



T.C.
MEHMET AKIF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BURDUR İLİNDEKİ BUZAĞILARIN DIŞKI ÖRNEKLERİNDE
GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA LAKTAMAZ (GSBL)
ÜRETEN *ESCHERICHIA COLI* VARLIĞININ BELİRLENMESİ**

Veteriner Hekim Durmuş YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU

BURDUR-2017

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BURDUR İLİNDEKİ BUZAĞILARIN DIŞKI
ÖRNEKLERİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA
LAKTAMAZ (GSBL) ÜRETEN *ESCHERICHIA COLI*
VARLIĞININ BELİRLENMESİ**

Veteriner Hekim Durmuş YILDIRIM

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

Danışman

Yrd. Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU

Bu araştırma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0277-YL-16 proje numarası ile desteklenmiştir.

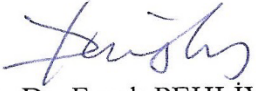
BURDUR-2017

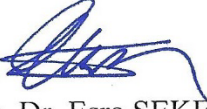
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Durmuş YILDIRIM tarafından *Yrd. Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU* yönetiminde hazırlanan *Burdur ilindeki buzağuların dışkı örneklerinde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten Escherichia coli varlığının belirlenmesi* başlıklı tez çalışması jüri üyeleri olarak tarafımızdan okunmuş; kapsamı ve niteliği açısından *Veteriner Mikrobiyoloji* Anabilim Dalında *Yüksek Lisans Tezi* olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi
02/01/2017


Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Jüri Başkanı


Yrd. Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi
Jüri Üyesi (Danışman)


Doç. Dr. Esra ŞEKER
Afyon Kocatepe Üniversitesi
Jüri Üyesi

ONAY

Bu tez, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Lisans Üstü Eğitim-Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu **02/01/2017** Tarih ve **2017/2** sayılı kararı ile kabul edilmiştir.



Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez projesi kapsamında çalıőmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen Mikrobiyoloji Anabilim Dalı öğretim üyelerinden başta Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Hülya TÜRÜTOğLU olmak üzere Doç. Dr. Dilek ÖZTÜRK ve Yrd. Doç. Dr. Özlem ŐAHAN YAPICIER'e, Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görevli Arő. Gör. Ezgi ŐABABOđLU ve Mehmet KAYA'ya; zaman ayırarak verilen istatistiksel analizleri gerçekleőtiren Yrd. Doç. Dr. Cevat SİPAHİ'ye; danışmanım Yrd. Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOğLU'na ve aileme teőekkürlerimi sunarım.



BEYAN

Burdur ilindeki buzağuların dışkı örneklerinde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten Escherichia coli varlığının belirlenmesi başlıklı tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

30.11.2016


Durmuş YILDIRIM

ONAY


Yrd. Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU

Danışman

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK	i
KABUL ve ONAY	ii
TEŞEKKÜR	iii
BEYAN	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar DİZİNİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	x
TÜRKÇE ÖZET	xii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Beta Laktam Grubu Antibiyotikler	3
2.1.1. Penisilinler	3
2.1.2. Sefalosporinler	4
2.1.3. Karbapenemler	5
2.1.4. Monobaktamlar	5
2.1.5. Beta Laktamaz İnhibitörleri	6
2.2. Beta Laktam Antibiyotiklerin Etki mekanizması	6
2.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Gelişimi	7
2.3.1. Bakteri Hücre Membranında Permeabilitenin Azalması	7
2.3.2. Sitoplazmik Membranda Yer Alan Penisilin Bağlayan Proteinlerde Modifikasyon	7
2.3.3. Gram Negatif Bakterilerde Tanımlanmış Efluks Pompa Sistemi	8
2.3.4. Beta Laktamaz Üretimi	8

2.4.	Beta Laktamazlar	9
2.4.1.	Ambler Moleküler Sınıflandırma	9
2.4.2.	Bush –Jacoby ve Medeiros Fonksiyonel Sınıflandırma	9
2.5.	Genişlemiş Spektrumlu Beta laktamazlar (GSBL)	12
2.5.1.	SHV Grubu GSBL’lar	13
2.5.2.	TEM Grubu GSBL’lar	13
2.5.3.	CTX-M ve Toho Grubu GSBL’lar	14
2.5.4.	OXA Grubu GSBL’lar	14
2.5.5.	PER Grubu GSBL’lar	15
2.5.6.	VEB Grubu GSBL’lar	15
2.5.7.	Diğer GSBL Türleri	15
2.6.	GSBL Tanı Yöntemleri	17
2.6.1.	Fenotipik Testler	17
2.6.2.	Genotipik Testler	19
2.7.	GSBL Epidemiyoloji	20
2.7.1.	Dünyadaki Durum	20
2.7.2.	Türkiye’deki Durum	21
3.	GEREÇ ve YÖNTEM	23
3.1.	Testlerde Kullanılan Besiyerleri	23
3.2.	Örnekleme Metodu ve Örnek Sayısının Belirlenmesi	24
3.3.	Dışkı Örneklerinin Toplanması	25
3.4.	<i>E. coli</i> İçin Selektif İzolasyon ve İdentifikasyon	26
3.4.1.	Üçlü Tüp Yöntemi	27
3.4.2.	Sitrat Testi	28
3.4.3.	Metil Red (MR) Testi	28
3.4.4.	Voges-Proskauer (VP) Testi	29
3.4.5.	Oksidaz Testi	29
3.4.6.	Katalaz Testi	30

3.5.	Doğrulama Testi (Kombine Disk Metodu)	30
3.6.	Antibiyotik Duyarlılık Testleri	30
3.7.	Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	32
3.7.1.	DNA Ekstraksiyonu	32
3.7.2.	GSBL Genlerinin PZR ile Araştırılması	32
3.7.3.	PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi	35
3.8.	İstatistiksel Değerlendirme	35
4.	BULGULAR	36
4.1.	<i>E. coli</i> Selektif İzolasyonu ve İdentifikasyonu	36
4.2.	Doğrulama Testi (Kombine Disk Metodu)	37
4.3.	Antibiyotik Duyarlılık Testleri	39
4.4.	PZR	39
4.5.	İstatistiksel Değerlendirme	42
5.	TARTIŞMA	43
6.	SONUÇ ve ÖNERİLER	46
7.	KAYNAKLAR	47
8.	ÖZGEÇMİŞ	56

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil numarası ve başlığı	Sayfa
Şekil 4.1. Brilliance™ <i>E. coli</i> / koliform selektif besiyerinde üreyen koloniler.	36
Şekil 4.2. GSBL üreten <i>E. coli</i> izolatu (örnek no:137).	37
Şekil 4.3. 16S rRNA geni primerleri ile <i>E. coli</i> izolatlarında yapılan PZR sonucu.	40
Şekil 4.4. TEM geni primerleri ile <i>E. coli</i> izolatlarında yapılan PZR sonucu.	40
Şekil 4.5. CTX-M universal primerleri ile <i>E. coli</i> izolatlarında yapılan PZR sonucu.	41
Şekil 4.6. CTX-M grup-1 primerleri ile <i>E. coli</i> izolatlarında yapılan PZR sonucu.	41

TABLolar DİZİNİ

Tablo numarası ve başlığı	Sayfa
Tablo 2.1. GSBL'lar için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değerleri.	17
Tablo 3.1. Buzağı dışkı örneklerinin alındığı merkezler ile işletme ve örnek sayısı.	25
Tablo 3.2. Merkezlere göre örneklenen hayvanların yaş (ay) dağılımları.	25
Tablo 3.3. Norveç üçlü tüp sitemindeki biyokimyasal testlerin değerlendirilmesi.	28
Tablo 3.4. İnhibisyon zon çaplarının değerlendirilmesinde kullanılan kritik zon çapları.	32
Tablo 3.5. PZR'unda kullanılan primerler.	33
Tablo 4.1. Buzağı dışkı örneklerinin alındığı yerleşim yerlerine göre GSBL üreten <i>E. coli</i> izolatlarının dağılımı.	38
Tablo 4.2. GSBL üreten <i>E. coli</i> izolatlarının buzağuların yaşlarına (ay) göre dağılımı ve oranları.	38
Tablo 4.3. GSBL üreten <i>E. coli</i> izolatlarının beta laktam antibiyotiklere direnç oranları.	39
Tablo 4.4. GSBL üreten <i>E. coli</i> izolatlarının diğer sınıftan antibiyotiklere direnç oranları.	39

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

A	: Adenin
ABD	: Amerika Birleşik Devletleri
ATCC	: American Type Culture Collection
bp	: Base pair (Baz çifti)
CAZ	: Seftazidim
cfu	: Koloni oluşturan birim (colony forming unit)
CLSI	: Clinical and Laboratory Standarts Institute
CTC	: Sefotaksim-klavulanik asit
CTX	: Sefotaksim
CZC	: Seftazidim-klavulanik asit
dH ₂ O	: Distile su
DNA	: Deoksiribonükleik asit
dNTP	: Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	: Etilen diamin tetra asetik asit
G	: Guanin
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
H ₂ S	: Hidrojen sülfid
IRT	: Inhibitor resistant TEM
KH ₂ PO ₄	: Mono potasyum fosfat
K ₂ HPO ₄	: Di potasyum fosfat
KOH	: Potasyum hidroksit
mg	: Miligram
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
MHA	: Mueller Hinton agar
MİK	: Minimum inhibitör konsantrasyonu
MRSA	: Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
ml	: Mililitre
mm	: Milimetre
mM	: Milimolar
NaCl	: Sodyum klorür

NAGA	: N-asetilglukozamin
NAMA	: N-asetilmuramik asit
T	: Timin
TBE	: Tris-Borat-EDTA buffer
PBP	: Penisilin bağlayan protein
pH	: Hidrojenin g¼c¼ (Asidite)
PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Rpm	: Revolutions per minute
S	: Sitozin
°C	: Santigrat derece
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre

T.C.
MEHMET AKİF ERSOY ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Yüksek Lisans Tezi

Burdur ilindeki buzağların dışkı örneklerinde genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* varlığının belirlenmesi

Veteriner Hekim
Durmuş YILDIRIM

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Tez danışmanı
Yrd. Doç. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU

BURDUR – 2017

ÖZET

Gram negatif bakteriler tarafından üretilen genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) tüm penisilinlere, 1.-4. kuşak sefalosporinlere ve monobaktamlara dirençten sorumludur. İndikatör bir bakteri olarak kommensal *E. coli*'nin antibiyotiklere dirençlilik açısından taranması antibiyotik direnç seviyesinin izlenmesi açısından önemlidir. Bu çalışmada Türkiye'nin Burdur ilindeki sağlıklı buzağlarda GSBL üreten *E. coli* varlığı araştırıldı. Toplam 150 buzağı dışkı örneği Burdur iline bağlı 3 ilçedeki 44 sığır işletmesinden toplandı. Her bir dışkı örneğinden tamponlanmış peptonlu su içinde % 10'luk süspansiyon hazırlandı ve sefotaksim ve seftazidim ilave edilerek hazırlanmış *E. coli* / koliform selektif agar besiyerlerine eş zamanlı ekildi. Besiyerinde görülen kolonilerden *E. coli* identifikasyonu standart metotlarla yapıldı ve *E. coli* 16S rRNA genine spesifik polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile genetik doğrulama yapıldı. Ardından *E. coli* izolatlarının GSBL üretilip üretilmediği kombine disk metodu ile belirlendi ve yaygın GSBL genleri (CTX-M, TEM ve SHV) PZR ile araştırıldı. Son olarak izolatların çeşitli beta laktam antibiyotiklere ve diğer sınıftan antibiyotiklere duyarlılığı agar disk difüzyon testi ile araştırıldı. Toplam 44 adet *E. coli* selektif agardan izole edildi

ancak bunların 36'sı GSBL üreten izolat olarak tespit edildi. CTX-M (grup 1) genleri tüm izolatlarda belirlendi. TEM geni 33 izolatta tespit edilirken SHV genine izolatların hiçbirinde rastlanmadı. GSBL üreten *E. coli* izolatları beta laktam grubu ve diğer grup antibiyotiklere yüksek oranda dirençli bulundu. Sonuç olarak, bu çalışma ile Türkiye'nin Burdur ilindeki işletmelerdeki sağlıklı buzağılarda GSBL üreten *E. coli* varlığı gösterilmiş oldu.

Anahtar kelimeler: Burdur, buzağı, GSBL, *Escherichia coli*.



**Mehmet Akif Ersoy University
Institute of Health Science**

Master of Science Thesis

**Detection of extended spectrum beta lactamase producing *Escherichia coli* in
fecal samples of calves in Burdur province**

**Name and Surname:
Durmuş YILDIRIM, DVM**

Department of Veterinary Microbiology

**Supervisor:
Asst. Prof. Dr. Faruk PEHLİVANOĞLU**

BURDUR – 2017

ABSTRACT

Extended spectrum beta lactamases (ESBL) produced by Gram negative bacteria are responsible from resistance to all penicillins, 1st-4th generation cephalosporins and monobactams. Screening of commensal *E. coli* isolates as indicator bacterium for resistance to antimicrobials is important to monitor the antibiotic resistance level. In the present study, existence of ESBL producing *E. coli* isolates was investigated in the healthy calves in Burdur city of Turkey. Total 150 calf fecal samples were collected from 44 cattle farms in 3 districts of Burdur city. A 10 % suspension was prepared from each feces in pepton buffered water and spread on *E. coli*/coliform selective agar supplemented with cefotaxime and ceftazidime. The colonies appeared on the media were identified as *E. coli* by standard methods and genetic confirmation for *E. coli* was performed by polymerase chain reaction (PCR) specific to *E. coli* 16S rRNA gene. Then ESBL production of *E. coli* isolates was confirmed by combined disc method and the common ESBL genes (CTX-M, TEM and SHV) were investigated by PCR. Finally, susceptibilities of the ESBL producing *E. coli* isolates to several beta lactams and other classes of antibiotics were investigated by agar disc diffusion test. Forty four *E. coli* isolates were isolated from selective media but 36 of them were confirmed as ESBL producer. CTX-M (group 1) genes were

found in all isolates. While TEM gene was detected in 33 isolates, no SHV gene was detected in the isolates. ESBL producing *E. coli* isolates were found resistant at high rate against to beta lactam group and other groups of antibiotics. Consequently, this study showed the presence of ESBL producing *E. coli* in the healthy calves in Burdur city of Turkey.

Key words: Burdur, calf, ESBL, *Escherichia coli*.



1.GİRİŞ

Antibiyotikler hayvancılıkta tedavi, profilaksi ve büyümei etkileyici etkisinden yararlanılarak, üretim performansını ve verimi artırmak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak antibiyotiklerin yaygın kullanımı gerek patojen bakterilerde gerekse flora bakterilerinde direnç gelişimine yol açmaktadır. Bu durum hayvanların bakteriyel hastalıklarının tedavisinde güçlükler yol açtığı gibi, dirençli bakteriler hayvanlardan insanlara direkt temas veya hayvansal ürünlerin tüketimi ile bulaşabilmekte ve halk sağlığını da etkilemektedir. Antibiyotik kalıntılı hayvansal gıdaların insanlar tarafından tüketilmesi insanlarda sadece dirençli mikroorganizmalarla enfeksiyonlara neden olmayıp alerjik, toksik ve üreme bozukluklarına da sebep olmaktadır (13).

Hayvanların bağırsak florasında bulunan *Escherichia coli* suşları çeşitli amaçlarla hayvanlarda kullanılan antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmekte ve bu direnci gerek patojen gerekse apatojen bakterilere transpozon, plazmid ve integronlar aracılığıyla aktarabilmektedirler. Bu nedenle, çeşitli ülkelerde antibiyotik dirençliliğinin izlenmesinde *E. coli* indikatör bakteri olarak kullanılmaktadır (29, 45).

Beta laktam grubu antibiyotikler hayvanların çeşitli enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklere karşı bakterilerin geliştirdiği dirençte bakterilerin ürettiği beta laktamaz enzimleri önemli bir yer tutar (33). Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) olarak bilinen enzimler, beta laktam grubu antibiyotiklerden sefotaksim, seftazidim, seftriakson gibi oksimin beta laktamlara, aztreonama ve penisilinlere direnç kazandıran ve genetik şifresi plazmid üzerinden taşınan enzimlerdir (15, 25, 64). Diğer bir önemli konu GSBL üreten suşların birçok beta laktam dışı antibiyotiğe karşı yüksek oranda direnç göstermeleridir. Dirençten sorumlu bu genler bakteride konjugatif plazmid üzerinde lokalize olmuştur. Dolayısıyla GSBL enzimini içeren suşlarda, aminoglikozid, kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sülfametoksazol direnci de eş zamanlı olarak bulunabilmektedir (19, 25, 54, 81). GSBL üreten *E. coli* suşlarının hayvanların çeşitli enfeksiyonlarından izole edildiği rapor edilmektedir (48, 67). GSBL üreten *E. coli* ve diğer Gram negatif bakterilerin halk sağlığı açısından önemi ise insanlarda hastane enfeksiyonlarına yol açmasıdır (69).

Bu tez çalışmasında, Burdur ilinde büyükbaş hayvancılık işletmelerinde yetiştirilen sağlıklı buzağuların bağırsak mikroflorasında, GSBL üreten *E. coli* suşlarının varlığının ve bu suşların taşıdıkları GSBL genlerinin belirlenmesi amaçlandı. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin, daha önce Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji anabilim dalında yapılan çalışma sonuçları ile ve Türkiye’de ve dünyanın değişik bölgelerinde yapılmış çalışma sonuçları ile karşılaştırılması hedeflendi.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Beta Laktam Grubu Antibiyotikler

Beta laktam antibiyotikler yapılarında bir azot ve üç karbon içeren bir beta laktam halkası içermeleri nedeniyle bu şekilde isimlendirilmişlerdir (5, 18, 51, 56, 73). Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler ve beta laktamaz inhibitörleri olmak üzere 5 grupta toplanmaktadırlar (5).

