



Adana İlinde Tavuk Etlerinde Geniş Spektrumlu Beta Laktamaz Gen Varlığının Tespitine Yönelik Pilot Bir Araştırma

Tülin Güven Gökmen

Çukurova Üniversitesi Ceyhan Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana,01630

Fatih Köksal

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Adana,01330

ÖZET

Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) üreten bakterilerin tüm dünyada giderek artan prevalansı tedavi başarısızlıklarının önemli bir sebebidir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda antibiyotik kullanımında akılcı olmayan yaklaşımlar gibi klasik risk faktörlerinin yanında kontamine gıda tüketimi oluşan kolonizasyonunda önemli bir risk faktörü olabileceği belirtilmektedir. Bu kolonizasyon sadece oluşacak enfeksiyonların tedavi edilmesini güçleştirmeyip aynı zamanda bu direnç mekanizmasının plazmid aracılığı ile bağırsakta bulunan diğer bakterilere de aktarılmasını kolaylaştırmaktadır. Bu çalışmada, Adana ilinde çeşitli market ve şarküterilerden toplanan 50 tavuk eti örneğinde GSBL varlığını tespit etmek ve moleküler düzeyde karakterizasyonunu yapmak amaçlanmıştır. Tavuk etlerinden steril eküvyonla sürüntü örnekleri alınarak Endo ve Kanlı Agar'a pasaj yapıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra gram negatif bakteriler Braun-Silberstein ve TSI besiyerlerine pasajlanarak üretilen kolonilerin makroskopik, mikroskopik morfolojik özelliklerine, biyokimyasal aktivitelerine göre identifikasyonu yapıldı. Daha sonra ticari bir identifikasyon kiti olan BBL Crystal System ile identifikasyon doğrulandı. *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E.coli*, *P.aeruginosa* ve *Proteus mirabilis* türleri tanımlanmıştır. Bu izolatlar ilk olarak Kirby-Bauer disk difüzyon testi ve çift disk sinerji testi ile geniş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) varlığı yönünden irdelenmiştir. Ardından Enterobacteriaceae ailesi üyelerinde GSBL varlığını gösteren *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{TEM} genlerinin tanımlanması için multipleks-PCR yöntemi uygulanmıştır. Sonuç olarak yalnızca bir örnekte bir *E.coli* izolatında fenotipik olarak GSBL varlığı gösterilmiş ve *bla*_{TEM} gen varlığı gösterilerek genotipik olarak doğrulanmıştır. Bölgemizde büyük çaplı epidemiyolojik çalışmalar yapılarak GSBL üreten izolatların prevalansı belirlenmeli ve kolonizasyon ve enfeksiyon izolatlarının klonal ilişkisi irdelenmelidir.

Anahtar Kelimeler: Tavuk eti, Antibiyotik Direnci, GSBL, *bla*_{TEM}

A Pilot Study for Determination of Extended-Spectrum Beta Lactamase Genes on Chicken meat in Adana

ABSTRACT

The increasing prevalence of Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) is a major cause of treatment failure worldwide. In recent studies, apart from the classic risk factors such as use of irrational antibiotics, colonization on contaminated food is reported to be an important risk factor. Colonization not only makes the infections difficult to treat, it makes easy transfer of bacterial resistance mechanisms in the gut via plasmid. In this study is aimed to detect the presence of ESBL and characterize at the molecular level on the fifty chicken samples collected from various market and butcher shop. Swab samples are taken from chicken meat by sterile swabs and inoculated Blood and Endo Agar. After an overnight incubation, gram-negative bacteria were inoculated Brain-Silberstein and TSI agar. Colonies were evaluated by macroscopic, microscopic and morphological characteristics. The identification was made according to the biochemical activity and confirmed a commercial identification kits (BBL Crystal Identification System). *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *Proteus mirabilis* species have been identified. These isolates were evaluated phenotypically by Kirby-Bauer disk diffusion test and double disk synergy test for the presence of extended spectrum beta-lactamase (ESBL). Then, the presence of *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes were performed and confirmed by multiplex-PCR method. As a result, the presence of ESBL was shown phenotypically one *E. coli* isolate from only one sample and *bla*_{TEM} gene was determined in same isolate. In our region, the prevalence of ESBL-producing isolates should be determined by larger epidemiological studies and the clonal relationship between colonization and infection should be considered.

