

GIDALARDAN İZOLE EDİLEN ENTEROBACTERIACEAE SUŞLARINDA GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZLARIN MOLEKÜLER YÖNTEMLE ARAŞTIRILMASI

ÖZET

Günümüzde klinik ve toplumsal kaynaklı dirençli bakterilere artan şekilde rastlanmaktadır. Bu yeni biyolojik tehlike Dünya’da insan sağlığını ciddi şekilde tehdit eder seviyelere gelmiştir. Bu nedenle WHO, FAO ve EFSA gibi otoriteler araştırmacıları bu konu üzerinde araştırma yapmaları için teşvik etmektedirler. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL) plazmid-aracılı *bla*-genleri tarafından kodlanan ve beta-laktam antibiyotikleri enzimatik inaktivasyon direnç mekanizması yoluyla etkisizleştirerek infeksiyon tedavilerini olumsuz etkileyen özgün enzimlerdir. GSBL-kodlayan *bla*-genlerin farklı ve/veya türdeş bakteriler arasında aktarılabilir olmaları, insan bağırsak mikroflorasının GSBL-pozitif Enterobacteriaceae ve *bla*-genler ile kolonize olma riskini doğurmaktadır. Bu durumun gelişiminde yalnızca klinik ve toplumsal kaynaklı etmenlerin değil, gıdaların da potansiyel rolleri oldukları düşünülmektedir. Türkiye’de GSBL-pozitif Enterobacteriaceae ve *bla*-genlerin epidemiyolojisini tespiti için klinik ve toplumsal kökenli araştırmalar yapılmış olmakla birlikte, gıda kaynaklı bulgular sınırlı olup, moleküler epidemiyolojik incelemelerin üzerinde ciddi şekilde durulmamıştır. Bu çalışmada Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu talimatları takip edilerek toplam 250 adet hayvansal kaynaklı çiğ gıda maddelerinden izole edilen ve kütle spektrometresi ile tiplendirilen toplam 55 adet GSBL-üreten Enterobacteriaceae suşlarında bu tip beta-laktamazları kodlayan *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} ve *bla*_{CTX-M} genleri ile *bla*_{CTX-M} sübtiplerinin genotipik karakterizasyonu amaçlanmıştır. GSBL-pozitif izolatlardan elde edilen DNA materyaller Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) ile amplifiye edilmiş ve amplikonları jel elektroforez tekniği ile görüntülenmiştir. Görüntülenen 1 adet *bla*_{TEM} pozitif *E. coli*, 1 adet *bla*_{SHV} pozitif *K. pneumoniae* ve 1 adet *bla*_{CTX-M} pozitif *E. coli* amplikonları saflaştırılmış, sekanslanılmış ve BLAST Programı kullanılarak doğrulamaları yapılmıştır. İstatistik analiz için SPSS 19 programı kullanılmış ve GSBL-pozitif Enterobacteriaceae suşların izole edildikleri gıda grupları bazında frekanslarının niteliksel kıyaslaması Kruskal-Wallis H-testi ile yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar $P < 0,05$ seviyesinde anlamlı kabul edilmiştir. Moleküler incelemeler *bla*-genlerin dağılımını %49,5 *bla*_{TEM}, %32,7 *bla*_{CTX-M} ve %17,8 *bla*_{SHV} olarak vermiştir. İzolatların %82’sinin birden fazla *bla*-geni taşıdıkları tespit edilmiştir. *bla*-genlerin ortak bulunmaları %52,7 *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}, %20 *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV}, %12,7 *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}+*bla*_{SHV} ve %1,8 *bla*_{SHV}+*bla*_{CTX-M} olarak tayin edilmiştir. CTX-M-pozitif amplikonlar ileri analize alınmış ve alt grupları %97,2 *bla*_{CTX-M-Grup-1} ve %2,8 *bla*_{CTX-M-Grup-8} olarak karakterize edilmiştir. Sekanslama ve BLAST analizi sonuçları üç adet GSBL-pozitif izolatların taşıdıkları *bla*-genleri doğrulamıştır. İstatistik değerlendirme GSBL-kodlayan *bla*-genler için hayvansal kaynaklı gıdaların gıdanın türüne bağlı olmaksızın potansiyel rezervuar olduklarını göstermiştir. Sonuç olarak, Türkiye’de ilk kez genotipik yöntemlerle hayvansal kaynaklı gıdaların *bla*-genleri içerdikleri ve tüketicilerin bu genetik materyaller ile kolonize olma riski taşıdıkları somut şekilde tespit edilmiştir.

