyonları görülebilmektedir. Üriner sistemde sıklıkla meydana getirdikleri semptomlar sistit, piyelit ve piyelonefrittir (Bilgehan, 2000). Bu grup hastalıkları oluşturan *E. coli* suşları ekstraintestinal bölgede hastalık oluşturan *E. coli*'dir (ExPEC) (Palaniappan ve diğ. 2006).

2.11.6. Yumurta ve *E. coli*

Kanatlı hayvanlarda *E. coli*'nin başlıca kaynağı bu hayvanların sindirim kanalıdır. Sindirim kanalında bulunan *E. coli*'lerin % 10-15'inin patojenik serotiplere ait oldukları bildirilmiştir. Sağlıklı tavukların dışkılarında *E. coli* konsantrasyonu, dışkı materyalinin her

gramında kabaca 10^6 kob olarak gözlemlenmiştir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999). *E. coli* etkenlerinin dışkıda fazlaca bulunması yumurtayı kontamine etmektedir. Kontaminasyon derecesini, kümes ve kuluçkahane idaresi etkilemektedir (Dho-Moulin ve diğ. 1990).

Avian Patojenik *E. coli* 'nin öncelikli kanatlılara bulaşma şeklinin *E. coli* ile kontamine toz ile hayvanların solunum yoluna geçmesi, toz aracılığı ile *E. coli* kontaminasyonunun gerçekleşebileceğini göstermektedir (Jordan ve Pattison, 1996).

Antibiyotik dirençli spesifik *E. coli* suşlarının kanatlı hayvanlar ile çalışan personellerde de saptanması konunun önemi arttırmakta ve kanatlı hayvanların veya kümes ürünlerinin antibiyotik dirençli mikroorganizma veya plazmidlere aracı olabileceğini göstermektedir (Van den Bogaard ve diğ. 2001).

2.12. ANTİBİYOTİK DİRENCİ

Antibiyotik direnci, mikroorganizmaların antibiyotiklerin etkilerini durdurması veya kendilerini öldürmesi için yapılan ilaçları engelleme yeteneğini kazanmasıdır (CDC, 2021).

Penisilinin Alexander Fleming tarafından 1928 de keşfedilmesiyle geleneksel tedavi yöntemlerinde büyük bir değişim yaşanmıştır. Antibiyotiklerin keşfedilmesine takiben sağlık sektöründe antibiyotikler vazgeçilmez hale gelmiştir (Abraham ve Chain, 1940). Ancak Fleming penisilinin aşırı ve uygunsuz şekilde kullanılması konusunda uyarıda bulunmuştur (Blazky, 2004).

Antibiyotik direnci, antibiyotiklerin yaygın kullanım nedeniyle hızlıca gelişti. Penisilin direnci, Abraham ve Chain tarafından daha penisilin küresel piyasa tanıtılmadan keşfedilmiştir (Abraham ve Chain, 1940). Gelişen penisilin direncine karşı penisilinaz aktivitesini durdurmak için penisilinin kimyasal yapısı değiştirilerek sentetik antibiyotik stratejisi oluşturulmuştur (Paterson ve Doi, 2007).

Antibiyotik direncinin hızlıca gelişmesi ve yeni antibiyotik geliştirme çalışmalarının yavaş gitmesi nedeniyle antibiyotikler nesli tükenmekte olan tedavi araçlarından biri olarak görülmeye başlanmıştır (WHO, 2016).

Antibiyotik direnci gelişiminde 2 temel biyolojik yol vardır. Birinci yolda doğal bakteri popülasyonu antibiyotik direncine önceden sahip olduğu fenotipik özellikle elde etmektedir. Bunun için bakteri genetik hataları biriktirir ve dikey gen transferi (VGT) aracılığıyla sonraki nesillere aktarmaktadır. İkinci yol edinilmiş antimikrobiyel direnç olup bakteri türleri arasında genetik materyallerin transferi ile gerçekleşmektedir. Yatay gen transferi (HGT) ile oluşan bu yolda plazmidler, integronlar, transpozonlar ve faj gibi mobil genetik maddeler aracılığıyla direnç kazanılmasıdır (Apata, 2009).

Bakteriyel enfeksiyonlarda kullanılan antibiyotiklerin temel etki mekanizmaları 4 kategoride toplanabilmektedir. Bunlar; hücre duvarı sentezinin inhibe edilmesi, protein sentezi inhibisyonu, nükleik asit sentezine müdahale ve metabolik hattın inhibisyonudur (Tenover, 2006).

Antimikrobiyel direnç, acil bir küresel sağlık tehditidir ve dünya çapında en az 1,27 milyon insanı öldüren bir olgudur. Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 2,8 milyon insandan fazla kişi antimikrobiyel dirençli bakteriler ile enfekte olmaktadır (CDC, 2021).

29 Avrupa Birliği veya Avrupa Ekonomik Alanda olan ülkede yapılan araştırmalar sonucu 2020 yılında 2016 yılına göre daha fazla antimikrobiyel direnç tespit edilmiştir. Bu araştırmalara göre en sık bildirilen bakteri türleri; *E. coli*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*'dır (ECDC, 2020).

2.12.1. Gıdalarda Antibiyotik Direnci

Gıda zinciri; çeşitli kanatlı hayvanlar, balıklar, büyükbaş hayvanlar ve sebzeler gibi farklı ekosistemlerden gelen, farklı bakteri türleri ve suşları barındıran ve çeşitli antibiyotiklerin kullanıldığı bir zincirdir (Acar ve Moulin, 2006).

Antibiyotik dirençli bakteriler doğrudan veya dolaylı yolla gıda zincirine yayılabilir. Gıda zincirini üretim aşamasında çalışan çiftçiler, besiciler, veteriner hekim vb. çalışanlar hayvan dışkısı, kanı, sütü gibi maddelere doğrudan maruz kalabilmektedir. Bu yolla bulaşmanın salgın hastalıklara yol açma şansının az olduğu düşünülmesine rağmen enfekte olan bireyin ailesi başta olmak üzere dirençli bakterinin topluma girmesi için kapı açılmış olmaktadır (Marshall ve Levy, 2011).

Antibiyotik dirençli bakteriler ile kontamine olan gıda ürünleri ile temas ya da tüketilmesiyle indirekt bulaşma olabilmektedir. Kontamine gıda ile bulaşma daha karmaşık bir yoldur. Çeşitli çiftlik ve kümes hayvanlarından elde edilmiş gıdalar üzerine yapılan analizler sonucu birçok antibiyotik dirence sahip bakteri bildirilmiştir (Price ve diğ. 2012).

Gıda aracılığıyla taşınan antibiyotik dirençli bakterilerin bazılarının ölümcül olabilmesi, tedavisinin zor olması ve kolayca toplumda yayılabilme ihtimali endişe verici bir toplum sağlığı problemidir. Bu nedenle gıda zincirinin tüm aşamalarında bu özellikteki bakterilerin sürekli izlenmesi ve bu bakterilerin epidemiyolojisinin daha iyi anlaşılmasının sağlanması gerekmektedir (WHO, 2014).

Gıda zincirinden antibiyotik dirençli bakterilerin izlenmesi için yapılan surveyans çalışmalarında *Salmonella* spp. , *Campylobacter* spp. gibi patojen bakterilerin yanında indikatör bakteriler olan *E. coli* ve *Enterococcus* spp. hedef alınmaktadır (FDA, 2016).

Gıda hayvanlarında gelişen antibiyotik dirençli bakteriler oldukça endişe vericidir. Çünkü uzun süre söz konusu bakteriler hayvanların üzerinde varlığını sürdürebilir. Gıda hayvanlarından insanlara gelişen bu bulaşma yolları ortaya konmuştur (EFSA, 2008).

Çiftlik hayvanlarında antibiyotik dirençli bakterilerin gelişmesinin esas sebebi fazla miktarda antibiyotik kullanımıdır. Bu hayvanların sağlıklı tutulabilmesi için 60 yıldan daha uzun süre kullanılan antibiyotikler ile zoonoz etkenler direnç mekanizmaları kazanmaktadır (WHO, 2021).

Gıda hayvanlarının yetiştirilmesinde büyüme teşvik edici olarak kullanılan antibiyotikler yasaklanmıştır. Bu kararın nedeni ise antibiyotik kullanımının azaltılması ve direnç gelişiminin yavaşlatılma isteğidir. Ancak bazı araştırmacılar bu yasağın beklenen sonucu getirmediğini aksine antibiyotik kullanımının arttığını belirtmektedir (Casewell ve diğ. 2003; Phillips 2007).

Genetiği değiştirilmiş bitkiler için genetik çalışmalarda antibiyotik direnç genlerinin de kullanılması oldukça dikkat çekicidir. Bu yöntemle başarılı şekilde gen transferi gerçekleşen hücreler antibiyotik verilmesi sonucu hayatta kalmaktadır. Bu marker direnç genlerinin daha sonra işlevi yoktur ancak bu genlerin bakterilere taşınma riski endişe vericidir (Demanèche ve diğ. 2008).

Çeşitli gıdalar işlenme sırasında veya paketlemede bakteri gelişimini engelleyici çeşitli aşamalar içermektedir. Bakteriler optimum seviyede gelişebilmesi için uygun pH, su aktivitesi değeri, uygun sıcaklık gibi şartlar gerekmektedir. Bu koşullarda olmayan ortamlarda bakteriler üzerinde strest gelişmektedir. Bazı bakteriler zor koşullara adapte olup stres yanıt oluşturabilmektedir. Bu oluşan yanıt ile antibiyotik direnç gelişimi arasında bağlantı vardır (McMahon ve diğ. 2006).

2.12.2. *E. coli*'de Antibiyotik Direnci

E. coli'de antibiyotik direnci florokinolonlar ve üçüncü ve dördüncü kuşak sefalosporinlere karşı gelişmektedir. Bu olguda dikkat çeken kısım, gelişen direncin sağlık sektörü alanlarından ziyade toplum içinden etkenin almasıdır (Laupland ve diğ. 2008).

Küresel sağlık sorunlarından bir tanesinde *Enterobacteriaceae*'de gelişen geniş spektrumlu sefalosporin ve karbapenem direncidir. *E. coli* bu bakteri ailesinde direnç kazanımı hızlı olan bir bakteri türüdür ve çeşitli ülkelerde çoklu antibiyotik dirençli *E. coli* suşları bildirilmiştir (Süleymanoğlu ve diğ. 2022).

E. coli'de β -laktam antibiyotiklere karşı baskın direnç mekanizması, plazmid aracılığıyla GSBL üretimidir. GSBL pozitif *E. coli* suşlarının bildirimleri artarak rapor edilmektedir (Franczek ve diğ. 2012). bla_{CTX-M} genleri (Canton ve Coque, 2006) ve bla_{OXA-48} genleri *E. coli*'nin genetik materyallerin transferi ile kazandığı antibiyotik direncine iyi birer örnektir (Poirel ve diğ. 2012).

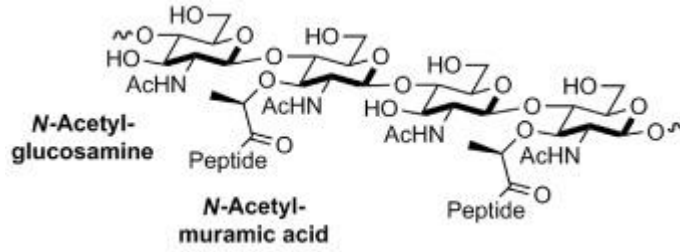
Diğer bakterilerde olduğu gibi *E. coli*'de de gelişen antibiyotik direnci, beşeri ve veteriner hekimliğin antibiyotik kullanımlarının artmasına ile paralel olarak yükselmiştir. En sık ve daha eski tarihte keşfedilen antibiyotiklere karşı direnç daha fazla gözlemlenmiştir. *E. coli*'de ilk direnç 1950'li yıllarda keşfedilmiştir (Tadesse ve diğ. 2012).

GSBL pozitif ve karbapenem dirençli *Enterobacteriaceae* suşları WHO tarafında antibiyotik dirençli bakteriler konusunda öncelikli önem verilmesi gereken bakteri grubundadır (WHO, 2017). Farklı ülkelerde yapılan çalışmalar ile tüketime hazır hayvansal ürünlerden elde edilen *E. coli* suşlarında başta beta laktam olmak üzere çeşitli antibiyotiklere karşı direnç tespit edilmiştir (Kaesbohrer ve diğ. 2019). *E. coli*'de son çare antibiyotiği olarak adlandırılan kolistine karşı gelişen direnç oldukça endişe vericidir (Joshi ve diğ. 2019).

2.12.3. Bakteri Hücre Duvarı

Hücre duvarı, bakteri hücrelerinin sitoplazmik zarını içine alan ve bakteri hücreleri için temel bir koruyucu bariyer olan peptidoglikandan oluşur. Peptidoglikan polimerik karbonhidratlar ile amino asitlerden oluşan karmaşık bir yapıdır. Karbonhidrat polimeri, değişen β -(1,4) bağlı N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit kalıntıları ile şekillenir. N-asetilmuramik asit kalıntıları tipik olarak yan zincirleri aracılığıyla çapraz bağlanan üç ila beş amino aside bağlanmaktadır. Bu şekilde peptidoglikan ağ benzeri görünmektedir (Schaefer ve diğ. 2018).

Peptidoglikan bakteri hücre duvarının önemli bir bileşeni olup bakterileri çevresel stresten korumada ve ozmotik stabiliteyi sağlamada önemli roller oynamaktadır (Yocum ve diğ. 1970).



Şekil 2: Peptidoglikan yapısı (Schaefer ve diğ. 2018).

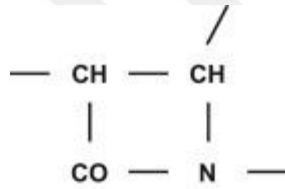
2.13. BETA LAKTAM GRUBU ANTİBİYOTİKLER

β - laktam grubu antibiyotikler 4 üyeli bir β -laktam halka sisteminden oluşan bir karbon gövdeden oluşur ve penisilin bağlayıcı proteinlere bağlanmaktadır. β laktam grubunu; monobaktamlar, sefamler, klavamlar, penemler ve karbapanemler oluşturmaktadır (Tipper ve Strominger, 1965). Bu antibiyotik grubu çeşitli Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır. Sıklıkla kullanılan penisilin ve sefalosporinler örnek verilebilmektedir (Wilke ve diğ. 2005).

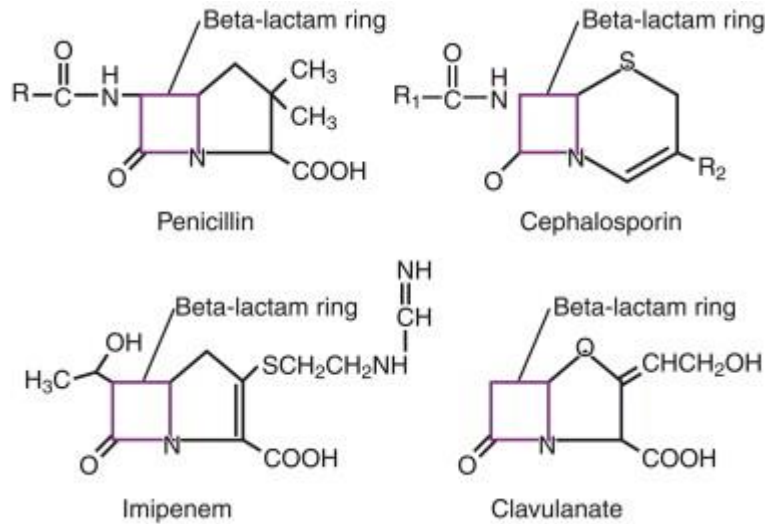
β -laktam antibiyotikler, bakteri hücre duvarının peptidoglikanlarında D-alanin-D-alanin yapısını taklit ederek etki etmektedir (Goffin ve Ghuysen, 1998). Beta laktam antibiyotikler, penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP'ler) kovalent olarak bağlanan ve bunları inhibe eden

bakterisidal antibiyotiklerdir. Penisilin bağlayıcı proteinler, bakterilerin hücre duvarının peptidoglikan tabakasının çapraz bağlanması ve katalize edilmesinde görevlidir (Skyes ve Papich, 2014). Tüm β -laktamlar, hücre duvarı sentezine müdahale ederek bakteriyel büyümeyi inhibe eder ve asıl hedefleri hücre duvarındaki peptidoglikan çapraz bağlama yapısıdır (Waxman ve Strominger, 1983).

Gram pozitif ve Gram-negatif bakterilerde PBP'lerin hücre dışı boşluğa göre konumları farklıdır. Gram negatif bakterilerin hücre duvarlarının dış yüzeyindeki lipopolisakkaritlerin (LPS), PBP'lere bağlanabilmesi için antibiyotik molekülünün bu katmandan diffüze olabilmesi gerekmektedir. Antibiyotikler arasındaki etki farklılığını PBP'lerin konsantrasyonlarındaki farklılıklar ve PBP'lerin β laktamlara olan yakınlıkları ile PBP'leri hücre duvarlarına bağlanırken ki fizyolojik görevleri ile açıklanabilmektedir (Tomazs, 1986).



Şekil 3: β laktam molekül yapısı (Iyer, 2022).



Şekil 4: β Laktam grubu antibiyotiklerin yapısı (Skyes ve Papich., 2014).

2.13.1. Penamlar

Penamlar grubu beta laktamlar; penisilinleri de içeren büyük bir β -laktam grubudur. Bu antibiyotik grubunun yapısı; L-sistein ve D-valinin yoğunlaşmasıyla oluşmakta ve β -laktam halkası ile tiazolidinik halkadan oluşan kapalı bir dipeptitten meydana gelmektedir (Long ve diğ. 2005).

Günümüzde β laktam grubu antibiyotikler beta laktamazlara geri dönüşümsüz bağlanan klavunik asit, tazobaktam veya sulbaktam ile kombine olarak kullanılmaktadır (Maiti ve diğ. 1998).

2.13.2. Sefemler

Sefem grubunun en bilinen üyesi sefalosporinler olup sık kullanılan antibiyotik gruplarından biridir (Dalhoff ve Thomson, 2003). Penisiline benzer özellikler gösteren sefalosporinlerin satışa sunulması için birçok modifikasyon yapılması gerekmiştir ve birçok sınıflandırma şekli mevcuttur (Fernandes ve diğ. 2013). Sefemlerin etki mekanizmaları penisilin bağlayıcı proteinlere (PBP) hücre duvarı sentezine engel olmalarıdır (Bousquet ve diğ. 2007).

Tablo 4: Sefalosporin grubu antibiyotiklerin kuşaklara göre sınıflandırılması (Fernandes ve diğ. 2013).

Birinci Jenerasyon	İkinci Jenerasyon	Üçüncü Jenerasyon	Dördüncü Jenerasyon	Beşinci Jenerasyon
Sefalotin	Sefoksitin	Sefotaksim	Sefepim	Seftarolin
Sefazolin	Sefuriksim	Seftiriakson	Sefpirom	Seftapirol
Sefaleksim	Sefotetan	Sefiksim		
Sefapirin	Seforanit	Seftibuten		
Sefadroksil	Seftametazol	Sefoperazon		
	Sefonisid	Seftizoksım		
	Sefminoks	Seftazidim		

2.13.3. Karbapenemler

Karbapenem; penisilinlerin C-2 ve C-3 arasında çift bağ bulunan ancak C-1'de kükürt yerine karbonun yer değiştirdiği 4:5 kaynaşmış halkalı laktam olan β laktam grubu antibiyotiktir. Karbapenemleri diğer β laktamlardan ayıran ve ona önemli özellikler kazandıran yan bağı olan hidroksietil yan zinciridir (Kahan, 1979).

Karbapenemler β laktam grubunda en geniş spektrumlu olan antibiyotik grubudur. Birçok Gram negatif ve Gram pozitif bakteriye karşı oldukça etkilidir (Bassetti ve diğ. 2009).

Tablo 5: Karbapenem grubu antibiyotiklerin sınıflandırması (Bassetti ve diğ. 2013).

Birinci Grup	İkinci Grup	Üçüncü Grup
Ertapenem	Meropenem	Razupenem
Tebipenem	İmipenem	Tomopenem
Panipenem	Doripenem	
	Biapenem	

2.13.4. Monobaktamlar

Monobaktamlar monosiklik bir β -laktam halkasına sahip olup β -laktamazlara dirençlidir. İlk piyasaya sunulan üyesi aztreonam olan monobaktamlar gram negatif bakterilere karşı etkili olmasına rağmen gram pozitif bakterilere karşı aynı etkiyi gösterememektedir (Brown ve diğ. 2019).

2.13.5. β Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç ve Genişlemiş Spektrumlu β Laktamazlar

Gram pozitif bakteriler Gram negatif bakterilere göre oldukça kalın çapraz bağlı peptodoglikan yapıda hücre duvarına sahiptir. Bu kalın yapı Gram pozitif bakterilerin Gram negatif bakterilere göre daha kolay β laktam grubu antibiyotikler ile inhibe olmasını sağlamaktadır (Gold ve Moellering, 1996).

Küresel olarak β laktamlara karşı direnç giderek artmakta ve direnç mekanizmasında başta β laktamazlar görev almaktadır. Gram-negatif bakterilerde β -laktamazlar, ilaç penetrasyonuna engel olan dış lipopolisakarit tabakasının hemen altında bulunmaktadır. Gram pozitif bakteriler ise yakın çevrelerine β -laktamaz salgılamaktadır. β laktamazların farklı antibiyotiklere özgü olan farklı tipleri bulunmaktadır. Aynı zamanda değiştirilmiş PBP'lerin

üretiminden ve gram-negatif bakteriler arasında normalde porinler yoluyla difüze olan ilaçlardan kaynaklanan direnç mekanizma çeşitleri de vardır (Bush ve Jacob, 2009).

Beta laktamlara karşı direnç başka şekillerde gelişebilmektedir. Bunlar; antibiyotik hedefinin modifikasyonu (alternatif PBP'lerin mutasyonu veya ekspresyonu), β -laktam girişi için gerekli porinlerin aşağı regülasyonu ile hücre geçirgenliğinin azalması, atım pompası (efflux) aşırı ekspresyonu ve modifiye edici ya da parçalayıcı enzimlerin üretimidir (King ve diğ. 2017).

E. coli'de tanımlanan ilk bakteriyel beta-laktamaz enzimi 1940 yılında AmpC enzimidir ve 1965 yılında tanımlanan yapısal geni de keşfedilmiştir (Jacoby, 2009).

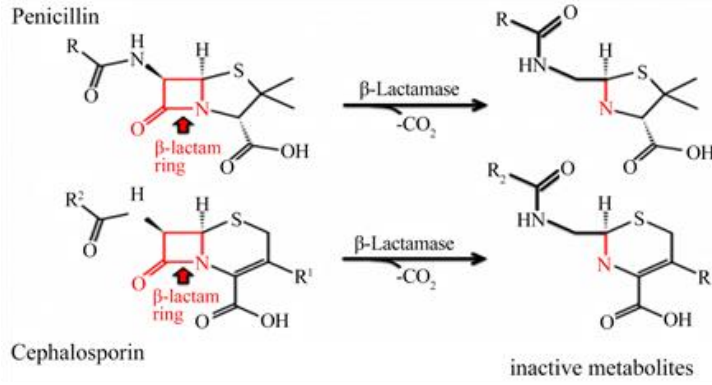
2.13.5.1. Beta Laktamaz

Beta laktamazlar; beta-laktam halkasında bulunan amid bağına parçalayarak beta laktam grubu antibiyotiklerin etkisini azaltan enzimlerdir (Süleymanoğlu ve diğ. 2022). β laktamazlar keşifleri ile sayıca artmaktadır. Yeni beta laktamazların tanımlanması, bu enzimlere ait protein-nükleotit ve gen dizi keşifleri ile beta laktamazların sınıflandırılmasının gerektiği ortaya çıkmıştır. Özellikle sekans analizlerinin artması ile beta laktamaz sayısı oldukça artmıştır ve 4000'in üzerinde enzim bildirilmiştir (Naas ve diğ. 2008).

Dünyada Gram negatif bakterilerde özellikle *Enterobacteriaceae*'de çoklu antibiyotik direnci artmakta olup bu endişe verici küresel sağlık sorununun başlıca sebeplerinden biri de genişlemiş spektrumlu beta laktamazlardır (Bush ve Bradford, 2020). HHS (2017) ve WHO (2017) β -laktamaz üreten Gram negatif bakterileri dünyanın en ciddi ve kritik küresel sağlık tehditlerinden bazıları olarak ifade etmiştir.

Beta laktam antibiyotiklerin etkinliğini azaltan beta laktamazlar, gram negatif bakterilerde daha önemli bir direnç mekanizmasıdır. Gram pozitif bakterilerde beta laktam direncinde PBP değişimi daha önemlidir. Gram pozitif bakteriler beta laktamazları salgımlarken gram negatif bakteriler de enzim periplazmik bölgede bulunmaktadır (Tenovar, 2006; Bush ve diğ. 1995).

Beta laktamaz sınıflandırmasında; enzim aktivitesine dayalı Bush–Jacoby–Medeiros (Bush ve diğ. 1995) sistemi ile sekans bilgisine dayalı Ambler sistemi (Ambler, 1980) bulunmaktadır.



Şekil 5: Beta laktamazlar ile antibiyotikler arasında etkileşim (Nagshetty ve diğ. 2021).

2.13.5.2. Ambler Sınıflandırma

Ambler sisteminde A, B, C, D olmak üzere beta laktamazlar 4 temel sınıfa ayrılmıştır. Bu ayırmda dizi sekans bilgileri ile beraber hidrolitik mekanizmalardaki temel farklılıklarda dikkate alınmıştır (Ambler, 1980). Ambler (1980), sınıflandırma yaparken önce 2 grup belirlemiştir. Bunlar; aktif bölgesi serin β -laktamazlar olan A sınıfı ile aktivitesi için genellikle Zn^{2+} olmak üzere iki değerli bir metal iyonu gerektiren metallo- β -laktamazları içeren B sınıfıdır. Bu 2 grubun ardından yeni bir serin β -laktamaz çeşidi olan C sınıfını belirlemiştir. C sınıfı aynı zamanda "AmpC β -laktamazlar" olarak da bilinmektedir. C sınıfının belirlenmesi sonrası A ve C sınıfına benzer D sınıfı keşfedilmiştir. D sınıfı, sıkça araştırılan OXA β -laktamazlar olarak bilinen bir başka serin β -laktamaz sınıfıdır (Jaurin ve Grundström, 1981; Ouellette ve diğ. 1987).

Ambler β -laktamaz moleküler sınıfları A-C-D olan beta laktamazlar; PBP'lere yapısal ve fonksiyonel olarak benzer olan ve PBP'lerden köken aldığı düşünülen aktif serin enzimleridir. Bu 3 sınıf enzim grubu PBP'lerde olduğu gibi aynı tip penisilloil-O-Ser enzim kovalent ara ürünlerinden meydana gelmektedir (Ambler, 1980).

B sınıfı β -laktamazlarda onların çeşitli ilaçlar tarafından inhibe edilememesini sağlayan A-C-D β laktamazlardaki kovalent penisilloil enzim ara maddesi bulunmamaktadır (Galleni ve diğ. 1995).

Ambler sınıflandırması yapısal bir yaklaşım olup çeşitli avantajları vardır. Bunlar hem daha az tartışmalı bir sınıflandırma olması hem de çok çeşitli enzimleri sınıflandırmanın kolay olmasıdır. Bu sınıflandırmanın yetersiz kaldığı ve enzimlerin rollerini ayıran fonksiyonlarına bakılarak sınıflandırılması gerektiği ortaya konmuştur (Richmound ve Sykes, 1973).

2.13.5.3. Fonksiyonel β Laktamaz Sınıflandırması

Bush-Jacobi-Medeiros (1995) beta laktamazları fonksiyonel olarak sınıflandırmıştır. Bu sınıflandırmada protein moleküler ağırlığı, substrat profilleri, beta-laktamaz inhibitörlerine duyarlılık gibi biyokimyasal özelliklerini dikkate alarak sınıflandırma yapılmıştır (Bush ve diğ. 1995). Bush ve Jacobi (2009) da fonksiyonel sınıflandırmaya güncelleme yapmıştır.

Tablo 6: Bakteriyel beta laktamaz sınıflandırma tablosu (Bush ve diğ. 1995; Bush ve Jacobi, 2009; Ambler 1980).

Bush-Jacoby Medeiros (1995)	Bush-Jacoby group (2009)	Moleküler sınıflandırma	Ayırt edici substrat/ substratlar	İnhibe eden		Temsil eden enzimler
				CA ya da TZB	EDTA	
1	1	C	Sefalosporinler	-	-	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
Hariç	1e	C	Sefalosporinler	-	-	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penisilinler	+	-	PC1
2b	2b	A	Penisilinler, ilk sefalosporinler	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktam	+	-	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penisilinler	-	-	TEM-30, SHV-10
Hariç	2ber	A	Geniş spektrumlu sefalosporinler, monobaktam	-	-	TEM-50
2c	2c	A	Karbenisilin	+	-	PSE-1, CARB-3,
Hariç	2ce	A	Karbenisilin, sefepim	+	-	RTG-4
2d	2d	D	Kloksasin	Değişken	-	OXA-1, OXA-10
Hariç	2de	D	Genişlemiş spektrumlu sefalosporin	Değişken	-	OXA-11, OXA-15

Hariç	2df	D	Karbapenem	Değişken	-	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Genişlemiş spektrumlu sefalosporin	+	-	CepA
2f	2f	A	Karbapenem	Değişken	-	KPC-2, IMI-1, SME-1
3	3a	B1/B3	Karbapenem	-	+	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 B / L1, CAU-1, GOB1, FEZ-1
3	3b	B2	Karbapenem	-	+	CphA, Sfh-1

CA: Klavunik asit TZB: Tazobaktam +:var -:yok

2.13.5.4. Plazmit ve β Laktamazlar

Plazmidler, kromozomdan bağımsız olarak replike olan ve hem ebeveyn hem de yavru hücrelerdeki kopya sayılarını kontrol eden dairesel DNA molekülleridir. Birçok plazmit, konjugasyon yoluyla kendi kendine bulaşmayı destekleyen kendi gen materyallerine sahiptir. Bu mekanizmayı kullanamayan plazmit tipleri birlikte bulunduğu konjugatif plazmidler ile diğer bakterilere bulaşabilmektedir (Bennett, 2008).

