



**AĞRI İLİ VE ÇEVRESİNDEN TOPLANAN ÇİĞ SÜT
ÖRNEKLERİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU
BETA-LAKTAMAZ ÜRETEN BAKTERİLERİN
İZOLASYONU TANISI VE KARAKTERİZASYONU**

**Meryem AYYILDIZ
Yüksek Lisans Tezi
Biyoloji Ana Bilim Dalı**

Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ

**AĞRI-2022
(Her hakkı saklıdır.)**

T.C.
AĞRI İBRAHİM ÇEÇEN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Meryem AYYILDIZ

**AĞRI İLİ VE ÇEVRESİNDEN TOPLANAN ÇİĞ SÜT
ÖRNEKLERİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-
LAKTAMAZ ÜRETEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU TANISI
VE KARAKTERİZASYONU**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ YÖNETİCİSİ

Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ

AĞRI-2022

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

AĞRI İLİ VE ÇEVRESİNDEN TOPLANAN ÇİĞ SÜT ÖRNEKLERİNDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ ÜRETEN BAKTERİLERİN İZOLASYONU TANISI VE KARAKTERİZASYONU

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ

Jüri: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ

Dr. Öğr. Üyesi Burak ALAYLAR

Beta-laktam antibiyotikleri, yan etkilerinin az olması ve bakteri öldürücü etkilerinden dolayı çağımızda yaygın olarak kullanılan antibiyotik grupları içerisinde yer almaktadır. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL), mikrobiyolojik olarak oksimino sefalosporinleri hidrolize edebilen, klavulanik asit tarafından inhibe olabilen enzimler olarak tanımlanmaktadır. Beta-laktamazlar ise, beta-laktam grubu antibiyotikleri, hedef bölgesine erişmeden etkisiz hale getirirler. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda hayvansal gıda kaynaklı bakterilerde antimikrobiyal direncin oldukça yüksek seviyede olduğu bildirilmiştir. Antibiyotik dirençli bakterilerin ve dirençli genlerin insanlara hayvansal gıdalardan geçtiği iddia edilmektedir. Özellikle GSBL üreten bakterilerin hayvansal gıdalardaki artan yayılımı, gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından önemli bir sorun haline gelmiştir. Bu çalışma kapsamında, Ağrı ili ve çevresinden toplanan süt örneklerinde, genişlemiş spektrumlu beta laktamaz enzimlerini üretebilen bakterilerin varlığı belirlenmiş, ürettikleri beta laktamaz tipleri karakterize edilmiştir. GSBL üretme yeteneğine sahip, süt kaynaklı bakterilerin belirlenmesi ve durum tespiti yapılması yöremiz açısından önem arz etmektedir.

2022, 63 sayfa

Anahtar Kelimeler: Ağrı, bakteri, Genişlemiş spektrumlu bakteri, süt.

ABSTRACT

MASTER THESIS

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF EXTENDED SPECTRUM BETA LACTAMASE PRODUCING BACTERIA FROM RAW MILK SAMPLES IN AĞRI PROVINCE

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ

Jury: Prof. Dr. Özlem BARIŞ

Assoc. Prof. Dr. Kenan KARAGÖZ

Assist. Prof. Dr. Burak ALAYLAR

Beta-lactam antibiotics are among the antibiotic groups commonly used in our age due to their low side effects and bactericidal effects. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) are defined as enzymes that can hydrolyze oxyimino cephalosporins microbiologically and can be inhibited by clavulanic acid. Beta-lactamases, on the other hand, neutralize beta-lactam group antibiotics before they reach their target area. In recent studies, it has been reported that antimicrobial resistance is very high in animal food-borne bacteria. It is claimed that antibiotic-resistant bacteria and resistant genes pass through animal foods to humans. Especially, the increasing spread of ESBL-producing bacteria in animal foods has become an important problem in terms of food safety and public health. In this study, the presence of bacteria capable of producing beta-lactamase enzymes will be determined in the milk samples to be collected from Ağrı and its surroundings, and the types of beta-lactamases they produce will be characterized. Determination of milk borne bacteria capable of producing beta-lactamase with extended spectrum and determining the situation is important for our region.

2022, Page: 63

Key Words: Ağrı, bacteria, Extended spectrum beta lactamase, milk.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamın konusunun belirlenmesinde, planlanmasında, yürütülmesinde ve sonuçların yorumlanmasında bana yol gösteren, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, her türlü yardımda bulunan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Kenan KARAGÖZ'e

Ayrıca çalışmalarım boyunca her koşulda yanımda olan ve beni hiç yalnız bırakmayan aileme ve babam Memet AYYILDIZ'a ve aileme teşekkür ederim.

Meryem AYYILDIZ

Ağustos 2022

İÇİNDEKİLER

ÖZET	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
SİMGELER KISALTMALAR DİZİNİ	vii
ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER	4
2.1. Beta-Laktam Antibiyotikleri	4
2.1.1. Penisilinler	5
2.1.2. Sefalosporinler	7
2.1.3. Monobaktamlar	8
2.1.4. Karbapenemler	9
2.2. Beta Laktam Antibiyotiklerin Etki mekanizması.....	9
2.3. Beta Laktamazlar	10
2.3.1. Beta Laktamazların Sınıflandırılması	11
2.3.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL).....	17
2.3.3. Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz Tipleri	18
2.4. Süt Örneklerinde GSBL Üreten Bakteriler Üzerine Yapılan Çalışmalar.....	24
3. MATERYAL VE METOD	26
3.1. Kullanılan alet ve cihazlar.....	26
3.2. Çiğ süt örneklerinin toplanması	26
3.3. Besiyeri ve Çözeltiler.....	30
3.3.1. Lauryl Broth	30
3.3.2. Nutrient Agar	30
3.3.3. Tryptic Soy Agar.....	30
3.3.4. Mueller Hinton Agar	30
3.3.5. MacConkey Agar	30
3.3.6. Tryptone water	31

3.3.7. Metil-Red Voges Proskauer Broth (MR-VP Broth).....	31
3.3.8. Simmon's Sitrat Agar.....	31
3.3.9. Fenol-Red Laktoz Broth.....	31
3.3.10. %95'lik Etil alkol.....	31
3.3.11. %30'luk Gliserol.....	32
3.3.12. %7'lik H ₂ O ₂ çözeltisi.....	32
3.3.13. %3'lük KOH çözeltisi.....	32
3.3.14. 10X TBE tamponu.....	32
3.4. İzolasyon.....	32
3.5. Morfolojik GSBL Doğrulaması.....	32
3.6. Biyokimyasal testler.....	33
3.6.1. İndol Testi.....	33
3.6.2. Metil-Kırmızısı Testi (MR).....	34
3.6.3. Voges-Proskauer Testi (VP).....	34
3.6.4. Sitrat Testi.....	35
3.6.5. Katalaz Testi.....	35
3.6.6. KOH Testi.....	35
3.6.7. Oksidaz Testi.....	36
3.6.8. Fenol-Kırmızı Laktoz Testi.....	36
3.7. DNA Ekstraksiyonu.....	37
3.8. Beta Laktamaz Tiplerinin Moleküler Analizi.....	37
3.9. 16S rDNA PZR ve Sekans Analizi.....	38
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	40
4.1. İzolasyon ve Morfolojik GSBL Doğrulaması.....	40
4.2. Biyokimyasal Testler.....	42
4.3. Beta Laktamaz Tiplerinin Moleküler Analizi.....	43
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
6. KAYNAKLAR.....	52

SİMGELER KISALTMALAR DİZİNİ

µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar
6-APA	Amino penisilanik asit
7-ABA	7-aminosefalosporinik asit
Bp	Baz çifti
CAZ	Seftazidim
CO ₂	Karbondioksit
CTC	Sefotaksim-Klavulanik asit
CTX	Sefotaksim
CZC	Seftazidim-Klavulanik asit
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
ESBL	Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
<i>et al.</i>	ve diğerleri
GSBL	Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
ID	Kimlik numarası
Kg	Kilogram
kob	Koloni oluşturan birim
KOH	Potasyum hidroksit
LAB	Laktik asit bakterileri
LB	Luria Bertani
MAK	Meryem AYYILDIZ-Kenan, bakteri kodu
MgCl ₂	Magnezyum klorür
MR	Metil kırmızısı
MR-VP	Metil-Kırmızısı Voges-Proskauer Broth
Na ₂ EDTA	Etilenamin asetik asit disodyum
NaCl	Sodyum klorür

nm	Nanometre
OD	Dış çap
PBP	Penisilin bağlayan protein
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
rDNA	Rekombinant DNA
s	Saniye
sdH ₂ O	Steril su
spp.	Türler
TBE	Trise base EDTA
TSA	Triptic soye agar
TSB	Triptic soye broht
vd.	ve diğerleri
VP	Voges-Proskauer

ŞEKİL VE TABLOLAR DİZİNİ

ŞEKİLLER

Şekil 1. 6-APA (amino penicillinic acid) (Murray 2009).....	4
Şekil 2. Penisilin Yapısı (Palzkill 2013).....	5
Şekil 3. Sefalosporin Yapısı (Palzkill 2013).....	7
Şekil 4. Monobaktam Yapısı (Palzkill 2013).....	8
Şekil 5. Karbapenem Yapısı (Palzkill 2013).....	9
Şekil 6. İndol testi pozitif (solda) ve negatif (sağda) sonuç.....	33
Şekil 7. Metil kırmızısı testi negatif (solda) ve pozitif (sağda) sonuç.....	34
Şekil 8. Sitrat testi pozitif (solda) ve negatif (sağda) sonuç.....	35
Şekil 9. Oksidaz testi sonuçlarına göre pozitif (solda) ve negatif (sağda) sonuç.....	36
Şekil 10. Fenol kırmızısı laktoz testi pozitif (solda) ve negatif (sağda) sonuç.....	36
Şekil 11. TEM, SHV ve CTX-M genleri için spesifik PZR sonuçları.....	43

TABLolar

Tablo 1. Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri.....	15
Tablo 2. Aşkale köyünden alınan süt örnekleri.....	26
Tablo 3. Murat köyünden alınan süt örnekleri.....	27
Tablo 4. Balıksu köyünden alınan süt örnekleri.....	27
Tablo 5. Beşiktepe köyünden alınan süt örnekleri.....	28
Tablo 6. Haydar oğlu köyünden alınan süt örnekleri.....	28
Tablo 7. Goncalı köyünden alınan süt örnekleri.....	29
Tablo 8. Toprak kale köyünden alınan süt örnekleri.....	29
Tablo 9. Kullanılan primerler ve özellikleri.....	37
Tablo 10. ESBL pozitif strainlere ait çift disk difüzyon test sonuçları.....	40
Tablo 11. Biyokimyasal test sonuçları.....	41
Tablo 12. Test edilen GSBL genlerine ait test sonuçları.....	43
Tablo 13. 16S rDNA sekans analizine göre tanı sonuçları.....	45

1. GİRİŞ

Süt, memelilerin yavrularını beslemek için, hayvanın süt bezlerinde türüne göre çeşitli zaman aralıklarında salgılanan ve hayvanların yavrularının kendi kendine beslenme durumuna varıncaya kadar alması gereken, sadece kendine özgü tad ve kokusu olan beyaz renginde bir sıvıdır. İnsanların büyümesi, gelişmesi, sağlıklı ve uzun bir hayat sürebilmesi için de şart bir besin türü olan süt; enzim, mineral, kalsiyum, protein ve vitamin gibi vücut için önemli maddeler bulundurur.

Beslenmede üstün önemli bir yer tutan, aynı zamanda temel besin maddesi olan süt pek çok mikroorganizmanın üremesi ve yaşamını devam etmesi için de iyi bir ortam oluşturmaktadır. Sağlıklı bir memeli hayvandan salgılanan süt, salgılandığı anda içerisinde hiçbir mikroorganizma bulundurmaz. Fakat sağım anında, sağımdan sonra taşınırken içinde bulunduğu eşyadan, götürüldüğü işletmelerde farklı ürünlere işlenirken ve işlendikten sonra çeşitli yerlere dağıtım sırasında mikroorganizmaların süte ve buna bağlı olarak işlendikten sonra oluşturulan ürünlere bulaşma ihtimali vardır. Hayvanların içinde bulunduğu ahırın havasından, içtikleri sudan, yedikleri yemden, sağım kaplarından, taşıma için kullanılan ekipmanlardan ve buldukları çevreden pek çok mikroorganizma süte bulaşabilir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda hayvansal gıda kaynaklı bakterilerde antimikrobiyal direncin yüksek seviyelerde olduğu bildirilmiştir. Buna bağlı olarak antibiyotiğe direnç gösteren bakterilerin, hayvansal besinler aracılığıyla insanlara geçtiği bilinmektedir.

Antibiyotikler, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde oldukça önemli yere sahip ilaçlardır. Antibiyotiklerin kullanılmaya başlanmasıyla enfeksiyon hastalıkları sonucu ortaya çıkan ölüm oranlarda önemli düşüşler görülmesi ile birlikte, tedavide kullanılabilirlikleri giderek artmıştır. Ancak antibiyotiklerin uzun süreli, bilinçsiz ve yoğun kullanılması sonucu hastalık etmeni bakterilerin bu ilaçlara karşı direnç geliştirdiği bilinmektedir. Bu durum enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde sorunları ve sürekli olarak hastalık etmenlerine karşı tedavide kullanılacak yeni etken madde arayışlarını da beraberinde getirmektedir. Dünya Sağlık Örgütü, belirli dönemlerde çoklu antibiyotik direnci gösteren bakteriler hakkında bilgilendirmeler yapmakta ve bu bakterilere karşı yeni etken maddeler bulunması konusunda paydaşlarını teşvik etmektedir.

Antibiyotikler sadece insanlarda görülen enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir ilaç grubu olmayıp hayvanlarda görülen enfeksiyon hastalıklarının tedavisi içinde vazgeçilmez elemanlardır. Ayrıca hayvancılıkta büyümeyi etkileme, verim ve randımanı artırma, yemden yararlanmayı kolaylaştırma gibi farklı amaçlara da dolaylı olarak hizmet ederler. Ancak bu kullanımın bilinçsiz ve fazla olması, daha önce de ifade edildiği gibi antibiyotik direncine sahip mikroorganizma varyantlarının ortaya çıkmasına neden olabilmektedir. Özellikle hayvansal gıdaların tüketimine bağlı olarak direçli bakterilerin insanlara geçişi ile enfeksiyon hastalıklarının yanı sıra alerjik tepkimeler de ortaya çıkabilmektedir.

Hayvansal ürünlerin üretiminde bağlı kalınması gereken standart uygulamaların varlığına rağmen bu alanda faaliyet gösteren tüm işletmelerde standartların hayata geçirilmesi konusunda arzu edilen noktada olunmadığını ifade etmek gerekir. Yetiştirme koşullarındaki olumsuzluklar, enfeksiyon hastalıklarının tespiti ve hasta hayvanların tecriti gibi hususlarda yaşanan aksaklıklar hayvanlar arasında enfeksiyon hastalıklarının daha kolay transfer edilmesine yol açabilmektedir. Burada asıl düşünülmesi gereken konu ise hastalık etmenlerinin transferi sırasında direnç durumları ve seviyelerinde görülen değişimlerdir. Yukarıda ifade edilen olumsuzluklara ilaveten bilinçsiz antibiyotik kullanımı ile beraber, bir antibiyotik grubuna karşı direnci artan ya da çoklu ilaç direncine sahip patojen varyantları ortaya çıkabilmekte ve hayvansal gıdaların tüketimi sonucu insanlara aktarılabilen bu patojenler önemli sorunlara yol açabilmektedir.

Tedavide en sık başvuru alan antibiyotik gruplarından birisi de beta-laktam grubu antibiyotiklerdir. Bu grupta yer alan antibiyotiklerin ortak özellikleri, beta-laktam halkası taşımalarıdır. Farklı etki spektrumları ve kimyasal yapıya sahip çok sayıda beta laktam antibiyotiği bulunmaktadır. Bakterisidal etki göstermeleri ve yan etkilerinin az olması nedeniyle tercih edilmekle birlikte, yukarıda özetlenen nedenlerden ötürü bu antibiyotiklere karşı da patojenlerin direnç geliştirmesi söz konusudur. Bu yüzden mevcut antibiyotiklerin etkinliğini korumak ve kullanım ömürlerini uzatmak için bazı tedbirler alınması elzemdir. Tabii ki direnç oluşumunu engelleyecek ya da geciktirecek tedbirlerin alınmasının yanı sıra patojenlerin sahip

olduğu direnç seviyelerinin izlenmesi ve bu dirence katkıda bulunan yapıların tespiti de, bu hususta hayati öneme sahiptir.

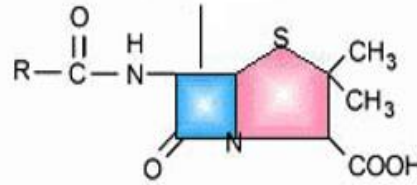
Özetle; enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde önemli enstürmanlar olan beta-laktam antibiyotiklerine karşı direnç geliştiren patojenlerin tespiti ve karakterizasyonu, bu grupta yer alan antibiyotiklerin etkinlerinin korunması adına alınacak tedbirlere yön verebilebilecek olması açısından önemlidir. Farklı kaynaklardan özellikle hayvansal gıdalardan elde edilen bakteriyel patojenleri hedef alan çalışmalar da bu konuda önemli bir veri kaynağıdır.

Bu çalışma kapsamında Ağrı İli ve çevresinden elde edilen bazı çiğ süt örneklerinden, geniş spektrumlu beta-laktamaz üreten bakteri strainlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır.

2. KURAMSAL TEMELLER

2.1. Beta-Laktam Antibiyotikleri

Beta laktam antibiyotikleri, kimyasal yapısında ortak beta-laktam halkası (Şekil 1) taşıyan, hücre duvarı sentezini inhibe ederek antibakteriyel etki gösteren geniş bir antibiyotik grubudur (Gür vd 2008). Yan etkilerinin az olması ve bakterileri öldürücü etkiye sahip olmalarından dolayı günümüzde daha çok kullanılan antibiyotiklerin içerisinde bulunur.

