



Tavuk Kloakasında Laktozu Fermente Edemeyen Gram Negatif Bakteri Türlerinin ve Çoklu Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Nisa SIPAHİ *^{ID}

Düzce Üniversitesi Geleneksel ve Tamamlayıcı Tıp Uygulama ve Araştırma Merkezi, 81620, Düzce, Türkiye

Gönderim Tarihi: 05.10.2022

Kabul Tarihi: 25.01.2023

ÖZ

Antibiyotik dirençliliği küresel bir sağlık problemidir. Özellikle tavuklar antibiyotik direncinin ve direnç genlerinin kaynağı konumundadır. Bu çalışmada kloakal svap ile alınan örneklerde laktozu fermente edemeyen Gram negatif bakteri türlerinin araştırılması ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bakterilerin tanımlanması MALDI-TOF-MS ile yapılmış ve sonrasında çoklu ilaç direnci disk difüzyon testleri ile belirlenmiştir. Ayrıca izolatlarda genişletilmiş spektrumlu beta laktamaz, AmpC ve karbapenemaz varlığı CLSI tarama ve doğrulama testleri ile araştırılmıştır. Toplamda elde edilen 27 izolatın 20'si *Escherichia coli*, 4'ü *E. fergusonii*, 1'er izolat *Pseudomonas fulva*, *Aeromonas media*, *Serratia marcescens* olarak tanımlanmıştır. Çalışmada 7 ayrı sınıftan 19 farklı antibiyotik diski kullanılmış ve buna göre izolatların %63'ünde 3 veya daha fazla sınıftan antibiyotiğe karşı direnç tespit edilmiştir. En yüksek direnç oranı tetrasiklinde (%74.07) görülürken imipeneme karşı tüm izolatların duyarlı olduğu saptanmıştır. Karbapenemaz hiçbir izolatta tespit edilememişken *P. fulva*'da beta laktamaz ve AmpC direnci gözlenmiş ve aynı izolat blaCTX-M, CIT, blaKPC genleri yönünden PCR ile araştırılmıştır. Sadece blaCTX-M geni yönünden pozitif bulunmuştur. Sonuç olarak beta laktamaz varlığının düşük olması sevindirici olsa da bakterilerde yüksek çoklu ilaç direncine rastlanmıştır. Bu durum yeni terapötik yaklaşımlar gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca "Tek Sağlık" yaklaşımı düşünüldüğünde antibiyotik direncinin hayvan-insan çevre etkileşimi doğrultusunda sürekli izlenmesi ve değerlendirilmesi gerektiği ön görülmüştür. Çünkü direnç gelişimi bakteriler arasında sürekli değişim halindedir.

Anahtar Kelimeler: Antibiyotik, Beta laktamaz, Çoklu ilaç direnci, *E. coli*, *P. fulva*.

ABSTRACT

Investigation of Non-Lactose-Fermenting Gram Negative Bacteria from Cloaca of Chicken and Determination of Multiple Antibiotic Resistance

Antibiotic resistance is a global health problem. In particular, chickens are the source of antibiotic resistance and resistance genes. In this study, it was aimed to investigate the Gram-negative bacterial species that cannot ferment lactose from cloacal swap samples and to determine the antibiotic resistance profiles. Identification of the bacteria was performed with MALDI-TOF-MS and multidrug resistance was determined by disk diffusion test. In addition, the presence of ESBL, AmpC and carbapenemase in isolates was investigated by CLSI directions. Totally, 27 isolates were collected and 20 of them were *Escherichia coli*, 4 of them were *E. fergusonii* and 1 isolate of *Pseudomonas fulva*, *Aeromonas media*, *Serratia marcescens*. 19 different antibiotic discs from 7 different classes were used in the study and 63% of bacteria had resistance to antibiotics from 3 or more classes. While the highest resistance rate was observed in tetracycline (74.07%), all isolates were found that sensitive to imipenem. While carbapenemase could not be detected in any isolate, it was observed that *P. fulva* had ESBL and AmpC. Also, PCR was conducted for blaCTX-M, CIT, blaKPC genes in *P. fulva*. It was found that the bacterium had only blaCTX-M gene. As a result, although it is pleasing to find low presence of beta lactamase, high multidrug resistance has been determined in bacteria. This situation suggests newer therapeutic approaches. In addition, considering the "One Health" concept, antibiotic resistance should be constantly monitored with the interaction of the animal-human-environment. Because the development of resistance is in a constant state of change between bacteria.

Keywords: Antibiotic, Beta lactamase, *E. coli*, Multi drug resistance, *P. fulva*.



GİRİŞ

Hayvancılık sektörünün en gelişmiş ve teknolojiye en açık alanı olan kümes hayvancılığı, ülke ekonomilerinde oldukça önemli bir yere sahiptir. Kümes hayvancılığı teknolojik üretim tesisleri yanı sıra köy şartlarında yapılan geleneksel tip ile de insan gelirine katkı sağlamaktadır. Aynı zamanda hayvansal protein açığının kapatılmasında dünya genelinde en fazla önem taşıyan alanlardan biridir. Dolayısıyla kümes hayvancılığında verim artışı oldukça önemli bir durumdur (Bayraktar ve ark. 2019; TEPGE 2022).