2.1.1. Penisilinler

Mantarlardan elde edilen doğal veya sentetik antibakteriyel maddelerdir. Kimyasal yapıları bir tiazolidin halkasına ekli bir beta laktam halkası ve bir yan zincirden oluşur (5, 51, 56).

Penisilinler doğal penisilinler, penisilinaza dirençli penisilinler, aminopenisilinler, genişlemiş spektrumlu penisilinler, aminopenisilin / beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları şeklinde klasifiye edilirler (5, 56).

Doğal penisilinler (penisilin G ve penisilin V) klinik kullanıma sokulan ilk ilaçlardır. Penisilin G ve penisilin V dar etki spektrumuna sahiptirler (56). Veteriner hekimlikte özellikle büyük baş hayvanlarda sıklıkla kullanılır (73).

Penisilinaza dirençli penisilinler (dikloksasilin, kloksasilin, metisilin, nafsilin ve oksasilin) yarı sentetik penisilinler olup doğal penisilinlerin yapısına bir yan zincirin eklenmesiyle üretilmişlerdir. Stafilokokların ürettikleri penisilinaz enzimine dirençlidirler (18). Metisilin bu grup ilaçların prototipidir. Nafsilin preparatları sadece intravenöz kullanım için uygundur. Dikloksasilin penisilinaz üreten Stafilokoklar üzerine özellikle etkilidir ve oral yoldan diğer ilaçlara kıyasla nispeten yüksek biyoyararlanıma sahiptir (56).

Aminopenisillinler (amoksisilin, ampisilin) doğal penisilinlerin etkilediği bakterilerin yanında, *Haemophilus influenzae* ve Enterobacteriaceae ailesindeki Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyel aktiviteye sahiptir. Bunun yanında beta laktamazlara dayanıksızdırlar (5). Amoksisilin oral olarak uygulandığında, ampisilinden daha iyi emilir. Ayrıca amoksisilin kanda daha yüksek serum seviyelerine ulaşır ve daha uzun bir yarı ömre sahiptir. Ampisilin hem parenteral hem

de oral formülasyonları kullanılabilen tek aminopenisilin grubuna ait bir penisilindir (56).

Genişlemiş spektrumlu penisilinlerden olan ve karboksipenisilin grubundan karbenisilin ve tikarsilin içeren preparatlar *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılır. Bununla birlikte, piperasilin ve üreidopenisillinler geniş spektrumlu antibakteriyel aktiviteye ve artmış anti-pseudomonas aktiviteye sahiptirler (5, 56). Bunlardan hastane enfeksiyonlarının tedavisinde de yararlanılmaktadır (56). Bu grupta bulunan antibiyotikler beta laktamazlara dayanıksızdırlar. Aminopenisilinlere kıyasla *Enterobacter* suşlarına daha fazla etkinlik gösterirler (5).

Aminopenisilin / beta laktamaz inhibitörü kombinasyonları bakterilerin ürettiği beta laktamazlara karşı üretilen kombinasyonlardır. Aminopenisilinler beta laktamaz üreten organizmalara karşı etkisizdir. Aminopenisilinlere beta laktamaz inhibitörlerinin eklenmesi etki spektrumlarını genişletmede önemli bir adımdır (56). Beta laktamaz inhibitörleri tek başlarına zayıf antimikrobiyal aktiviteye sahiptir (5, 75).

2.1.2. Sefalosporinler

Sefalosporinler, bulunuş sıralarına ve etki spektrumları göre 5 gruba ayrılırlar (56).

Birinci nesil sefalosporinlerin (sefazolin, sefaleksim, and sefadroksil) penisiline dirençli stafilokoklar dahil Gram pozitif bakterilere etkilidirler (51, 73). Gram negatif bakterilere karşı etkinlikleri ise sınırlıdır (51, 56, 73).

İkinci nesil sefalosporinler; *Moraxella* spp., *Neisseria* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp. ve diğer Gram negatif patojenlere karşı daha aktiftirler. Sefoksitin ve sefotetan, aynı zamanda anaerofilik bakterilere de etki eden geniş bir spektruma sahiptirler. Bu sınıfta ayrıca sefprozil, sefuroksim ve sefaklor vardır. Bu ilaçlar esas olarak solunum yolu enfeksiyonlarında özellikle de *H. influenzae*'nin beta laktamaz üreten izolatlarına karşı daha iyi etkilidirler (56).

Üçüncü nesil sefalosporinler grubunda (sefopezon, sefotaksim, seftazidim ve seftriakson) bulunan bazı ilaçların *Pseudomonas* türlerine etkilemesi, önceki kuşaklara göre farklı bir özelliktir (6, 56, 75). Bunun yanında beyin omurilik sıvısına geçmeleri

diğer bir üstün özellikleridir (6, 75). Geniş etki spektrumları sayesinde birçok farklı patojene karşı etkilidirler. Seftiofur veteriner hekimlik için spesifik bir ilaçtır (73).

Dördüncü nesil sefalosporinler (sefepim) başta Enterobacteriaceae ailesine ait bakteriler dahil olmak üzere, hem Gram negatif hem de Gram pozitif bakterilere karşı oldukça etkilidirler (51, 56).

Yukarıda anlatılan sefalosporinlerin haricinde son yıllarda kullanılmaya başlanılan 5. nesil sefalosporinlerden de bahsetmek mümkündür. Bu grupta seftarolin ve seftobiprol metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA)'a etkili sefalosporinlerdir. Komplike deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarında vankomisine benzer etki gösterdikleri bildirilmiştir. (30).

2.1.3. Karbapenemler

Karbapenemlerin diğer antibiyotiklere kıyasla antimikrobiyal aktivitesinin en güçlü olduğu ve geniş bir spektruma sahip olduğu düşünülmektedir. Antimikrobiyal aktivite spektrumları, Gram pozitif ve Gram negatif aerofilik ve anaerofilik patojenleri içerir (56, 57, 80). Diğer beta laktam antibiyotiklerin kimyasal yapısından ayrılan özelliği beta laktam halkasının tiyazolidinik ekinde 4. pozisyonda bulunan sulfon yerine karbon içermesidir (57).

Karbapenemler metallobetalaktamazlara ve karbapenemazlara dayanıksız olmalarına rağmen, penisilinaz, AmpC ve GSBL'lara karşı dirençli antibiyotiklerdir (35). Türkiye'de beşeri hekimlikte kullanılan karbapenemlere imipenem, meropenem, ertapenem ve doripenem örnek olarak verilebilir (57).

2.1.4. Monobaktamlar

Moleküler yapısı sadece bir beta laktam halkası ve bir yan zincirden oluşmaktadır (56). Penisilin ve sefalosporinlerden beta laktam halkasından başka bir halka içermemesiyle ayrılır. Gram negatif bakterilerde penisilin bağlayan proteinlerine (PBP) bağlanarak etkisini gösterirler. Gram pozitif ve anaerofilik bakterilere etkinliği yoktur. Klinik kullanıma girmiş olan tek monobaktam olan aztreonam, sadece paranteral kullanılır ve dar spektrumlu bir ilaçtır. Klinik kullanımda aminoglikozidlere

benzer etkilere sahiptirler. Aminoglikozidlerin nefrotoksik ve ototoksik yan etkilerinden dolayı aminoglikozidlere alternatif olarak kullanılabilirler (3).

2.1.5. Beta Laktamaz İnhibitörleri

Penisilinlerin etki gücünün artırılması ve spektrumunun genişletilmesi amacıyla beta laktamazları inhibe eden enzim inhibitörleri geliştirilmiştir. Beta laktamaz inhibitörleri zayıf antibakteriyel etkinliğe sahip olmaları sebebiyle enfeksiyonların tedavisinde tek başına kullanılmazlar (5, 75). Başlıca beta laktamaz inhibitörleri klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktamdır (5, 51, 62, 75). Beta laktamaz inhibitörlerinin genellikle C sınıfı beta laktamazlara karşı bir etkinliği yoktur (5). *E. coli* ve *Proteus* türlerine klavulanik asit daha etkili iken, *Enterobacter* spp. ve *Serratia* türlerine sulbaktam etkilidir (51). Daha çok sınıf A beta laktamazların etkisizleştirdiği antibiyotiklerle kombine edilerek kullanılırlar (62).

2.2. Beta Laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Beta laktam grubu antibiyotikler etkilerini bakterilerin hücre duvarı yapısında bulunan peptidoglikan tabakasının sentezini önleyerek oluştururlar. Bunu, peptidoglikan tabakasının yapısındaki polisakkarid zincirlerinin kros bağlanmasında rolü olan transpeptidasyon enzimlerini inhibe ederek gerçekleştirirler (7). Bakteri hücre duvarının ana maddesi murein tabakasından oluşur. Bu madde peptidoglikan zincirlerinin yan dallarla birbirine bağlanmalarıyla oluşan bir polisakkariddir. Peptidoglikan zincirleri N-asetilmuramik asit (NAMA) ve N-asetilglukozamin (NAGA) ünitelerinden oluşur (51). Hücre duvar sentezinde 30 kadar enzim görevlidir (5). Bu enzimlerden transpeptidazlar, NAMA'ya bağlı pentapeptidlerde L-lizin ile D-alanin arasındaki peptid bağı oluşmasında, karboksipeptidazlar ise oluşan pentapeptidin son D-alanin molekülünün ayrışmasını sağlar. Beta laktam grubu antibiyotiklere bağlanarak etkinliğini engelleyen transpeptidaz enzimlerine penisilin bağlayan proteinler (PBP) denir. Beta laktam antibiyotiklerin beta laktam halkası, peptidoglikan tabasındaki NAMA'ya bağlı pentapeptidin ucundaki D-alanin-D-alanin yapısına benzemektedir. Bu sebeple transpeptidaz enzimi ya da PBP'ler, D-alanin-D-alanin yerine periplazmik boşluğa girmiş beta laktam antibiyotiğin beta laktam

halkasına bağlanır. Sonuçta, bakteri hücre duvarı şekillenemez ve hücrenin lizisiyle sonuçlanır (51, 79, 85).

Beta laktam antibiyotikler, hücre duvarı sentezlenmiş olan gelişmesini tamamlayan bakterilere etki etmeyip, gelişmekte-çoğalmakta olan hücrelere etkilidirler ve etkileri genellikle öldürücüdür (5, 7, 51, 75, 79). Karbapenemler üreme fazında olmayan bakterilere de etkilidirler (79).

2.3. Beta Laktam Antibiyotiklere Direnç Gelişimi

Beta laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç kazanılması başlıca dört mekanizmayla gelişir (5, 68).

2.3.1. Bakteri Hücre Membranında Permeabilitenin Azalması

Gram pozitif bakterilerin hücre duvarının büyük bir kısmını şekillendiren peptidoglikan tabakası antibiyotiklerin hücre içine girişinde bir zorluk oluşturmaz. Gram negatif bakterilerin hücre duvarını oluşturan çift tabakalı lipid yapı antibiyotiklerin hücre içine girişinde ciddi bir engel teşkil eder. Antibiyotikler Gram negatif bakterilere hücre duvarında bulunan protein yapısında porin adı verilen içi su dolu kanallardan girerler (5, 17, 85). Molekül büyüklüğü 600 Da'un altındaki moleküller porin kanallarından geçebilirler (17). Çift tabakalı lipid yapıda meydana gelen değişiklikler hücre membranı üzerindeki porin kanal sayısının ve buna bağlı olarak bakteri içine giren antibiyotik miktarının azalmasına neden olarak direnç gelişmesine yol açar (5, 17, 85).

2.3.2. Sitoplazmik Membranda Yer Alan Penisilin Bağlayan Proteinlerde Modifikasyon

Beta laktam grubu antibiyotikler bakterilerin peptidoglikan sentezi sırasında transpeptidasyon enzimlerinin doğal substratı gibi davranır. Bu nedenle, transpeptidazlara penisilin bağlayıcı proteinler (PBP) de denmektedir. PBP'lerdeki değişiklikler çeşitli şekillerde oluşabilmektedir. PBP'lerde mutasyonlar sonucunda beta laktam antibiyotiklere karşı düşük affiniteli PBP'ler ortaya çıkabilir, PBP'lerin

sayısında azalmalar olabilir ya da yeni sentezlenen PBP'ler beta laktam antibiyotiklere düşük affinite gösterebilirler. Sonuçta; PBP'lerdeki değişiklik sonucu beta laktam antibiyotiklere direnç gelişmesine sebep olur (5, 17, 79, 85). Bu türdeki dirence klinik ve epidemiyolojik açıdan Gram pozitif bakterilerde *S. aureus* suşlarındaki metisilin direncinde, Gram negatif bakterilerde *H. influenzae*'da direnç örnek olarak verilebilir. (5).

2.3.3. Gram Negatif Bakterilerde Tanımlanmış Efluks Pompa Sistemi

Porin kanallarından antibiyotiğın hücre içine girişinin önlenmesi veya bakteri içine giren antibiyotiğın, giriş hızından daha yüksek bir hızda hücre dışına pompalanması bakterilerin geliştirdiği diğeri bir direnç mekanizmasıdır (17). Bakteri içine giren antibiyotiğın hücre dışına pompalanmasıyla ilgili, Gram negatif bakterilerde antibiyotik direncine katkıda bulunan aktif pompalama sisteminden söz edilmektedir (85). Bu mekanizmanın karakteristik örneği *P. aeruginosa*'da tanımlanmış MexA-MexB-OprM dışarı-atma pompa sistemidir (5, 85). Bu mekanizmadaki MexB proteini sitoplazmik membran içindeki yer alan bir pompa, OprM dış duvarda por oluşturan bir protein ve MexA ise bu iki komponenti birbirine bağlayan proteini ifade etmektedir (5).

2.3.4. Beta Laktamaz Üretimi

Özellikle Gram negatif bakterilerde beta laktam grubu antibiyotiklere karşı gelişen dirençte en önemli mekanizma beta laktamaz yapımıdır (5). Bu enzimler beta laktam halkasındaki siklik amid bağımlı hidrolize uğratarak, beta laktamların etkinliğini ortadan kaldırır. Beta laktamazlar plazmid ve kromozom tarafından kodlanırlar (5, 83, 85). Gram negatif bakteriler tarafından periplazmik aralık içine, Gram pozitif bakterilerce ise hücre dışına salgılanırlar. Gram negatif bakterilerin salgıladığı enzim miktarca az fakat yüksek bir konsantrasyona sahip olduğu için, Gram pozitif bakterilerin fazla miktarda salgıladığı beta laktamaz enzimine kıyasla daha fazla etkinlik gösterir (5). Bakterilerin antibiyotik tarafından etkilenen hedef yapısında bir değişiklik meydana gelmezken, antibiyotiğın yapısında meydana gelen değişiklik, bakterinin etkilenmesini önler (17).

2.4. Beta Laktamazlar

Beta laktamaz üretimi ile gelişen beta laktam antibiyotiklere dirence Gram negatiflerde sıklıkla karşılaşılmaktadır (5, 85). Bu güne kadar karakterize edilmiş beta laktamazların isimlendirilmesinde farklı uygulamalar mevcuttur. Örneğin isimlendirmeler, bazı enzimleri inaktive ettikleri antibiyotiklere göre, bazılarının ise biyokimyasal özelliklerine göre yapılabilmektedir. Günümüzde ise isimlendirmeler aynı enzimden köken alanların numaralandırılması (TEM 1, SHV 1 gibi) şeklinde uygulanmaktadır (37, 76).

Beta laktamazlar farklı şekillerde sınıflandırılırlar. Aşağıda günümüzde en yaygın kullanılan Ambler tarafından yapılan moleküler sınıflandırma ve Bush-Jacoby ve Medeiros tarafından yapılan fonksiyonel sınıflandırma verilmiştir (39, 64).

2.4.1. Ambler Moleküler Sınıflandırma

Beta laktamazların Ambler tarafından yapılan şemasında, amino asit benzerlikleri ve fenotipik özellikleri esas alınmıştır. Dört gruba ayrılan klasifikasyon şemasında A, C, D grubunda serin beta laktamazlar ve B grubunda ise metallo beta laktamazlar bulunur (37, 39, 64).

A sınıfı enzimler çoğunlukla plazmid kontrolünde olan penisilinazlardan oluşurlar (37).

B sınıfı enzimler çoğunlukla karbapenem grubu antibiyotiklere karşı etkilerini gösterirler (37). Bunlar metallo beta laktamazlardır (16, 64).

C sınıfı enzimler çoğunlukla kromozom kontrolündeki sefalosporinazdır (37).

D sınıfı enzimler grubunda oksasilini hidrolize eden serin beta laktamazlar bulunur (37).

2.4.2. Bush-Jacoby ve Medeiros Fonksiyonel Sınıflandırma

Bush –Jacoby ve Medeiros sınıflandırılmasında beta laktamazlar fonksiyonel olarak kullandıkları beta laktam substratı ve etkilendikleri beta laktam inhibitörleri temel alınmıştır (16, 37, 39, 64). Beta laktamazların en yeni sınıflandırma şemasıdır (16).