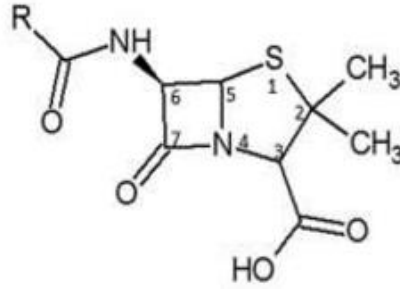


Şekil 1. 6-APA (amino penicillanic acid) (Murray et al. 2009)

Beta-laktam antibiyotikleri ilk defa 1928'de besiyerine tesadüfen düşen *Penicillium nonatum* isimli mantarın çevresinde Stafilokok türü bakterilerin çoğalmamasıyla dikkatleri çekmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda 1949 yılında penisilin G keşfedilmiştir (Aydemir vd 2005). İlerleyen süreçte diğer beta-laktam antibiyotikleri, beta-laktam halkasına bağlı aminoasitler üzerinde yapılan modifikasyonlarla türevlendirilmiştir. Beta-laktam antibiyotikleri; penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler olmak üzere 4 grupta sınıflandırılırlar:

2.1.1. Penisilinler

Penisilinlerin yapısında bir tane beta-laktam halka, bir tane tiazolidin halka bir tane de 6-amino penisillanik asit (6-APA) olarak bilinen yan zincir bulunur.



Şekil 2. Penisilin Yapısı (Palzkill 2013)

Penisilinler bakterilerin hücre çeperini oluşturan peptidoglikan sentezini engellerler. Hücre çeperinde yer alan Penisilin Bağlayıcı Protein (PBP)'lerin reseptörlerine bağlanarak bunu başarırlar. Beta-laktam antibiyotiklerin içerisinde en yaygın kullanım alanı olan penisilinler, *Penicillum nonatum* ve *Penicillum chrysogenum* mantarlarından elde edilirler. Tüm penisilin çeşitlerinde asıl yapıyı *Penisillum chrysogenum* mantarından elde edilen 6 amino penisillanik asit adı verilen organik asitten oluşur. Bakterilere karşı sağlıklı bir direnç göstermeleri için bu yapının korunması gerekir (Hare 1982).

Penisilinler, beta-laktam halkasının amino grubunun üzerinde bulunan yan zincirde oluşan değişikliklerle birbirlerinden ayrılırlar. Yan zincirde oluşan bu değişiklikler ilacın antibakteriyel özelliklerini değiştirebilir (Murray *et al.* 2009). Penisilinler kendi içerisinde 7 türe ayrılırlar:

Doğal penisilinler: Prokain penisilin G, Penisilin G, Benzatin penisilin G, Kristalize penisilin G, Penisilin V (Fenoksi metil penisilin).

Kliniklerde kullanımına başlatılan ilk ilaç doğal penisilinlerdir. Genellikle büyük baş hayvanlarda ve veteriner hekimlikte çoğunlukla kullanılan Penisilin G ve Penisilin V etki spektruma sahiptirler (Masoud *et al.* 2014).

Penisilinaza dayanıklı penisilinler: Oksasilin, Metisilin, Dikloksasilin, Nafsilin, İzaksazolil penisilin, Kloksasilin, Flukloksasilin.

Penisilinaza dirençli penisilinler yarı sentetik penisilinlerdir. Doğal penisilinlere ek olarak bir yan zincir ile üretilmiştir. Stafilokok bakterilerin sentezlediği penisilinaz enzimine karşı direnç gösterir (Sarı 2005).

Aminopenisilinler: Siklasilin, Ampisilin, Amoksisilin, Bakampisilin, Episilin, Pivampisilin.

Aminopenisilinler doğal penisilinlerin etki ettiği bakterilerin yanında, *Haemophilus influenzae* ve *Enterobacteriaceae* ailesindeki Gram negatif bakterilere karşı antimikrobiyel aktiviteye sahiptir. Bunun yanında beta-laktamazlara dayanıksızdırlar (Akova vd 2005).

Pseudomonaslara etkili penisilinler: Karbenisilin, İndanil Karbenisilin (Korindasilin), Tikarsilin.

Pseudomonaslara karşı etkili olan bu penisilinler, *Pseudomonas aeruginosa* da dahil pek çok aerob Gram negatif basil için etkili ilaçlardır. Hali hazırda Pseudomonaslara en etkili penisilinler Piperasilin ve azlosilinlerdir. Tümünün Gram pozitif bakterilere karşı etkileri penisilin G ve aminopenisilinlere göre daha da aşağı kalıyor. Bu grup penisilin varyantları beta laktamazlara karşı direnç göstermeyenlerdir (Sarı 2005).

Geniş spektrumlu pseudomonaslara etkili penisilinler: Azlosilin, Mezlosilin, Piperasilin.

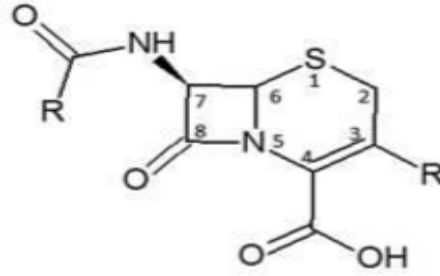
Geniş spektrumlu penisilinlerin içerisinde olan ve karboksipenisilin grubunda bulunan karbenisilin ve tikarsilin bulunduran preparatlar *Pseudomonas aeruginosa* bakterisinin oluşturduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılır. Bu grubun içerisinde olan antibiyotikler beta laktamazlara karşı dayanıklı değildir. Aminopenisilinler ile karşılaşıldığında *Enterobacter* türlerine daha çok etkinlik gösterirler (Akova vd 2005)

Amdinopenisilinler: Amdinosilin, Pivamdinosilin.

Beta-laktam inhibitörlü kombine penisilinler: Ampisilin/Sulbaktam, Amoksisilin/ Klavulonat, Tikarsilin/Klavulonat, Piperasilin/Tazobaktam.

2.1.2. Sefalosporinler:

Sefalosporinler, *Cephalosporium acremonium* mantarından elde edilirler. Penisilindeki beta-laktam halkasının yanında bulunan tiazolidin halkası yerine 6 üyeli dihidrotiazin halkasından meydana gelen 7- amino sefalosporinik asit (7-APA) çekirdeğinden türetilmiştir. Sefalosporinler bakterilerin hücre duvarında bulunan peptidoglikan salgısını engelleyip bakteri öldürücü etkisini gösterirler, tıpkı penisilinler gibi. Bakteriler üzerindeki etki durum çeşitliliğini incelemek ve tarih sıralaması açısından da sefalosporinler 4 gruba ayrılırlar (Sarı 2005).



Şekil 3. Sefalosporin Yapısı (Palzkill 2013)

1. kuşak sefalosporinler: sefalotin, sefazolin, sefaloridin, sefaleksim, sefapirin, sefradin, sefadroksil, sefasetril, seftezol.

1. kuşak sefalosporinlerin etkinlikleri birbirini andırır. Penisiline direnç gösteren Stafilokoklar da dahil Gram pozitif bakterilere etkilidir. Ama sefazolinin stafilokoklara etki alanı daha azdır. Etki alanının sınırlı olduğu alan ise Gram negatif bakterilerdir (Songer *et al.* 2012; Kaya 2013; Masoud *et al.* 2014).

2. kuşak sefalosporinler: sefuroksim, sefoksitin, sefamandol, sefonisid, sefonarid, sefaklor, sefotiam, sefmetazol, sefotetan.

2. kuşak sefalosporinler, 1. kuşağa ilaveten *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* türü bakterilerine de dirençle karşılık verir. 1. kuşağa nazaran streptokoklar ile stafilokoklara az etkiye sahip, Gram negatif basillere, anaeroblara daha çok etkilidir (Ahmed 2012; Masoud *et al.* 2014).

3. kuşak sefalosporinler: sefotaksim, seftizoksim, sefoperazon, seftriakson, moksolaktam, seftazidim, sefsulodin, sefmenoksim, sefpiramid.

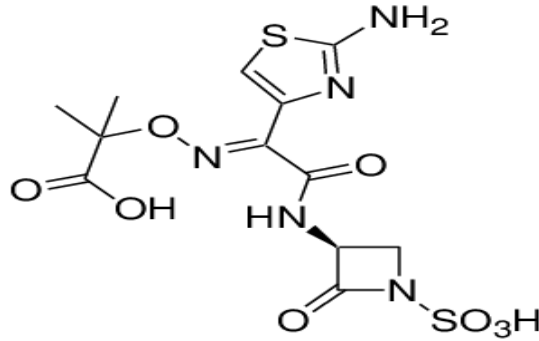
3. kuşak sefalosporinler, 1. ve 2. kuşak sefalosporinlere göre daha iyi etkilidir Gram negatifler için. Bunun aksine Gram pozitif olan koklara da 1. kuşak sefalosporinlere göre daha az etkilidir. Sefalosporinler Gram negatif basillere karşı yaygın ve geniş kullanım alanına sahiptir. Bununla beraber *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, indol (+) *Proteus*, *Providencia* ve *Serratia* bakterilerine de etkilidir (Harold *et al.* 1985; Şadan 2003; Akova vd 2005; Ahmed 2012; Masoud *et al.* 2014).

4. kuşak sefalosporinler: sefepim, sefpirom.

4. kuşak sefalosporinler, *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan bakterileri de kapsayan, Gram negatif bakterilere ve Gram pozitif bakterilere karşı yüksek bir dozda etkilidirler (Kaya 2013).

2.1.3. Monobaktamlar:

İlk sentetik monobaktam antibiyotik Aztreonam'dır. Aztreonamı salgılayan bakteri ise *Chromobacterium violaceum*' dir. Var olan mevcut yapısı bir tane beta laktam halka ve bir tane de yan zincirden ibarettir. Onu diğer beta-laktamalardan ayıran ise yapısındaki beta-laktam halkasına ekli başka halkanın bulunmamasıdır.

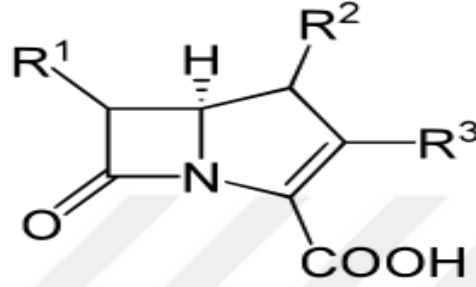


Şekil 4. Monobaktam Yapısı (Palzkill 2013)

Gram negatif bakterilere PBP'3 bağlanıp hücre duvarı sentezini engelleyen Aztreonam, Gram pozitif bakterilerin PBP'sine ise bağlanamaz. Etki alanı bu sebepten ötürü Gram negatif aerob bakterilerle sınırlıdır. Sık rastlanılan *K. pneumoniae*, *H. influenzae* gibi Gram negatif patojen bakterilere karşı etkindirler.

2.1.4. Karbapenemler:

Bilinen en geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiklerdirler. Karbapenemlerin diğer beta-laktam ajanlardan ayrılması sefalosporinlerde bulunan bir çift bağ bulunduran 5 üyeye sahip halka yapısında bulunan bir metilenin yerine bir sülfürün bulundurmasıdır (Mülazımoğlu 2010).



Şekil 5. Karbapenem Yapısı (Palzkill 2013)

Karbapenemleri oluşturan *Streptomyces cattleya* bakterisinin ürettiği tienamisin yapısındaki türevlerdir. Karbapenemler de penisilin ve sefalosporin gibi bakteri hücre duvarı yapımını engellemeyi penisilin bağlayan proteinlere bağlanarak gerçekleştirir (Bozkaya 2002).

Karbapenemlerin direnci diğer beta-laktam antibiyotiklerle mukayese edildiğinde daha düşüktür. Karbapenemler büyük bir oranda bakterilerin salgılamış oldukları GSBL ve AmpC gibi indüklenebilir beta-laktamaz enzimlere dayanıklı olurlar (Livermore *et al.* 2000).

2.2. Beta Laktam Antibiyotiklerin Etki mekanizması

Bakteri hücre duvarını oluşturan asıl polimer peptidoglikan tabakadır. Peptidoglikanın temel yapısı N-asetilglukozamin ve N-asetilmuramik asit moleküllerin sıralanmasıyla oluşan bir zincir şeklindedir. Peptit bağları ile çapraz bağlanarak bakteriyi sarar ve hücre duvarına şeklini verip ozmotik kuvvetlere karşı koruma görevi görür bu zincirler (Murray *et al.* 2009; Kaya 2013).

Geniş bir aile olan serin proteazların üyesi kimi özel enzimlerce katalize edilir bu zincir ve çapraz bağların yapısı. Bunlar transpeptidazlar, transglikozilazlar ve

karboksipeptidazlar olan düzenleyici enzimlerdir. Bu enzimlerin anılan başka bir isimleri ise penisilin bağlayan proteinlerdir (PBP) (Akova vd 2005; Hanlon *et al.* 2007).

Beta laktamlar etkilerini bakterinin hücre zarının üstüne bulunan ve bakterinin çeperi üzerinde bulunan peptidoglikan maddesinin sentezinden sorumlu olan Penisilin Bağlayıcı Protein olarak bilinen hedef proteinlere bağlanıp ortaya koyarlar.

Beta laktam antibiyotikler, kovalent bağ ile bu moleküllere bağlanarak peptidoglikan adlı maddenin sentezini engeller, böylelikle istenmeyen bakterilerin üremesine engel olmuş olurlar (Leung-Kei 2002; Jehl *et al.* 2004; Wilke *et al.* 2005; Babic *et al.* 2006; Demir 2006; Töreci 2008; Kaya 2013) .

Beta laktam antibiyotikler, hedef proteinlerine bağlansın ve etkinlik gösterebilir diye Gram negatif bakteriler üzerinde bulunan porin isimli proteinkanalıklarından geçmelidir ve bunun yanında sitoplazmik zar ile dış zar arasında bulunan periplazmik boşluk denilen bu boşlukta var olan beta laktamazlardan etkilenmemiş olmalıdır (Samaha-Kfoury *et al.* 2003).

Gram pozitif bakterilerde bulunan dış membran katmanı yerine, sitoplazmatik adında bir tane kalın peptidoglikan katmanı bulunmaktadır. Ya bu tabakaya yapışık halde ya da bakteri hücresinin çevresinde serbest bir şekilde yer alırlar beta laktamazlar (Akova vd 2005).

2.3. Beta Laktamazlar

Antibiyotikler henüz hedef bölgesine varamadan beta-laktamazlar, beta laktam halkasını parçalayarak inhibe ederler. Ayrıca beta laktamazlar, beta laktam halkasında bulunan amid bağlarını ayırıştırırlar. Substratları bulunan antibiyotiklerle karşılıklı bir şekilde etkileşimde bulunarak karmaşık bir ürün meydana getirirler. Daha sonrasında ise bu karmaşık ara ürün su ile parçalanır. Aktif enzim bir daha serbest hale gelir ve yeni beta laktam molekülleriyle etkileşim içinde olur. Meydana gelen beta laktam antibiyotiklerinin asidik devreleri etkisizleşir ve bununla beraber antibakteriyel özelliklerini kaybederler (Siu 2002; Büyükuysal 2003).

Anaerob bakteriler, Gram negatif bakteriler ve Gram pozitif bakteriler tarafından sentezlenirler. Gram pozitifler içerisinde beta laktamaz sentezleyen en

kaydadeğer patojen *Staphylococcus* spp.' dir. Stafilokoksik beta-laktamazlar bilerek penisilini parçalar, en gerekli de indüklenbilir ve hücre dışına salınırlar. Stafilokoksik beta laktamazları kodlayan genlerin taşınması ekseriyetle küçük plazmidlerle ve transpozonlarla gerçekleşir.

Beta-laktamaz üretimi olarak Gram negatif bakteriler Gram pozitif olanlardan daha çok sayıdadır. Enzim, Gram negatif olan bakterilerde periplazmik alanda mevcuttur ve bu sebepten ötürü düşük bir oranda enzim dahi, antibiyotiklerin sitoplazmadaki zara bağlı penisilin bağlayan proteinlere varmalarından evvel etkisizleşmesine sebebiyet verir.

Beta laktamaz enzimi üreterek beta-laktamaz antibiyotiklere direnç geliştiren bakterilerden biri de anaerob bakterilerdir. *Clostridium* ve *Fusobacterium*'ların beta laktamazlarının asıl görevi penisilini ayrıştırmalarıdır. *Bacteriodes* spp'ler kaynaklı üretilmiş olan beta laktamazlar ise ekseriyetle sefalosporinaz etkinliğini gösterirler.

2.3.1. Beta Laktamazların Sınıflandırılması

Bugüne dek süregelen zamanda 400 sularında beta-laktamaz enzimi tespit edilmiştir. Beta-laktamazların hem sayı hem tür olarak artışı bu enzimlerin sınıflandırılmasını güçleştirmiştir. Beta-laktamazların sınıflandırılmasında en sık kullanılan 2 sınıflandırma bunlardır (Bush *et al.* 1995; Shah *et al.* 2004; Paterson and Bonomo 2005; Harada *et al.* 2008):

- Ambler'in moleküler sınıflandırması
- Bush-Jacoby-Medeiros'un fonksiyonel sınıflandırması (Tablo 1)

Ambler moleküler sınıflandırma: Bu sınıflandırmada beta laktamazlar A-B-C-D isimli 4 grupta derlenmektedir. İçerik olarak A, B ve C beta laktam antibiyotiklerin hidrolizi için aktif bölgesi serin olan enzimler iken B grubunda ise aktif çinko enzimlerdir.

Sınıf **A** beta-laktamazlar; bu enzimlerin büyük bir kısmı plazmidlerle taşınır, aktif bölgelerinin içerisinde bir tane seri aminoasit bulunduran ve başlıca substratları penisilinler olan beta laktamazlardır.

Sınıf **B** beta-laktamazlar; bu enzimlerin çoğu karbapenamaz aktivitesi taşıyan ve aktif bölgelerinin içerisinde Zn^{+2} (Çinko) bağımlı bir thiol gurubu bulunduran metalloenzimlerdir.

Sınıf C beta-laktamazlar; kromozomal amp C geni ile kodlanan ve bu kodlanmadan ötürü Amp C tipi enzim olarak da anılan ve *Salmonella* spp. dışında tüm Gram negatif basillerin içerisinde bulunan beta laktamazlardır. Aktif bölgelerinde serin aminoasiti taşır ve asıl olarak sefalosporinaz niteliğinde olan beta laktamazlardır.

Sınıf D beta-laktamazlar; oksasilini hidrolize eden serin beta-laktamazlar bulunur (Gür 2002a; Paterson and Bonomo 2005; Murray *et al.* 2009; Bush and Jacoby 2010).

Bush-Jacoby-Medeiros Fonksiyonel Sınıflandırması: Biyokimyasal özellikleri ve substrat profillerini göz önünde bulunduran Bush, Jacoby ve Medeiros beta-laktamazları 1995'te 4 gruba ayırmışlardır. Günümüze dek süregelen zaman zarfında bu sınıflandırma kabul görülmüştür. Bu sınıflandırma Beta-laktamazların en yeni sınıflandırılmasıdır (Bush and Jacoby 2010).