Kümes hayvancılığında enfeksiyöz hastalıklar, verimi %20 oranında düşüren bir faktördür. Bunu önlemek için sıklıkla antibiyotik takviyesi yapılmaktadır. Hatta Dünya genelinde üretilen antibiyotiklerin %70'inden fazlası gıda-hayvan-yem üretiminde kullanılmaktadır. Avrupa Birliği antibiyotik kullanımını yasaklasa da sağlıklı büyümeyi teşvik etmek için antibiyotiklerin profilaktik olarak kullanımının düzenlenmesi ve izlenmesi tüm dünyada seyrekler. Dolayısıyla kümes hayvancılığında antibiyotik kullanımı oldukça yaygındır. Bu durum bazı yararlar sağlamaktadır; ancak aynı zamanda dirençli suşların baskın hale gelmesine neden olmuştur (Hedman ve ark. 2020; Tian ve ark. 2021). Bakteriyel enfeksiyonları önlemek için kullanılan antibiyotikler hem insan sağlığında hem de veteriner tıbbında önemli bir sorundur. Antibiyotik direnci, Amerika Birleşik Devletleri Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC), Avrupa Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (ECDC) ile Dünya Sağlık Örgütü (WHO), tarafından küresel ve oldukça önemli bir sağlık sorunu olarak nitelendirilmektedir. Özellikle çoklu antibiyotik direnci gelecek için büyük endişeler yaratmaktadır (Prestinaci ve ark. 2015). Antibiyotik direnci ile ilişkili olarak en sık rapor edilen bakteri *Escherichia coli*'dir. Hayvanlarda ve insanlarda mikrobiyotanın yaygın bir üyesi olan *E. coli*, fırsatçı patojenler grubunda yer almakta ve genellikle lac+ (laktöz pozitif, laktözu fermente edebilen) özellik göstermektedir. Ancak lac- (laktöz negatif, laktözu fermente edemeyen) atipik varyantları da bulunmaktadır (Gajdacs ve ark. 2020). Laktöz permeaz enzimi (LacY proteini) *E. coli*'de laktözün kullanımını sağlayan önemli bir proteindir ve bu şekilde bakteriler laktöz hücre içerisine alarak kullanabilmektedir (Kırtıl ve ark. 2020; Sun 2022). *E. coli*'nin lac- varyantları, *Shigella spp.* türlerinin sebep olduğu şigeloz benzeri önemli diyarelerin nedeni olmakta ve teşhiste zorluklar yaratmaktadır (Gajdacs ve ark. 2020). Özellikle Enteroinvazif *E. coli* (EIEC) patotipleri laktöz negatif özellik göstermektedir. Laktözün fermantasyonu *E. coli*'nin biyokimyasal analizinde oldukça beklenen bir durum olması sebebiyle lac- suşlar identifikasyonda güçlükler neden olmaktadır. Lac- özellik gösteren *E. fergusonii* de şigeloz benzeri diyareye neden olan suşlardan biridir ve yüksek derecede *E. coli* ile genotipik ve fenotipik benzerlik göstermektedir. Bu da iki türün ayrımını zorlaştırmaktadır (Maheux ve ark. 2018). *Acinetobacter baoumanii* ve *Pseudomonas aeruginosa* ise ciddi enfeksiyonlara neden olan yüksek mortaliteye sahip laktöz fermente edemeyen diğer önemli gram negatif bakterilerdir. Özellikle de karbapenem dirençli *A. baoumanii* ve *P. aeruginosa* 2017 yılında WHO tarafından "kritik patojenler" CDC tarafından da "ciddi tehdit" olarak tanımlanmıştır (Jung ve ark. 2021). Bunun dışında antibiyotik direnci bakımından sıklıkla rapor edilen ve kümes hayvancılığında oldukça önemli olan *Salmonella* serovarları, kanatlı hayvan sağlığını ve insan sağlığını ciddi derecede tehdit eden bir başka mikroorganizma grubudur. (Simmons ve ark. 2016). *Salmonella* suşlarını *E. coli*'den

ayırmanın önemli özellik lac- olmasıdır ve maalesef kümes hayvancılığında *Salmonella*'nın düzenli taraması bulunmamaktadır. *Salmonella* suşları önemli zoonotik enfeksiyöz ajanların başını çekmektedir ve kanatlı hayvanlar da en önemli bulaş kaynağını oluşturmaktadır. Ülkemizde 2018 yılında Ulusal *Salmonella* Kontrol Programı uygulanmaya başlanmış olsa da köy tavukçuluğu ile ilgili araştırmalar ihmal edilmektedir (Güngördü ve Çelen 2018). Herhangi bir üretici tesise bağlı olmaksızın serbest gezen köy tavuklarında genellikle antibiyotik tedavisi pek uygulanmasa da bakterilerin direnç genlerini mobil elementlerle aktarabilmesi ve yemlere antibiyotik ilavesi sebebiyle çoklu antibiyotik direnci kozmopolit dağılım göstermektedir (Simmons ve ark. 2016; Babacan ve Karadeniz 2019; Singh ve ark. 2019). Köylerde geleneksel yöntemlerle yapılan kümes hayvancılığı kayıtlı/kayıtsız seyreden ve antibiyotik direnci bakımından saha taraması isteyen bir alandır. Bu sebeple bu çalışma, köy tavuklarında laktöz negatif özellik gösteren suşların identifikasyonunu ve antibiyotik direnç profillerinin araştırılmasını amaçlamaktadır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun 2022/12 no'lu kararına göre etik kurul iznine gerek duyulmamıştır.

Örnek Toplanması

Çalışmada denek olarak köy tavukları (Arnavutköy-İstanbul/Türkiye bölgesindeki köylerden) seçilmiştir. Herhangi özel bir takviye almayan serbest gezen ve sağlıklı görünen tavukların kloakasından swap ile alınan numuneler transport besiyeri içerisinde laboratuvara getirilmiştir. 7 farklı yumurtacı kümeden toplamda 96 tavuktan dışkı örneği alınmıştır.

Bakteri İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Örnekler direk olarak Mac Conkey Agar'a (MAC, CondaLab) inoküle edilmiştir. 24 saat 37 °C'de inkübe edilen kültürlerden beyaz koloniler laktöz negatif olarak seçilmiş ve laktöz içeren sıvı besiyeri ile fermantasyon yetenekleri doğrulanmıştır. Bakterilerin kültüre edilmesinde Tryptic Soy Agar (TSA, Merck) ve Tryptic Soy Broth (TSB, Merck) besiyerleri kullanılmıştır. İzolatların gram boyama, katalaz, oksidaz, OF, sitrat, üreaz aktivitesi, jelatinaz aktivitesi, triple şeker iron test, H₂S oluşumu ve benzeri biyokimyasal testler ile fermantasyon test bulguları sonrası identifikasyon, matriks aracılı lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş süresi kütle spektrometrisi (MALDI TOF MS) yöntemi ile yapılmıştır. Mikrobiyal biyokütle analizi için MALDI-TOF MS cihazı (Bruker Daltonik MALDI Biotyper, Microflex LT, Almanya) ve Flex Control 3.0 yazılımı kullanılmıştır.

Antibiyotik Direnç Profillerinin Belirlenmesi

Tüm izolatların antibiyotik direnç profilleri Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) tarafından önerilen disk difüzyon testi ile belirlenmiştir (CLSI 2019; CLSI 2020). Çalışmada 7 ayrı sınıftan 19 farklı antibiyotik diski (Bioanalyse, Türkiye) kullanılmıştır. Bunlar, streptomisin (10µg), tetrasiklin (30 µg), kanamisin (30 µg), neomisin (30 µg), nitrofurantoin (300 µg), eritromisin (15 µg), imipenem (10 µg), gentamisin (10 µg), amoksisilin-klavulanik asit (30 µg), ampisilin sulbaktam (20 µg), kloramfenikol (30 µg), siprofloksasin (5 µg), ofloksasin (10 µg), nalidiksik asit (30 µg), seftazidim (30 µg), seftoksım (30 µg), aztreonam (30 µg), seftriakson (30 µg), sefpodoksım (10 µg). Test sonuçları duyarlı (S), orta

duyarlı (I) ve dirençli (R) olarak değerlendirilmiştir. Testin yapılışında kontrol olarak *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır.

Çoklu Antibiyotik Direncinin Belirlenmesi

Beta-laktam, fenikol, aminoglikozid, kinolon, tetrasiklin, nitrofuran ve makrolid gruplarından 3 ya da daha fazlasına karşı direnç saptanan suşlar, çoklu dirençli olarak kabul edilmiştir (de Jong ve ark. 2018).