Keywords: Chicken meat, Antibiotic Resistance, ESBL, *bla*_{TEM}

GİRİŞ

Beta-laktam grubu antibiyotikler yan etkilerinin azlığı ve bakterisidal etkileri nedeniyle günümüzde en sık kullanılan antibiyotik grubudur. Bakterilerin peptidoglikan tabakasının sentezini bozarak etki ederler[1].

Alexander Fleming'in 1928 yılında penisilini keşfinin ardından ve zamanla gruba yeni ve etkin üyelerin katılması ile beraber Beta-laktam grubu antibiyotikler yoğun ve rasyonel olmayan şekilde kullanılmaya başlanmıştır[2].

Bu kullanım alanlarından biri de hayvan yemleri olmuştur. Broyler tavuk yetiştiriciliğinde büyüme performansını artırma veya enfeksiyonları önlemek amacıyla belirli oranlarda rasyonlara katılan Beta laktam grubu antibiyotikler (Penisilin), özellikle, ülkemizde kontrolsüz şekilde kullanılabilir. Bu antibiyotiklerin yetiştiricilikte kullanılması, başta hayvanlardan elde edilen gıdalar olmak üzere, insan sağlığı açısından da ciddi tehlikeleri ortaya çıkarabilmektedir. Antibiyotikler böbrek ve karaciğer olmak üzere çeşitli organ ve dokularda birikmektedirler. İlaç kalıntısı içeren gıdaları tüketen bireylerde, alerjik reaksiyonlar, toksik belirtiler, üreme bozuklukları, bağırsak florasında değişiklikler ve özellikle dirençli bakterilerin gelişimi gözlenebilmektedir[3,4,5].

Dirençli bakterilerde direnç mekanizmalarından en dikkat çekici olanı Beta-laktamaz enzimleridir. Beta-laktamazlar, Beta-laktam grubu antibiyotiklerin beta-laktam halkasındaki siklik amid bağlarını parçalayarak ajanların etkinliğini ortadan kaldıran enzimlerdir. Bu mekanizma başta *Enterobacteriaceae* üyeleri olmak üzere birçok bakteri türünün en önemli direnç mekanizmalarından birisidir. Bugüne kadar 350'ye yakın beta-laktamaz enzimi tanımlanmıştır. Bunların yaklaşık 150'si genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL, extended-spectrum beta-lactamases, ESBL) olup plazmidik özellikleri nedeniyle

bakteriler arasında transfer edilebilir. GSBL'ler gram-negatif basillerde bulunan, geniş spektrumlu sefalosporinler ve aztreonam karşı dirençten sorumlu olan enzimlerdir[6,7,8,9].

Rasyonlara katılan antibiyotiklere maruz kalarak tavuk intestinal florasında zamanla Beta laktamaz enzimi oluşturan mikroorganizmalar gıdaları kontamine ederek insan vücuduna alınmakta ve direnç genlerini insan gastrointestinal sistemindeki diğer bakterilere kolayca aktarabilmektedir. Dirençli mikroorganizmaların, insan gastrointestinal florasına yerleşmesi ve mobil elementler aracılığı ile GSBL genlerini kolayca flora üyelerine horizontal transferi sonrasında tedavisi zor veya başarısız enfeksiyonlar ortaya çıkabilmektedir[10].