Grup 1 enzimler, moleküler sınıf C'ye ait sefalosporinazlardır (16, 47, 83). Kloksasilin ve aztreonam ile inhibe olmalarına rağmen, klavulanik asitten (47) ve sulbaktamdan etkilenmezler (83). Sefamisinlere sefoksitin gibi aktiftirler ve aztreonama yüksek derecede duyarlıdırlar (47). Benzilpenisilinlere kıyasla sefalosporinlere daha aktiftirler (16). AmpC ve MIR-1 beta laktamazları da bu grupta yer almaktadır (37, 83).

1e: Grup 1'deki enzimlerin aminoasit dizilimlerindeki eklemeler veya çıkarmalar sonucunda yeni bir alt grup oluşmuştur. Bu grupta seftazidim ve diğer oksiiimino sefalosporinlere karşı daha fazla hidrolitik aktivite şekillenmiştir (16, 47).

Grup 2 enzimler, penisilinazlar, sefalosporinazlar, geniş spektrumlu beta laktamazlar ve serin karbapenemazlardan oluşur. Genellikle klavulanik asit ile inhibe olurlar (47). Ambler sınıflandırmada grup A ve D'de yer alırlar ve moleküler sınıfta en geniş grubu oluştururlar (16). Substrat profillerindeki farklılık nedeniyle alt gruplara ayrılmıştır (83).

2a: Bu enzimler birçok penisilin türevlerini (83) ve benzilpenisilinleri hidrolize edebilirler (16, 47). Benzilpenisilin ve ampisiline kıyasla % 10 oranında sefalosporinleri (47), karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize edebilirler. Klavulanik asit ve tazobaktam ile inhibe olurlar. PC 1 örnek olarak verilebilir (16, 47).

2b: Penisilinleri ve sefaloridin ve sefalotin gibi ilk sefalosporinleri kolaylıkla hidrolize ederler. Tazobaktam ve klavulanik aside çok duyarlıdırlar (16, 47). Plazmid kontrolündeki TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimlerini içerirler (16, 47, 83).

2be: 2b grubundan türemişlerdir (47, 64). Seftazidim, sefotaksim veya aztreonam gibi oksiiimino beta laktamları hidrolize ederler. Klavulanik asit tarafından inhibisyona uğramaları (16, 47, 64, 83) ve bu özelliklerinin laboratuvarında kullanılması karakteristik özellikleridir (16).

2br: Klavulanik asite direnç kazanmışlardır (16, 47, 83). Bu alt grup inhibitör dirençli TEM (ITR)'lerden oluşur (47). TEM-30'dan TEM-36'ya kadar olan TEM enzimleri ile TRC-1 enzimleri bu grupta yer alır (83).

2ber: Oksiiimino sefalosporinler ve klavulanik aside dirençli TEM enzimlerini içerir. Bu alt grup kompleks mutant TEM (CMT) olarak adlandırılmaktadır (16, 47). TEM-50 (16, 47), TEM-68, TEM-89 bu gruba dahil enzimlerdir (47).

2c: Bu penisilinazların benzilpenisilinin % 60' ı kadar karbenisilin ve tikarsilini ve benzilpenisilinin % 50' si kadar oksasilin ve kloksasilini hidroliz edebilme fonksiyonu vardır (16, 47). PSE-1, PSE-3, PSE-4 beta laktamazlar bu gruptadır (37, 83).

2ce: Son zamanlarda tanımlanmış genişlemiş spektrumlu karbenisillinaz RTG-4 (CARB-10) ile sefepim ve sefpiroma karşı genişlemiş aktiviteye sahip enzimleri içerir (16).

2d: Bu gruptaki enzimler, kloksasilin veya oksasilini benzilpenisilline kıyasla % 50 oranında daha fazla oranda hidrolize edebilme yeteneğinde olmaları sebebiyle OXA enzimleri olarak isimlendirilmişlerdir (16, 47). Klavulanik asit ve sulbaktama dirençli enzimlerdir (83). Bu gruptaki beta laktamazların büyük bölümü sodyum klorür ile inhibe olur. OXA beta laktamaz enzimlerinin ikinci büyük ailesini oluştururlar (16).

2de: Bu yeni alt gruptaki beta laktamazlar, kloksasilin, oksasilini ve oksimino beta laktamları hidrolize edebilir fakat karbapenemleri hidrolize edemez. Seftazidime karşı direnç genellikle sefotaksim veya aztreonama dirençten daha belirgindir (16, 47). Bunlar Türkiye ve Fransa'daki *P. aeruginosa* izolatlarında rapor edilmiştir (16).

2df: Karbapenemleri hidrolize eden OXA enzimleridir (16, 47). Bu enzimler klavulanik asit ile inhibe olmazlar (47). 2d enzimlerinin kloksasilin ve oksasilini hidrolize etme yetenekleri tanımlanmıştır. Bu özellik 2df alt grubunda çok az test edilmiştir. Bu testlerde sadece OXA-50 oksasilini hidrolize etmiştir (16).

2e: Bu alt grup sefalosporinazlar genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri hidrolize etme yeteneğindedir. Klavulanik asit ya da tazobaktam tarafından inhibe edilmektedirler (16). Penisilinlere karşı hidrolitik aktiviteleri zayıftır (47). Bu enzimlerin AmpC enzimlerinden farkı aztreonama karşı zayıf affinite göstermeleridir (16, 47).

2f: Moleküler sınıf A'da yer almaktadır. Karbapenemleri hidroliz edebilen grup, klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (16, 47, 83). Tazobaktam ile klavulanik aside kıyasla daha zayıf bir hidroliz görülmektedir (16). Bu grupta, *Serratia marcescens*'in Sme-1, *Enterobacter cloacae*'nın kromozomal NMC-A enzimi (16, 37, 83) ve *E. cloacae*'nın indüklenebilen IMI-1 enzimi yer almaktadır (16, 83).

Grup 3 enzimler, aktif bölgelerinde serin grubu yerine çinko bulunur. Moleküler sınıflandırmada B sınıfında yer alırlar (16, 83). Tazobaktamın yanı sıra

klavulanik asit tarafından da inhibe olmazlar (16, 83). Bu enzimler EDTA ile inhibe olurlar. Monobaktamlar hariç tüm beta laktamları hidrolize edebilirler ve metallo beta laktamazlar olarak da isimlendirilirler (16, 83).

3a: IMP ve VIM enzimlerinin dahil olduğu bu grup plazmidler tarafından kodlanan büyük metallo beta laktamaz ailelerini içerirler (16, 47). Bu enzimlerin hidrolitik aktivitelerinde iki çinko atomu gereklidir (47). Monobaktamları hidroliz edememelerine rağmen karbapenem, penisilin ve sefalosporinleri yüksek oranda hidroliz edebilirler (16).

3b: Bu metallo beta laktamaz grubunda ise penisilin ve sefalosporinlerin aksine karbapenemlere yönelik tercihli hidroliz söz konusudur (16, 47). Bu enzimlerin hidrolitik aktivitelerinde bir çinko atomu gereklidir (47).

Grup 4 enzimler, henüz tam olarak karakterize edilmiş ve moleküler sınıfı belirlenmemiştir (16, 83). Klavulanik asit ile inhibe olmayan penisilinazlar bu grupta yer alır. Örnek olarak *E. coli*'nin plazmid kontrolündeki SA-2 beta laktamazı verilebilir (83).

2.5. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL)

Üçüncü kuşak sefalosporinlerin 1980'lerde kullanıma girmesinden hemen sonra bakterilerin daha önceleri hiç tanımlanmamış beta laktamazlar üretmeye başladıkları bildirilmiştir. İlk olarak 1983 yılında Almanya'da *Klebsiella ozaenae* izolatında SHV-2 olarak isimlendirilen GSBL tanımlanmıştır. Tanımlanan yeni beta laktamazın başta oksimino-sefalosporinler olmak üzere çok sayıda geniş spektrumlu beta laktam antibiyotiğe direnç gelişmesine neden olduğu gözlenmiştir. Bu enzimler "Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL)" olarak isimlendirilmişlerdir (64, 68).

Beta laktamaz sınıflandırmada Amblerin moleküler sınıf A ve D'sinde, Bush-Jacoby fonksiyonel sınıf 2be, 2e ve 2d grubunda bulunurlar. Etki spektrumları oksimino- beta laktamları da kapsamı sebebiyle bu ismi almışlardır (25). GSBL'lar penisilinleri, 3. ve 4. kuşak sefalosporinleri ve aztreonamı hidrolize etme özelliğine sahiptirler (15). Sefamisinleri (örneğin, sefoksitin ve sefotetan), karbapenemleri (örneğin, imipenem, meropenem, ve ertapenem) ve beta laktamaz inhibitörlerini hidrolize edemezler (25, 64, 68).

Aşağıda GSBL tiplerine kısa bilgiler verilmeye çalışılmıştır. Bilinen GSBL tipleri ve sayılarına ilişkin en güncel verilere ulaşmak için '<http://www.lahey.org/studies/webt.html>' web adresinden yararlanılabilir (46).

2.5.1. SHV Grubu GSBL'lar

SHV-1 penisilinlere, sefalotin ve sefaloridin gibi dar spektrumlu sefalosporinlere karşı aktivitesi olan bir beta laktamazdır (39). SHV grubu GSBL'ların öncüsü SHV-1'dir. Oksimino sefalosporinlere plazmid aracılı direnç ilk olarak *Klebsiella pneumoniae*, *K. ozaenae* ve *S. marcescens* izolatlarında 1983 yılında görülmüştür. Bunlardan SHV-1'in amino asit sekansında 238. pozisyonundaki glisin yerine serin aminoasidi geçmesiyle SHV-2 meydana gelmiştir. Yine SHV-1'den 240. pozisyonundaki glutamik asit yerine lizin aminoasidi geçmesiyle SHV-5 türemiştir. SHV-2 sefotaksime hidrolitik aktivite gösterirken, SHV-5 ise seftazidimi karşı daha etkilidir (4, 15, 25, 39). SHV tipi enzimlerden olan SHV-10 inhibitör dirençliliği özelliği taşımaktadır (4, 15). SHV ismi sülfhidril değişkenini ifade eder (64). Bugün itibari ile karakterize edilmiş SHV tipi beta laktamaz sayısı 193 adettir (46).

2.5.2. TEM Grubu GSBL'lar

TEM-1 ilk kez 1965 yılında Yunanistan'da bir hastadan izole edilen *E. coli* izolatından rapor edilmiştir ve hastanenin ismine (Temoneira) istinaden TEM olarak adlandırılmıştır (39, 64). Bu grubu birbirlerine çok benzer yapıdaki TEM-1 ve TEM-2 enzimleri temsil eder ve bunlardaki aminoasit değişiklikleri ile diğer TEM tipi beta laktamazlar türemiştir. TEM-1 ve TEM-2 enzimleri GSBL karakterinde değildir. Bu enzimler penisilin ve 1. kuşak sefalosporin direncine neden olurlar. TEM tipi GSBL'lar sıklıkla *E. coli* ve *K. pneumoniae* bakterilerinden izole edilmesine rağmen diğer Gram negatif bakterilerde de bulunmaktadır (4, 15, 25, 64). TEM-3 1989 yılında GSBL fenotipinde tanımlanmış ilk TEM grubu enzimdir (15).

Bazı TEM tipi beta laktamazlar, beta laktamaz inhibitörlerine azalmış afinite gösterdikleri için inhibitör-resistant TEM tipi beta laktamazlar olarak tanımlanmaktadır. TEM-30, TEM-31, TEM-32, TEM-33, TEM-34, TEM-35, TEM-36, TEM-37, TEM-38, TEM-39, TEM-40, TEM-41, TEM-44, TEM-45, TEM-

51, TEM-59, TEM-65, TEM-73, TEM-74, TEM-76, TEM-77, TEM-78, TEM-79, TEM-80 ve TEM-103 inhibitör resistant TEM tipi beta laktamazlardır (15, 46).

Bugün itibari ile karakterize edilmiş TEM tipi beta laktamaz sayısı 223 adettir (46).

2.5.3. CTX-M ve Toho Grubu GSBL'lar

İlk olarak Almanya'da 1989'da TEM ve SHV tipi GSBL'lardan farklı, sefotaksime seftazidime oranla daha dirençli olan ve beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı yeni bir GSBL belirlenmiş ve CTX-M-1 olarak adlandırılmıştır (10). Zamanla CTX-M ailesi tüm dünyada Enterobacteriaceae ailesi başta olmak üzere farklı bakteri türleri arasında, hızla yayılan ve büyüyen bir GSBL enzim grubu haline gelmiştir. CTX-M tipi beta laktamazlar, TEM ve SHV tipi beta laktamazlardan köken almazlar ve TEM ve SHV tipi beta laktamazlar ile % 40'dan daha az bir aminoasit benzerliği gösterirler. CTX-M tipi GSBL'lar ortaya çıkışı, çevresel bir bakteri olan *Kluyvera* spp.'nin kromozomunda bulunan beta laktamaz geninin, mobil bir genetik element vasıtasıyla transferi ile gerçekleşmiştir. Bu enzimler, her biri çok sayıda tip içeren CTX-M-grup 1, grup 2, grup 8, grup 9 ve grup 25 olarak adlandırılmış 5 gruptan oluşmaktadır. Aynı gruptan enzimler arasındaki aminoasit benzerliği % 94'den fazla, ancak farklı gruplardan enzimler arasındaki benzerlik % 90 ve daha azdır. (12, 15, 39, 54, 64). Bugün itibari ile karakterize edilmiş CTX-M tipi beta laktamaz sayısı 172 adettir (46).

Toho tipi GSBL'lar ilk olarak Japonya'da tanımlanmıştır (12). Toho-1 ve Toho-2 tip beta laktamazlar yapısal olarak CTX-M tip beta laktamazlara benzerler. Bu enzimler sefotaksimi seftazidime oranla daha fazla hidrolize ederler (12, 64).

2.5.4. OXA Grubu GSBL'lar

İsimlerini oksasiline yüksek afinite göstermeleri sebebiyle almışlardır (4, 25). İlk OXA tipi beta laktamaz, Ankara'daki bir hastaneden izole edilen *P. aeruginosa* suşunda keşfedilmiştir (58). OXA grubu beta laktamazlar moleküler sınıf D, fonksiyonel grup 2d'de yer alırlar (25, 39). Bu enzimlerin beta laktamaz inhibitörleri tarafından inhibisyona uğramaları değişkendir (39). Kloksasilin ve oksasilini

benzilpenisilinden % 50 daha iyi hidrolize ederler. OXA-10 ve deriveleri (OXA-11, OXA-14, OXA-16, OXA-17), OXA-13 ve deriveleri (OXA-19, OXA-32) ve bazı OXA enzimleri (OXA-18, OXA-45) oksiiimino sefalosporinlere karşı yüksek derecede aktivite gösterirler ve bu enzimler *P. aeruginosa* izolatlarından tespit edilen OXA tipi GSBL'lardır (39).

2.5.5. PER Grubu GSBL'lar

PER-1 enzimi ilk olarak Fransa'da *P. aeruginosa* suşunda bir Türk hastadan izole edilmiştir (15, 25). TEM ve SHV tip GSBL'lara % 25 ile % 27 oranında benzerlik gösterilirler. PER-1 enzimi sefalosporinleri ve penisilinleri hidrolize ederken klavulanik asit tarafından inhibe olurlar. PER tipi GSBL'lar sefamisin ve karbapenemleri inaktive edemezler (15, 25, 64). Şu ana kadar 8 PER tipi beta laktamaz varlığı ortaya çıkarılmıştır (46).

2.5.6. VEB Grubu GSBL'lar

VEB-1 geni ilk olarak Fransa'da 1996 yılında Vietnamlı bir hastadan tek bir *E. coli* izolatında belirlenmiştir (15, 25, 58, 64). Ancak daha sonra *P. aeruginosa* izolatında Tayland'lı bir hastada da bulunmuştur (15, 64). PER-1 ve PER-2 enzimleriyle % 38 oranında benzerlik gösteren VEB-1 seftadizim, sefotaksim ve aztreonama yüksek direnç gösterir (25, 58, 64). Klavulanik asit, tazobaktam ve sulbaktam ile iyi inhibe olur. Penisilinlere karşı hidrolitik aktiviteleri düşük iken seftazidim dışındaki geniş spektrumlu sefalosporinlere genel olarak çok yüksektir (58). Şu ana kadar 16 adet VEB tipi beta laktamaz tanımlanmıştır (46).

2.5.7. Diğer GSBL Grupları

GES, BES, TLA, SFO ve BEL diğer GSBL'lar olarak sayılabilmektedir (32, 64).

GES-1 ilk olarak Fransa'da (Fransız Guyanası) *K. pneumoniae* izolatından neonatal bir hastada bildirilmiştir (25, 39, 58). Sefamisin ve karbapenemleri hidrolize edemez fakat penisilinlere ve geniş spektrumlu sefalosporinlere aktivite gösterir. Beta

laktam inhibitörleriyle inhibe olur. Bu enzimatik özellikleriyle fonksiyonel sınıf A'ya dahil edilir ve GES-1 bir GSBL olarak tanımlanır (39, 58). Çoğu GSBL'in aksine, GES-1 aztreonamı hidrolize edemez (58). GES-2, GES-1'den 170. amino asitin değişmesiyle meydana gelir. GES-2'nin oksimino sefalosporinlere karşı aktivitesi azalmışken (39), imipenem karşı artmıştır (39, 58). Buna ek olarak beta laktamaz inhibitörlerinden az etkilenir. Diğer GES türevlerinden GES-4, GES-3 ile karşılaştırıldığında, karbapenemleri hidrolize edebilir ve beta laktamaz inhibitörleri tarafından zayıf inhibe edilir (39). Bundan başka, GES-4'ün sefamisine karşı hidrolitik aktivitesi vardır (39, 58).