Grup 1: Ambler'in moleküler sınıflandırmasında Sınıf C'de yer alan sefalosporinazlardır. Grup C beta-laktamazlar, penisilinlere oranla sefalosporinleri (genişlemiş spektrumlu sefalosporinler dahil) daha etkin olarak parçalarlar. Ekseriyetle indüklenebilme özelliğine sahip olan bu enzimler kromozomal enzimlerdir. Hemen hemen Gram negatif bakterilerin tümünde, *Salmonella* hariç, kromozomal grup 1 beta-laktamazlar mevcuttur. Lakin bunun yanında sentez miktarı bakımından değişkenlik gösterirler. Genler bu grupta enzimlerin yapısını meydana getirerek plazmidlerin içerisinde görülmekte ve *Enterobacteriaceae* spp. familyasından transfer yolu ile aktarılır. Klavunatlı antibiyotikler ve sulbaktamli antibiyotikler grup 1 beta laktamazlara etkide bulunmazlar. Kloksasilin ve aztreonam bu grubu inhibe eden antibiyotiklerdir. Karbapenem antibiyotiğine ise duyarlıdır.

Grup 2: Beta-laktamazların en geniş ve hacimli grubudur. İçeriğinde penisilinazlar, sefalosporinazlar, geniş spektrumlu beta-laktamazlar ve serin karbapenemazlar bulunur. Bu grupta bulunanların hepsi Ambler'in moleküller sınıflandırmasında sınıf A ve sınıf D içerisinde bulunur. Grup 2 beta laktamazlar sefalosporinleri, karbenisilini, karbapenemleri, penisilinleri ve monobaktamları parçalamalarına göre 6 alt gruba ayrılırlar. (Medeiros 1997).

2a: Bu alt grup içerisinde penisilini parçalayan ve klavulanik asite karşı duyarlı enzimler bulunur. Bu grupta bulunan enzimler penisilini sefalosporinlerden daha hızlı hidroliz eder. *Streptococcus aureus*'un enzimleri de bu grupta yer alır.

2b: Bu grubun içerisinde bulunan enzimler klavulonik asit ile engellenir bunun yanında penisilinleri ve sefalosporinleri hidrolize eder. Plazmidlerin kontrol altında bulunan "geniş spektrumlu" TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 enzimleri de bu alt grupta yer alır (Gür 1997). Bu enzimlerin geniş spektrumlu ismini almasının gerekçesi ise tikarsilin, karbenisilin, ampisilin, sefalotin gibi beta laktam antibiyotiklere karşı dirençli olmalarıdır. *Enterobacteriaceae* ailesinde yaygın olarak bulunur. (Gür 1997).

2be: 2b alt grubundan meydana gelir. Aynı zamanda içeriğinde genişlemiş spektrumlu beta-laktamazları (GSBL) barındırır. İçerisinde bulunan 'e' harfi geniş spektrumlu aktivitenin göstergesidir. Bünyesinde seftazidim, aztreonam sefotaksim gibi oksimino beta laktamazları barındırır ve bununla beraber klavulonik aside kuvvetli bir biçimde inhibe olurlar. *Klebsiella* ve *E. coli* türlerinde çok fazla görülürler. Bu grup içerisinde bulunan enzimlerden biri de PER-1 enzimidir ve bu enzim ilk defa türk izolatlarından izole edilmiştir (Yuluğ 1997).

2br: "r" harfiyle klavulonik asit ve sulbaktama bağlanmanın azaldığı gösterilmektedir. Bu gruba klavulanik asit etkisi altına girmeyen geniş spektrumlu beta laktamazlar alınmıştır. TEM ve SHV enzimlerinin inhibitörlere dirençli mutantları bulunmaktadır (Bush *et al.* 1995). TRC-1 enzimi ve TEM-30 ile TEM-36'ya kadar olan aralıkta bulunan enzimler bu gruptadır.

2c: Bu alt grup, Ambler'in moleküler sınıflandırmasında Sınıf A'da yer alır. Karbenisilini parçalayan, klavulanik aside ise duyarlı olan enzimler de bu grupta sınıflandırılır. Grup 2b'den ayrılmış olmalarının sebebi kloksasilin üzerindeki bazı etkileri ile karbenisilinin benzilpenisiline nazaran daha çok aktifliğini gidermesidir. PSE-1, PSE-3, PSE-4 enzimleri, *Moraxella catarrhalis*'in BRO-1 ve 2 enzimleri, *Aeromonas hydrophila*'nın kromozomal AER-1 enzimi bu gruptadır (Bush *et al.* 1995).

2d: Kloksasilini penisiline göre daha hızlı parçalayan beta laktamazları içerir. Enzimlerden, sulbaktama ve klavulanik asite dirençli olanlardır. Bu toplulukta beta-laktamazların büyük bir kısmı sodyum klorür sayesinde inhibe olur. Bu grupta

aynı zamanda OXA 14'ten OXA 22'ye kadar olan OXA enzim aralığı da vardır. Türkiye'de izole edilen bir türde OXA 11 enzimi bulunmuştur (Hall *et al.* 1993). Sadece bu alt grup moleküler sınıf D'de yer alırken grup 2'nin diğer alt gruplarındaki bütün enzimler, moleküler sınıf olarak, Sınıf A da yer alır.

2e: Bu alt grupta buluna sefalosporinazlar, genişlemiş spektrumlu sefalosporinleri parçalama kabiliyetindedirler. Grup 1'dekilerden farklı olarak inhibe olma yöntemi klavulanil asit ile mümkün olur. *Proteus vulgaris* ve *Bacteroides fragilis*'in kromozomal enzimi ve *Stenotrophomonas maltophilia*'nın kromozomal L-2 enzimi bu grupta yer alır (Bush 1989; Bush *et al.* 1995; Livermore 1995).

2f: Bu gruptakiler klavulanik asitle inhibe olurlar ve karbapenemleri parçalarlar (Bush *et al.* 1995). Moleküler sınıf A'da yer alırlar. Bu grupta, *Serratia marcescens*'in Sme-1, *Enterobacter cloacae*'nın kromozomal NMC-A enzimi (Gür 2002; Vural 2003; Bush *et al.* 2010) ve *E. cloacae*'nin indüklenebilen IMI-1 enzimi yer almaktadır (Vural 2003; Bush and Jacoby 2010).

Grup 3 (Metallo Beta-Laktamazlar): Monobaktamlar haricinde bütün beta laktamları ve karbapenemleri hidroliz edebilen bu beta-laktamazlar moleküler sınıflandırmada B sınıfında yer alır. Aktif bölgelerinde serin yerine bir Zn^{+2} iyonu bulunması bu beta laktamazları diğer enzimlerden farklı kılar. Bu gerekçeden dolayı beta-laktamaz inhibitörlerinden etkilenmez ama bunun yanı sıra EDTA ile inaktive olurlar. Bunlar 3 alt grupta tanımlanır (Gür 1996; Gülay 2003; Topçu ve Koç 2008; Poirel *et al.* 2000).

3a: Bu alt grup monobaktamları hidroliz edemezler fakat penisilin, karbapenem ve sefalosporinleri çok iyi hidroliz edebilirler. Penisilinleri karbapenemlere göre daha çabuk hidroliz eden IMP-1-8 ve VIM-1-3 enzimlerini barındırırlar (Demir 2006).

3b: Bu alt grupta ise penisilin ve sefalosporinlerin tersine hidroliz etme tercihi karbapenemlerdir. Bu enzimlerin hidrolitik aktiviteleri için bir çinko atomu gereklidir. *Aeromonas*'ın gerçek karbapenemazları bulunur (Demir 2006).

3c: Kapsam olarak yalnız *Legionella gormanii*'den yüksek sefalosporinaz aktiviteli olan metalloenzimleri barındırır.

Grup 4: Bu grubun oluşumu klavulanik asit ile iyi inhibe olmayan küçük bir penisilinazlar grubundan ibarettir. Hepsisi kromozamaldır bir tanesi hariç. Yapı olarak

halen de tam anlamıyla karakterize edilmeyip ve moleköl sınıfı belirsizdir. *Alcaligenes faecalis*, *Bacteroides fragilis* kromozomal enzimleri bu gruptadır (Bush *et al.* 1995).



Tablo 1. Beta-laktamaz grupları ve genel özellikleri

Beta-laktamaz Grubu	Alt grup	Molekül Sınıfı	Özellik
1		C	Genellikle Gram-negatif bakterilerdeki kromozomal enzimler (fakat plazmidde de kodlanabilir)
2		A.D	Klavulanik asit ile inhibe olmaz.
	2a	A	Çoğunluğu klavulanik asitle inhibe olur. Stafilokok ve enterokoklardaki penisilinazlar
	2b	A	
	2be	A	Çoğunlukla Gram-negatif bakterilerdeki geniş spektrumlu beta-laktamazlar (TEM-1, TEM-2, SHV-1)
	2br	A	Oksiimino sefalosporin ve monobaktamlara direnç oluşturan genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL)
	2c	A	İnhibitörlere dirençli TEM (IRT) beta-laktamazlar
	2d	D	
	2e	A	Bir tane SHV türevi Karbonisilini hidroliz eden enzimler Oksasilini hidroliz eden enzimler
	2f	A	Klavulanik asit ile az inhibe olurlar. Klavulanik asit ile inhibe olan sefalosporinazlar
3	3a,3b,3c	B	Karbapenemleri hidroliz eden, aktif bölgede serin içeren ve klavulanik asit ile inhibe olan enzimler Metallo-beta-laktamazlar
4		?	Klavulanik asit ile inhibe olmazlar. Diğer gruplara girmeyen dizileri belirlenmemiş enzimler

2.3.2. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL)

Beta-laktamazlarda en çok önem teşkil eden grup genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz olanlardır (GSBL).

Aktif bölgelerinde serin bulunan genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar, Ambler'in moleküler sınıflandırılmasında sınıf A ve sınıf D'de; Bush, Jacoby ve Medeiros'un yaptığı fonksiyonel sınıflandırılmasında ise 2be, 2d ve 2e gruplarında yer alırlar (Yüce 2001).

GSBL'ler, SHV-1, TEM-1, TEM-2 beta laktamaz meydana gelen mutasyonlar sonucunda, enzimin aktif bölgesinde meydana gelen aminoasit değişiklikleri sonucu ortaya çıkmıştır. Bu aminoasit değişikliklerinin, enzimin yapısında ve aktivitesinde değişikliklere neden olduğu bulunmuştur (Aktaş vd 2001; Öksüz 2005; Taşlı ve Bahar 2005).

Enzimde vücut bulan bu değişiklik sayesinde enzimin aktif bölgesi daha da genişlemekte, oksiminin yan zinciri taşıyan beta-laktam antibiyotikleri de bu bahsi geçen enzimlerin substratı haline gelmektedir. Böylelikle enzim substrat münasebetinin oluşturduğu aktif bölgede bundan ötürü yeni bir modelleme oluşmakta ve geniş spektrumlu sefalosporinler (sefotaksim, seftriakson, seftazidim, sefuroksim) ve bunlarla beraber aztreonamın da bu enzimlerin etki spektrumuna girmesi sağlanmaktadır.

Bu da şu anlama geliyor ki, enzimin kodunu oluşturan genin yapısında meydana gelen değişiklikten kaynaklı peptid yapısında aminoasit değişikliklerin ortaya çıkması GSBL'lere farklı olan bir substrat özgülüğünü sağlamaktadır.

Bu enzimler genellikle bakteri suşları ve türleri arasında yayılabilen büyük plazmidlerde kodlanmaktadır (Gülay 2001; Gür 2004).

Bakterilerin daha önce hiç tanımlanmamış beta-laktamazlar üretmesi üçüncü kuşak sefalosporinlerin kullanıma girmesinin akabinde başlamıştır. İlk GSBL olan SHV-2, *Klebsiella ozaenae* izolatında, 1983'te Almanya'da tanımlanmıştır. Bu enzimlerin "Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar (GSBL)" olarak isimlendirilmesinin sebebi tanımlanmış yeni beta laktamazın birincil olarak oksiminin sefalosporinler olmak üzere ve daha fazla sayıda geniş spektrumlu beta-laktam antibiyotiğe direnç geliştirmiş olmasıdır. (Paterson and Bonomo 2005; Perez *et al.* 2007a).

GSBL'ler klavulanik asit tarafından inhibe olabilen ve mikrobiyolojik olarak oksiminio sefalosporinleri hidroliz edebilen enzimler olarak tanımlanmaktadır. Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamazlar karbapenemlere ve sefamisinlere etki göstermezken tazobaktam, klavulanik asit ve az miktarda sulbaktam gibi beta laktamaz inhibitörlerine duyarlıdır (Bradford 2001; Murray *et al.* 2009).

GSBL'lar başta *K. pneumoniae* olmak üzere, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella morganii*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia cepacia*, *Acinetobacter baumannii* gibi pek çok Gram negatif, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Clostridium difficile* gibi Gram pozitif bakterilerde bulunabilmektedir (Bradford 2001; Mavroidi *et al.* 2001; Gür 2002b; Grohs *et al.* 2003; Vourli *et al.* 2003; Aydemir 2005; Gülay 2005; Öksüz 2005; Jacqueline *et al.* 2006; Bakri *et al.* 2009; Sedighi *et al.* 2017).

2.3.3. Geniş Spektrumlu Beta-Laktamaz Tipleri

İçinde olduğumuz son senelerde beta laktamazlarının miktarının hızlıca arttığı ve klinik açıdan bakıldığında da kaydadeğer yeni tip enzimlerin tanımlanmış olduğu görülmektedir. Bugün ise sayı olarak SHV türü beta laktamazların 60'ı, TEM türevi beta laktamazların sayısı 130'u geçmiştir.

GSBL'ler 2 gruba ayrılabilirler:

- TEM ve SHV türevi olan GSBL'ler
- TEM ve SHV dışı GSBL'ler

TEM ve SHV türevi enzimler, TEM-1, TEM-2 ve SHV-1 gibi enzimlerden nokta mutasyonuyla köken almış, geniş spektrumlu beta laktamazları hidroliz edebilen enzimlerdir (Samaha-Kfoury 2003).

TEM Grubu GSBL:

TEM-1 enzimi, Gram negatif bakterilerde en çok olan ve bunun yanında ampisiline direnç gösteren *E. coli*'lerin %90 gibi bir kısmında direnç yükümlülüğünü taşıyan enzimdir. Klavulanik asit tarafından inhibe edilir ve penisilinleri hidroliz eder (Chaudhary and Aggarwal 2004). İlk tespiti ise 1965'te Atina'da Temoneira isimli hastanın *E.coli* izolatından yapılmıştır bu sebepten dolayı TEM ismini almıştır.

Bu TEM-1 enzimi aynı zamanda *Haemophilus influenzae* ve *Neisseria gonorrhoeae*'de fazla sayıda görülen ampisilin ve penisilin direncinden sorumludur. Bu grubun sembolü, fazlasıyla birbirini andıran yapıdaki TEM-1 ve bu enzimin yapısında bulunan bir aminoasit değişikliği oluşmasının neticesinde meydana gelen TEM-2'lerdir. Diğer TEM tipi beta-laktamazlar da bunlarda bulunan aminoasit değişiklikleri ile türerler.

TEM-1 ve TEM-2 enzimleri sıklıkla transpozonlar tarafından kodlanan dar spektrumlu enzimler olup 1. kuşak sefalosporinleri ve penisilinleri hidroliz edebilme yeteneğine sahiptirler. Fakat oksiiimino-sefalosporinlere karşı herhangi bir aktiviteleri bulunmamaktadır (Gür 2004).

TEM-3 ile TEM varyantı olarak, ilk defa 1989'da rapor edilip, GSBL fenotipinde tanımlanmıştır. TEM-3 enzimi geniş spektrumlu sefalosporinlere karşı artmış bir aktivite gösterir. O günden bugüne süregelen zaman zarfında sayı ve tür olarak TEM grubu beta-laktamazlarda büyük bir artış gözlemlenmiştir.

TEM enziminin yapısında meydana gelen aminoasit değişkenleri sonucunda GSBL'ların dış görünüşlerinde yani fenotiplerinde önemli değişiklikler olmaktadır. Örneğin izoelektrik noktaları veya belirli oksiiimino-sefalosporinleri hidroliz etme özellikleri değişebilmektedir (Sturenburg and Marck 2003).

TEM grubu beta laktamazlar başta *E.coli* ve *K. pneumoniae* olmak üzere, *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* *Salmonella* spp. gibi *Enterobacteriaceae* üyelerinde sıkça bulunmaktadır. Daha nadir olarak *Pseudomonas aeruginosa*'da bildirilmiştir (Bradford 2001; Welthagen *et al.* 2003; Akova 2004; Gür 2004).

İtalya'da 2007 yılında *Acinetobacter baumannii* ile yapılan bir çalışmada izolatın TEM-92 tipi GSBL ürettiği rapor edilmiştir (Endimiani *et al.* 2007).

SHV Grubu GSBL:

Sulfhydryl variable'ın kısaltmasından dolayı bu ismi alırlar. SHV-1 en sık *Klebsiella pneumoniae*'de bulunup SHV grubu GSBL'ların öncüsüdür ve bu enzim genellikle kromozomal bir enzimdir. *Klebsiella*'da bulunan SHV-1 beta-laktamaz geninin kromozomdan plazmide aktarılabilir olarak diğer enterobakteriyal türlere de yayıldığı düşünülmektedir (Sturenburg and Marck 2003). Tirkasilin, ampisilin ve

piperasiline direnç oluşturmaktadır. Ancak oksiiimino-sefalosporine karşı aktivitesi bulunmamaktadır (Sturenburg and Marck 2003).

1983' te Almanya'da *Klebsiella ozaenae*'de SHV türü enzimlerin ilk türevi olan SHV-2 saptanmıştır. Bu enzim bir nokta mutasyonu sonucu, SHV-1 enziminin 238. Pozisyonu üzerinde bulunan glisin aminoasidi yerine serin amioasidinin geçmesiyle oluşmuştur (Knothe *et al.* 1983; Kliebe *et al.* 1985).

SHV-1 enziminden köken alan aminoasit değişikliği olan pozisyonlar ve enzim sayısı TEM grubu GSBL'ler ile GSBL'ler ile karşılaştırıldığında daha az olduğu görülür.

SHV gurubu GSBL'ler *Enterobacteraceae*'de daha yaygın olarak belirlenmiştir (Morris *et al.* 2003). Bunlar; *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella ozaenae*, *Acinetobacter spp.*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Citrobacter diversus*, *Morganella morganii*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia cepacia* bakterilerinde bulunabilmektedir (Bradford 2001; Al-Jasser 2006).