Bu çalışmada, Adana ilinde çeşitli market ve şarküterilerden toplanan tavuk eti örneklerinde GSBL varlığını tespit etmek ve moleküler düzeyde karakterizasyonunu yapmak amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Çalışmamıza Adana ilinde yeralan 4 market ve 7 şarküteriden toplanan 50 tavuk eti örneği dahil edildi. Tavuk etlerinden steril eküvyonla sürüntü örnekleri alınarak Endo ve Kanlı Agar'a pasaj yapıldı. Bir gecelik inkübasyondan sonra gram negatif bakteriler "Braun-Silberstein" ve TSI besiyerlerine pasajlanarak üretilen kolonilerin makroskopik, mikroskopik morfolojik özelliklerine, biyokimyasal aktivitelerine göre identifikasyonu yapıldı. Daha sonra ticari bir identifikasyon kiti olan BBL Crystal System ile identifikasyon doğrulandı.

Bakterilerde GSBL varlığı çift disk sinerji testi (ÇDST) ile tespit edildi. GSBL enzimlerinin moleküler yöntemlerle tespiti için suşlar Mueller-Hinton agar (MHA) besiyerine pasajlandı.

Besiyerinde saf kültür halinde üreyen izolatlar steril öze ile alınarak, 1 ml TE buffer içerisinde 5 McFarland bulanıklığında süspanse edildi. Daha sonra kuru ısı bloğunda (Biosan., Türkiye) 90°C'de 30 dakika kaynatıldı. 3000 devirde 5 dakika santrifüj edildi ve elde edilen süpernatant amplifikasyon için kalıp DNA olarak kullanıldı.

Her bir suşun DNA ekstraktı ile *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} genlerine yönelik spesifik primerlerle amplifikasyon işlemi yapıldı (Tablo 1). MJ Mini 48 (Biorad, ABD) cihazında Dallene ve arkadaşlarının tanımladığı şekilde multipleks-PCR gerçekleştirildi[11]. Amplifiye edilen ürünler agaroz jel elektroforezinde görüntüldü. Her bir gen için bant büyüklükleri, DNA moleküler marker (Roche, Almanya) ve negatif kontrol ile karşılaştırılarak yorumlandı.

Tablo 1. Multipleks-PCR ve spesifik PCR primerleri.

Set	Beta laktamaz geni	Amplikon Büyüklüğü
Multiplex I	TEM, SHV	800bp, 713bp
Multiplex II	CTX-M Group 1,2,9,8/25	688bp, 404bp, 561bp, 326bp

BULGULAR

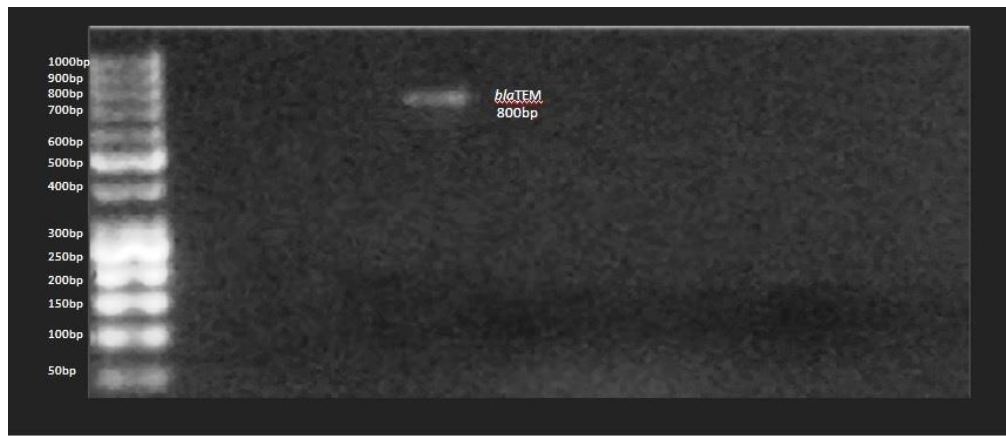
Adana ilinde yeralan 4 market ve 7 şarküteriden toplanan 50 tavuk eti (göğüs, but) örneğini dahil ettiğimiz çalışmamızda *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes*, *E.coli*, *P.aeruginosa* ve *Proteus mirabilis* türleri tanımlanmıştır. Bu izolatlar ilk olarak Kirby-Bauer disk difüzyon testi ve çift disk sinerji testi ile geniş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) varlığı yönünden irdelenmiştir.