BES-1 ilk defa 1996 yılında Brezilya'da *Serratia* şuşundan izole edilmiştir. Sefotaksime seftazidimden daha dirençlidir. Aztreonam'a ise; seftazidimden 1000 kat daha dirençli bir enzimdir. Sefotaksime, CTX-M ile benzer bir affinite gösterir. BES-1 fonksiyonel grup 2be içinde yer alır. Tazobaktamın inhibisyonu zayıf fakat klavulanik asitin iyidir (58).

TLA-1 Meksika'da *E. coli* izolatında 1993 yılında tespit edilmiştir. TLA-1 beta laktamaz geniş spektrumlu sefalosporinleri (sefotaksim, seftazidim ve sefepim dahil) hidrolize eder ancak imipenem ve sefoksitin üzerine aktivite gösteremez. Tazobaktam, klavulanik asit ve sulbaktam tarafından inhibe edilebilmektedir. VEB ve PER enzimleri ile % 40 homoloji gösterir. TLA-2, Almanya'da 2002 yılında tanımlanmıştır. TLA-2 çoğu sefalosporine karşı etkisi mevcuttur fakat penisilinlere karşı etkisi zayıftır. Beta laktamaz inhibitörlerine ise duyarlıdır (58).

SFO-1'nin varlığı ilk olarak *E. cloacae* izolatında Japonya'da 1988 yılında belirtilmiştir. SFO-1 seftazidimi zayıf, sefotaksimi oldukça iyi hidrolize edebilmektedir (58). Diğer taraftan, klavulanik asit ile inhibe olmaktadır (15, 58).

Bel-1 ilk olarak *P. aeruginosa* izolatında Belçika'da 2004 yılında tespit edilmiştir. Amino asit benzerliği GES-1 ile % 50, CTX-M grup 8 ile % 40 ve BES-1 ile % 36 oranındadır ve Ambler sınıf A'da yer alır. Tazobaktam ile zayıf inhibe olmasına karşın klavulanik asit tarafından iyi inhibe edilir (58).

2.6. GSBL Tanı Yöntemleri

GSBL tanı yöntemleri, fenotipik ve genotipik olarak yapılmaktadır.

2.6.1. Fenotipik Testler

Fenotipik yöntemler tarama testleri ve doğrulama testleri olarak incelenebilir (25, 39, 60, 64).

GSBL Tarama Testleri

Tarama amacıyla disk difüzyon (25, 39, 60, 64) veya sıvı mikrodilüsyon testleri uygulanır (25, 39, 64). Testlerin sonucunda Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) verilerine göre Tablo 2.1.'da belirtilen inhibisyon zonu veya minimal inhibitör konsantrasyonu (MİK) değerleri ile karşılaştırıp dirençli olduklarına karar verildiğinde doğrulama testlerine geçilir (25, 39, 60, 64).

Tablo 2.1. GSBL'ler için tarama testi olarak önerilen inhibisyon zonu ve MİK değerleri (23, 25).

Antibiyotik	İnhibisyon zonu (mm)	MİK (µg/ml)
Sefotaksim (30 µg)	≤ 27	≥ 2
Seftriakson (30 µg)	≤ 25	≥ 2
Seftazidim (30 µg)	≤ 22	≥ 2
Sefpodoksim (10 µg)	≤ 17	≥ 8
Aztreonam (30 µg)	≤ 27	≥ 2

GSBL Doğrulama Testleri

Tarama testleri sonucunda çıkan sonucun doğrulanması amacıyla, GSBL'ların beta laktamaz inhibitörlerine duyarlı olma özelliğinden faydalanılarak doğrulama testleri uygulanır (25, 39, 64). Sık olarak kullanılan yöntemler, kombine disk yöntemi, çift disk sinerji yöntemi, E test yöntemi, mikrodilüsyon yöntemi, üç boyutlu test ve otomotize sistemler olarak sıralanabilir (25).

Kombine disk yönteminde, Mueller-Hinton agara (MHA) Mc Farland 0.5 standardında hazırlanmış bakteri süspansiyonu yayılır. İlave olarak 10 µg klavulanik asit içeren ve içermeyen 30 µg sefotaksim ve 30 µg seftazidim diskleri agar yüzeyine

yerleştirilir. Petriler 35 °C’de 18-24 saat inkübe edilir. Klavulanik asit içeren diskin etrafındaki zon çapı klavulanik asit içermeyen disklerlerdeki zon çapından 5 mm ve daha fazla olursa izolatin GSBL ürettiği kabul edilir (25, 39, 60, 64).

Çift disk sinerji yönteminde, 0,5 Mc Farland standardında hazırlanmış bakteri süspansiyonunun yayıldığı MHA’lı petri kutusunun ortasına amoksisilin-klavulanik asit diski (30/10 µg), diskin etrafına ise 30 mm uzaklıkta üçüncü kuşak sefalosporinler ve aztreonam diskleri yerleştirilir. Petriler 35 °C’de 18 saat inkübe edilir (25, 39, 60, 64). Çevreye yerleştirilmiş antibiyotik disklerinin inhibisyon zonlarının, merkezdeki amoksisilin-klavulanik asitin inhibisyon zonuna doğru genişlemesi veya arada bakterinin üremediği bir alanın oluşması, GSBL üretimi için bir kanıt olarak kabul edilir (25, 64).

E-test yöntemi, bir ucunda seftazidim (0.5-32 µg/ml) diğer ucunda seftazidim-klavulanik asit (0.064-4 µg/ml) ve yine bir ucunda sefotaksim (0.25-16 µg/ml) diğer ucunda sefotaksim-klavulanik asit (0.016-1 µg/ml) içeren 2 adet ticari test stripleri ile yapılır. MHA’a 0.5 McFarland standardına uygun hazırlanan bakteri süspansiyonları ekilir. E-test şeritleri agar yüzeyine yerleştirildikten sonra 35°C’de 18-24 saat inkübasyona bırakılır. İnkübasyondan sonra eliptik inhibisyon zonunun stripti kestiği değer, MİK değeri olarak kaydedilir. Klavulanik asitle kombinasyonu olan tarafta ölçülen MİK değeri klavulanik asitsiz taraftakinden 8 kat veya daha fazla küçükse GSBL pozitif kabul edilir (25, 39, 60, 64).

Mikrodilüsyon yönteminde, klavulanik asit ile beraber ya da tek olarak üçüncü kuşak sefalosporinlerin MİK değerleri saptanır. Klavulanik asit varlığında ölçülen MİK değerlerinde $\geq 3 \log_2$ (8 kat) azalma GSBL varlığı olarak kabul edilir (25, 60, 64).

Üç boyutlu test yönteminde, agar yüzeyine disk difüzyon testine benzer şekilde hazırlanmış test edilecek mikroorganizma yayılır. Buna ek olarak, agarın kenarından steril bir bistüri ile dairesel bir yarık kesilir. Test mikroorganizması (10^9 - 10^{10} CFU hücre) yarık içine pipetle konur. Beta laktam emdirilmiş diskler daha sonra agarın yüzeyine test mikroorganizması ekilmiş dairesel yarıktan 30 mm dışa yerleştirilir. Yarığa bakan taraftaki inhibisyon zonlarında bozulma ve daralmalar GSBL pozitif olarak değerlendirilir. Testin dezavantajları, inhibisyon bölgeleri azsa veya yoksa ek bir dolaylı teste ihtiyaç duyulmasıdır (60, 64). Bu testin alternatifi olan indirekt testte

ise, agarın yüzeyine *E. coli* ATCC 25922 gibi tamamen duyarlı bir suş ekilir ve daha sonra agarın dairesel yarığına test mikroorganizmasının süspansiyonunun ekilmesiyle gerçekleştirilir (64).

Yukarıda anlatılan yöntemler dışında GSBL varlığını saptamak için bazı otomatize sistemler kullanılmaktadır. Bunlara VİTEK-2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) ve Phoenix (Becton Dickinson, Sparks, MD, ABD) örnek gösterilebilir. Bu sistemlerde çeşitli kurallar dahilinde bütün penisilinler, geniş spektrumlu sefalosporinler ve azteonama dirençlilik rapor edilir (25, 39, 60).

2.6.2. Genotipik Testler

GSBL'ların belirlenmesinde kullanılan genotipik metotların fenotipik metotlara üstünlüğü GSBL varyantını da belirliyor olmasıdır. Fenotipik testlerle sadece GSBL varlığını belirlemek mümkün olabilmektedir (15, 25, 60).

İzoelektrik odaklama yöntemi ile enzim tiplerinin özgül izoelektrik noktaları belirlenmekte ve GSBL'in hangi gruba ait olduğu tahmin edilebilmektedir. Bu metot genotipik belirlemede uygulanan ilk metottur ancak günümüzde benzer izoelektrik noktalı enzimlerin sayısı fazla olduğu için, özdeş izoelektrik noktasına sahip enzimleri birbirinden ayırt etmek bu metot ile mümkün olamamaktadır (15, 25).

DNA probları ile hibridizasyon metotunda sıkı hibridizasyon koşulları altında, nokta mutasyonları tespit etmek için geliştirilmiş oligonükleotid proplar kullanılmış ve bazı beta laktamazların identifikasyonu yapılabilmektedir (15).

Günümüzde bir enzim ailesine ait beta laktamazların varlığını tayin etmek için en sık kullanılan moleküler yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'dur. Bu yöntemle enzimin bağlı olduğu aile saptanabilmektedir. Fakat enzim varyantları arasındaki ayırım için PZR yetersiz kalmaktadır. PZR'nu takiben nükleotid dizi analizinin yapılması ile nükleotid değişiklikleri dolayısıyla aminoasit değişiklikleri belirlenmekte ve böylelikle GSBL varyantı ortaya çıkarılabilmektedir. Bu nedenle PZR-nükleotid dizi analizi halen altın standart olarak kabul edilmektedir (15, 25).

2.7. GSBL Epidemiyolojisi

2.7.1 Dünyadaki Durum

Dünyanın çeşitli bölgelerinde evcil hayvanların GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı üzerine yapılmış çalışma mevcuttur. Elde edilen sonuçların birbirinden farklı oldukları görülmektedir. Sağlıklı ve ishallerde kedi ve köpeklerde karşılaştırmalı yapılan Hollanda'daki bir araştırmada sağlıklı kedilerde % 0, ishallerde kedilerde % 25, sağlıklı köpeklerde % 45 ve ishallerde köpeklerde % 55 GSBL/AmpC üreten Enterobacteriaceae oranları bulunmuştur (44). İran'da koyun dışkılarından izole edilmiş 55 adet *E. coli* izolatında yapılan GSBL taramasında 55 koyun izolatının 33 (% 60)'ünde GSBL üretimi tespit edilmiş ve 15 (% 27.2)'inin CTX-M geni, 10 (% 18.2)'unun TEM geni ve 8 (% 14.5)'inin ise CTX-M+TEM genlerini taşıdığı belirlenmiştir (2). Aynı çalışmada 56 broiler tavuk dışkısından izole edilmiş *E. coli* izolatlarının 32 (% 57.1)'sinin GSBL pozitif olduğu belirlenmiş ve bunların 17 (% 30.4)'sinin CTX-M geni, 6 (% 10.7)'sinin TEM ve 9 (% 16.1)'unun CTX-M+TEM genlerini taşıdığı belirlenmiştir (2). Aynı çalışmada test edilen *E. coli* izolatlarının hiçbirinde SHV genine rastlanmamıştır (2). İsviçre'de yapılan benzer bir araştırmada, koyunların dışkı örneklerinde % 8.6 oranında, tavuk dışkı örneklerinde ise % 63.4 oranında GSBL üreten *E. coli*'ye rastlanmıştır (34). Fransa'da yapılmış bir çalışmada, sağlıklı sığırların dışkı örneklerinin % 5.8'inde GSBL üreten *E. coli* varlığı rapor edilmiştir (55). Portekiz'de yapılmış çalışmada broiler tavuklardan toplanmış dışkı örneklerinin % 42.1'inde GSBL üreten *E. coli*'ye rastlanmıştır (24). Japonya'da yapılmış çalışmada ise GSBL üreten *E. coli* broiler tavuk rektal sıvıplarının % 60'undan, yumurta tavuklarının % 5.9'undan, sığırların % 12.5'inden ve domuzların % 3'ünden izole edilmiştir (41). Çek Cumhuriyeti'ndeki çalışmada hipodrom atlarında GSBL pozitif *E. coli* izolasyon oranı % 32 olarak tespit edilmiştir (27). İngiltere'de domuzlarda yapılan bir araştırmada, % 23.4 oranında bir prevalans bulunmuş ve tespit edilen GSBL üreten *E. coli* izolatlarının % 22'sinin CTX-M genlerini (CTX-M-1, -3, -14, -15, -27, -32 ve -55) ve % 2.2'sinin SHV-12'i taşıdığı tespit edilmiştir (70).

2.7.2 Türkiye'deki Durum

Türkiye'de çiftlik hayvanlarında yapılmış GSBL üreten *E. coli*'ye ilişkin çalışma sayısı azdır. Burdur bölgesindeki sığır, koyun ve yumurta tavuklarından toplanan dışkı örneklerinde yapılan çalışmada, GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı sığırlarda % 15.5, koyunlarda % 1.5 ve tavuklarda % 6.0 olarak tespit edilmiştir (65, 66). Bu çalışmadaki PZR sonuçlarına göre, tüm CTX-M tipi beta laktamaz genlerinin CTX-M grup 1'e ait olduğu ve dizi analizi sonuçlarına göre ise CTX-M-15 tipi GSBL'nin en yaygın olduğu belirlenmiştir. Çalışmadaki izolatlarda, belirlenen TEM genlerinin dizi analizinde, tümünün GSBL olarak kabul edilmeyen TEM-1 beta laktamaz olduğu görülmüştür. SHV geni yönünden ise, sığırlarda SHV-12 tipi GSBL üreten *E. coli*'ye rastlanırken, koyun ve tavuklarda SHV geni taşıyan *E. coli* izole edilmediği belirtilmiştir. (65, 66). Türkiye'de gen tip ve alt tiplerini belirlemeye yönelik diğer çalışmada ise Küçükbaşmacı ve ark. (52) tarafından iki mezbahadan (İstanbul ve Tekirdağ) toplanmış sığır ve koyun dışkılarında yapılmış olan çalışmada, *E. coli* suşlarında PZR ve sekans analizi sonucu bu suşların TEM-1 ve SHV (2'si SHV-5 ve 1'i SHV-12) genlerini taşıdıkları gösterilmiştir. Hatay ilinde yapılmış çalışmada ise GSBL üreten *E. coli* prevalansının sığırlarda % 8.3 olduğu belirtilmiştir (9).

Türkiye'de 2013 yılında atlardan toplanan dışkı örneklerinde GSBL üreten *E. coli* varlığı üzerine yapılan bir tez çalışmasında GSBL üreten *E. coli* prevalansı % 6 olarak tespit edilmiştir (61). Hayvansal gıdalarda Gündoğan ve Avcı (36) tarafından yapılan bir araştırmada GSBL üretimi *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* izolatlarında sırasıyla, % 44.4, % 38.5 ve % 26 olarak belirlenmiştir. Dinç ve ark. (26) tarafından yapılan diğer bir araştırmada ise GSBL üreten *E. coli*'ye rastlanmamıştır. Diğer taraftan Pehlivanoğlu ve ark. (67) bir sığır çiftliğindeki mastitis vakalarından GSBL üreten *E. coli* izole etmiştir.

Türkiye'de sığırlarda GSBL genlerinin yaygınlığının ve GSBL genlerinin çeşitliliğinin ortaya çıkarılması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır. Günümüz itibariyle yetişkin sığırlarda yapılmış birkaç çalışma mevcutken (9, 52, 65), bu çalışmalardan sadece Küçükbaşmacı ve ark. (52)'nin çalışması buzağuları da içermektedir ve bu çalışmada da GSBL üreten *E. coli*'ye rastlanmamıştır. Bu nedenle,

bu tez çalışmasında Burdur ilindeki sağlıklı buzağılardan toplanan dışkı örneklerinde GSBL üreten *E. coli* varlığının ve GSBL genlerinin belirlenmesi amaçlandı.



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Testlerde Kullanılan Besiyerleri

Brilliance™ *E. coli* / coliform Selective Agar (Oxoid, İngiltere)

Buffered Peptone Water (Lab M, İngiltere)

MacConkey Agar (Oxoid, İngiltere)

MR-VP Broth (BD, ABD)

Mueller-Hinton Agar (BD, ABD)

Simmons Citrate Agar (Oxoid, İngiltere)

Tryptone Soya Agar (Oxoid, İngiltere)

Tryptone Soya Broth (Oxoid, İngiltere)

E. coli izolatlarının identifikasyonu için üçlü tüp sisteminden yararlanıldı ve bu amaçla aşağıdaki besiyerleri hazırlanarak kullanıldı

Tüp I (Triple Sugar Iron Agar) (Merck, Almanya)

<u>Formül</u>	<u>gr/litre</u>
Pepton (kazeinden)	: 15.0
Peptone (etten)	: 5.0
Et ekstraktı	: 3.0
Maya ekstraktı	: 3.0
NaCl	: 5.0
Laktoz	: 10.0
Sükroz	: 10.0
D (+) glikoz	: 1.0
Amonyum demir (III) sitrat	: 0.5
Sodyum thiosülfat	: 0.5
Fenol kırmızısı (% 0,2'lik)	: 0.024
Agar	: 12.0
pH: 7.4 ± 0.2	

Tüp II (Mannitol-Mobilite besiyeri) (53)

<u>Formül:</u>	<u>gr/litre</u>
Pepton	: 5.0
Neopepton	: 5.0
Mannitol	: 2.0
Agar	: 2.5
Potasyum nitrat	: 1.7
Fenol kırmızısı (% 0.2'lik)	: 20.0 ml
pH: 7.2	

Tüp III (Üre-İndol besiyeri) (53)

<u>Formül:</u>	<u>gr/100 ml</u>
L-triptofan	: 0.3 gr
KH ₂ PO ₄	: 0.1 gr
K ₂ HPO ₄	: 0.1 gr
NaCl	: 0.5 gr
Üre	: 2.0 gr
Ethanol (% 95'lik)	: 1.0 ml
Fenol kırmızısı (% 0,2'lik)	: 1.25 ml
pH: 6.5	

3.2. Örneklemeye Metodu ve Örnek Sayısının Belirlenmesi

Çalışmaya dahil edilecek sağlıklı buzağı sayısı, tahmini prevalans % 10, güven aralığı % 95 ve hata payı % 5 alınarak, en az 138 olarak epidemiyolojik tablolardan yararlanılarak belirlendi (78). Ancak daha güvenilir sonuç elde etmek için, 150 hayvan örnek olarak seçildi.