Plazmidler çoklu antibiyotik direncinin yayılmasında önemli bir vektördür. Gram negatif bakterilerde daha etkili olsa da Gram pozitif bakterilerde daha az olmakla beraber direnç kazanımında etkilidir (Carattoli, 2013).

Gram negatif bakterilerdeki ilk plazmit aracılı β -laktamaz olan TEM-1 enzimi, Yunanistan'da Temoniera adlı bir hastadan alınan kan kültüründen izole edilen bir *E. coli* suşunda bulunmuştur. Plazmit aracılı ve transpozon aracılı olması TEM-1'in diğer bakteri türlerine yayılmasını kolaylaştırmıştır ve ilk izolasyonundan birkaç yıl sonra dünyaya yayılmıştır. Günümüzde TEM-1 *Enterobacteriaceae* spp., *H. influenzae*, *P. aeruginosa* ve *Neisseria gonorrhoeae* bakterilerinin birçok farklı türünde bulunmaktadır (Livermore, 1995).

Gram negatif bakterilerde kromozomlar ile sınırlı kalan AmpC genleri olan C sınıfı β laktamazlar, 1980'lerin sonu ile plazmidler aracılığıyla bütün dünyaya yayılmıştır (Walther-Rasmussen ve Høiby 2002). C sınıfı β laktamaz üreten bakterilerde CLSI değerlerinde kullanılan sefalosporinler klinik tedavide etkili olmasına rağmen plazmid aracılı bu sınıf β laktamazlara karşı aynı klinik başarı gözlemlenmemiştir (Pai ve diğ. 2004). Plazmid aracılığıyla oluşan C sınıfı β laktamazlar CLSI GSBL klavuzundaki testlere cevap vermemesi son derece önemlidir. Sefalosporinlere duyarlı gözüken gram negatif suşların bazıları aslında direnç

genleri içerebilmesi üzerine bu plazmid aracılı enzimlerin varlığını dair test çalışmaları artmıştır (Doi ve Paterson, 2007).

Tablo 7: Plazmid kaynaklı GSBL (Naas ve diğ. 2008).

β laktamaz adı	İsmin kaynağı
SHV	Sülfidril değişkeni
TEM	Hasta İsmi: Temoneira
CTX-M	Sefotaksim
OXA	Oksasilin hidrolizi
PER	Genişletilmiş <i>Pseudomonas</i> direnci
VEB	Vietnam GSBL
BES-1	Brezilya GSBL
BEL-1	Belçika GSBL
SFO-1	<i>Serratia fonticola</i>
TLA-1	Tlahuicas
TLA-2	TLA-1 ile amino asit benzerliği % 51 oranında olduğu için
GES	Guyana GSBL

2.14. GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZLAR

1985 yılında Almanya’da geniş spektrumlu antibiyotikleri hidrolize edebilen plazmit aracılı beta laktamaz *Klebsiella pneumoniae* suşunda tespit edilmesiyle genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) ortaya çıkmıştır (Kliebe ve diğ. 1985).

GSBL genel olarak klavulanik asit, sulbaktam ya da tazobaktam tarafından inhibe edilebilen enzimler olup bakteriler arasında transfer edilebilen genler tarafından kodlanan bulaşıcı β-laktamazlar olarak tanımlanmaktadır (Paterson ve Bonomo, 2005).

2.14.1. TEM Grubu

TEM-1 enzimi 1965 yılında *E. coli* izolatında saptanmıştır. Bu enzim inhibisyon profili ve substrat özelliği ile SHV-1 enzime benzer (Datta ve Kontomichalou, 1965). TEM-1, penisilinleri ve birinci nesil sefalosporinleri hidrolize edebilirken oksiminino sefalosporine karşı etkili değildir. Genişletilmiş spektrumlu sefalosporinlere karşı etkili ilk TEM varyantı TEM-3’dür (Souhakoff ve diğ. 1988). TEM-1 gram negatif bakterilerde en sık rastlanan GSBL’dir (Paterson ve Bonomo, 1995).

2.14.2. SHV Grubu

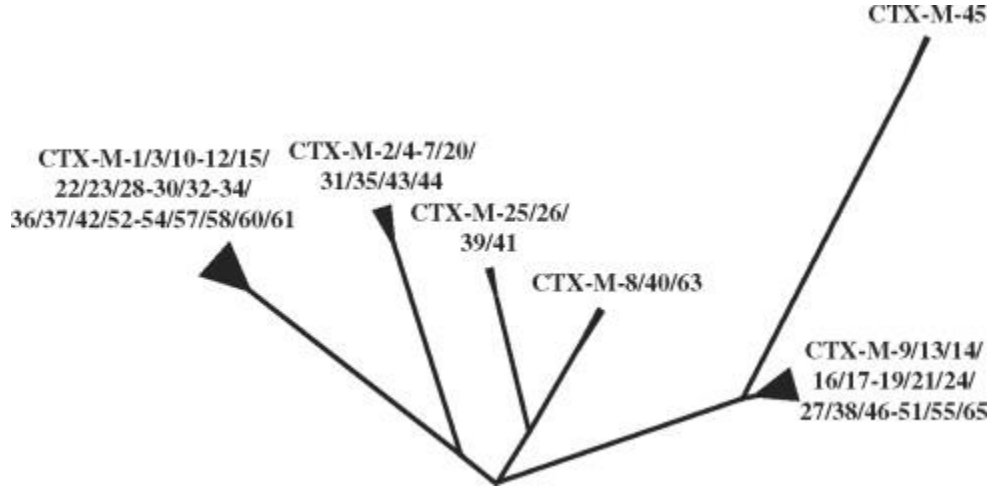
SHV enzimi *Klebsiella* spp. kökenlidir. SHV enzim grubu öncüsü SHV-1, *K. pneumoniae*'de bulunmaktadır ve geniş spektrumlu penisilin direncinin kaynaklarından. *K. pneumoniae* kromozonlarında SHV-1 veya bu enzimin öncüsü LEN-1 bulunur. Kromozomda bulunan genlerin plazmidlere geçişi ile *Enterobacteriaceae*'de hızla yayılmıştır (Livermore, 1995).

Çoğu suş 238. pozisyonda bulunan glisinin serin ile yer değiştirmiş plazmidleri aracılığıyla SHV'ye sahiptir. Bazı suşlarda 240. pozisyonda glutamat yerine lizin geçer. 238. pozisyonda serin kalıntısı seftazidimin hidrolizi için önemlidir ve lizin kalıntısı ile sefotaksim hidrolizi için önemlidir (El-Harrif-Heraud ve diğ. 1997). Her SHV türü fenotipik GSBL özelliğini gösterememektedir (Paterson ve Bonomo, 2005).

2.14.3. CTX-M Grubu

CTX-M ilk kez 2000 yılında Tzouveleakis tarafından tanımlanmıştır (Tzouveleakis ve diğ. 2000). Bu enzim grubunun keşfinden sonra hızla yeni CTX-M varyantları bildirilmiştir ve birçok alt grupları ile varyantları tespit edilmiştir. Her grup ilk tanımlanan üyeden sonra adlandırılmaktadır. CTX-M tipi β -laktamazları kodlayan genlerin asıl kaynağı bilinmektedir. CTX-M belirleyicilerinin kaynakları, *Kluyvera* spp. yerleşik olan kromozomal genlerdir. *Kluyvera* spp. insanlar için çok az veya hiç patojen olmayan çevresel bir mikroorganizmadır. CTX-M belirleyicilerinin yakalanması ve yayılmasında çoklu genetik mekanizmaların rol oynadığı düşünülmektedir. Birkaç CTX-M grubunun (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-9 ve CTX-M-25) enzimlerini kodlayan genler, bir ISecp1 yerleştirme dizisinde bulunmuştur. Bu yerleştirme dizisi; bir yan DNA parçalarını tek uçlu bir yer değiştirme mekanizması yolunu kullanarak beraber hareket ettirebilen ve yer değiştirebilen elemandır. CTX-M beta-laktamazlar, yaygın olarak *K. pneumoniae*, *E. coli*, thyphoidal ve nonthyphoidal *Salmonella*, *Shigella*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* ve *Citrobacter freundii*'de mevcuttur (Bonnet, 2004).

GSBL'lerin epidemiyolojisinde güncel veriler değerlendirildiğinde en yaygın GSBL tipinin CTX-M sınıfı olduğu görülmektedir (Livermore ve diğ. 2006).



Şekil 6: 6 CTX-M tipi beta laktamaz grubu (Rossolini ve diğ. 2008).

2.14.4. OXA Grubu

OXA tipi GSBL'ler ilk olarak Ankara, Türkiye'deki hastane kaynaklı *P. aeruginosa* izolatlarında keşfedilmiştir (Hall ve diğ. 1993).

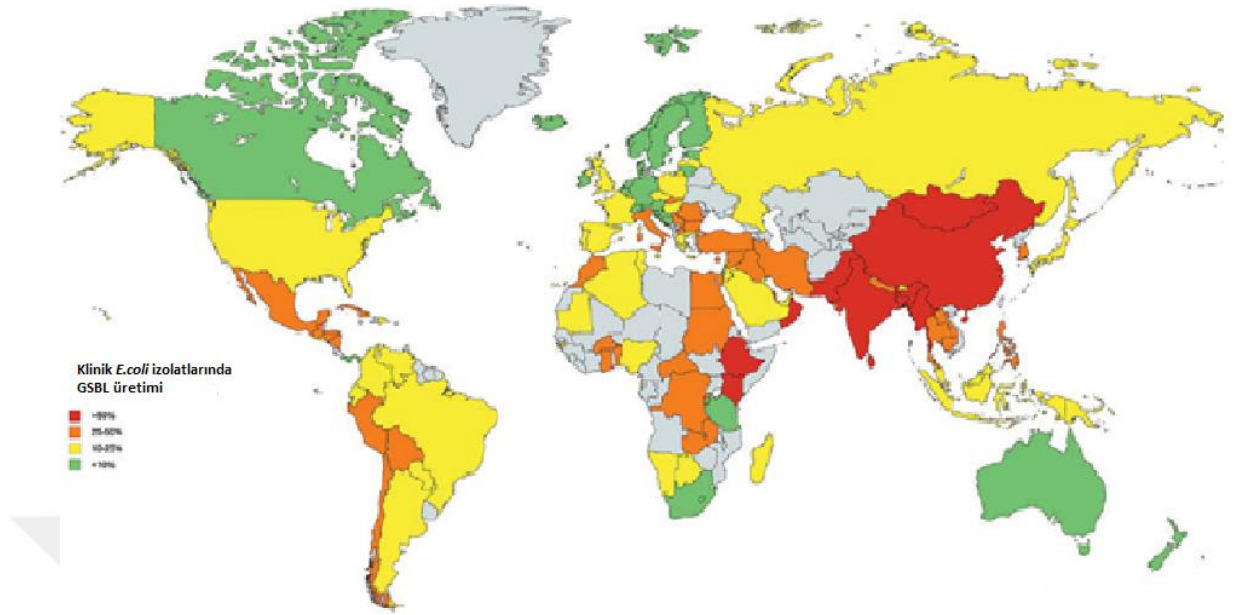
OXA β laktamazların isimlendirilmesinde oksasilini hidrolize etmesi etkili olmuştur. Bu enzim genellikle *P. aeruginosa* bulunmakla beraber *Enterobacteriaceae* da dahil olmak üzere gram negatif bakterilerde tespit edilmiştir. Çoğu OXA tipi β -laktamaz, genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri etkin şekilde hidrolize edememektedir. Bu enzim grubunun gelişimi diğer GSBL'ler ile paralelliğe sahiptir (Naas ve Nordman, 1999).

Çoğu OXA tipi β -laktama, genişletilmiş spektrumlu sefalosporini hidrolize edemediği için GSBL'ler olarak kabul edilmemektedir. OXA-GSBL'ler; OXA-10, OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17, OXA-19, OXA -15, OXA -18, OXA-28, OXA-31, OXA-32, OXA-35 ve OXA-45'dir (Paterson ve Bonomo, 2005).

2.14.5. Diğer Beta Laktamazlar

İlk beta laktamazların keşfi ile beraber sınıf A türü çeşitli beta laktamazlarda (Bonnet ve diğ. 2000; Giakkoupi ve diğ. 2000; Poirel ve diğ. 2001) keşfedilmiştir. Bu enzimler herhangi bir β -laktamazın basit nokta mutasyon türevleri değildirler. Kromozomal olarak kodlanmış yeni GSBL'ler olarak ifade edilmiş, dünyanın farklı coğrafyalarında olmalarıyla dikkat çeken enzimlerdir (Bellais ve diğ. 2001).

Bu beta laktamazlara örnek olarak; SFO-1, TLA-1, BES-1, BEL-1, PER ve VEB verilebilir (Naas ve diğ. 2008).



Şekil 7: GSBL üreten *E. coli*'lerin tahmini oranları (Doi ve diğ. 2017).

2.15. *Enterobacteriaceae*'da GSBL TANI ve TEŞHİS YÖNTEMLERİ

GSBL üreten bakterilerin tespitinde tarama ve doğrulama testleri kullanılmaktadır. Sefalosporin içeren duyarlılık testleri ile oksimino sefalosporin ve klavulanat arasındaki sinerjiyi test eden mekanizmalar sıkça kullanılmaktadır (Süleymanoğlu ve diğ. 2022).

Enterobacteriaceae'da GSBL üretimi küresel sağlığı tehdit eder seviyeye gelmiştir (Bush ve Bradford, 2020). GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarının tespiti için çeşitli kurumlarca klavuzlar hazırlanmıştır (CLSI 2022, EUCAST 2017, HPA 2008).

2.15.1. *E. coli*'de GSBL Tarama Yöntemleri

GSBL üreten *E. coli* şüphesi bulunan numunelerde disk difüzyon, agar difüzyon, sıvı difüzyon veya otomatize sistemler [VİTEK2 (bioMérieux, Fransa), MicroScan WalkAway-96 System (Dade Behring, Inc., West Sacramento, CA, ABD), Phoenix Automated Microbiology System (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, ABD)] ile tarama testleri gerçekleştirilebilmektedir.

GSBL tarama testlerinde EUCAST klavuzunda sefotaksim ve seftazidimde biri veya her ikisine direnç saptanmaz ise doğrulama testlerine geçilmemektedir (EUCAST, 2017).

Tablo 8: CLSI (2020) GSBL üreten *E. coli* disk difüzyon zon kriterleri.

Antibiyotik İsmi	Zon Çapı
Sefotaksim	≤27 mm
Seftazidim	≤22 mm
Seftiriakson	≤25 mm
Sefpodoksim	≤17 mm
Aztreonam	≤27 mm

2.15.2. GSBL Doğrulama Yöntemleri

GSBL tarama testleri sonucu şüpheli olan izolatlarda doğrulama testleri yapılması gerekmektedir. Doğrulama testleri, fenotipik doğrulama ve genetik doğrulama yöntemleri ile yapılmaktadır (EUCAST, 2017).

2.16. GSBL FENOTİPİK DOĞRULAMA

2.16.1. Çift Disk Sinerji Yöntemi

Sefalosporin içeren antibiyotik diskleri ile klavulanik asit içeren antibiyotik diskleri belli mesafe ara bırakılarak yerleştirilir. Sefalosporin içeren diskler merkeze uzaklığı 15 ila 30 mm arasında olmalıdır. İdeal mesafe 20 mm olarak bildirilmiştir. Sefalosporin içeren disklerin klavunik asitli diske bakan yüzlerindeki birinin zon çapları genişler veya arada üreme noktasın olmayacak şekilde anahtar deliği tarzından büyüme gerçekleşirse pozitif olarak değerlendirilmelidir (EUCAST, 2017).

2.16.2. Kombine Disk Difüzyon Testi

Sefalosporin içeren antibiyotik diskleri ile aynı tür sefalosporin içeren klavunik asitli diskleri kullanılır. 2 diskin inhibisyon çapları ölçülür ve klavunik asit ile kombine sefalosporinli diskin inhibisyon çapı sadece sefalosporinli olanın çapından 5 mm ve üstü fazla ise test pozitif olarak kabul edilir (Towne ve diğ. 2010). Kombine disk difüzyon testi kolay uygulanabilmesi ve kolay yorumlanabilmesi ile tercih edilen bir testtir (Linscott ve Brown, 2005).

2.16.3. Gradyent Test

Bir tarafında sefalosporin diğer tarafında sefalosporinle kombine edilmiş klavunik asit bulunan gradyent testlerde klavunik asitli tarafta 8 kat ve üzeri düşüş varsa veya hayalet zon

varsa pozitifdir (EUCAST, 2017). Testin yapılmasının görece zorluğu ve yorumlanmasının tecrübe istemesi bu testin negatif yönleridir (Leverstein-van ve diğ. 2002).

2.16.4. Broth Mikrodilüsyon

Sefalosporin ve sefalosporinle kombineli klavulanik asit 2 katlı Muller Hinton Broth besiyerinde kullanılır. Klavulanik asit ile kombine edilen sefalosporinin MİK değeri, sefalosporin tek başına olduğunda ölçülen MİK değerinden 8 kat veya 8 kattan daha düşükse test pozitif olarak kabul edilmektedir (EUCAST, 2017).

2.17. GENETİK DOĞRULAMA

GSBL varlığı, AmpC üretimi ve KPC (*Klebsiella pneumoniae* karbapenemaza) varlığında fenotipik testlerin doğruluk yüzdesi düşebilmektedir (Paterson ve Bonomo, 2005).

GSBL varlığının tespiti için moleküler genetik analiz yöntemleri kullanılabilir. Genetik analiz yöntemlerinde sadece GSBL varlığı değil aynı zamanda tipleri de araştırılabilir (Bradford, 2001).

GSBL üreten suşların varlığı ve GSBL tür ve alt tür tiplendirme araştırmaları için kullanılabilecek bazı genetik analiz yöntemleri; PZR (Bermuedes ve diğ. 1997), PFGE (Branger ve diğ. 1998) , LCR (Kim ve Lee, 2000) ve dizi sekans (Bradford, 1999) analizleridir.

2.18. KÜMES ve YUMURTALARDA GSBL ÜRETEEN *E. coli* VARLIĞI

Gıdalar aracılığıyla taşınan GSBL üreten *E. coli* suşları halk sağlığını tehdit etmektedir. Kümes, kümeslerde bulunan malzeme ve ürünler, kanatlı ve kanatlı ürünleri GSBL üreten *E. coli* yayılmasına sebep olabilmektedir. Bu konu çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmektedir (Süleymanoğlu ve diğ. 2022; Oikarainen ve diğ. 2019; Kim ve diğ. 2021).

Oikarainen ve diğ. (2019) 450 ekebeyn broyler, inkübasyon öncesi 300 yumurta, inkübasyon sonra 428 yumurta, kuluçka ortamından 20 ve 420 embriyoda GSBL üreten /pAmpc üreten *E. coli* suşları aramışlardır. Analizleri sonucu; ekebeyn broylerlerde 120 (% 26,7) kuluçka ortamında 1 (% 5) ve inkübasyon öncesi yumurtada 4 (% 1,3) tane GSBL üreten /pAmpc üreten *E. coli* bulmuşlardır. Diğer aradıkları ortamlarda sonuç negatif çıkmıştır.

Chishimba ve diğ. (2016) 384 tavuk örneğinde GSBL üreten *E. coli* suşları aramışlardır. 77 (% 20,1) örnekte GSBL üreten *E. coli* saptamışlardır. Yaptıkları PZR analizleri ile 2 suşta

SHV, 50 sušta CTX-M, 3 sušta TEM, 17 sušta hem CTX-M hem de TEM, 2 sušta hem CTX-M hem de SHV, 1 sušta hem TEM hem de SHV ve 2 sušta CTX-M, SHV ve TEM grubu beta laktamazlar tespit etmişlerdir.

Kaesbohrer ve diğ. (2019) 2256 gıda örneğinde (399 sebze, 255 çiğ süt, 151 peynir, 199 tavuk eti, 227 hindi eti, 282 domuz eti, 215 domuz eti kıyması, 284 sığır eti ve 243 sığır eti kıyması) GSBL üreten *E. coli* suşları aramışlardır. 341 adet suşu pozitif bulup: CTX-M, SHV, TEM ve CMY açısından incelemeler yapmışlardır. Sebzelerde 1 sušta CTX-M; çiğ sütte 33 sušta CTX-M, 1 sušta TEM ve 1 sušta CMY, peynirde 1 sušta CTX-M; tavukta 46 sušta CTX-M, 12 sušta TEM, 34 sušta SHV ve 50 sušta CMY; hindilerde 58 sušta CTX-M, 6 sušta SHV, 4 sušta CMY; domuz etinde 23 sušta CTX-M, 2 sušta TEM, 1 sušta SHV, 1 sušta CMY; domuz kıymasında 23 sušta CTX-M, 2 sušta TEM, 2 sušta SHV, 2 sušta CMY; sığır etinde 11 sušta CTX-M, 1 sušta SHV; sığır eti kıymasında 21 sušta CTX-M ve 2 sušta TEM beta laktamazlarını saptamışlardır.

Abubakar ve diğ. (2016), 246 tavuk ve 85 sofralık yumurtada GSBL üreten *E. coli* suşları aramışlardır. 21 tavukta (% 8,9) ve 5 (% 5,7) tanesinde GSBL üreten *E. coli* suşu saptamışlardır.

Chowdhury ve diğ. (2021) 150 sağlıklı broylerin kloaklarından aldıkları swap örneklerinde GSBL üreten *E. coli* aramışlardır. 128 örnekte 32 adet GSBL üreten *E. coli* suşu saptamışlardır. 32 suşun 20'si CTX-M (% 62,5), 8'i SHV (% 25) ve 4 tanesi TEM (% 12,5) beta laktamazı içermektedir.

Tasbihullah ve diğ. (2020) 200 adet sofra yumurtası ve 50 adet personel malzemesinde GSBL üreten *E. coli* suşları aramışlardır. Sofralık yumurtada 20 adet ve personel malzemesinde 4 adet GSBL üreten *E. coli* bulunmuştur. Yaptıkları PZR analizleri sonucu suşların 15 tanesinde CTXM-1, 4 tanesinde CTXM-9, 12 tanesinde SHV-2, 12 tanesinde CTX-M ile SHV-2 bulunmuşlardır.

Rasheed ve diğ. (2014) çeşitli gıda ürünlerinde (sebze salatası, çiğ yumurta yüzeyi, çiğ tavuk eti, pastörize edilmemiş süt ve çiğ kırmızı et) GSBL üreten *E. coli* suşları aramışlardır. Toplamda 150 adet olan gıda örnekleri, örnek türü başına 30 adet olmak üzere test edilmiştir. Sebze salatalarında 23 adet, çiğ yumurta yüzeylerinde 18 adet, çiğ tavukta 25 adet, pastörize edilmemiş sütte 13 adet ve çiğ kırmızı etlerde 20 adet *E. coli* suşu tespit etmişlerdir. Sebze

salatalarında 2, çiğ yumurta yüzeylerinde 1, çiğ tavuk etlerinde 2 ve çiğ ette 1 adet olmak üzere toplamda 6 adet GSBL üreten *E. coli* suşları bulunmuştur.

Gazal ve diğ. (2021), Brezilya’da çeşitli kümes içerisindeki maddelerde (dışkı, yem, ortam) yaptıkları analizler sonucu 117 suşun 78’inde beta laktamaz üreten *E. coli* varlığını tespit etmişlerdir. CTX-M varlığı yönünden yaptıkları PZR analizleri sonucu baskın gen grubunun CTX-M- 2 grubu olduğunu bildirmişlerdir.

Kim ve diğ. (2021) Güney Kore’de kanatlı hayvan endüstrisinden elde ettikleri 1376 örnekte yaptıkları analizler sonucu % 6,8 oranında GSBL üreten *E. coli* saptamışlardır. Yaptıkları genetik analizler sonucu CTX-M-55 ve CTX-M-14 genlerini daha fazla tespit etmişlerdir.

Pehlivanlar ve diğ. (2015), GSBL ve AmpC üreten *E. coli* varlığı üzerine perakende sektöründen elde edilen etlerde (sığır ve tavuk) yaptıkları araştırmalar sonucu 100 tavuk etinin 81’inde ve 100 sığır etinin 7’sinde GSBL üreten *E. coli* saptamışlardır. PZR analizleri sonucu en çok CTX-M-1 ‘e rastlamışlardır.

2.19. KOLİSTİN

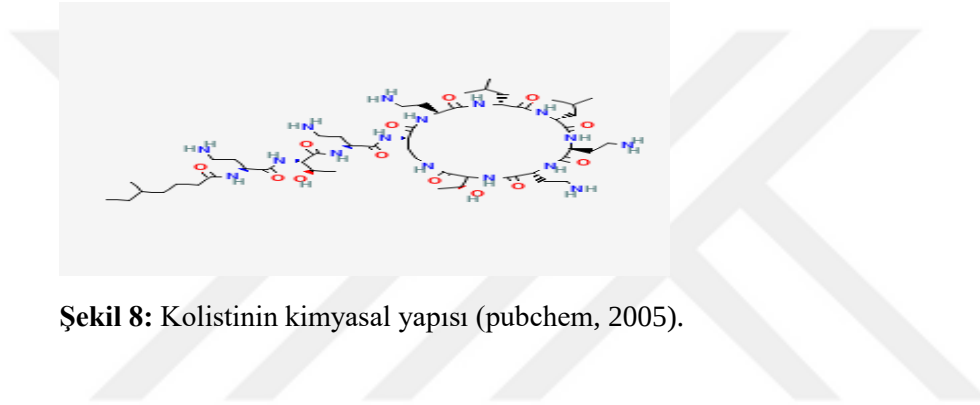
1947 yılında keşfedilen (Koyama, 1950) kolistin diğer adıyla polimiksin E, *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*’dan elde edilmiştir. Polimiksin grubu antibiyotikler 1950’li yıllarda piyasaya çıkmış ve kullanıldıklarında düşük direnç ile karşılaştıklarından dolayı mucize antibiyotik olarak adlandırılmıştır (Baron ve diğ. 2016). Toksik etkilerinden dolayı terk edilen kolistin 2000’li yıllardaki çoklu antibiyotik dirence sahip gram negatif bakterilerin geliştirdikleri direnç seviyeleri ve sayıları ile birlikte tekrar gündeme gelmiştir (Olaitan ve diğ. 2014).

2.19.1 Kolistin Kimyasal Özellikleri

Kolistin, bir a-amid bağlantısı yoluyla bir yağ asidi zincirine bağlanan katyonik bir siklik dekaeptitten meydana gelmektedir (Katz ve Demain, 1977). Kolistin molekül ağırlığı 1750 Da’dır ve kolistin molekülündeki amino asit bileşenleri D-lösin, L-treonin ve L-a-y-diaminobütirik asittir. Sonuncusu, 6-metil-oktan-oik asit (kolistin A) veya 6-metil-eptanoik asit (kolistin B) olarak tanımlanan yağ asidine bağlanmıştır. Ticari kolistin preparatları kolistin A ve B’ den farklı miktarlarda içerebilmektedir (Storm ve diğ. 1977).

Kolistinin moleküler formülü $C_{52}H_{98}N_{16}O_{13}$ 'dür. Kolistinin 2 temel preparatı bulunmaktadır. Bunlar kolistin sülfat ve kolistimethasodyumdur. Kolistin sülfat daha etkili bir antibiyotiktir ve daha toksiktir. 2 preparatında uygulanma yolları farklıdır (Beveridge ve Martin, 1967).

Poliipeptit yapılu bir antibiyotik olan kolistin Polimiksin B ile benzer kimyasal yapıya sahiptir. Heptopeptid halka içeren 10 amino asitten meydana gelen amid bağı ve 2-4 aminobütirik asitle birleşmiş yağ asit kuyruğundan oluşan kimyasal yapıya sahip bir antibiyotiktir (Ustaçelebi, 1999).

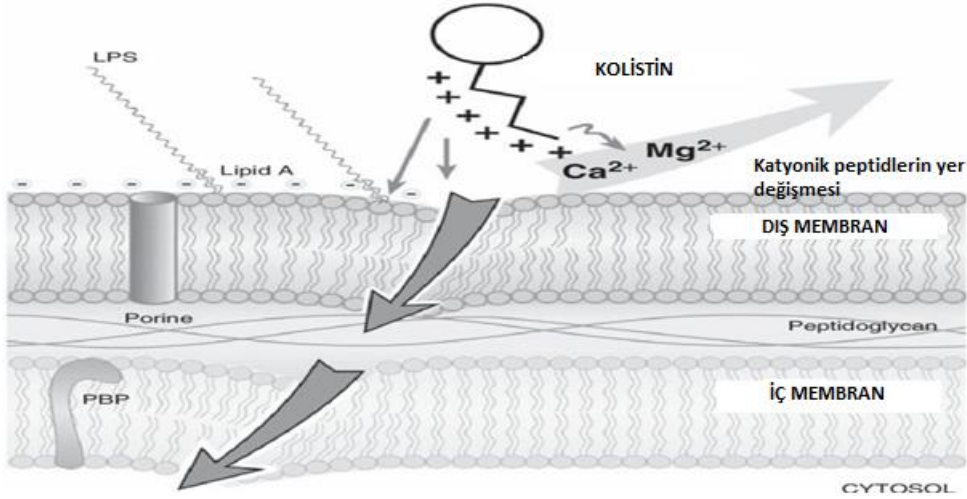


Şekil 8: Kolistinin kimyasal yapısı (pubchem, 2005).