Yalnızca bir *E.coli* izolatında bu yöntemler ile GSBL üretimi fenotipik olarak gösterilmiştir. Ardından izole ettiğimiz tüm Enterobacteriaceae ailesi üyelerinde GSBL varlığını gösteren genlerinin tanımlanması için PCR yöntemi uygulanmıştır.

Sonuç olarak fenotipik olarak GSBL varlığı tespit edilen tek *E.coli* izolatında *bla*_{TEM} gen varlığı gösterilerek genotipik olarak doğrulanmıştır (Tablo 2, Şekil 1).

Tablo 2. Tavuk etlerinden izole edilen isolatlar ve GSBL varlığının fenotipik ve genotipik dağılımı

İzole edilen türler	Sayı	Çift disk sinerji yöntemi	GSBL gen varlığı
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	14	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	12	-	-
<i>E.coli</i>	24	1	1
<i>P.aeruginosa</i>	13	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	21	-	-



Şekil 1: *E.coli* izolatında *bla*_{TEM} geni varlığının PCR yöntemiyle gösterilmesi

TARTIŞMA

Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz (GSBL) üreten *Enterobacteriaceae* izolatları tüm dünyada çiftlik hayvanlarından, vahşi hayvanlardan, hayvansal gıdalardan ve pet hayvanlarından izole edilmektedir. Hayvanlar GSBL genlerini taşıyan bakteriler içinde rezervuar rol oynamaktadırlar¹².

Hayvanların intestinal florasında bulunan *Enterobacteriaceae* üyeleri besinlerle aldıkları kontrolsüz, dozu “fazla ama öldürmeyen” antibiyotikler nedeniyle zamanla ortama uyum sürecine girmiş ve çeşitli mutasyonlarla direnç mekanizmaları oluşturmuşlardır. En önemli direnç mekanizmalarından biri olan GSBL genlerinin varlığı ve bu genin mobil genetik elementlerle flora elemanlarına horizontal geçişi direncin yayılımında önemli bir tehdit oluşturmaktadır[10,13,14].

Avrupa ülkelerinde çiftlik hayvanları ve hayvansal gıda kaynaklı kommensal ve zoonoz bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının gözlemlendiği ulusal programlar bulunmaktadır. Ancak, Türkiye’de dirençli mikroorganizmaların ve direnç kodlayan genlerin gıdalar yoluyla insanlara bulaşma yolları hakkında kapsamlı epidemiyolojik araştırmalar azdır ve bu konuda ulusal bir program bulunmamaktadır. Ancak 23.12.2011 tarihinde yayınlanan “Zoonozlar Ve Zoonotik Etkenler, İlgili Antimikrobiyal Direnç Ve Gıda Kaynaklı Salgınların İzlenmesi Yönetmeliği” ile konunun yasal dayanağı oluşturulmuştur[15].

Avrupa Birliği tarafından antibiyotik kökenli büyütme faktörlerinin kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde kullanılmasının günümüzde geniş ölçüde yasaklandığı bildirilmiştir. Son yıllarda araştırmacılar, antibiyotiklere alternatif olabilecek doğal ve gelişmeyi hızlandırıcı madde arayışı içine girmişlerdir. Bu

amaçla probiyotikler, organik asitler ve enzimlerin alternatif olarak kullanımı güncellik kazanmıştır[16,17,18,19].