Beta Laktamaz ve Karbapenemaz Varlığının Fenotipik Araştırılması

Tüm izolatlar 1 mg/L sefotaksim içeren veya 1 mg/L seftazidim içeren Mac Conkey Agar besiyerine pasajlanmış ve üreme gösterip göstermedikleri kaydedilmiştir. (Wilson ve McCabe 2007). Daha sonra geniş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) ve AmpC beta laktamazların varlığını fenotipik olarak belirlemek için CLSI tarafından önerilen tarama ve doğrulama testleri yapılmıştır. Karbapenemaz için modifiye Hodge testi uygulanmıştır (CLSI 2018). Modifiye Hodge testi için meropenem (10 µg), GSBL tarama testlerinde daha önce belirtilen 3. kuşak sefalosporinler ve monobaktam kullanılmıştır. Doğrulama testi için çift disk yönteminden yararlanılmış ve sefotaksim-klavulanik asit (40 µg), seftazidim-klavulanik asit (40 µg), AmpC beta laktamaz taraması için sefoksitin

(30 µg), sefepim (30 µg), diskleri (Bioanalyse, Türkiye) kullanılmıştır.

Beta Laktamaz ve Karbapenemaz Varlığının Genotipik Araştırılması

Şüpheli izolatlarda DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemiyle yapılmıştır. TSA'daki kültürlerden steril eküvyon ile alınan koloniler 1,5 ml'lik tüplerde 500 µl distile su içerisine konularak 10 dk kaynatılmış ve akabinde 12000 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra süpernatant PCR için kullanılmıştır. Beta laktamaz için blaCTX-M, CIT tip AmpC ve karbapenemaz için blaKPC genleri PCR yöntemiyle araştırılmıştır. PCR reaksiyonlarında kullanılan primerler Tablo 1'de verilmiştir. Her PCR reaksiyonu toplam hacim 25µl olacak şekilde 35 döngü olarak çalışılmıştır. Her üç gen için, PCR mix (K0171 Thermo Scientific) 10 pmol reverse ve forward primerler ve RNase DNase ari steril distile su kullanılmıştır. Her üç reaksiyonda 95 °C'de 5dk ön denatürasyon, 95 °C 30 sn denatürasyon 58 °C'de blaCTX-M, 53 °C'de CIT, 47 °C'de blaKPC için 30 sn primer bağlanma ısısı, 72 °C'de 45 sn sentez ve en son 72 °C'de 7dk son sentez olacak şekilde çalışılmıştır. *E. coli* NCTC 13461, *E. coli* ATCC 35218, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *K. pneumoniae* BAA-1705 suşları kontrol olarak kullanılmıştır

Tablo 1. PCR için kullanılan primerler.

Table 1. Primers used for PCR.

Hedef Gen	Gen Dizilimi (5'-3')	Amplikon Büyüklüğü	Kaynak
<i>bla</i> _{CTX-M}	F-SCSATGTGCAGYACCAGTAA R-CCGCRATATGRTTGGTGGTG	550 bp	Saladin ve ark. 2002
CIT	F-TGGCCAGAAGTACAGGCAAA R-TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462 bp	Pérez-Pérez ve Hanson, 2002
<i>bla</i> _{KPC}	F-GCTCCGATAATGAAAGCGT R-ACGACGGCATAGTCATTTC	583bp	Voets ve ark. 2011

BULGULAR

MALDI TOF MS Sonuçları

Çalışmada toplanan örneklerin %30'unda laktozu kullanamayan bakteriler tespit edilmiştir. Toplanan 96 svap örneğinden her bir izolat farklı svap örneğine ait olmak üzere toplamda 29 adet laktoz negatif özellik gösteren bakteri tespit edilmiştir. İki izolat kültür aşamasında üretilemediğinden kaybedilmiştir. Bu sebeple izolatların 27 tanesi tanıya edilmiş ve tanımlanan

Tablo 2: MALDI TOF MS Çalışma Sonuçları.

Table 2: MALDI TOF MS Assay Results.

İzolat Adı	Belirlenen Bakteri	Skor Değeri	İzolat Adı	Belirlenen Bakteri	Skor Değeri
TB1	<i>Escherichia coli</i>	2.374	TB17	<i>Escherichia coli</i>	2.237
TB2	<i>Escherichia coli</i>	2.038	TB18	<i>Escherichia coli</i>	2.275
TB3	<i>Escherichia coli</i>	2.422	TB19	<i>Escherichia coli</i>	2.257
TB5	<i>Escherichia coli</i>	1.875	TB20	<i>Escherichia coli</i>	2.401
TB6	<i>Escherichia coli</i>	2.472	TB21	<i>Escherichia coli</i>	2.552
TB7	<i>Escherichia coli</i>	2.438	TB22	<i>Pseudomonas fulva</i>	1.956
TB8	<i>Escherichia coli</i>	2.186	TB23	<i>Escherichia coli</i>	2.522
TB9	<i>Escherichia coli</i>	2.271	TB24	<i>Escherichia coli</i>	2.164
TB11	<i>Escherichia coli</i>	2.172	TB25	<i>Aeromonas media</i>	1.700
TB12	<i>Escherichia fergusonii</i>	2.163	TB26	<i>Escherichia coli</i>	2.435
TB13	<i>Escherichia fergusonii</i>	2.078	TB27	<i>Escherichia fergusonii</i>	2.228
TB14	<i>Escherichia fergusonii</i>	2.136	TB28	<i>Escherichia coli</i>	1.966
TB15	<i>Escherichia coli</i>	2.322	TB29	<i>Serratia marcescens</i>	2.136
TB16	<i>Escherichia coli</i>	1.728			

izolatlar Tablo 2'de verilmiştir. Analiz bulgularında zayıf spektruma rastlanmamış ve izolatların hepsi (%100) tür bazında tanımlanabilmiştir. Buna göre izolatların 20 tanesi *E. coli*, 4 tanesi *E. fergusonii*, 1 tanesi *Pseudomonas fulva*, 1 tanesi *Aeromonas media*, 1 tanesi *Serratia marcescens* olarak tanımlanmıştır. Svap örneklerinde *Salmonella* spp. türlerine rastlanmamıştır.