Dışkı örneği toplanacak sağlıklı buzağular ve işletmeler tesadüfi örnekleme metoduna göre seçildi. Holştayn ırkı 6 aylık yaştan küçük buzağular Burdur iline bağlı 3 ilçeden (Bucak, Merkez ilçe ve Tefenni) ve her bir ilçeden 50 sağlıklı buzağı olacak

şekilde seçildi. Ziyaret edilen işletmelerin her birinden en az 2 en fazla 5 buzağıdan dışkı örneği toplandı. Dışkı örneği toplanan buzağuların yaşları (ay) kaydedildi.

Örneklerin alındığı merkezlerdeki işletme ve örnek sayıları Tablo 3.1.'de, örneklenen hayvanların yaş dağılımı Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.1. Buzağı dışkı örneklerinin alındığı merkezler ile işletme ve örnek sayısı.

İlçe-Köy	İşletme Sayısı	Örnek Sayısı
Bucak- Demirli	8	20
Bucak- Kavacık	6	18
Bucak- Kocaaliler	5	12
Merkez- Hacılar	3	13
Merkez- Suludere	4	19
Merkez- Yazıköy	5	18
Tefenni- Aşıklar	3	10
Tefenni- Esentepe	4	13
Tefenni- Hasanpaşa	3	14
Tefenni- Yaylaköy	3	13
TOPLAM	44	150

Tablo 3.1'e göre, toplam 150 adet örnek 44 farklı işletmeden alınmıştır.

Tablo 3.2. Merkezlere göre örneklenen hayvanların yaş (ay) dağılımları.

İlçe- Köy	0 - ≤ 2 ay	2 ay < - ≤ 4 ay	4 ay < - ≤ 6 ay
Bucak	20	15	15
Merkez	18	15	17
Tefenni	18	17	15
Toplam	56	47	47

3.3. Dışkı Örneklerinin Toplanması

Dışkı örnekleri, steril dışkı numunesi alma kapları içerisine her bir hayvan için ayrı eldiven kullanılarak direkt rektumdan alındı. Numuneler alımı takiben soğuk şartlarda 2 saat içerisinde laboratuvara nakledildi.

3.4. *E. coli* İçin Selektif İzolasyon ve İdentifikasyon

Selektif izolasyon için öncelikle 2 µg/ml sefotaksim ve 2 µg/ml seftazidim içeren besiyerleri ayrı ayrı hazırlandı. Bunun için ilk önce sefotaksim (Sigma, ABD) ve seftazidim (Sigma, ABD) antibiyotikleri ile, 1000 µg/ml konsantrasyonda 10'ar ml stok solüsyonlar hazırlandı. Temin edilen antibiyotiklerin, stok solüsyonları için ilave edilecek miktarları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (38).

$$\text{Tartılacak antibiyotik ağırlığı} = \frac{\text{Hacim (ml)} \times \text{İstenen Yoğunluk (µg/ml)}}{\text{Antibiyotik Test gücü (antibiotic assay potency) (µg/mg)}}$$

Antibiyotikleri üreten firmanın analiz sertifikasındaki test gücü (assay potency), sefotaksim için 964 µg/mg ve seftazidim için 983 µg/mg olduğu belirlendi.

$$\text{Sefotaksim için : } \frac{10 \text{ ml} \times 1000 \text{ µg/ml}}{964 \text{ µg/mg}} = 10.37 \text{ mg}$$

$$\text{Seftazidim için : } \frac{10 \text{ ml} \times 1000 \text{ µg/ml}}{983 \text{ µg/mg}} = 10.17 \text{ mg}$$

Sonuç olarak, 10.37 mg sefotaksim ve 10.17 mg seftazidim tartıldı ve 10'ar ml steril distile su içinde ozdrlerek antibiyotiklerin 1000 µg/ml stok solüsyonları hazırlandı.

Brilliance™ *E. coli* / koliform selektif besiyerinden 1 litre hazırlanıp otoklavlandı ve 50°C'ye kadar soğutulduktan sonra sefotaksim stok solüsyonundan 2 ml ilave edilip iyice karıştırıldı. Böylece 2 µg/ml yoğunluğunda sefotaksim içeren selektif besiyeri hazırlanmış oldu. Besiyeri petrilere dökülerek katılaşması sağlandı. Aynı işlem tekrarlanarak 2 µg/ml yoğunluğunda seftazidim içeren selektif besiyeri de hazırlandı.

Dışkı rneklerinin her birinden 1.0 gram alınıp daha önce hazırlanmış tamponlanmış peptonlu su ile dışkı örneklerinin % 10'luk süspansiyonları hazırlandı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Tamponlanmış peptonlu su içerisinde hazırlanan dışkı süspansiyonları vortekslendi ve her birinden 25'er µl alınarak petrilerdeki 2

$\mu\text{g/ml}$ seftazidim ve $2 \mu\text{g/ml}$ sefotaksim içeren Brilliance™ *E. coli* / koliform selektif besiyelerine öze ile yayılarak ekildi. Petriler 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. Petrilerde üreyen seftazidim ve sefotaksime dirençli mor renkli kolonilerden MacConkey Agar besiyerine pasajlar yapıldı ve 37°C 'de 24 saat inkübe edildi. MacConkey Agar besiyerinde üreyen pembe renkli laktoz pozitif koloniler Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerine pasajlandı ve 37°C 'de 24 saat inkübe edildi.

Elde edilen izolatların *E. coli* yönünden identifikasyonları yapıldı. İdentifikasyon amacıyla çabuk sonuca ulaşılabilen Norveç üçlü tüp sistemi (11, 53), sitrat testi, metil red testi, Voges-Proskauer testi, oksidaz testi ve katalaz testi kullanıldı.

3.4.1. Üçlü Tüp Yöntemi

Tüp 1, tüp 2 ve tüp 3 için besiyeri içerikleri yukarıda belirtilen miktarlarda hassas terazide tartıldıktan sonra, 1. ve 2. tüpteki besiyerleri otoklavlanarak, 3. tüpteki besiyeri ise tindalizasyon işlemine tabi tutularak hazırlandı. Tüp 1 eğik portakal kırmızısı renginde ve katı, tüp 2 kırmızı renkli ve yarı katı, tüp 3 ise sıvı ve açık sarı renklidir. Bu yöntem ile bakılabilen biyokimyasal testlerin değerlendirilmesi aşağıda özetlendi (Tablo 3.3). Tüp 1'e ekim için TSA besiyerinde üretilmiş kolonilerden sıvri uçlu öze ile alınıp besiyerine orta hattan girildi ve aynı hattan çıkıldı. Aynı zamanda besiyerinin eğik yüzeyine de ekim işlemi gerçekleştirildi. Tüp 2'ye ekimde koloniler tüp 1'de olduğu gibi sıvri uçlu öze ile alındı ve besiyerine orta hattan girildi ve aynı hattan çıkıldı. Tüp 3'e ekim için ise yuvarlak uçlu öze ile koloniden alındı ve sıvı besiyerine ekimleri gerçekleştirildi. Tablo 3.3'de üçlü tüp testi sonuçlarının değerlendirilmesi sunulmuştur.

Tablo 3.3 Norveç üçlü tüp sistemindeki biyokimyasal testlerin değerlendirilmesi (11).

Testler	Pozitif	Negatif
Tüp I.		
Glikoz (dip kısım)	Sarı renk	Portakal kırmızısı rengi
Laktoz (üst kısım)	Sarı renk	Portakal kırmızısı rengi
Gaz	Hava kabarcığı	Hava kabarcığı yok
H ₂ S	Siyah renk	Portakal kırmızısı rengi
Tüp II.		
Mannitol	Sarı renk	Kırmızı renk
Hareket	Homojen üreme	Ekim hattında üreme
Tüp III.		
Üre	Çingene pembesi renk	Açık sarı
İndol	Kovaks ayırıcı sonrası kırmızı halka	Kovaks ayırıcı sonrası halka yok

3.4.2. Sitrat Testi

Simmons citrate agar (Oxoid, İngiltere) besiyerinden 23 gram tartılıp 1 litre distile su içinde eritildi ve otoklavlandı. Ardından yaklaşık 50°C'ye kadar soğuması beklendi ve steril cam tüplere 4'er ml aktarıldı. Tüplerdeki soğuyan ve katılaştıran besiyerlerine, TSA besiyerinde üretilmiş *E. coli* kolonilerinden iğne uçlu öze ile alınıp orta hattan girildi ve aynı hattan çıkılarak ekim yapıldı. Cam tüpler 37°C'de 48 saat inkübe edildi. Yeşil renkli besiyerinin koyu maviye dönmesi mikroorganizmanın sitratı karbon kaynağı olarak kullandığını gösterdi ve sonuç sitrat (+) olarak değerlendirildi. Besiyerinin rengini koruması ise sitrat (-) olarak değerlendirildi (7).

3.4.3. Metil Red (MR) Testi

Metil red (MR) ve Voges-Proskauer (VP) testleri MR-VP Buyyon'da gerçekleştirildi. MR-VP Buyyon (BD, ABD) besiyerinden 4.25 gram tartılıp 250 ml distile su içinde eritildi ve otoklavlandı. Ardından steril cam tüplere 2'şer ml dağıtıldı. Cam tüplerde bulunan besiyerlerine, TSA besiyerinde pasajlanan izolatlardan ekimler

yapılıp, 37°C'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Ardında metil red solüsyonundan (Sigma-Aldrich, ABD) 2-3 damla kültürlerin üzerine eklendi. Rengin kırmızı-pembeye dönmesi besiyerinde bulunan glikozun fermente edilerek besiyeri pH'sının 4.4 ve altına düştüğünü ve testin pozitif olduğunu, sarı kalması ise pH'ın değişmediğini ve testin negatif olduğunu gösterdi (7, 11).

3.4.4. Voges-Proskauer (VP) Testi

MR testinde olduğu gibi VP testi de MR-VP Buyyon (BD, ABD)'da gerçekleştirildi. MR-VP besiyeri MR testindeki gibi hazırlandı ve izolatlar MR-VP sıvı besiyerine ekilip, 37°C'de 2 gün inkübasyona bırakıldı. Test için kullanılacak VP indikatörü (% 5'lik α -naphtol) ve % 40 KOH aşağıdaki formüllere göre hazırlandı. VP testi için, inkübasyon sonucunda besiyerine 0.6 ml % 5'lik α -naphtol solüsyonu ilave edildi ve karışım iyice çalkalandı. Ardından karışımın üzerine 0.2 ml % 40'luk KOH ilave edildi. Otuz dakika içerisinde tüplerde parlak kırmızı renk oluşması, bakterinin glikozu kullanarak asetil metil karbinol oluşturduğunu ve testin pozitif olduğunu gösterdi. Bir saatlik süre sonunda tüplerde şekillenen bakır rengi negatif sonuç olarak değerlendirildi (86).

VP indikatörü: 5 gr α -naphtol 100 ml etil alkol içerisinde eritilerek indikatör solüsyon hazırlandı.

% 40 KOH: 40 gr potasyum hidroksit 100 ml distile su içerisinde eritilerek % 40'luk KOH solüsyonu hazırlandı.

3.4.5. Oksidaz Testi

Steril Whatman filtre kağıdına % 1'lik tetrametil-p-fenilendiamin dihidroklorür (Sigma Aldrich, ABD) ayırıcı emdirildi. TSA besiyerindeki kolonilerden öze ile alınıp bu filtre kağıdının üzerine aktarıldı. Renk değişikliğinin 5-10 saniye içinde olmaması oksidaz (-), mavi-mor rengin oluşması oksidaz (+) olarak değerlendirildi (7).

3.4.6. Katalaz Testi

Katalaz testi *E. coli*'nin hidrojen peroksidi ayrıştırma katalaz enziminin saptanması amacıyla yapıldı. Temiz bir lam üzerine öze ile % 3'lük hidrojen peroksit (H_2O_2) alındı. TSA besiyerindeki kolonilerden öze ile alınıp hidrojen peroksit içerisinde dağıtıldı. Hava kabarcıklarının oluşması testin pozitif olduğunu gösterdi (7).

3.5. Doğrulama Testi (Kombine Disk Metodu)

İdentifikasyonları gerçekleştirilen *E. coli* izolatlarının GSBL üreten izolatlar olup olmadığının tespiti amacıyla Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)'nin önerdiği fenotipik doğrulama testi uygulandı (23). İlk önce Tryptic Soy Broth (TSB) içerisinde 0.5 McFarland'a göre *E. coli* izolatları süspansiyon edildi. Süspansiyon içerisinden steril sıvayla alınarak, daha önce hazırlanmış Mueller Hinton Agar (MHA) besiyerine, yüzeyinde boş yer kalmayacak şekilde yayılarak ekim yapıldı. Daha sonra agar yüzeyine seftaksim (30µg) (BD, ABD) ve seftaksim-klavulanik asit (30/10µg) (BD, ABD), seftazidim (30µg) (BD, ABD) ve seftazidim-klavulanik asit (30/10µg) (BD, ABD) diskleri yerleştirildi. Petripler $35 \pm 2^\circ C$ 'de 16-18 saat inkübe edildi.

Sefalosporin diskinin etrafında oluşan inhibisyon zon çapı, aynı sefalosporin antibiyotiklerinin klavulanik asit ile kombinasyonunu içeren diskin etrafında oluşan zonun çapından 5 mm ve daha fazla ise, bu izolat GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edildi (23).

3.6. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

GSBL üretimi doğrulanmış *E. coli* izolatlarının beta laktam antibiyotiklere olan duyarlılıkları agar disk difüzyon testi ile belirlendi (23). Bu amaçla, aztreonam (30 µg), sefpodoksim (10 µg), seftriakson (30 µg), sefoksitin (30 µg) ve seftiofur (30 µg) (Oxoid, İngiltere) diskleri kullanıldı. Test MHA'da gerçekleştirildi.

E. coli izolatlarından bir iki koloni öze ile alınıp steril 2 ml TSB içeren tüplerde 0.5 McFarland bulanıklığına göre süspansiyonlar hazırlandı. Bu bakteri süspansiyonlarından steril sıvayla yardımıyla MHA besiyerinin yüzeyine boş yer

kalmayacak şekilde ekimler yapıldı. Ardından test edilecek antibiyotik diskleri petrilere 3 cm aralıklar ile yerleştirildi ve petrilere 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkubasyonu takiben, antibiyotik disklerinin etrafında oluşan inhibisyon zon çapları ölçüldü ve CLSI'nin kriterlerine göre aşağıdaki gibi değerlendirildi: Aztreonam, sefpodoksim ve seftriakson inhibisyon zon çapları CLSI'nin GSBL tarama testi zon çapları kriterlerine göre değerlendirildi (23). Sefoksitin'in değerlendirilmesinde ise, CLSI tarafından yayınlanan Enterobacteriaceae familyası için standart zon çapları kullanıldı (21, 23) (Tablo 3.4).

Elde edilen GSBL üreten *E. coli* izolatlarının, diğer sınıf antibiyotiklere olan duyarlılıkları CLSI protokolüne göre agar disk difüzyon testi ile belirlendi (23). Bu amaçla, enrofloksasin (5 µg), florfenikol (30 µg), gentamisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg) ve sulfametoksazol - trimetoprim (23.75 + 1.25 µg) (Oxoid, İngiltere) diskleri kullanıldı. Gentamisin ve sulfametoksazol- trimetoprim değerlendirilmesinde, hayvan patojenleri için CLSI'nin güncellenmiş kritik zon çapları baz alındı (22). Enrofloksasin'in değerlendirilmesinde tavuk ve hindilerde *E. coli* için belirlenmiş olan zon çapları (20) ve tetrasiklin'in değerlendirilmesinde ise CLSI'nin 2010 yılı yayınında hayvan patojenleri için belirtilen zon çapları baz alındı (20). Florfenikol'ün değerlendirilmesinde, hayvan patojenleri *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* ve *Histophilus somni* için kabul edilmiş zon çapları baz alındı (22) (Tablo 3.4).

Tablo 3.4. İnhibisyon zon çaplarının değerlendirilmesinde kullanılan kritik zon çapları (20, 22, 23).

