



T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİĞ SÜTTEN İZOLE EDİLEN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VE  
*ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARINDA GSBL, AMP-C VE  
KARBAPENEMAZ GENLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK  
İNCELENMESİ

ESRA ALTUNAY  
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Sibel KIZIL

KIRIKKALE-2024





T.C.  
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ÇİĞ SÜTTEN İZOLE EDİLEN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VE  
*ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARINDA GSBL, AMP-C VE  
KARBAPENEMAZ GENLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK  
İNCELENMESİ

ESRA ALTUNAY  
VETERİNER MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN  
Doç. Dr. Sibel KIZIL

KIRIKKALE-2024

## ETİK BEYANI

Kırıkkale Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Esra ALTUNAY

09/01/2024

## ÖZET

### ÇİĞ SÜTTEN İZOLE EDİLEN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* VE *ESCHERICHIA COLI* İZOLATLARINDA GSBL, AMP-C VE KARBAPENEMAZ GENLERİNİN MOLEKÜLER OLARAK İNCELENMESİ

Kırıkkale Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Doç. Dr. Sibel KIZIL

Ocak 2024, 36 Sayfa

Ankara Bölgesi'nde yer alan çığ süt işletmelerinden, aseptik koşullarda toplanan, toplam 150 adet sağlıklı inekten alınan sütler (120 adet) ve marketlerde satışa sunulan çığ sütlerden (30 adet) izole edilen *Escherichia coli* (*E. coli*) ve *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) izolatlarında GSBL, Amp-C ve karbapenemaz genlerinin tespiti amaçlandı. Bu amaçla incelenen çığ süt örneklerinden yapılan konvansiyonel izolasyon sonucunda, 1 adet *E. coli* ve 4 adet *K. pneumoniae* konvansiyonel yöntem ve hızlı identifikasyon kiti (BBL Crystal) ile identifiye edildi. *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında, klasik PCR yöntemi ile GSBL, Amp-C ve karbapenemaz genlerinin varlığı araştırıldı. GSBL aktivitesi yönünden incelendiğinde *CTX-M1*, *TEM-1*, *SHV*, *CTX-M9*, *OXA-1* genleri; Amp-C aktivitesi yönünden incelendiğinde *FOX* geni ve karbapenemaz aktivitesi yönünden incelendiğinde *KPC*, *OXA-48*, *VIM* ve *NDM* genleri tespit edildi. Ankara Bölgesi'nde çığ sütlerden izole ve identifiye edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında, diğer birçok çalışmadan daha yüksek oranda GSBL, Amp-C ve karbapenemaz genleri saptandı. Bu nedenle inek besleyen küçük aile işletmelerinden elde edilen sütlerin ve marketlerde satışı yapılan çığ sütlerin antibiyotik dirençliliği yönünden takip edilmesi gerektiği ve bu ürünleri tüketen insanların antibiyotik dirençliliği açısından risk altında oldukları düşünülmektedir.

Bu çalışma, Kırıkkale Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projesi Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje Numarası: 2022/069

**Anahtar Kelimeler:** *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, mastitis, antibiyotik direnci, GSBL, Amp-C, karbapenemaz

## ABSTRACT

### MOLECULAR EXAMINATION OF GSBL, AMP-C AND CARBAPENEMASE GENES IN *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* AND *ESCHERICHIA COLI* ISOLATS FROM RAW MILK

Kırıkkale University

Graduate School of Health Science

Department of Veterinary Microbiology, Master's Thesis

Supervisor: Doç. Dr. Sibel KIZIL

January 2024, 36 Pages

It was aimed to detect extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL), Amp-C and carbapenamase genes in *Escherichia coli* (*E. coli*) and *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) isolates isolated from milk sampled from a total of 150 healthy cows, collected under aseptic conditions from raw milk enterprises in Ankara Region (120), and raw milk sold in markets (30). As a result of conventional isolation from raw milk samples, 1 *E. coli* and 4 *K. pneumoniae* were identified with conventional methods and rapid identification kit (BBL Crystal). The presence of GSBL, amp-C and carbapenamase genes in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates was searched by classical PCR method. When examined in terms of GSBL activity, *CTX-M1*, *TEM-1*, *SHV*, *CTX-M9*, *OXA-1* genes; in terms of amp-C activity, *FOX* gene and in terms of carbapenamase activity, *KPC*, *OXA-48*, *VIM* and *NDM* genes were detected. A higher rate of GSBL, Amp-C ve Carbapenemaz genes were detected in *E. coli* and *K. pneumoniae* isolates isolated and identified from raw milk in the Ankara Region compared to many other previous studies. For this reason, it is considered that milk obtained from small family businesses that feed cows and raw milk sold in markets should be followed in terms of antibiotic resistance and that people who consume these products are at risk in terms of antibiotic resistance.

This work was supported by Scientific Research Projects Coordination Unit of Kırıkkale University. Project number is 2022/069.

**Key words:** *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, mastitis, antibiotic resistance, ES $\beta$ L, amp-C, carbapenamase

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimine başladığım günden itibaren yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle bana her daim yol gösteren ve destek olan tez danışmanım Doç. Dr. Sibel KIZIL'a teşekkürü borç bilirim. Hem lisans ve hem de yüksek lisans sürecinde bilgilerini paylaşan ve bu alanda gelişmeye yardımcı olan Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Murat Yıldırım'a teşekkürlerimi sunarım. Tez sürecimde yardımlarını esirgemeyen değerli meslektaşlarım ve aynı zamanda arkadaşlarım Sayın Veteriner Hekim Bilal ÖZDEMİR'e, Sayın Veteriner Hekim Efsun Melike ÇEÇEN'e ve Sayın Veteriner Hekim Asya KAZAN'a teşekkür ederim. Hayatım boyunca her alanda desteğini hissettiğim annem Kadriye ALTUNAY'a ve babam Hüseyin ALTUNAY'a teşekkür ederim.

Bu tezi beni her daim destekleyen ve Veteriner Hekim olmamda etkili olan canım ablam Kübra ALTUNAY'a ithaf ediyorum.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa

<b>ÖZET</b> .....	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vi</b>
<b>İÇİNDEKİLER DİZİNİ</b> .....	<b>vii</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>ix</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Meme Bezi İmmünitesi.....	3
1.2. <i>E. coli</i> .....	3
1.2.1. <i>E. coli</i> Patotipleri .....	4
1.2.1.1. Enterotoksijenik <i>E. coli</i> (ETEC).....	4
1.2.1.2. Enteropatojenik <i>E. coli</i> (EPEC).....	5
1.2.1.3. Shiga toksin üreten <i>E. coli</i> (STEC) .....	5
1.2.1.4. Enteroinvasiv <i>E. coli</i> (EIEC).....	5
1.2.1.5. Enteroagregatif <i>E. coli</i> (EAEC).....	5
1.3. <i>K. pneumoniae</i> .....	5
1.4. Antimikrobiyal Direnç.....	6
1.4.1. Doğal Direnç.....	7
1.4.2. Kazanılmış Direnç .....	7
1.5. Antibiyotik Gruplarına Göre Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları.....	8
1.5.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç .....	8
1.5.2. Kinolon Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç .....	9
1.5.3. Glikopeptid Yapısındaki Antibiyotiklerde Direnç Mekanizması .....	9
1.5.4. Makrolit Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizması .....	10
1.5.5. Kloramfenikol Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç.....	10
1.5.6. Rifampisin Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç .....	10
1.5.7. Tetrasiklin Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç.....	10

1.5.8. Sülfonamid-Trimetoprim Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç.....	11
1.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar (GSBL) .....	11
1.6.1. TEM Tip GSBL .....	12
1.6.2. SHV Tip GSBL .....	12
1.6.3. CTX-M Tip GSBL.....	12
1.7. Karbapenemazlar .....	13
1.7.1. Sınıf A Karbapenemaz.....	13
1.7.2. Sınıf B Karbapenemaz.....	14
1.7.3. Sınıf D Karbapenemaz.....	14
1.8. Amp-C $\beta$ -laktamazlar .....	14
<b>2. MATERYAL-YÖNTEM .....</b>	<b>16</b>
2.1. Kullanılan Ekipmanlar.....	16
2.2. Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar .....	16
2.3. Örneklerin Toplanması .....	17
2.4. İzolasyon ve İdentifikasyon.....	17
2.4.1. İzolasyon.....	17
2.4.2. İdentifikasyon .....	18
2.4.2.1. Gram Boyama.....	18
2.4.2.2. Oksidaz Testi .....	18
2.4.2.3. İndol Testi.....	18
2.4.2.4. Üreaz Testi.....	18
2.4.2.5. Hareket Testi.....	19
2.4.2.6. Laktoz Testi .....	19
2.4.2.7. BBL Crystal Hızlı İdentifikasyon Sistemi.....	19
2.5. Klasik PCR ile Direnç Genlerinin Belirlenmesi.....	19
2.5.1. Kullanılan Primerlerin Listesi.....	19
2.5.2. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i> İzolatlarından DNA İzolasyonu .....	20
2.5.3. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i> İzolatlarının Klasik PCR ile GSBL, Karbapenemaz ve Amp-C Genlerinin Belirlenmesi.....	20
2.5.4. Elektroforez .....	21
<b>3. BULGULAR .....</b>	<b>22</b>
<b>4. TARTIŞMA .....</b>	<b>25</b>
<b>5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>29</b>
<b>KAYNAKÇA .....</b>	<b>30</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>36</b>