OXA Grubu GSBL:

OXA grubu enzimler Ambler'in moleküler sınıflandırması içerisinde grup D, Bush-Jacoby-Medeiros fonksiyonel sınıflandırmasında ise grup 2d'de bulunan enzimlerdir. Bu ismi almalarına kloksasilin ve oksasiline karşı büyük oranda afinite göstermeleri sebep olmuştur. Ampisilin ve sefalotine direnç gösterebilen bu enzimler klavulonik asit tarafından inhibisyon olarak güçlü değillerdir.

TEM ve SHV'de olduğu gibi aminoasit dizilerindeki nokta mutasyonları sonucu oksiiimino-sefalosporinleri hidroliz edebilen geniş spektrumlu enzimler haline gelmişlerdir (Livermore 1995; Naas *et al.* 1998). GSBL'lerin çoğu *E. coli*, *K. pneumoniae* ve *Enterobacteriaceae*'nın diğer üyelerinde bulunmalarına rağmen OXA tipi bu enzimler asıl olarak *P. aeruginosa*'da bulunurlar (Bush 1995; Bradford 2001).

Geniş spektrumlu OXA enzimlerinden ilki OXA-11 enzimidir ve Türkiye'de izole edilen bir *P. aeruginosa* suşunda bulunmuştur (Gülay 2001; Paterson and David 2006). Daha sonra Türkiye'de izole edilen *P. aeruginosa* suşlarında OXA-14,

OXA-15, OXA-16, OXA-17 beta laktamazları tanımlanmıştır (Gür 2004). Bu enzim genlerinin birçoğu genellikle transpozon, integron veya plazmid kontrolündedir.

CTX-M Grubu GSBL:

Substrat olarak sefotaksimi seçen ve son dönemlerde GSBL'lerin içerisine yeni bir grup olarak katılan, CTX-M olarak adlandırılan enzimlerdir. Her ne kadar seftazidimi az miktarda hidrolize ederse de bu özelliği klinik içerisinde dirence yol açacak kadar önem teşkil etmez. Bu grupta, tazobaktamın inhibitör etkisinin sulbaktam ve klavulanik asite göre daha fazla olması bu enzimlere önemli bir özellik kazandırmıştır.

Bauernfeind ve arkadaşlarıncı 1989'un ilk zamanlarında Almanya'da *Escherichia coli* bakterisinde ilk CTX-M beta-laktamaz saptanmıştır. CTX-M grubu bütün dünyada giderek *Enterobacteriaceae* familyası öncelikli olmak üzere farklı bakteri çeşitleri içerisinde süratle yayılıp büyümekte olan bir Genişlemiş Spektumlu Beta Laktamaz enzim grubu haline gelmiştir. CTX-M grubu beta laktamazlar SHV ve TEM grubu beta laktamazlar ile %40'tan az bir aminoasit benzerliği göstermekle beraber TEM ve SHV grubu beta-laktamazlardan köken almazlar. Bazı plazmid kontrolündeki CTX-M enzimlerinin *Kluyvera ascorbata*'nın kromozomal beta-laktamazından köken aldığı bilinmektedir (Bradford 2001; Woodford *et al.* 2004; Demir 2006; Murray *et al.* 2009).

Bugün itibari ile yaklaşık 40 tane CTX-M enzimi saptanmıştır. CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-14 en yaygın bulunan enzimler olup plazmid aracılığıyla yayılmaktadırlar (Bonnet 2004).

CTX-M enzimleri; *E. coli*, *Salmonella enterica*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter amalonaticus* ve *Acinetobacter baumannii* bakterilerinde rapor edilmiştir (Bauernfeind *et al.* 1996; Gniadkowski *et al.* 1998; Bonnet *et al.* 2000; Endimiani *et al.* 2007).

İnhibitörlere Dirençli (IRT) Beta-Laktamazlar:

İsim serüveni olarak inhibitörlere direnç gösteren beta-laktamazlar ilkin TRC (Klavulanik asite karşı dirençli olan TEM enzimi), sonrasında TRI (beta laktamaz inhibitörlerine karşı dirençli olan TEM enzimi) ve en sonunda da IRT (İnhibitörlere

dirençli TEM enzimi) olarak isimlendirilmişlerdir. IRT enzimleri, Bush–Jacoby–Medeiros’un fonksiyonel sınıflandırılmasında grup 2br’de yer alırlar (Akova 2004).

Beta-laktamaz inhibitörlerine karşı genellikle herhangi bir direnç yokken, 1997’de amoksisilin klavulanat birleşimine dirençli olan *E. coli* soyları saptanmaya başlanır. Saptanan bu yeni enzimlerin TEM-1 ve TEM-2 enzimlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşan yeni varyantlar olduğu belirlenir. Meydana gelen mutasyonlar sonucu, inhibitörlere dirençli beta laktamazlar (IRT) dar ve geniş spektrumlu sefalosporinler, piperasilin tazobaktamları, sefamisinleri ve karbapenemleri hidroliz etmezler. Ancak bu enzimler TEM ve SHV tipi enzimler oldukları için GSBL sınıfı içerisinde yer alırlar (Kartali *et al.* 2002; Sturenburg and Marck 2003).

IRT’ler, *E. coli* başta olmak üzere, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Shigella sonnei*, *Citrobacter freundii*’de de bildirilmektedir (Chaibi *et al.* 1999; Thomson *et al.* 2000; Bradford 2001; Gür 2004; Canton *et al.* 2008).

Diğer GSBL’ler:

Son zamanlarda GSBL enzimlerinden olup SHV, TEM, OXA ve CTX-M beta laktamazlardan köken almayan bazı enzimler tespit edilmeye başlanmıştır. Bu enzimler;

PER-1: PER-1 enzimi ilk olarak Fransa ülkesinde Türk bir hastadan izole edilen *Pseudomonas aeruginosa* suşunda saptanmıştır. Daha sonra ise *S. typhimurium* ve *Acinetobacter baumannii* izolatlarında tespit edilmişlerdir. PER-1 enzimi klavulanik asit ile inhibe olup, sefasporinleri ve penisilinleri hidroliz eder (Naas *et al.* 1998).

VEB-1: Saptanması ilk olarak Vietnam’da *E.coli* bakterisinde olup daha sonrasında Tayland’da *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* ve *Pseudomonas aeruginosa* izolatlarında tespit edilmiştir. Sefotaksim, seftazidim ve aztreonam’a büyük oranda direnç gösterip, klavulanik asitle inhibe olular (Poirel *et al.* 1999). Seftazidim haricindeki geniş spektrumlu sefalosporinlere hidrolitik aktiviteleri çoğunlukla yüksek iken penisilinlere karşı ise hidrolitik aktiviteleri düşüktür.

SFO-1: SFO-1 enzimi, *Serratia fonticola*'daki sınıf A beta-laktamazdır. Pek sık rastlanmayan bu enzim ilk defa 1988'de Japonya'da *Enterobacter cloacae* izolatında bulunmuştur. Hidrolize etmede SFO-1 enzimi sefotaksimi iyi, sefamisin ve karbapenemi zayıf, seftazidimi kötü bir şekilde hidroliz ederken imipenem ve klavulonata inhibe olmazlar (Bradford 2001).

BES-1: Bu enzimler ilk olarak 1996'da Brezilya'da *Serratia marcescens* suşundan izole edilmiştir. Aztreonama büyük oranda direnç gösterirken bunun yanında seftazidime göre sefotaksime daha dirençlidirler. *bla*_{BES-1} geni plazmid tarafından kodlanır ve fonksiyonel sınıflandırılmada grup 2be'de bulunur. BES-1'in, CTX-M-1 beta laktamazlar ile %48 oranında aminoasit benzerliği vardır. Klavulonata tarafından iyi bir şekilde inhibe edilirken tazobaktam ile inhibisyon zayıftır (Kamburoğlu 2011).

BEL-1: Bu enzim Belçika'da 2004 yılında bir *Pseudomonas aeruginosa* suşundan izole edilmiştir. BEL-1 enzimi diğer Ambler sınıf A GSBL'ler ile daha az oranda ilişkilidirler. BEL-1 enzimi klavulonata, moksalaktam, imipenem ve sefoksitin tarafından inhibe edilirken, çoğunluğu da geniş spektrumlu aztreonamı ve sefalosporinleri hidroliz ederler (Kamburoğlu 2011).

GES: GSBL'lerin ender görülen bir enzimidir. GES enzimi *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *K. Pneumoniae* bakterilerinde tespit edilmiştir. Bu enzim ilk kez *K. pneumoniae* izolatında Fransa'da saptanmıştır ve bu enzimin plazmid ve integron tarafından kodlandığı bildirilmiştir. GES enzimi karbapenemlere ve sefamisinlere etkili değilken geniş spektrumlu sefalosporinlere ve penisilinlere etkilidirler. GES enzimi aztreonam tarafından hidroliz edilmeyip, imipenem, tazobaktam ve klavulonata tarafından inhibe edilebilirler (Bradford 2001).

GES-1 enzimi çoğu GSBL'nin aksine aztreonamı hidroliz edemez (Naas *et al.* 2008). GES-1'in 170. Pozisyonunda bulunan aminoasidin değişmesi sonucunda GES-2 enzimi ortaya çıkar. Oluşan bu GES-2 enziminin imipeneme karşı aktivitesi artmışken (Harada *et al.* 2008; Naas *et al.* 2008) oksimino-sefalosporinlere karşı aktivitesi azalmıştır (Harada *et al.* 2008). Bunlara ek olarak GES-2 enzimi beta laktamaz inhibitörlerinden az oranda etkilenir. Diğer GES grubu türevlerinden olan GES-4, GES-3 ile kıyaslandığında beta laktamaz inhibitörlerince zayıf inhibe edilir ve bunun yanında karbapenemleri hidroliz edebilir (Harada *et al.* 2008). Tüm bu

özelliklerden farklı olarak GES-4'ün sefamisine karşı hidrolitik aktivitesi vardır (Harada *et al.* 2008; Naas *et al.* 2008).

2.4. Süt Örneklerinde GSBL Üreten Bakteriler Üzerine Yapılan Çalışmalar

Hammad *et al.* (2008), Japonya'da sağlıklı ineklerden elde ettikleri çiğ süt örneklerinde ilk kez SHV-60 enzimi üreten *K. pneumoniae* tanımlamışlardır.

Geser *et al.* (2012), 100 farklı çiftlikten topladıkları tank sütlerini temsil eden 100 çiğ süt örneğinin hiçbirinde GSBL üreten enterobakter varlığına rastlamadıklarını bildirmişlerdir.

Normanno *et al.* (2005), 2000-2002 yılları arasında İtalya'da yaptıkları araştırmada 437 çiğ süt örneği içerisinde 168 adet koagülaz pozitif *S. aureus* bulunduğunu belirtmişlerdir.

Khoshbakht *et al.* (2014), İran'da çeşitli süt ve peynir örneklerinden izole ettikleri *E. coli* izolatlarının %38'inin (n=150) fenotipik olarak GSBL ürettiğini ve en sık görülen enzimin CTX-M olduğunu (%80,7) bildirmişlerdir.

Bhoomika *et al.* (2016), çiğ sütlerde *E. coli* prevalansını %81,1 (n= 90) olarak tespit etmişler ve bu numunelerden elde edilen izolatların 9'unun (%12,3) GSBL üretimi açısından pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

Gündoğan ve Avcı (2013), çiğ süt, beyaz peynir ve dondurma (n= 60) örneklerinden izole ettikleri toplam 65 *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatının 21'inin (%32,3) fenotipik olarak GSBL yönünden pozitif olduğunu bildirmişlerdir.

Tekiner ve Özpınar (2016), analiz ettikleri 100 çiğ süttten 24 GSBL üreten *Enterobacteriaceae* (*E. coli* n=18, *K. pneumoniae* n=3), 50 çiğ süttten yapılmış peynir örneğinden ise 2 GSBL üreten *E. coli* izole etmişlerdir.

Temiz ve Öner (1988), Ankara'da biri özel sektöre ait, diğeri kamuya ait süt işletmedeki toplanan 335 adet çiğ süt örneklerini antibiyotik varlığı açısından incelemişlerdir. Özel sektöre ait işletmesinin %14,38'inin penisilin, %1,31'inin ise penisilin dışında diğeri inhibitör madde bulundurduğu ortaya çıkmıştır. Kamuya ait işletmedeki süt örneklerinin ise %6,04'ünün farklı oranlarda penisilin bulundurduğu saptanmıştır.

El-Sukhon *et al.* (2003), Ürdün'de 649 süt, dondurma, peynir örnekleri bakteriyolojik olarak incelenmiştir. Toplam 346 *Klebsiella* izolatı izole edilmiştir. *K. pneumoniae*, 63 (%9.7) izolatta tanımlanmıştır.

Rasheed *et al.* (2014), Hindistan ülkesinin Haydarabat adlı şehrinde 12 çeşit bölgeden 30 tane topladığı çiğ süt örneklerinde %6,7'sinde GSBL pozitif *E. coli* bulunduğunu saptamışlardır.

Geser *et al.* (2012), Nisan 2011 ayında İsviçre'de yapılan bir çalışmada kapsamlı bir süt işletmesinde 100 gün içerisinde toplanan 100 çiğ süt örneklerinden 67 tane *E. coli* izole edilmiştir ve bunlardan %1,5'inin GSBL üreten serotip olduğu tespit edilmiştir.

Randall *et al.* (2014), Galler ve İngiltere'de 103 ayrı çiftlikten aldıkları örneklerin içerisinde fazla miktarda *E. coli*'nin bulaştığını ve örneklerin %3,9'unda GSBL pozitif *E. coli* olduğunu saptamışlardır.

Farzana *et al.* (2009), yaptıkları bir çalışmada süt ürünlerinden izole edilen *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. izolatlarının antibiyotiklere dirençlilik durumunu araştırmışlar, *E. coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarının kloramfenikol antibiyotiğine direnç gösterirken *Enterobacter* spp. izolatlarının bu antibiyotiğe duyarlı olduğunu belirtmişlerdir.

Hadimli vd. (2001), yaptıkları bir çalışmada topladıkları mastisitli süt örneklerinden izole edilen 82 koagülaz pozitif, 25 koagülaz negatif olmak üzere toplam 107 sitofilokok suşunun antibiyotik duyarlılıklarını ve beta laktamaz aktivitelerini saptamayı amaçlamışlardır. Bu amaç doğrultusunda sitofilokok suşlarının antibiyotik duyarlılıklarını Muller-Hinton agar içerisinde Disk Difüzyon yöntemine göre belirlemişler. Yapılan antibiyotik testlerine göre 105'i yani %98'i danofloksasiline, enrofloksasiline ve amoksisilin+klovonik asite duyarlı, 104'ü yani %97,1'i sefaperazan+sulbaktam, 98'i yani %91,5'i ise kloksasiline duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sitofilokok suşlarının %39,3'ünün amoksisiline, %61,7'sinin penisiline ve %62,3'ünün ise ampisiline karşı dirençli olduğunu saptamışlardır.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan alet ve cihazlar

Çalışmalar süresince; otoklav, hassas terazi, saf su cihazı, pH metre, steril kabin, çalkalayıcı, -86 °C derin dondurucu, inkübatör, otomatik pipetler, mikroskop, manyetik karıştırıcı, santrifüj, themocycle, jel görüntüleme sistemi, mikrodalga fırın gibi temel cihazlar kullanılmıştır.

3.2. Çiğ süt örneklerinin toplanması

Çalışma kapsamında, Ağrı İli ve çevresindeki süt işletmelerinden 10'ar ml çiğ süt örneği aseptik teknikle alınarak, soğuk zincir koşullarında laboratuvara ulaştırılmıştır. Örnek alınırken lokasyon, tarih ve örnek alınan ineğin cinsi eş zamanlı olarak kaydedilmiştir.

Tablo 2. Aşkale köyünden alınan süt örnekleri

ÖRNEK NO	İNEĞİN CİNSİ	TARİH
1	Montofon	03.02.2021
2	Simental	03.02.2021
3	Simental	03.02.2021
4	Montofon	03.02.2021
5	Simental	03.02.2021
6	Simental	03.02.2021
7	Simental	03.02.2021
8	Yerli	03.02.2021
9	Simental	03.02.2021
10	Montofon	03.02.2021
75	Yerli	06.06.2021
76	Yerli	06.06.2021
77	Yerli	06.06.2021
78	Yerli	06.06.2021

Tablo 3. Murat köyünden alınan süt örnekleri

ÖRNEK NO	İNEĞİN CİNSİ	TARİH
11	Montofon	13.02.2021
12	Simental	13.02.2021
13	Simental	13.02.2021
14	Montofon	13.02.2021
15	Simental	13.02.2021
16	Simental	13.02.2021
17	Simental	13.02.2021
18	Yerli	13.02.2021
19	Simental	13.02.2021
20	Montofon	13.02.2021
79	Yerli	08.06.2021
80	Yerli	08.06.2021
81	Yerli	08.06.2021
82	Yerli	08.06.2021
83	Yerli	08.06.2021

Tablo 4. Balıksu köyünden alınan süt örnekleri

ÖRNEK NO	İNEĞİN CİNSİ	TARİH
21	Simental	13.02.2021
22	Simental	13.02.2021
23	Simental	13.02.2021
24	Simental	13.02.2021
25	Simental	13.02.2021
66	Simental	13.02.2021
27	Simental	13.02.2021
28	Montofon	13.02.2021
29	Simental	13.02.2021
30	Yerli	13.02.2021
31	Montofon	13.02.2021
32	Simental	13.02.2021
84	Yerli	15.06.2021
85	Yerli	15.06.2021
86	Yerli	15.06.2021
87	Yerli	15.06.2021

Tablo 5. Beşiktepe köyünden alınan süt örnekleri

ÖRNEK NO	İNEĞİN CİNSİ	TARİH
33	Simental	13.02.2021
34	Yerli	13.02.2021
35	Simental	13.02.2021
36	Simental	13.02.2021
37	Simental	13.02.2021
38	Simental	13.02.2021
39	Simental	13.02.2021
40	Simental	13.02.2021
41	Simental	13.02.2021
42	Simental	13.02.2021

Tablo 6. Haydaroğlu köyünden alınan süt örnekleri

ÖRNEK NO	İNEĞİN CİNSİ	TARİH
43	Yerli	28.02.2021
44	Yerli	28.02.2021
45	Montofon	28.02.2021
46	Simental	28.02.2021
47	Simental	28.02.2021
48	Simental	28.02.2021
49	Yerli	28.02.2021
50	Yerli	28.02.2021
51	Montofon	28.02.2021
52	Yerli	28.02.2021
53	Simental	28.02.2021
88	Yerli	02.072021
89	Yerli	02.072021
90	Yerli	02.072021
91	Yerli	02.072021
92	Yerli	02.072021

Tablo 7. Goncalı köyünden alınan süt örnekleri

ÖRNEK NO	İNEĞİN CİNSİ	TARİH
54	Montofon	28.02.2021
55	Simental	28.02.2021
56	Simental	28.02.2021
57	Simental	28.02.2021
58	Montofon	28.02.2021
59	Yerli	28.02.2021
60	Montofon	28.02.2021
61	Montofon	28.02.2021
62	Hoştayn	28.02.2021
93	Yerli	05.07.2021
94	Yerli	05.07.2021

Tablo 8. Toprak kale köyünden alınan süt örnekleri

ÖRNEK NO	İNEĞİN CİNSİ	TARİH
63	Yerli	28.02.2021
64	Yerli	28.02.2021
65	Montofon	28.02.2021
66	Montofon	28.02.2021
67	Yerli	28.02.2021
68	Simental	28.02.2021
69	Yerli	28.02.2021
70	Simental	28.02.2021
71	Simental	28.02.2021
72	Montofon	28.02.2021
73	Yerli	28.02.2021
74	Montofon	28.02.2021

3.3. Besiyeri ve Cözeltiler

3.3.1. Lauryl Broth

NaCl 10 g/L; pepton 10 g/L; maya ekstraktı 5 g/L olacak şekilde saf su içerisinde katılıp ısıtılarak çözdürüldükten sonra elde edilen besiyeri otoklav içerisinde 121°C’de 15 dakika steril edilmiştir.