İzolatların Çoklu Antibiyotik Direnç Profilleri

İzolatlarda en fazla tetrasiklin direncine rastlanmıştır. Toplam 27 izolattın 20'sinde tetrasiklin (%74.07), 16'sında eritromisin (%59.25), 14 tanesinde neomisin (%51.85), kanamisin (%51.85) ve nalidiksik asit (%51.85) direncine rastlanmıştır. İzolatların 3 tanesinde ampisilin-sulbaktam (*P. fulva*, *E. coli* ve *S. marcescens*), 2 tanesinde (*P. fulva*, *S. marcescens*) amoksisilin klavulanik asit direncine rastlanmıştır. Çalışmada *E. fergusonii* olarak tespit edilen 4 izolattın 3'ünde en az 1 antibiyotiğe karşı direnç görülmüştür. *E. fergusonii* izolatlarından diğer 1'inde ise sadece tetrasiklin ve nitrofurantoin karşı orta derecede duyarlılık görülmüşken diğer tüm antibiyotiklere karşı tam duyarlı olduğu tespit edilmiştir. Çalışmada tespit edilen *A. media* izolattı tüm antibiyotik gruplarına karşı duyarlı tespit edilmişken *S. marcescens* izolattı 3 farklı sınıftan 4 antibiyotiğe karşı (TE, AMC, SAM ve E) direnç göstermiştir. Türlerine göre izolatların antibiyotik direnç durumları Tablo 3'te verilmiştir. İmipenem ve seftazidim antibiyotiklerine karşı tüm izolatlar duyarlı olarak tespit edilmişken izolatların yaklaşık %63'ünde (17/27) en az 3 veya daha fazla sınıftan antibiyotiğe karşı direnç tespit edilmiştir. Bu izolatların 12'si *E. coli*, 3'ü *E. fergusonii*, 1'i *P. fulva* ve 1'i *S. marcescens* türüne aittir. Genel olarak izolatların içinde bir izolat 10 farklı antibiyotiğe, 2 izolat 9 farklı antibiyotiğe, 5 izolat ise 8 farklı antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuştur. 4 izolat test edilen tüm antibiyotiklere karşı duyarlı, geriye kalan 23 izolat ise en az 1 antibiyotiğe karşı dirençli bulunmuştur. Dirençli izolatlarla ilişkin sayısal veriler Şekil 1 ve 2'de gösterilmiştir. Bununla birlikte sadece *P. fulva* olarak tanımlanan izolatta beta laktam antibiyotiklere karşı dirence rastlanmış ve beta laktamaz taraması için ilgili testlere tabi tutulmuştur. Bunun dışında *P. fulva* amino penisilinlere, nitrofurantoin ve eritromisine karşı direnç göstermiş diğer tüm antibiyotiklere duyarlı olarak belirlenmiştir.

Tablo 3. Türe göre Antibiyotik dirençliliği.

Table 3. Antibiotic resistance for each species.

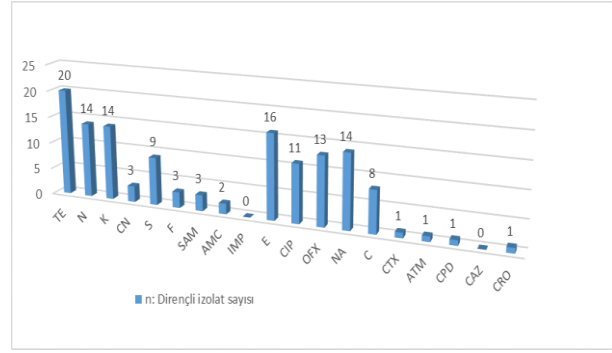
Bakteriler/ Toplam izolat sayısı:n	Antibiyotikler (Dirençli İzolat Sayısı)													
	TE	N	K	CN	S	F	SAM	AMC	IMP	E	CIP	OFX	NA	C
<i>E. fergusonii</i> n=4	3	2	2	2	3	1	0	0	0	2	3	3	3	2
<i>E. coli</i> n=20	16	12	12	1	6	1	1	0	0	12	8	10	11	6
<i>A. media</i> n=1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>P. fulva</i> n=1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0
<i>S. marcescens</i> n=1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0

Beta laktam grubu antibiyotiklere sadece *P. fulva* direnç göstermiştir. Bu sebeple tabloda yer verilmemiştir. TE: Tetrasiklin, N: Neomisin, K: Kanamisin, CN: Gentamisin, S: Streptomisin, F: Nitrofurantoin, SAM: Ampisilin-sulbaktam, AMC: Amoksisilin-klavulanik asit, IMP: İmipenem, E: Eritromisin, CIP: Siprofloksasin, OFX: Ofloksasin, NA: Nalidiksik asit, C: Kloramfenikol

Only *P. fulva* has shown resistance against beta-lactam group antibiotics. For this reason, it is not included in the table. TE: Tetracycline, N: Neomycin, K: Kanamycin, CN: Gentamicin, S: Streptomycin, F: Nitrofurantoin SAM: ampicillin-sulbactam, AMC: amoxicillin-clavulanic acid, IMP: Imipenem, E: Erythromycin, CIP: Ciprofloxacin OFX: Ofloxacin, NA: Nalidixic acid, C: Chloramphenicol.

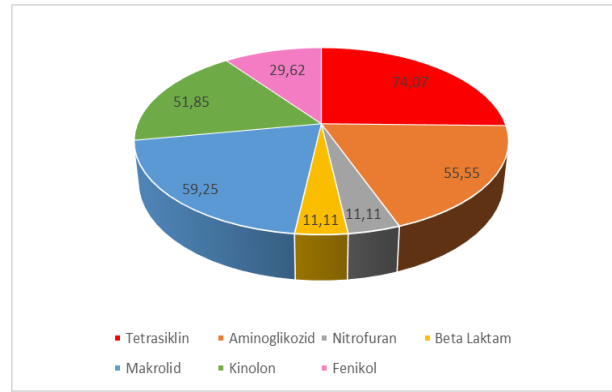
İzolatlarda Beta Laktamazların Varlığı ve PCR Sonuçları

Çalışmada elde edilen tüm izolatlar sefotaksim ve seftazidim içeren MAC besiyerine ekilmiş ve sadece *P. fulva* üreme göstermiştir. Daha sonra tüm izolatlar çift disk tarama testine ve modifiye Hodge testine tabi tutulmuştur. Tüm izolatlar her bir teste duyarlılık gösterirken *P. fulva*'da GSBL ve AmpC direncine rastlanmıştır. *P. fulva* için beta laktamazlara yönelik fenotipik tarama testi bulguları Tablo 4'te verilmiştir. Buna göre sefotaksim ve seftazidim zon çaplarının klavulanik asit ile olan zon çaplarında 5 mm'den daha fazla ilerleme göstermesi pozitif olarak değerlendirilmiştir. Modifiye Hodge testinde ise 27 izolattın



Şekil 1. Her bir antibiyotiğe karşı direnç gösteren izolat sayısı.

Figure 1. The number of isolates showing resistance to each antibiotic.



Şekil 2. Antibiyotik sınıflarına göre tüm izolatların direnç oranları.

Figure 2. Resistance rates of all isolates according to antibiotic classes.