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Yapılan çalışmalar. ....	3
1.2. Doğal direnç bulunduran bakteriler (Reygaert, 2018). ....	7
1.3. A, B ve D sınıfı metallo- $\beta$ -laktamaz farkları (Kılıç vd., 2016). ....	13
2.1. GSBL, Amp-C ve karbapenemazlar için PCR primerleri (Dallenne, Costa, Decré, Favier, & Arlet, 2010). ....	20
3.1. Konvansiyonel identifikasyon test sonuçları. ....	22
3.2. GSBL, Amp-C ve karbapenemaz genleri açısından izolatların Klasik PCR analiz sonuçları. ....	23
3.3. <i>K. pneumoniae</i> ve <i>E. coli</i> izolatlarında araştırılan antimikrobiyal direnç genlerinin % grafiği. ....	24

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Kanlı agar'a yapılan ekim.....	17
3.1. Üreaz Testi .....	22



## KISALTMALAR DİZİNİ

<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
GSBL	: Geniş spektrumlu $\beta$ -laktamaz
TEM	: Temoniera
SHV	: Sülfidril Değişken
Amp-C	: Aminopenisilin İnaktive Edici Sefalosporinaz
CTX-M	: Sefotaksim-Münih
<i>K. pneumoniae</i>	: <i>Klebsiella pneumoniae</i>
NK	: Doğal Öldürücü
MHC	: Ortalama Eritrosit Hemoglobini
TNF	: Tümör Nekroz Faktörü
EMB	: Eosine Methylen Blue
MCA	: Mac Conkey Agar
KA	: Kanlı Agar
ETEC	: Enterotoksijenik <i>E. coli</i>
EPEC	: Enteropatojenik <i>E. coli</i>
STEC	: Shiga toksin üreten <i>E. coli</i>
EIEC	: Enteroinvasiv <i>E. coli</i>

EAEC	: Enteroagregatif <i>E. coli</i>
DAEC	: Diffuz Adherent <i>E. coli</i>
AMR	: Antimikrobiyal Direnç
ARG	: Antimikrobiyal Direnç Genleri
HGT	: Yatay Gen Transferi
SME	: <i>Serratia marcescens</i> enzyme
NMC/IMI	: Not metalloenzyme carbapenemase/imipenem hydrolyzing $\beta$ -lactamase
KPC	: <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
VIM	: Verona integronencoded MBL
IMP	: Imipenemase
NDM	: New Delhi MBL
FOX	: Sefoksitin
OXA	: Oksasilin
DHPS	: Dihidropteroat Sentaz
DHFR	: Dihidrofolat Redüktaz
TSI Agar	: Triple Sugar Iron Agar

# 1. GİRİŞ

Süt ve süt ürünleri, her yaşta insan için karbonhidrat, protein, vitamin ve esansiyel yağ kaynaklarıdır; beslenmede önemli role sahiptir (Gücükoğlu vd., 2023). Zoonotik mikroorganizmaların süt yoluyla yayılımı, özellikle pastörize edilmemiş süt ürünleri ve pastörizasyon işleminin başarısız olduğu süt ürünlerinin tüketimi nedeniyle insan sağlığı için risk oluşturmaktadır (Bradley, 2002). Pastörize edilmemiş süt, *E. coli* izolatlarının ana kaynağı olarak düşünülmektedir (Alharbi vd., 2019). 1874-1878 yılları arasında sağlıklı memede mikrobiyotaya olmadığı düşünülüyordu. Ancak son yıllarda yapılan çalışmalara bakıldığında sağlıklı memeden alınan sütlerde, çok sayıda bakteri tespit edildiği belirtilmiştir. Bulunan bu bakterilerin kaynağının ise çevre, yavruların ağız boşluğu ve meme derisi olduğu düşünülmektedir (Halıcı Demir ve Kızıl, 2022).

Çiftlik hayvanları birçok zoonotik patojen için rezervuardır (Al vd., 2020). Bu patojenlere karşı önleyici ve tedavi edici amaç için yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı bakteri suşlarının geliştirdiği antimikrobiyal direnç genleri, halk sağlığı için ciddi tehdit oluşturmaktadır. Bununla beraber antibiyotik direnç genlerinin, diğer bakterilere aktarılabilmesiyle yaygınlığı artmaktadır (Martínez, Coque ve Baquero, 2014; Al vd., 2020).

Genişlemiş Beta-laktamaz (GSBL) üreten bakterilerin ortaya çıkışı ve yayılması günümüzde önemli bir halk sağlığı sorunu oluşturmaktadır (Athanasakopoulou vd., 2021). GSBL üreten bakteriler çiğ süt tüketimi ile alınabilir ve genetik özellikleri insanlara yayılabilir (Odenthal, Akineden ve Usleber, 2016). Çoklu ilaca dirençli bakteriler yalnızca insandan insana değil, aynı zamanda hayvandan besin zinciri yoluyla insanlara da geçebilmektedir (Freire, Grilo, Rodrigues ve Oliveira, 2023). Hayvanlarda yanlış ve bilinçsiz olarak uygulanan antibiyotiklerin uygun pastörizasyon yöntemi kullanılmayan ve/veya pastörize edilmeden tüketilen çiğ sütler aracılığıyla, dünya genelinde antibiyotik direncinin artmasına etki etmektedir. Yaygın olarak kullanılan üçüncü ve dördüncü nesil sefalosporin  $\beta$ -laktam antibiyotikler, giderek artan GSBL'lerin üretimi ile bu bileşiklere karşı bakteriyel

direncin ortaya çıkması nedeniyle, süt hayvancılığında önem arz etmektedir (Odenthal vd., 2016). 1970'lerden günümüze kadar *Enterobacteriaceae* arasında zaten yaygın olan plazmid aracılı Temoniera (TEM) ve sülfidril değişken (SHV) laktamazlar dahil, bir çok GSBL enziminin varlığı çeşitli literatürlerde bildirilmiştir (D'Andrea, Arena, Pallecchi ve Rossolini, 2013; Odenthal vd., 2016). 1980'lerin sonlarından bu yana, aminopenisilin inaktive edici sefalosporinaz (AmpC) ve Sefotaksim-Münih (CTX-M) tipi  $\beta$ -laktamazlar gelişmiş; günümüzde, dünya çapında kullanılan, en yaygın laktamaz grubu antibiyotiklerdir (Ewers, Bethe, Semmler, Guenther ve Wie, 2012; Odenthal vd., 2016). Son on yılda, CTX-M enzimleri, *Enterobacteriaceae* familyası içerisinde, neredeyse diğer GSBL enzimlerinin yerini almıştır (Odenthal vd., 2016). Karbapenemazlar penisilinleri, genellikle sefalosporinleri ve değişen derecelerde karbapenemleri ve monobaktamları hidrolize eden beta-laktamazlardır.

GSBL ve karbapenemaz üretiminden sorumlu olan genler, özellikle *Enterobacteriaceae*'de, direnç genlerini taşıyan plazmidler yoluyla aktarılırlar (Uyanik, Çadirci, Gücükoğlu ve Can, 2022). Çiğ sütte tespit edilen *E. coli* izolatlarının yaklaşık %7'sinin çoklu ilaca dirençli olduğu bildirilmiş ve GSBL üreten *K. pneumoniae*'nin, artan morbidite ve mortalite ile birlikte, inatçı enfeksiyonlara neden olduğu için, tüketiciler açısından önemli bir tehdit olabileceği düşünülmektedir (Koovapra vd., 2016; Alharbi vd., 2019).

Bu alanda yapılan çalışmalar; Odenthal, Akineden ve Usleber (2016), süt çiftliğinden topladıkları örneklerde, %75.6 oranında GSBL üretimi gösteren türün, *E. coli* olduğunu tespit etmişlerdir. Badri ve arkadaşları (2017), çiğ inek sütünden izole edilen CTX-M tipi ile *E. coli* ve *K. pneumoniae* için sırasıyla %29.3 ve %44.8 ile yüksek oranda GSBL pozitif olduğunu bildirmiştir. Batı Bengal'de yapılmış bir çalışmada, süt örneklerinin %12.1'inde GSBL üreten *E. coli* tespit edilmiştir (Batabyal vd., 2018). Başka bir çalışmada, çiğ inek sütlerinden elde edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatları CTX-M geni yönünden pozitif olarak değerlendirmiştir (Ahmed, 2021). Uyanik ve arkadaşlarının, 2022 yılında yapmış oldukları bir çalışmada, 150 adet çiğ inek sütlerinde *E. coli* suşlarında GSBL genleri sırasıyla, CTX-M (%36.58), TEM (%24.39) ve SHV (%7.31) olarak belirlenmiştir (Uyanik vd., 2022). Yapılan çalışmalar Çizelge 1.1'de tablo şeklinde verilmiştir.

**Çizelge 1.1.** Yapılan çalışmalar.

Yıl- Ülke	GSBL Geni Oranları		
	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	
2016- Almanya	%75.6	-	
2017- Sudan	%29.3	%44.8	
2018- Batı Bengal	%12.1	-	
2021- Irak	<i>E. coli</i> ve <i>K. pneumoniae</i> şuşlarında CTX-M geni varlığı		
	+	+	
2022- Türkiye	<i>E. coli</i> şuşlarında GSBL genlerinin varlığı		
	CTX-M	TEM	SHV
	%36.58	%24.39	%7.31

## 1.1. Meme Bezi İmmünitesi

Meme bezi, iki farklı kategoriye ayrılabilen çeşitli savunma mekanizmaları tarafından korunur: doğuştan gelen bağışıklık ve spesifik bağışıklıktır. Spesifik olmayan yanıt olarak da bilinen doğuştan gelen bağışıklık, enfeksiyonun erken evrelerinde olan, baskın savunmadır. Meme bezinin spesifik olmayan veya doğuştan gelen tepkilerine meme ucunun fiziksel bariyeri, makrofajlar, nötrofiller, doğal öldürücü (NK) hücreler ve belirli çözümler aracılık eder. Bunun aksine, spesifik veya edinilmiş bağışıklık sistemi, seçici eliminasyonu kolaylaştıran bir patojenin spesifik belirleyicilerini tanır. Patojenik faktörlerin tanınmasına antikor molekülleri, makrofajlar ve birkaç lenfoid popülasyon aracılık eder. Lenfositlerin “hafızası” nedeniyle, bir patojene tekrar tekrar maruz kalınarak spesifik bağışıklık tepkileri arttırılabilir. Meme bezinde hem doğuştan gelen hem de sonradan kazanılan koruyucu faktörler, hastalıktan optimum koruma sağlamak için koordine edilir (Sordillo, Shafer-Weaver ve DeRosa, 1997).