Test edilecek antibiyotikler	Disk içeriği (µg)	Dirençli ≤ mm	Orta duyarlı mm	Duyarlı ≥ mm
Aztreonam	30	27	-	-
Enrofloksasin	5	16	17-22	23
Florfenikol	30	14	15-18	19
Gentamisin	10	12	13-15	16
Tetrasiklin	30	14	15-18	19
Sefoksitin	30	14	15-17	18
Sefpodoksim	10	17	-	-
Seftiofur	30	14	18-20	21
Seftriakson	30	25	-	-
Sulfametoksazol-trimetoprim	25	10	11-15	16

3.7. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

3.7.1. DNA Ekstraksiyonu

TSA'da üretilmiş *E. coli* izolatlarının her birinin steril ultra saf su içinde süspansiyonları hazırlandı (McFarland 5.0) ve süspansiyonlar 99°C'de 15 dakika termal blokta tutuldu. Ardından süspansiyonlar 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip hücre partikülleri çöktürüldü. Üst sıvıdan 100 µl alınıp yeni ependorf tüplere aktarıldı. DNA örnekleri PZR'de kullanılmaya kadar -20°C'de saklandı.

3.7.2. GSBL Genlerinin PZR ile Araştırılması

DNA örneklerinin her biri, 16S rRNA (84), TEM (8, 40), SHV (40, 77) ve CTX-M (40, 71) genlerine spesifik primerler kullanılarak PZR ile test edildi (Tablo 3.5). CTX-M geninin belirlenmesi için önce universal primer (40, 71) kullanılarak CTX-M geni taşıyan izolatlar belirlendi. Ardından CTX-M genlerinin hangi alt gruptan olduğunu belirlemek için ilk önce CTX-M grup 1 primerleri ile PZR yapıldı (40, 49). CTX-M geni taşıyan izolatların hepsinin de CTX-M grup 1 alt geni taşıdığı

belirlenince diğer alt gruplara bakılmaya gerek görülmedi. PZR’da pozitif kontrol izolatları olarak, 16S rRNA geni için *E. coli* ATCC 25922, TEM geni için *E. coli* ATCC 35218 (TEM-1), SHV geni için *K. pneumoniae* ATCC 700603 (SHV-18), CTX-M üniversal ve CTX-M grup 1 PZR için *E. coli* NTCC 13461 izolatları kullanıldı. PZR reaksiyonlarında kullanılan hazır master mix, *Taq* DNA polimeraz enzimi, deoksiribonükleotid trifosfatlar ve buffer’lar Thermo Fisher Scientific Inc.’den temin edildi. Kullanılan primerlerin bilgileri Tablo 3.5’de sunuldu.

Tablo 3.5. PZR’da kullanılan primerler.

Gen	Primerler	Amplikon boyutu (baz çifti)
16S rRNA	F: 5’-CCC CCT GGA CGA AGA CTG AC-3’ R: 5’-ACC GCT GGC AAC AAA GGA TA-3’	401
TEM	F: 5’-GTA TCC GTC CAT GAG ACA ATA-3’ R: 5’-TCC AAA GTA TAT ATG AGT AAA C-3’	966
SHV	F: 5’-GCC GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC-3’ R: 5’-TCT TTC CGA TGC CGC CGC CAG TCA-3’	1007
CTX-M*	F: 5’-SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA-3’ R: 5’-CCG CRA TAT CRT TGG TGG TG-3’	543
CTX-M grup 1	F: 5’-CCC ATG GTT AAA AAA TCA CTG-3’ R: 5’-CCG TTT CCG CTA TTA CAA AC-3’	891

*S:G/C; Y:C/T; R:A/G

Yapılan PZR’larda kullanılan PZR koşulları aşağıda sunulmuştur:

E. coli 16S rRNA geni için spesifik PZR’da; PZR reaksiyonu 12.5 µl hazır master mix (0.05 U/µl *Taq* DNA polimeraz, reaksiyon buffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM her bir dNTP), 1 µl primer forward, 1 µl primer reverse, 7.5 µl ddH₂O ve 3 µl kalıp DNA ile oluşturuldu. Thermocycler (ATC 401-Apollo Instrumentation, İngiltere) programı ise 95°C’de 8 dakika süreyle başlangıç denatürasyonunu takiben 30 döngü olacak şekilde 95°C’de 30 saniye denatürasyon, 58°C’de 30 saniye primer bağlanma ve 72°C’de 30 saniye uzama safhalarından oluştu ve son olarak 72°C’de 7 dakikalık son uzama aşaması gerçekleştirildi (84).

TEM geni için spesifik PZR'da; PZR reaksiyonu 2.5 µl 10xKCl buffer, 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl forward primer (10 µM), 1 µl reverse primer (10 µM), 2.5 µl dNTP karışımı (2 mM her biri), 1.5 U (0.3 µl) Taq DNA polimeraz, 14 µl ddH₂O ve 2.5 µl kalıp DNA ile oluşturuldu. Thermocycler programı ise 94°C'de 5 dakika süreyle başlangıç denatürasyonunu takiben 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 48°C'de 1 dakika primer bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama safhalarından oluştu ve son olarak 72°C'de 10 dakikalık son uzama aşaması gerçekleştirildi (67).

SHV geni için spesifik PZR'da; PZR reaksiyonu 2.5 µl 10xKCl buffer, 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 1 µl forward primer (10 µM), 1 µl reverse primer (10 µM), 2.5 µl dNTP karışımı (2 mM her biri), 1.5 U (0.3 µl) Taq DNA polimeraz, 13.5 µl ddH₂O ve 3 µl kalıp DNA ile oluşturuldu. Thermocycler programı ise 94°C'de 5 dakika süreyle başlangıç denatürasyonunu takiben 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 58°C'de 30 saniye primer bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama safhalarından oluştu ve son olarak 72°C'de 7 dakikalık son uzama aşaması gerçekleştirildi (67).

CTX-M üniversal primerleri ile yapılan CTX-M geni belirlemeye yönelik PZR'da; PZR reaksiyonu 12.5 µl hazır master mix (0.05 U/µl Taq DNA polimeraz, reaksiyon buffer, 4 mM MgCl₂, 0.4 mM her bir dNTP), 0.5 µl forward primer, 0.5 µl reverse primer, 9 µl ddH₂O ve 2.5 µl kalıp DNA ile oluşturuldu. Thermocycler programı ise 94°C'de 5 dakika süreyle başlangıç denatürasyonunu takiben 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 30 saniye denatürasyon, 54°C'de 30 saniye primer bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama safhalarından oluştu ve son olarak 72°C'de 7 dakikalık son uzama aşaması gerçekleştirildi (67).

CTX-M grup 1 için spesifik PZR'da; PZR reaksiyonu 2.5 µl 10xKCl buffer, 1.5 µl MgCl₂ (25 mM), 0.5 µl forward primer (10 µM), 0.5 µl primer reverse (10 µM), 2.5 µl dNTP karışımı (2 mM herbiri), 1.5 U (0.3 µl) Taq DNA polimeraz, 15 µl ddH₂O ve 2.5 µl kalıp DNA ile oluşturuldu. Thermocycler programı ise 94°C'de 5 dakika süreyle başlangıç denatürasyonunu takiben 35 döngü olacak şekilde 94°C'de 1 dakika denatürasyon, 55°C'de 1 dakika primer bağlanma ve 72°C'de 1 dakika uzama

safhalarından oluştu ve son olarak 72°C’de 7 dakikalık son uzama aşaması gerçekleştirildi (67).

3.7.3. PZR Ürünlerinin Agaroz Jelde Görüntülenmesi

PZR ürünleri % 1’lik agaroz jel içerisinde yürütülerek ultraviyole ışığı altında görüntüledi. Bu amaçla, 0,3 g agaroz (Thermo Fisher Scientific Inc.) 30 ml 1x TBE buffer (Thermo Fisher Scientific Inc.) içerisinde mikrodalga fırında eritildi. Tamamen çözünen agaroz, 45-50°C’ye kadar soğutuldu. Boş haldeki elektroforez kasedine (BlueMarine 100-Serva, Almanya) taraklar konuldu. Agaroz içerisine 2 µl toksik olmayan DNA boyası (EZ Vision, Amresco, ABD) eklendi ve iyice karıştırılarak yatay elektroforez kasedinin içerisine dökülerek soğumaya bırakıldı. Katılaşan jelden taraklar çıkarılarak kuyucukların oluşması sağlandı. Elde edilen PZR ürününden 10 µl, yaklaşık 2 µl loading dye (yükleme boyası) ile karıştırılarak kuyucuklara yüklendi. Birinci kuyucuğa 5 µl marker DNA (100 bp) (Marker DNA= 2 µl DNA ladder + 1 µl loading dye + 4 µl ddH₂O) yüklendi ve 40 dakika 85 V sabit voltajlı elektrik akımı uygulanarak DNA’nın pozitif kutuba doğru hareketi sağlandı. DNA bantları, ultraviyole ışığı altında jel görüntüleme sistemi (EDAS 290-Kodak, ABD) yardımıyla görüntüledi ve fotoğraflandı.

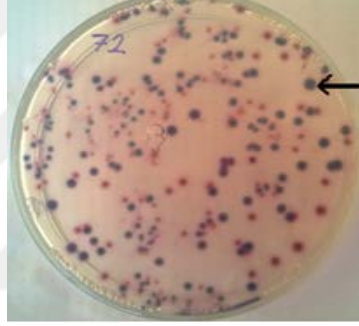
3.8. İstatistiksel Değerlendirme

Buzağıların yaş grupları arasında GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı açısından farkın anlamlı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla, SPSS (version 11) programı kullanılarak Pearson ki kare testi uygulandı (74). Değerlendirmede p<0.05 değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. *E. coli* Selektif İzolasyonu ve İdentifikasyonu

Seftazidim ve sefotaksim içeren Brilliance™ *E. coli* / koliform selektif besiyerlerinin her ikisinde de üreyen izolat sayısı; Bucak ilçesinde 8, Merkez ilçede 18 ve Tefenni ilçesinde 18 olmak üzere toplam 44 olarak bulundu. Selektif besiyerinde görülen *E. coli* kolonilerine örnek Şekil 4.1’de verildi. Her bir petriden rastgele 1 koloni seçildi ve MacConkey Agar besiyerine pasajlandı. İzolatların hepsi MacConkey agarda üredi ve hepsinin de laktoz pozitif olduğu görüldü. Ardından TSA besiyerine pasajlanan izolatların *E. coli* yönünden identifikasyonu yapıldı.



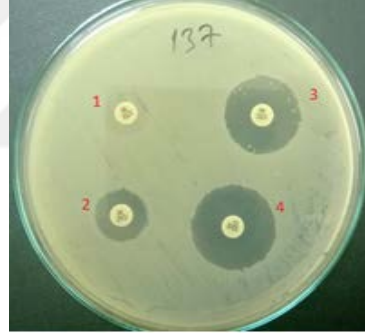
Şekil 4.1. Brilliance™ *E. coli*/ koliform selektif besiyerinde üreyen koloniler (Ok ile gösterilen mor renkli koloni *E. coli* kolonisidir).

Norveç üçlü tüp sistemi testlerinin sonuçlarına göre; Tüp I’de izole edilen tüm *E. coli* izolatlarının glikoz ve laktozu kullandığı görüldü. Ayrıca tüm *E. coli* izolatları tüpün dibinde gaz oluşturdu. Tüplerin tümünde H₂S üretimini gösteren siyah renk oluşumu görülmedi. Tüp II’deki hareket muayenesinde; toplam 8 izolat hareketsiz olarak tespit edildi. Hareketsiz izolatların 2’si Tefenni ilçesinden, 3’ü ise Merkez ilçeden izole edildi. Mannitol testinde; tüm izolatların mannitolü kullandığı görüldü. Tüp III’de; tüm izolatlarda ürenin kullanılmadığı görüldü. Tüm izolatlarda kovaks ayırıcı damlatılması sonrası tüpün üst kısmında 1-2 dakika içinde kırmızı halka meydana geldi ve indol testinin pozitif olduğu görüldü.

Test edilen tüm *E. coli* izolatlarında sitrat testi, VP testi ve oksidaz testi negatif sonuç verdi. MR ve katalaz testleri ise pozitif sonuç verdi.

4.2. Doğrulama Testi (Kombine Disk Metodu)

Kombine disk metodu ile *E. coli* / koliform selektif besiyerinde üreyen toplamda 44 izolatın 36'sının GSBL üreten *E. coli* olduğu belirlendi. Bucak ilçesinden *E. coli* / koliform selektif besiyerinde üreyen 8 izolatın hepsi, Merkez ilçeden 18 izolatın 16'sı ve Tefenni ilçesinden 18 izolatın 12'si GSBL üreten *E. coli* izolatı olarak belirlendi. Böylece çalışmada toplanan 150 dışkı örneğinin 36'sından GSBL üreten *E. coli* izole edilmiş ve izolasyon oranının % 24 olduğu belirlenmiş oldu. İzole edilen GSBL üreten *E. coli* izolatlarının örneklerin toplandığı yerleşim yerlerine göre dağılımı Tablo 4.1'de sunuldu. Merkez-Suludere ve Tefenni-Yaylaköy merkezlerinden GSBL pozitif izolatlara rastlanmadı. En yüksek oran Tefenni-Aşıklar'da elde edildi ve 10 dışkı örneğinin 7'sinde GSBL üreten *E. coli* izolatına rastlandı (% 70). MHA besiyerindeki yapılan doğrulama testi sonuçlarından bir örnek Şekil 4.2'de verildi.



Şekil 4.2. GSBL üreten *E. coli* izolatı (örnek no:137): 1 (CTX, sefotaksim), 2 (CAZ, seftazidim), 3 (CTC, sefotaksim-klavulanik asit) ve 4 (CZC, seftazidim-klavulanik asit).

Tablo 4.1. Buzağı dışkı örneklerinin alındığı yerleşim yerlerine göre GSBL reten *E. coli* izolatlarının dağılımı.

İlçe- Köy	rnek alınan işletme sayısı	rnek Sayısı	GSBL üreten <i>E. coli</i> sayısı	Oran
Bucak- Demirli	8	20	3	% 15
Bucak- Kavacık	6	18	4	% 22.2
Bucak- Kocaaliler	5	12	1	% 8.3
Merkez- Hacılar	3	13	5	% 38.4
Merkez- Suludere	4	19	0	% 0
Merkez- Yazıköy	5	18	11	% 61.1
Tefenni- Aşıklar	3	10	7	% 70
Tefenni- Esentepe	4	13	2	% 15.3
Tefenni- Hasanpaşa	3	14	3	% 21.4
Tefenni- Yaylaköy	3	13	0	% 0
TOPLAM	44	150	36	% 24

Çalışmada toplanan örnekler her bir yaş grubunda değerlendirildiğinde, GSBL reten *E. coli* izolasyon oranlarının birbirine yakın olduğu görüldü. Yaş gruplarına göre GSBL reten *E. coli* izolasyon oranlarının, 0 - \leq 2 ay yaşındaki buzağılar için % 23.21 (13/56), 2 ay < - \leq 4 ay yaş grubu için % 25.53 (12/47) ve 4 ay < - \leq 6 ay yaş grubu için ise % 23.40 (11/47) olduğu belirlendi. GSBL reten *E. coli* izolatlarının buzağıların yaşlarına (ay) göre dağılımı ve oranları Tablo 4.2’de sunuldu.

Tablo 4.2. GSBL reten *E. coli* izolatlarının buzağıların yaşlarına (ay) göre dağılımı ve oranları.

İlçe- Köy	0 - \leq 2 ay n= 56	2 ay < - \leq 4 ay n= 47	4 ay < - \leq 6 ay n= 47
Bucak	3	3	2
Merkez	8	3	5
Tefenni	2	6	4
Toplam	13	12	11
İzolasyon oranı	% 23.21	% 25.53	% 23.40

4.3. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarında yüksek direnç profiline rastlandı. Yerleşim yerlerine göre beta laktam antibiyotiklere ve diğer sınıflardan antibiyotiklere dirençli GSBL üreten *E. coli* izolatı sayıları Tablo 4.3 ve 4.4'te sunuldu.

Tablo 4.3. GSBL üreten *E. coli* izolatlarının beta laktam antibiyotiklere direnç oranları.

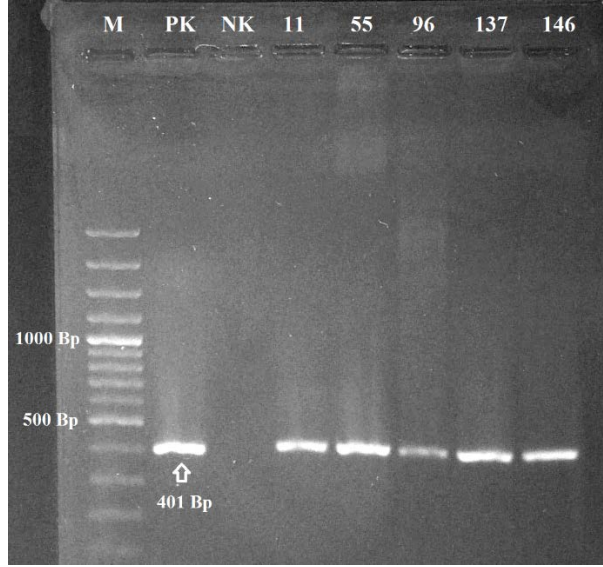
Test edilen antibiyotikler	Bucak (8 izolat) (n, %)	Merkez (16 izolat) (n, %)	Tefenni (12 izolat) (n, %)	TOPLAM (36 izolat) (n, %)
Aztreonam	8, % 100	16, % 100	12, % 100	36, % 100
Sefoksitin	0, % 0	0, % 0	0, % 0	0, % 0
Sefpodoksim	8, % 100	16, % 100	12, % 100	36, % 100
Seftiofur	8, % 100	16, % 100	12, % 100	36, % 100
Seftriakson	8, % 100	16, % 100	12, % 100	36, % 100

Tablo 4.4. GSBL üreten *E. coli* izolatlarının diğer sınıftan antibiyotiklere direnç oranları.