2.19.2. Kolistinin Etki Mekanizması

Kolistin dar spektrumlu bir antibiyotik olup asıl etkili olduğu bakteri grubu gram negatif bakterilerdir. Kolistinin ana hedefi bu bakteri grubun hücre zarlarının liposakkarit (LPS) tabakasıdır. Liposakkarit tabakasının dış kısmında lipid A tabakası bulunmaktadır ve katyonlar ile etkileşime girer. Kolistin pozitif yüklü olması sayesinde bağ kurabilmekte ve hücre membranında bozulmalara neden olmaktadır (Baron ve diğ. 2016).

Dış zar geçirgenliğini değiştiren kolistin, iç zara nüfus eder ve çift katlı fosfolipid tabakasının yapısını bozarak bakteri yapısını bozar ve bakterinin ölümü gerçekleşir. Diğer bir etkisi de serbest radikallerin bakteri DNA'sına zarar vermesi ve endotoksinlerin lipid tabakasına zarar vermesidir (El Sayed Ahmed ve diğ. 2020).



Şekil 9: Kolistin etki mekanizması (Bialvaei ve Samadi, 2015).

2.20. *E.coli*'de KOLİSTİN DİRENCİ

2.20.1. Kromazomal Direnç Gelişimi

E. coli'de gerçekleşen kromazomal mutasyonlar sonucu kolistin direnci oluşabilir. Yaygın olarak görülen direnç mekanizmalarından birisi kasyonik gruplar (pEtN ve L-Ara4N) aracılığıyla gerçekleşen lipid tabakasındaki değişimdir (Liu ve diğ. 2016). Enzimleri kodlayan operonlardan olan pmrC geni, pmrE geni ve pmrHFIJKLM operon düzenleyici genlerdeki modifikasyonlardan sorumludur (Gunn, 2008).

İki bileşenli sistemler PhoPQ ve PmrAB (antimikrobiyel peptilere karşı hücre zarında değişiklik oluşmasını sağlayan moleküller) (Hua ve diğ. 2020), LPS zarına kasyonik grupların eklenmesiyle LPS modifikasyonlarından büyük ölçüde sorumludur. (Gunn, 2008).

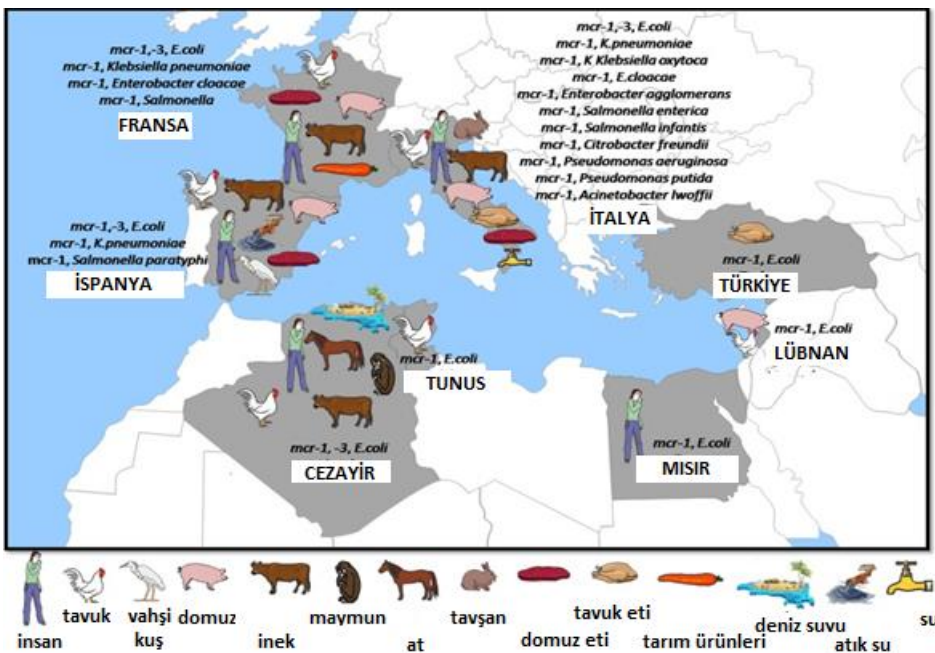
2.20.2. Plazmid Aracılı Direnç

2015 yılına kadar *E. coli*'de gerçekleşen kolistin direncinin kromozomal modifikasyonlar sonucu olduğu bildirilmiştir. Ancak ilk plazmid aracılı transfer edilebilir kolistin direncinin 2015'de keşfedilmesi dünya sağlığı açısından oldukça endişe vericidir (Liu ve diğ. 2016).

Fosfoetanolamin transferaz ailesinin bir üyesi olan mcr-1 kromozomal mutasyonların etkisine benzer şekilde lipid A tabakasına etki ederek kolistinin bağlanmasını zorlaştırmaktadır.

İlk mcr-1 genin taşıyan plazmit, plazmit uyumsuzluk tipi IncI2'dir (Liu ve diğ. 2016). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalar sonrası IncF, IncHI1, IncY, IncX4, IncP ve IncHI2 plazmitlerinin de mcr-1 taşıdığı tespit edilmiştir (Hasman ve diğ. 2015; Poirel ve diğ. 2017).

Mcr-1 keşfinden sonra bu konudaki varyantların tespit çalışmaları hızlanarak, mcr-2'nin varlığı Belçika'da bildirildi ve mcr 1 proteini ile % 80,65 benzerlik gösterdiği saptanmıştır (Xavier ve diğ. 2016). Mcr-3 domuzdan elde edilen *E. coli* izolatında bulundu ve mcr-1 ile % 45, mcr-2 ile % 47 nükleotit dizi olarak benzerlik göstermiştir (Yin ve diğ. 2017). Mcr-4 geni *Salmonella* izolatında keşfedilmiştir ve ardından Avrupa da domuzlardan elde edilen izolatlarda bu direnç geni rapor edilmiştir (Carattoli ve diğ. 2017). Mcr-5 geni *Salmonella enterica* serovar *Paratyphi* B suşunda çiftlikten elde edilen örneklerde Almanya'da tespit edilmiştir (Borowiak ve diğ. 2017). Mcr-6, mcr-2 ile % 87,9 benzerlik gösteren bir gen olduğu tespit edilmiştir (AbuOun ve diğ. 2018). Mcr-7.1 Çin'de tavuk örneklerinden elde edilen *Klebsiella pneumoniae* izolatlarında bulunmuştur ve mcr-7.1. mcr-1 ile % 70 benzerlik göstermiştir (Yang ve diğ. 2018). Çin'de Mcr-8 *Klebsiella pneumoniae* izolatında bulunmuş ve mcr-1 ile % 31,08, mcr-2 ile % 30,26, mcr-3 ile % 39,96, mcr-4 ile % 37,85, mcr-5 ile % 33,51, mcr-6 ile % 30,4 ve mcr-7 ile % 37,46 benzerlik gösterdiği rapor edilmiştir (Wang ve diğ. 2018). Mcr-9 *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* suşunda Amerikada tespit edilmiş ve mcr-3 geni ile % 64,5 benzerlik göstermiştir (Caroll ve diğ. 2019). Mcr-10, mcr-9 ile % 79,69 ile benzerlik göstermekte olup *Enterobacter roggenkampii* suşunda keşfedilmiştir (Wang ve diğ. 2020).



Şekil 10: Mcr-1 ve mcr- 3 genlerinin akdeniz havzasında dağılımı (Toutai ve diğ. 2020).

2.20.3. Kolistine Karşı Heterodirenç

Duyarlı bir izolat içinde antibiyotiğe dirençli bir alt popülasyonun oluşması anlamına gelen heterodirenç kolistin ile yapılan tedavilerin başarısını düşürdüğü düşünülmektedir (Falagas ve diğ. 2008; Hernan ve diğ. 2009).

Rutin analizlerde yanlış sonuçlara neden olabilen heterodirenç ölümle sonuçlanabilen süreçlere neden olabilmektedir. Bu nedenle çoklu antibiyotik dirençli bakterilere karşı kombine kolistin tedavileri uygulanmaktadır (Band ve diğ. 2016).

2.21. KOLİSTİN DİRENCİ SAPTAMA YÖNTEMLERİ

Beşeri ve Veteriner Hekimlik'te önemi artan ve son çare antibiyotiklerinden biri olan kolistine karşı oluşan direncin belirlenmesinde çeşitli yöntemler uygulanabilmektedir (EUCAST, 2017).

2.21.1. Disk Diffüzyon

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında sık kullanılan yöntemlerden olan disk diffüzyon gibi duyarlılık tespiti yöntemleri kolistin direncinin araştırılmasında kullanılamamaktadır. Bunun nedeni kolistinin molekül yapısının büyük olması ve agara yeterince diffüze olmamasıdır (Süleymanoğlu ve diğ. 2022).

2.21.2. Gradiyent Test

Birçok antibiyotik direnç duyarlılık testinde güvenilir olarak kabul edilen testlerden olan E test kolistinin molekül büyüklüğünden dolayı kullanımı güvenilir değildir (Poirel ve diğ. 2017).

2.21.3. Agar Dilüsyon

Kolistin direnci tespitinde uygun görülmemektedir (Poirel ve diğ. 2017).

2.21.4. Sıvı Mikrodilüsyon

Antibiyotik dirençlerinin araştırılmasında önemli bir konu olan MİK değerinin saptanması için altın standart sıvı mikrodilüsyon testidir (Leclercq ve diğ. 2013).

2.21.5. Disk Elüsyon Yöntemi

Disk elüsyon yöntemi disk diffüzyon gibi ucuz bir yöntem olmakla beraber disk difüzyona göre kolistin direncinin saptanmasında daha doğru sonuçlar vermektedir (Koyuncu ve diğ. 2019)

2.21.6. Kolistin Agar

Disk diffüzyon yönteminden daha güvenilir bir yöntem olan kolistin agar rutin laboratuvarlarda uygulanabilecek bir yöntemdir (Humphries ve diğ. 2019).

2.21.7. Otomatize Sistemler

Otomatize sistemler iş yükünü düşüren ve daha hızlı sonuç almaya yardımcı olan teknolojik gelişmelerden olup birçok antibiyotik duyarlılık testi için kullanılmaktadır. Ancak, kolistin direnç araştırmalarında güvenilir datalar elde edilemeyebilir (Koyuncu ve diğ. 2019).

2.21.8. MALDI-TOF

Antibiyotik direncinin hızlı şekilde analiz edilme gereksinimi bu yöntem ile olabilmekte ve *E. coli* suşları için optimizasyon çalışmaları devam etmektedir (Dortet ve diğ. 2018; Sorensen ve diğ. 2020).

2.21.9. Moleküler Genetik Analizler

Kolistin direncinin oluşmasına etki eden gen veya gen bölgelerini ortaya çıkarmaya dayana moleküler genetik metodlar kolistin direnç tespitlerinde güvenilir testler olarak kabul edilmektedir. PZR (Yıldız ve diğ. 2021; Yoon ve diğ. 2018) , PFGE (Hazıroğlu ve Karagöz, 2020), NGS (Cha ve diğ. 2020; Odoi ve diğ. 2021), WGS (Otter ve diğ. 2017; Guenther ve diğ. 2017), MLST (Hu ve diğ. 2013; Payne ve diğ. 2016).

2.22. YUMURTA ve TAVUKLARDAN ELDE EDİLEN *E. coli* SUŞLARINDA KOLİSTİN DİRENCİ

Kolistin direncinin plazmid kökenli yayılabilmesi küresel sağlığı tehdit eden bir konu olup bu konunun bilim dünyasında yankı uyandırması tavuk etlerinden elde edilen *E. coli* suşlarında mobilize kolistin direncinin saptanması ile gerçekleşmiştir (Liu ve diğ. 2016; Süleymanoğlu ve diğ. 2022).

Tek sağlık konsepti ile bağlantılı olan hayvan ve hayvansal ürünlerden insanlara taşınabilen kolistin direncinin yayılmasında tavuk ve tavuk yumurtasının önemi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Araştırmalara daha çok tavuk etlerinde gerçekleşmiş olup incelenen örneklerde endişe verici sonuçlar gösterilmiştir (Irrgang ve diğ. 2016; Joshi ve diğ. 2019).

Zou ve diğ. (2021), Çin’de bulunan 10 şehirden 7 yumurtacı, bir broyler çiftliği ve 17 canlı hayvan pazarında toplam 929 *E. coli* izolatu izole etmişler ve 22 tanesinin PZR yöntemi işe ExPEC olduğunu tespit etmişlerdir. 22 adet *E. coli* izolatının 2 adedinde hem mcr-1 hem de bla_{NDM} geni olduğunu saptamışlardır.

Yang ve diğ. (2017) Çin’de farklı 20 bölgeden 2010-2015 yılları arasında hasta tavuklardan 1136 *E. coli* izolatu elde etmiş ve PZR ile sanger sekans analizleri sonucu 58 izolatta mcr-1 geni bulmuştur.

Ahmed ve diğ. (2020) Bangladeş’de etlik tavuk üretim döneminin 3 farklı zamanında topladıkları tavuk dışkılarında 1200 kommensal *E. coli* suşu tespit etmiştir. 1200 izolatın 305 tanesinde mcr-1 geni varlığını multipleks PZR ile gözlemlenmiş ancak; mcr-2, mcr-3, mcr-4 ve mcr-5 genleri saptanamamıştır.

Irrgang ve diğ. (2016) Almanya’da besi hayvanları ve gıdalarda yaptıkları analizler sonucu 10.600 *E. coli* suşu bulunmuştur. Fenotipik kolistin direnci (MİK değeri >2 mg/l) açısından yaptıkları taramalar sonucu 505 izolatın kolistin direncine sahip olduğunu belirlemiştir ve mcr-1 geni yönünde gerçek zamanlı PZR ile analizleri sonucu 402 suşta mcr-1 tespit etmiştir.

Sodagari ve diğ. (2021), 2172 adet yumurtayı perakende satış noktalarında toplamışlar ve 181 numune olacak şekilde gruplandırmışlardır. Analiz sonucunda 36 *E. coli* suşu tespit edilmiş, ancak kolistin direnç varlığı tespit edilmemiştir.

Vounba ve diğ. (2019) Kanada’dan 108, Senegal’den 93 ve Vietnam’dan 126 potansiyel tavuk dışkısından elde edilen GSBL/AmpC üreten *E. coli* izolatu üzerinde broth mikrodilüsyon

ve PZR yöntemleriyle kolistin direnci hakkında çalışmıştır. Kanada'dan elde edilen örneklerde direnç saptanmazken, Senegal'den toplanan örneklerde % 2,2 fenotipik direnç saptanmıştır. Vietnam'dan alınan numunelerin 13 tanesinde fenotipik direnç belirlenmiştir ve fenotipik direnç sahibi suşların 11'inde mcr-1 geni saptanmamıştır. Hiçbir örnekte mcr-2 geni bulunmamıştır.

Kurekçi ve diğ. (2018) Hatay ve Adana illerindeki market ve kasaplardan toplam 80 adet tavuk örneğinde 4 adet *E. coli*'nin MIC >8µg/m kolistin direncine sahip olduğu ve 4 suşunda yaptıkları PZR analizi sonucu mcr-1 genine sahip olduğunu belirtmiştir.

Zhang ve diğ. (2022) Çin'de tavuklardan 1674 swab örneği toplamış ve 1132 adet *E. coli* suşu izole etmişlerdir. Broth mikrodilüsyon yöntemiyle kolistin duyarlılığını incelemişler ve 131 adet izolatta kolistin direnci tespit etmişlerdir. Mcr-1, mcr-2, mcr-3 mcr-4 ve mcr-5 gen varlığına yönelik yaptıkları multipleks PZR analizleri sonucu 51 izolatta mcr-1 varlığı bildirilirken diğer mcr tipleri bulunamamıştır.

Chaalal ve diğ. (2021), Cezayir'de 181adet tavuk eti örneği analiz etmişler ve 17 adet kazanılmış kolistin dirençli *E. coli* suşu bulmuşlar; 17 adet suşun 11 tanesinde PZR yöntemi ile mcr-1 geni tespit etmişlerdir.

Joshi ve diğ. (2019) Nepal'de 180 çiğ tavuk etinde yaptıkları analiz sonucu 60 adet *E. coli* izolatu elde ederek bu izolatların 16 tanesinde mcr-1 geni bulmuşlardır.

3. YÖNTEM

3.1 GEREÇ

3.1.1 Tavuk Yumurtası Örnekleri

Bu çalışmada 2021 yılında İstanbul ilindeki çeşitli semt ve ilçelerdeki (Silivri, Beylikdüzü, Avcılar, Tuzla, Kadıköy) bakkal, market, semt pazarları, kasap ve peynir dükkanlarından tavuk yumurtaları temin edilmiştir. Bu kapsamda 120 adet tavuk yumurtası steril poşetler içine konup yerinde kayıt altına alınarak soğuk muhafaza koşullarında (+4°C) kutulara konup paketlenmiştir. Örnekler haftalık 20 adet olacak şekilde 6 haftada temin edilmiş ve çalışmada seçilen yumurtaların, alınan örnek grubunu temsil etmesine özen gösterilmiştir.

Numune kutuları ivedilikle İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı Laboratuvarına ulaştırılmıştır. Ulaşan yumurta örnekleri kayıt altına alınarak düzenli olarak kaydedildi ve mevcut çalışma için stoklanmıştır. Örnekler üzerinde yapılacak mikrobiyolojik analizlerin doğruluğunun etkilenmemesi için ivedilikle *E. coli* açısından tespit çalışmaları yapılmaya başlanmıştır.

3.1.2. Kalite Kontrol Suşları

Mevcut çalışmada *E. coli* izolasyonu ve identifikasyonunun değerlendirilmesi *E. coli* ATCC 25922, kolistin fenotipik direnci ve mcr-1 gen varlığı tespitinden *E. coli* NCTC 13846 referans suşu kullanılmıştır.

3.1.3. Analiz için Laboratuvarda Kullanılan Ekipmanlar ve Aletler

- Etüv (Memmert, IN55, Almanya)
- Stomacher (Interscience, Fransa)
- Elektrikli pipet pompası (Isolab, Almanya)
- Hassas terazi (Sartorius, CP224S, Almanya)
- Terazi (RADWAG, WTB2000, Polonya)
- Elektronik saat (Isolab, Türkiye)
- Otoklav (Hirayama, HV-50L, Japonya)
- +4°C ve -20°C'lik çift kapılı buzdolabı (Samsung, RSA1STSL, Güney Kore)

- Steril biogüvenlik kabin (Class II, Amerika Birleşik Devletleri)
- Vorteks karıştırıcı 2500 devir/dakika (Velp Scientifica, İspanya)
- Mc Farland Densitometresi (Biosan, Litvanya)
- Mikropipet (10-100-1000 Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri)
- Santrifüj (Hettich, Micro 120, Almanya)
- Mini santrifüj (Isolab, D1008, Almanya)
- Çalkalamalı su banyosu (Memmert, Almanya)
- Kuru Blok (Grant-Bio, PCH-2, İngiltere)
- Jel görüntüleme sistemi (Viber Lourtmat, Almanya)
- Thermal cycler PCR cihazı (Biorad, PTC0200, Meksika)
- Epoch2 (BioTek, USA)
- Güç kaynağı ve elektroforez sistemi (Thermo Fisher Scientific, EasycastB1, Amerika Birleşik Devletleri)

3.1.4. Analizlerde Kullanılan Besiyerleri

Tryptone Bile X glucuronide Agar (Oxoid CM0945)

Formülasyon	g/L
Tryptone	20.0
Bile Salts No. 3	1.5
Agar	15.0
X-glucuronide	0.075

pH 7.2 ± 0.2 @ 25°C

36.6 gr Tryptone Bile X glucuronide Agar (Oxoid CM0945) 1000 ml distile su içerisine eklenerek homojenize edildikten sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

Eosin Methylene Blue Agar (Modified) Levine (Oxoid CM0069)

Formülasyon	g/L
Peptone	10.0
Lactose	10.0
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0
Methylene blue	0.065
Agar	15.0

pH 6.8 ± 0.2

37.5 gr Eosin Methylene Blue Agar (Oxoid CM0069) 1000 ml distile su içerisinde eklenerek homojenize edildikten sonra 121°C de 15 dakika sterilize edildi.

Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid CM0131)

Formülasyon	g/L
Pancreatic digest of casein	15.0
Enzymatic* digest of soya bean	5.0
Agar	15.0

pH 7.3 ± 0.2 @ 25°C

40 gr Tryptone Soya Agar (Oxoid CM0131) 1000 ml distile su içerisinde eklenerek homojenize edildikten sonra 121°C' de 15 dakika sterilize edildi.

Tryptone Soya Broth (TSB) (Oxoid CM 129)

Formülasyon	g/L
Pancreatic digest of casein	17,0
Enzymatic digest of soyabean meal	3,0
Sodium chloride	5,0

Dipotassium hydrogen phosphate 2,5

Glucose 2,5

pH 7.3 ± 0.2 , 25 °C’de

30 gr Tryptone Soya Broth (Oxoid CM 129) 1000 ml distile su içerisinde eklenerek homojenize edildikten sonra 121°C de 15 dakika sterilize edildi.

Mueller-Hinton Agar (MHA) (Oxoid CM 0337)

Formülasyon	g/L
Beef, dehydrated infusion from	300
Casein hydrolysate	17,5
Starch	1,5
Agar	17,0

pH 7.3 ± 0.1 , 25 °C’ de,

38 gr Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM 0337) 1000 ml distile su içerisinde eklenerek homojenize edildikten sonra 121°C de 15 dakika sterilize edildi.

Moleküler Analizlerde Kullanılan Solüsyon ve Malzemeler

- SDS pure Ph. Eur. (AppliChem, A4259, 1000)
- Trizma® Base (Sigma-Aldrich, T1503, CAS no: 77-86-1)
- Phenol/Chloroform/Isoamyl Alcohol (Amresco, K169)
- Ethanol Absolute (Sigma-Aldrich, 32221)
- 25 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific)
- 10X Tag Buffer with KCL (Thermo Fisher Scientific)
- Tag DNA Polymerase 5 U/μL, 500 U (Thermo Fisher Scientific, EP0402)
- Lysozyme 50000U/mg (Merck, 05281)
- 10 mM Tris-HCL, pH 8,0
- Safe View Classic (ABM, G108)

- GeneRuler 100 bp DNA Ladder 0,5 µg/µl, 50 µg (Thermo Fisher Scientific, SM0241)
- 2- Propanol (Sigma-Aldrich, 24137)
- Seakem® LE Agarose (Lonza, 50004)
- Proteinaz K (SIGMA P2308-100MG)
- SDS pure Ph. Eur. (AppliChem, A4259, 1000)
- Glycerol (Sigma-Aldrich, G5516, Germany)

3.2. YÖNTEM

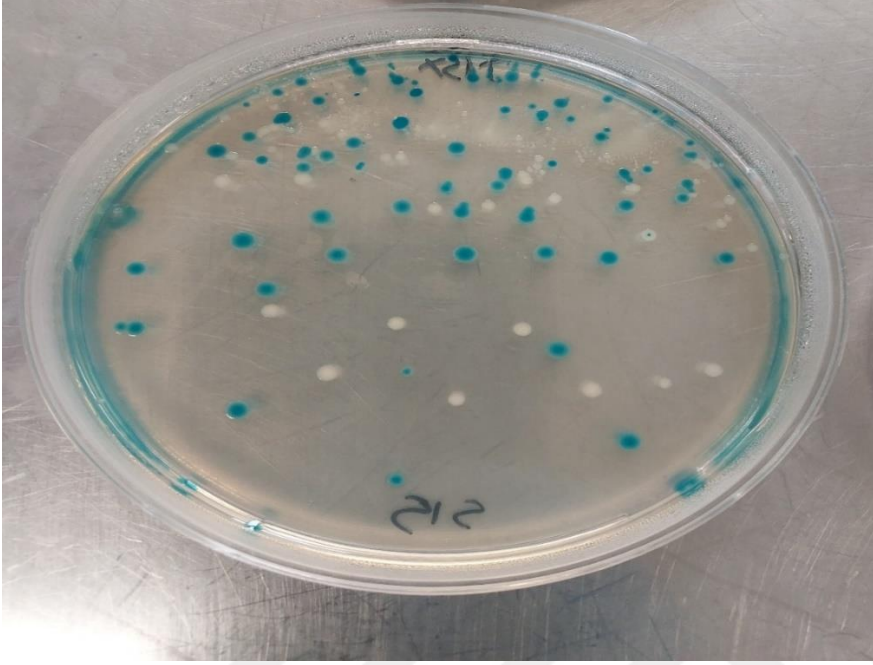
3.2.1. *E. coli* İzolasyonu

Yumurta, kabukları ve iç kısmının birbirinden ayrılması için dikkatlice birbirinden ayrılmıştır. Yumurta kabuklarının iç yüzeyinde kalan antimikrobiyel madde olan albüminin bakteri varlığına etki etmemesi için kabukların iç kısmı steril fosfatlı tuzlu su ile yıkanmıştır. Yumurta kabuğu yüzeyinde *E. coli* varlığının araştırılmasında Musgrove ve diğ. (2006) tarafından önerilen yöntem kullanılmıştır.

Kırılan yumurta kabukları Stomacher poşetine konularak elle ezilmesi sağlanmıştır. Sızıntıların önlenmesi amacıyla için 2 adet stomacher poşeti kullanılmıştır.

E. coli izolasyonu için ISO 16649-1:2018 standardı kullanılarak; 25 gr yumurta kabuğu üzerine 225 ml Buffer Peptone Water (BPW) ilave edilmesinden sonra 2 dk. Stomacher (Interscience, Fransa) homojenize edilmiştir. Daha sonra TSB'de (Oxoid CM 129) 37 °C'de 24 saat etüvde örnekler inkübe edilmiştir.

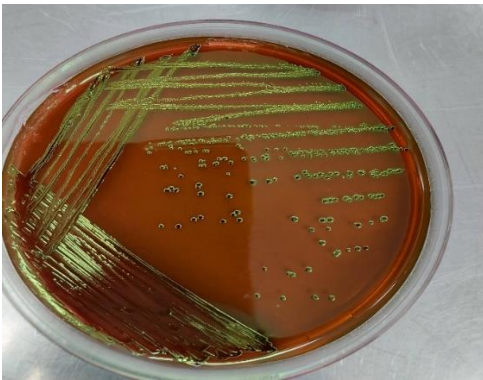
İnkubasyon sonrası, örneklerden kromojenik Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) Agar (Oxoid, UK) üzerine homojenat konularak drigalski çomağı yardımı ile agar yüzeyine yayılmıştır. Besiyerleri 44 °C'de 24 saat inkübe edildikten sonra mavi-yeşil koloni morfolojileri *E. coli* şüpheli kabul edilmiştir.



Şekil 11: TBX agarda *E. coli* karışık suş görüntüsü

3.2.2. EMB Agarda *E. coli* Doğrulama

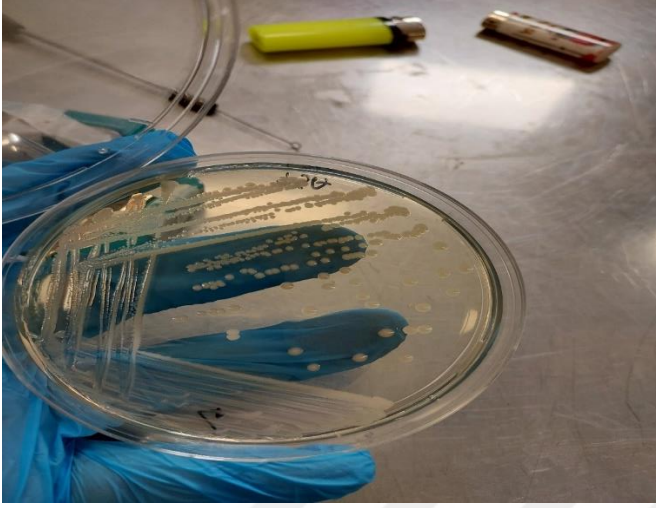
TBX agarda şüpheli tespit edilen koloniler, Eosin Methylene Blue Agar (Oxoid, CM0069)'a mikrobiyolojik olarak doğrulamak amacıyla geçilmiştir. Şüpheli izolatların ekimini müteakip petri plakları 37 °C'de 24 saat etüvde inkübe edilerek siyah renkli merkezi olan yeşil metalik parlaklık gösteren koloniler *E. coli* pozitif kabul edilmiştir.



Şekil 12: EMB agarda *E. coli* suşu görüntüsü

3.2.3. Saflaştırma ve Stoklama

Şüpheli izolatların saflığı Tryptone Soy Agar'a (Oxoid, CM 0131) geçilerek 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek kontrol edilmiştir. Saf izolatlar daha sonrada kullanılabilmesi için % 20 gliserollü (Sigma-Aldrich, G5516, Germany) Tryptone Soya Broth (Oxoid, CM 129) solüsyonunda -20 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 13: TSA agarda saf *E. coli* suşu

3.2.4. DNA Ekstraksiyonu

Moleküler genetik testler için elde edilecek genomik DNA ekstraksiyonu Liu ve diğ. (2004) geliştirdikleri method doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

Şüpheli *E. coli* suşları cam tüpte TSB'de (Oxoid, CM 129) 37 °C'de 24 saat inkübe edilerek 2 mililitrelik eppendorf tüpler içerisine 750 µl bakteri süspansiyonu konulmuş ve eppendorf tüpler 10.000 rpm'de 5 dakika santrifüj (Hettich, Micro 120, Almanya) edilmiştir.

Santrifüj sonrası bakteri süspansiyonunun canlı kısmı dipe çökmektedir. Üst kısım, otomatik pipet yardımı ile uzaklaştırılmıştır. Peletin üzerine 500 µl 4 mg/ml lizozim (Merck, 05281) içeren 1xTE [1xTE: 10 mM Tris-HCl / 1 mM EDTA (pH:8, disodiumsalt dihydrate)] eklendi ve 37 °C'de 18 saat su banyosunda (Memmert, Almanya) bekletilmiştir. Bu sayede bakteri hücre duvarı parçalanmıştır. Lave olarak, sürenin uzaması parçalanma seviyesini arttırmaktadır.