## 1.2. *E. coli*

*E. coli* Dr. Theodor Escherich tarafından 1885 yılında diyareli bir hastanın dışkılarından izole edilmiştir (Shulman, Friedmann ve Sims, 2007).

*E. coli* Gram negatif, çomak, fakültatif anaerob, peritrik flagellaya sahip olup; *Enterobacteriaceae* ailesi içerisinde yer alan bir bakteridir. Flagellaya sahip olmasına karşın, hareketsiz şuşları da bulunmaktadır (Khider Abd Alrahim Ahmed, 2017). Somatik O, flagellar H, kapsüler K ve fimbrial F antijenleri bulunmaktadır (Güler ve

Gündüz, 2007). *E. coli* suşları üreaz testi negatif, indol testi pozitif sonuç vermektedir (Prescott vd., 2022). Genel besiyerleri ile selektif/diferansiyel besiyerlerinde S-tipi koloni oluşturur. Laktozu fermente edebilme yeteneğinden dolayı, Eosine Methylen Blue (EMB) Agar'da metalik röfle rengi, MacConkey Agar'da (MCA'da) pembe renkli koloniler oluştururken, eritrositleri parçaladığı için Kanlı Agar'da (KA'da) hemoliz meydana getirir (Khıder Abd Alrahım Ahmed, 2017).

*E. coli* hayvanlarda genellikle bağırsakda bulunur; bazı suşları patojeniktir ve etkiledikleri mekanizmaya göre sınıflandırılırlar (Prescott vd., 2022). Bununla beraber *E. coli*, sığır mastitisinde çevresel patojenlerden biridir ve meme kanalı yoluyla memeye girer; meme bezinde doku hasarına yol açar (Wenz, Barrington, Garry, Ellis ve Magnuson, 2006; Ghanbarpour ve Oswald, 2010).

*E. coli* genomunda 4.000 ile 5.000 arasında gen bulunmakta ve 3.000 gen farklı *E. coli* izolatları tarafından paylaşılmaktadır (Poirel vd., 2018).

### **1.2.1. *E. coli* Patotipleri**

Sağlıklı florada bulunan *E. coli* suşları ile patojenik suşların ayrımının yapılabilmesi için virülens faktörlerinin tanımlanması yapılmalıdır (Kaipainen vd., 2002). Bu virülans faktörleri oluşturdukları hastalık ve buna bağlı oluşan klinik tablo, enterotoksin yapıları, O ve H antijenik yapılarıyla, hedef hücrede oluşturdukları değişime göre Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC), Enteropatojenik *E. coli* (EPEC), Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC), Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC), Enteroagregatif *E. coli* (EAEC) ve Diffuz Adherent *E. coli* (DAEC) olmak üzere altı patotipi bulunmaktadır (Nataro ve Kaper, 1998; Öngen, 2008; Prescott vd., 2022).

#### **1.2.1.1. Enterotoksijenik *E. coli* (ETEC)**

ETEC suşların, hayvanlarda görülen ishalin en yaygın nedeni olduğu bilinmektedir. İki adet virülans faktörü bulunmaktadır. Bunlar fimbrial ve afimbrial adezinler ile enterotoksinlerdir: Termotabil (ST) ve termolabil (LT). ST enterotoksinler, ETEC suşlarıyla Gram negatif bakteriler olan *Vibrio cholerae* ve *Yersinia enterocolitica* tarafından da salgılanırlar. Diğer LT enterotoksini ise LT-I ve LT-II olmak üzere 2 ana gruba ayrılır. Zoonoz bir patojen olan *E. coli* LT-I salgılarken, sadece

hayvanlardan elde edilen *E. coli*'ler LT-II salgılar (Omerovic, Müştak ve Kaya, 2017).

#### **1.2.1.2. Enteropatojenik *E. coli* (EPEC)**

EPEC *E. coli*'nin, tanımlanan ilk patotipi olmakla beraber, konakçılarının normal bağırsak florasının bir parçası olarak taşınır ve fırsatçı patojenler olarak kabul edilirler. İnce bağırsakta bulunan membran mikrovilluslarına tutunup, sentezledikleri enterotoksinlerle epitel hücrelerinde bozulmaya sebep olur. Bunun sonucunda diyare şekillenir (Padhye ve Doyle, 1992; Omerovic vd., 2017; Prescott vd., 2022).

#### **1.2.1.3. Shiga toksin üreten *E. coli* (STEC)**

*Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*) tarafından üretilen Shiga toksin ile *E. coli*'nin salgıladığı sitotoksin genetik olarak benzemektedir. Ana virülens faktörü olan shiga toksininin (Stx) iki alt grubu (Stx1, Stx2) bulunur. Stx1 toksini, *S. dysenteriae* Shiga toksini ile aynıdır. Sığırların normal florasında bulunan STEC suşları, insanlar için oldukça patojeniktir (Omerovic vd., 2017; Prescott vd., 2022).

#### **1.2.1.4. Enteroinvasiv *E. coli* (EIEC)**

EIEC suşlarının diğer *Shigella* spp. ve *E. coli* suşlarından ayrımı zordur. Bu suşlar *Shigella* gibi laktozu kullanamaz. Bu suşların identifikasyonu için öncelikle *E. coli* olduğunun tanısının konulması gerekmektedir (Öngen, 2008).

#### **1.2.1.5. Enteroagregatif *E. coli* (EAEC)**

EAEC suşları, enterotoksin oluşturmayan *E. coli* suşları olarak tanımlanır ve plazmid tarafından kodlanan enteroagregatif sitotoksin salgılamaktadır. Bu toksin hücrelerde yuvarlaklaşma ve hücre harabiyetine yol açmaktadır (Willke, 2008; Öngen, 2008).

### **1.3. *K. pneumoniae***

*K. pneumoniae* Carl Friedlander tarafından 1882 yılında, pnömonili bir hastanın akciğer dokusundan tanımlanmıştır. *Enterobacteriaceae* familyasına ait çomak şeklinde, kapsüllü, Gram negatif ve hareketsiz bir bakteridir. Kapsülleri sayesinde birçok antibiyotiğe karşı direnç oluşturur. Somatik antijenleri ve kapsülleri sayesinde endotoksin üretebilir; ayrıca ekzotoksin üreten suşları da vardır. *K. pneumoniae*, mannitol ve laktozu fermente edebilir; bununla beraber nitratı nitrite indirger.

MacConkey ve EMB agarlarda mukoid koloni oluşturur (Moya ve Maicas, 2020; Lenchenko, Blumenkrants, Sachivkina, Shadrova ve Ibragimova, 2020).

*K. pneumoniae* süt ve et gibi hayvansal gıdalarda bulunabildiğinden, gıda kaynaklı önemli bir patojendir. Hayvanlarda pnömoni, menenjit gibi çeşitli hastalıklara sebep olmaktadır. Bununla beraber klinik veya subklinik enfeksiyona sahip ineklerin sütünde bulunabilir (Junaid vd., 2022).

*K. pneumoniae* süt sığırları için önemli ekonomik kayıplara neden olan klinik ve subklinik mastitise sebep olmakta ve sütün kalitesini düşürmektedir (Langoni vd., 2015).

*K. pneumoniae*'nin pangenomu ortalama 5.500 geni kodlar ve daha tanımlanmamış yardımcı genler de bulunmaktadır. Nükleer genomunda ise 2.000 gen bulunmaktadır (Moya ve Maicas, 2020).

#### **1.4. Antimikrobiyal Direnç**

Pasteur ve Joubert, 19. yüzyılda, Şarbon etkenlerinin steril idrarda ürerken, diğer bakteriler ile kirlenen idrarda üremediğini saptamış ve yaptıkları deneysel çalışmayla bunu kanıtlamışlardır. Antimikrobiyal ilaçların keşfi Pasteur ve Joubert'in yaptığı bu deneysel çalışma ile başlamıştır. 1928 yılında ise Alexander Fleming kültür ortamında üreyen küf mantarın çevresinde stafilokokların üremediğini gözlemlemiştir. Daha sonra yaptığı deneysel çalışmada, bu mantarın birçok bakteriye karşı etkili olduğunu keşfetmiştir. Böylece antimikrobiyal ilaçların keşfi penisilin ile Alexander Fleming tarafından gerçekleştirilmiştir (Topal, Uslu Şenel, Arslan Topal ve Öbek, 2015).

Penisilin keşfinden sonra Alexander Fleming antibiyotiklere belirli süre maruz kalınması durumunda direnç şekillenebileceğini söylemiştir. Bir mikroorganizmanın antibiyotiklere karşı koymasına antimikrobiyal direnç denmektedir (Kayış, 2019).

Günümüzde hatalı antibiyotik kullanımı sonucunda antimikrobiyal direnç (AMR) prevalansı artmaktadır. Yapılan çalışmalarda AMR'den sorumlu antimikrobiyal direnç genlerinin (ARG) arttığı saptanmıştır. Bu durum hem hayvan hem de insan sağlığını için tehdit oluşturmaktadır (Khıder Abd Alrahım Ahmed, 2017; Hendriksen, Munk, Njage, Bunnik ve McNally, 2019).