Hollanda’da yapılan bir çalışmada parekende olarak satışa sunulan tavuk etlerinden izole edilen *E.coli* izolatlarında GSBL gen oranı %79.8 olarak belirlenmiştir[20]. Doi ve arkadaşları Seville, İspanya’da yaptıkları çalışmalarında ise bu oranı %67 olarak tespit etmişlerdir[21]. İngilterede yapılan bir çalışmada ise oran %37 olarak ifade edilmiştir[22]. Bizim çalışmamızda bu oranlara kıyasla oldukça düşük bir oran bulunmuştur. Ancak, bölgemizde daha geniş çaplı bir çalışma yapılarak GSBL prevalansı yeniden değerlendirilebilir.

GSBL genleri plazmidler veya diğer mobil elementler üzerine yerleşip kolayca bakteri türleri arasında tranfer olabilir. Yapılan çalışmalarda plazmid-aracılı beta-laktamazların TEM ve SHV tipleri, diğer mobil element-aracılı olanların ise CTX-M tipi oldukları belirlenmiştir. Özellikle 1990’lı yıllarda en çok rapor edilen beta-laktamaz genleri hastane çevresinde klinik örneklerden izole edilen *bla*_{TEM/SHV} iken, son yıllarda global olarak toplum kökenli *bla*_{CTX-M} genleri önemli oranda artmıştır. Bizim çalışmamızda tespit ettiğimiz beta-laktamaz geni *bla*_{TEM}’dir. Yapılan çalışmalarda dizi analizi yöntemleri ile coğrafik olarak farklılık gösteren hayvan kökenli çeşitli TEM, SHV ve CTX-M aileleri tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada en sık belirlenen GSBL genlerinin CTX-M-1, TEM-52 ve SHV-12 olduğu bildirilmiştir[23].

Etlerden ve klinik örneklerden izole edilen GSBL üreten Enterobacteriaceae izolatlarının kaynaklarını ve klonal ilişkilerini tespit amacıyla son yıllarda Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) ve Multi Locus Sequence Typing (MLST) gibi çeşitli moleküler epidemiyolojik yöntemler kullanılmaktadır[20,24]. Bölgemizde daha fazla örnek ve izolatla GSBL oranlarının belirlenmesine ve klonal ilişkilerinin PFGE yöntemiyle tespitine yönelik bir çalışma planlanmaktadır.

SONUÇ

Ülkemizde antibiyotik direncinin giderek yükselen grafiğine etki eden önemli etkenlerden biri dirençli mikroorganizma ile kontamine gıdalar olarak gösterilmektedir. Çalışmamızda, Adana ilinde GSBL prevalansı düşük olarak tespit edilsede, bölgemizdeki gıdalardaki kontaminasyon ve izole edilen bakterilerdeki direnç profili sürekli kontrol altında tutulmalıdır. Ayrıca çeşitli moleküler metodlarla kontamine gıda izolatları, kolonizasyon izolatları ve enfeksiyon izolatlarının klonal ilişkileri irdelenerek genotipik düzeyde ilişkileri kıyaslanmalıdır.

REFERANSLAR

- [1] GÜR D. (1994). Antibiyotiklere Direnç Gelişmesi. Klinik Uygulamalarda Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar. Güneş Kitabevi Limitet Şirketi. Ankara, s.19–37.
- [2] Kong K.F., Schnepher L., Mathee K. (2010). Beta-lactam Antibiotics: From Antibiosis to Resistance and Bacteriology. APMIS, 118(1), 1–36.
- [3] Web 1:Doyle M.E. (2006). Veterinary drug residues in processed meats - potential health risk. A review of the scientific literature. http://www.wisc.edu/fri/briefs/FRIBrief_VetDrgRes.pdf, consulted 18 February 2016.
- [4] Gustafson R.H., Bowen R.E. (1997). Antibiotic use in animal agriculture. Journal of Applied Microbiology, 83, 531-541.
- [5] Allen H.K., Stanton T.B. (2014). Altered Egos: Antibiotic Effects on Food Animal Microbiomes. Annual Reviews Microbiology, 68, 297–315.
- [6] Akçam F.Z., Gönen İ., Kaya O.,Yaylı G. (2004). Hastane enfeksiyonu etkeni çeşitli Gram-negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz yapımının iki yöntemle araştırılması. KLİMİK Dergisi, 17(1), 47-9.