Lizozimle parçalanmış bakteriler 20 µl 20 mg/ml proteinaz K (SIGMA P2308-100MG)/dH₂O ile muamele edilmiştir. Bu aşamada 250 µl % 10 SDS eklenerek 56°C’de 2 saat boyunca su banyosunda inkübe edilmiştir.

Daha sonra, Proteinaz K aracılığıyla hücre içi proteinlerinde parçalanması sonrası 14.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir.

Bundan sonraki aşamada DNA ekstraksiyonuna geçilmiştir. 750 µl 25:24:1 Fenol: Kloroform: İzomilalkol eklenmiştir. Eppendorf tüpleri 15-20 kere alt-üst edilerek, ki böylelikle alkol ile iyice numune ile muamele edilmiştir, 14.000 rpm’de 15 dakika santrifüj edilmiştir. Bu işlem sonucunda 3 faz meydana gelmiştir. Bunlar: akuaz faz, ara faz ve organik fazdır. Ara faza müdahale edilmeden üst faz olan akuaz faz otomatik pipet yardımıyla başka bir eppendorf tüpe alınmıştır. Ara faz çekilse dahi 2-5 saniye pipet ucu yere bakılacak şekilde tutularak protein kısmının düşmesi sağlanmıştır.

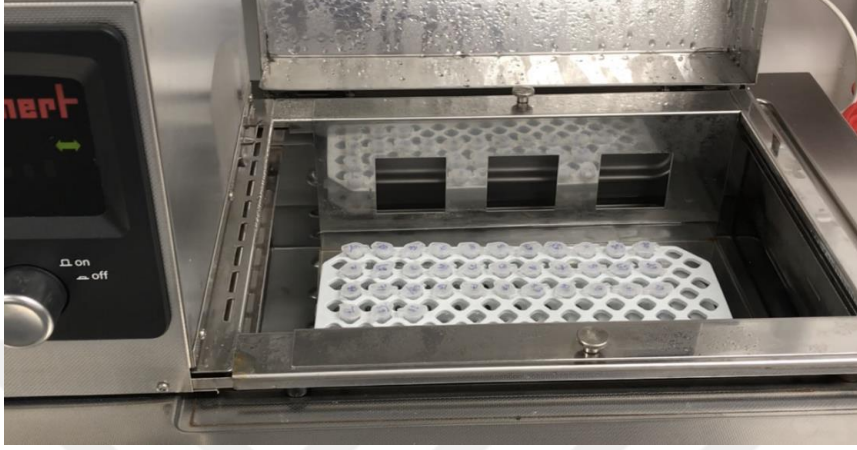
DNA çöktürme aşamasında 150 µl 5 M NaCl eklenerek 15-20 kez eppendorf tüpleri dikkatlice alt üst edilmiştir. Ardından 1:1 hacime eşdeğer (600–700 µl) isopropanol (2-propanol) (Sigma-Aldrich, 24137) eklenerek bulanık renkte olan süspansiyon berrak bir görüntü halini almıştır. Daha sonra, süspansiyon 14.000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilmiştir.

Santrifüj sonrası, eppendorf tüpünün alt kısmında toplu iğne başı büyüklüğünde DNA birikmiştir. Devamında, DNA’ya zarar vermeden eppendorf tüpler ters çevrilerek süspansiyon dökülmüştür. Eppendorfun içinde kalan damlacıklar ise eppendorf tüpler ters çevrilip damlalar peteye emdirilerek giderilmiştir. Bu aşamada DNA’nın düşmemesine özellikle dikkat edilmiştir.

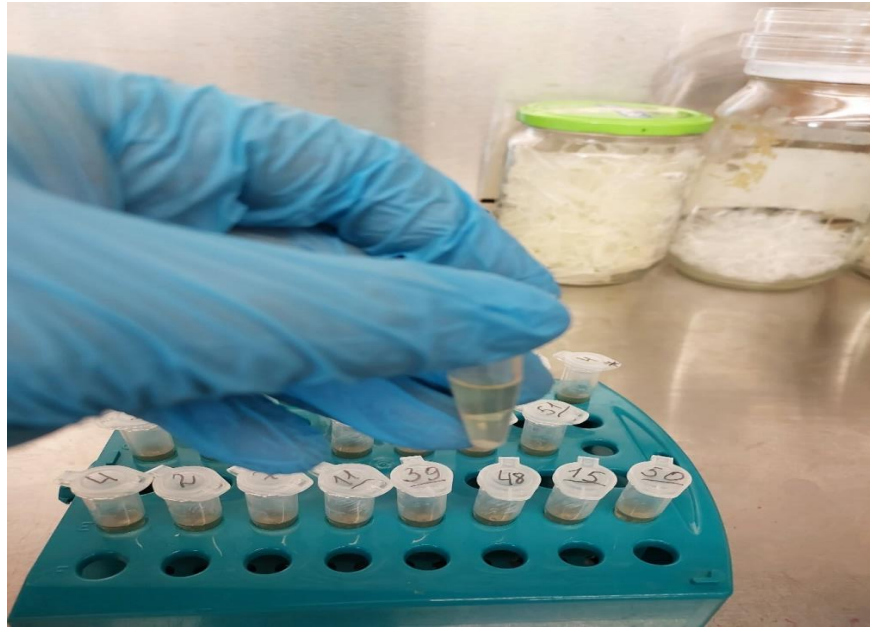
Pelet üzerine -20 °C’de bekletilen soğuk % 70’lik EtOH (Sigma-Aldrich, 32221)’den 750 µl eklenerek peletin iyice alkolle yıkanması için 5-10 sn vortekslenip 14.000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası eppendorf tüpler ters çevrilerek DNA’nın düşmemesine dikkat edilmek suretiyle alkol dökülmüştür. DNA ekstraksiyonun verimli olması için etil alkol aşaması iki kere tekrarlanmıştır.

Etil alkol aşaması bitiminde alkol dökülerek 55°C’de 45-50 dk’da Dry Block (Grant-Bio, PCH-2, İngiltere)’ta tutularak eppendorf tüplerin içerisindeki alkol uçurulmuştur. DNA miktarı ile kalitesinin ölçülmesi için mikropate okuyucu (Epoch, BioTek, USA) kullanılmıştır.

Epoch cihazında DNA kalitesinin belirlenmesinde 260/280 oranında 1,8 ile 2 değerleri arasında olmalı ve DNA yoğunluğu 100 ng/ μ l üzerinde olmalıdır.



Şekil 14: Su banyosunda DNA ekstraksiyon aşaması



Şekil 15: DNA ekstraksiyon aşamasında bakteri pelet görüntüsü



Şekil 16: Toplu iğne başı büyüklüğünde DNA görüntüsü

3.2.5. Polimer Zincir Reaksiyonu

Moleküler genetik yöntemlerinden biri olan PZR, bu çalışmada şüpheli suşların kesin tanısı ve antibiyotik direnç genlerinin varlığının araştırılması için kullanılmıştır.

3.2.6. 16S rRNA (*E. coli* spesifik) Varlığının Araştırılması

ECO 1-2 primeri (16S rRNA, *E. coli* spesifik) 585 bp 'da görüntülenebilen ve *E. coli* varlığının araştırılmasında kullanılan bir primerdir (Schippa ve diğ. 2010).

ECO 1-2 primer dizileri:

Forward primer: 5' -GACCTCGGTTTAGTTACAGA -3'

Revers primer: 5' -CACACGCTGACGCTGACCA- 3'

Şüpheli *E. coli* suşlarının genomik DNA'larının elde edilmesinden sonra spesifik ECO 1-2 primeri ile tanımlanması için PZR yöntemi kullanılmıştır. PZR analizinde her bir örnek için:

- 2,5 µl DNA
- 2,5 µl 10X reaksiyon tamponu KCl (Thermo)

- 2,5 µl dNTP karışımı (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM) (Thermo)
- 0,5 µl forward primer (10 uM)
- 0,5 µl reverse primer (10 uM)
- 1 U Taq DNA polimeraz
- dH₂O ile 25 µl'ye master mix tamamlanmıştır.

ECO 1-2 için PZR koşulları:

Başlangıç: 1 döngü 95°C'de 5 dakika

Denatürasyon: 30 döngüde 95°C 30 saniye

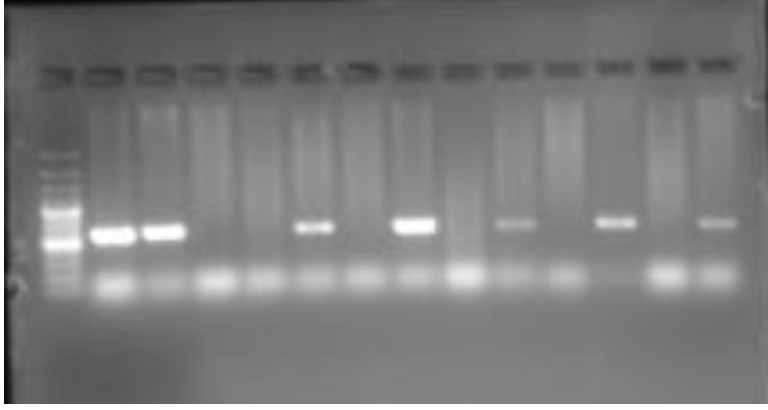
Bağlanma: 55°C 45 saniye

Uzama: 72°C 45 saniye

Son uzama: 72°C 7 dakika

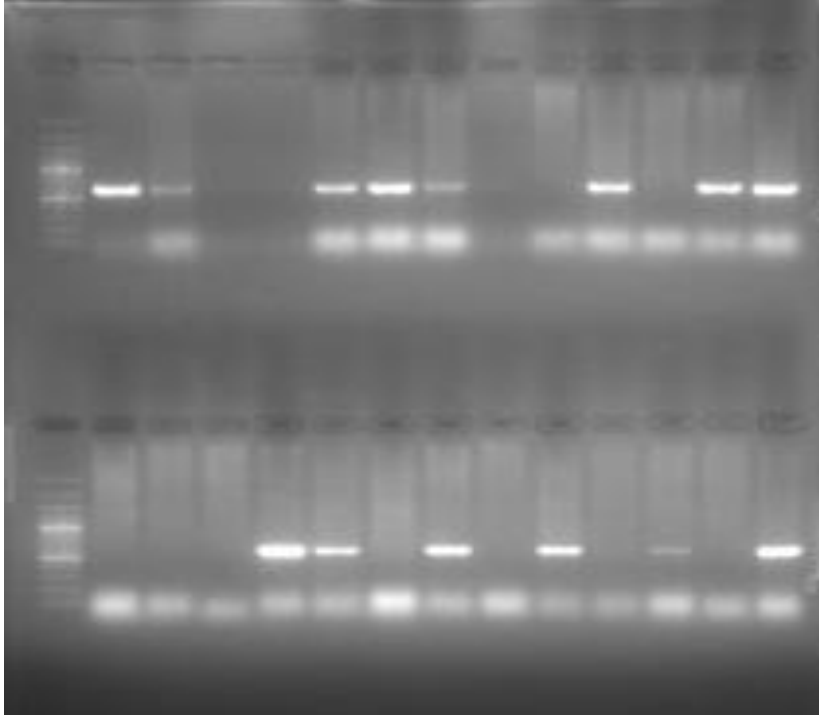
Agaroz Jel Elektroforez

PZR analizi sonucu elde edilen numuneler %1,5'lik agaroz içeren [1×TAE tamponu (0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA) içerisinde] mutajen olmayan SafeView DNA boyası (ABM, G108) eklenmiş olan jelde yatay elektroforez sisteminde (Thermo Owl B1) yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar 100 bp DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, SM0241) ile jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat) görüntülendi.



Şekil 17: Eco 1-2 PZR jel görüntüsü

Soldan sağa; 100 bp DNA ladder, *E. coli* ATCC 25922, Şüpheli *E. coli* suşlarından elde edilen genomik DNA sonuçları



Şekil 18: ECO 1-2 PZR jel görüntüsü

Soldan sağa üst sıra; 100 bp DNA ladder, *E. coli* ATCC 25922, Pozitif *E. coli* suşu, Negatif kontrol, master mix, Şüpheli *E. coli* suşlarından elde edilen genomik DNA sonuçları

3.2.7. *gyrB* Gen (*E. coli* spesifik) Varlığının Araştırılması

gyrB geni 622 bp'da görüntülenebilen ve *E. coli* varlığının araştırılmasında kullanılan bir gen bölgesidir (Iguchi ve diğ. 2015).

gyrB geni primer dizileri:

Forward primer: 5' –AGTGATCATGACCGTTCTGCA- 3'

Revers primer: 5' - TTTGTCCATGTAGGCGTTCA-3'

Şüpheli *E. coli* suşlarının genomik DNA'larının elde edilmesinden sonra spesifik *gyrB* geni ile tanımlanması için PZR yöntemi kullanılmıştır. PZR analizinde her bir örnek için:

- 2,5 µl DNA
- 2,5 µl 10X reaksiyon tamponu KCl (Thermo)
- 2,5 µl dNTP karışımı (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM) (Thermo)
- 0,5 µl forward primer (10 uM)
- 0,5 µl reverse primer (10 uM)
- 1 U Taq DNA polimeraz
- dH₂O ile 25 µl'ye master mix tamamlanmıştır.

gyrB 1-2- için PZR koşulları:

Başlangıç: 1 döngü 95°C'de 5 dakika

Denatürasyon: 35 döngü 95°C'de 30 saniye

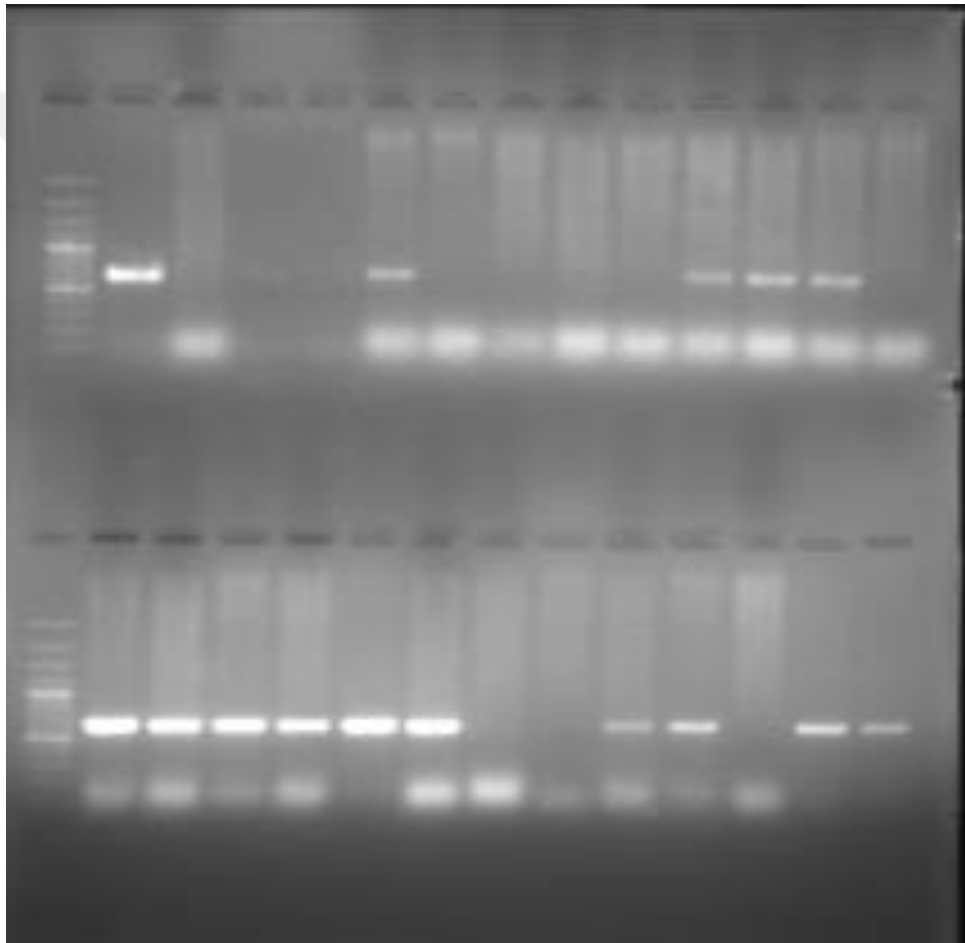
Bağlanma: 51°C'de 30 saniye

Uzama: 72°C'de 45 saniye

Son uzama: 72°C'de 7 dakika

Agaroz Jel Elektroforez

PZR analizi sonucu elde edilen numuneler %1,5'lik agaroz içeren [1×TAE tamponu (0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA) içerisinde] mutajen olmayan SafeView DNA boyası (AMB, G 108) eklenmiş olan jelde yatay elektroforez sisteminde (Thermo Owl B1) yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, SM0241) ile jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat) görüntülenmiştir.



Şekil 19: gyrB PZR jel görüntüsü

Soldan sağa üst sıra; 100 bp DNA ladder, *E. coli* ATCC 25922, Negatif kontrol, Şüpheli *E. coli* suşlarından elde edilen genomik DNA sonuçları

3.2.8. GSBL Gen Varlığının Araştırılması

Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten *E. coli* suşların GSBL gen varlığının incelenebilmesi için PZR yöntemi kullanılmıştır (Fang ve diğ. 2008).

Tablo 9: GSBL gen varlığının incelenmesi için kullanılan primer dizileri

GSBL Tipi	Primer Dizileri	Bp	Referans
bla _{SHV}	5'-CTTTATCGGCCCTCACTCAA-3' 5'-AGGTGCTCATCATGGGAAAG-3'	237	Fang ve diğ. 2004
bla _{TEM}	5'-CGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA-3' 5'-ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT-3'	445	Monstein ve diğ. 2007
bla _{CTX-M}	5'-ATGTGCAGYACCAGTAARGTKATGGC-3' 5'- TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG- 3'	593	Boyd ve diğ. 2004
bla _{OXA}	5'-ACACAATACATATCAACTTCGC-3' 5'-AGTGTGTTTAGAATGGTGATC-3'	813	Quellette ve diğ. 1987

Multipleks PZR yöntemi için örnek başına hazırlanan master mix:

- 2,5 µl DNA
- 2,5 µl 10X reaksiyon tamponu KCl (Thermo)
- 2,5 µl dNTP karışımı (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM) (Thermo)
- 0,5 µl her primer için forward primer (10 uM)
- 0,5 µl her primer için reverse primer (10 uM)
- 1 U Taq DNA polimeraz
- dH₂O ile 25 µl'ye master mix tamamlanmıştır.

Multipleks GSBL PZR için koşullar:

Başlangıç: 1 döngü 95°C'de 15 dakika

Denatürasyon: 30 döngü 94°C'de 30 saniye

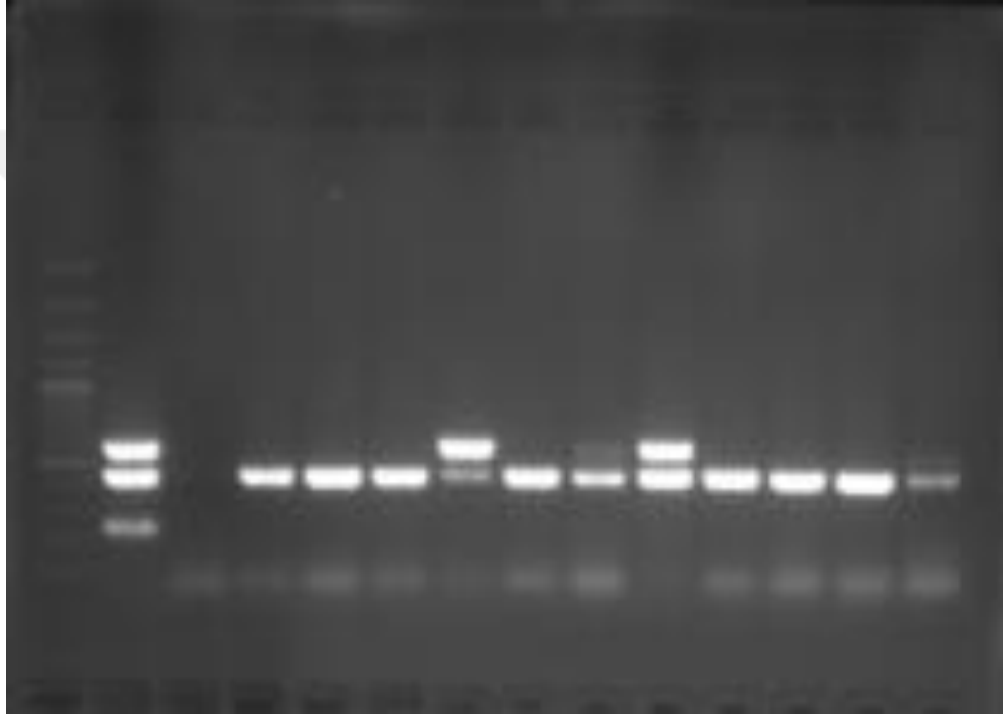
Bağlanma: 62°C'de 90 saniye

Uzama: 72°C'de 60 saniye

Son uzama: 72°C'de 10 dakika

Agaroz Jel Elektroforez

PZR analizi sonucu elde edilen numuneler %1,5'lik agaroz içeren [1×TAE tamponu (0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA) içerisinde] mutajen olmayan SafeView DNA boyası (AMB, G 108) eklenmiş olan jelde yatay elektroforez sisteminde (Thermo Owl B1) yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, SM0241) ile jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat) görüntülenmiştir.



Şekil 20: GSBL multipleks PZR jel görüntüsü

Soldan sağa; 100 bp DNA ladder, Pozitif Kontrol, Negatif Kontrol ve *E.coli* suşlarından elde edilen genomik DNA sonuçları

3.2.9. Mcr 1-5 Gen Varlığının Araştırılması

Mobilize kolistin direnç genlerinin araştırılması için multipleks PZR yöntemi kullanılmıştır (Cavaco ve diğ. 2016).

Tablo 10: Mcr 1-5 gen varlığının incelenmesi için kullanılan primer dizileri

Hedef Gen	Primer dizisi	Bp	Referans
<i>mcr-1</i>	5' –AGTCCGTTTGTTCCTTGTTGGC- 3' 5'- AGATCCTTGGTCTCGGCTTG- 3'	320	Cavaco ve diğ. 2016
<i>mcr-2</i>	5' –CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT- 3' 5'- TCTAGCCCGACAAGCATACC- 3'	715	Cavaco ve diğ. 2016
<i>mcr-3</i>	5'- AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG- 3' 5' –AATGGAGATCCCCGTTTTT- 3'	929	Cavaco ve diğ. 2016
<i>mcr-4</i>	5'- TCACTTTCATCACTGCGTTG- 3' 5' –TTGGTCCATGACTACCAATG- 3'	1116	Cavaco ve diğ. 2016
<i>mcr-5</i>	5' –ATGCGGTTGTCTGCATTTATC- 3' 5' –TCATTGTGGTTGTCTTTTCTG- 3'	1644	Borowiak ve diğ. 2017

Multipleks PZR yöntemi için örnek başına hazırlanan master mix:

- 3 µl DNA
- 2,5 µl 10X reaksiyon tamponu KCl (Thermo)
- 2,5 µl dNTP karışımı (dATP, dTTP, dGTP, dCTP)
- 1,5 µl MgCl₂ (25 mM) (Thermo)
- 0,3 µl her primer için forward primer (10 uM)
- 0,3 µl her primer için reverse primer (10 uM)
- 1 U Taq DNA polimeraz
- dH₂O ile 25 µl'ye master mix tamamlanmıştır.

Multipleks Mcr 1-5 PZR için koşullar:

Başlangıç: 1 döngü 94°C'de 15 dakika

Denatürasyon: 30 döngü 94°C'de 30 saniye

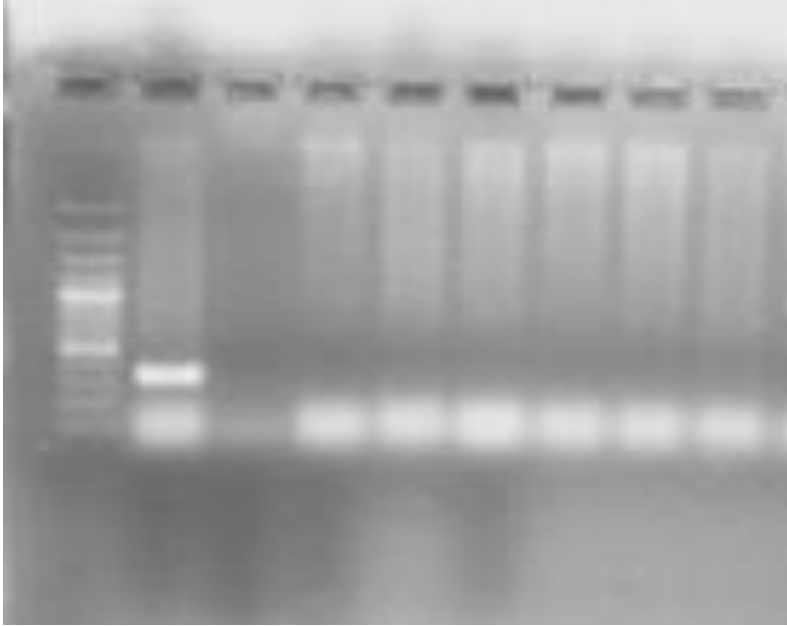
Bağlanma: 58°C’de 90 saniye

Uzama: 72°C’de 60 saniye

Son uzama: 72°C’de 10 dakika

Agaroz Jel Elektroforez

PZR analizi sonucu elde edilen numuneler %1,5’lik agaroz içeren [1×TAE tamponu (0,04 M Tris-acetate, 0,001 M EDTA) içerisinde] mutajen olmayan SafeView DNA boyası(ABM, G 108) eklenmiş olan jelde yatay elektroforez sisteminde (Thermo Owl B1) yürütülmüştür. Elde edilen sonuçlar DNA ladder (Thermo Fisher Scientific, SM0241) ile jel görüntüleme sisteminde (Vilber Lourmat) görüntülenmiştir.



Şekil 21: Mcr1-5 multipleks PZR jel görüntüsü

Soldan sağa; 100 bp DNA ladder, *E. coli* NCTC 13846, Negatif kontrol, *E. coli* suşlarından elde edilen genomik DNA sonuçları

3.2.10. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Elde edilen *E. coli* suşlarında çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının analizi disk difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla izolatlar önce TSA agarda (Oxoid, CM0131)

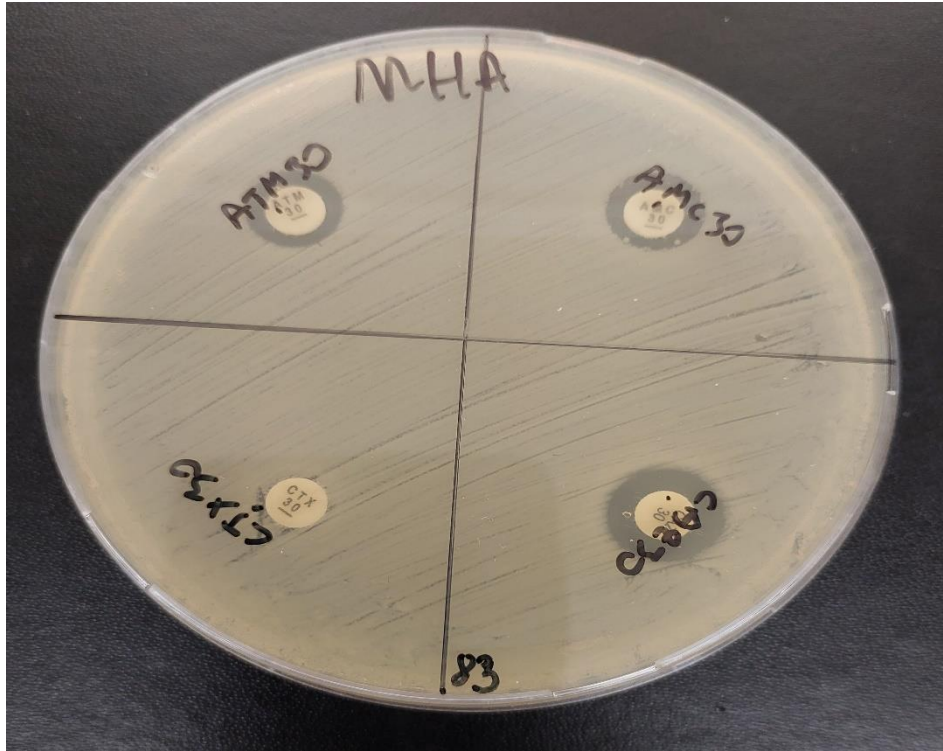
üretilek daha sonra steril swab aracılığıyla cam tüplerde fizyolojik tuzlu su içine McFarland No 0,5 bulanıklık standardına göre olacak şekilde eklenmiştir. Bulanıklık ölçümü sonrası Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM 0337) yüzeyinde ekimler gerçekleştirilmiştir. Ekim sonrası her petriye 4 adet disk olacak şekilde antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Bu çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri EUCAST (2021) ve CLSI (2022)'de *E. coli* 'ye uygun olarak değerlendirilmiştir.

Çalışmada antibiyotik duyarlılık tespiti için kullanılan diskler; Ampisilin (AMP) (Oxoid, CTOOO3B, 10 µg), Amoksisilin Klavulanik Asit (AMC) (Oxoid, CT0223B, 30 µg), Aztreonam (ATM) (Oxoid CT0264B, 30 µg) Sefotaksim (CTX) (Oxoid, CT0166B, 30 µg), Tetrasiklin (TE) (Oxoid, CT0054B, 30 µg), Siprofloksasin (CIP) (Oxoid, CT0425B, 5 µg), Nitrofurantoin (F300) (Oxoid, CT0036B, 300 µg), Amikasin (AK) (Oxoid, CT0107B, 30 µg) Seftazidim (CAZ) (Oxoid, CTO412B, 30 µg), Trimethoprim Sülfamethazol (SXT) (Oxoid, CT0025B, 1,25 µg-23,5 µg), Gentamisin (CN) (Oxoid, CTOO24B, 10 µg), Sefoksitin (FOX) (Oxoid, CT0119B, 30 µg), Kloramphenicol (C) (Oxoid, CT0013B, 30 µg), Sefuroksime (CXM) (Oxoid, CT0127B, 30 µg), Piperasillin/Tazobactam (TZP) (Oxoid, CT0725B, 110µg) ve Meropenem (MEM) (Oxoid, CT0774B,10µg)'dir.