Test edilen antibiyotikler	Bucak (8 izolat) (n, %)	Merkez (16 izolat) (n, %)	Tefenni (12 izolat) (n, %)	TOPLAM (36 izolat) (n, %)
Enrofloksasin	3, % 37.5	15, % 93.75	10, % 83.33	28, % 77.77
Florfenikol	5, % 62.5	8, % 50	7, % 58.33	20, % 55.55
Gentamisin	0, % 0	16, % 100	10, % 83.33	26, % 72.22
Tetrasiklin	8, % 100	15, % 93.75	8, % 66.66	31, % 86.11
Sulfametoksazol- trimetoprim	5, % 62.5	15, % 93.75	12, % 100	32, % 88.88

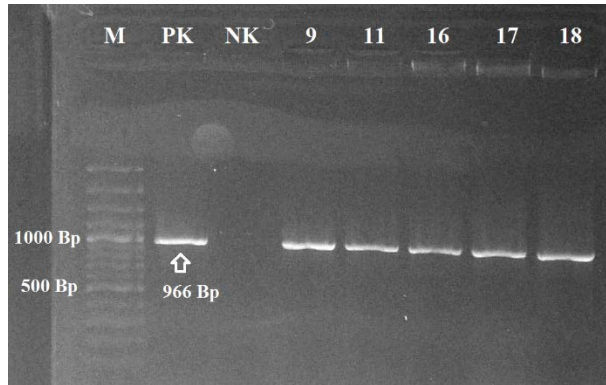
4.4. PZR

Doğrulama testi ile GSBL üretimi doğrulanan tüm *E. coli* izolatlarında 16S rRNA geni belirlendi. Böylece izolatların genotipik olarak *E. coli* olduğu doğrulanmış oldu. Yapılan PZR'a ilişkin bazı izolatların sonucu Şekil 4.3'de verildi.



Şekil 4.3. 16S rRNA geni primerleri ile *E. coli* izolatlarında yapılan PZR sonucu. M:Marker (100 bp), PK: 16S rRNA geni pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 25922), NK: Negatif kontrol (kalıp DNAsız PZR karışımı), buzağı izolatları (11, 55, 96, 137, 146).

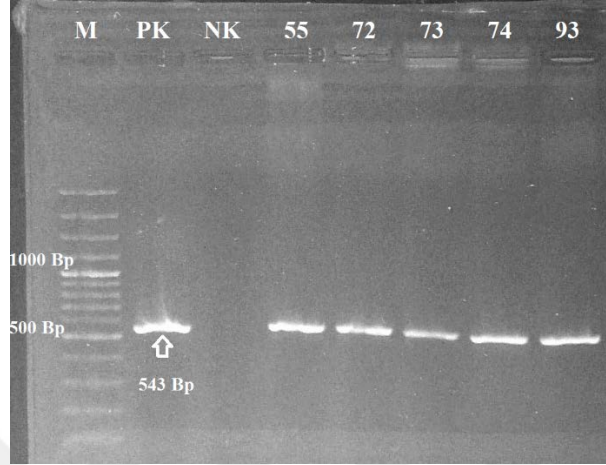
TEM geni için yapılan PZR’da 36 adet GSBL pozitif izolattan 33 (% 91,66)’ünde TEM geni belirlendi, 3’ünde ise TEM geninin var olmadığı tespit edildi. TEM geni taşımayan *E. coli* izolatlarının Bucak ilçesinden alınan dışkı örneklerinden izole edildiği belirlendi. TEM geni için yapılan PZR’a ilişkin bazı izolatların sonucu Şekil 4.4.’de verilmiştir.



Şekil 4.4. TEM geni primerleri ile *E. coli* izolatlarında yapılan PZR sonucu. M: Marker (100 bp), PK: TEM geni pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 35218), NK: Negatif kontrol (kalıp DNAsız PZR karışımı), buzağı izolatları (9, 11, 16, 17, 18).

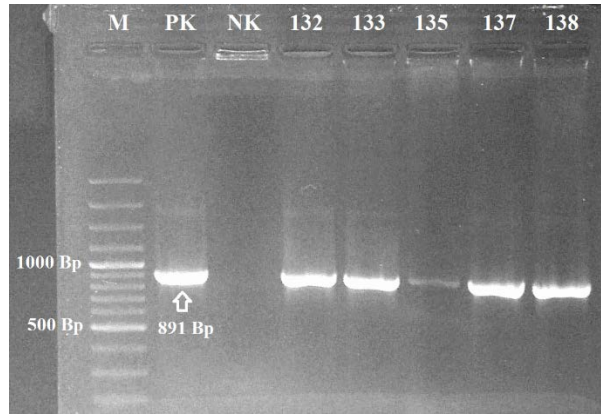
SHV geni için yapılan PZR’da *E. coli* izolatlarının hiçbirisinin SHV genine sahip olmadığı belirlendi.

CTX-M üniversal primerleri kullanılarak yapılan PZR’da tüm izolatların CTX-M genini taşıdığı görülmüştür. CTX-M geni için yapılan PZR’a ilişkin bazı izolatların sonucu Şekil 4.5.’de verildi.



Şekil 4.5. CTX-M üniversal primerleri ile *E. coli* izolatlarında yapılan PZR sonucu. M: Marker (100 bp), PK: CTX-M üniversal pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 13461), NK: Negatif kontrol (kalıp DNAsız PZR karışımı), buzağı izolatları (55, 72, 73, 74, 93).

CTX-M grup 1 primerleri kullanılarak yapılan PZR’da tüm izolatların CTX-M grup 1’e ait CTX-M genlerini taşıdığı belirlenmiştir. CTX-M grup 1 için yapılan PZR’a ilişkin bazı izolatların sonucu Şekil 4.6.’de verildi.



Şekil 4.6. CTX-M grup-1 primerleri ile *E. coli* izolatlarında yapılan PZR sonucu. M:Marker, PK: CTX grup-1 pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 13461), NK: Negatif kontrol (kalıp DNAsız PZR karışımı), buzağı izolatları (132, 133, 135, 137, 138).

PZR sonucunda, 33 *E. coli* izolatının TEM ve CTX-M geninin her ikisini de taşıdığı belirlendi. Üç *E. coli* izolatının ise sadece CTX-M genini taşıdığı görüldü.

4.5. İstatistiksel Değerlendirme

Buzağıların yaş gruplarına göre GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ($p= 0.957$).



5. TARTIŞMA

Dünyanın çeşitli bölgelerinde, yetişkin sığırlarda GSBL üreten *E. coli* varlığı üzerine yapılmış çok sayıda çalışma bulunmaktadır (42, 59, 63). Buzağular üzerine yapılan çalışmalar ise daha çok son yıllarda yoğunlaşmış durumdadır. Amerika Birleşik Devletleri'nde ishalleri buzağularda yapılan bir araştırmada sadece TEM genine bakılmış ve izolatların çoğunluğunda TEM beta laktamaz geni tespit edilmiştir (14). Hollanda'da 1997-2010 yılları arasında 14 yıllık bir süreçte sefotaksime dirençli bakterilerin prevalansındaki değişimi araştırmak için buzağularda yapılan bir çalışmada, 1998 ve 1999 yıllarında prevalans % 4 bulunmuş, 2010 yılında ise % 39 bulunmuştur (44). Yine Hollanda'da buzağularda 3 farklı çiftlikte 0., 3., 6., 8. ve 10. haftalarda yapılan prevalans çalışmasında, 0. haftada çiftliklerde prevalansın % 18 ile % 26 arasında değiştiği, 10. haftada ise prevalansların giderek düştüğü görülmüştür (43). Almanya'da ishalleri buzağularda Şiga toksin üreten GSBL fenotipine sahip 2 farklı *E. coli* izolatında yapılan bir çalışmada, 1. izolatın CTX-M-1 ve TEM-1, 2. izolatın ise sadece CTX-M-1 geni taşıdığı rapor edilmiştir (31). Schmid ve ark. (72)'de buzağularında içeren çalışmalarında (Almanya), buzağulardan topladıkları dışkı örneklerinin % 56.2'sinde GSBL üreten *E. coli* tespit etmişlerdir. Geser ve ark. (34)'nın İsviçre'de yaptığı çalışmada topladıkları buzağı dışkı örneklerinin % 25.3'ünde GSBL üreten Enterobacteriaceae izolatları tespit etmişlerdir.

Türkiye'de yetişkin sığırlarda günümüze kadar GSBL üreten *E. coli* prevalansı ve GSBL tiplerinin belirlenmesine ilişkin yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (1, 9, 52, 65). Aksoy ve ark. (1) tarafından yapılan çalışmada GSBL üreten *E. coli* suşuna sığırlarda rastlanmamıştır. Hatay ilinde yapılmış çalışmada prevalans sığırlarda % 8.3 olarak bulunmuştur (9). İstanbul ve Tekirdağ'da yapılmış çalışmalarda yetişkin sığırlarda sadece 3 adet GSBL üreten *E. coli* suşu izole edilmiş ve prevalans % 1.2 olarak bildirilmiştir (52). Aynı çalışmada İstanbul ve Tekirdağ'da bulunan iki sığır çiftliğindeki buzağulardan toplanan rektal sıvı örneklerinde GSBL üreten *E. coli*'ye rastlanmamıştır (52). Burdur bölgesinden yetişkin sığırlardan toplanan dışkı örneklerinde yapılan çalışmada ise, GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı sığırlarda % 15.5 olarak bulunmuştur (65). Yapılan bu tez çalışmasında ise Burdur ilindeki sağlıklı buzağuların dışkı örneklerinde GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılık oranı % 24 olarak

bulundu. Tez çalışmamız öncesinde buzağuların antibiyotiklere daha az maruz kalmış olmaları veya antibiyotik tedavisi görmemiş olmaları dolayısıyla, izolasyon oranının aynı bölgedeki yetişkin sığırlarla yapılan çalışmaya (65) kıyasla daha düşük bulunacağı tahmin edilmişti. Ancak çalışma sonunda buzağılardaki prevalansın biraz yüksek olduğu görüldü. Bu durum, buzağuların dışkı örnekleri toplandıkları sırada yetişkin hayvanlar ile birlikte olmalarına ve doğumdan sonra yetişkin hayvanlardan GSBL üreten *E. coli* izolatlarını almış olabileceğine bağlıdır.

Bu çalışmada, yaş gruplarına göre GSBL üreten *E. coli* prevalansı, 0 ay - \leq 2 ay yaşındaki buzağular için % 23.21, 2 ay < - \leq 4 ay yaş grubu için % 25.53 ve 4 ay < - \leq 6 ay yaş grubu için ise % 23.40 olarak bulundu ve yaş grupları arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmadı. Bu durum yaş ile GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı arasında bir ilişkinin olmadığını göstermektedir.

Bu tez çalışmasında PZR ile GSBL üreten *E. coli* izolatlarında TEM, SHV ve CTX-M tipi GSBL genlerine bakıldı. Çalışmadaki 36 GSBL üreten *E. coli* izolatının 33 (% 91.7)'ünde TEM geni bulunurken, izolatların hiçbirinde SHV geninin olmadığı belirlendi. Pehlivanoğlu ve ark. (65) Burdur ilindeki yetişkin sığırlarda yaptıkları çalışmada 31 GSBL üreten *E. coli* izolatının 24 (% 77.4)'ünde TEM geni belirlenmiştir. Ancak Pehlivanoğlu ve ark.'nın (65) 3 *E. coli* izolatında SHV geninin varlığını da belirlemiştir. Aslantaş ve ark. (9) tarafından Hatay bölgesindeki sığırlarda yapılan araştırmada ise, yetişkin sığırlardan izole edilen 26 GSBL üreten *E. coli* izolatının 21'inde (% 80.8) TEM genleri bulunmuştur (9). Bu tez çalışmasında, bütün (36/36, % 100) izolatların CTX-M geni taşıdığı belirlendi ve tüm tespit edilen CTX-M tipi beta laktamaz genlerinin CTX-M grup 1'e ait olduğu görüldü. Benzer şekilde Pehlivanoğlu ve ark. (65) Burdur ilinde yetişkin sığırlardan izole ettikleri 31 adet GSBL üreten *E. coli* suşunun 27 (% 87.1)'inde CTX-M geni belirlemiş ve hepsinin grup 1'e ait olduklarını rapor etmiştir. Aslantaş ve ark. (9) ise Hatay bölgesindeki yetişkin sığırlardaki çalışmasında, 26 izolatın 25 (% 96.2)'inde CTX-M geni belirlemiş ve bunlarında CTX-M grup 1 (12 adet CTX-M-15, 11 adet CTX-M-1, 2 adet CTX-M-3)'e ait olduğunu belirtmiştir (9). Bu verilere bakarak bu tez çalışmasında elde edilen GSBL genlerinin dağılımı Hatay ve Burdur bölgesinde yapılan çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Ancak, Küçükbaşmacı ve ark. (52) tarafından İstanbul ve Tekirdağ illerinde yapılan araştırmada ise izole edilen 5 adet GSBL üreten

Enterobacteriaceae izolatlarında SHV geni (4 izolatta SHV-5, 1 izolatta SHV-12) bulunmasına rağmen, CTX-M geni bulunmamıştır. Bu çalışmaya bakarak verilerin çok zıt olduğu ve bunun sebebinin o coğrafik bölgedeki sığır popülasyonunun yapısının farklılığından, çalışmalardaki örnekleme metodlarının farklı olmasından ve geçmişte hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin farklı olmasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

GSBL'ları kodlayan genlerin genellikle plazmidlerde lokalize olduğu bilinmektedir (64). Yapılan araştırmalarda bu plazmidlerde aynı zamanda aminoglikozid, kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametoksazol dirençliliğini sağlayan genlerin de taşındığı ve bu nedenle GSBL üreten *E. coli* izolatlarının bu antibiyotiklere de yüksek oranda direnç gösterdikleri görülmektedir (4, 14, 19, 25, 54, 81). Bu tez çalışmasında da GSBL genlerini tespit ettiğimiz *E. coli* izolatlarında diğer gruptan antibiyotiklere (aminoglikozid, kinolon, tetrasiklin, fenikol ve trimetoprim-sulfametoksazol) karşı yüksek oranda direnç görülmüştür.

Özellikle gelişmiş ülkelerde, Bakteriyele Dirençlilik İzleme Programları düzenli olarak yürütülmekte ve indikatör, patojenik ve zoonotik bakterilerin antibiyotiklere dirençlilik durumlarına ilişkin sonuçlar periyodik olarak yayınlanmaktadır (28, 45). *E. coli* insan ve hayvan bağırsak mikroflorasının doğal üyesi olması sebebiyle, hayvanlarda çeşitli amaçlarla kullanılan antibiyotiklere sıklıkla maruz kalabilmekte ve böylece çeşitli direnç mekanizmalarını kolaylıkla geliştirmektedir. *E. coli*'nin diğer bir özelliği, direnç genlerini patojenik ve zoonotik bakterilere kolaylıkla transfer etmesi ve *E. coli*'nin antibiyotik dirençliliğinin izlenmesinde indikatör bakteri olarak kabul edilmesidir (50, 82, 87). Bu nedenle, *E. coli* antibiotik dirençliliğinin izlenmesinde patojen bakteriler kadar normal flora üyesi *E. coli* izolatlarına da bakılması önem arz etmektedir. Pehlivanoğlu ve ark. (65)'nin Burdur ilindeki sağlıklı Holştayn ırkı yetişkin sığırların dışkı örneklerinden izole ettiği bağırsak flora üyesi *E. coli*'lerdeki GSBL üretimi üzerine elde ettiği verilere ilaveten aynı bölgedeki Holştayn ırkı sağlıklı buzağılardaki durumun da bu tez çalışmasında ortaya çıkarılmış olması, Burdur ili sığırlarındaki durumun belirlenmiş olması açısından önemlidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Sonuç olarak, bu çalışma ile Burdur ilindeki Holştayn ırkı sağlıklı buzağlarda GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı gösterilmiş ve taşıyıcılık oranı % 24 olarak belirlenmiştir. Bu çalışma Türkiye’de sağlıklı buzağlarda CTX-M tipi beta laktamaz üreten *E. coli* varlığını gösteren ilk çalışma olması açısından önemlidir. Ayrıca bu çalışmada örneklenen buzağlarda yaş ile GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı arasında bir ilişkinin olmadığı belirlenmiştir.