- [7] Bradford PA. (2001). Extended spectrum beta-lactamases in the 21st century. Characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 933-51.
- [8] Bush K. (2001). New beta-lactamases in gram negative bacteria. Diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clinical Infectious Disease*, 32, 1085-9.
- [9] Steward C.D., Rasheed J.K., Hubetr S.K. (2001). Characterization of clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards extended spectrum beta-lactamase detection methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(8), 2864-72
- [10] Hijazi S. M., Fawzi M. A., Ali F. M., Abd El Galil K. H. (2016). Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases producing **Enterobacteriaceae** in healthy children and associated risk factors. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 15,3
- [11] Dallenne C., Da Costa A., Decré D., Favier C., Arlet G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 490-5.
- [12] Urumova V. (2015) Extended spectrum beta lactamase producing animal enterobacteriaceae isolates as potential risk to public health – review. *Revue Médecine Vétérinaire*, 166, 7-8, 192-207
- [13] Smet A., Martel A., Persoons D., Dewulf J., Heyndrickx M., Catry B. (2008). Diversity of extended-spectrum β -lactamases among cloacal *Escherichia coli* isolates on Belgian broiler farms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52,1238–43.
- [14] Machado E., Coque T.M., Cantón R., Sousa J.C., Peixe L. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 62, 296–302.
- [15] Web 2: Ünal Nilgün (2006): http://www.tmc-online.org/userfiles/file/AKG_Sunumlar/20nisan/nilgun_unal_hayvan_kaynakli_bakteri.pdf, consulted 18 February 2016.
- [16] Can H.Y., Çelik T.H. (2008). Kanatlı hayvan yetiştiriciliğinde antibiyotik kullanımı ve kalıntı riski. *Veteriner Hekim Derneği Dergisi*, 79(4), 35-40.
- [17] Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R. (1999). Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products: regulatory aspects. *Livestock Production Science*, 59, 183-198.
- [18] Casewell M., Friis C., Marco E., Mc Mullin P., Phillips I. (2003). The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52, 159-161.
- [19] Küçükersan K. (2002). Büyütme faktörleri. *Türk-Koop. Ekin*, 20, 31-34
- [20] Overdevest I, Willemsen I, Rijnsburger M., Eustace A., Xu L., Hawkey P.M., Heck M., Savelkoul P., Vandenbroucke-Grauls C., Zwaluw K.V.D., Huijsdens X., Kluytmans J. (2011). Extended-Spectrum β -Lactamase Genes of *Escherichia coli* in Chicken Meat and Humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, 17, No. 7.
- [21] Doi Y., Paterson D.L., Egea P., Pascual A., López-Cerero L., Navarro M.D. (2010). Extended-spectrum and CMY-type β -lactamase-producing *Escherichia coli* in clinical samples and retail meat from Pittsburgh, USA and Seville, Spain. *Clinical Microbiology and Infection*, 16:33–8.

- [22] Warren R.E., Ensor V.M., O'Neill P., Butler V., Taylor J., Nye K. (2008). Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61, 504–8.
- [23] Reich F., Atanassova V., Klein G. (2013). Extended-Spectrum β -Lactamase– and AmpC-Producing Enterobacteria in Healthy Broiler Chickens, Germany. *Emerging Infectious Disease*, 19(8), 1253–1259.
- [24] Kluytmans J.A., Overvest I.T., Willemsen I., Kluytmans-van den Bergh M.F., van der Zwaluw K., Heck M., Rijnsburger M., Vandenbroucke-Grauls C.M., Savelkoul P.H., Johnston B.D., Gordon D., Johnson J.R. (2013). Extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* from retail chicken meat and humans: comparison of strains, plasmids, resistance genes, and virulence factors. *Clinical Infectious Disease*, 56(4), 478-87.