3.3.2. Nutrient Agar

Paket üzerindeki hazırlanış prosedürüne bakılarak, Nutrient agar karışımı (Oxoid CM0309) 20 g/L olacak şekilde tartılarak saf su içerisinde çözdürüldükten sonra otoklav içerisinde 121°C’de 15 dk steril edilmiştir ve sonrasında besiyeri 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra aseptik şartlarda petrilere dökülerek bırakılmıştır.

3.3.3. Tryptic Soy Agar

Paket üzerindeki hazırlanış prosedürüne bakılarak Tryptic soy agar karışımı (Oxoid CM0131) 40 g/L olacak şekilde tartılarak saf su içerisinde çözdürüldükten sonra otoklav içerisinde 121°C’de 15 dk steril edilmiştir ve sonrasında besiyeri 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra aseptik şartlarda petrilere dökülerek bırakılmıştır.

3.3.4. Mueller Hinton Agar

Paket üzerindeki hazırlanış prosedürüne bakılarak, Mueller Hinton agar karışımı (Oxoid CM0337) 34 g/L olacak şekilde tartılarak saf su içerisinde çözdürüldükten sonra oluşan çözelti otoklav içerisinde 121°C’de 15 dk steril edilmiştir ve sonrasında besiyeri 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra aseptik şartlarda petrilere dökülerek bırakılmıştır.

3.3.5. MacConkey Agar

Paket üzerindeki hazırlanış prosedürüne bakılarak, MacConkey agar karışımı (Merck 10205) 50 g/L olacak şekilde tartılarak saf su içerisinde çözdürüldükten sonra oluşan çözelti içerisinde 121°C’de 15 dk steril edilmiştir ve sonrasında besiyeri 45°C’ye kadar soğutulduktan sonra aseptik şartlarda petrilere dökülerek bırakılmıştır.

3.3.6. Tryptone water

Kazein pepton 10 g/L; Sodyum klorür 5 g/L olacak şekilde saf su içerisine eklenip, manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözündürülmüş ardından karışımın pH'sı $7,3 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Son olarak besi yeri cam tüplere 10 ml olarak dağıtılmış ve otoklav içerisinde 121°C 'de 15 dk steril edilmiştir.

3.3.7. Metil-Red Voges Proskauer Broth (MR-VP Broth)

Et peptonu 7 g/L; dekstroz 5 g/L; dipotasyum fosfat 5g/L olacak şekilde saf su içerisine eklendikten sonra elde edilen çözelti manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak eritilmiş ve pH'sı $6,9 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Ardından cam tüplere 10'ar ml olarak dağıtılan besi yerleri 121°C 'de 15 dk otoklavlanmıştır.

3.3.8. Simmon's Sitrat Agar

Amonyum dihidrojen fosfat 1.0 g/L; dipotasyum hidrojen fosfat 1,0 g/L; sodyum klorür (NaCl) 5,0 g/L; sodyum sitrat 2,0 g/L; magnezyum sülfat 0,2 g/L; bromthymol blue 0,08 g/L; agar 13,0 g/L olacak şekilde saf su içerisine eklenerek elde edilen karışım manyetik karıştırıcı üzerinde çözündürülmüş ve pH'sı $6,6 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Ardından cam tüplere 7'şer ml olarak dağıtılan besiyerleri otoklav içerisinde 121°C 'de 15 dk steril edilmiştir. Son olarak steril edilen tüpler yatık agar elde etmek için çıtalar üzerine yatırılmış ve katılaşması için bekletilmiştir.

3.3.9. Fenol-Red Laktoz Broth

Proteaz pepton 10 g/L; et ekstraktı 1 g/L, sodyum klorid 5 g/L; fenol red 0,018 g/L; laktoz 5 g/L olacak şekilde saf su içerisine eklenmiştir. Elde edilen karışım manyetik karıştırıcı üzerinde ısıtılarak çözündürülmüş ve pH'sı $7,4 \pm 0,2$ 'ye ayarlanmıştır. Ardından cam tüplere 10'ar ml olarak dağıtılan besiyerleri otoklav içerisinde 121°C 'de 15 dk steril edilmiştir.

3.3.10. %95'lik Etil alkol

% 99,5'lik etanolden 95,4 ml alınarak saf su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.3.11. %30'luk Gliserol

70 ml steril saf su içerisine 30 ml gliserol eklenerek elde edilen çözelti otoklav içerisinde 121°C'de 15 dk steril edilmiştir.

3.3.12. %7'lik H₂O₂ çözeltisi

%30'luk H₂O₂'den 23,3 ml alınarak hacmi sdH₂O ile 100 ml'ye tamamlanmıştır.

3.3.13. %3'lük KOH çözeltisi

100 ml steril saf su içerisinde 3 g KOH konulup çözdürülerek istenen çözelti hazırlanmıştır.

3.3.14. 10X TBE tamponu

108 g Tris base ve 55 g borik asidi 900 ml steril saf su içerisinde çözdürüldükten sonra üzerine 40 ml 0,5 M Na₂EDTA eklenip pH: 8'e ayarlanmıştır. Toplam hacmi 1 litre olacak şekilde saf su ile tamamlanmıştır.

3.4. İzolasyon

Uygun koşullar altında laboratuvara getirilen örnekler ön zenginleştirme işlemi yapmak için, Skockova vd (2014) tarafından daha önce yapılan prosedürler bazı küçük modifikasyonlarla kullanılmıştır. Her süt örneğinde 1 ml alınarak, 1µg / ml konsantrasyonda sefotaksim içeren 9 ml Luria-Bertani (LB) Broth besiyerine inokule edilmiştir. Süt ve besiyeri iyice karıştıktan sonra 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Ön zenginleştirme işlemi tamamlandıktan sonra zenginleştirme ortamından, drigalski yardımı ile 1µg/ml konsantrasyonda sefotaksim içeren MacConkey agar besiyerine yayma ekim yapılmıştır. 37°C' de 24-48 saatlik inkübasyonun ardından gelişen koloniler saflaştırılarak TSA besiyerine transfer edilmiştir.

3.5. Morfolojik GSBL Doğrulaması

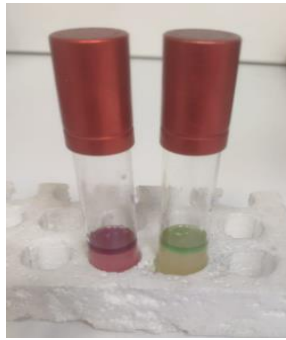
TSA besiyerine transfer edilerek geliştirilen bakteri strainleri, morfolojik GSBL doğrulaması için çift disk difüzyon testine tabi tutulmuştur. TSA'da geliştirilen bakterilerden, ~10⁵ kob / ml olacak şekilde süspansiyonlar hazırlanmış ve

ardından bu süspansiyonlardan 100 µl alınarak Mueller-Hinton besiyeri üzerine steril swap yardımı ile yayma ekim yapılmıştır. Daha sonra petrinin içerisine seftazidim (CAZ) / seftazidim- klavulonik asit (CZC) ve sefotaksim (CTX) / sefotaksim-klavulonik asit (CTC) diskleri yerleştirilmiştir. 37 °C’de 48 saat inkübe edilen besiyerleri incelenmiş ve diskler etrafında oluşan zonların çapı kaydedilmiştir. Klavulanik asit içeren disklerin etrafındaki zon çaplarının, içermeyen disklerin etrafındaki zon çaplarından 5 mm fazla olması durumunda bakteriler GSBL pozitif olarak kabul edilmiştir (Aydemir vd 2019). Tüm testler 3 tekrarlı olarak yapılmıştır. *K. pneumoniae* ATCC 700603 ve *E. coli* ATCC 35218 strainleri pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.

3.6. Biyokimyasal testler

3.6.1. İndol Testi

Stok kültürden öze ile alınan bakteriler Tryptone Water besiyeri bulunan tüplere ekimi yapıp üzerine isimleri yazılarak 24 saat 37°C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hazır olan kültürün üzerine 0,5 ml Kovacs İndol çözültisi (Merck 1.09293) eklenip hafif bir şekilde çalkalanmıştır. Birkaç dakika sonra hazırlanan besiyerinin üzerinde kırmızı bir halka oluşması testin pozitif (+), halka oluşmaması ise negatif (-) sonuç olarak değerlendirilmiştir.

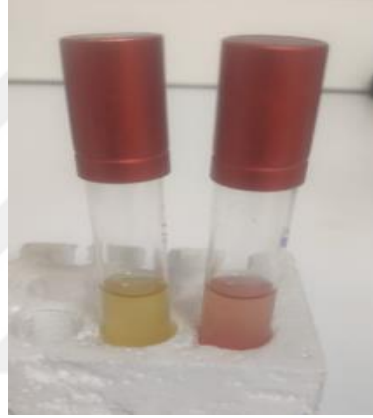


Şekil 6. İndol testi pozitif (solda) ve negatif (sağda) sonuç

3.6.2. Metil-Kırmızısı Testi (MR)

Daha önce stoğa alınmış bakteri kültüründen steril öze ile bir miktar alınıp MR-VP Broth (Merck 105712) besiyeri bulunan tüplere ekimi yapılmış ve 96 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan hazır olan besiyerinin üstüne 1 ml MR indikatörü eklenip hafifçe karıştırılmıştır. Bir süre sonra tüplerde kırmızı renk değişimi pozitif (+), sarı renk değişimi ise negatif (-) olarak yorumlanmıştır.

Metil-Kırmızısı İndikatörü; 0,1 g Metil-Red (Merck) 300 ml %95'lik etil alkolün içinde çözdürüldükten sonra distile su ile 500 ml'ye tamamlanarak hazırlanmıştır.



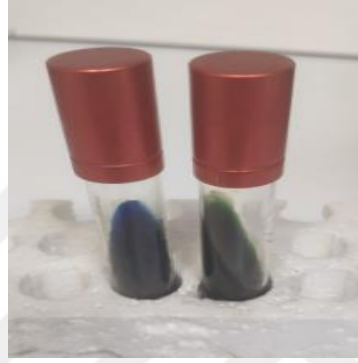
Şekil 7. Metil kırmızısı testi negatif (solda) ve pozitif (sağda) sonuç.

3.6.3. Voges-Proskauer Testi (VP)

İncelenmek istenen stok bakteriler, MR-VP Broth (Merck 105712) besiyeri bulunan tüplere ekimi yapılmış ve 48 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyondan sonra hazır olan kültürlerin içerisine 0,6 ml Baritt çözeltisi (alfa naphthol çözeltisi) eklenerek karıştırılmıştır. Sonrasında aynı tüpün üzerine 0,2 ml O'Meara çözeltisi (KOH çözeltisi) eklenip bir daha karıştırıldıktan bir süre sonra tüplerde kırmızı renk değişimi pozitif (+), sarı renk değişimi negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.6.4. Sitrata Testi

Stok kültürden alınan bakteriler daha önceden tüplere yatay olarak hazırlanmış Simmons Citrate Agar (Merck) besiyerinin üzerine ekimi yapılmıştır ve 48 saat 37 °C’de olacak şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonrası besiyeri incelenmiştir ve koyu mavi renk değişimi pozitif (+), herhangi bir renk değişimi olmaması negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.



şekil 8. Sitrata testi pozitif (solda) ve negatif (sağda) sonuç

3.6.5. Katalaz Testi

Daha önce nutrient agara ekimi yapılan ve 24 saat 37 °C’de inkübasyona bırakılarak geliştirilen bakterilerden steril bir öze ile alınarak lam üzerine konulmuştur. stne bir damla olacak şekilde H₂O₂ damlatılmıştır. Bu işlemler sonucunda kabarcık oluşumu gözlenen bakteriler pozitif (+), gzlenmeyenler ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.6.6. KOH Testi

Daha önce nutrient agara ekimi yapılan ve 24 saat 37 °C’de inkübasyonda bekletilerek geliştirilen bakterilerden steril ze yardımıyla alınıp lamın üzerine konulmuştur. zerine bir damla olacak şekilde % 3’lk KOH zeltisi damlatılmış ve krdan yardımıyla karıştırılıp yukarı kaldırılmıştır. Yukarı doğru snen bakteriler pozitif (+), sönmeyen bakteriler ise negatif (-) olarak değerlendirilmiştir.

3.6.7. Oksidaz Testi

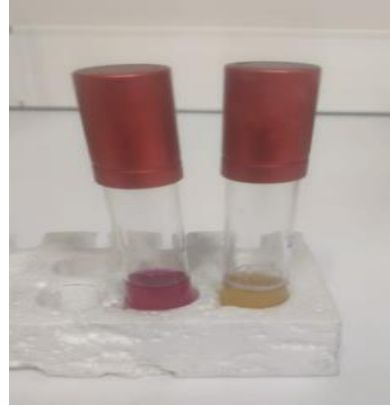
Bakteriler katı besiyeri üzerine ekim yapıldıktan sonra 37°C de 1-5 gün inkubasyona bırakılmış ve bekleme süresinin sonunda üreyen kolonilerin üzerine ayıraç (%0.5, tetrametil-p-fenilendiamin) damlatılmıştır. Üzerine ayıraç damlatılan kolonilerin 1-2 dk içerisinde mavi renk değişimi oksidaz pozitif olarak, renk değişiminin olmaması ise oksidaz negatif olarak yorumlanmıştır.



Şekil 9. Oksidaz testi sonuçlarına göre pozitif (solda) ve negatif (sağda) sonuç

3.6.8. Fenol-Kırmızı Laktoz Testi

Daha önce stoğa alınmış bakteri kültüründen siteril öze ile bir miktar alınıp Fenol-Kırmızısı Laktoz Broth besiyeri bulunan tüplere ekimi yapılmış ve 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. 18-24 saat inkübasyon sonrasında tüplerde sarı renk değişimi pozitif (+), kırmızı renk değişimi ise negatif (-) olarak yorumlanmıştır.



Şekil 10. Fenol kırmızısı laktoz testi pozitif (solda) ve negatif (sağda) sonuç.

3.7. DNA Ekstraksiyonu

DNA ekstraksiyonu için Qiagen otomatize sistem kullanılmıştır. Kısaca; bakteri strainleri Lauria Bertani broth besiyerinde, 37 °C'de 24 saat yatay çalkalayıcıda geliştirilmiş, ardından kültürler 5000 rpm'de, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Hasat edilen hücrelerden DNA ekstraksiyonu Qiagen DNA Mini Kit (Qiagen ID:51304) manüeline göre üretici firma tarafından önerilen izolasyon prosedürü takip edilerek yapılmış, izole edilen DNA'ların kalitesi nanodrop spektrofotometre ile ölçülerek, OD260 / OD280 değeri 1.8-2.0 aralığında olan DNA örnekleri daha sonra kullanmak üzere – 20 °C'de muhafaza edilmiştir.

3.8. Beta Laktamaz Tiplerinin Moleküler Analizi

In-vitro testlerde beta laktamaz üretimi pozitif olarak değerlendirilen strainlerin hangi tip beta laktamaz genlerine sahip olduğunu belirlemek için de PZR kullanılmıştır. Bu aşamada daha önceki çalışmalarda yaygın olarak bulunduğu ifade edilen TEM, SHV ve CTX-M grubu beta laktamaz genleri üzerine yoğunlaşmıştır. TEM geni için Chang vd. (2001), SHV geni için Paterson *et al.* (2003), CTX-M geni için ise Ali vd. (2016) tarafından daha önce takip edilen prosedürler, bazı küçük modifikasyonlarla kullanılmıştır. Özetle; 12,5 µl Taq 2X master mix (Fermentas), 1 µl 10 mM forward ve reverse primer ve 2 µl kalıp DNA içeren reaksiyon karışımının hacmi nükleaz içermeyen steril su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. İlgili gen bölgeleri; 95 °C'de 5 dk birinci denatürasyon, 35 döngü 95 °C'de 45 sn denatürasyon, 45 sn bağlanma (Tablo 9), 72 °C'de 90 sn uzama ve son olarak 72 °C'de 10 dk son uzama basamakları ile amplifiye edilmiştir. PZR ürünleri, etidium bromid ilave edilmiş %1,5'lik agaroz jel içerisinde, 90 V akımda 45 dakika yürütülmüştür. Ardından görüntüleme sistemine aktarılan jel üzerinde gözlemlenen DNA bantları değerlendirilmiştir. Pozitif kontrol olarak *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ve *Escherichia coli* ATCC 35218, negatif kontrol olarak ise steril su kullanılmıştır. Tüm testler 3 kez tekrar edilmiştir. Çalışmada kullanılan primer setleri, beklenen ampikon uzunlukları ve bağlanma sıcaklıkları Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Kullanılan primerler ve özellikleri

Primer (5' → 3')	Gen	Amplikon Uzunluğu	Bağlanma Sıcaklığı
ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	TEM / F	1080 bp	58°C
GACAGTTACCAATGCTTAATCA	TEM / R		
ATGCGTTATATTCGCCTGTG	SHV / F	747 bp	52°C
TGCTTTGTTATTCGGGCAA	SHV / R		
CGCTTTGCGATGTGCAG	CTX-M / F	550 bp	54°C
ACCGCGATATCGTTGGT	CTX-M / R		

3.9. 16S rDNA PZR ve Sekans Analizi

Bu aşamada daha önce çoğu çalışmada başarı ile kullanılan 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ve 1392R primerleri (5'-ACGGGCGGTGTGTRC-3') kullanılmıştır. PZR reaksiyonu kurulurken; 50 ng kalıp DNA, 2 µl 10X buffer (with MgCl), 0,4 µl dNTP mix (Sigma D7295), 0,25 µl U Taq DNA polymerase (Sigma T1806), 0,1 µl 100 µM forward ve reverse primer karışımının hacmi nükleaz içermeyen steril su ile 20 µl'ye tamamlanmıştır. Ardından thermocycle cihazına yüklenen örneklerin 16S rDNA bölgeleri; 95 °C'de 5 dk birinci denatürasyon, 95 °C'de 45 sn denatürasyon, 55 °C'de 45 sn bağlanma, 72 °C'de 90 sn uzama (30 döngü) ve son olarak 72 °C'de 10 dk son uzama basamakları ile amplifiye edilmiştir. PZR ürünleri, etidium bromid ilave edilmiş %1,5'lik agaroz jel içerisinde, 90 V akımda 45 dakika yürütülmüştür. Ardından görüntüleme sistemine aktarılan jel üzerinde gözlemlenen DNA bantları değerlendirilmiştir.