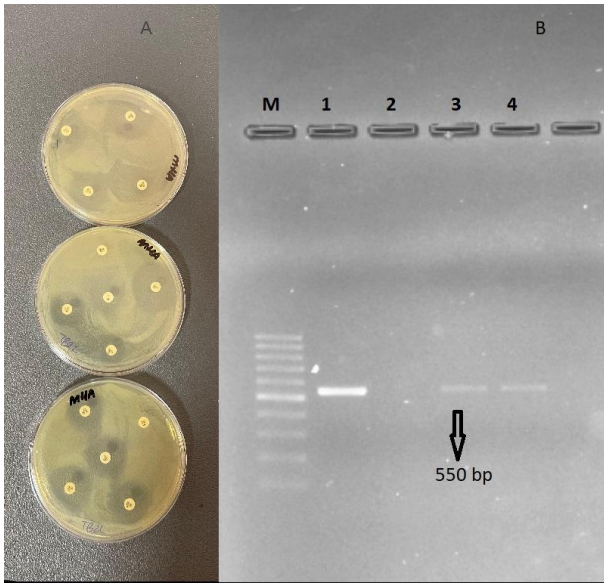
hiçbirinde *E. coli* ATCC 25922 suşu ile sinerji gözlenmemiş ve test negatif olarak değerlendirilmiştir. Sonuç olarak tüm izolatlarda fenotip bulguları negatif olarak, *P. fulva* için beta laktamaz ve AmpC pozitif olarak tespit edilmiştir (Şekil 3A). Bu sebeple blaCTX-M ve CIT-tip AmpC genleri ihtivasi açısından araştırılmıştır. *P. fulva* için modifiye Hodge testi negatif olmasına rağmen PCR yöntemiyle blaKPC geni de araştırılmıştır. PCR sonuçlarına göre *P. fulva*'da sadece blaCTX-M genine rastlanmış CIT ve blaKPC için PCR sonuçları negatif olarak tespit edilmiştir (Şekil 3B).

Tablo 4: *P. fulva* için beta laktamaz ve karbapenemaz fenotip test sonuçları.**Table 4.** Beta lactamase and carbapenemase phenotype test results for *P. fulva*.

Beta Laktamaz Tarama					Beta Laktamaz Doğrulama		AmpC		Modifiye Hodge Testi
Zon çapı (mm)					Zon çapı (mm)				
CTX	ATM	CPD	CAZ	CRO	CZC	CTC	FOX	FEP	MEM
21	20	R	30	21	32	25	R	30	Negatif

R: Dirençli (Resistant, zon çapı yok), CTX: Sefotaksim, ATM: Aztreonam, CPD: Sefpodosim, CAZ: Sefotaksim, CRO: Seftriakson, CZC: Seftazidim-klavulanik asit, CTC: Sefotaksim-klavulanik asit, FOX: Sefoksitin, FEP: Sefepim, MEM: Meropenem. Eşik değerler CSLI 2018'e göre belirlenmiştir; CTX: R ≤27, ATM: R ≤27, CPD: R ≤27, CAZ: R ≤22, CRO: R ≤25, FOX: R ≤14, FEP: R ≤18 olarak kabul edilmiştir.

R:Resistant (No zone diameter), CTX: Cefotaxime, ATM: Aztreonam, CPD: Cefpodoxime, CAZ: Ceftazidime, CRO: Ceftriaxone, CZC: Ceftazidime-clavulanic acid, CTC: Cefotaxime-clavulanic acid, FOX: Cefoxitin, FEP: Cefepime, MEM: Meropenem. The threshold values were determined according to CSLI 2018; CTX: R ≤27, ATM: R ≤27, CPD: R ≤27, CAZ: R ≤22, CRO: R ≤25, FOX: R ≤14, FEP: R ≤18 were accepted.



Şekil 3. *P. fulva* için Beta Laktamaz Taraması: A: Fenotip Direnç Taraması: Beta laktamaz ve AmpC için çift disk taraması. B: Genotip Direnç Taraması: blaCTX-M bulguları, M: Marker 100bpDNA ladder, 1: Pozitif kontrol, 2: Negatif kontrol, 3 ve 4. *P. fulva* DNA.

Figure 3. Research of Beta Lactamase for *P. fulva*: A: Phenotype Resistance Screening: Double disk assay for beta lactamase and AmpC. B: Genotype Resistance Screening: The results of blaCTX-M, M: Marker 100bpDNA ladder, 1: Positive control, 2: Negative control, 3 and 4. *P. fulva* DNA.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Antibiyotik direnç araştırmalarında çoğunlukla enterik bakteriler tercih edilmektedir. Bunun nedeni çevrede ve canlı organizmalarda sıklıkla rastlanan geniş dağılım gösteren bakteriler olmasıdır (Wallace ve ark. 2020). En önemli yaygın patojen *E. coli*'dir; ancak tavuklarda *Salmonella* serovarlarının ihtivası *E. coli*'nin neden olduğu enfeksiyonlara göre daha fazla önem arz etmektedir. *Salmonella* türleri laktozu fermente edemez ve önemli kanatlı hastalıklarında da başı çekmektedir (Babacan ve Karadeniz 2019; Sipahi ve ark. 2019). Dışkı kökenli laktoz negatif diğer mikroorganizmalar arasında *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* de nispeten daha az görülen bakteriler olmasına karşın; tespit edilen bakterilerde antibiyotik direnci insidansı giderek artmaktadır. (Jung ve ark. 2021). Öte yandan bu çalışmada *Salmonella* spp., *P. aeruginosa* ve *A. baumannii* bakterilerine rastlanmamıştır. Özellikle

ihbarı mecburi bazı *Salmonella* türlerinin olmaması, toplum sağlığı açısından oldukça olumlu bir sonuç olarak yorumlanmıştır. Bu çalışmada laktozu fermente edemeyen bakterilerin %70'inden fazlası *E. coli* olarak tanımlanmıştır. *E. coli*'nin lac+ özelliği, temel karakteristik özelliği olmasına karşın son yıllarda bu bir değişim içindedir. Laktoz permeaz enzim eksikliği *E. coli*'de artık çok sık görülen bir durum olmaktadır (Gajdacs ve ark. 2020; Pinto ve ark. 2021). Gajdacs ve ark. (2020) 4 yıl boyunca üriner sistem enfeksiyonlarından izole ettikleri *E. coli*' lerde lac- özellik gösteren suşların lac+ özelliğe sahip suşlardan sayıca daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Asembe ve ark. (2018) klinik olarak tavuklardan izole ettikleri bakterilerin %55'ini *E. coli* ve %44'ünü "non lactose fermenter" laktozu fermente edemeyen bakteriler olarak tanımlamıştır. Başka bir çalışmada ise tavuk etinden izole edilen bakterilerde %86 oranında lac+ bakteri izole edilmiş ve bu bakteriler *E. coli*, *Klebsiella* spp, *Citrobacter* spp. olarak tanımlanmıştır. Geriye kalan %14'lük kısım lac- bakteriler *Salmonella* spp. ve *Shigella* spp. olarak rapor edilmiştir (Qader ve ark. 2019). Bu çalışmada 96 örnekten 27 lac- özellikli bakteri izole edilmiş ve 20'si *E. coli*, 4'ü *E. fergusonii* ve 1'er izolat ise *P. fulva*, *A. media* ve *S. marcescens* olarak tanımlanmıştır. Bu araştırmada bakteri tanımlaması MALDI TOF MS ile yüksek spektrumla gerçekleştirilmiştir. Geleneksel yöntemlerle bakteri tanımlanması nispeten pahalı ve zaman alan işlemler içermesi nedeniyle, son yıllarda MALDI TOF MS ile bakteri tanımlaması oldukça yaygınlaşmaktadır. MALDI TOF MS 10 yılı aşkın bir süredir mikrobiyoloji rutininde kullanılmaktadır ve özellikle son 5 yıldır doğruluk ile maliyet açısından neredeyse biyokimyasal testlerin yerini almıştır. Ayrıca klinik araştırmalarda yüksek verim, hassasiyet ve spesifik uygulamalara da olanak tanımaktadır (Burckhardt ve Zimmermann 2018; Clark ve ark. 2018; Topić Popović ve ark. 2021).