Son yıllarda *K. pneumoniae* farklı antibiyotik gruplarına karşı antimikrobiyal direnç oluşturmaktadır. HGT yoluyla  $\beta$ -laktam ve kinolon tipi antibiyotiklere karşı antimikrobiyal direnç oluşturmuştur. *K. pneumoniae* 'de yüzden fazla antimikrobiyal direnç geni saptanmıştır (Moya ve Maicas, 2020). Yapılan çalışmalara bakıldığında *K. pneumoniae* gibi mastitise sebep olan *E. coli*'de de antimikrobiyal direncin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Süt örneklerinde *E. coli* tarafından üretilen ampC'ler ve GSBL'ler sporadik olarak izole edilmiştir (Poirel vd., 2018).

Antimikrobiyal direnç, doğal direnç ve kazanılmış direnç olarak ikiye ayrılır:

#### 1.4.1. Doğal Direnç

Mikroorganizmalar antimikrobiyal ilaçlara karşı aynı oranda dirençli değildir. (Reygaert, 2018). Bazı bakteriler genetik özelliklerinden dolayı antimikrobiyal ilaçlardan etkilenmezler. Bu durum doğal direnç olarak adlandırılır (Kayış, 2019). Çizelge 1.2'de doğal dirence sahip *E. coli* ve *Klebsiella* spp.'lere verilmiştir.

**Çizelge 1.2.** Doğal direnç bulunduran bakteriler (Reygaert, 2018).

Mikroorganizma	Antibiyotik Grubu
Tüm Gram pozitif bakteriler	Aztreonam
<i>Enterococci</i>	Aminoglikozitler, sefalosporinler, linkozamidler
<i>Listeria monocytogenes</i>	Sefalosporinler
Tüm Gram negatif bakteriler	Glikopeptitler, lipopeptitler
<i>E. coli</i>	Makrolidler
<i>Klebsiella</i> spp.	Ampisilin
<i>Serratia marcescens</i>	Makrolidler
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Sülfonamidler, ampisilin, 1. ve 2. kuşak sefalosporinler, kloramfenikol, tetrasiklin
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Aminoglikozidler, $\beta$ -laktamlar, karbapenemler, kinolonlar
<i>Acinetobacter</i> spp.	Ampisilin, glikopeptitler

#### 1.4.2. Kazanılmış Direnç

Bakterinin kendi kromozomal yapısında meydana gelen mutasyonla ya da dirençli bakteri tarafından, yatay gen transferi olarak adlandırılan (HGT); transformasyon, transdüksiyon veya konjugasyon aracılığıyla edinilen bağışıklığa kazanılmış direnç denir (Reygaert, 2018; Kayış, 2019).

##### • Plazmidler

Kromozomdan bağımsız replike olabilen, çift zincirli DNA parçalarıdır (Kamburoğlu, 2011). Direnç genlerinin plazmid aracılı aktarılması extra genetik

materyalin ediniminde en sık kullanılan yoldur (Reygaert, 2018). Bu durum hızla artan antimikrobiyal direncin sorumlusu olarak büyük oranda plazmidleri göstermektedir (Mathers, Peirano ve Pitoutb, 2015).

- **Transpozonlar**

Bakteri kromozomuna yerleşebilen ve plazmidten bakteriyofaja veya DNA'ya aktarılabilen, plazmidler gibi kendi kendine replike olamayan, çift zincirli DNA parçalarıdır (Kamburoğlu, 2011). Transpozonlarda meydana gelen mutasyonlar ile bakterilerde kazanılmış bağışıklık oluşmaktadır (Kayaş, 2019).

- **İntegronlar**

Antimikrobiyal direnç genlerinin taşınmasında etkili üç integron vardır. Gram negatif bakterilerde Sınıf 1 ve 2 integronlar antimikrobiyal direnç genlerinin taşınmasında yaygındır (Kamburoğlu, 2011).

## **1.5. Antibiyotik Gruplarına Göre Antimikrobiyal Direnç Mekanizmaları**

### **1.5.1. Beta-Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç**

Moleküler çalışmalar sonunda A, B, C ve D olmak üzere 4 farklı  $\beta$ -laktamaz tanımlanmıştır. Bu enzimler  $\beta$ -laktam halkasındaki karbonil grubuyla bağ kurarak amid bağını kırar ve antibiyotiğin etkinliğini olumsuz etkiler (Yüce, 2001).

- **Sınıf A**

Sınıf A  $\beta$ -laktamazların molekül ağırlıkları 29.000 kDa'dır. Birinci kuşak sefalosporin, penisilinleri ve karbapenemleri etkisiz hale getirir; GSBL'in azitreonam, sefotaksim vb. karşı etkinliği azdır. B-laktamların yaygın kullanılması sonucu Sınıf A  $\beta$ -laktamazların içerdiği *TEM* ve *SHV* genlerinde nokta mutasyonlar meydana gelmektedir. Mutasyonların sonucunda daha sık olarak *K. pneumoniae* ve *E. coli*'de görülen antimikrobiyal dirence neden olan yeni enzimler oluşmaktadır (Philippon , Arlet ve Lagrange, 1994; Jones, Baquero, Privitera, Inoue ve Wiedemann, 1997).

- **Sınıf B**

Sınıf B  $\beta$ -laktamazlar penisilin ve sefalosporinler ile karbapenemleri de hidrolize edebilme yeteneğine sahip enzimlerdir. Klavulanik asid ile inhibe olmazlar (Yüce, 2001).

- **Sınıf C**

Sınıf C  $\beta$ -laktamazların molekül ağırlıkları 39.000 kDa'dır. Sadece Gram negatif bakterilerde bulunmakta ve çoğunlukla kromozomlarında kodlanmakta olan enzim grubudur. Sefalosporinlere karşı etkilidir ve klavulanik asid ile inhibe olmazlar (Yüce, 2001).

- **Sınıf D**

Sınıf D  $\beta$ -laktamazların oksasilinleri parçalayabildikleri için oksasilinaz olarak da isimlendirilir. Sınıf C ve Sınıf D  $\beta$ -laktamazlardan farklı olarak klavulanik asid ile inhibe olurlar (Yüce, 2001).

### **1.5.2. Kinolon Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç**

Fluorokinolonlara karşı oluşan direnç kromozomal kaynaklıdır. Oluşan direnç mekanizması giraz enzimideki (*gyrA*, *gyrB*) mutasyonlardan kaynaklı şekillenmektedir. Dört alt tipten oluşan giraz enzimleri içerisinde kinolon grubu antibiyotikler A alt tipini hedef almaktadır. Bu alt tipi kodlayan *gyrA* geninde meydana gelen mutasyon, bütün bakterilerde kinolon grubu antibiyotiklere karşı direnç şekillenmesinden sorumludur. *gyrB* geninde meydana gelen mutasyonlar ise *E. coli*'de kinolon direnci oluşturmaktadır (Yüce, 2001).

### **1.5.3. Glikopeptid Yapısındaki Antibiyotiklerde Direnç Mekanizması**

Vankomisin gibi glikopeptid grubu antibiyotikler peptidoglikanın yapısında bulunan peptidil-D alaninin uç kısmına bağlanarak bakterinin hücre duvarı sentezini engeller. Glikopeptid grubu antibiyotikler Gram negatif bakterilerin dış membranından geçemezler. Bu sebepten Gram negatif bakteriler glikopeptid grubu antibiyotiklere karşı doğal dirençliyken, Gram pozitif bakteriler dirençli değildir (Yüce, 2001).

#### **1.5.4. Makrolit Grubu Antibiyotiklere Direnç Mekanizması**

Glikopeptid grubu antibiyotikler gibi makrolit grubu antibiyotikler de Gram negatif bakterilerin dış membranından geçemedikleri için bu antibiyotik grubuna karşı doğal dirençlidir. Bu antibiyotik grubuna karşı ribozomal hedefin değiştirilmesi Gram pozitif bakteriler içinde en sık görülen direnç mekanizmasıdır. Metilasyon ile ribozomda yapısal değişiklikler oluşturarak ribozoma bağlanmayı engeller. Metilasyondan sorumlu *erm* (eritromisin ribozom metilasyon) geni kromozom, plazmid veya transpozonlar üzerinde bulunur (Yüce, 2001).

#### **1.5.5. Kloramfenikol Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç**

İntraselüler enzim olan ve plazmid kontrolünde sentezlenen kloramfenikol asetil transferaz aktivitesi sayesinde kloramfenikol grubu antibiyotiklere karşı antimikrobiyal direnç oluşmaktadır. Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerde yaygın bulunan bu enzim plazmid veya transpozonlar ile aktarılabilir. Kloramfenikol asetil transferaz, hidroksil grubunu asetil ile yıkımlayarak etki eder. *E. coli* (ETEC) suşlarında kloramfenikol ve ampisilin direnci tedavilerde olumsuz sonuç alınmasına sebep olmaktadır (Yüce, 2001).

#### **1.5.6. Rifampisin Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç**

Rifampisin, RNA polimeraz enzimini kodlayan *rpoB* gen bölgesini taşımaktadır. Bu gen bölgesinde meydana gelen kromozomal mutasyonlar rifampisin grubu antibiyotiklere karşı direnç şekillenmesinden sorumludur. Rifampisin, hidrofilik bir yapıya sahip olduğundan glikopeptid ve makrolit grubu antibiyotikler gibi dış membrandan geçemezler. Bu durum Gram negatif bakterilere rifampisin grubu antibiyotiklere karşı doğal bir direnç oluşturmaktadır (Yüce, 2001).

#### **1.5.7. Tetrasiklin Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç**

Bakterilerde meydana gelen kromozomal mutasyonlar sonucunda membran geçirgenliğinin azaldığı tespit edilmiştir. Bu durum ilacın bakteri içerisine alınmasını azaltmakta ve direnç oluşumuna sebep olmaktadır. Direnç gelişmesinde etkili olan diğer bir sistem ise aktif pompa sistemidir. Bu sistemde bulunan tetrasiklin transport proteinlerini kodlayan genler *tetA-G*, *tetK* ve *tetL*'dir (Yüce, 2001).