Tablo 11: Çalışmada kullanılan antibiyotik diskleri EUCAST (2021)- CLSI (2022)

Antibiyotik Disk Adı	Dozu (µl)	Dirençli	Duyarlı
Ampisilin	10	R≤14	S≥14
Amoksisilin Klavulanik Asit (CLSI)	30	R≤13	S≥18
Aztreonam (CLSI)	30	R≤18	S≥21
Amikasin	30	R<18	S≥18
Gentamisin	10	R<17	S≥17
Sefotaksim	30	R<17	S≥20
Siprofloksasin	5	R<22	S≥25

Seftazidim (CLSI)	30	$R \leq 17$	$S \geq 21$
Sefoksitin	30	$R < 19$	$S \geq 19$
Sefuruksim	30	$R < 17$	$S \geq 50$
Kloramfenikol	30	$R < 17$	$S \geq 17$
Trimetoprim Sülfametazol	25	$R < 11$	$S \geq 14$
Tetrasiklin (CLSI)	30	$R \leq 11$	$S \geq 15$
Nitrofuran (CLSI)	300	$R \leq 14$	$S \geq 17$
Meropenem	10	$R < 16$	$S \geq 22$
Piperasilin/ Tazobaktam	110	$R \leq 17$	$S \geq 21$
CLSI; CLSI (2022) rehberini temsil eder.		R: Direnç	S: Duyarlı

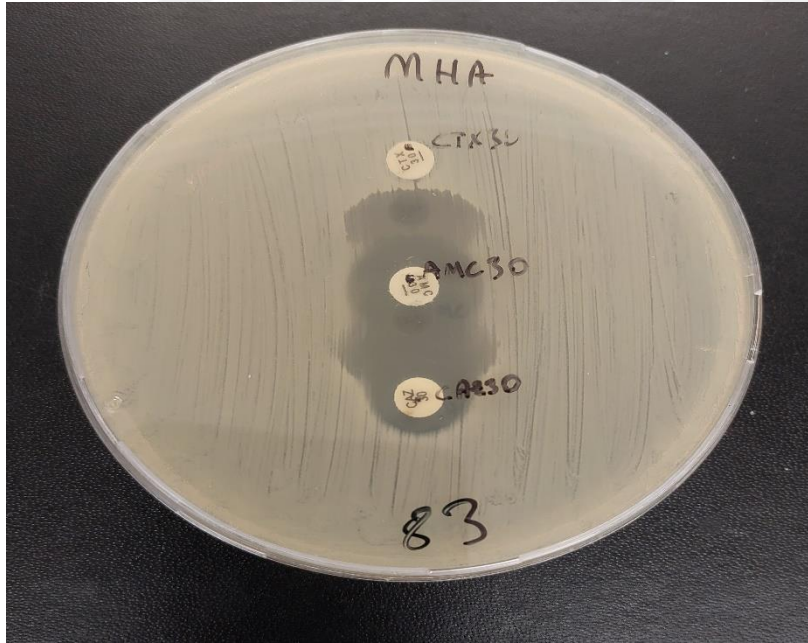


Şekil 22: Disk diffüzyon görüntüsü

3.2.11. GSBL Fenotipik Doğrulama Testi

Bu çalışmada GSBL üreten *E. coli* varlığının fenotipik doğrulamasının yapılabilmesi için çift disk sinerji testi kullanılmıştır. Çift disk sinerji testi, izolatların önce TSA'da (Oxoid, CM0131) üretilmesi ve daha sonra swab aracılığıyla cam tüplerde fizyolojik tuzlu su içine McFarland No 0,5 bulanıklık değerine getirilip Mueller-Hinton Agar (Oxoid, CM 0337) yüzeyine sıkı bir şekilde ekimlerinin gerçekleştirilmesi ve ortada amoksisilin klavulanik asit (Oxoid, CT0223B, 30 µg) ve 20 mm yan tarafında sefotaksim (Oxoid, CT0166B, 30 µg) ile seftazidim (Oxoid, CTO412B, 30 µg) disklerinin yerleştirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra petriler 37 °C'de 24 saat inkübasyon için inkübatöre konulmuştur.

Sefalosporin grubu disklerin herhangi birinin klavulanik asitli diske bakan kısmına doğru zonun genişlemesi testin pozitif olarak kabul edilmesi olarak yorumlanmaktadır (EUCAST, 2017).



Şekil 23: Çift disk sinerji testi görüntüsü

3.2.12. Fenotipik Kolistin Direncinin Saptanması

İzole edilen suşlarda kolistin direncinin fenotipik olarak incelenmesi için Kolistin Agar kullanılmıştır (CLSI 2020). Kolistin Agar 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL ve 0 µg/mL olan kontrol agarı olarak hazırlanmıştır. Kolistin agar hazırlanması için Mueller-Hinton Agar (Oxoid CM 0337) ve kolistin sülfat (Acros, 455392500) kullanılmaktadır.

Kolistin agar hazırlanırken 20 mg kolistin sülfat ultra saf suda çözündürülmüştür. Mueller-Hinton Agar ise 121°C de 15 dakika otoklavlanıp 55 °C'ye soğutulmuştur. 4 µg/mL kolistin agar için 20 ml çözünmüş kolistin sülfat süspansiyonu 100 ml Mueller-Hinton Agar içerisine; 2 µg/mL kolistin agar için 10 ml çözünmüş kolistin sülfat süspansiyonu 100 ml Mueller-Hinton Agar içerisine ve 1 µg/mL kolistin agar için 5 ml çözünmüş kolistin sülfat süspansiyonu 100 ml Mueller-Hinton Agar içerisine eklenmiştir. Karışım 20 ml olacak şekilde petri kablarına dökülerek petri plakları 8 eşit parçaya bölünmüştür.

TSA'da 37 °C 'de 24 saat üretilen *E. coli* izolatlarından alınan koloniler steril swab aracılığıyla cam tüplerde % 0,9'luk fizyolojik tuzlu su içine McFarland No 0,5 bulanıklık değeri elde edilecek şekilde eklenmiştir. Cam tüplerden öze yardımıyla bölünmüş Kolistin agar yüzeyine ekimler gerçekleştirilerek ve 37 °C'de 24 saat inkübasyon için etüve konulmuştur. Saflık kontrolü için negatif kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 ve pozitif kontrol olarak *E. coli* NCTC 13846 mcr-1 suşları kullanılmıştır.

Kolistin agardaki direnç varlığı; $n \leq 2$ µg/mL değerler orta dirençli ve $n \geq 4$ µg/mL kolistin dirençli olarak yorumlanmıştır.

4. BULGULAR

4.1. *E. coli* İZOLATLARININ TOPLANMASI

Çalışmada İstanbul'un Avrupa ve Asya yakalarından 60'ar adet olarak temin edilen toplam 120 tavuk yumurtası yüzeyinden, elde edilen *E. coli* suşları izole edilmiştir.

4.2. YUMURTADAN ELDE EDİLEN *E. coli* İZOLAT SAYILARI

Yapılan mikrobiyolojik analizler sonucu; TBX agar üzerine yapılan ekimler sonucu 39 adet şüpheli *E. coli* (% 32,5) suşu tespit edilmiştir. 39 adet izolatın EMB agara ekimi sonrası 37 adet şüpheli *E. coli* (% 30,8) izolatu gözlemlenmiştir.

Mikrobiyolojik analizler sonrası şüpheli *E.coli* izolatlarının identifikasyonu için PZR analiz yönteminde *E. coli* spesifik ECO1-2 (16S rRNA, *E. coli* spesifik) ve *gyrB* genlerinin varlığına bakılarak, her iki geni de içeren suşlar *E. coli* kabul edilmiştir. İzolatların 20 adedinde ECO 1-2 (16S rRNA, *E. coli* spesifik) (% 16,6) ve 21' inde (% 17,5) *gyrB* geni tespit edilmiştir. Her iki primerle pozitif olan 15 adet (% 12,5) *E. coli* izolatu elde edilerek sonuçta toplam 15 adet *E. coli* izolatu çalışmada izole edilmiştir.

Tablo 12: Avrupa yakasından yumurtaların toplandığı satış yerleri ve alınan yumurta sayıları

Avrupa yakası	Semt Pazarı	Bakkal	Organik Yumurta
Silivri	5	5	8
Beylikdüzü	6	3	1
Avcılar	6	4	2
Güngören	6	5	1
Bakırköy	3	2	3

Tablo 13: Avrupa yakasındaki örneklerde tespit edilen *E. coli* sayısı

Avrupa Yakası	Toplanan Örnek sayısı	TBX agarda şüpheli <i>E. coli</i> sayısı	EMB agarda şüpheli <i>E. coli</i> sayısı	ECO1-2 pozitif İzolat sayısı	gyrB pozitif izolat sayısı	Toplam <i>E. coli</i> sayısı
Silivri	18	7	6	2	2	2
Beylikdüzü	10	3	3	1	2	1
Avcılar	12	7	6	4	2	2
Güngören	12	4	3	2	4	2
Bakırköy	8	3	3	2	1	1

Tablo 14: Asya yakasından yumurtaların toplandığı satış yerleri ve alınan yumurta sayıları

Asya yakası	Semt Pazarı	Bakkal	Organik Yumurta
Tuzla	5	5	4
Üsküdar	6	2	2
Kadıköy	3	3	4
Ataşehir	4	5	2
Maltepe	5	5	3

Tablo 15: Asya yakasındaki örneklerde tespit edilen *E. coli* sayısı

Avrupa Yakası	Toplanan Örnek sayısı	TBX agarda şüpheli <i>E. coli</i> sayısı	EMB agarda şüpheli <i>E. coli</i> sayısı	ECO1-2 pozitif İzolat sayısı	gyrB pozitif izolat sayısı	Toplam <i>E. coli</i> sayısı
Tuzla	14	4	4	4	3	3
Üsküdar	10	3	3	-	2	-
Kadıköy	10	3	3	1	1	1
Ataşehir	11	3	3	1	2	2
Maltepe	13	2	2	1	1	1

4.3. *E. coli* İZOLATLARINDA DİSK DİFFÜZYON YÖNTEMİ ile ANTİBİYOTİK DUYARLILIK SONUÇLARI

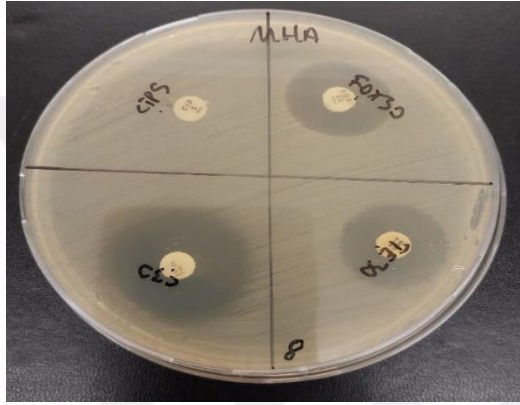
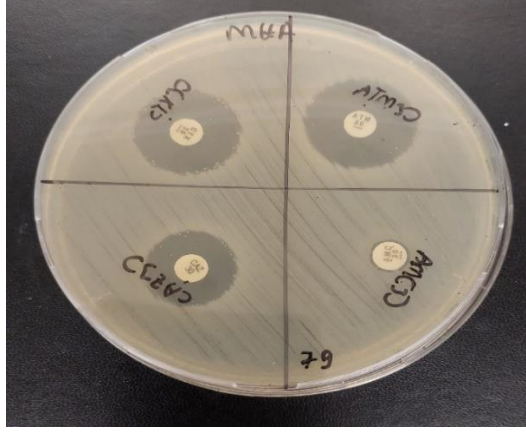
Saf olarak elde edilen *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılıklarının ölçülmesi için disk diffüzyon yöntemi kullanılmıştır. Toplam 16 adet farklı antibiyotik diski, her petriye 4 adet disk yerleştirilerek ölçümler yapılmıştır. Ölçümler CLSI (2022) ve EUCAST (2021) klavuzlarına göre değerlendirilmiştir.

Tablo 16: Antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

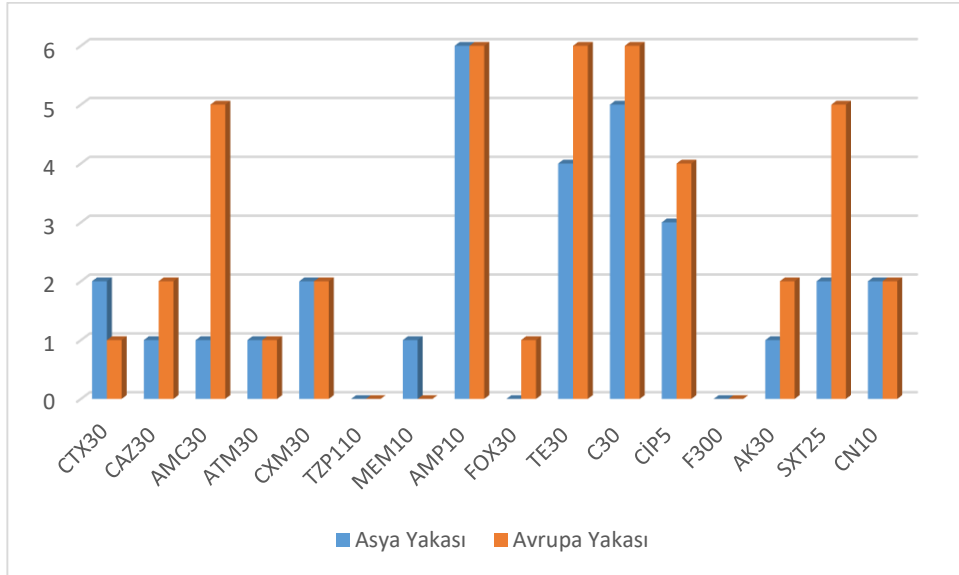
Numune	CTX30	CAZ30	AMC30	ATM30	CXM30	TZP110	MEM10	AMP10	FOX30	TE30	C30	CİP5	F300	AK30	SXT25	CN10
5	36	34	20	39	28	32	30	0	30	0	0	15	24	20	0	21
8	31	26	18	35	24	28	27	0	20	19	26	0	22	20	27	18
17	21	27	19	31	20	27	26	0	25	18	12	0	21	16	27	15
45	0	16	0	11	0	24	11	0	25	0	0	28	22	20	29	19
46	32	28	18	31	25	28	26	0	27	0	0	26	21	21	31	20
56	35	30	20	33	27	31	30	22	27	22	30	36	20	20	32	20
61	15	30	15	19	0	21	28	0	27	0	0	32	24	20	0	10
63	31	31	11	35	22	30	25	0	25	0	0	8	21	21	0	21
69	31	27	12	31	23	26	24	0	22	0	0	12	20	16	0	16
79	20	17	0	20	16	25	24	0	11	0	0	24	22	20	0	0
82	30	26	24	37	25	34	27	25	30	15	25	34	23	25	34	20
83	0	12	10	10	0	25	22	0	26	0	0	10	24	19	0	20
86	35	30	11	35	25	30	26	0	27	0	30	35	21	17	29	18
90	33	30	24	35	24	28	25	18	26	20	26	30	22	20	34	19
110	38	30	15	35	26	31	26	0	25	0	0	11	22	19	0	19

CTX30: Sefotaksim 30 µg, **CAZ30 30:** Seftazidim 30 µg, **AMC30:** Amoksisilin klavulanik asit 30 µg, **CXM30:** Sefoksime 30 µg, **TZP100:** Tazobaktam piperasilin 110 µg, **MEM10:** Meropenem 10 µg, **AMP10:** Ampisillin 10 µg, **FOX30:** Sefoksitin 30 µg, **TE30:** Tetrasiklin µg, **C30:** Kloramfenikol 30 µg, **CİP5:** Siprofloksasin 5 µg, **F300:** Nitrofurantoin 300 µg, **AK30:** Amikasin 30 µg, **SXT25:** Trimethoprim sülfametazol 25 µg, **CN10:** Gentamisin 10 µg

Disk diffüzyon testi sonucu en çok Ampisiline karşı direnç (% 80) gözlemlenmiştir. Tazobaktam piperasiline ve Nitrofurantiona karşı direnç ise tespit edilememiştir. 15 adet *E. coli* izolatının 11'inde (% 73,3) çoklu antibiyotik direnci gözlemlenirken, 2 adet izolatın hiçbir antibiyotiğe karşı dirence sahip olmadığı, 1 izolatın ise 2 antibiyotiğe karşı direnç geliştirdiği belirlenmiştir.



Şekil 24: Disk diffüzyon görüntüleri

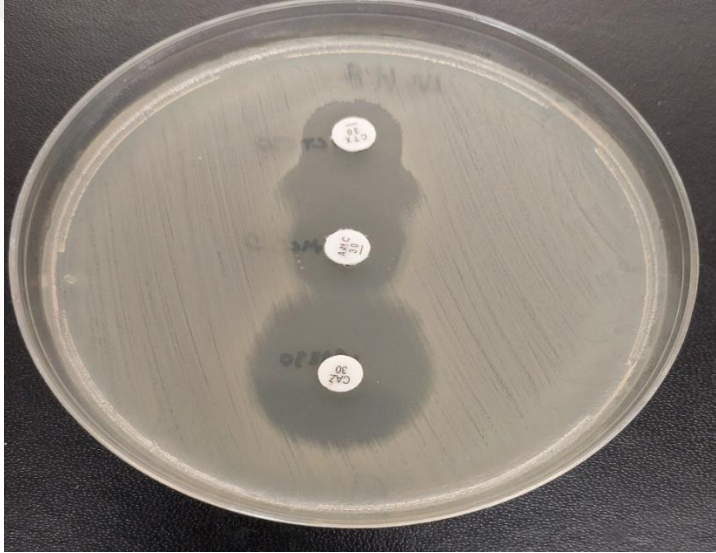


Şekil 25: İstanbul'un Asya ve Avrupa yakasından elde edilen *E. coli* suşlarında antibiyotik direnç sayıları

Dikey eksenle kaç izolata ilişkin antibiyotiğe direnç gösterdiği ifade edilmektedir.

4.4. ÇİFT DİSK SİNERJİ TESTİ

Antibiyotik Duyarlılık testleri sonrası sefotaksim veya seftazidime dirençli olan izolatlar çift disk sinerji testi ile GSBL fenotipik doğrulama testi için seçilmiştir. 15 adet *E. coli* izolatından 4 (% 26,6) tanesi çift disk sinerji testi için seçilmiştir. 4 adet izolatın 2 tanesi fenotipik olarak GSBL üreten *E. coli* olarak, 1 tanesi ise zayıf olarak GSBL üreten ve diğeri ise negatif olarak saptanmıştır.



Şekil 26: Çift disk sinerji testi pozitif izolat görüntüsü

4.5 KOLİSTİN AGAR ile KOLİSTİN DİRENCİNİN BELİRLENMESİ

Çalışma kapsamında 15 adet *E. coli* izolatının hiçbiri Kolistin agarda gelişim göstermemiştir. Bu durumda tüm izolatların kolistin direncine sahip olmadığı gözlemlenmiştir.

4.6. DNA EKSTRAKSİYON KALİTESİ

Epoch2 cihazı (BioTek, USA) ile yapılan ölçümler sonucu 260/280 değerinde 1,8 ile 2 arasında değerler PZR analizine uygun DNA numuneleri olarak kabul edilmiş ve *E. coli* pozitif olan belirlenen izolatların değerleri yukarıdaki tabloda verilmiştir.

PZR analizinde başarılı sonuç elde etmek için yeteri kadar DNA miktarına ulaşılması gerekmektedir. Az ya da çok DNA miktarı analizde başarı oranını düşürmekte ve analizin tekrarlanmasını bile gerektirecek durumlar meydana getirmektedir. Çalışma kapsamında yapılan DNA ekstraksiyon çalışması sonucu, yoğun miktarda (400 ng/μL) DNA elde edilmiştir. Sonuçların olumsuz etkilenmemesi açısından yoğun DNA miktarı sulandırılmak suretiyle PZR analizinde kullanılmıştır.

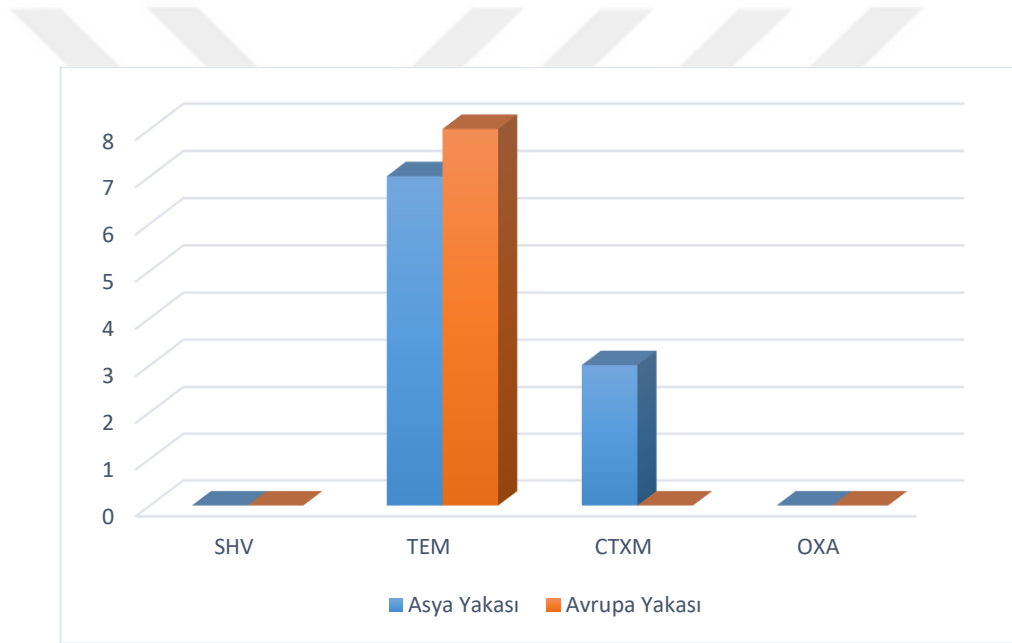
Kullanılan DNA ekstraksiyon prosedürünün genel anlamda başarılı olduğu ölçülmüş olup referans değerler arasında veriler elde edilmiş olup veriler Tablo 17'de ortaya konulmuştur.

Tablo 17: DNA ekstraksiyonu kalite ölçümü

Numune	260 Raw	280 Raw	320 Raw	260	280	260/280	ng/μL
5	0,609	0,361	0,084	0,485	0,256	1,896	484,588
8	0,739	0,426	0,102	0,589	0,299	1,967	588,513
17	0,889	0,492	0,077	0,748	0,382	1,959	747,69
45	0,703	0,397	0,073	0,579	0,298	1,944	579,38
46	0,574	0,348	0,098	0,439	0,23	1,905	438,566
56	1,331	0,75	0,117	1,12	0,584	1,919	928,12
61	0,57	0,345	0,102	0,431	0,224	1,928	431,206
63	0,707	0,413	0,085	0,57	0,3	1,9	570,279
69	0,787	0,456	0,099	0,637	0,331	1,924	637,17
79	0,652	0,375	0,083	0,523	0,269	1,947	523,433
82	0,794	0,461	0,107	0,635	0,326	1,949	635,459
83	0,7	0,418	0,106	0,545	0,287	1,902	545,296
86	0,935	0,526	0,089	0,785	0,405	1,937	785,073
90	0,749	0,42	0,07	0,624	0,322	1,941	624,264
110	0,53	0,329	0,106	0,388	0,204	1,9	388,376

4.7. Multipleks PZR ile GSBL Gen Varlığının İncelenmesi

GSBL gen varlığının tespiti için *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} ve *bla*_{OXA} genlerinin varlığı multipleks PZR ile incelenmiştir. 15 adet *E. coli* izolatının tamamında *bla*_{TEM} geni saptanmış, ilave olarak 3 adet izolatta *bla*_{CTX-M} direnç genine rastlanmıştır. *bla*_{OXA} ve *bla*_{SHV} direnç genleri hiçbir izolatta tespit edilememiştir.



Dikey Eksendeki sayılar ilgili direnç geninden kaç tane saptandığını belirtmektedir

Şekil 27: İstanbul'un Asya ve Avrupa yakasında tespit edilen GSBL direnç genlerinin sayıları

4.8. MULTİPLEKS PZR ile KOLİSTİN DİRENÇ GEN VARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

E. coli izolatlarında kolistin direnç genlerinin varlığının araştırılması amacıyla *mcr*-1, *mcr*-2, *mcr*-3, *mcr*-4 ve *mcr*-5 gen varlığı multipleks PZR ile araştırılmıştır. Hiçbir suşta herhangi ilgili direnç genlerine rastlanmamıştır.

5. TARTIŞMA

E. coli normal bağırsak florasında yer alan, kommensal olarak patojen olmayan türleri bulunduğu gibi diyare başta olmak üzere neonatal menenjiyete varan çeşitli semptomlara neden olabilen patojen türleride bulunan *Enterobacteriaceae*'de yer alan bir bakteri olarak bilinmektedir (Palaniappan ve diğ. 2006).

E. coli salgınlara neden olabilen bir patojen tipleri olan bir bakteri türü olup, en bilinen suşlarından biriside *E. coli* 0157:H7'dir. Asıl rezervuarı kanatlılar olmasa bile kanatlı ürünlerinde de görülebilmekte olan bu suş her sene salgınlara neden olabilmektedir. STEC tipi *E. coli* suşlarının ABD 'de 3600 kişinin hastaneye yatışına neden olacak semptomlara neden olduğu ve 30 kişinin ölümüne neden olduğu tahmin edilmektedir (CDC, 2022).

Kanatlı hayvanların sindirim kanalı *E. coli*'nin doğal konağı olup sindirim kanalı kanatlılarda *E. coli*'nin en önemli kaynağıdır. Tavuk dışkılarında *E. coli* varlığı ortalama 10^6 kob/g olarak bildirilmiştir ve bu nedenle tavuk yumurtalarında da yüksek miktarda bu bakteri bulunabilmekte ve yumurtadan yeni çıkan civcivlerin ölümüne neden olabilmektedir (Dho-Moulin ve Fairbrother, 1999; Jordan ve Pattison, 1996).

Dünya genelinde tüketici tarafından besleyici ve diğer hayvansal proteinlere göre görece ucuz olarak kabul edilen yumurta kuluçkahane veya satış noktalarında *E. coli* ile kontamine olabilmektedir (Pasquali ve diğ. 2014; Lee ve diğ. 2016). Yumurtanın kontaminasyon düzeyi, yumurtanın raf ömrü ile gıda güvenliği açısından önemlidir ve patojenlerin yumurta üzerinde yaşam sürelerini etkilemektedir (Mayes ve Takeballi 1983). Fekal kontaminasyon indikatörü olan *E.coli* yumurtaların çiğ tüketilmesi veya çapraz kontaminasyon aracılığıyla insanlara geçebilmekte ve enfeksiyonlara ya da antibiyotik direnç gelişimine katkıda bulunabilmektedir (Ferri ve diğ. 2017).

Tez çalışmasında İstanbul ilindeki çeşitli satış noktalarından (Pazar, market, bakkal vb.) temin edilen tavuk yumurtası örneklerinde *E. coli* varlığını araştırılmıştır ve mevcut çalışmada yapılan mikrobiyolojik ve moleküler genetik çalışmalar sonucu 120 tavuk yumurtası yüzeyinde 15 adet *E. coli* gözlemlenmiştir. İlgili bakterinin yumurta kabuğundan penetrasyonu oldukça

sınırlı olması nedeniyle yüzeydeki bakteri varlığı incelenmiştir. Birçok farklı gıda yapımında kullanılabilen tavuk yumurtasının taşıdığı *E. coli* gıda güvenliği açısından önemlidir. Çalışmada özellikle fenotipik olarak dışkı ile bulaşık olan yumurtalarda *E. coli* varlığının dış bakıda görece temiz olanlara göre fazla olduğu görülmüştür.

Diyarbakır ilinde yapılan çalışmada, 200 adet tavuk yumurtası kabuğunda ortalama 66 adet *E. coli* tespit edilmiştir. Bu çalışmada dışkı ile bulaşık olan yumurtalarda daha fazla *E. coli* bulunduğu belirlenmiştir (Erkan ve diğ. 2008). Ülkemizde 350 adet tavuk yumurtası yüzeyinde; 100 adet organik tavuk yumurtası, 100 adet serbest gezen tavuk yumurtası, 100 adet kafeste yetişen tavuk yumurtası ve 50 adet kümeste serbest gezen tavuk yumurtasında *E. coli* varlığı mikrobiyolojik yöntemler ile araştırılmıştır. 350 adet yumurtada 64 (% 18,3) adet *E. coli* varlığı bildirilmiştir (Esen, 2019). Ülkemizde 128 pastörize sıvı yumurtada yapılan araştırma sonucunda *E. coli* varlığına rastlanmadığı bildirilmiştir (Algan, 2007). Ülkemizde yapılan çalışmalarda yapılan çalışmamıza paralel sayıda *E. coli* varlığı belirlenmiştir. Fakat yukarıda verilen çalışmalarda farklı mikrobiyolojik analiz yöntemlerin kullanıldığı belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise *E. coli* varlığı moleküler genetik yöntemlerden olan PZR ile doğrulanmıştır. Moleküler genetik doğrulama yönteminin kullanılması *E. coli* varlığı verilerinde farklılıklara neden olabilmektedir.