Tavuklardan izole edilen bakterilerin tanımlanması ve antibiyotik direnç profillerinin belirlenmesi oldukça önemli bir araştırma alanıdır. Çünkü tavuk işletmeciliği ya da köy tavukçuluğu insan gelirinin ve beslenmesinin iyileştirilmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Ancak buna rağmen köy tavukçuluğu ile ilgili araştırmalar ihmal edilmektedir (Güngördü ve Çelen, 2018). Sürdürülebilir bir yaşam ve optimal sağlığa ulaşmak için yerel, bölgesel, ulusal ve küresel düzeylerde faaliyet gösteren hayvanların, bitkilerin ve onların ortak ekosisteminin düzenli olarak araştırılması gerekmektedir. Bu sebeple bu çalışmada köy tipi tavuklarda antibiyotik direnci araştırılmıştır. Çünkü gıda-tarım ve hayvancılık sektöründe verim artışı ve enfeksiyöz hastalıkların önlenmesi için sıklıkla antibiyotik kullanımı söz konusudur (Rüegg ve ark. 2018; Delesalle ve

ark. 2022). Antibiyotikler bir yandan fayda sağlarken bir yandan da gıda güvenliği ve insan sağlığı açısından büyük risk oluşturmaktadır. Bazı uzmanlar tarafından 2050 yılında kadar antibiyotik direnciyle ilişkili her yıl 10 milyon ölümün olacağı tahmin edilmektedir (Tian ve ark. 2021). Bu çalışmada laktozu fermente edemeyen mikroorganizmalar tanımlanarak direnç karakterleri belirlenmiştir. Buna göre izolatların 23'ünde (%85.18) test edilen 19 farklı antibiyotikten en az 1 antibiyotiğe karşı direnç görülmüştür. Ayrıca 17 izolatta (%63) çoklu ilaç direncine rastlanmıştır. Bu oranın oldukça yüksek olduğu düşünülmektedir. Çünkü örnekler ticari çiftliklerden toplanmamış, test materyal kaynağı olarak geleneksel tip köy tavukları seçilmiştir. Bu tavuklar herhangi özel bir vitamin, antibiyotik ve benzeri bir takviye almamaktadır. Dolayısıyla ticari tavuk çiftliklerinden alınan örneklerde bu oran daha da yüksek olabilmektedir. Önceki bir çalışmada tavuk dışkılarından (ticari tavuk çiftliklerinden toplanmış) izole edilen *E. coli*'lerde %100 oranında çoklu ilaç direncine rastlanmıştır (Al-Azad ve ark. 2019). Diğer bir çalışmada *Salmonella* serovarları için bu çoklu ilaç direnci oranı %89.51 olarak bildirilmiştir (Şahan ve ark. 2016). Genel olarak antimikrobiyal ajana maruz kalan bakterilerde bir süre sonra farklı mekanizmalarla gerçekleşen bir direnç gözlenmektedir. Bu dirençler ekzojen genlerle veya kromozomal mutasyonlarla edinilmektedir. Ancak bakteriler bu genleri horizontal ve vertikal olarak türler arası yayabilmektedir (Read ve Woods, 2014; Andersson ve ark., 2020). Dolayısıyla direnç gelişimi için antibiyotiğe maruz kalmak zaruri bir durum değildir. Bu sebeple bu çalışmada köy tavuklarından elde edilen izolatlarda görülen yüksek antibiyotik direnci "olası" bir durum olarak değerlendirilmiştir. Zaten tavuk çiftlikleri ve tavukların yaşam alanları çoğunlukla antimikrobiyal dirençli bakteriler ve direnç genleri yönünden bir rezervuar olarak nitelendirilmektedir (Wang ve ark., 2021). Musa ve ark. (2020) çalışmasında GSBL üreten *Salmonella* spp varlığını rapor etmiş ve ticari tavuk eti ürünleri ile antibiyotik kullanılmayan geleneksel tip tavuklardan elde edilen ürünler arasında GSBL genleri yönünden bir fark olmadığını vurgulamıştır. Yapılan diğer bir çalışmada Simmons ve ark (2016) farklı çiftliklerdeki broylerden 245 *E. fergusonii* izolatu elde etmiş ve izolatların hepsinin meropenem ve siprofloksasin duyarlı olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada *E. fergusonii* izolatlarının sırayla en yüksek direnç oranlarını ampisilin (75.1%), streptomisin (62.9%) ve tetrasiklin (57.1%) şeklinde bulmuşlardır. Gerçekleştirilen bu çalışmada sadece 4 farklı *E. fergusonii* izolatu elde edilmiş ve 3 tanesi 11 farklı antibiyotiğe karşı bir ya da birden fazla direnç göstermiştir. Bu çalışmadaki *E. fergusonii* izolatlarının tetrasiklin, streptomisin, siprofloksasin, ofloksasin ve nalidiksik asit direnci tür içinde %75 olarak tespit edilmiştir. Simmons ve ark (2016)'nın çalışmasına benzer şekilde, bu çalışmadaki *E. fergusonii* ve diğer tüm izolatların hiçbirinde meropenem ve imipenem direncine rastlanmamıştır. Bunun nedeni karbapenemlere direncin diğer antibiyotiklere göre daha az rastlanır olması olabilir. Çünkü karbapenemaz varlığı diğerlerine göre daha az rapor edilmekte; ancak yapılan insan klinik çalışmaları, geçen zamanda bir önceki yıllara göre artış olduğunu vurgulamaktadır (Tümtürk ve ark. 2019; Karamanlıoğlu ve ark. 2019; Telli 2022). Aynı durumu vurgulayan hayvansal kaynaklı çalışmalarda bulunmaktadır (Bonardi ve Pitino 2019; Ilyas ve ark. 2021). Bu durum gelecek için endişe yaratmakta ve karbapenem direncinin sıklıkla monitorize edilmesi gerektiğini düşündürmektedir. Ayrıca bu çalışmada fenotip ve genotip olarak karbapenem

direncinin görülmemesi olumlu bir sonuç olarak değerlendirilmiştir.