Direnç gelişiminde etkili olan ribozomal korumadaysa *tetM*, *tetO*, *tetQ* ve *tetS* genleri tarafından sentezlenen sitoplazmik proteinin aktivasyonu sonucunda etken madde ribozoma bağlanamaz. Bunun sonucunda direnç şekillenir (Yüce, 2001).

#### **1.5.8. Sülfonamid-Trimetoprim Grubu Antibiyotiklere Karşı Direnç**

Sülfonamidlere karşı oluşan direnç kromozomal ya da plazmidlerce kodlanmaktadır. En sık karşılaşılan direnç şekli plazmid kaynaklı dihidropteroat sentaz'ın (DHPS) sentezlenmesiyle oluşmaktadır. DHPS sentezlenmesine göre daha az görülen direnç oluşum şekli olan dihidrofolat redüktaz'ın (DHFR) aşırı sentezlenmesi *E. coli*'de görülmektedir. (Yüce, 2001).

### **1.6. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamazlar (GSBL)**

Günümüzde antibiyotiklerin Veteriner Hekimlikte yaygın kullanımı, antimikrobiyal direncin artmasına ve yaygınlaşmasına sebep olmaktadır. Yapılan çalışmalarda hayvansal kaynaklı gıda ürünlerinde GSBL genleri tespit edilmiştir. Bu durum halk sağlığı yönünden de endişe vericidir (Odenthal vd., 2016). Hollanda'da yapılan çalışmada, mesleki olarak hayvanlara maruz kalan kişilerde, diğerlerine göre GSBL ve Amp-C üreten, *E. coli* ve *K. pneumoniae* taşıyıcılık prevalansının daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Ancak bu durumun görülme oranının hayvanlarda insanlardan daha fazla olduğu belirtilmiştir (Meijs vd., 2021).

*E. coli* ve *K. pneumoniae* gibi Gram negatif bakterilerden  $\beta$ -laktamaz enzimleri izole edilmiştir. Mastitis etkenlerinden olan *E. coli* ve *K. pneumoniae*'ye ülkemizde sıkça rastlanmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalardan elde edilen verilere göre GSBL ve plazmid aracılı Amp-C  $\beta$ -laktamaz enzimi üreten patojenlerdeki artış halk sağlığını için endişe vericidir (Junaid vd., 2022). Bununla beraber antimikrobiyal direnç sorunu oluşmaktadır (Kayaş, 2019; Junaid vd., 2022).

Monobaktamları, geniş spektrumlu sefalosporinleri ve penisilinleri hidrolize edebilme yeteneğine sahip GSBL enzimleri klavulanik asit tarafından inhibe edilebilir. Bu özelliği sayesinde Amp-C tipi  $\beta$ -laktamazlardan ayrılır (Rupp ve Fey, 2003). GSBL enzimleri *Enterobacteriaceae* ailesinde bulunan *E. coli* ve *K. pneumoniae* gibi bakteriler arasında yaygın olarak tespit edilmiştir (Koovapra vd., 2016).

Yapılan araştırmalar sonucunda süt sığırlarında GSBL reten *Enterobacteriaceae* ailesine ait bakteriler genetik materyallerini, plazmidler ve transpozonlar aracılığıyla birbirlerine aktırdığı tespit edilmiştir. (Odenthal vd., 2016; Al vd., 2020).

TEM, SHV ve CTX-M tip  $\beta$ -laktamazlar *E. coli*'de en çok tespit edilen GSBL sınıfı enzimlerdir. Günümüze kadar tanımlanan CTX-M tip  $\beta$ -laktamazların tamamı GSBL karakterindeyken, TEM ve SHV tip  $\beta$ -laktamazların tamamı GSBL karakterinde değildir (Yıldırım ve Pehlivanoglu, 2018).

### **1.6.1. TEM Tip GSBL**

TEM tip  $\beta$  laktamazların TEM-1 ve TEM-2 olmak üzere iki türevi bulunmakta ve izoelektrik noktalarındaki farklılıklar bulunmaktadır. TEM tip  $\beta$ -laktamazlar genellikle *Enterobacteriaceae* ailesinde görülmektedir. TEM-1 ilk olarak 1965 yılında Temoneira adlı hastadan izole edilen *E. coli* suşunda tespit edilmiş ve bu suşun ampisiline karşı oluşturduğu direnç TEM-1 enziminden kaynaklı şekillenmektedir (Paterson ve Bonomo, 2005; Grge, 2012).

### **1.6.2. SHV Tip GSBL**

*K. pneumoniae*'de bulunan SHV-1 tip  $\beta$ -laktamaz, birinci nesil sefalosporinlere ve penisilinlere karşı antimikrobiyal direnç şekillendiren bir enzimdir. TEM-1'e oranla daha az GSBL varyantı bulunmaktadır. Yapısındaki genetik mutasyonlar sonucunda hidroliz yeteneğini monobaktamlarla genişletmiştir (Rupp ve Fey, 2003).

### **1.6.3. CTX-M Tip GSBL**

Belirgin derecede sefotaksimi hidroliz etme yeteneklerinden dolayı Sefotaksim-Münih (CTX-M) olarak adlandırılırlar. (zad Düzgün ve Saral, 2018). CTX-M tip  $\beta$ -laktamazlar çok sayıda üyeye sahiptir. Amoksisilin dizilimlerine göre temel olarak CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 ve CTX-M-25 olmak üzere beş gruba ayrılır (Qi, Pilla, Yu ve Reed, 2010; Deniz Ögedey, Cömert, Köktürk, Külah ve Aktaş, 2016).

Dünya genelinde CTX-M tip  $\beta$ -laktamazlar, plazmid aracılı aktarımları sayesinde, *Enterobacteriaceae* ailesi içerisinde yaygınlığı hızla artmaktadır. Bununla beraber çoğunlukla *E. coli* suşları tarafından taşınmaktadır (Rossolin, D'Andrea ve Mugnaioli, 2008; Qi vd., 2010; zad Düzgün ve Saral, 2018).

CTX-M tip  $\beta$ -laktamazları taşıyan *E. coli* suşları dar spektrumlu sefalosporinlere, karboksi penisilinlere, amoksisipenisilinlere karşı antimikrobiyal direnç geliştirmiştir. Türkiye’de CTX-M tip  $\beta$ -laktamaz üzerine yapılan çalışmalar, *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatları arasında %71 oranı ile en yaygın enzim olduğunu göstermektedir (Özad Düzgün ve Saral, 2018).

## 1.7. Karbapenemazlar

Karbapenemler, GSBL antibiyotik direnci gelişen, Gram negatif bakterilere karşı kullanılan bir antibiyotik grubudur. Ancak antimikrobiyal direnç gelişimini önlemek amacı ile hayvanlarda kullanımı onaylı değildir. Buna rağmen son yıllar da yapılan çalışmalarda hayvanlarda da karbapenemlere karşı direnç şekillendiği saptanmıştır (Al vd., 2020).

Karbapenem dirençli bakterilerin yayılmasında  $\beta$ -laktam antibiyotikleri inhibe edebilen VIM, NDM, OXA ve KPC tip karbapenemazları barındıran, gram negatif bakteriler önemli bir etkidir. Karbapenemazlar, çoğu  $\beta$ -laktam antibiyotikleri inhibe etme yeteneğine sahip bir enzimdir (Diene ve Rolain, 2014). Bu enzimler Ambler sınıflamasına göre A, B ve D sınıfı metallo- $\beta$ -laktamazları kapsar (Kılıç, Demiray ve Altındış, 2016). Bu sınıfların farkları Çizelge 1.3’te gösterilmiştir.

**Çizelge 1.3.** A, B ve D sınıfı metallo- $\beta$ -laktamaz farkları (Kılıç vd., 2016).

Amber Sınıflaması	Enzim Aktif Bölgesi	İnhibitörleri	$\beta$ -laktamlar Üzerindeki Etkileri	Plazmid Kaynaklı Genler	Kromozomal Kaynaklı Genler
Sınıf A	Serin	Klavulanat ile zayıf inhibisyon	Sefamisinler hariç tüm $\beta$ -laktamlara karşı etkili	KPC	NMC/IMI
Sınıf B	Çinko (Zn)	Dipikolinik asit, EDTA	Aztreonam dışında tüm $\beta$ -laktamlara etkili	NDM	VIM, IMP
Sınıf D	Serin	-	Oksasilin ve kloksasilin üzerinde etkili.	-	OXA-48

### 1.7.1. Sınıf A Karbapenemaz

Bu grupta yer alan; kromozomal kodlanan SME (*Serratia marcescens* enzyme) ile NMC/IMI (not metalloenzyme carbapenemase/Imipenem hydrolyzing  $\beta$ -lactamase)

ve plazmidle kodlanan KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) enzimleri antimikrobiyal direnç gelişimine sebep olmaktadır (Kılıç vd., 2016).

### **1.7.2. Sınıf B Karbapenemaz**

Plazmidlerde kodlanan VIM (Verona integronencoded MBL), IMP (Imipenemase) ve NDM (New Delhi MBL) enzimlerini bulundurmaktadır (Diene ve Rolain, 2014; Kılıç vd., 2016). Yapılan çalışmalarda, Avrupa'da VIM; Tayvan, Avustralya ve Filipinler'de IMP; Hindistan, balkanlar ve Vietnam'da NDM direnç genlerinin daha baskın olduğu tespit edilmiştir (Peirano vd., 2018).

### **1.7.3. Sınıf D Karbapenemaz**

Oksasilini hidrolize edebilen OXA  $\beta$ -laktamazlar olarak da adlandırılabilirler (Diene ve Rolain, 2014). *Enterobacteriaceae* ailesi içinde karbapenemaz aktivitesi yüksek olan OXA tipi enzim, OXA-48 enzimidir (Kılıç vd., 2016). OXA  $\beta$ -laktamazlar hem plazmid hem kromozomal kaynaklı olabilirken, OXA-48 enzimi her zaman plazmid kaynaklıdır (Poirel, Potron ve Nordmann, 2012; Diene ve Rolain, 2014).