PZR ürünleri saflık ve kaliteleri açısından kontrol edildikten sonra dizileme için BM LABOSİS (Ankara / TÜRKİYE) firmasına gönderilmiştir. PZR ürünleri MAGBIO "HighPrep™ PCR Clean-up System" (AC-60005) saflaştırma kiti ile saflaştırılmıştır. Dizileme için, ABI 3730XL Sanger dizileme cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ve BigDye Terminator v3.1 Cycle Dizileme Kiti kullanılmıştır (Applied Biosystems, Foster City, CA).

27F ve 1392R primerleriyle elde edilen okumalardan konsensus dizi oluşturmak için BioEdit CAP contig assembly algoritması kullanılmıştır. Ardından konsensus diziler National Center for Biotechnology Information (NCBI) veri tabanı üzerinden kullanılan BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) yazılımı ile analiz edilmiş ve 16S rDNA bölgelerine göre tür tanı sonuçlarına ulaşılmıştır. Son aşamada sekans verileri gen bankasına yüklenmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. İzolasyon ve Morfolojik GSBL Doğrulaması

Bu çalışma kapsamında Ağrı ve çevresinde bulunan süt işletmelerinden toplamda 94 çiğ süt örneği alınmış ve bu örneklerden bakteri izolasyonları yapılmıştır. Alınan 94 çiğ süt örneğinden toplamda 113 bakteri straini izole edilerek saflaştırılmış ve stok çözelti içerisine alınarak çalışmalarda daha sonraki aşamalarda kullanılmak üzere -86°C’de muhafaza edilmiştir.

İzolasyon ve saflaştırma aşamalarından sonra stok kültürleri hazırlanan bakteri strainleri, LB agar besiyerine aktarılmış ve 24 saatlik taze kültürler KOH testi yapılmıştır. Ardından KOH testine göre Gram (-) olarak değerlendirilen 63 bakteri straini morfolojik GSBL doğrulaması için çift disk difüzyon testine tabi tutulmuştur. Yapılan değerlendirmeler sonucunda 20 strain GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir. Çalışmanın daha sonraki kısımları bu 20 strain ile sürdürülmüştür. Elde edilen sonuçlara göre Gram (-) olarak değerlendirilen bakteri strainlerinin %31,74’ü GSBL pozitifdir. GSBL pozitif olarak değerlendirilen strainlere ait çift disk difüzyon test sonuçları Tablo 10’da özetlenmiştir.

Başkan (2020) tarafından Amasya’da yapılan bir çalışmada farklı işletmelerden çiğ süt örnekleri alınarak izolasyonlar yapılmıştır. Bu çalışmada 68 çiğ süt örneği alındığı ve bu örneklerden *Enterobacteriaceae* familyasına ait 50 bakteri straini izole edildiği ifade edilmiştir. Bizim çalışmamızda GSBL pozitif negatif olarak değerlendirilen strainler hesaplamalara dahil edilmemiştir. Ancak izole edilen 63 adet Gram (-) bakteri straininin çoğunluğunun *Enterobacteriaceae* üyesi olduğu tahmin edilmektedir. Yukarıda ifade edilen ve GSBL pozitif olarak değerlendirilen 20 strainin de çoğunluğunun *Enterobacteriaceae* üyesi olduğu tespit edilmiştir.

Badri vd (2018) tarafından Sudan’da yapılan bir çalışmada ise araştırmacılar toplamda 70 çiğ süt örneğini incelemiş ve 52 adet GSBL pozitif bakteri straini izole ettiklerini bildirmişlerdir. Toplamda izole edilen strainlerin %43’ünün GSBL pozitif olduğu ifade edilmiştir.

Tepeli ve Zorba (2018) tarafından yapılan bir çalışmada ise çiğ süt ve peynir üretim hatlarından bakteri izolasyonları yapılmıştır. Araştırmacılar toplamda 64 bakteri straini izole ettiklerini ve bu strainlerin % 10.9'unda GSBL aktivitesinin doğrulandığını bildirmişlerdir.

Bizim çalışmamızda izole edilen Gram (-) bakteri strainlerinin %31,74'ü, izole edilen toplan bakteri strainleri açısından değerlendirildiğinde ise, strainlerin % 17,69'u GSBL pozitif olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çalışmalarda örnekleme zamanı ve örnek alınan hayvanların sağlık durumları gibi faktörlere bağlı olarak GSBL pozitif strainlerin yoğunluğunda değişimler gözlemlenmesi muhtemeldir. Ancak Genel itibari ile bizim çalışmamızda da çiğ süt örneklerinde GSBL pozitif strainlerin farklı frekanslarda ortaya çıkabileceği tespit edilmiştir.

Tablo 10. ESBL pozitif strainlere çift disk difüzyon test sonuçları

	CAZ30	CZC40	CTX30	CTC40
MAK10	9	13	0	10
MAK11	7	11	0	8
MAK12	21	26	17	23
MAK13	0	11	0	9
MAK14	12	26	20	24
MAK15	23	24	20	25
MAK16	16	26	26	31
MAK17	13	18	16	21
MAK19	20	25	14	23
MAK21	0	6	0	9
MAK25	10	15	10	16
MAK27	20	25	21	27
MAK28	18	25	24	30
MAK29	20	26	23	28
MAK30	15	24	24	28
MAK32	9	15	11	17
MAK33	19	24	20	26
MAK37	17	23	6	16
MAK40	14	24	11	26
MAK42	10	15	0	10
KP700603	9	14	15	21
EC35218	22	27	21	31

*CAZ30: seftazidim, CZC40: seftazidim+klavulanik asit, CTX30: sefotaksim, CTC40: sefotaksim+klavulanik asit,

4.2. Biyokimyasal Testler

Biyokimyasal testler planlanırken, izole edilecek bakteri strainlerinin büyük çoğunluğunun *Enterobacteriaceae* üyesi olacağı düşünülerek standart İMVİC testleri tercih edilmiş, bunlara ilaveten ayrımı kolaylaştırmak için KOH, oksidaz, katalaz ve laktoz fermentasyon testleri de uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar Tablo 11’de özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlar genel itibari ile literatür verileri ve (Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition, Volume 2), 16S rDNA sekans analizlerine göre yapılan tür tanı sonuçları ile de örtüşmüştür. Kimi strainler bazı testlerde zayıf pozitif sonuçlar vermiş ve bu şekilde kaydedilmiştir. Bu durumun

strainler arasında görülebilen varyasyonlara bağlı olarak ortaya çıkabileceği düşünülmektedir.

Tablo 11. Biyokimyasal test sonuçları

	İndol	MK	VP	Sitrat	Oksidaz	Katalaz	KOH	LF
MAK10	-	-	-	-	-	+	+	+
MAK11	-	-	-	-	-	+	+	+
MAK12	+	+	-	-	-	+	+	-
MAK13	-	-	-	-	-	+	+	+
MAK14	-	-	-	-	+	+	+	-
MAK15	+	+	-	-	-	+	+	Z ⁺
MAK16	+	+	-	-	-	+	+	-
MAK17	-	-	+	+	-	+	+	-
MAK19	+	+	-	-	-	+	+	-
MAK21	-	-	+	+	-	+	+	+
MAK25	+	Z ⁺	-	-	-	+	+	+
MAK27	+	-	+	+	-	+	+	+
MAK28	+	-	+	+	-	+	+	+
MAK29	+	+	-	-	-	+	+	+
MAK30	+	+	-	-	-	+	+	Z ⁺
MAK32	+	+	-	-	-	+	+	+
MAK33	+	-	+	+	-	+	+	-
MAK37	-	-	-	+	+	+	+	-
MAK40	+	+	-	+	-	+	+	+
MAK42	-	-	-	-	-	+	+	-
KP700603	-	-	+	+	-	+	+	+
EC35218	+	+	-	-	-	+	+	-

* (+): Pozitif, (-): Negatif, Z⁺: Zayıf pozitif, VP: Voges preskauer, LF: Laktoz fermentasyonu, MK: Metil kırmızısı

4.3. Beta Laktamaz Tiplerinin Moleküler Analizi

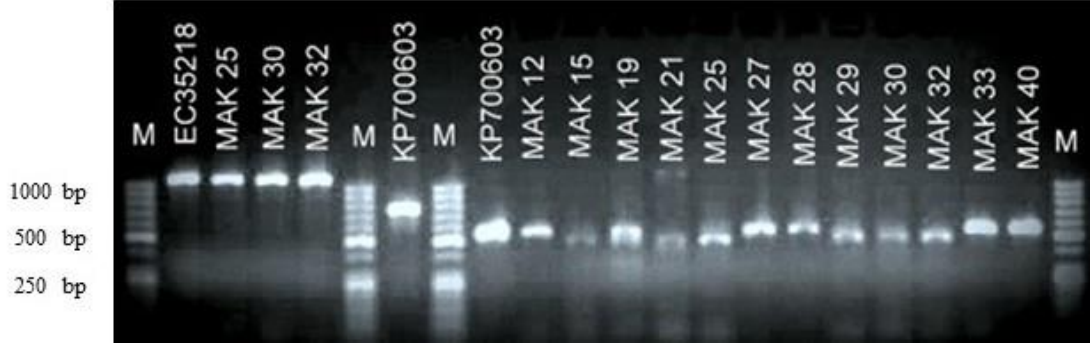
GSBL pozitif strainler için yapılan karakterizasyon çalışmalarında, PZR yardımıyla ilgili gen bölgeleri amplifiye edilmiş ve agaroz jelde görüntülenmiştir. Analizler sonucunda; izole edilen ve morfolojik GSBL doğrulama testlerinde pozitif olarak değerlendirilen hiçbir strainin SHV genine sahip olmadığı tespit edilmiştir. Pozitif kontrol olarak kullanılan *Klebsiella pneumoniae* 700603 straininden kullanılan primer çiftlerine spesifik ~ 747 bp'lik DNA bandı elde edilmiş ancak diğer strainlerde bu bant gözlemlenmemiştir. TEM genini barındıran strain sayısı 3 olarak kaydedilmiştir. Bu genin analizinde pozitif kontrol olarak *Escherichia coli* 35218

straini kullanılmış ve ~ 1080 bp'lik spesifik DNA bandı elde edilmiştir. Pozitif kontrol straini haricinde 3 strainde TEM genini işaret eden ~ 1080 bp'lik spesifik bantlar elde edilmiştir. CTX-M geni ise 12 strainde tespit edilmiştir. Bu gen içinde pozitif kontrol olarak *Klebsiella pneumoniae* 700603 straini kullanılmış ve 12 strainle birlikte pozitif kontrolde de ~550 bp'lik spesifik DNA bantları gözlemlenmiştir. 8 strain için herhangi bir gene dair spesifik PCR bandı elde edilememiştir. Yine bu 12 strainden 3 tanesi hem TEM hem de CTX-M genleri bakımından pozitif olarak değerlendirilmiştir. Araştırılan genlere dair spesifik bant eldesi olmayan 8 strainin farklı GSBL genlerine (PER, VEB, GES gibi) sahip olabileceği düşünülmektedir. Öte yandan CTX-M'e dair çok sayıda varyant olması ve varyant sayısının her geçen gün artmasının da bu duruma neden olabileceği düşünülmektedir. Bu analizlere dair veriler de aşağıdaki Tablo 12'de, spesifik PZR bantları ise Şekil 11'de verilmiştir.

Tablo 12. Test edilen GSBL genlerine ait sonuçlar

	TEM	SHV	CTX-M		TEM	SHV	CTX-M
MAK10	N	N	N	MAK27	N	N	P
MAK11	N	N	N	MAK28	N	N	P
MAK12	N	N	P	MAK29	N	N	P
MAK13	N	N	N	MAK30	P	N	P
MAK14	N	N	N	MAK32	P	N	P
MAK15	N	N	P	MAK33	N	N	P
MAK16	N	N	N	MAK37	N	N	N
MAK17	N	N	N	MAK40	N	N	P
MAK19	N	N	P	MAK42	N	N	N
MAK21	N	N	P	KP700603	N	P	P
MAK25	P	N	P	EC35218	P	N	N

* N: negatif, P: pozitif



Şekil 11. TEM, SHV ve CTX-M genleri için spesifik PZR sonuçları (M:marker)

Literatürde süt ve süt ürünlerinden GSBL pozitif bakteri strainlerinin tanısı ve karakterizasyonunu amaçlayan çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Krahulcova *et al.* (2022) yaptıkları çalışmada çiğ süt örneklerinden GSBL pozitif bakteri strainlerini izole etmiş ve karakterizasyonlarını yapmışlardır. Araştırma sonuçlarına göre GSBL pozitif olarak değerlendirilen strainlerden % 25'ini OXA, % 19'unun TEM, % 14'ünün ise SHV tipi beta laktamaz genine sahip olduğu ifade edilmiştir.

Başkan (2020) tarafından Amasya'da yapılan bir çalışmada farklı işletmelerden 68 çiğ süt örneği alınmıştır. Bu çalışmada elde edilen 50 izolat TEM ve SHV grubu beta laktamaz genlerinin belirlenmesi amacıyla PZR'ye tabi tutulmuştur. Yapılan analizler sonucunda strainlerin % 4'ünde SHV, %12'sinde ise TEM genine rastlanmıştır.

Alkarsh *et al.* (2019) tarafından Hindistan'da yapılan bir çalışmada ise çiğ süt örneklerinden, GSBL pozitif *Escherichia coli* ve *Salmonella spp.*'nin izolasyonu yapılmıştır. Araştırmacılar GSBL pozitif strainlerde TEM geni frekansının % 56,66, CTX-M geni frekansının % 40 ve SHV geni frekansının % 26,66 olarak kaydedildiğini bildirmişlerdir.

Badri *vd.* (2018) tarafından Sudan'da yapılan bir çalışmada ise toplanan 70 süt örneğinden 52 adet GSBL pozitif bakteri straini izole edilmiştir. Çalışma sonucunda bu izolatlardan % 61'inde CTX-M , % 23'ünde SHV, % 16'sında ise TEM geni tespit edildiği bildirilmiştir.

Tekiner and Özpinar (2016) tarafından yapılan bir başka çalışmada ise tavuk eti, çiğ süt ve peynir örneklerinden izolasyonlar yapılmıştır. Toplamda 55 GSBL

pozitif bakteri strainini izole edilmiş ve bunlara ait beta laktamaz gen frekanslarının; TEM için % 94,6, CTX-M için % 53,7 ve SHV için % 35,4 olduğu ve çok sayıda strainin 1'den fazla GSBL genine sahip olduğu da ifade edilmiştir.

Burada özetlenen çalışmalar ve literatürde yer alan diğer veriler göz önünde bulundurulduğunda süt ve süt ürünlerinin GSBL pozitif bakteri strainleri için uygun ortamlar olduğunu söylemek mümkündür. Genel itibari ile GSBL üretiminden sorumlu çok sayıda gen vardır. CTX-M, TEM, SHV, OXA, PER, GES, VEB, MIR tipi genler bunlara örnek olarak verilebilir. Bu çalışma kapsamında üzerinde çokça çalışılan ve yoğunluğunun olarak raslanıldığı bilinen CTX-M, TEM ve SHV tipi beta laktamaz genleri araştırılmıştır. Sonuçta; GSBL pozitif olarak değerlendirilen strainlerin % 60'ında (12/20) CTX-M, % 15'inde ise (3/20) TEM grubu beta laktamaz genlerinin varlığı tespit edilirken, SHV grubu beta laktamaz genine rastlanmamıştır.

Daha önceki çalışmalardan da görülebileceği üzere, GSBL pozitif strainlerde bu genlerin ortaya çıkış durumları ve frekansları değişkenlik göstermektedir. Kimi çalışmalar bir gen grubunun daha yoğun frekansına, kimileri ise başka bir gen grubunun daha yoğun frekansına işaret etmektedir. Bazı çalışmalarda ise belli gen gruplarına rastlanmadığı bildirilmektedir. Bu durumun çalışmaların yapıldığı yerlerdeki yetiştirme koşulları ve antibiyotik kullanım durumlarına bağlı olarak değişkenlik gösterdiği düşünülmektedir.

4.4. 16S rDNA PZR ve Sekans Analizi

İzole edilen ve GSBL pozitif olarak değerlendirilen bakteri strainlerinin moleküler tanısı 16S rDNA bölgeleri esas alınarak yapılmıştır. Yapılan analizlerde strainlere göre değişimle birlikte 1375 ila 1395 bp'lik DNA bölgeleri BLAST işlemine tabi tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre; 7 strain *Escherichia coli* olarak değerlendirilmiş ve BLAST benzerlik oranları % 99.64 ila % 98.63 arasında değişiklik göstermiştir. 4 strain *Stenotrophomonas maltophilia* olarak değerlendirilmiş ve BLAST benzerlik oranları % 99.43 ila % 98.78 arasında değişiklik göstermiştir. 3 strain *Klebsiella oxytoca* olarak değerlendirilmiş ve BLAST benzerlik oranı %99.28 olarak tespit edilmiştir. 1 strain *Pseudomonas*

stutzeri olarak değerlendirilmiş ve BLAST benzerlik oranı % 96.81 olarak kaydedilmiştir. 1 strain *Proteus vulgaris* olarak değerlendirilmiş ve BLAST benzerlik oranı % 98.19 bulunmuştur. 1 strain *Enterobacter cloacae* olarak değerlendirilmiş ve BLAST benzerlik oranı % 98.52 olarak bulunmuştur. 1 strain *Enterobacter sp.* olarak değerlendirilirken tür düzeyinde tanı sonucuna ulaşılammış ve BLAST benzerlik oranı % 97,42 olarak kaydedilmiştir. 1 strain *Pseudomonas aeruginosa* olarak değerlendirilmiş ve BLAST benzerlik oranı % 99.64 olarak bulunmuştur. Son olarak 1 strain *Citrobacter amalonaticus* olarak değerlendirilmiş ve BLAST benzerlik oranı % 99.13 olarak tespit edilmiştir. 16S rDNA sekans analizi sonuçları ve BLAST algoritmsına göre benzerlik oranları Tablo 13’de özetlenmiştir.