Gerçekleştirilen bu çalışmada beta laktamaz taraması tüm izolatlar için yapılmış ancak fenotip testi pozitif olarak değerlendirilen tek izolat *P. fulva* olmuştur. Bu sebeple *P. fulva* için PCR protokolleri uygulanmış ve *bla*_{CTX-M} geni ihtiva ettiği görülmüştür. Zaten GSBL'lerin çoğu Ambler sınıf A'ya aittir ve ana enzimden CTX-M, SHV, TEM ve türevleri (SHV-1,SHV-2, TEM-1, CTX-M-1, CTX-M-15 gibi) genler sorumludur. Özellikle CTX-M ve CTX-Ms (CTX-M türevleri) *Enterobacteriaceae* ailesinde oldukça yaygın olarak bulunmaktadır (Peirano ve Pitout 2019). Yapılan epidemiyolojik çalışmalar coğrafi farklılıklara rağmen dünyada özellikle hayvansal gıda kaynaklı izolatlarda CTX-M varyantlarının yaygın olduğunu göstermektedir (Cormier ve ark. 2019; Uyanık 2022). Ayrıca beta laktam antibiyotiklerin yaygın kullanımı nedeni ile bakterilerde bu direncin belirlenmesi oldukça ilgi çekici olmaktadır (Maus ve ark. 2020). Bu çalışmada *E. coli*'lerde beta laktam direncinin görülmemesi olumlu bir sonuç olmakla birlikte, bu durum şaşırtıcı bir sonuç olarak yorumlanmıştır. Çünkü çiftlik hayvanlarından izole edilen *E. coli* suşlarında sıklıkla beta laktam direnci rapor edilmektedir (Dahms ve ark. 2015). Feng ve ark. (2018) çalışmalarında %22,9 oranında GSBL *E. coli* olduğunu bildirmiştir. Yapılan diğer çalışmalarda bu oran %90'a kadar varabilmektedir (Cormier ve ark. 2019; Fournier ve ark. 2020). Bunun dışında bu çalışmada *P. fulva* fenotip olarak AmpC pozitif olmasına rağmen CIT geni yönünden PCR bulguları negatif çıkmıştır. Bunun nedeni olarak dirençten sorumlu bir başka gen ihtivasi olabileceği düşünülmüştür. Çünkü son yıllarda plazmid aracılı AmpC için CMY, DHA, MOX, FOX, EBC ve ACC gibi birçok gen bildirilmiştir. Hatta DHA-1, CMY-1 ve CMY-2 ve benzeri alt varyantlar da bildirilmektedir (Pietsch ve ark. 2018; Oikarainen ve ark. 2019; Carvalho ve ark. 2021).

Sonuç olarak bu çalışmadan elde edilen izolatlarda yüksek antibiyotik direnci görülmüştür. Çoklu antibiyotik direnç oranı sadece fenotip olarak değerlendirilmiştir. İleriki çalışmalarda dirençlerden sorumlu genlerin araştırılması yararlı olabilir. Diğer yandan beta laktamaz ihtivasi fenotipik ve genotipik olarak araştırılmıştır. Buna göre sadece tek bir izolatın pozitif olması sevindirici olsa da hayvan-çevre-insan etkileşimi ele alındığında, mevcut durumun direnç dağılımı yönünden sürekli izlenmesi gerektiği düşünülmektedir. Direnç gelişiminin bakteriler arasında sürekli değişim halinde olduğu unutulmamalıdır.

ÇIKAR ÇATIŞMASI

Herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

TEŞEKKÜR VE BİLGİLENDİRME

Çalışmada MALDI TOF-MS analizleri T.C. Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğünde yapılmıştır. Analize katkı sağlayan Yasemin Numanoğlu Çevik'e ve örnek toplanması sırasında katkı sağlayan Veteriner Hekim Arş. Gör. Ayşe İlgin Kekeç'e teşekkür ederim.

YAZAR KATKILARI

Fikir/Kavram: NS
Denetleme/Danışmanlık: NS
Veri Toplama ve/veya İşleme: NS
Analiz ve/veya Yorum: NS
Makalenin Yazımı: NS
Eleştirel İnceleme: NS