Kuzey Afrika ülkelerinden olan Mısır'da 100 tavuk yumurtası üzerinde yapılan mikrobiyolojik ve moleküler genetik çalışmalar ile 16 adet *E. coli* bildirilmiştir (Mo'ataz ve diğ. 2021). Bangladeş'de 180 yumurta üzerinde yapılan mikrobiyolojik ve biyokimyasal çalışmalar sonucu 28 adet *E. coli* tespit edilmiştir (Hossain ve diğ. 2021). Yumurta üzerinde *E. coli* varlığı sonuçları ülkemiz ile yukarıdaki dünya verilerine benzerlik göstermektedir. Bu çalışmada 120 adet tavuk yumurtasında 15 adet *E. coli* varlığı mikrobiyolojik ve moleküler genetik analizler ile tespit edildi. Bulunan *E. coli* varlığının mikrobiyolojik olarak diğer çalışmalar ile uyum gösterdiği görülmüş ancak yapılan literatür çalışması sonucu bu konudaki moleküler genetik çalışmaların azlığı nedeniyle sunulan PZR sonucunu doğru şekilde karşılaştıracak yeterli veri bulunamamıştır. Bu nedenle yapılan PZR çalışmalarının *E. coli* varlığını spesifik olarak göstermesi, sonraki çalışmalar ve toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Tavuk yumurtasındaki *E. coli* varlığı, ilgili suşların bu gıda ile yayılabileceğini ve gıda işletmelerinde çapraz kontaminasyonun önemini göstermektedir. Bu nedenle gıda güvenliği ve

gıda kalite yönetim sistemlerinin doğru uygulanması ile bu patojen bakteriye karşı yapılacak mücadele için gereklidir. Dışkı ile bulaşık yumurtaların daha fazla *E. coli* taşıması, bu tarz yumurtalar ile temas sonrası riskin daha fazla olduğunu göstermekte olup bu konu hakkında özellikle gıda işletmelerinde çalışan personele gerekli öğretici bilgilendirmelerin yapılması gerekmektedir.

Fekal kontaminasyon indikatörü olan *E. coli*'nin varlığı yumurtalarda dışkı kaynaklı *Salmonella* spp. gibi diğer patojen bakterilerinde bulunabileceğine işaret etmektedir. Bu nedenle yumurta yüzeyinin yıkanmaması gerektiği sonucuna varılabilmektedir.

Antibiyotik direnci ve bu direncin hızla artması küresel sağlık problemi olup 21. yüzyılda insan ve hayvan sağlığını tehdit eden bir olgudur ve *E. coli* antimikrobiyal direnç genlerinin rezervuarlarından biri olarak görülen bir bakteridir (Liu ve diğ. 2016; HHS, 2013). Tek sağlık konseptinde bu antimikrobiyal direncinin taşınmasını ve antimikrobiyal direncin küresel olarak azaltılmasını hedeflemektedir. Bu küresel mücadelede gıdalar aracılığıyla çoklu antibiyotik direncine sahip *E. coli* varlığı endişe verici bir sağlık problemidir (WHO, 2017).

Hossain ve diğ. (2021) 180 tavuk yumurtasında 28 *E. coli* izolatı tespit etmiş ve disk difüzyon yöntemi ile antibiyotik duyarlılıklarını ölçmüşlerdir. Gentamisin, Siprofloksasin, Eritromisin, Doksisilin, Kloramfenikol, Tetrasiklin, Amoksisilin, Ampisillin, Ceftriaxone, Meropenem ile yaptıkları çalışmada antibiyotik direnç oranları sırasıyla; % 0, % 50, % 71,42; % 35,71; % 21,42, % 57,14; % 64,28, %71,42; % 0 ve % 0 olarak tespit etmişlerdir. Islam ve diğ. (2018) 100 adet yumurta yüzeyi ve 100 adet yumurta içeriği ile yaptıkları analiz sonucu 280 izolat elde etmiş ve bu izolatlardan mikrobiyolojik ve biyokimyasal testler sonucu 97 adet *E.coli* izolatı elde etmişlerdir. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarını ölçmek için disk difüzyon testinden faydalanmışlardır. Kullandıkları antibiyotik diskleri: Seftiriakson, Azitromisin, Siprofloksasin, Tetrasiklin, Kloramfenikol, Amoksisilin, Ampisillin, Gentamisin, Nalisidik asit ve Kanamisin olup direnç oranları sırasıyla; % 5,56; % 22,2; % 0, % 100, % 38,89; % 88,9; % 77,78; % 22,22; % 22,2 ve % 33,3 olarak bildirmişlerdir. Taddese ve diğ. (2020) 83 yumurtayı çiftlikten ve 83 yumurtayı marketten toplayıp hem yumurta yüzeyi hem de yumurta içeriğinde *E. coli* varlığını araştırmışlardır. Aynı zamanda tavuk çiftliğinde 83 kloakal swab örneğinde incelemede bulunmuşlardır. Yaptıkları mikrobiyolojik ve biyokimyasal analizler sonucu 156 *E. coli* izolatı bildirmişlerdir. İzolatların antibiyotik duyarlılıklarını ölçmek amacıyla disk difüzyon yöntemini kullanmışlardır. Kullandıkları antibiyotik diskleri: Sefoksitin, Gentamisin,

Kanamisin, Streptomisin, Siprofloksasin, Neomisin, Kloramfenikol, Sülfonamid, Trimethoprim, Ampisillin ve Nalisidik asit olup direnç oranları sırasıyla: % 50, % 0, % 0, % 1,6; % 0, % 75, % 0, % 0, % 0, % 0, % 100 ve % 25 olarak bildirmişlerdir.

Mevcut çalışmada gerçekleştirilen disk diffüzyon testleri sonucu literatür ile paralel sayıda çoklu antibiyotik direncine sahip *E. coli* izolatı olduğu görülmüştür. Özellikle Ampisillin direncinin fazla bulunması bu antibiyotiğe karşı gelişen direncin seviyesi ve yaygınlığını göstermektedir. Gentamisine karşı direnç literatür araştırması sonucu bulunan verilerden daha yüksek tespit edilmiştir. Gerçekleştirilen tez çalışmasında Ampisillin, Amoksisillin klavulanik asit, Tetrasiklin ve Kloramfenikol antibiyotiklerine karşı daha fazla direnç tespit edilmiştir. Meropenem direncinin mevcut çalışma ve literatürde rastlanmaması son çare antibiyotiklerinde olan bu grup ve toplum sağlığı açısından önemlidir. Bu veriler antibiyotik dirençli suşların yumurta aracılığı ile taşınabileceğini, hayvan sağlığı için kullanılan antibiyotiklerin daha dikkatli kullanılması gerektiğini göstermektedir. Diğer gıdalara göre görece daha az paketli ve açık olarak satışa sunulması bu konu hakkında önem arz etmektedir.

Klinik vakaların tedavilerinde sıklıkla kullanılan beta laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen direnç küresel sağlığı tehdit etmektedir. Beta laktam grubu antibiyotikleri inhibe eden beta laktamaz enzimleri günden güne gelişmiş ve genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar adını almıştır (Pitout ve Laupland 2008). Bu enzimler *E. coli* bakterisinde yaygın olarak görülebilmektedir ve çeşitli gıdalarda GSBL üreten *E. coli* (Kaesbohrer ve diğ. 2019; Tepeli ve Zorba, 2018; Sivaraman ve diğ. 2020) izolatları tespit edilmiştir. Mezhoud ve diğ. (2016) yaptıkları çalışmada 11 tavuk çiftliğinden toplam 186 yumurta toplamışlar ve 10/11 çiftlikte *E. coli* veya *Enterobacter cloacae* tespit etmişlerdir. GSBL varlığını çift disk sinerji ve PZR yöntemiyle incelemiş ve *Enterobacter cloacae* suşlarında blaSHV-12, blaTEM-52 and blaACT-39 gen varlığını 8 *Enterobacteriaceae* izolatında tespit etmişlerdir.

Martínez-Álvarez ve diğ. (2022) tavuk çiftliklerinden elde ettikleri 57 gübre ve 54 çiftlik içindeki havadan izole ettikleri 111 *E. coli* izolatının yaklaşık yarısı çoklu antibiyotik direnci göstermekte olup PZR analizi sonucu 23 izolat blaSHV-12 geni taşımaktadır. Tespit ettikleri 60 ampisillin dirençli izolatın 58'i blaTEM genini bildirmişlerdir. Rasheed ve diğ. (2014) 150 gıda örneğinde (30 adet sebze, 30 adet tavuk yumurtası yüzeyi, 30 adet çiğ tavuk eti, 30 farklı pastörize edilmemiş süt numenesi ve 30 adet taze sığır eti) GSBL üreten *E. coli* varlığını çift disk sinerji ve fenotipik konformasyon testi ile araştırmışlardır. Analizleri sonucu GSBL üreten

E. coli izolatlarından 2'sini sebzelerde, birini tavuk yumurtası yüzeyinden ve diğerini taze sığır etinden elde etmişlerdir.

Mevcut çalışmada elde edilen 15 *E. coli* izolatı ile yapılan çift disk sinerji testi sonucu 3 adet GSBL üreten *E. coli* suşu tespit edilmiştir. Multipleks PZR ile GSBL genlerinden olan blaTEM, blaSHV, blaCTX-M ve blaOXA varlığının araştırılması sonucu tüm suşlarda blaTEM geni gözlemlenmiştir. Bu olgu yüksek miktarda bulunan ampisillin direnci ile paralellik gösteren bir sonuçtur. 3 suşta blaCTX-M saptandı ve blaSHV ile blaOXA genleri mevcut izolatlarda saptanmamıştır. Yapılan çalışmalarda da blaTEM geninin diğer direnç genlerine göre fazla miktarda bulunması penisilin grubuna karşı direncin küresel anlamda arttığını göstermektedir. Ülkemizde tavuk yumurtalarından elde edilen *E. coli* izolatlarında GSBL genleri daha önce araştırılmadığı ve bu konuyla ilgili ilk gen analiz sonuçlarını göstermesiyle yaptığımız çalışma epidemiyolojik açıdan önem arz etmektedir.

GSBL üreten *E. coli* varlığının toplum tarafında sıklıkla tüketilen ve yaygın olarak satışı gerçekleştirilen tavuk yumurtasının bulunması toplum sağlığı açısından endişe vericidir. GSBL direnç genlerinin yüksek sayıda olması ve mutasyonlar sonucu giderek artması direnç gen varlığının araştırılmasını zorlaştırmakta ve DNA sekans analizleri gibi pratikte tarama testi olarak kullanılmayan testlerin kullanılmasını gerektirmektedir. *E. coli* bakterisinin çeşitli GSBL direnç genleri taşıdığı görülmekte ve bu izolatların neden olabileceği enfeksiyonların sık kullanılan beta laktam grubu antibiyotikler ile tedavisini zorlaştırmaktadır. Endişe verici diğer bir nokta ise bu direnç genlerinin plazmid gibi direnç genlerinin transfer yolları ile diğer patojenlere aktarılabileceğini göstermektedir.

E. coli suşlarında son yıllarda gözlemlenen önemli bir antibiyotik direnç konusunda kolistin direncidir. Kolistin direncinde plazmit aracılı kolistin direnci ön plana çıkmakta olup ilk kez 2016 yılında rapor edilmiştir (Liu ve diğ. 2016). Plazmid aracılı kolistin direnci *E. coli* izolatlarından tespit edilmiş ve bu bakterinin mobilize kolistin direncinin yayılmasında önemli bir etken olduğu gözlemlenmektedir.

Son çare antibiyotiklerinden olan ve alternatifi sınırlı sayıda olan kolistine karşı gelişen direnç küresel sağlığı tehdit etmektedir. Bu nedenle kolistin direncine sahip izolatlar üzerine çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalar sonucu hem insanlarda elde edilen izolatlardan hem de hayvansal ürünlerden elde edilen izolatlarda kolistine karşı dirençli *E. coli* izolatları bulunmuştur. (Liu ve diğ. 2016; Schrauwen ve diğ. 2017; Nishino ve diğ. 2017).

Shrauwen ve diğ. (2017) perakende sektöründen topladığı 214 tavuk etinde 34 adet *Enterobacteriaceae* izolatında mcr-1 geni tespit etmiş ve mcr-2 gen varlığına rastlamamışlardır. Bu sonuçları PZR yöntemi ile bildirmişlerdir. Kolistin direncinin incelenmesinde kolistin agar ve broth mikrodilüsyon yöntemlerindende faydalanmışlardır. Mcr-1 pozitif izolatlar üzerinde otomatize sistemler (Vitek2, Biomérieux) sonucu tüm suşlarda ampicillin direncine rastlamış olup bu izolatlar içersinde 1 adet GSBL üreten suş varlığını bildirmişlerdir. Tüm suşların meropenem karşı duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Zajac ve diğ. (2019) 5787 *E. coli* izolatını hindi, tavuk, domuz ve sığır dışkısından elde etmişlerdir ve R > 2 mg/L olarak tanımlanan kolistine (R) direncin varlığı için minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) ile tespit ettiler ve 128 izolat elde ettiler. Bu izolatlarda 61 hindi, 11 broyler, 2 yumurta tavuğu ve birer domuz ile sığırdaki mcr-1 gen varlığını bildirdiler. Yaptıkları PZR analizlerinde mcr-2, mcr-3, mcr-4 ve mcr-5 gen varlığına rastlamamışlardır. Irrgang ve diğ. (2016) çeşitli gıda ürünlerinden (süt ürünler, hindi eti, tavuk eti, tavuk yumurtası, sığır eti vb.) 10.906 kommensal *E. coli* izolatı elde ettiler ve 505 izolat kolistin için >2 mg/l MİK değerleri gösterdi. Fenotipik kolistin direnci gösteren suşlarda yapılan PZR çalışması sonucu 402 izolatta mcr-1 geni tespit ettiler. Bu çalışmada 90 yumurta örneği kullanmış olup mcr-1 gen varlığını tespit etmemişlerdir.

Mevcut çalışmada tavuk yumurtalarında elde edilen *E. coli* izolatlarında fenotipik ve mobilize direnç genlerinden olan mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 ve mcr-5 gen varlığı araştırılmıştır. Analizler sonucu fenotipik veya ilgili gen varlığı yönünden pozitif izolat tespit edilmemiştir. Tavuklardan elde edilen *E. coli* izolatlarında kolistine dirençli izolatlar bulunması yumurtalarda da bulunabileceğini göstermektedir. Ülkemizde tavuk yumurtlarında elde edilen *E. coli* izolatlarında kolistin direnç genleri daha önce araştırılmadığından mevcut çalışma önem arz etmektedir.

GSBL üreten bakteriler ve karbapenem dirençli suşların tedavisinde kullanılan kolistinin tespit edilmemesi toplum sağlığı açısından olumlu bir gelişmedir. Ancak tespit edilen diğer antibiyotik direnç konularının toplum sağlığı açısından önemi unutulmamalıdır ve gıdalar aracılığıyla taşınma, gıda hayvanlarında kullanımına dikkat edilmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Gıda üretimi için kullanılan hayvanlarda verim ya da tedavi amaçlı kullanılan antibiyotiklerin fazlalığı ve kontrolsüz kullanımı sonucu yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı direncin arttığı bu çalışmada gözlemlenmiştir. Elde edilen veriler ile yapılan literatür çalışması karşılaştırıldığında mevcut *E. coli* izolatlarında çoklu antibiyotik dirençli suş sayısı yapılan çalışmalar ile örtüşmektedir. Yumurta gibi sık tüketilen bir üründe bu verilerin belirlenmesi toplum sağlığı açısından önem arz etmektedir. Organik yumurta adı altında dışkı ile kontamine taşıyan yumurtaların özellikle bu riski taşıdıkları gözlemlenmiş olup diğer araştırmacılarda benzer sonuçlar bildirmişlerdir.

Günümüzde beta laktamaz üreten *E. coli* izolatlarının hasta tedavisinde önemli zorluklar çıkardığı göz önüne alındığında gıda aracılığıyla bu bakterilerin taşınmasının önlenmesi, minimum düzeye indirilmesi veya kontrol altına alınması gerekmektedir. Bu amaçla ISO 22000, HACCP veya GMP (İyi Üretim Uygulamaları) gibi kalite kontrol yöntemlerinin yaygınlaşması ve daha fazla taraması testi ile direnç gelişiminin seyri takip edilmelidir.

Yumurta ticaretinde dünyada önemli ülkelerden olan Türkiye, antibiyotik dirençli *E. coli* suşlarına karşı yapacağı mücadele ile pazar payını arttırabilir ve küresel sağlığı tehdit eden bu konuda daha fazla söz sahibi olabilir.

Yapılan literatür çalışmasında yumurtalarda *E. coli*'de kolistin direnci varlığı üzerine az sayıda çalışma bulunmuş olup mevcut çalışmanın bu konuda ileride yapılacak çalışmalara temel oluşturabilecektir. GSBL üreten *E. coli* izolatlarının tedavisinde kullanılan son çare antibiyotiği olan kolistin direncinin bu çalışmada saptanmaması toplum sağlığı açısından olumlu bir gelişmedir.

Mevcut çalışma tavuk yumurtasından elde edilen *E. coli* izolatlarında GSBL üretimi ve kolistin direncinin araştırılan ilk çalışma olmasıyla ülkemizdeki antibiyotik direnci yaygınlığı ve yayılım yolları hakkında bilgiler sunmaktadır.

Kolistin direnç varlığının araştırılmasında sınırlı sayıda güvenilir testin bulunması ve bu testlerin rutin laboratuvarlarda uygulanamaması bu konunun doğru şekilde verimli olarak incelenememesine neden olmaktadır.

İstanbul ilinin Avrupa ve Asya yakasından elde edilen izolatlarda anlamlı sayıda *E. coli* farkı, antibiyotik duyarlılık testlerinden farklılıklar ile GSBL üreten izolatlarda farklılık gözlemlenmemiştir. Bu değerlendirmelerin daha doğru yapılabilmesi için yüksek sayıda numune ile benzer çalışmaların yapılması istatistiksel olarak daha doğru veriler sunacaktır.

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar gıda güvenliği ve gıda hijyenin önemini bir kez daha ortaya koymaktadır. Yumurta satışının diğer gıda ürünlerine göre daha fazla kontaminasyona açık şekilde satışa sunulması nedeniyle elde edilen verilerin orjini hakkında kesin bir yorum yapılamamasına neden olmaktadır.

KAYNAKLAR

- Abeyrathne, E.D.N.S., Lee, H.Y. ve Ahn, D.U. (2013). Egg white proteins and their potential use in food processing or as nutraceutical and pharmaceutical agents--A review. *Poultry Science*, 92(12), 3292–3299. doi:10.3382/ps.2013-03391.
- Abubakar, M. B., Salihu, M. D., Aliyu, R. M., Bello, A., Tukur, H., ve Shuaibu, A. B. (2016). Occurrence and antimicrobial resistance of ESBL-producing *Escherichia coli* in indigenous chickens and retailed table-eggs in Sokoto metropolis, Nigeria. *School of Biological Sciences*, 5(2), 56-60.
- Abraham, E.P. ve Chain, E. (1940). An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature*, 146 (3713), 837–837. doi:10.1038/146837a0.
- AbuOun, M., Stubberfield, E.J., Duggett, N.A., Kirchner, M., Dormer, L., Nunez-Garcia, J., Randall, L.P., Lemma, F., Crook, D.W., Teale, C., Smith, R.P. ve Anjum, M.F. (2018). mcr-1 and mcr-2 (mcr-6.1) variant genes identified in *Moraxella* species isolated from pigs in Great Britain from 2014 to 2015. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(10), 2904–2904. doi:10.1093/jac/dky272.
- Acar, J. ve Moulin, G. (2006). Resistencia a los antimicrobianos en las explotaciones. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 25(2), 775–792. doi:10.20506/rst.25.2.1695.
- Açıkgöz, Z., ve Özkan, K. (1996). Yumurta tüketiminin beslenme ve sağlık üzerine etkisi. *Hayvancılık*, 96, 18-20.
- Adegbenjo, A.O., Liu, L. ve Ngadi, M.O. (2020). Non-Destructive Assessment of Chicken Egg Fertility. *Sensors*, 20(19), 5546. doi:10.3390/s20195546.
- Adesiyun, A., Offiah, N., Seepersadsingh, N., Rodrigo, S., Lashley, V., Musai, L. ve Georges, K. (2005). Microbial health risk posed by table eggs in

- Trinidad. *Epidemiology and Infection*, 133(06), 1049. doi:10.1017/s0950268805004565.
- Agarwal, J., Singh, M. ve Srivastava, S. (2012). Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 30(2), 141. doi:10.4103/0255-0857.96657.
- Ahmed, S., Das, T., Islam, M.Z., Herrero-Fresno, A., Biswas, P.K. ve Olsen, J.E. (2020). High prevalence of mcr-1-encoded colistin resistance in commensal *Escherichia coli* from broiler chicken in Bangladesh. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-75608-2.
- Algan, Ö. (2007). Pastörize Sıvı Yumurtaların Mikrobiyolojik Özellikleri Üzerine Bir Araştırma. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi.
- Arslan D. (2008). İshal oluşturan *Escherichia coli* infeksiyonları, epidemiyoloji, klinik, tedavi. *Ankem Dergisi*, 22(2):192-196.
- Anton, M., Martinet, V., Dalgalarondo, M., Beaumal, V., David-Briand, E. ve Rabesona, H. (2003). Chemical and structural characterisation of low-density lipoproteins purified from hen egg yolk. *Food Chemistry*, 83(2), 175–183. doi:10.1016/s0308-8146(03)00060-8.
- Anonim J.C. (2002). *Escherichia coli* O157:H7 Ground Beef: Review of a Draft Risk Assessment, Institute of Medicine of the National Academy of Sciences, Washington, 13-26.
- Apata, D.F. (2009). Antibiotic Resistance in Poultry. *International Journal of Poultry Science*, 8(4), 404–408. doi:10.3923/ijps.2009.404.408.
- Ambler, R. P. (1980). The structure of β -lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 289(1036), 321-331.
- Bayer, E. A. (1994). Modified avidins for application in avidin-biotin technology: an improvement on nature. *Egg uses and processing technologies, new developments*, 158-176.

- Bassetti, M., Nicolini, L., Esposito, S., Righi, E. ve Viscoli, C. (2009). Current Status of Newer Carbapenems. *Current Medicinal Chemistry*, 16(5), 564–575. doi:10.2174/092986709787458498.
- Bassetti, M., Merelli, M., Temperoni, C. and Astilean, A. (2013). New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 12(1), 22. doi:10.1186/1476-0711-12-22.
- Band, V.I., Crispell, E.K., Napier, B.A., Herrera, C.M., Tharp, G.K., Vavikolanu, K., ve diğ. (2016). Antibiotic failure mediated by a resistant subpopulation in *Enterobacter cloacae*. *Nature Microbiology*, 1(6), 16053. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.53.
- Baron, E. J., Peterson, L. R., & Finegold, S. M. (1994). Bailey & Scott's diagnostic microbiology, Mosby-Year Book. Inc., St. Louis, 362-387.
- Baron, S., Hadjadj, L., Rolain, J.-M. and Olaitan, A.O. (2016). Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(6), 583–591. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023.
- Bahrani-Mougeot, F.K., Scobey, M.W. and Sansonetti, P.J. (2009). Enteropathogenic Infections. *Encyclopedia of Microbiology*, 329–343. doi:10.1016/b978-012373944-5.00224-8.
- Bermudes, H., Arpin, C., Jude, F., El-Harrif, Z., Bébéar, C. ve Quentin, C. (1997). Molecular epidemiology of an outbreak due to extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteria in a French hospital. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 16(7), 523–529. doi:10.1007/bf01708236.
- Bellais, S., Poirel, L., Fortineau, N., Decousser, J.W. ve Nordmann, P. (2001). Biochemical-Genetic Characterization of the Chromosomally Encoded Extended-Spectrum Class A β -Lactamase from *Rahnella aquatilis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(10), 2965–2968. doi:10.1128/aac.45.10.2965-2968.2001.

- Bennett, P.M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, [online] 153(1), 347–357. doi:10.1038/sj.bjp.0707607.
- Beveridge, E.G. ve Martin, A.J. (1967). Sodium Sulphomethyl Derivatives of Polymyxins. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 29(2), 125–135. doi:10.1111/j.1476-5381.1967.tb01946.x.
- Branger, C., Lesimple, A.L., Bruneau, B., Berry, P. ve Lambert-Zechovsky, N. (1998). Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a university hospital. *Journal of Medical Microbiology*, 47(3), 201–209. doi:10.1099/00222615-47-3-201.
- Bradford, P.A. (1999). Automated Thermal Cycling Is Superior to Traditional Methods for Nucleotide Sequencing of *bla*SHV Genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(12), 2960–2963. doi:10.1128/aac.43.12.2960.
- Bradford, P.A. (2001). Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 933–951. doi:10.1128/cmr.14.4.933-951.2001.
- Brown, M.J., Pankaj Sharma ve Bennett, P.N. (2019). *Clinical pharmacology*. Edinburgh, Uk: Elsevier.
- Bruce, J., ve Drysdale, E. M. (1994). Trans-shell transmission. In *Microbiology of the avian egg*. Springer, Boston, MA, 63-91.
- Björck, L. (1990). Proteinase inhibition, immunoglobulin-binding proteins and a novel antimicrobial principle. *Molecular Microbiology*, 4(9), 1439–1442. doi:10.1111/j.1365-2958.1990.tb02054.x.
- Blazyk, J. (2004). Cationic, amphipathic β -sheet peptides and uses thereof. *U.S. Patent Application No. 10/181,898*.
- Bilgehan H. (2000). *Escherichia* Özel Bakteriyoloji ve Bakteri Alanları, *Barış Yayınları*, 10(2), 3-17.

- Bialvaei, A.Z. ve Samadi Kafil, H. (2015). Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. *Current Medical Research and Opinion*, 31(4), 707–721. doi:10.1185/03007995.2015.1018989.
- Bonadonna, L., Cataldo, C. ve Semproni, M. (2007). Comparison of methods and confirmation tests for the recovery *Escherichia coli* in water. *Desalination*, 213(1-3), 18–23. doi:10.1016/j.desal.2006.03.601.
- Bonnet, R., Sampaio, J.L.M., Chanal, C., Sirot, D., De Champs, C., Viallard, J.L., Labia, R. ve Sirot, J. (2000). A Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* Isolated in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(11), 3061–3068. doi:10.1128/aac.44.11.3061-3068.2000.
- Bonnet, R. (2004). Growing Group of Extended-Spectrum β -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 1–14. doi:10.1128/aac.48.1.1-14.2004.
- Bousquet, P.J., Pipet, A., Bousquet-Rouanet, L. ve Demoly, P. (2008). Oral challenges are needed in the diagnosis of β -lactam hypersensitivity. *Clinical & Experimental Allergy*, doi:10.1111/j.1365-2222.2007.02867.x.
- Borowiak, M., Fischer, J., Hammerl, J.A., Hendriksen, R.S., Szabo, I. and Malorny, B. (2017). Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, mcr-5, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(12), 3317–3324. doi:10.1093/jac/dkx327.
- Bush, K. ve Jacoby, G.A. (2009). Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(3), 969–976. doi:10.1128/aac.01009-09.
- Bush, K., Jacoby, G.A. ve 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. doi:10.1128/aac.39.6.1211.
- Bush, K. ve Bradford, P.A. (2020). Epidemiology of β -Lactamase-Producing Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, [online] 33(2), pp.e00047-19. doi:10.1128/CMR.00047-19.

- Castellani, O., Davidbriand, E., Guerindubiard, C. ve Anton, M. (2005). Effect of aggregation and sodium salt on emulsifying properties of egg yolk phosphatidylcholine. *Food Hydrocolloids*, 19(4), 769–776. doi:10.1016/j.foodhyd.2004.09.010.
- Capita, R. ve Alonso-Calleja, C. (2013). Antibiotic-Resistant Bacteria: A Challenge for the Food Industry. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 53(1), 11–48. doi:10.1080/10408398.2010.519837
- Carattoli, A. (2013). Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 303(6-7), 298–304. doi:10.1016/j.ijmm.2013.02.001.
- Carattoli, A., Villa, L., Feudi, C., Curcio, L., Orsini, S., Luppi, A. ve diğ. (2017). Novel plasmid-mediated colistin resistance mcr-4 gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*, 22(31). doi:10.2807/1560-7917.es.2017.22.31.30589.
- Carroll, L.M., Gaballa, A., Guldimann, C., Sullivan, G., Henderson, L.O. ve Wiedmann, M. (2019). Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene mcr-9 in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella enterica* Serotype Typhimurium Isolate. *mBio*, 10(3). doi:10.1128/mbio.00853-19.
- Cantón, R. ve Coque, T.M. (2006). The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*, 9(5), 466–475. doi:10.1016/j.mib.2006.08.011.
- Causeret, D., Matringe, E., ve Lorient, D. (1991). Ionic strength and pH effects on composition and microstructure of yolk granules. *Journal of food science*, 56(6), 1532-1536.
- Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P., ve Phillips, I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 52(2), 159-161.
- Cavaco, L., Mordhorst, H., ve Hendriksen, R. (2016). Laboratory protocol: PCR for plasmid-mediated colistin resistance genes. *Lyngby, Denmark: National Food Institute*.