Tablo 13. 16S rDNA sekans analizine göre tanı sonuçları

	Benzerlik oranı(%)	GenBank erişim numarası	Tanı sonucu
MAK10	99.35	OP060219	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
MAK11	98.78	OP060220	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
MAK12	98.63	OP060221	<i>Escherichia coli</i>
MAK13	99.43	OP060222	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
MAK14	96.81	OP060223	<i>Pseudomonas stutzeri</i>
MAK15	98.85	OP060224	<i>Escherichia coli</i>
MAK16	98.19	OP060225	<i>Proteus vulgaris</i>
MAK17	98.52	OP060226	<i>Enterobacter cloacae</i>
MAK19	99.64	OP060227	<i>Escherichia coli</i>
MAK21	97.42	OP060228	<i>Enterobacter sp.</i>
MAK25	99.42	OP060229	<i>Escherichia coli</i>
MAK27	99.28	OP060230	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MAK28	99.28	OP060231	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MAK29	99.28	OP060232	<i>Escherichia coli</i>
MAK30	99.50	OP060233	<i>Escherichia coli</i>
MAK32	99.13	OP060234	<i>Escherichia coli</i>
MAK33	99.28	OP060235	<i>Klebsiella oxytoca</i>
MAK37	99.64	OP060236	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
MAK40	99.13	OP060237	<i>Citrobacter amalonaticus</i>
MAK42	99.43	OP060238	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>

16S rDNA sekans analizlerine göre GSBL pozitif strainlerin % 35’i (7/20) *Escherichia coli* olarak değerlendirilmiştir. Yapılan birçok çalışmada da GSBL pozitif strainler arasında frekansı en yüksek olan tür *Escherichia coli* olarak kaydedilmiştir. Hassani *et al.* (2022) yaptıkları çalışmada 100 adet çiğ süt örneğinden izolasyonlar gerçekleştirdiklerini ve izole ettikleri strainlerin % 78’inin *Escherichia*

coli olduğunu ayrıca izole edilen *Escherichia coli* strainlerinde % 50 oranında TEM, % 6.4 Oranında ise SHV tipi beta laktamaz genlerine raslandığını bildirmişlerdir. Liu *et al.* (2021) tarafından Çin’de yapılan çalışmada 195 farklı işletmeden çiğ süt örneği alınmış ve bu örneklerden izolasyonlar yapılmıştır. Sonuçta alınan örneklerin % 64.4’ünden *E. coli* izole edildiği ve bu strainlerin değişen ferakanslarda CTX-M, TEM ve SHV tipi beta laktamaz genlerine sahip olduğu ifade edilmiştir. Ansharieta *et al.* (2021)’de yaptıkları çalışmada 200 çiğ süt örneğinden izolasyonlar yaptıklarını ve izole edilen strainlerin % 70.5’inin *Escherichia coli* olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca bu strainlerin sahip olduğu CTX-M ve TEM grubu beta laktamaz genlerinin varlığını da belirlemişlerdir.

Özpinar vd (2017) tarafından Sakarya, Kocaeli ve İstanbul’da farklı işletmelerden süt ve süt ürünü örnekleri alınarak izolasyonlar yapılmıştır. Bu çalışmada 135 çiğ süt örneği alındığı, bunlardan 29 tanesi GSBL pozitif bakteri straini izole edildiği, GSBL pozitif strainlerin 23 tanesinin ise *Escherichia coli* olduğu ifade edilmiştir. Yine Skockova *et al.* (2015) tarafından Çekya’da yapılan bir başka çalışmada 40 çiftlikten 263 çiğ süt örneği toplanmış ve incelenmiştir. Bu çalışmada toplam 270 izolat elde edilmiştir. Elde edilen bu izolatların %90 oranında *Escherichia coli* olduğu ifade edilmiştir.

Bir başka çalışmada Uyanık vd (2022) tarafından yapılan bir çalışmada Türkiye Karadeniz bölgesinden 150 çiğ süt örnekleri alınarak izolasyonları sonucu 47 adet GSBL pozitif bakteri strainleri elde etmişlerdir. Bu bakteri strainlerden %87,23 oranında *Escherichia coli* bulunduğu tespit edilmiştir. Literatür bilgisi göz önünde bulundurulduğunda verilerimizin mevcut literatür ile paralellik gösterdiğini söylemek mümkündür. Bizim çalışmamızda da izole edilen 20 GSBL pozitif bakteri straininin % 35 oranında *Escherichia coli* olduğu ve GSBL pozitif strainlerin çoğunluğunun bu türe mensup bakteri strainlerinden oluştuğu kaydedilmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre 4 strain ise *Stenotrophomanas maltophilia* olarak değerlendirilmiştir. El-Prince *et al.* (2019) yaptıkları çalışmada çiğ süt örneklerini de içeren süt ürünleri üzerinde çalışmış ve 90 çiğ süt örneğinde 25 *Stenotrophomanas maltophilia* straini izole ettiklerini bildirmişlerdir. Kaçar (2021) tarafından Burdur’da yapılan bir çalışmada çeşitli ilçelerden toplanan süt

örneklerinden %20 oranında *Stenotrophomanas maltophilia* tespit edilmiştir. Yine Lavigne *et al.* (2008) yaptıkları çalışmada izole ettikleri hastane kaynaklı *Stenotrophomanas maltophilia* strainlerinde CTX-M grubu beta laktamaz genlerinin varlığını tespit etmişlerdir. Abdel-Aziz *et al.* (2013)'de yaptıkları çalışmada klinik *Stenotrophomanas maltophilia* suşlarında GSBL üretiminin tehlikesine ilişkin değerlendirmeler yapmış ve bu organizmaları tespit etmek için rutin duyarlılık raporlarının hazırlanması gerektiğinden bahsetmişlerdir. Bu çalışmada da GSBL pozitif olarak değerlendirilen *Stenotrophomanas maltophilia* suşlarına rastlanmış olup benzer tehlikelerin hayvan kaynaklı gıdalar açısından da değerlendirilip direnç durumunun izlenmesi gerektiği düşünülmektedir.

Klebsiella spp'de gerek çevresel koşullarda gerekse hayvan kaynaklı gıdalarda bulunabilen 2021 ve GSBL üretimine rastlanan patojenler olarak bilinmektedir. Nahar *et al.* (2021) tarafından yapılan bir çalışmada çiğ süt örneklerinden GSBL pozitif *Klebsiella* spp. strainlerinin izolasyonu ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Araştırmacılar 200 çiğ süt örneğinden 30 *Klebsiella* spp. izole ettiklerini ve bunlardan 20 tanesinin GSBL pozitif olduğunu ifade etmişlerdir. 20 *Klebsiella* spp. straininde GSBL üretimi ise hem fenotipik hem de TEM ve SHV grubu genlerin varlığı ile genotip olarak doğrulanmıştır. Badri *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmada ise alınan çiğ süt örneklerinde *Klebsiella pneumoniae* strainlerinin yoğunlukta olduğu, izole edilen 36 *Klebsiella pneumoniae* straininden 26'sının GSBL pozitif olduğu kaydedilmiştir.

Tsuka *et al.* (2021) ise yaptıkları çalışmada hayvancılık açısından sıklıkla rastlanan türün *Klebsiella pneumoniae* olduğu ve bu yüzden *Klebsiella oxytoca*'nın fazla dikkat çekmediğini ancak ESBL pozitif *Klebsiella oxytoca* strainlerinin çiftlikler arasında yayıldığını ifade etmişler ve bu strainlerde CTX-M grubu GSBL geninin varlığını doğrulamışlardır. Bizim çalışmamızda da elde edilen *Klebsiella* strainlerinin her 3'ünün de 16S rDNA sekans analizlerine göre *Klebsiella oxytoca* olarak tanılanması dikkate değerdir. Kanımızca bu türün direnç durumu ve lokal olarak mı yoksa daha yaygın şekilde mi bulunduğu detaylı araştırmalar ile ortaya konulmalıdır.

16S rDNA sekans analizlerine göre, bu çalışmada GSBL pozitif olarak değerlendirilen 20 stinden 1 'i *Pseudomonas stutzeri*, 1'i *Pseudomonas aeruginosa*, 1'i *Proteus vulgaris*, 1'i *Enterobacter cloacae*, 1'i *Enterobacter* sp. ve 1'i ise *Citrobacter amalonaticus* olarak değerlendirilmiştir. Bu gruplara mensup bakteri strainlerinin de farklı kaynaklardan izole edilebildiği ve GSBL üretebildikleri bilinmektedir (Pagani *et al.* 2002; Kanamori *et al.* 2011; Amin *et al.* 2013; Begum *et al.* 2013; Karuppasamy *et al.* 2015; Laudy *et al.* 2017; Özpınar vd 2017; Alhaj *et al.* 2019). Bu çalışmada da daha önce farklı kaynaklardan izole edilen ve GSBL pozitif olarak değerlendirilen gruplara mensup toplamda 7 türe ait 19 GSBL pozitif bakteri straini elde edilmiş, 1 strainin tür düzeyinde tanısına ise ulaşamamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Süt, diğer gıdalar ile karşılaştırıldığında besin değeri en yüksek besinlerin içerisinde olduğu bilinmektedir. Yaşam için gerekli olan besin öğelerinin çoğunu içerir. Süt, içerisinde bulunan çeşitli maddeler yönünden insanlar için yararlı olduğu kadar mikroorganizmaların yaşamını devam ettirme açısından da uygun bir ortamdır. Bundan dolayı çiğ sütlerin içerisine havadan, yedikleri yemden, buldukları ahırdan, içtikleri sudan ya da sağım şekli ve sağıldıkları ortam gibi benzeri nedenlerden veya depolanması sırasında sütün içine bulaşan farklı farklı mikroorganizmalar ortamın uygunluğundan yararlanıp hızlı bir şekilde üremektedir. Bu da sütün içeriğinde istenmeyen durumları meydana getirmektedir.

Bu çalışmada, Ağrı İli'ni temsil etmesi açısından belirlenen farklı bölgelerden toplanan çiğ süt örneklerinde bulunan bakterilerin izolasyonu, tanı ve karakterizasyonu amaçlanmıştır. Araştırma sonuçlarına göre; Ağrı İli ve çevresinde çiğ süt örneklerinden, daha önce yapılmış çalışmalara benzer şekilde GSBL pozitif bakteri strainleri elde edilmiştir. Başka bir deyişle antibiyotik direnç sorununun gün be gün artarak karşımıza çıktığı görülmektedir. GSBL pozitif bakterilerin, süt yolu ile buzağılara aktarılması ve çiftlik hayvanları arasında transfer edilerek yayılması, buna bağlı olarak da çevreye ve insanlara geçişinin ilerleyen zamanlarda daha sık yüz yüze gelinecek bir tehlike olduğu aşikardır.

Bu sorunla mücadele edebilmek başka bir deyişle GSBL pozitif bakterilerin yayılımını engellemek için dirençli mikroorganizmaları ve direnç durumlarını izleyebilmek adına daha fazla çalışma, sürvey ve örnekleme yapılarak durumun sürekli kontrol altında tutulması, ayrıca çiftlik hayvanlarında da antibiyotik kullanımının kanun ve yönetmeliklerle sıkı denetimlere tabi tutulması gerektiği düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abdel-Aziz, N., Morsy, M.M.F., Amin, S.S., Mohammed, K.I., Alharbi, A.E., Alshami, I., 2013. Threatening problem of *Stenotrophomonas maltophilia* producing extended-spectrum beta-lactamases: prevalence and automated antibiotic susceptibility pattern. *Journal of Clinical Microbiology*, 2(2).
- Ahmed, M., 2012, Characterization and molecular epidemiology of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* derived from university hospitals of Egypt and Germany. PhD Thesis, Justus-Liebig-University Giessen, 1-10.
- Akova, M., 2004. Dikkat: Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz (GSBL) var!. *ANKEM Dergisi*, 18(2), 98-103.
- Akova, M., Kayaalp, S.O., 2005. Beta laktam antibiyotikler 1: Penisilinler. Editör: Kayaalp, S.O. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Hacettepe Taş Yayınevi, Ankara, 167-187.
- Aktaş, A.E., Şahin, Ü., Yiğit, N., Al, F., Tuncel, E., 2001. Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta laktamazların çift disk sinerji ve E-test yöntemleri ile araştırılması. *İnfeksiyon Dergisi*, 15(3), 325-328.
- Alhaj, N.A., Alsafani, M.S., Bahaj, S.S., 2019. Prevalence and potential risk factors of hospital acquired extended-spectrum beta-lactamase—producing proteus species. *Open Journal of Medical Microbiology*, 9(4).
- Ali, T., Zhang, L., Shahid, M., Zhang, S., Liu, G., Gao, J., Han, B., 2016. ESBL-producing *Escherichia coli* from cows suffering mastitis in China contain clinical class 1 integrons with CTX-M linked to *ISCR1*. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1931.
- Al-Jasser, A.M., 2006. Extended-spectrum β -lactamases (ESBLs): A global problem. *Kuwait Medical Journal*, 38, 171–185.
- Ambler, R.P. 1980. The structure of beta-lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 289, 321-331.
- Amin, H., Zafar, A., Ejaz, H., Jameel, N.A., 2013. Phenotypic characterization of ESBL producing *Enterobacter cloacae* among children. *Pakistan Journal of Medical Sciences*, 29(1), 144-147.
- Ansharieta, R., Ramandimanto, S.C., Effendi, M.H., Plumeriastuti, H., 2021. Molecular identification of bla_{CTX-M} and bla_{TEM} genes encoding extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from raw cow's milk in East Java, Indonesia. *Biodiversitas*, 22(4),1600-1605.
- Aydemir, H., 2005. *E. coli* ve *Klebsiella* spp. suşlarında GSBL araştırılması. Uzmanlık tezi, Ankara Dışkapı Eğitim ve Araştırma Hastanesi.
- Aydemir, Ö., Terzi, H.A., Özözen Şahin, E., Köroğlu, M., Altındiş, M., 2019. Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella*

- pneumoniae* suşlarında piperasilin/tazobaktam *in-vitro* etkinliği. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi, 4(2), 118-127.
- Babic, M., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., 2006. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta lactamases. Drug Resistance Updates, 9, 142–156.
- Badri, A.M., İbrahim, İ.T., Mohamed, S.G., Garbi, M.I., Kabbashi, A.S., Arbab, M.H., 2018. Prevalence of extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from raw milk samples in Al Jazirah State, Sudan. Journal of Molecular Biology, 7(1).
- Bakri, M.M., Brown, D J., Butcher, J P., Sutherland, A D., 2009. *Clostridium difficile* in ready-to-eat salads, Scotland. Emerging Infectious Diseases, 15, 817-818.
- Başkan, C., 2020. Determination of antibiotic susceptibility profile and Int11, *bla*SHV and *bla*TEM genes of raw milk origin *Enterobacteriaceae* isolates. Fen Bilimleri Dergisi, 16 (4), 403-407.
- Bauernfeind, A., Chong, Y., Schweighart, S., 1989. Extended broad spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* including resistance to cephamycins. Infektion, 17, 316-321.
- Bauernfeind, A., Stemplinger, I., Jungwirth, R., Ernst, S. ve Casellas, J., 1996. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 40 (2), 509-513.
- Begum, S., Salam, A.M., Alam, K.F., Begum, N., Hassan, P., Haq, J.A., 2013. Detection of extended spectrum β -lactamase in *Pseudomonas* spp. isolated from two tertiary care hospitals in Bangladesh. BMC Res Notes, 6(7).
- Bhoomika, S.S., Patyal, A., Eknath, G.N., 2016. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamases producing *Escherichia coli* in foods of animal origin and human clinical samples in Chhatisgarh. India Vet World, 9(9), 1392231–1400916
- Bonnet, R., Sampaio, J. L. M., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J., 2000. A novel CTX-M β -Lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. American Society for Microbiology, 44(7), 1936- 1942.
- Bonnet, R., 2004. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. Antimicrobial agents and chemotherapy, 48 (1), 1-14.
- Bozkaya, E., 2002. Tıbbi mikrobiyoloji 1. İstanbul tıp fakültesi mikrobiyoloji ve klinik mikrobiyoloji anabilim dalı, Nobel Tıp Kitapevi, 107-133.
- Bradford, P.A., 2001. Extended spectrum beta lactamases in the 21st Century. characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clinical Microbiology Reviews, 14(4), 933-951.

- Bush, K., Quinn, J.P., Miyashiro, D., Sahm, D., Flamm, R., 1989. Novel plasmid-mediated beta lactamase (TEM-10) conferring selective resistance to ceftazidime and aztreonam in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 1451- 1456.
- Bush, K., Jacoby, G.A., Mederios, A.A., 1995. A functional classification scheme for beta lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39 (6), 1211-1233.
- Bush, K., Jacoby, G.A., 2010. Updated functional classification of beta lactamases. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, 54 (3), 969–976.
- Büyüküysal, R.L., 2003. Antibiyotiklerde direnç sorunu. *The Journal of Clinical Pharmacology*, 1(2), 162-170.
- Canton, R., Novais, A., Valverde, A., 2008. Prevalence and spread of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, 14, 144-154.
- Chaïbi, E. B., Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Labia, R. ve Nordmann, P., 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43 (3), 573-581.
- Chang, F. Y., Siu, L.K., Fung, C.P., Huang, M.H., Ho, M., 2001. Diversity of SHV and TEM beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gene evolution in Northern Taiwan and two novel beta-lactamases, SHV-25 and SHV-26. *Antimicrobiology Agents Chemother*, 45(9), 2407–2413.
- Chaudhary, U., Aggarwal, R., 2004. Extended spectrum B-lactamases (Esbl) – an emerging threat to clinical therapeutics. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 22(2), 75-80.
- Demir, N., 2006. Gram negatif bakterilerde genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (gsbl) üretimine katkıda bulunan çeşitli risk faktörlerinin araştırılması. Uzmanlık Tezi, Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul.
- El-Prince, E., Amin, W.F., Thabet, S.S., Hanna, M.I.L., 2019. *Stenotrophomonas* species in milk and some dairy products. *Journal of Advanced Veterinary Research*. 9(1), 11-13.
- El-Sukhon, S.N., 2003. Identification and characterization of *Klebsiella* isolated from milk and milk products in Jordan. *Food microbiology*, 20(2), 225-230.
- Endimiani, K., Perez, F., Hujer, K. M. Bonomo, R., 2007. The continuing challenge of ESBLs. *Current Opinion in Pharmacology*, 5(7), 459-469.
- Farzana, K., Akhtar, S., Jabeen, F., 2009. prevalence and antibiotic resistance of bacteria in two ethnic milk based products. *Pakistan Journal of Botany*, 41(2), 935-943.