Anahtar kelimeler: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, Enterobacteriaceae, GSBL, PCR, BLAST

CHARACTERIZATION OF EXTENDED SPECTRUM BETA-LACTAMASES IN ENTEROBACTERIACEAE FROM FOODS USING MOLECULAR METHOD

ABSTRACT

Clinical and community-related resistant bacteria are widely found in the present time. This new type of biohazard is a growing health concern of global significance for the human health. To date, international authorities, including WHO, FAO and EFSA, therefore, enhance the researchers to focus on this emerging issue. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) are the specific enzymes that are encoded by plasmid-mediated *bla*-genes. They inactivate beta-lactam antibiotics through a mechanism of resistance, also known as enzymatic inactivation, thereby leading to failure of treatment of bacterial infections. The *bla*-genes are easily transferable among the same and/or different bacterial species. This situation is the leading cause of the colonization of human intestinal microflora with ESBL-positive Enterobacteriaceae, including *bla*-genes. Not only the clinical and community settings, the foods are also under suspicion for being transmission vectors of ESBL producing strains and their encoding genes, in particular, among Enterobacteriaceae. In Turkey, clinical and community-related ESBL-producers were examined well. However, the potential contribution of foods to dissemination of plasmid-born ESBLs was not questioned seriously. The objective of this study was to genotypically characterize ESBL-coding *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes and *bla*_{CTX-M} subtypes in 55 ESBL-producing Enterobacteriaceae from a total of 250 raw foods of animal origin based on the Guidelines of Clinical and Laboratory Standards Institute after identification by a mass spectrometer. DNAs from each ESBL-positive isolates were initially amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR), and subsequently visualised by gel-electrophoresis. Within the visualised *bla*-genes, 1 *bla*_{TEM} positive *E. coli*, 1 *bla*_{SHV} positive *K. pneumoniae* and 1 *bla*_{CTX-M} positive *E. coli* amplicons were purified, sequenced, and confirmed using BLAST Program. SPSS 19 was used for statistical analysis. The Kruskal-Wallis H-test was performed for qualitative-comparison of the frequencies of ESBL-positive Enterobacteriaceae with respect to their sampling groups. $P < 0.05$ was considered to be significant. Genotypic results provided that the frequency rates of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} were given as 49.5%, 32.7%, and 17.8%, respectively. The co-existence of *bla*-genes were determined to be 52.7% *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}, 20% *bla*_{TEM}+*bla*_{SHV}, 12.7% *bla*_{TEM}+*bla*_{CTX-M}&*bla*_{SHV}, and 1.8% *bla*_{SHV}+*bla*_{CTX-M}. Further subtyping of CTX-M-positive amplicons revealed that the most prevalent *bla*_{CTX-M} subtype was 97.2% *bla*_{CTX-M-Group-1}, and followed by 2.8% *bla*_{CTX-M-Group-8}. Sequencing and BLAST analysis also confirmed the selected 3 ESBL-producers to harbor *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes. The statistical evaluation proved that foods of animal-origin were all potential reservoirs for ESBL-positive bacteria and their *bla*-encoding genes regardless type of food. To conclude, this was the first genotypic report on high frequencies of diverse of ESBL-coding *bla*-genes in some foods of animal origin, thereby leading to the colonization of the consumers with these transferable genetic materials.

Keywords: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, Enterobacteriaceae, ESBL, PCR, BLAST