- Causseret, D., Matringe, E. ve Lorient, D. (1992). Mineral Cations Affect Microstructure of Egg Yolk Granules. *Journal of Food Science*, 57(6), 1323–1326. doi:10.1111/j.1365-2621.1992.tb06847.x.
- Cha, M.-H., Woo, G.-J., Lee, W., Kim, S.-H., Woo, J.-H., Kim, J. ve diğ. (2020). Emergence of Transferable mcr-9 Gene-Carrying Colistin-Resistant *Salmonella enterica* Dessau ST14 Isolated from Retail Chicken Meat in Korea. *Foodborne Pathogens and Disease*, 17(11), 720–727. doi:10.1089/fpd.2020.2810.
- Chaalal, N., Touati, A., Yahiaoui-Martinez, A., Aissa, M.A., Sotto, A., Lavigne, J.-P. ve Pantel, A. (2021). Colistin-Resistant Enterobacterales Isolated from Chicken Meat in Western Algeria. *Microbial Drug Resistance*, 27(7), 991–1002. doi:10.1089/mdr.2020.0109.
- Chambers, S.T. ve Metcalf, S.C. (2017). Cystitis and Urethral Syndromes. *Infectious Diseases*, 523-531. doi:10.1016/b978-0-7020-6285-8.00057-5.
- Cherian, G., Holsonbake, T.B. ve Goeger, M.P. (2002). Fatty Acid Composition and Egg Components of Specialty Eggs. *Poultry Science*, 81(1), 30–33. doi:10.1093/ps/81.1.30
- Chishimba, K., Hang'ombe, B.M., Muzandu, K., Mshana, S.E., Matee, M.I., Nakajima, C. ve Suzuki, Y. (2016). Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Market-Ready Chickens in Zambia. *International Journal of Microbiology*, 2016, 1–5. doi:10.1155/2016/5275724.
- Chowdhury, M., Bardhan, R., Pal, S., Banerjee, A., Batabyal, K., Joardar, S.N., Mandal, G.P. ve diğ. (2021). Comparative occurrence of ESBL/AmpC beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Salmonella* in contract farm and backyard broilers. *Letters in Applied Microbiology*, 74(1), 53–62. doi:10.1111/lam.13581.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2020). Tests for Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*, 104-108.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2022). Tests for Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* and

- Proteus mirabilis*. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. 118-122.
- Cliver, D.O. (1994). Epidemiology of Viral Foodborne Disease. *Journal of Food Protection*, 57(3), 263–266. doi:10.4315/0362-028x-57.3.263.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2014). *E. coli (Escherichia coli)* <https://www.cdc.gov/ecoli/general/>, [Erişim: 04.08.2022].
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2021). *About Antimicrobial Resistance* <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>, [Erişim: 09.08.2022].
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2022). *Reports of Selected E. coli Outbreak Investigations*. <https://www.cdc.gov/ecoli/outbreaks.html>, [Erişim: 10.11.2022].
- Chen, J., Clarke, R.C. ve Griffiths, M.W. (1996). Use of Luminescent Strains of *Salmonella enteritidis* To Monitor Contamination and Survival in Eggs. *Journal of Food Protection*, 59(9), 915–921. doi:10.4315/0362-028x-59.9.915.
- Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N. ve Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3(2), 71–87. doi:10.4161/gmic.19182.
- Cooke, S. K. and Sampson, H. A. (1997). Allergenic properties of ovomucoid in man. *The Journal of Immunology*, 159(4), 2026-2032.
- Cordeiro M.M., C. ve Hincke T., M. (2011). Recent Patents on Eggshell: Shell and Membrane Applications. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 3(1), 1–8. doi:10.2174/2212798411103010001.
- Çiçekgil Z. (2022). *Tarım Ürünleri Piyasaları Yumurta*, <https://arastirma.tarimorman.gov.tr/tepge/Belgeler/PDF%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Piyasalar%C4%B1/2022-Temmuz%20Tar%C4%B1m%20%C3%9Cr%C3%BCnleri%20Raporu/43-YUMURTA%20T%C3%9CP%20TEMMUZ%202022.pdf>, [Erişim:02.08.2022].
- Dalhoff, A. ve Thomson, C.J. (2003). The Art of Fusion: From Penams and Cepheids to Penems. *Chemotherapy*, 49(3), 105–120. doi:10.1159/000070616.

- Datta, N. ve Kontomichalou, P. (1965). Penicillinase Synthesis Controlled By Infectious R Factors In Enterobacteriaceae. *Nature*, 208(5007), 239–241. doi:10.1038/208239a0.
- Dede M., Kahraman N. ve Kaleli D. Ö. (2005). *Çukurova Üniversitesi Öğrencilerinin Yumurta Tüketimi*. 1. Ulusal Zootekni Öğrenci Kongresi 16-17 Mayıs Adana, 12-13.
- Demby, J.H. ve Cunningham, F.E. (1980). Factors Affecting Composition of Chicken Meat. A Literature Review. *World's Poultry Science Journal*, 36(1), 25–67. doi:10.1079/wps19800002.
- Demaneche, S., Sanguin, H., Pote, J., Navarro, E., Bernillon, D., Mavingui, P. ve diğ. (2008). Antibiotic-resistant soil bacteria in transgenic plant fields. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(10), 3957–3962. doi:10.1073/pnas.0800072105.
- Dho-Moulin, M., ve Fairbrother, J. M. (1999). Avian pathogenic Escherichia coli (APEC) *Veterinary Research*, 30(2-3), 299-316.
- Dho-Moulin, M., van den Bosch, J.F., Girardeau, J.P., Brée, A., Barat, T. ve Lafont, J.P. (1990). Surface antigens from Escherichia coli O2 and O78 strains of avian origin. *Infection and Immunity*, 58(3), 740–745. doi:10.1128/iai.58.3.740-745.1990.
- Dobrindt, U., Agerer, F., Michaelis, K., Janka, A., Buchrieser, C., Samuelson, M., ve diğ. (2003). Analysis of Genome Plasticity in Pathogenic and Commensal Escherichia coli Isolates by Use of DNA Arrays. *Journal of Bacteriology*, 185(6), 1831–1840. doi:10.1128/jb.185.6.1831-1840.2003.
- Dortet, L., Bonnin, R.A., Pennisi, I., Gauthier, L., Jousset, A.B., Dabos, L. ve diğ. (2018). Rapid detection and discrimination of chromosome- and MCR-plasmid-mediated resistance to polymyxins by MALDI-TOF MS in Escherichia coli: the MALDIxin test. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. doi:10.1093/jac/dky330.
- Doi, Y.ve Paterson, D.L. (2007). Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases. *International Journal of Infectious Diseases*, 11(3), 191–197. doi:10.1016/j.ijid.2006.07.008.

- Doi, Y., Iovleva, A. ve Bonomo, R.A. (2017). The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *Journal of Travel Medicine*, 24(1), 44–51. doi:10.1093/jtm/taw102.
- Donnenberg, M. (2013). *Escherichia coli*. Academic Press. 576.
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) (2020). Antimicrobial resistance in the EU/EEA (EARS-Net) - Annual Epidemiological Report for 2020. *Antimicrobial resistance surveillance in Europe*.
- The European Food Safety Authority (EFSA) (2008). Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard - Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. *EFSA Journal*, 6(8), 765. doi:10.2903/j.efsa.2008.765.
- The European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). (2014). Scientific Opinion on the public health risks of table eggs due to deterioration and development of pathogens. *EFSA Journal*, 12(7), 3782.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2017). *The EUCAST guideline on detection of resistance mechanisms*, https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_170711.pdf, [Erişim: 20.03.2021].
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (2021). *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*. https://www.eucast.org/clinical_breakpoints, [Erişim: 10.12.2021].
- Erkan, M. E., Vural, A., ve Gran, H. ř. (2008). Diyarbakır İli’nde Satışa Sunulan Ky ve Market Yumurtalarının Hijyenik Kalitesi zerine Bir Araştırma. *Dicle Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, (1), 11-16.
- El-Sayed Ahmed, M.A.E.-G., Zhong, L.-L., Shen, C., Yang, Y., Doi, Y. ve Tian, G.-B. (2020). Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 868–885. doi:10.1080/22221751.2020.1754133.

- El Harrif-Heraud, Z., Arpin, C., Benliman, S. ve Quentin, C. (1997). Molecular epidemiology of a nosocomial outbreak due to SHV-4-producing strains of *Citrobacter diversus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(10), 2561–2567. doi:10.1128/jcm.35.10.2561-2567.1997.
- Emdy, L., Kerenyi, M., Nagy, G (2003). Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 29–33. doi:10.1016/s0924-8579(03)00236-x.
- Esen Ş. (2019). *Farklı Yetiştirme Sistemlerinde Üretilen Tavuk Yumurtalarında Salmonella ve Bazı İndikatör Mikroorganizmaların Varlığı*. Yüksek Lisans Tezi, Türkiye Cumhuriyeti Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Falagas, M.E., Makris, G.C., Dimopoulos, G. ve Matthaiou, D.K. (2008). Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? *Clinical Microbiology and Infection*, 14(2), 101–104. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01912.x.
- Fang, H., Ataker, F., Hedin, G. ve Dornbusch, K. (2007). Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases among *Escherichia coli* Isolates Collected in a Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(2), 707–712. doi:10.1128/jcm.01943-07.
- Fernandez, M.L. ve Andersen, C.J. (2016). Eggs: Composition and Health Effects. *Encyclopedia of Food and Health*, 470–475. doi:10.1016/b978-0-12-384947-2.00246-4.
- Fernandes, R., Amador, P. ve Prudêncio, C. (2013). β -Lactams. *Reviews in Medical Microbiology*, 24(1), 7–17. doi:10.1097/mrm.0b013e3283587727.
- Ferri, M., Ranucci, E., Romagnoli, P. ve Giaccone, V. (2017). Antimicrobial resistance: A global emerging threat to public health systems. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57(13), 2857–2876. doi:10.1080/10408398.2015.1077192.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA) (2016). *National Antimicrobial Resistance Monitoring System--Enteric Bacteria (U.S.);Center for Veterinary Medicine (U.S.);United States. Food Safety and Inspection Service.;Centers for Disease*

Control and Prevention (U.S.) <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82926>. [Erişim:10.07.2022].

- Franciczek, R., Sobieszcańska, B., Turniak, M., Kasprzykowska, U., Krzyżanowska, B., Jermakow, K., ve Mokracka-Latajka, G. (2012). ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from children with acute diarrhea—antimicrobial susceptibility, adherence patterns and phylogenetic background. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 21(2), 187-192.
- Galleni, M., Lamotte-Brasseur, J., Raquet, X., Dubus, A., Monnaie, D., Knox, J.R. ve Frère, J.-M. (1995). The enigmatic catalytic mechanism of active-site serine β -lactamases. *Biochemical Pharmacology*, 49(9), 1171–1178. doi:10.1016/0006-2952(94)00502-d.
- Gazal, L.E. de S., Medeiros, L.P., Dibo, M., Nishio, E.K., Koga, V.L., Gonçalves, B.C. ve diğ. (2021). Detection of ESBL/AmpC-Producing and Fosfomycin-Resistant *Escherichia coli* From Different Sources in Poultry Production in Southern Brazil. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.604544.
- Giakkoupi, P., Tzouvelekis, L.S., Tsakris, A., Loukova, V., Sofianou, D. ve Tzelepi, E. (2000). IBC-1, a Novel Integron-Associated Class A β -Lactamase with Extended-Spectrum Properties Produced by an *Enterobacter cloacae* Clinical Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2247–2253. doi:10.1128/aac.44.9.2247-2253.2000.
- Gold, H.S. ve Moellering, R.C. (1996). Antimicrobial-Drug Resistance. *New England Journal of Medicine*, 335(19), 1445–1453. doi:10.1056/nejm199611073351907.
- Grijspeerdt, K. (2001). Modelling the penetration and growth of bacteria in eggs. *Food Control*, 12(1), 7–11. doi:10.1016/s0956-7135(00)00015-3.
- Guilmineau, F. ve Kulozik, U. (2006). Impact of a thermal treatment on the emulsifying properties of egg yolk. Part 2: Effect of the environmental conditions. *Food Hydrocolloids*, 20(8), 1114–1123. doi:10.1016/j.foodhyd.2005.12.006.
- Guentzel, M. N. (1996). *Escherichia, klebsiella, enterobacter, serratia, citrobacter, and proteus. Medical Microbiology. 4th edition.*

- Guenther, S., Falgenhauer, L., Semmler, T., Imirzalioglu, C., Chakraborty, T., Roesler, U. ve Roschanski, N. (2017). Environmental emission of multiresistant *Escherichia coli* carrying the colistin resistance gene *mcr-1* from German swine farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, p.dkw585. doi:10.1093/jac/dkw585.
- Gunzburg, S.T., Chang, B.J., Elliott, S.J., Burke, V. ve Gracey, M. (1993). Diffuse and Enteroaggregative Patterns of Adherence of Enteric *Escherichia coli* Isolated from Aboriginal Children from the Kimberley Region of Western Australia. *Journal of Infectious Diseases*, 167(3), 755–758. doi:10.1093/infdis/167.3.755.
- Gunn, J.S. (2008). The Salmonella PmrAB regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more. *Trends in Microbiology*, 16(6), 284–290. doi:10.1016/j.tim.2008.03.007.
- Goffin, C. ve Ghuysen, J.-M. (1998). Multimodular Penicillin-Binding Proteins: An Enigmatic Family of Orthologs and Paralogs. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(4), 1079–1093. doi:10.1128/mmbr.62.4.1079-1093.1998.
- Guyer, D.M., Radulovic, S., Jones, F.-E. ve Mobley, H.L.T. (2002). Sat, the Secreted Autotransporter Toxin of Uropathogenic *Escherichia coli*, Is a Vacuolating Cytotoxin for Bladder and Kidney Epithelial Cells. *Infection and Immunity*, 70(8), 4539–4546. doi:10.1128/iai.70.8.4539-4546.2002.
- Gülay Z. (2001). Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta-laktamlara ve karbapenemlere direnç. *Hastane Enfeksiyonları Dergisi*; 5, 210-229.
- Hasler, C.M. (2000). The Changing Face of Functional Foods. *Journal of the American College of Nutrition*, 19(5), 499S-506S. doi:10.1080/07315724.2000.10718972.
- Hall, L.M., Livermore, D.M., Gur, D., Akova, M. ve Akalin, H.E. (1993). OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 37(8), 1637–1644. doi:10.1128/aac.37.8.1637.
- Hagan, E.C. ve Mobley, H.L.T. (2009). Haem acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney

- infection. *Molecular Microbiology*, 71(1), 79–91. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06509.x.
- Hasman, H., Hammerum, A. M., Hansen, F., Hendriksen, R. S., Olesen, B., Agersø, Y. ve diğ. (2015). Detection of mcr-1 encoding plasmid-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from human bloodstream infection and imported chicken meat, Denmark 2015. *Eurosurveillance*, 20(49), 30085.
- Hazırolan, G.ve Karagöz, A. (2020). Emergence of carbapenemase-producing and colistin resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 high-risk clone in Turkey. *Acta microbiologica et immunologica Hungarica*, 67(4), 216-221.
- Hernan, R.C., Karina, B., Gabriela, G., Marcela, N., Carlos, V. ve Angela, F. (2009). Selection of colistin-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in postneurosurgical meningitis in an intensive care unit with high presence of heteroresistance to colistin. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 65(2), 188–191. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2009.05.019.
- Hewitt, J.H. ve Rigby, J. (1976). Effect of various milk feeds on numbers of *Escherichia coli* and *Bifidobacterium* in the stools of new-born infants. *Journal of Hygiene*, 77(1), 129–139. doi:10.1017/s0022172400055601.
- Health Protection Agency (HPA), (2008), *Laboratory Detection and Reporting of Bacteria with Extended Spectrum β -Lactamases*, <https://bsac.org.uk/wp-content/uploads/2012/02/qsop51.pdf>, [Erişim:16.02.2022].
- Hebbelstrup Jensen, B., Olsen, K.E.P., Struve, C., Krogfelt, K.A. and Petersen, A.M. (2014). Epidemiology and Clinical Manifestations of Enteraggative *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(3), 614–630. doi:10.1128/cmr.00112-13.
- US Department of Health and Human Services (HHS) (2017). Antibiotic resistance threats in the United States. *Centers for Disease Control and Prevention*. 2017.
- Hossain, M., Siddique, M., Hossain, F., Zinnah, M., Hossain, M., Alam, M. ve diğ. (1970). Isolation, identification, toxin profile and antibiogram of *Escherichia coli* isolated from broilers and layers in Mymensingh district of

- Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 6(1), 1–5. doi:10.3329/bjvm.v6i1.1330.
- Hossain, M., Rahman, W., Ali, M., Sultana, T. ve Hossain, K. (2021). Identification and Antibioqram Assay of Escherichia Coli Isolated From Chicken Eggs. *Journal of Bio-Science*, 123–133. doi:10.3329/jbs.v29i0.54828.
- Hua, J., Jia, X., Zhang, L. ve Li, Y. (2020). The Characterization of Two-Component System PmrA/PmrB in Cronobacter sakazakii. *Frontiers in Microbiology*, 11. doi:10.3389/fmicb.2020.00903.
- Huang, S.W., Chang, C.H., Tai, T.F. ve Chang, T.C. (1997). Comparison of the β -Glucuronidase Assay and the Conventional Method for Identification of Escherichia coli on Eosin-Methylene Blue Agar. *Journal of Food Protection*, 60(1), pp.6–9. doi:https://doi.org/10.4315/0362-028x-60.1.6.
- Huntington, J.A. ve Stein, P.E., (2001). Structure and properties of ovalbumin. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1), 189–198. doi:10.1016/S0378-4347(01)00108-6.
- Humphries, R.M., Green, D.A., Schuetz, A.N., Bergman, Y., Lewis, S., Yee, R. ve diğ. (2019). Multicenter Evaluation of Colistin Broth Disk Elution and Colistin Agar Test: a Report from the Clinical and Laboratory Standards Institute. *Journal of Clinical Microbiology*, 57(11). doi:10.1128/jcm.01269-19.
- Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Morita-Ishihara, T., Scheutz, F. ve Ohnishi, M. (2015). Escherichia coli O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping. *Journal of Clinical Microbiology*, 53(8), 2427–2432. doi:10.1128/jcm.00321-15.
- Irrgang, A., Roschanski, N., Tenhagen, B.-A., Grobbel, M., Skladnikiewicz-Ziemer, T., Thomas, K. ve diğ. (2016). Prevalence of mcr-1 in E. coli from Livestock and Food in Germany, 2010–2015. *PLOS ONE*, 11(7), p.e0159863. doi:10.1371/journal.pone.0159863.
- ISO16649, I. S. O. (2018). 3. Microbiology of the Food Chain–Horizontal Method for the Enumeration of Beta-Glucuronidase-Positive Escherichia Coli–Part 3: Detection and Most Probable Number Technique Using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-

Glucuronide. *International Organization for Standardization (ISO)*: Geneva, Switzerland.

- Islam, M., Sabrin, M.S., Kabir, M.H.B. ve Aftabuzzaman, M. (2018). Antibiotic sensitivity and resistant pattern of bacteria isolated from table eggs of commercial layers considering food safety issue. *Asian Journal of Medical and Biological Research*, 4(4), 323–329. doi:10.3329/ajmbr.v4i4.40103.
- Iyer, R.N. (2022). Beta lactam. *Comprehensive Pharmacology*, 3–63. doi:10.1016/b978-0-12-820472-6.00212-7.
- Jann, K.ve Jann, B. (1983). The K Antigens of Escherichia coli. *Host Parasite Relationships in Gram-Negative Infections*, 53–79. doi:10.1159/000407421.
- Jann, K. ve Jann, B. (1992). Capsules of Escherichia coli, expression and biological significance. *Canadian Journal of Microbiology*, 38(7), 705–710. doi:10.1139/m92-116.
- Jacoby, G.A. (2009). AmpC -Lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22(1), 161–182. doi:10.1128/cmr.00036-08.
- Jaurin, B. ve Grundström, T. (1981). ampC cephalosporinase of Escherichia coli K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 78(8), 4897–4901. doi:10.1073/pnas.78.8.4897.
- Joshi, P.R., Thummeepak, R., Leungtongkam, U., Pooarlai, R., Paudel, S., Acharya, M. ve diğ. (2019). The emergence of colistin-resistant *Escherichia coli* in chicken meats in Nepal. *FEMS Microbiology Letters*, 366(20). doi:10.1093/femsle/fnz237.
- Johnson, W.M. ve Lior, H. (1988). A new heat-labile cytolethal distending toxin (CLDT) produced by Escherichia coli isolates from clinical material. *Microbial Pathogenesis*, 4(2), 103–113. doi:10.1016/0882-4010(88)90052-6.
- Johnson, J.R. (1991). Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 4(1), 80–128. doi:10.1128/cmr.4.1.80.

- Johnson, J.R. ve Russo, T.A. (2005). Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology*, 295(6-7), 383–404. doi:10.1016/j.ijmm.2005.07.005.
- Jordan, F. T .W. ve Pattison, M. (1996). *Poultry diseases*. W. B. Saunders Company: London, 38-43.
- Juneja IR ve Kim M. Egg yolk proteins (1997). in: Yamamoto T, Juneja IR, Hatta H, Kim m, eds. *Hen Eggs Their Basic and Applied Science*. Boca Raton: CRC Press, 57-72.
- Källenius, G., Svenson, S.B., Hultberg, H., Möllby, R., Helin, I., Cedergren, B. ve Winberg, J. (1981). Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections, *The Lancet*, 318(8260-8261), 1369–1372. doi:10.1016/s0140-6736(81)92797-5.
- Kaplan, S. L., ve Keusch, G. T. (2004). Diarrhea-and dysentery-causing *Escherichia coli*. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*, 5, 1431-1449.
- Kahan, J.S., Kahan, F.M., Goegelman, R., Currie, S.A., Jackson, M., Stapley, E.O. ve diğ. (1979). Thienamycin, a new .BETA.-lactam antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. *The Journal of Antibiotics*, 32(1), 1–12. doi:10.7164/antibiotics.32.1.
- Kaesbohrer, A., Bakran-Lebl, K., Irrgang, A., Fischer, J., Kämpf, P., Schiffmann, A., ve diğ. (2019). Diversity in prevalence and characteristics of ESBL/pAmpC producing *E. coli* in food in Germany. *Veterinary Microbiology*, 233, 52–60. doi:10.1016/j.vetmic.2019.03.025.
- Katz, E. ve Demain, A. L. (1977). The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis, and possible functions. *Bacteriological reviews*, 41(2), 449-474.
- Kiosseoglou, V. (2003). Egg yolk protein gels and emulsions. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 8(4-5), 365–370. doi:10.1016/s1359-0294(03)00094-3.
- Kliebe, C., Nies, B.A., Meyer, J.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M. ve Wiedemann, B. (1985). Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum

cephalosporins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 28(2), 302–307. doi:10.1128/aac.28.2.302.

King D.T., Sobhanifar S. ve Strynadka N.C.J. (2017) In: *Handbook of Antimicrobial Resistance*. Gotte M., Berghuis A., Matlashewski G., Wainberg M., Sheppard D., editors. Springer; New York, NY: The mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics.

Kim, J. ve Lee, H.-J. (2000). Rapid Discriminatory Detection of Genes Coding for SHV β -Lactamases by Ligase Chain Reaction. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(7), 1860–1864. doi:10.1128/aac.44.7.1860-1864.2000.

Kim, H., Kim, Y.A., Seo, Y.H., Lee, H. ve Lee, K. (2021). Prevalence and Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum- β -Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* from Multiple Sectors of Poultry Industry in Korea. *Antibiotics*, 10(9), 1050. doi:10.3390/antibiotics10091050.

Korpela, J., Salonen, E.-M., Kuusela, P., Sarvas, M. ve Vaheri, A. (1984). Binding of avidin to bacteria and to the outer membrane porin of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 22(1), 3–10. doi:10.1111/j.1574-6968.1984.tb00344.x.

Koyama, Y. (1950). A new antibiotic 'colistin' produced by spore-forming soil bacteria. *The Journal of Antibiotics*, 3, 457-458.

Koyuncu Özyurt, Ö., Özhak, B., Ögünç, D., Yıldız, E., Çolak, D., Günseren, F. Ve Öngüt, G. (2019). Evaluation of the BD Phoenix100 System and Colistin Broth Disk Elution Method for Antimicrobial Susceptibility Testing of Colistin Against Gram-negative Bacteria. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 53(3), 254–261. doi:10.5578/mb.68066.

Kurekci, C., Aydın, M., Nalbantoglu, O.U. ve Gundogdu, A. (2018). First report of *Escherichia coli* carrying the mobile colistin resistance gene *mcr-1* in Turkey. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 15, 169–170. doi:10.1016/j.jgar.2018.09.013.

Laupland, K.B., Church, D.L., Vidakovich, J., Mucenski, M. ve Pitout, J.D.D. (2008). Community-onset extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia*

- coli: Importance of international travel. *Journal of Infection*, 57(6), 441–448. doi:10.1016/j.jinf.2008.09.034.
- Leclercq, R., Cantón, R., Brown, D.F.J., Giske, C.G., Heisig, P., MacGowan, A.P. ve diğ. (2013). EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clinical Microbiology and Infection*, 19(2), 141–160. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03703.x.
- Lee, M., Seo, D.J., Jeon, S.B., Ok, H.E., Jung, H., Choi, C. ve Chun, H.S. (2016). Detection of Foodborne Pathogens and Mycotoxins in Eggs and Chicken Feeds from Farms to Retail Markets. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 36(4), 463–468. doi:10.5851/kosfa.2016.36.4.463.
- Lewinson, W ve Jawetz, E. (2000). Gram-Negative Rods Related to the Enteric Tract. *Review of Medical Microbiology & Immunology: A Guide to Clinical Infectious Diseases*, San Francisco, U.S.A. 107-26.
- Linscott, A.J.ve Brown, W.J. (2005). Evaluation of Four Commercially Available Extended-Spectrum Beta-Lactamase Phenotypic Confirmation Tests. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1081–1085. doi:10.1128/jcm.43.3.1081-1085.2005.
- Livermore, D.M. (1995). beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(4), 557–584. doi:10.1128/cmr.8.4.557.
- Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G. ve diğ. (2006). CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59(2), 165–174. doi:10.1093/jac/dkl483.
- Li-Chan, E. C., Powrie, W. D. ve Nakai, S. (2017). The chemistry of eggs and egg products. *In Egg science and technology*, 105-175.
- Liu, D., Ainsworth, A.Jerald., Austin, F.W. ve Lawrence, M.L. (2004). Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 91(3), 297–304. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2003.07.004.

- Liu, Y.-Y., Wang, Y., Walsh, T.R., Yi, L.-X., Zhang, R., Spencer, J. ve diğ. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet. Infectious diseases*, 16(2), 161–8. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
- Leverstein-van Hall, M.A., Fluit, A.C., Paauw, A., Box, A.T.A., Brisse, S. ve Verhoef, J. (2002). Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 Automated Instruments for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(10), pp.3703–3711. doi:10.1128/jcm.40.10.3703-3711.2002.
- Losso J. N., Nakai S. ve Charter E. A. (2000). *Lysozyme, Natural Food Antimicrobial System*. Boca Raton, Fla, USA: CRC Press. 185-210.
- Long, A.J., Clifton, I.J., Roach, P.L., Baldwin, J.E., Rutledge, P.J. ve Schofield, C.J. (2005). Structural Studies on the Reaction of Isopenicillin N Synthase with the Truncated Substrate Analogues δ -(1- α -aminoadipoyl)-l-cysteinyl-glycine and δ -(1- α -aminoadipoyl)-l-cysteinyl-d-alanine. *Biochemistry*, 44(17), 6619–6628. doi:10.1021/bi047478q.
- Lukac, P.J., Bonomo, R.A. ve Logan, L.K. (2015). Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in Children: Old Foe, Emerging Threat. *Clinical Infectious Diseases*. doi:10.1093/cid/civ020.
- MacConkey, A. (1905). Lactose-Fermenting Bacteria in Faeces. *Journal of Hygiene*, 5(3), 333–379. doi:10.1017/s002217240000259x.
- Makrides, M., Hawkes, J.S., Neumann, M.A. ve Gibson, R.A. (2002). Nutritional effect of including egg yolk in the weaning diet of breast-fed and formula-fed infants: a randomized controlled trial. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 75(6), 1084–1092. doi:10.1093/ajcn/75.6.1084.
- Maiti, S.N., Phillips, O.A., Micetich, R.G. ve Livermore, D.M. (1998). β -Lactamase Inhibitors: Agents to Overcome Bacterial Resistance. *Current Medicinal Chemistry*, 5(6), 441–456. doi:10.2174/0929867305666220319110127.

- Manges, A.R., Dietrich, P.S. ve Riley, L.W. (2004). Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Clonal Groups Causing Community-Acquired Pyelonephritis. *Clinical Infectious Diseases*, 38(3), 329–334. doi:10.1086/380640.
- Marshall, B.M. ve Levy, S.B. (2011). Food Animals and Antimicrobials: Impacts on Human Health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 718–733. doi:10.1128/cmr.00002-11.
- Martínez-Álvarez, S., Sanz, S., Olarte, C., Hidalgo-Sanz, R., Carvalho, I., Fernández-Fernández, R.ve diğ. (2022). Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from the Broiler Farm Environment, with Detection of SHV-12-Producing Isolates. *Antibiotics*, 11(4), 444. doi:10.3390/antibiotics11040444.
- Mayes, F.J. ve Takeballi, M.A. (1983). Microbial Contamination of the Hen's Egg: A Review. *Journal of Food Protection*, 46(12), 1092–1098. doi:10.4315/0362-028x-46.12.1092.
- McMahon, M.A.S., Xu, J., Moore, J.E., Blair, I.S. ve McDowell, D.A. (2006). Environmental Stress and Antibiotic Resistance in Food-Related Pathogens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(1), 211–217. doi:10.1128/aem.00578-06.
- Meng J ve Schroeder CM. 2007. *Escherichia coli*. Ch 1 In: Simjee S.(ed) *Foodborne diseases*. Totowa: Humana Press. 1-25.
- Mezhoud, H., Chantziaras, I., Iguer-Ouada, M., Moula, N., Garmyn, A., Martel, A. ve diğ. (2016). Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. *Avian Pathology*, 45(4), 493–500. doi:10.1080/03079457.2016.1167837
- Miranda, J., Anton, X., Redondo-Valbuena, C., Roca-Saavedra, P., Rodriguez, J., Lamas, A. ve diğ. (2015). Egg and Egg-Derived Foods: Effects on Human Health and Use as Functional Foods. *Nutrients*, 7(1), 706–729. doi:10.3390/nu7010706.
- Moataz, saad, N. ve el-bassiony (2021). Detection of Coliforms in table eggs. *New Valley Veterinary Journal*. doi:10.21608/nvj.2021.91134.1000.