KAYNAKLAR

- Al Azad MA R, Rahman M M, Amin R et al. (2019). Susceptibility and multidrug resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from cloacal swabs of live broiler chickens in Bangladesh. *Pathogens*, 8 (3), 118.
- Andersson D I, Balaban N Q, Baquero F (2020). Antibiotic resistance: turning evolutionary principles into clinical reality. *FEMS Microbiol Rev*, 44 (2), 171-188.
- Asambe A, Babashani M, Salisu US (2018). In vitro comparative activity of ciprofloxacin and enrofloxacin against clinical isolates from chickens in Benue State, Nigeria. *Nigerian Vet J*, 39 (3), 199-208.
- Babacan O, Karadeniz H. (2019). Çiğ tavuk etlerinden izole edilen *Salmonella* spp. suşlarının antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması. *Vet Hekim Der Derg*, 90 (2), 105-114.
- Bayraktar E, Şekeröglü A, Duman M (2019). Artvin ilinde farklı rakımlarda köy tavukçuluğu yapan işletmelerin kümes ve tercih edilen kanatlıların özellikleri ile hastalıklara yaklaşım durumlarının belirlenmesi. In Congress Book, 4th International Anatolian Agriculture, Food, Environment and Biology Congress-2019 (p. 292).
- Bonardi S, Pitino R (2019). Carbapenemase-producing bacteria in food-producing animals, wildlife and environment: A challenge for human health. *Ital J Food Saf*, 8 (2), 77-92.
- Burckhardt I, Zimmermann S (2018). Susceptibility testing of bacteria using MALDI-TOF mass spectrometry. *Front Microbiol*, 9, 1744.
- Carvalho I, Safia Chenouf N, Cunha R et al. (2021). Antimicrobial resistance genes and diversity of clones among ESBL-and acquired AmpC-producing *Escherichia coli* isolated from fecal samples of healthy and sick cats in Portugal. *Antibiotics*, 10 (3), 262.
- Clark CM, Costa MS, Sanchez LM, Murphy BT (2018). Coupling MALDI-TOF mass spectrometry protein and specialized metabolite analyses to rapidly discriminate bacterial function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 115 (19):4981-4986.
- CLSI (2018). M100S 28th Edition. Wayne, PA:Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR. Clinical Veterinary Microbiology. London: Wolfe Publishing; 1994. p. 42-126.
- CLSI (2019). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 29th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA ABD.
- CLSI (2020). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard Document 5th ed. CLSI supplement VET01S.
- Cormier A, Zhang PL, Chalmers G (2019). Diversity of CTX-M-positive *Escherichia coli* recovered from animals in Canada. *Vet Microbiol*, 231, 71-75.
- Dahms C, Hübner N O, Kossow A et al. (2015). Occurrence of ESBL-producing *Escherichia coli* in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany. *PloS one*, 10 (11), e0143326.
- de Jong A, Simjee S, El Garch F et al. (2018). Antimicrobial susceptibility of enterococci recovered from healthy cattle, pigs and chickens in nine EU countries (EASSA Study) to critically important antibiotics. *Vet Microbiol*, 216, 168-175.
- Delesalle L, Sadoine M L, Mediouni S et al. (2022). How are large-scale One Health initiatives targeting infectious diseases and antimicrobial resistance evaluated? A scoping review. *One Health*, 100380.
- Fournier C, Aires-de-Sousa M, Nordmann P, Poirel L. (2020). Occurrence of CTX-M-15-and MCR-1-producing Enterobacterales in pigs in Portugal: Evidence of direct links with antibiotic selective pressure. *Int J Antimicrob Agents*, 55 (2), 105802.
- Gajdacs M, Ábrók M, Lázár A, Burián K (2020). *Differential epidemiology and antibiotic resistance of lactose-fermenting and non-fermenting Escherichia coli: Is it just a matter of taste?* *Biologia Futura*, 71 (1), 175-182.
- Güngördü, S, Celen M F (2018). Batman İli köy tavukçuluğunun durumu. *Batman Üniv Yaşam Bilim Derg*, 8 (2/2), 37-59.
- Hedman H D, Vasco KA, Zhang L (2020). A review of antimicrobial resistance in poultry farming within low-resource settings. *Animals*, 10 (8), 1264.
- Ilyas S, Rasool M H, Arshed M J et al. (2021). The *Escherichia coli* sequence type 131 harboring extended-spectrum beta-lactamases and carbapenemases genes from poultry birds. *Infect Drug Resist*, 14, 805.
- Jung H, Pitout J D, Mitton B C et al. (2021). Evaluation of the rapid ResaPolymyxin Acinetobacter/Pseudomonas NP test for rapid colistin resistance detection in lactose non-fermenting Gram-negative bacteria. *J Med Microbiol*, 70 (6), 001373.
- Karamanhoğlu D, Aysert-Yıldız P, Kaya M, Sarı N (2019). İdrar kültürlerinden izole edilen enterik bakterilerde genişlemiş spektrumlu β-laktamaz oluşturma sıklığı ve antibiyotik duyarlılıkları. *Klinik Derg*, 32 (3), 233-9.
- Kırtıl HE, Metin B, Arıcı M (2020). Peynir küfü olarak *Penicillium roqueforti*'nin taksonomisi, morfolojik, genetik ve metabolik özellikleri. *The J of Food*, 45 (6) :1188-1200.
- Maheux AF, Brodeur S, Bérubé É et al. (2018). Method for isolation of both lactose-fermenting and non-fermenting *Escherichia albertii* strains from stool samples. *J Microbiol Methods*, 154, 134-140.
- Maus A, Bisha B, Fagerquist C, Basile F. (2020). Detection and identification of a protein biomarker in antibiotic-resistant *Escherichia coli* using intact protein LC offline MALDI-MS and MS/MS. *J Appl Microbiol*, 128 (3), 697-709.
- Musa L, Casagrande Proietti P, Branciarri R et al. (2020). Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* and ESBL-producing *Escherichia coli* diffusion in conventional, organic and antibiotic-free meat chickens at slaughter. *Animals*, 10 (7), 1215.
- Oikarainen PE, Pohjola LK, Pietola ES, Heikinheimo A (2019). Direct vertical transmission of ESBL/pAmpC-producing *Escherichia coli* limited in poultry production pyramid. *Vet Microbiol*, 231, 100-106.
- Peirano G, Pitout JD (2019). Extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae: update on molecular epidemiology and treatment options. *Drugs*, 79 (14), 1529-1541.
- Pietsch M, Irrgang A, Roschanski N(2018). Whole genome analyses of CMY-2-producing *Escherichia coli* isolates from humans, animals and food in Germany. *BMC Genom*, 19, 601.
- Pinto C, Melo-Miranda R, Gordo I, Sousa A (2021). The selective advantage of the lac operon for *Escherichia coli* is conditional on diet and microbiota composition. *Front Microbiol*, 12.
- Prestinaci F, Pezzotti P, Pantosti A (2015). "Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon", *Pathog Glob Health*, 109 (7), 309-318.
- Qader M B A, Alkhafaji M H (2019). Detection of bacterial contamination of imported chicken meat in Iraq. *Iraqi J Sci*, 60 (9), 1957-1966.
- Read AF, Woods RJ (2014). Antibiotic resistance management. *Evol Med Public Health*, 2014 (1), 147.
- Rüegg S R, Nielsen L R, Buttigieg S C (2018). A systems approach to evaluate One Health initiatives. *Front Vet Sci*, 5, 23.
- Simmons K, Islam M R, Rempel H et al. (2016). Antimicrobial resistance of *Escherichia fergusonii* isolated from broiler chickens. *J of Food Prot*, 79 (6), 929-938.
- Singh A, Chhabra D, Sharda R et al. (2019). Antibiotic resistance in *E. coli* isolated from poultry. *Int J Curr Microbiol Appl Sci*, 8 (10), 89-94.
- Sipahi N, Karakaya E, İkiz S (2019). Phenotypic and genotypic investigation of the heavy metal resistance in *Escherichia coli* isolates recovered from cattle stool samples. *Turkish J Vet Anim Sci*, 43 (5), 684-691.
- Sun H (2022). Equilibrium properties of *E. coli* lactose permease symport—A random-walk model approach. *PloS One*, 17(2), e0263286.
- Şahan Ö, Aral E M, Aden M A, et al. (2016). Türkiye'deki broyler tavuk işletmelerinden izole edilen *Salmonella* serovarlarının antimikrobiyel direnç durumu. *Ankara Üniv Vet Fak Derg*, 63 (1), 1-6.
- Tarım Ekonomisi ve Politika Geliştirme Enstitüsü (TEPGE) (2022). Durum ve Tahmin Kümes Hayvancılığı, *TEPGE Yayınları*, Haziran 2022, 352.
- Telli M (2022). Klebsiella pneumoniae Klinik Suşlarında, 2012-2020 Yılları Arasında Karbapenem Direnç Oranlarındaki Değişimin ve Direnç Genlerinin Araştırılması. *Türk Mikrobiyol Cem Derg*, 95.
- Tian M, He X, Feng Y et al. (2021). Pollution by antibiotics and antimicrobial resistance in livestock and poultry manure in China, and countermeasures. *Antibiotics*, 10 (5), 539.
- Topić Popović N, Kazazić S P, Bojanić K et al. (2021). Sample preparation and culture condition effects on MALDI-TOF MS identification of bacteria: A review. *Mass Spectrom Rev*, 2021, 1-15.
- Tümtürk A, Tezer Tekçe AY, Şanal L (2019). Nozokomiyal infeksiyon etkeni Gram negatif bakterilerde karbapenem direnç oranları: Üçüncü basamak bir hastaneden retrospektif bir çalışma. *Ortadoğu Tıp Derg*, 422-426.
- Uyanık T (2022). Samsun İlindeki Hastane Kantinlerinde Satışa Sunulan Tüketime Hazır Sandviçlerde Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten *Escherichia coli* Varlığının Araştırılması. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, 19 (1), 37-42.
- Wallace M J, Fishbein S R S, Dantas G (2020). Antimicrobial resistance in enteric bacteria: current state and next-generation solutions. *Gut Microbes*, 12 (1), 1799654.
- Wang Y, Lyu N, Liu F et al. (2021). More diversified antibiotic resistance genes in chickens and workers of the live poultry markets. *Environ Int*, 153, 106534.
- Wilson G, McCabe D (2007). The use of antibiotic-containing agars for the isolation of extended-spectrum β-lactamase-producing organisms in intensive care units. *Clin Microbiol Infect*, 13 (4), 451-453.