- Geser, N., Stephan, R., ve Hächler, H., (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing *Enterobacteriaceae* in food producing animals, minced meat and raw milk. BMC Veterinary Research, 8(21), doi:10.1186/1746-6148-8-21.
- Gniadkowski, M., Schneider, I., Pałucha, A., Jungwirth, R., Mikiewicz, B., Bauernfeind A., 1998. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: Identification of a New CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. Mechanisms Of Resistance, 42(4).
- Grohs, P., Kitzis, M.D., Gutmann, L., 2003. In vitro bactericidal activities of linezolid in combination with vancomycin, gentamicin, ciprofloxacin, fusidic acid, and rifampin against *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents Chemother, 47, 418-420.
- Gundogan, N., Avci, 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. African Journal of Microbiology Research, 7(31), 4059-4064.
- Gülay, Z., 2001. Antibiyotiklere direnç mekanizmaları ve çözüm önerileri: Beta laktamlara ve karbapenemlere direnç. Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 5, 210-229.
- Gülay, Z. 2003. Gram olumsuz bakterilerdeki direncin moleküler temelleri. İçinde Yüce A., Çakır N. İnfeksiyon Hastalıkları. İzmir Güven Kitabevi, 87-93.
- Gülay, Z., 2005. Gram negatif çomaklarda antibiyotik direnci: 2003-2004 Türkiye haritası. Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi, 19(2), 66-77.
- Gür, D. 1996. Beta-laktamazların sınıflandırılması. Flora Dergisi, 1, 80-86.
- Gür, D., 1997. Hastane infeksiyonlarında önem kazanan Gram-negatif bakterilerde antibiyotiklere direnç mekanizmaları. Hastane İnfeksiyonları Dergisi, 1, 38-45.
- Gür, D., 2002a. Beta laktamazlar. Hacettepe Tıp Dergisi, 33, 102-109.
- Gür, D., 2002b. enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. Bakterilerde Antibiyotiklere Karşı Direnç, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 17(2), 182-192.
- Gür, D., 2004. GSBL'lerin genel özellikleri ve gsbl tipleri, Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar yeni ve yeniden gündeme gelen infeksiyonlar. Bilimsel Tıp Yayınevi, 5-12.
- Gür, D., 2008. Bakterilerde antibiyotiklere karşı direnç. İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Ed: 'Topçu, A.W., Söyletir, G., Doğanay., Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 243-257.

- Hadimli, H.H., Ateş, M., Güler, L., Kav, K., Öncel, T., 2001. Mastitisli süt ineklerinden izole edilen stafilokokların β -Laktamaz aktiviteleri ve antibiyotiklere duyarlılıkları. *Veteriner Bilimleri Dergisi* 17, 21-25.
- Hall, L.M.C., Livermore, D.M., Gür, D., Akova, M., Akalın, H.E., 1993. OXA-11, an extended spectrum variant of OXA-10 (PSE-) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*, 37, 1637-44.
- Hammad, A.M., Ahmed, A.M., Ishida, Y., Shimamoto, T., 2008. First characterization and emergence of SHV-60 in raw milk of a healthy cow in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*, 70, 1269-1272.
- Hanlon, A., Taylor, M., Dick, J.D., 2007. agar dilution susceptibility testing. *Antimicrobial susceptibility testing protocols*. Ed (s): Schwalbe, R., Steele-Moore, L., Goodwin, A.C. CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida, 91–103.
- Harada, S., Ishii, Y., Yamaguchi, K., 2008. Extended-spectrum β -lactamases: Implications for the clinical laboratory and therapy. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 28(6), 401-412.
- Hare R., 1982. New light on the history of penicillin. *Medical history*, 26,1–24.
- Harold, C. Neu, M.D., 1985. Relation of structural properties of beta-lactam antibiotics to antibacterial activity. *The American Journal of Medicine*, 79(2), 2-13.
- Hassani, S., Moosavy, M.H., Gharajalar, S.N., Khatibi, S.A., Hajibemani, A., Barabadi, Z., 2022. High prevalence of antibiotic resistance in pathogenic foodborne bacteria isolated from bovine milk. *Scientific Reports*, 12, 3878.
- Jacqueline, C., Caillon, J., Grossi, O., Le Mabecque, V., Miegerville, A.F., Bugnon, D., Batarde, E., Potel, G., 2006. In vitro and in vivo assessment of linezolid combined with ertapenem: a highly synergistic combination against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 50, 2547-2549.
- Jehl, F., Chomarar, M., Weber, M., Gerard, A., 2004. Antibiyotik duyarlılık testinden reçeteye. *Biomerieux Yayınları*, 1(3), 129-202.
- Kamburoğlu, A., 2011. Genişlemiş-spektrumlu beta laktamaz üreten *Escherichia Coli* Ve *Klebsiella* spp. izolatlarında beta laktamaz direncinin polimeraz zincir reaksiyonu ile araştırılması. Yüksek lisans tezi, Sağlık bilimleri enstitüsü, Trabzon.
- Kanamori, H., Yano, H., Hirakata, Y., Endo, S., Arai, K., Ogawa, M., Shimojima, M., Aoyagi, T., Hatta, M., Yamada, M., Nishimaki, K., Kitagawa, M., Kunishima, H., Kaku, M., 2011. High prevalence of extended-spectrum β -lactamases and qnr determinants in *Citrobacter species* from Japan: dissemination of CTX-M-2. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66(10), 2255-2262.

- Kartali G., Tzelepi E., Pournaras S., Kontopoulou C., Kontos F., Sofianou D., Maniatis A.N., Tsakris A., 2002. Outbreak of infections caused by *Enterobacter cloacae* producing the integron-associated beta lactamase IBC-1 in a neonatal intensive care unit of a Greek hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(5), 1577- 1580.
- Karuppasamy C., Ralte, L., Malsawtluangi, L., Chawang, S., 2015. Prevalence of extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing pathogens in raw milk samples collected from Aizawl Town, Mizoram. *Online International Journal Available*, 5(1), 332-340.
- Kaya, S., 2013. Antibiyotikler. Veteriner farmakoloji. Editör: Kaya, S. Medisan Yayınevi, Ankara, 325-379.
- Khoshbakht, R., Moraveji, Z., Tabatabaei, M., Aski, S.H., 2014. Characterization of hemolysins of *Staphylococcus* strains isolated from human and bovine, southern Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*, 15(4), 326-330.
- Kliebe, C., Nies, B.A., Meyer, J.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M., Wiedemann, B., 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents and Chemotherapy*, 28(2), 302–307.
- Knothe, E., Shah, P., Kremery, V., Antal, M., Mitsushashi, S., 1983. Transfereble resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefomandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection*, 11, 315-317.
- Kovacs, N., 1956. Identification of *Pseudomonas pyocyanea* by the oxidase reaction. *Nature*, 170-173.
- Krahulcova, M., Cverenkárová, K., Olejníková, P., Micajová, B., Koreneková, J., Bírošová, L., 2022. Characterization of antibiotic resistant coliform bacteria and resistance genes isolated from samples of smoothie drinks and raw milk. *Foods*, 11(9), 1109-1324.
- Laudy, A.E., Rog, P., Król, K.S., Ćmiel, M., Słoczyńska, A., Patzer, J., Dzierżanowska, D., Wolinowska, R., Starościak, B., Tyski, S., 2017. Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. *PLoS One*, 12(6).
- Lavigne, J.P., Gaillard, J.B., Bourg, G., Tichit, C., Lecaillon, E., Sotto, A., 2008. Extended-spectrum beta-lactamases-producing *Stenotrophomonas maltophilia* strains: CTX-M enzymes detection and virulence study. *Pathologie Biologie*. 56(7-8), 447-453.
- Leung-Kei, S., 2002. Antibiotics: action and resistance in Gram negative bacteria. *Journal Microbiology Immunology Infection*, 35, 1-11.
- Liu, H., Meng, L., Dong, L., Zhang, Y., Wang, J., Zheng, N., 2021. Prevalence, antimicrobial susceptibility, and molecular characterization of *Escherichia*

- coli* isolated from raw milk in dairy herds in Northern China. *Frontiers in Microbiology*, 12.
- Livermore, D.M., 1995. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 557-584.
- Livermore, D.M., Woodford, N., 2000. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiology*, 3, 489-95
- Masoud, M. S., Ali, A.E., Nasr, N.M., 2014. Chemistry, classification, pharmacokinetics, clinical uses and analysis of beta lactam antibiotics: A review, *Journal Chemical Pharmaceutical Research*, 6 (11), 28-58.
- Mavroidi, A., Tzelepi, E., Tsakris, A., Miriagou, V., Sofianou, D., Tzouveleki, S., 2001. An integron associated beta lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended spectrum beta lactamase IBC-1. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 627-630.
- Medeiros, A.A., 1997. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clinical Infectious Diseases*, 24, 19-45.
- Morris, D., O'Hare, C., Glennon, M., Maher, M., Corbett-Feeney, G., Cormican, M., 2003. Extended-spectrum β -lactamases in Ireland, including a novel enzyme, TEM-102. *American Society for Microbiology*, 47(8), 2572-2578.
- Murray, P.R., Baron, E., Jorgensen, J.H., Landry, M.L., Pfaller, M.A., 2009. *Klinik mikrobiyoloji. Atlas Kitapçık*, 1077-1083.
- Mülazımoğlu, L. 2010. 1986'dan günümüze karbapenemler. *Ankem Dergisi*, 24(2), 33-35.
- Naas, T., Sougakoff, T.W., Casetta, A. and Nordmann, P. 1998. Molecular characterization of OXA-20 a novel class D beta-lactamase and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobiology Agents Chemother*, 42, 2074- 2083.
- Naas, T., Poirel, L. ve Nordmann, P., 2008, Minor extended spectrum beta-lactamases, *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 14, 42-52.
- Nahar, A., Islam, A. A., Islam, M. N., Alam, M.M., 2021. ESBL-producing *Klebsiella* spp. isolated from raw milk of healthy cow in small holder dairy farms of Mymensingh district in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*, 19(2).
- Normanno, G. Firinu, A., Virgilio, S., Mula, G., Dambrosio, A., Poggiu, A., Decastelli, A., Mioni, R., Scuota, S., Bolzoni, G., Di Giannatale, E., Salinetti, A.P., La Salandra, G., Bartoli, M., Zuccon, F., Pirino, T., Sias, S., Parisi, A., Celano, G.V., 2005. Coagulase-positive *Staphylococci* and *Staphylococcus aureus* in food products marketed in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 98(1), 73-79.

- Öksüz, L., 2005. Genişlemiş spektrumlu beta laktamaz oluşturan *E.coli* ve *Klebsiella* suşlarında izoelektrik fokuslama yöntemi ile beta laktamaz tiplerinin saptanması ve plazmid profil analizi. Doktora tezi, İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü, İstanbul.
- Özpinar, H., Tekiner, İ.H., 2016. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae* from foods of animal origin. *Food Microbiology*, 47(2).
- Özpinar, H., Tekiner, İ.H., Sarıca, B., Çakmak, B., Gökalp, F., Özadam, A., 2017. Phenotypic characterization of ESBL- and AmpC- type betalactamases in *Enterobacteriaceae* from chicken meat and dairy products. *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 64, 267-272.
- Pagani, L., Migliavacca, R., Pallecchi, L., Matti, C., Giacobone, E., Amicosante, G., Romero, E., Rossolini, G.M., 2002. *Proteus mirabilis*'te gelişen genişletilmiş spektrumlu β -laktamazlar. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1549-1552.
- Palzkill, T., 2013. Metallo- β -lactamase structure and function. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277, 91-104.
- Paterson, D.L., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Yeiser, B., Bonomo, M.D., Rice, L.B., Bonomo, R.A., and the International *Klebsiella* study group., 2003. Extended spectrum b-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV-and CTX-M-type b-lactamases. *Antimicrobial Agents Chemother.* 47, 3553–3560.
- Paterson, D.L., Bonomo, R.A., 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18 (4), 657-686.
- Paterson, M.D., David, L., 2006. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *American Journal of Infection Control*, 34(5), 520-528.
- Perez, F., Endimiani, A., Hujer, K. M. ve Bonomo, R. A., 2007a. The continuing challenge of ESBLs. *Current opinion in pharmacology*, 7(5), 459-469.
- Poirel, L., Naas, T., Guibert, M., Chaibi, E.B., Labia, R., Nordmann, P., 1999. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. *American Society for Microbiology*, 43(3), 573-581.
- Poirel, L., Nicolas, D. ve ark., 2000. Characterization of VIM2, a carbapenem hydrolyzing metallo-lactamase and its plasmid and integronborne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in France. *Antimicrobial Agents and Chemother.* 44, 891- 897.
- Randall, L., Heinrich, K., Horton, R., Brunton, L., Sharman, M., Bailey-Horne, V., Sharma, M., McLaren, I., Coldham, N., Teale, C., Jones, J. 2014. Detection of antibiotic residues and association of cefquinome residues with the occurrence of Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)-producing bacteria in

- waste milk samples from dairy farms in England and Wales in 2011. *Research in Veterinary Science*, 96, 15- 24.
- Rasheed, M.U., Thajuddin, N., Ahamed, P., Teklemariam, Z. Ve Jamil, K., 2014. Antimicrobial drug resistance in strains of *Escherichia coli* isolated from food sources. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 56(4,) 341-346.
- Samaha-Kfoury, J.N., Araj, G.F., 2003. Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. *BMJ Journals*, 327, 1209-1213.
- Sarı H., 2005. Karbapenemlere dirençli Gram-negatif basil izolatlarında imipenem-EDTA / meropenem-EDTA disk yöntemi ve modifiye hodge testi ile metallo-beta- laktamaz varlığının araştırılması. Uzmanlık tezi, İstanbul.
- Sedighi, M., Halajzadeh, M., Ramazanzadeh, R., Amirmozafari, N., Heidary, M., Pirouzi, S., 2017. Molecular detection of beta-lactamase and integron genes in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* by multiplex polymerase chain reaction. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 50(3), 321-328.
- Shah, A.A., Hasan, F., Ahmed, S., Hameed, A., 2004. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. *Research in Microbiology*, 155(6), 409-421.
- Siu, L.K., 2002. Antibiotics: action and resistance in Gram negative bacteria. *Journal Microbiology Immunology Infection*, 35, 1-11.
- Skockova, A., Bogdanovicova, K., Kolackova, I., Karpiskova, R., 2014. Antimicrobial-resistant and extended-spectrum b-lactamase- producing *Escherichia coli* in raw cow's milk. *Journal of Food Protection*, 78(1), 72-77.
- Skočková, A., Koláčková, I., Bogdanovičová, K., Karpíšková, R., 2015. Characteristic and antimicrobial resistance in *Escherichia coli* from retail meats purchased in the Czech Republic. *Food Control*, 47, 401-406.
- Songer, J.G., Post, K.W., 2012. *Veterinary Microbiology – Bacterial and fungal agents of animal disease (veteriner hekimlik mikrobiyolojisi - hayvan hastalığı etkeni olan bakteriler ve mantarlar)*. Nobel Tıp Kitabevleri, 21–31, İstanbul.
- Sturenburg, E., Marck, D., 2003. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. *Journal of Infection*, 4(47), 273-295.
- Şadan, G., 2003. Beta-laktam antibiyotikler. *The Clinical Journal Pharmacology*, 1 (2), 194-202.
- Taşlı, H., Bahar, I., 2005. Molecular characterization of TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta lactamases in hospital-based *Enterobacteriaceae* in Turkey. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 58, 162-167.

- Tekiner, İ.H., Özpınar, H., 2016. Occurrence and characteristics of extended spectrum beta-lactamases-producing *Enterobacteriaceae* from foods of animal origin. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), 444-451.
- Temiz, A., Öner, Z. 1988. Ankara'daki iki ayrı süt işletmesine gelen çiğ sütlerde antibiyotik varlığının belirlenmesi. *Gıda*, 13 (4), 289-295.
- Tepeli, S.Ö., Zorba, N.D., 2018. Frequency of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)– and AmpC β -lactamase–producing *Enterobacteriaceae* in a cheese production process. *Journal of Dairy Science*, 101(4), 2906-2914.
- Thomson, K.S. Coundron, P.E., Moland, E.S., 2000. Occurrence and detection of AmpC Beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *American Society for Microbiology*, 38(5), 1791-1796.
- Topçu, A., Koç, M., 2008, Kinolonlar, In: Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi, Eds: Topçu, A., Söyletir, G. ve Doğanay, M.: İstanbul: Nobel Kitabevi, 341-353.
- Töreci, K. 2008. Antibakteriyel antibiyotiklerin etki mekanizması. Güncel bilgiler ışığında antibiyotikler. Editör(ler): Leblebicioğlu, H., Usluer, G., Ulusoy, S. Bilimsel Tıp Yayınevi, Ankara, 15-37.
- Tsuka, T., Ozaki, H., Saito, D., Murase, Y., Okamoto, Y., Azuma, K., Osaki, T., Ito, N., Murahata, Y., Imagawa, T., 2021. Genetic characterization of CTX-M-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* associated with bovine mastitis in Japan. *Frontiers in Veterinary Science*, 7(8).
- Uyanik, T., Çadirci, T., Gücükoğlu, A., Can, C., 2022. Investigation of major carbapenemase genes in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from raw milk in Black Sea region of Turkey. *International Dairy Journal*, 128, 105315.
- Vourli, S., Tzouvelekis, S.L., Tzelepi, E., 2003. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Clinical strain producing a rare extended spectrum beta lactamase (IBC-1). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 21(5), 495-497.
- Vural, T., 2003, Beta-laktamazlar, *Türkiye Klinikleri Pharmacology-Special Topics*, 1 (2), 231-236.
- Welthagen, G., Poirel, L. ve Nordman, P., 2003. Ambler class A extended-spektrum β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa*. Novel developments and clinical impact., *Antimicrobial Agents Chemother* 45, 183-189.
- Wilke, M.S., Lovering, A.L., Strynadka, N.C., 2005. β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiology*., 8(5), 525-533.
- Woodford, N., Ward, M.E., Kaufmann, M.E., Turton, J., Fagan, E.J., James D., Johnson, A.P., Pike, R., Warner, M., Cheasty, T., Pearson, A., Harry, S., Leach, J.B., Loughrey, A., Lowes, J.A., Warren, R.E., Livermore, D.M.,

2004. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54(4), 735-43.

Yuluğ, N., 1997. Beta-laktamazlar ve klinik aıdan nemi. *ANKEM Dergisi*, 11, 205-7.

Yüce, A., 2001. Antibiyotik ilalara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.