Türkiye'de tespit edilen ilk OXA-48 tip karbapenemaz *K. pneumoniae* suşunda tespit edilmiştir (Kılıç vd., 2016). Yapılan araştırmalar OXA-48 enziminin çoğunlukla Akdeniz Bölgesi'nde görüldüğünü, bununla beraber Orta Doğu ve Kuzey Afrika'da da bulunduğunu bildirmektedir (Potron, Poirel, Rondinaud ve Nordmann, 2013; Peirano vd., 2018).

## **1.8. Amp-C $\beta$ -laktamazlar**

Amp-C  $\beta$ -laktamazlar, Amber sınıflandırmasına göre, Sınıf C  $\beta$ -laktamazlar içinde yer almaktadır. Amp-C  $\beta$ -laktamazlar, *E. coli* gibi birçok *Enterobacteriaceae*'nin kromozomlarında kodlu olan bir sefalosporinazdır (Jacoby , 2009). Amp-C  $\beta$ -laktamazların çoğu, kromozomlarda kodlanmaktadır. Ancak plazmidlerde kodlanan Amp-C  $\beta$ -laktamaz genleri de bulunmaktadır. Plazmidlerde kodlanan ACC, CIT, DHA, EBC, FOX ve MOX olmak üzere 6 adet amp-C  $\beta$ -laktamaz geni vardır (Pehlivanoglu, 2019).

Amp-C  $\beta$ -laktamaz üreten bakteriler; penisilinlere, sefalosporinlere (oksiimino-sefalosporinler dâhil) ve sefamisinlere karşı dirençlidirler (Pehlivanoglu, 2019).

Bu alışmada, Ankara Bölgesi'nde yer alan çiğ süt işletmelerinden, aseptik koşullarla toplanan, toplam 150 adet sağlıklı inekten alınan sütler (120 adet) ve marketlerde satışı sunulan çiğ sütlerden (30 adet) izole edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında GSBL, Amp-C ve karbapenemaz genlerinin tespiti amaçlanmıştır.



## **2. MATERYAL-YÖNTEM**

Bu Tez çalışmasında, Ankara Bölgesi'nde bulunan, 9 farklı aile işletmesinden, toplam 150 adet (120 adedi sağlıklı inekten ve 30 adedi ise marketlerde satışı sunulan farklı firmalardan olmak üzere) çiğ süt örnekleri kullanıldı.

### **2.1. Kullanılan Ekipmanlar**

50 ml tüp,

İnkübatör,

Vortex,

McFarland,

Dansitometre,

Mikrodalga fırın,

1 µL'den 1000 µL'ye kadar mikropipetler,

Nano-Drop Spektrofotometre (Inovia, Türkiye),

Klasik PCR (Boeco, Almanya),

Elektroforez cihazı kullanıldı.

### **2.2. Kullanılan Besiyerleri ve Solüsyonlar**

MacConkey Agar (Oxoid, İngiltere),

Nutrient Agar (Oxoid, İngiltere),

Kanlı Agar,

Mueller Hinton Agar (BD, Almanya)

Ürea Agar,

Triple Sugar Iron (TSI) Agar,

Agaros (Biomax, Avrupa),

TE (Tris-Edta) ve TAE (Tris-Asetat-Edta) kullanıldı.

### 2.3. Örneklerin Toplanması

Örnekler hijyenik koşullarda, steril tüplere alınarak en kısa sürede, soğuk zincirde laboratuvara ulaştırıldı. Sağım gerçekleştirilmeden önce meme başları antiseptik su ile temizlendi ve pamuk ile silindi; örnekler alınırken ilk sağım boşa akıtıldı ve daha sonra steril falkon tüplere, her meme başından 5 ml olmak üzere, bir inekten toplam 20 ml çiğ süt örneği (dört meme başından alınan süt örnekleri havuz örnekleme mi yapıldı) alındı. Marketlerden alınan süt örnekleriyle beraber soğuk zincirde, en kısa sürede laboratuvara ulaştırıldı.

### 2.4. İzolasyon ve İdentifikasyon

#### 2.4.1. İzolasyon

Çiğ sütlerden Nutrient Agar, MacConkey Agar ve Kanlı Agar'a ekimler yapıldı ve 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda üreyen şüpheli koloniler *E. coli* ve *K. pneumoniae* yönünden incelendi. Konvansiyonel identifikasyonla birlikte, hızlı identifikasyon test kiti (BBL Crystal) ile de doğrulama yapıldı.



Şekil 2.1. Kanlı agar'a yapılan ekim.

## **2.4.2. İdentifikasyon**

### **2.4.2.1. Gram Boyama**

Yayma tekniği kullanılarak bakteriler lam üzerine yerleştirildi. Lamın üzeri kristal viyole ile tamamen kaplanıp 1 dakika beklendi ve distile su ile yıkandı. Üzeri lugol solüsyonu ile kaplanıp, 1 dakika beklendikten sonra distile su ile yıkandı. Daha sonra lamın üzeri %95'lik etanol ile kaplanıp 10-15 saniye beklendi ve tekrar distile su ile yıkandı. Lamın üzeri fuksin ile kaplanıp 30 saniye beklendikten sonra yıkandı ve preparat kurutma kağıdı veya havada kurutuldu. Mikroskopta incelendi.

### **2.4.2.2. Oksidaz Testi**

NA'da üreyen şüpheli koloniler steril swap aracılığı ile filtre kağıdı üzerine sürüldü, %1'lik oksidaz ayracı (TMpPD, N, N, N', N'-tetra-metil-p-fenilen diamin dihidroklorid) bir damla eklendi, 10-15 saniye içinde kolonilerin mor veya kahverengi-siyah renkte görünmesi oksidaz (+), görülmemesi oksidaz (-) olarak değerlendirildi (Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS), 2015).

### **2.4.2.3. İndol Testi**

Şüpheli örnekler sıvı veya yüksek oranda triptofan içeren buyyon içerisine ekimi yapıldı ve 37<sup>0</sup> C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon süreci sonunda besiyerinin üzerine 0,5 ml Kovacs veya Ehrlich ayracı eklendi. Triptofan'ın indol'e dönüşmesi sonucunda besiyerinin üzerinde kırmızı/mor halkaların görülmesi indol (+) olarak değerlendirildi (Temiz, 2000).

### **2.4.2.4. Üreaz Testi**

Üreaz enzimi ile üre CO<sub>2</sub> ve amonyağa parçalanır. Amonyanın oluşumu nedeniyle pH yükselir ve kırmızı renk gözlenir. Üre Agar'a şüpheli kolonilerden ekim yapıldı ve 37<sup>0</sup> C'de 5-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda kırmızı renk görülmesi üre (+), renk değişimi görülmemesi üre (-) olarak değerlendirildi (Temiz, 2000).

#### **2.4.2.5. Hareket Testi**

Şüpheli koloniden bir öze dolusu alınarak lam üzerinde bir damla FTS'de süspansiyon edildi. Temiz bir lamel ile üzeri kapatıldı. Hazırlanan preparat ışık mikroskopunda diyafram kısılmadan x40'luk objektifte incelendi.

#### **2.4.2.6. Laktoz Testi**

TSI Agar'da üstte sukroz, ortada laktoz ve altta glukoz bulunur. Şüpheli koloniden TSI Agar'a ekim yapıldı ve 37<sup>0</sup> C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda sarı rengi görülürse pozitif olanlar değerlendirildi. Üreme esnasında H<sub>2</sub>S açığa çıkmış durumda demir ile birleşir ve siyah renkli demir sülfid oluşur. Besiyeri ve tüp arasında boşluk bulunması gaz oluşumunun pozitif olduğunu gösterir.

#### **2.4.2.7. BBL Crystal Hızlı İdentifikasyon Sistemi**

*K. pneumoniae* ve *E. coli*'nin karakteristik özelliklerini gösteren, şüpheli izolat, identifikasyon için 37<sup>0</sup> C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve Enterik-non fermentatif bakterilere uygun kit ile identifikasyonu yapıldı.

*K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatları, % 50 Gliserinli Brain Heart Infüzyon Buyyon'da daha sonra kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

### **2.5. Klasik PCR ile Direnç Genlerinin Belirlenmesi**

#### **2.5.1. Kullanılan Primerlerin Listesi**

GSBL aktivitesi için *TEM-1*, *OXA*, *CTX-M1*, *CTX-M9*, *SHV* genleri; Karbapenemaz aktivitesi için *VIM*, *IMP*, *KPC*, *OXA-48*, *NDM* genleri ve Amp-C aktivitesi için *FOX* geni kullanılmıştır. Genlerin baz sıralamaları çizelge 2.1'de verilmiştir.