Tez çalışması sonucunda ortaya çıkan veriler, hem akademisyenler hem de bölgede çalışan veteriner hekimler ve hayvan yetiştiriciler için önemli bir kaynak olacaktır. Bölgemizde çalışan veteriner hekimler başta olmak üzere hayvan yetiştiricileri, GSBL üreten *E. coli* suşlarının ortaya çıkışı ve önemi hakkında bilgilendirilmelidir. Bu eğitimlerin içeriğinde antibiyotik preparatlarının daha bilinçli kullanılmasına ve çoğunlukla antibiyogram testlerine başvurarak antibiyotik seçimi yapılmasına dikkat çekilmelidir. Bu eğitimlerden sağlanacak bilgi birikiminin tedavide başarıyı arttırmak ve direnç gelişimini kısıtlamak için önemli olacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Aksoy A, Göçmen JS, Kaçmaz B, Canver S** (2005): İnsan ve sığırlardan izole edilen fekal *Escherichia coli* suşlarında antibiyotik direnç ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimi. *Ankem Derg.*, **19 (3)**, 130-134.
2. **Aliasadi S, Dastmalchi Saei H** (2015): Fecal carriage of *Escherichia coli* harboring extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes by sheep and broilers in Urmia region, Iran. *Iran J Vet Res.*, **9 (2)**, 93-101.
3. **Alp E, Doğanay M** (2008): *Monobaktam antibiyotikler*. Editör(ler): Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S. Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, s: 323-329.
4. **Akova M** (2004): Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) var!, *Ankem Derg.*, **18 (Ek 2)**, 98-103.
5. **Akova M, Kayaalp SO** (2005a): *Beta laktam antibiyotikler I: Penisilinler*. Editör: Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 11. baskı, Hacettepe Taş Yayınevi, Ankara, s: 167-187.
6. **Akova M, Kayaalp SO** (2005b): *Beta laktam antibiyotikler II: Sefalosporinler ve Diğerleri*. Editör: Kayaalp SO. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 11. Baskı, Hacettepe Taş Yayınevi, Ankara, s: 188-200.
7. **Arda M** (2011): *Temel mikrobiyoloji*, 4. Baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, s: 235-254.
8. **Arpin C, Dubois V, Coulange L, Andre C, Fischer I, Noury P, Grobost F, Brochet JP, Jullin J, Dutilh B, Larribet G, Lagrange I, Quentin C** (2003): Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother.*, **47(11)**, 3506-3514.
9. **Aslantaş Ö, Elmacioğlu S, Yılmaz EŞ** (2017): Prevalence and characterization of ESBL-and AmpC-producing *Escherichia coli* from cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg.*, **23**, 63-67. DOI: 10.9775/kvfd.2016.15832
10. **Bauernfeind A, Schweighart S, Grimm H** (1990): A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Infection*, **18**, 294-298.

11. **Bekar M** (1997): *Enterobacteriaceae familyası mikroorganizmaların genel karakterleri ve tanı yöntemleri*. Etlik Vet. Kon. Arşt. Enst. Yayın no: 97-1, Ankara.
12. **Bonnet R** (2004): Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.*, **48 (1)**, 1-14.
13. **Bozkurt İ, Lelebicioğlu H** (2015): Hayvanlarda oluşan antibiyotik direncinin insan sağlığı üzerine etkileri, *Turkiye Klinikleri J Vet Sci Pharmacol Toxicol-Special Topics.*, **1 (2)**, 76-82.
14. **Bradford PA, Petersen PJ, Fingerman IM, White DG** (1999): Characterization of expanded-spectrum cephalosporin resistance in *E. coli* isolates associated with bovine calf diarrhoeal disease. *J Antimicrob Chemother.*, **44 (5)**, 607-610.
15. **Bradford PA** (2001): Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Reviews.*, **14 (4)**, 933–951.
16. **Bush K, Jacoby GA** (2010): Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.*, **54 (3)**, 969–76.
17. **Büyüküysal RL** (2003): Antibiyotiklerde direnç sorunu. *T Klin J Pharmacol.*, **1 (2)**, 162-170.
18. **Calderon CB, Sabundayo BP** (2007): *Antimicrobial classifications: drugs for bugs*. Ed(s): Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin AC. Antimicrobial susceptibility testing protocols, CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, USA.
19. **Carattoli A** (2008): Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect.*, **14 (Suppl 1)**, 117-23.
20. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)** (2010): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, Approved Standard, 3rd Ed, CLSI document M31-A3, Wayne, PA, USA.
21. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)** (2012): Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, 9th Ed, CLSI documents M07-A09, Wayne, PA, USA.

22. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)** (2013): Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, second informational supplement, CLSI document VET01-S2, Wayne, PA, USA.
23. **CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)** (2014): Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24. CLSI, Wayne, Pennsylvania, USA.
24. **Costa D, Vinué L, Poeta P, Coelho AC, Matos M, Sáenz Y, Somalo S, Zarazaga M, Rodrigues J, Torres C** (2009): Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Vet Microbiol.*, **138 (3)**, 339-344.
25. **Dağlar D, Öngüt G** (2012): Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) ve tanı yöntemleri, *İnönü Üniv Tıp Fak Derg.*, **1**, 1-9.
26. **Dinç G, Ata Z, Temelli S** (2012): Sığır mastitislerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta laktamaz aktivitesi ve antibiyotik dirençlilik profilinin incelenmesi. *Ankara Üniv Vet Fak Derg.*, **59**, 85-88.
27. **Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J, Janoszowska D, Roubalova E, Dibdakova K, Maceckova G, Kohoutova L, Literak I, Smola J, Cizek A** (2011): Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. *J Antimicrob Chemother.*, **66**, 757-764.
28. **EFSA (European Food Safety Authority)** (2012): Antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in the European Union in 2010. *EFSA J.*, **10 (3)**, 2598.
29. **EFSA (European Food Safety Authority)** (2015): EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2013. *EFSA J.*, **13 (2)**, 4036.
30. **Erdinç FŞ** (2013): Sefalotinden, seftobiprole, seftaroline. *Ankem Derg.*, **27 (Ek 2)**, 124-126.
31. **Ewers C, Stamm I, Stolle I, Guenther S, Kopp PA, Fruth A, Wieler LH, Scheufen S, Bauerfeind R, Bethe A, Prenger-Berninghoff E** (2014).

- Detection of shiga toxin-and extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* O145: NM and Ont: NM from calves with diarrhoea. *J Antimicrob Chemother.*, doi: 10.1093/jac/dku042
32. **Falagas ME, Karageorgopoulos DE** (2009): Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. *J Hosp Infect.*, **73**, 345-354.
 33. **Frere JM** (1995): Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol Microbiol.*, **16**, 385-395.
 34. **Geser N, Stephan R, Hächler H** (2012): Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res.*, **8** (1), 21.
 35. **Gill CJ, Jackson JJ, Gerckens LS, Pelak BA, Thompson RK, Sundelof JG, Rosen H** (1998): In vivo activity and pharmacokinetic evaluation of a novel long-acting carbapenem antibiotic, MK-826 (L-749,345). *Antimicrob Agents Chemother.*, **42** (8), 1996-2001.
 36. **Gündoğan N, Avcı E** (2013): Prevalence and antibiotic resistance of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species isolated from foods of animal origin in Turkey. *Afr J Microbiol Res.*, **7** (31), 4059-4064.
 37. **Gür D** (2002): Beta laktamazlar. *Hacettepe Tıp Derg.*, **33**, 102-109.
 38. **Hanlon A, Taylor M, Dick JD** (2007): *Agar Dilution Susceptibility Testing*. Ed (s): Schwalbe R, Steelle-Moore L, Goodwin AC, Antimicrobial susceptibility testing protocols, CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, p: 91–103.
 39. **Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K** (2008): Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J Lab Med.*, **28** (6), 401-412.
 40. **Heffernan HM, Woodhouse RE, Pope CE, Blackmore TK** (2009): Prevalence and types of extended-spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in New Zealand. *Int J Antimicrob Agents.*, **34** (6), 544-549.
 41. **Hiroi M, Yamazaki F, Harada T, Takahashi N, Iida N, Noda Y, Yagi M, Nishio T, Kanda T, Kawamori F, Sugiyama K, Masuda T, Hara-Kudo Y,**

- Ohashi N** (2012): Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals. *J Vet Med Sci*, **74**, 189–195.
42. **Ho PL, Chow KH, Lai EL, Lo WU, Yeung MK, Chan J, Chan PY, Yuen KY** (2011): Extensive dissemination of CTX-M-producing *Escherichia coli* with multidrug resistance to critically important antibiotics among food animals in Hong Kong, 2008–2010. *J Antimicrob Chemother.*, **66** (4), 765–768.
43. **Hordijk J, Mevius D J, Kant A, Bos M E, Graveland H, Bosman AB, Hartskeerl CM, Heederik DJ, Wagenaar JA** (2013): Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: a longitudinal approach. *J Antimicrob Chemother.*, **68** (11), 2468–2476.
44. **Hordijk J, Schoormans A, Kwakernaak M, Duim B, Broens E, Dierikx C, Mevius D, Wagenaar JA** (2013): High prevalence of fecal carriage of extended spectrum β -lactamase/AmpC-producing *Enterobacteriaceae* in cats and dogs. *Front Microbiol.*, **4**, 242.
45. <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/UCM312360.pdf> : NARMS (The National Antimicrobial Resistance Monitoring System) - Enteric bacteria, executive report 2010 (erişim tarihi: 18.11.2016).
46. <http://www.lahey.org/Studies/>: β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA extended spectrum and inhibitor resistant enzymes (erişim tarihi: 18.11.2016).
47. <http://www.microrao.com>: Extended spectrum beta lactamases (erişim tarihi: 15.11.2016).
48. **Huber H, Zweifel C, Wittenbrink MM, Stephan R** (2013): ESBL-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolated from dogs and cats in Switzerland. *Vet microbiol.*, **162** (2), 992–996.
49. **Jeong SH, Bae IK, Know SB, Lee JH, Song JS, Jung HI, Sung KH, Jang SJ, Lee SH** (2005): Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum B-lactamase-producing *E. coli* in Korea. *J Appl Microbiol*, **98**, 921–927.

50. **Jordan D** (2003): Surveillance for antibiotic resistant *Escherichia coli* in food animals. *Commun Dis Intell.*, **27 Suppl**, 117-120.
51. **Kaya S** (2013): *Antibiyotikler*. Editör: Kaya S. Veteriner farmakoloji, cilt 2, 5. baskı, Medisan Yayınevi, Ankara, s: 325-379.
52. **Küçükbasmaç O, Çiftçioğlu G, Midilli K, Issa G** (2008) Detection of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* from food animals in Turkey. *Revue Méd Vét.*, **159 (12)**, 586-592.
53. **Lassen J** (1975): Rapid identification of Gram-negative rods using a three-tube method combined with a dichotomic key. *Acta Path Microbiol Scand Sect B.*, **83 (6)**, 525-533.
54. **Livermore DM** (2012): Current epidemiology and growing resistance of Gram negative pathogens. *Korean J Intern Med.*, **27(2)**, 128-142.
55. **Madec JY, Lazizzera C, Chatre P, Meunier D, Martin S, Lepage G, Menard MF, Lebreton P, Rambaud T** (2008): Prevalence of fecal carriage of acquired expanded-spectrum cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae* strains from cattle in France. *J Clin Microbiol.*, **46**, 1566–1567.
56. **Masoud MS, Ali AE, Nasr NM** (2014): Chemistry, classification, pharmacokinetics, clinical uses and analysis of beta lactam antibiotics: A review, *J Chemical Pharm Res.*, **6 (11)**, 28-58.
57. **Mülazımoğlu L** (2010): 1986’ dan günümüze karbapenemler. *Ankem Derg.*, **24 (Ek-2)**, 33-35.
58. **Naas T, Poirel L, Nordmann P** (2008): Minor extended-spectrum beta lactamases. *Clin Microbiol Infect.*, **14 (Suppl 1)**, 42–52.
59. **Ohnishi M, Okatani AT, Esaki H, Harada K, Sawada T, Murakami M, Marumo K, Kato Y, Sato R, Shimura K, Hatanaka N, Takahashi T** (2013): Herd prevalence of *Enterobacteriaceae* producing CTX-M-type and CMY-2 β -lactamases among Japanese dairy farms. *J Appl Microbiol.*, **115 (1)**, 282-289.
60. **Öcal D** (2012): Gram negatif bakterilerde antibakteriyal direncin fenotipik yöntemler ile tayin ve bildirimi. *Ankem Derg.*, **26 (3)**, 154-164.

61. **Örnek G** (2013): *Atların dışkılarından izole edilen Escherichia coli izolatlarında antimikrobiyal direnç ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretiminin fenotipik olarak araştırılması*, Yüksek lisans tezi danışmanı: Yrd. Doç. Dr. Nilgün Ünal, Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kırıkkale.
62. **Sili U, Mert A** (2010): 1986'dan 2010'a beta laktamaz inhibitörleri. *Ankem Derg.*, **24 (Ek-2)**, 28-32.
63. **Snow LC, Wearing H, Stephenson B, Teale CJ, Coldham NG** (2011): Investigation of the presence of ESBL-producing *Escherichia coli* in the North Wales and West Midlands areas of the UK in 2007 to 2008 using scanning surveillance. *Vet Rec.*, **169 (25)**, 656.
64. **Paterson DL, Bonomo RA** (2005): Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update, *Clin Microbiol Rev.*, **18 (4)**, 657-686.
65. **Pehlivanoglu F, Türütoğlu H, Öztürk D, Yardımcı H** (2014): *Presence of extended-spectrum beta lactamase producing Escherichia coli in fecal samples of cattle and sheep*. XI. Veteriner Hekimleri Mikrobiyoloji Kongresi Bildiri Kitabı, Antalya, s: 34-35.
66. **Pehlivanoglu F, Turutoglu H, Ozturk D, Yardimci H** (2015): *Presence of CTX-M type extended-spectrum beta lactamase producing Escherichia coli in healthy laying hens*. Proceedings of the 6th International Scientific Meeting, Days of Veterinary Medicine 2015, Struga, Macedonia, p:32.
67. **Pehlivanoglu F, Turutoglu H, Ozturk D** (2016): CTX-M-15-type extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* as causative agent of bovine mastitis. *Foodborne Pathog Dis.*, **13 (9)**: 477-482.
68. **Perez F, Endimiani A, Hujer KM, Bonomo RA** (2007): The continuing challenge of ESBLs. *Curr Opin Pharmacol.*, **7 (5)**, 459-469.
69. **Pitout JD, Laupland KB** (2008): Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis.*, **8 (3)**, 159-166.
70. **Randall LP, Lemma F, Rogers JP, Cheney TEA, Powell LF, Teale CJ** (2014): Prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia*

- coli* from pigs at slaughter in the UK in 2013. *J Antimicrob Chemother.*, **69**, 2947-2950.
71. **Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocne Z, Verdet C, Delisle F, Philippon A, Arlet G** (2002): Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett.*, **209**, 161-168.
 72. **Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäusser U, Käsbohrer A, Sauter-Louis C, Mansfeld R** (2013): Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environ Microbiol.*, **79** (9), 3027-3032.
 73. **Songer JG, Post KW** (2012): Veterinary Microbiology – Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease (*Veteriner Hekimlik Mikrobiyolojisi - Hayvan Hastalığı Etkeni Olan Bakteriler ve Mantarlar*). Çeviri Editörleri: Anđ Ö, Özgür NY, Çevirenler: Ilgaz A, Ak S, Özgür NY, İkiz S, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul, s: 21–31.
 74. **SPSS Inc.** (2007): SPSS for windows version 11.00, Chicago.
 75. **Şadan G** (2003): Beta-laktam antibiyotikler. *T Klin J Pharmacol.*, **1** (2), 194-202.
 76. **Tanır G, Göl N** (1999): Antibiyotik direnci. *Klinik Derg.*, **12** (2), s:47-54
 77. **Tenover FC, Rasheed JK** (2004): *Detection of antimicrobial resistance genes and mutations associated with antimicrobial resistance in microorganisms*. Ed(s): Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, Tang YW, Unger ER, Relman DA, White TJ, Molecular microbiology: diagnostic principles and practice, ASM Press, Washington, DC, USA, p: 391-406.
 78. **Thrusfield M** (2005): *Veterinary Epidemiology*, 3rd edition, Blackwell publishing, Oxford, UK.
 79. **Töreci K** (2008): *Antibakteriyel Antibiyotiklerin Etki Mekanizması*. Editör(ler): Leblebicioğlu H, Usluer G, Ulusoy S, Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler, Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, s: 15-37.
 80. **Traş B, Yazar E, Elmas M** (2007): *Veteriner hekimliğinde ilaç kullanımına pratik ve akılcı yaklaşım*, 2. baskı, Olgun Çelik Ofset Matbaa, Konya.

81. **Tükenmez-Tigen E, Mülazımoğlu L** (2012): Toplum kökenli infeksiyonlarda genişlemiş spektrumlu β -laktamazlar ve klinik önemi. *Klimik Derg.*, **25** (3), 94-98.
82. **Van Den Boagaard AE, Stobberingh EE** (2000): Epidemiology of resistance to antibiotics, links between animals and humans. *Int J Antimicrob Agents.*, **14** (4), 327-35.
83. **Vural T** (2003): Beta laktamazlar. *T Klin J Pharmacol.*, **1** (2), 231-236.
84. **Wang G, Clark CG, Rodgers FG** (2002): Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol.*, **40**, 3613-3619.
85. **Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC** (2005): β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol.*, **8** (5), 525-533.
86. **Winn W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G** (2006): *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed, Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, USA.
87. **Wray C, Gnanou JC** (2000): Antibiotic resistance monitoring in bacteria of animal origin: analysis of national monitoring programmes. *Int J Antimicrob Agents.*, **14** (4), 291-294.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Durmuş YILDIRIM

Doğum Yeri ve Yılı: Burdur, 1985

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dili: İngilizce

Uyruğu: T.C.

Telefon No: 0537 542 77 17

Elektronik Posta: burbaydur@hotmail.com

İletişim Adresi: Burdur Gıda Kontrol Laboratuvarı, Burdur



Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl):

Lise: Burdur Anadolu Lisesi, 2004, Burdur

Lisans: Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, 2009

Yüksek Lisans: -

Çalıştığı Kurum/ Kurumlar ve Yıl (Mesleki Deneyim):

1. Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü Bayburt 2009-2012
2. Gıda, Tarım ve Hayvancılık İlçe Müdürlüğü Tefenni/Burdur 2012-2014
3. Burdur Gıda Kontrol Laboratuvarı 2014 -

Yayınları (SCI ve diğer makaleler):

- 1.

Üyesi olduğu Mesleki Kuruluşlar:

- 1.