- Mirsepasi-Lauridsen, H.C., Du, Z., Struve, C., Charbon, G., Karczewski, J., Krogfelt, K.A. ve diğ. (2016). Secretion of Alpha-Hemolysin by *Escherichia coli* Disrupts Tight Junctions in Ulcerative Colitis Patients. *Clinical and Translational Gastroenterology*, 7(3), 149. doi:10.1038/ctg.2016.3.
- Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J.H., Landry, M.L. ve Pfaller, M.A. (2009). *Klinik Mikrobiyoloji*. (1). Ankara/Türkiye: Atlas Kitapçılık, 734-748.
- Musgrove, M.T., Jones, D.R., Northcutt, J.K., Cox, N.A., Harrison, M.A., Fedorka-Cray, P.J. ve Ladely, S.R. (2006). Antimicrobial Resistance in *Salmonella* and *Escherichia coli* Isolated from Commercial Shell Eggs. *Poultry Science*, 85(9), 1665–1669. doi:10.1093/ps/85.9.1665.
- National Academy of Sciences (NAS) (2002). *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef. Washington, D.C.: National Academies Press. doi:10.17226/10528.
- Naas T ve Nordmann P. (1999). OXA-type β -lactamases. *Current Pharmaceutical Design*, 5: 865–879.
- Naas, T., Poirel, L. ve Nordmann, P. (2008). Minor extended-spectrum β -lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 42–52. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01861.x.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R. O. Y., Prado, V., Vial, P., ve Levine, M. M. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *The Pediatric infectious disease journal*, 6(9), 829-831.
- Nataro, J.P. ve Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142–201. doi:10.1128/cmr.11.1.142.
- Nataro, J.P., Bopp, C.A., Fields, P.I., Kaper, J.B. ve Strockbine, N.A. (2011). *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. *Manual of Clinical Microbiology*, pp.603–626. doi:10.1128/9781555816728.ch35.
- Nagshetty, K., Shilpa, B.M., Patil, S.A., Shivannavar, C.T. ve Manjula, N.G. (2021). An Overview of Extended Spectrum Beta Lactamases and Metallo Beta Lactamases. *Advances in Microbiology*, 11(01), 37–62. doi:10.4236/aim.2021.111004.

- Nishino, Y., Shimojima, Y., Suzuki, Y., Ida, M., Fukui, R., Kuroda, S. ve diğ. (2017). Detection of the mcr-1 gene in colistin-resistant *Escherichia coli* from retail meat in Japan. *Microbiology and Immunology*, 61(12), 554–557. doi:10.1111/1348-0421.12549.
- Nolan, L. K., Barnes, H. J., Vaillancourt, J. P., Abdul-Aziz, T., ve Logue, C. M. (2013). Colibacillosis. *Diseases of poultry*, 751-805.
- Odoi, J.O., Takayanagi, S., Sugiyama, M., Usui, M., Tamura, Y. ve Asai, T. (2021). Prevalence of Colistin-Resistant Bacteria among Retail Meats in Japan. *Food Safety*, 9(2), 48–56. doi:10.14252/foodsafetyfscj.d-21-00002.
- Oikarainen, P.E., Pohjola, L.K., Pietola, E.S. ve Heikinheimo, A. (2019). Direct vertical transmission of ESBL/pAmpC-producing *Escherichia coli* limited in poultry production pyramid. *Veterinary Microbiology*, 231, 100–106. doi:10.1016/j.vetmic.2019.03.001.
- Olaitan, A.O., Morand, S. ve Rolain, J.-M. (2014). Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 5. doi:10.3389/fmicb.2014.00643.
- Ouellette, M., Bissonnette, L. ve Roy, P.H. (1987). Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(21), 7378–7382. doi:10.1073/pnas.84.21.7378.
- Okubo, T., Akachi, S. ve Hatta, H. (2018). Structure of hen eggs and physiology of egg laying. In *Hen eggs*, 1-12. CRC press.
- Otter, J.A., Doumith, M., Davies, F., Mookerjee, S., Dyakova, E., Gilchrist, M. ve diğ. (2017). Emergence and clonal spread of colistin resistance due to multiple mutational mechanisms in carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in London. *Scientific Reports*, 7(1). doi:10.1038/s41598-017-12637-4.
- Ørskov, I. ve Ørskov, F. (1985). *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. *Journal of Hygiene*, 95(3), 551–575. doi:10.1017/s00222172400060678.

- Parkinson, T.L. (1966). The chemical composition of eggs. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 17(3), 101–111. doi:10.1002/jsfa.2740170301.
- Palaniappan, R.U.M., Zhang, Y., Chiu, D., Torres, A., DebRoy, C., Whittam, T.S. ve Chang, Y.-F. (2006). Differentiation of *Escherichia coli* Pathotypes by Oligonucleotide Spotted Array. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(4), 1495–1501. doi:10.1128/JCM.44.4.1495-1501.2006.
- Pai, H., Kang, C.-I., Byeon, J.-H., Lee, K.-D., Park, W.B., Kim, H.-B. ve diğ. (2004). Epidemiology and Clinical Features of Bloodstream Infections Caused by AmpC-Type- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(10), 3720–3728. doi:10.1128/aac.48.10.3720-3728.2004.
- Paterson, D.L. ve Bonomo, R.A. (2005). Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657–686. doi:10.1128/cmr.18.4.657-686.2005.
- Pasquali, F., De Cesare, A., Valero, A., Olsen, J.E. ve Manfreda, G. (2014). Improvement of sampling plans for *Salmonella* detection in pooled table eggs by use of real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 184, 31–34. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.005.
- Payne, M., Croxen, M.A., Lee, T.D., Mayson, B., Champagne, S., Leung, V. ve diğ. (2016). *mcr-1*–Positive Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Traveler Returning to Canada from China. *Emerging Infectious Diseases*, 22(9), 1673–1675. doi:10.3201/eid2209.160177.
- Paterson, D. L. ve Doi, Y. (2007). Editorial commentary: a step closer to extreme drug resistance (XDR) in Gram-negative bacilli. *Clinical infectious diseases*, 1179–1181.
- Pehlivanlar Önen, S., Aslantaş, Ö., Şebnem Yılmaz, E. ve Kürekci, C. (2015). Prevalence of β -Lactamase Producing *Escherichia coli* from Retail Meat in Turkey. *Journal of Food Science*, 80(9), 2023–2029. doi:10.1111/1750-3841.12984.
- Pennington, H. (2010). *Escherichia coli* O157. *The Lancet*, 376(9750), 1428–1435. doi:10.1016/s0140-6736(10)60963-4.

- Pitout, J.D. ve Laupland, K.B. (2008). Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet Infectious Diseases*, 8(3), 159–166. doi:10.1016/s1473-3099(08)70041-0.
- Phillips, I. (2007). Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30(2), 101–107. doi:10.1016/j.ijantimicag.2007.02.018.
- Price, L.B., Stegger, M., Hasman, H., Aziz, M., Larsen, J., Andersen, P.S. ve diğ. (2012). *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. *mBio*, 3(1). doi:10.1128/mbio.00305-11.
- Poirel, L., Weldhagen, G.F., Naas, T., De Champs, C., Dove, M.G. ve Nordmann, P. (2001). GES-2, a Class A β -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(9), 2598–2603. doi:10.1128/aac.45.9.2598-2603.2001.
- Poirel, L., Kieffer, N., Brink, A., Coetze, J., Jayol, A. ve Nordmann, P. (2016). Genetic Features of MCR-1-Producing Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolates in South Africa. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(7), 4394–4397. doi:10.1128/aac.00444-16.
- Poirel, L., Kieffer, N. ve Nordmann, P. (2017). In Vitro Study of IS *Apl1* -Mediated Mobilization of the Colistin Resistance Gene *mcr-1*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7). doi:10.1128/aac.00127-17.
- Poirel, L., Potron, A. ve Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(7), 1597–1606. doi:10.1093/jac/dks121.
- Poolman, J.T. (2017). *Escherichia coli*. *International Encyclopedia of Public Health*, 585–593. doi:10.1016/b978-0-12-803678-5.00504-x.
- PubChem. (2005). *Colistin*. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Colistin>. [Erişim: 09.08.2022].
- Rasko, D.A., Rosovitz, M.J., Myers, G.S.A., Mongodin, E.F., Fricke, W.F., Gajer, P. ve diğ. (2008). The Pangenome Structure of *Escherichia coli*: Comparative Genomic

- Analysis of *E. coli* Commensal and Pathogenic Isolates. *Journal of Bacteriology*, 190(20), 6881–6893. doi:10.1128/jb.00619-08.
- Ray, C. G., ve Ryan, K. J. (2010). *Sherris medical microbiology*, 6. McGraw-Hill.
- Ratchtrachenchai, O.-A., Subpasu, S., Hayashi, H. ve Ba-Thein, W. (2004). Prevalence of childhood diarrhoea-associated *Escherichia coli* in Thailand. *Journal of Medical Microbiology*, 53(3), 237–243. doi:10.1099/jmm.0.05413-0.
- Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z. ve Jamil, K. (2014). Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(4), 341–346. doi:10.1590/s0036-46652014000400012.
- Richmond, M.H. ve Sykes, R.B. (1973). The β -Lactamases of Gram-Negative Bacteria and their Possible Physiological Role. *Advances in Microbial Physiology*, 31–88. doi:10.1016/s0065-2911(08)60376-8.
- Rhouma, M., Beaudry, F. ve Letellier, A. (2016). Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production? *International Journal of Antimicrobial Agents*, 48(2), 119–126. doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008.
- Roberts, T. A., Cordier, J. L., Gram, L., Tompkin, R. B., Pitt, J. I., Gorris, L. G. M., ve Swanson, K. M. J. (Eds.). (2005). *Micro-organisms in foods 6: microbial ecology of food commodities*. London, UK: Springer US.
- Rossolini, G.M., D'Andrea, M.M. ve Mugnaioli, C. (2008) 'The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases', *Clinical Microbiology and Infection*, 14, pp. 33–41. doi:10.1111/j.1469-0691.2007.01867.x.
- Sack, R. B. (2011). The discovery of cholera-like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretory diarrhoea in humans. *Indian Journal of Medical Research*, 133(2), 171-178.
- Sato, Y., Watanabe, K. ve Takahashi, T. (1973). Lipids in Egg White. *Poultry Science*, 52(4), 1564–1570. doi:10.3382/ps.0521564.

- Schippa, S., Iebba, V., Barbato, M., Di Nardo, G., Totino, V., Checchi, M. ve diğ. (2010). A distinctive 'microbial signature' in celiac pediatric patients. *BMC Microbiology*, 10(1), 175. doi:10.1186/1471-2180-10-175.
- Schrauwen, E. J., Huizinga, P., van Spreuwel, N., Verhulst, C., Kluytmans-van den Bergh, M. F.ve Kluytmans, J. A. (2017). High prevalence of the mcr-1 gene in retail chicken meat in the Netherlands in 2015. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 6(1), 1-5.
- Silva, R.M., Toledo, M.R. ve Trabulsi, L.R. (1980). Biochemical and cultural characteristics of invasive *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 11(5), 441–444. doi:10.1128/jcm.11.5.441-444.1980.
- Sivaraman, G.K., Sudha, S., Muneeb, K.H., Shome, B., Holmes, M. ve Cole, J. (2020). Molecular assessment of antimicrobial resistance and virulence in multi drug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from food fishes, Assam, India. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104581. doi:10.1016/j.micpath.2020.104581.
- Shallo, H. E. (2001). Designer foods: egg products. In *Proceedings of the 54th Reciprocal Meat Conference. American Meat Science Association, Savory, IL*, 169-171.
- Schaefer, A.K., Melnyk, J.E., He, Z., Del Rosario, F. ve Grimes, C.L. (2018). Pathogen- and Microbial- Associated Molecular Patterns (PAMPs/MAMPs) and the Innate Immune Response in Crohn's Disease. *Immunity and Inflammation in Health and Disease*, 175–187. doi:10.1016/b978-0-12-805417-8.00014-7.
- Scott, T.A. ve Silversides, F.G. (2000). The effect of storage and strain of hen on egg quality. *Poultry Science*, 79(12), 1725–1729. doi:10.1093/ps/79.12.1725.
- Servin, A.L. (2005). Pathogenesis of Afa/Dr Diffusely Adhering *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(2), 264–292. doi:10.1128/CMR.18.2.264-292.2005.
- Strixner, T. ve Kulozik, U. (2011). Egg proteins. *Handbook of Food Proteins*, 150–209. doi:10.1533/9780857093639.150.

- Storm, D. R., Rosenthal, K. S. ve Swanson, P. E. (1977). Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual review of biochemistry*, 46(1), 723-763.
- Sykes, J.E. ve Papich, M.G. (2014). Antibacterial Drugs. *Canine and Feline Infectious Diseases*, 66–86. doi:10.1016/b978-1-4377-0795-3.00008-9.
- Sorensen, M., Chandler, C.E., Gardner, F.M., Ramadan, S., Khot, P.D., Leung, L.M. ve diğ. (2020). Rapid microbial identification and colistin resistance detection via MALDI-TOF MS using a novel on-target extraction of membrane lipids. *Scientific Reports*, 10(1). doi:10.1038/s41598-020-78401-3.
- Sodagari, H.R., Wang, P., Robertson, I., Abraham, S., Sahibzada, S. ve Habib, I. (2021). Antimicrobial resistance and genomic characterisation of *Escherichia coli* isolated from caged and non-caged retail table eggs in Western Australia. *International Journal of Food Microbiology*, 340, 109054. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109054.
- Sougakoff, W., Goussard, S. ve Courvalin, P. (1988). The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. *FEMS Microbiology Letters*, 56(3), 343–348. doi:10.1111/j.1574-6968.1988.tb03204.x.
- Sperandio, V. ve Hovde, C.J. (2015). *Enterohemorrhagic Escherichia coli and other shiga toxin-producing E. coli*. Washington, Dc: Asm Press.
- Sunwoo, H.H. ve Gujral, N. (2015). Chemical Composition of Eggs and Egg Products. *Handbook of Food Chemistry*, 331–363. doi:10.1007/978-3-642-36605-5_28.
- Sussman, M. (1997). *Escherichia coli : mechanisms of virulence*. New York: Cambridge University Press.
- Süleymanoğlu, A. A., Aksu H. ve Aydın, A. (2022). Enterobacteriaceae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz ile Karbapenem ve Kolistin Direnci. *Bozok Veterinary Sciences*, 3(1), 12-19.
- Svennerholm, A. M. (2011). From cholera to enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine development. *The Indian journal of medical research*, 133(2), 188.

- Şenköylü, N., (2001). Yumurta Teknolojisi. *Modern Tavukçuluk Üretimi*, Ankara, 277-290.
- Tasbihullah, T., Rahman, S. ur, Ali, T., Saddique, U., Ahmad, S., Shafiq, M. ve diğ. (2020). High Occurrence Rate of Multidrug-Resistant ESBL-Producing *E. coli* Recovered from Table Eggs in District Peshawar, Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology*, 52(4). doi:10.17582/journal.pjz/20190513220514.
- Tarr, P.I., Gordon, C.A. ve Chandler, W.L. (2005). Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *The Lancet*, 365(9464), 1073–1086. doi:10.1016/s0140-6736(05)71144-2.
- Tadesse, D.A., Zhao, S., Tong, E., Ayers, S., Singh, A., Bartholomew, M.J.ve McDermott, P.F. (2012). Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases*, 18(5), 741–749. doi:10.3201/eid1805.111153.
- Taddese, D., Shumi, E.ve Asefa, M. (2020). Isolation and antimicrobial susceptibility pattern of *Escherichia Coli* from laying chicken and egg in Jimma Town, Ethiopia. doi:10.21203/rs.2.21745/v1.
- Ternes W. ve Drotleff A.M. (2011). Egg Lipids. *Chemical, Biological, and Functional Aspects of Food Lipids*. CRC Press.
- Tepeli, S.Ö. ve Demirel Zorba, N.N. (2018). Frequency of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)– and AmpC β -lactamase–producing Enterobacteriaceae in a cheese production process. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2906–2914. doi:10.3168/jds.2017-13878.
- Tenover, F.C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine*, 119(6), 3–10. doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.011.
- Tipper, D.J. ve Strominger, J.L. (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 54(4), 1133–1141. doi:10.1073/pnas.54.4.1133.

- Tomasz, A. (1986). Penicillin-Binding Proteins and the Antibacterial Effectiveness of β -Lactam Antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 8(3), 260–278. doi:10.1093/clinids/8.supplement_3.s260.
- Touati, M., Hadjadj, L., Berrazeg, M., Baron, S.A. ve Rolain, J.M. (2020). Emergence of *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and *mcr-3* genes in North West Algerian farmlands. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 132–137. doi:10.1016/j.jgar.2019.10.001.
- Tsuge, Y., Shimoyamada, M. ve Watanabe, K. (1996). Differences in Hemagglutination Inhibition Activity against Bovine Rotavirus and Hen Newcastle Disease Virus Based on the Subunits in Hen Egg White Ovomucin. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 60(9), 1505–1506. doi:10.1271/bbb.60.1505.
- Resmî Gazete Sayı: 29211. (2014). *Türk Gıda Kodeksi Yumurta Tebliğ*, <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2014/12/20141220-5.htm>, [Erişim: 10.02.2020]
- Towne, T.G., Lewis, J.S., Herrera, M., Wickes, B. ve Jorgensen, J.H. (2010). Detection of SHV-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamase in *Enterobacter* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(1), 298–299. doi:10.1128/jcm.01875-09.
- Töreci K., Topçu A.W., Söyletir G. ve Doğanay M. (2002). *Escherichia türleri. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*. Nobel Tıp Kitabevleri, 1564-1574.
- Tzouveleakis, L.S., Tzelepi, E., Tassios, P.T. ve Legakis, N.J. (2000). CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 14(2), 137–142. doi:10.1016/s0924-8579(99)00165-x.
- Ustaçelebi Ş. (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitabevi Ltd Şti, Ankara, 1, 480-485.
- Ustaçelebi Ş. (1999). *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. Güneş Kitapevi; Ankara, 509-513.

- Ünlütürk, A. ve Turantaş, F. (1993). *Gıda mikrobiyolojisi*, İzmir/Türkiye: Mengi Tan Basımevi, 605-606.
- Van Boeckel, T.P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B.T., Levin, S.A., Robinson, T.P., Teillant, A. ve Laxminarayan, R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(18), 5649–5654. doi:10.1073/pnas.1503141112.
- Vallance, B.A.ve Finlay, B.B. (2000). Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichiacoli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(16), 8799–8806. doi:10.1073/pnas.97.16.8799.
- van den Bogaard, A.E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(6), 763–771. doi:10.1093/jac/47.6.763.
- Valenti, P., Antonini, G., Von Hunolstein, C., Visca, P., Orsi, N. ve Antonini, E. (1983). Studies of the antimicrobial activity of ovotransferrin. *International journal of tissue reactions*, 5(1), 97-105.
- Vadehra, D.V., Baker, R.C. ve Naylor, H.B. (1972). Distribution of lysozyme activity in the exteriors of eggs from *Gallus gallus*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 43(3), 503–508. doi:10.1016/0305-0491(72)90133-2.
- Vercauteren, E., Descheemaeker, P., Ieven, M., Sanders, C.C. ve Goossens, H. (1997). Comparison of screening methods for detection of extended-spectrum beta-lactamases and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in a Belgian teaching hospital. *Journal of clinical microbiology*, 35(9), 2191–2197. doi:10.1128/jcm.35.9.2191-2197.1997.
- Vered, M., Gertler, A. ve Burstein, Y. (2009). Inhibition of Porcine Elastase II by Chicken Ovoidinhibitor. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 18(2), 169–179. doi:10.1111/j.1399-3011.1981.tb02055.x.
- Vigil, P.D., Alteri, C.J. ve Mobley, H.L.T. (2011). Identification of In Vivo-Induced Antigens Including an RTX Family Exoprotein Required for Uropathogenic

- Escherichia coli Virulence. *Infection and Immunity*, 79(6), 2335–2344. doi:10.1128/iai.00110-11.
- Vounba, P., Rhouma, M., Arsenault, J., Bada Alambédji, R., Fravallo, P. ve Fairbrother, J.M. (2019). Prevalence of colistin resistance and mcr-1/mcr-2 genes in extended-spectrum β -lactamase/AmpC-producing Escherichia coli isolated from chickens in Canada, Senegal and Vietnam. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 19, 222–227. doi:10.1016/j.jgar.2019.05.002.
- Walther-Rasmussen, J. ve Høiby, N. (2002). Plasmid-borne AmpC beta-lactamases. *Canadian Journal of Microbiology*, 48(6), 479–493. doi:10.1139/w02-039.
- Waxman, D.J. ve Strominger, J.L. (1983). Penicillin-Binding Proteins and the Mechanism of Action of Beta-Lactam Antibiotics¹. *Annual Review of Biochemistry*, 52(1), pp.825–869. doi:10.1146/annurev.bi.52.070183.004141.
- Wang, X., Wang, Y., Zhou, Y., Li, J., Yin, W., Wang, S. ve diğ. (2018). Emergence of a novel mobile colistin resistance gene, mcr-8, in NDM-producing Klebsiella pneumoniae. *Emerging Microbes & Infections*, 7(1), 1–9. doi:10.1038/s41426-018-0124-z.
- Wang, C., Feng, Y., Liu, L., Wei, L., Kang, M. ve Zong, Z. (2020). Identification of novel mobile colistin resistance gene mcr-10. *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), 508–516. doi:10.1080/22221751.2020.1732231.
- Weihrauch, J.L. ve Son, Y.-S. (1983). Phospholipid content of foods. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 60(12), 1971–1978. doi:10.1007/bf02669968.
- Weintraub, A. (2007). Enterotoxigenic Escherichia coli: epidemiology, virulence and detection. *Journal of Medical Microbiology*, 56(1), 4–8. doi:10.1099/jmm.0.46930-0.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L. ve Strynadka, N.C. (2005). β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 8(5), 525–533. doi:10.1016/j.mib.2005.08.016.

- Winn, W.C. ve Koneman, E.W. (2006). *Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 218-308.
- Whitehead, C.C., Bowman, A.S. ve Griffin, H.D. (1993). Regulation of plasma oestrogen by dietary fats in the laying hen: Relationships with egg weight. *British Poultry Science*, 34(5), 999–1010. doi:10.1080/00071669308417659.
- Wurpel, D.J., Beatson, S.A., Totsika, M., Petty, N.K. ve Schembri, M.A. (2013). Chaperone-Usher Fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 8(1), p.e52835. doi:10.1371/journal.pone.0052835
- World Health organization (WHO) (2003). Diet, nutrition, and the prevention of chronic diseases : report of a Joint WHO/FAO expert consultation [Geneva, 28 January - 1 February 2002]. (2003). Geneva: World Health Organization.
- World Health organization (WHO) (2017) *Prioritization of pathogens to guide discovery, research and development of new antibiotics for drug-resistant bacterial infections, including tuberculosis*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/311820>, [Erişim tarihi: 06.02.2022.]
- World Health organization (WHO) (2017) *WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed*, <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>, [Erişim: 10.06.2022].
- World Health organization (WHO) (2014). *Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance*. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf, [Erişim: 11.08.2022].
- World Health organization (WHO) (2021) *Antimicrobial resistance*, <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>, [Erişim: 10.07.2022].
- World Health organization (WHO) (2015). *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases*, https://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/fergreport/en/, [Erişim: 27.07.2022].

- World Health organization (WHO) (2016). *Global action plan on antimicrobial resistance*, <https://www.who.int/publications/i/item/9789241509763>, [Erişim: 23.08.2022].
- World Health organization (WHO) (2017). *One Health*, <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/one-health>, [Erişim: 13.11.2022].
- World Health organization (WHO) (2022, 19 May) *Food safety*. [online] Who.int. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>, Erişim: 26.07.2022.
- World Health organization (WHO) (2022). *Draft WHO Global Strategy for Food Safety 2022-2030*, <https://www.who.int/publications/m/item/draft-who-global-strategy-for-food-safety-2022-2030>, [Erişim: 26.07.2022].
- World Health organization (WHO) (2021). *Antibiotic Resistance*, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>, [Erişim: 27.07.2022].
- Xavier, B.B., Lammens, C., Ruhai, R., Kumar-Singh, S., Butaye, P. ve diğ. (2016). Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, mcr-2, in *Escherichia coli*, Belgium, *Eurosurveillance*, 21(27). doi:10.2807/1560-7917.es.2016.21.27.30280.
- Xiao, N., Zhao, Y., Yao, Y., Wu, N., Xu, M., Du, H. ve Tu, Y. (2020). Biological Activities of Egg Yolk Lipids: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(7), 1948–1957. doi:10.1021/acs.jafc.9b06616.
- Yıbar, A., Soyutemiz, E., (2013): Antibiotics use in food-producing animals and possible residual risk. *Atatürk Üniv Vet Bil Derg*, 8, 97-104.
- Yıldız, S. S., şimşek, H., Bakkaloğlu, Z., Çevik, Y. N., Hekimoğlu, C. H., Kılıç, S. ve Alp, E. (2021). Türkiye’de 2019 Yılı İinde İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarında Karbapenemaz Epidemiyolojisi. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 55(1), 1-16.

- Yamamoto, Y., Sogo, N., Iwao, R. ve Miyamoto, T. (1990). Antioxidant Effect of Egg Yolk on Linoleate in Emulsions. *Agricultural and Biological Chemistry*, 54(12), 3099–3104. doi:10.1080/00021369.1990.10870480.
- Yang, Y.-Q., Li, Y.-X., Lei, C.-W., Zhang, A.-Y. ve Wang, H.-N. (2018). Novel plasmid-mediated colistin resistance gene mcr-7.1 in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(7), 1791–1795. doi:10.1093/jac/dky111.
- Yang, Y.-Q., Li, Y.-X., Song, T., Yang, Y.-X., Jiang, W., Zhang, A.-Y., Guo, X.-Y. ve diğ. (2017). Colistin Resistance Gene mcr-1 and Its Variant in *Escherichia coli* Isolates from Chickens in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(5). doi:10.1128/AAC.01204-16.
- Yin, W., Li, H., Shen, Y., Liu, Z., Wang, S., Shen, Z. ve diğ. (2017). Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene mcr-3 in *Escherichia coli*. *mBio*, 8(3). doi:10.1128/mbio.00543-17.
- Yokota, T., Ohishi, H. ve Watanabe, K. (1999). Antitumor Effects of .BETA.-Subunit from Egg White Ovomucin on Xenografted Sarcoma-180 Cells in Mice. *Food Science and Technology Research*, 5(3), 279–283. doi:10.3136/fstr.5.279.
- Yongcheng, L., Michael, B., Clive, LI., Gary, M. ve Wang, K.(2013). *Eggshell powder compositions and methods of producing eggshell powder compositions*. <https://patents.google.com/patent/WO2013075003A1/en> , [Erişim: 08.10.2022].
- Yocum, R.R., Waxman, D.J., Rasmussen, J.R. ve Strominger, J.L. (1979). Mechanism of penicillin action: penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(6), 2730–2734. doi:10.1073/pnas.76.6.2730.
- Yoon, E. J., Hong, J. S., Yang, J. W., Lee, K. J., Lee, H. ve Jeong, S. H. (2018). Detection of mcr-1 plasmids in Enterobacteriaceae isolates from human specimens: comparison with those in *Escherichia coli* isolates from livestock in Korea. *Annals of laboratory medicine*, 38(6), 555.
- Zajac, M., Sztromwasser, P., Bortolaia, V., Leekitcharoenphon, P., Cavaco, L.M., Ziğtek-Barszcz, A. ve diğ. (2019). Occurrence and Characterization of mcr-1-Positive

Escherichia coli Isolated From Food-Producing Animals in Poland, 2011–2016. *Frontiers in Microbiology*, 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01753.

Zhang, W., Zhang, T., Wang, C., Liang, G., Lu, Q., Wen, G. ve diğ. (2022). Prevalence of colistin resistance gene mcr-1 in Escherichia coli isolated from chickens in central China, 2014 to 2019. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 29, 241–246. doi:10.1016/j.jgar.2022.03.024.

Zeidler, G. (2002). Shell Eggs and Their Nutritional Value. *Commercial Chicken Meat and Egg Production*, 1109–1128. doi:10.1007/978-1-4615-0811-3_57.

Zou, M., Ma, P.-P., Liu, W.-S., Liang, X., Li, X.-Y., Li, Y.-Z. ve Liu, B.-T. (2021). Prevalence and Antibiotic Resistance Characteristics of Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli among Healthy Chickens from Farms and Live Poultry Markets in China. *Animals*, 11(4), 1112. doi:10.3390/ani1104111.

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI

İSTANBUL'DAN ELDE EDİLEN TAVUK YUMURTALARINDA
Escherichia coli VARLIĞI ile GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU
BETA LAKTAMAZ POZİTİF E.coli SUŞLARI ve KOLİSTİN
DİRENCİNİN ARAŞTIRILMASI

ORJİNALLİK RAPORU

% 12	% 10	% 5	% 5
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	% 4
2	Submitted to The Scientific & Technological Research Council of Turkey (TUBITAK) Öğrenci Ödevi	% 1
3	Submitted to Istanbul University Öğrenci Ödevi	% 1
4	Submitted to Erciyes Üniversitesi Öğrenci Ödevi	% 1
5	Dongyou Liu. "Diarrhoeagenic Escherichia coli", Elsevier BV, 2015 Yayın	% 1
6	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	% 1
7	<u>www.researchgate.net</u> İnternet Kaynağı	<% 1

ETİK KURUL İZİN YAZISI

Uyarı: Canlı denekler üzerinde yapılan tüm araştırmalar için Etik Kurul Belgesi alınması zorunludur.

- ☐ Etik Kurul izni gerekmektedir.
- ☒ Etik Kurul izni gerekmemektedir.

Ali Anıl SÜLEYMANOĞLU



KURUM İZNİ YAZILARI

Uyarı: Canlı ve cansız deneklerle yapılan tüm çalışmalar için kurum izin belgelerinin eklenmesi zorunludur. Gizlilik ve mahremiyet içeren durumlarda kurum adı kapatılmalıdır.

- ☐ Kurum izni gerekmektedir.
- ☒ Kurum izni gerekmemektedir.

Ali Anıl SÜLEYMANOĞLU