**Çizelge 2.1.** GSBL, Amp-C ve karbapenemazlar için PCR primerleri (Dallenne, Costa, Decré, Favier, & Arlet, 2010).

<b>GSBL Genleri</b>	<b>5' - 3' primer</b>
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	(F) CATTTCCTGTCGCCCCTTATTC (R) CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	(F) AGCCGCTTGAGCAAATTAAC (R) ATCCCGCAGATAAATCACCAC
<i>bla<sub>CTXM-9</sub></i>	(F) TCAAGCCTGCCGATCTGGT (R) TGATTCTCGCCGCTGAAG
<i>bla<sub>CTXM-1</sub></i>	(F)TTAGGAARTGTGCCGCTGYA (R) CGATATCGTTGGTGGTRCCAT
<i>bla<sub>OXA-1</sub></i>	(F) GGCACCAGATTCAACTTTCAAG (R) GACCCCAAGTTTCCTGTAAGTG
<b>Karbapenemaz Genleri</b>	<b>5' - 3' primer</b>
<i>bla<sub>KPC</sub></i>	(F) CATTCAAGGCTTTCTTGCTGC (R) ACGACGGCATAGTCATTTGC
<i>bla<sub>OXA-48</sub></i>	(F) GCTTGATCGCCCTCGATT (R) GATTTGCTCCGTGGCCGAAA
<i>bla<sub>NDM1</sub></i>	(F) GATGCCGACACTGAGCACTA (R) GGGCCGTATGAGTGATTGC
<i>bla<sub>VIM</sub></i>	(F) GATGGTGTTTGGTCGCATA (R) CGAATGCGCAGCACCAG
<i>bla<sub>IMP</sub></i>	(F) TTGACACTCCATTTACDG (R) GATYGAGAATTAAGCCACYCT
<b>Amp-C Geni</b>	<b>5' - 3' primer</b>
<i>bla<sub>FOX</sub></i>	(F) CTACAGTGCGGGTGGTTT (R) CTATTTGCGGCCAGGTGA

### 2.5.2. *K. pneumoniae* ve *E. coli* İzolatlarından DNA İzolasyonu

İdentifiye edilen 1 adet *E. coli* ve 4 adet *K. pneumoniae* izolatlarından Klasik PCR testinde kullanılmak üzere; 1 koloni alındı ve 100 µl steril distile su ile süspanse edildi. Daha sonra 95°C'de 10 dakika süre ile kaynatıldı; 10.000 rpm devirde, 2 dakika santrifüj edildi. Elektronik pipet yardımıyla süpernatantlar steril ependorf tüplerine alındı ve NanoDrop spektrofotometre ile elde edilmiş DNA'lar, 1-10 ng/mL olacak şekilde hazırlandı (Dallenne, Costa, Decré, Favier ve Arlet, 2010).

### 2.5.3. *K. pneumoniae* ve *E. coli* İzolatlarının Klasik PCR ile GSBL, Karbapenemaz ve Amp-C Genlerinin Belirlenmesi

Klasik PCR için 12,5 µl master mix, 1 µl DNA, 6,5 µl distile su ve 5 µl primer mix olacak şekilde 25 µl karışım ependorf tüp içerisinde hazırlandı.

Termal syclerde: 94°C’de 10 dakika, 94°C’de 40 saniye, 60°C’de 40 saniye, 72°C’de 1 dakika olmak üzere toplamda 30 siklus ve 72°C’de 7 dakika çalıştırıldı (Dallenne vd., 2010).

#### **2.5.4. Elektroforez**

2 gram agaroz tartıldı. Daha sonra 1xTAE solüsyonu ile 100 ml olacak şekilde tamamlandı. Tampon çözeltide bulunan agaroz tamamen çözünene kadar mikro dalga fırında kaynatıldı ve yaklaşık 40-45°C oluncaya kadar soğuması beklendi. Soğuyan tampon çözeltisine ethidium bromide katılarak elektroforez için hazırlanan kalıba döküldü ve jelin katılaşması için beklendi. Katılaştıran jel 1xTAE ile dolu elektroforez tankına yerleştirildi. Parafilm üzerine 1 µl 6xLoading Dye (Jel yükleme boyası) ve 5 µl amplifikasyon ürünü, pipetaj yöntemi ile homojenize edildi. 6XLoading Dye ile homojenize edilen amplifikasyonlar, ilk kuyucuk boş bırakılacak şekilde diğer kuyucuklara dolduruldu. İlk kuyucuğa 10 µl DNA-Ladder ile dolduruldu. Amplikonlar %2 agaroz içeren jel elektroforezde 45-60 dakika, 100 Voltta yürütüldü. Görüntüleme için Ethidiyum bromidli jel UV ışık altında incelendi.

### 3. BULGULAR

Tezde, 120 adet inek sütünden ve marketlerden toplanan 30 farklı markadan alınan çiğ süt numunelerden, 1 adet *E. coli* ve 4 adet *K. pneumoniae* suşu izole ve identifiye edilmiştir. Ayrıca çalışma sürecinde, marketten alınan numunelerde 1 adet *Yersinia enterocolitica* ve 1 adet *Enterobacter sakazakii* izole edilmiştir. Konvansiyonel identifikasyon testlerinin sonuçları Çizelge 3.1 'de verilmiştir.



Şekil 3.1. Üreaz Testi

Çizelge 3.1. Konvansiyonel identifikasyon test sonuçları.

İzolatlar	Oksidaz	İndol	Üre	Hareket	Gaz	Laktöz	İdentifikasyon Sonucu
73İ						+	<i>K. pneumoniae</i>
76İ						+	<i>K. pneumoniae</i>
18M	+		+	+	+	+	<i>K. pneumoniae</i>
22M		+		+	+	+	<i>E. coli</i>
21M				+	+	+	<i>Yersinia enterocolitica</i>
25M				+	+	+	<i>Enterobacter sakazakii</i>
27M			-/+	+	+	+	<i>K. pneumoniae</i>

İ: Çiftliklerden toplanan çiğ inek sütü, M: Marketlerden toplanan çiğ süt örnekleri

Klasik PCR işleminin ardından jel elektroforezde yürütülüp, UV ışık altında incelenen *E. coli* suşunda GSBL aktivitesi yönünden incelendiğinde; *CTX-M1*, *TEM-1*, *SHV*, *CTX-M9* ve *OXA-1* genleri tespit edildi. Karbapenemaz genlerinden *VIM*, *KPC*, *OXA-48*, *NDM* pozitif; *IMP* geni negatif sonuç verdi.

Şekil 3.2’de Klasik PCR’da 27M izolatında GSBL aktivitesinde sırasıyla yerleştirilen *CTX-M1*, *TEM*, *SHV*, *CTX-M9*, *OXA-1* genlerinin hepsinde pozitif; karbapenemaz aktivitesinde sırasıyla yerleştirilen *VIM*, *IMP*, *KPC*, *OXA-48*, *NDM* genlerinde *VIM*, *IMP* ve *NDM* genleri negatif, *KPC* ve *OXA-48* genleri pozitif; Amp-C aktivitesi için yerleştirilen *FOX* geni pozitif sonuç verdiği gözlemlenmiştir.

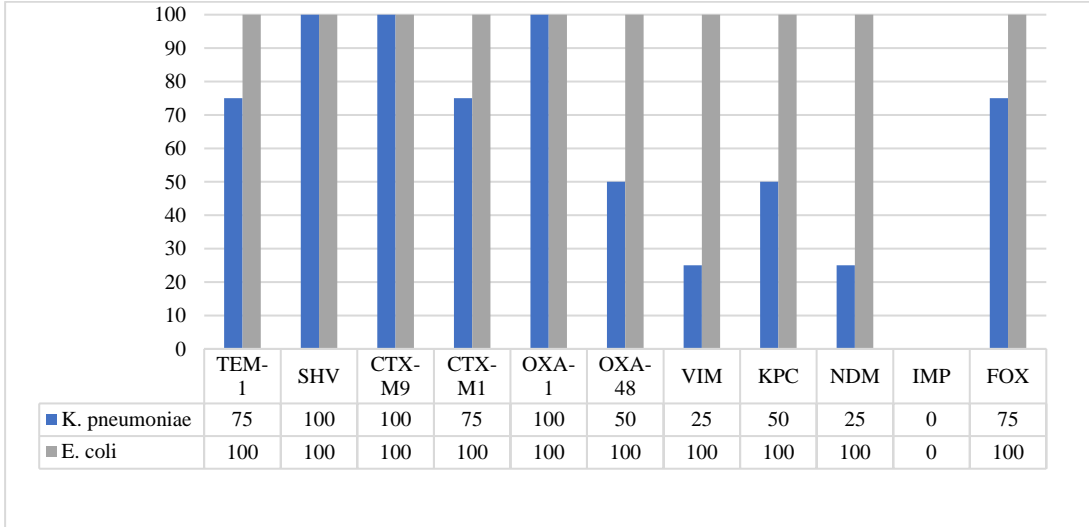
Amp-C aktivitesi için *FOX* geni pozitif bulundu. Aynı işlemler uygulanan 4 adet *K. pneumoniae* izolatı, GSBL aktivitesi yönünden incelendiğinde; *CTX-M1* geni 3 izolatta; *TEM-1* geni 3 izolatta, *SHV*, *OXA-1* ve *CTX-M9* geni tüm izolatlarda pozitif sonuç verdi. Karbapenemaz aktivitesi yönünden incelendiğinde; *VIM* ve *NDM* geni 1 izolatta, *KPC* ve *OXA-48* geni 2 izolatta, *FOX* geni 1 izolatta tesbit edildi ve *IMP* geni hiçbir izolatta rastlanılmadı. Çizelge 3.2’de klasik PCR sonuçları verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** GSBL, Amp-C ve karbapenemaz genleri açısından izolatların Klasik PCR analiz sonuçları.

İzolatlar	GSBL					KARBAPENEMAZ					AMP-C
	CTX-M1	TEM-1	SHV	CTX-M9	OXA-1	VIM	IMP	KPC	OXA-48	NDM	FOX
73İ ( <i>K. pneumoniae</i> )	YOK	VAR	VAR	VAR	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK
76İ ( <i>K. pneumoniae</i> )	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	YOK	VAR	VAR	VAR	VAR
18M ( <i>K. pneumoniae</i> )	VAR	YOK	VAR	VAR	VAR	YOK	YOK	YOK	YOK	YOK	VAR
22M ( <i>E. coli</i> )	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	YOK	VAR	VAR	VAR	VAR
27M ( <i>K. pneumoniae</i> )	VAR	VAR	VAR	VAR	VAR	YOK	YOK	VAR	VAR	YOK	VAR

Elde edilen 4 adet *K. pneumoniae* izolatında *SHV*, *CTX-M9* ve *OXA-1* genleri %100; *CTX-M1*, *FOX* ve *TEM-1* genleri %75; *KPC* ve *OXA-48* genleri %50; *VIM* ve *NDM* genleri %25; *IMP* geni %0 oranında tesbit edilmiştir. Çizelge 3.3’te grafik değerleri verilmiştir.

**Çizelge 3.3.** *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında araştırılan antimikrobiyal direnç genlerinin % grafiği



Elde edilen toplam 5 adet *K. pneumoniae* ve *E. coli* izolatlarında ise araştırılan genler değerlendirildiğinde *SHV*, *CTX-M9* ve *OXA-1* genleri %100; *CTX-M1*, *TEM-1* ve *FOX* genleri %80; *KPC* ve *OXA-48* genleri %60; *VIM* ve *NDM* genleri %40; *IMP* geni %0 oranında belirlenmiştir.

## 4. TARTIŞMA

Çiftlik hayvanları birçok zoonotik patojenler için rezervuardır ve bu patojenlere karşı antibiyotik direnci kazandıklarında halk sağlığı için ciddi tehlikeler oluşturabilirler. Özellikle antibiyotik direnç genlerinin, diğer bakterilere aktarılabilmesi ve mutasyona uğraması, halk sağlığı açısından, hayvansal gıdalara daha fazla ağırlık verilmesi gerekliliğini ortaya koymaktadır. Bakteriyel patojenlerin kontrolü için antibiyotiklerin yanlış ve aşırı kullanımı, dirençli patojenlerin gelişmesine yol açmaktadır (Al vd.,2020). Antibiyotiklere karşı artan direnç hem insan hem de Veteriner Hekimlik için küresel bir endişe haline gelmiştir (Ahmed, 2021).

Birleşik Krallık'ta yapılan bir çalışmada klinik sığır mastitis vakalarından izole edilen 2 adet *E. coli* ve 3 adet *K. pneumoniae* izolatları GSBL genleri yönünden incelenmiştir. *TEM-1* geni *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarının tamamında bildirilmiştir. *CTX-M1* geni tüm *E. coli* izolatlarında, *SHV* geni *K. pneumoniae* izolatlarının hepsinde tespit edilmiştir. *OXA* ve *amp-C* genleri ise 5 izolatın hiçbirinde bildirilmemiştir (Timofte vd., 2014). Bu çalışmada 4 *K. pneumoniae* izolatında *TEM*, *SHV*, *CTX-M9*, *CTX-M1*, *OXA-1*, *OXA-48*, *VIM*, *KPC*, *NDM* ve *FOX* genleri sırasıyla %75, %100, %100, %75, %100, %50, %25, %50, %25 ve %75 oranında saptanmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarının hiçbirinde *IMP* genine rastlanmamıştır. İzole edilen 1 *E. coli* suşundaya *TEM*, *SHV*, *CTX-M9*, *CTX-M1*, *OXA-1*, *OXA-48*, *VIM*, *KPC*, *NDM* ve *FOX* genlerini saptanırken *IMP* geni saptanmamıştır. Bu iki çalışma karşılaştırıldığında *TEM*, *SHV* ve *CTX-M* genlerinin varlığı yönünden tez bulgularıyla paralel sonuç vermiştir.

Endonezya'da yürütülen bir çalışmada Java Bölgesinde bulunan 80 adet süt çiftliğindeki toplu tank sütlerinden numuneler GSBL üreten *Enterobacteriaceae* varlığı yönünden incelenmiştir. Bu çiftliklerden toplam 8 adet *K. pneumoniae* suşu izole edilmiştir. PCR analizi sonucunda *SHV*, *TEM-1* ve *CTX-M15* genleri tüm *K. pneumoniae* izolatlarında bildirilmiştir (Sudarwanto M. , Akineden, Odenthal, Gross ve Usleber, 2015). Bu çalışmayla paralel olarak izole edilen 4 *K. pneumoniae* suşunda ise *SHV* (%100) ve *TEM-1* (%75) genleri tespit edilmiştir. *CTX-M15* genine

bakılmamış ancak *CTX-M9* (%100) ve *CTX-M1* (%75) genleri bildirilmiştir. Bu genlere ek olarak bu tez çalışmasında *OXA-1* (%100), *OXA-48* (%50), *VIM* (%25), *KPC* (%50), *NDM* (%25), *FOX* (%75) ve *IMP* (%0) genleri yönünden de araştırılmıştır.

Almanya’da yapılan bir çalışmada, 866 adet süt çiftliğinden toplanan örnekler, biyokimyasal ve moleküler yöntemler ile incelenmiştir ve elde ettikleri izolatlar içerisinde en yüksek oranda GSBL üretimi gösteren türün, % 75,6 oranında *E. coli* olduğunu tespit etmişlerdir (Odenthal vd., 2016). Tezde ise 120 farklı inekten toplanan çiğ süt numunelerinde *E. coli* izolatlarına rastlanmamıştır. 30 farklı marketten toplanan çiğ süt numunelerinde ise 1 adet izolatta (%3,3’ünde) *E. coli*, 4 adet izolatta (%2,6’sında) *K. pneumoniae*, 1 adet izolatta (%0,6’sında) *Yersinia enterocolitica* ve 1 adet izolatta (%0,6’sında) *Enterobacter sakazakii* suşları tespit edilmiştir. Odenthal ve ark. Almanya’da yaptıkları bir çalışmada GSBL üretimi gösteren *E. coli* suşlarının oranı % 75,6 olarak saptanmışken bu tez çalışmasında %3,3 oranında olup paralel sonuç vermemiştir. Her iki çalışmadan elde edilen sonuçların paralel olmaması çalışmaya konu olan hayvanların farklı coğrafi bölgelerde yer almasından kaynaklı olduğu düşünülmektedir.

Endonezya’nın batı Java Bölgesi’nde toplanan 129 adet süt numunesinin 4’ünde (%3,1) GSBL üreten *E. coli* izolatında *CTX-M* (*CTX-M15* (n=3; %75), *CTX-M55* (n=1; %25)) geni tespit edilmiş ve *CTX-M* tipi GSBL izolatlarının tamamında *TEM-1* geni bildirilirken *SHV* geni saptanmamıştır (Sudarwanto M. vd., 2017). Topladığımız çiğ süt numunelerinden izole edilen 1 *E. coli* izolatında *CTX-M* (*CTX-M1*, *CTX-M9*), *TEM*, *SHV*, *OXA* (*OXA-1*, *OXA-48*), *VIM*, *KPC*, *NDM* ve *FOX* genleri varlığı yönünden pozitif sonuç verirken *IMP* geni negatif sonuç vermiştir. Sudarwanto ve ark. yaptığı çalışmayla paralel olarak *TEM-1* (%100) geni tesbit edilmiş, *CTX-M* (*CTX-M1*, *CTX-M9*) geni farklı gruplar yönünden araştırılmıştır. Ancak bu iki çalışma *SHV* geni varlığı yönünden paralel sonuç vermemiştir.

Batı Bengal’de toplanan süt numunelerinin %12,1’inin (22/182) GSBL *E. coli* pozitif olduğunu bildirilmiştir (Batabyal vd., 2018). Sudan’da çiğ inek sütlerinde yapılan çalışmada *CTX-M* tipi ile *E. coli* ve *K. pneumoniae* için sırasıyla %29,3 ve %44,8 ile yüksek oranda pozitif GSBL geni saptamışlardır (Badri vd., 2017). Bu tezde ise *E. coli* ve *K. pneumoniae* için *CTX-M1* ve *CTX-M9* genleri sırasıyla %80 ve %100 oranında tespit edilmiştir.

Irak'ta yapılan başka bir çalışmaya bakıldığında, çiğ inek sütlerinden elde edilen izolatların %28,75'inin (23/80) GSBL pozitif olduğunu bildirmiş olup; *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarını, *CTX-M* geni yönünden pozitif olarak değerlendirmiştir (Ahmed, 2021). Bu tez sonuçlarıyla uyumlu olarak *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında, ancak daha yüksek oranda, % 100 oranında *CTX-M9* ve %80 oranında *CTX-M1* geni tespit edilmiştir.

Amerika'da mandıra çiftliklerindeki toplu tank sütlerinden alınan numuneler ile yapılan çalışmada çiftliklerden toplanan toplam 33 adet çiğ süt numunesinde 8 adet *E. coli* ve 2 adet *K. pneumoniae* suşu izole edilmiştir. Çiftliklerden toplanan *E. coli* suşlarında 7 *CTX-M*, 5 *TEM-1* geni; 2 *K. pneumoniae* suşundaysa *CTX-M* ve *SHV* genleri tespit edilmiştir (Gelalcha, Mohammed, Gelgie ve Deogo, 2023). Bu çalışmadaysa 4 *K. pneumoniae* izolatında *TEM* (%75), *SHV* (%100), *CTX-M9* (%100), *CTX-M1* (%75), *OXA-1* (%100), *OXA-48* (%50), *VIM* (%25), *KPC* (%50), *NDM* (%25) ve *FOX* (%75) genleri saptanmıştır. *K. pneumoniae* izolatlarının hiçbirinde *IMP* genine rastlanmamıştır. İzole edilen 1 *E. coli* suşundaysa *TEM*, *SHV*, *CTX-M9*, *CTX-M1*, *OXA-1*, *OXA-48*, *VIM*, *KPC*, *NDM* ve *FOX* genlerini saptanırken *K. pneumoniae* izolatındaki gibi *IMP* geni saptanmamıştır. Bu tezde Gelalcha ve ark. yaptıkları bir çalışmada *CTX-M*, *SHV* ve *TEM-1* genlerinin varlığı ve oranlarıyla paralel sonuç vermiştir.

Bu alanda ülkemizde yapılan çalışmalar kısıtlı olmakla beraber Ankara Bölgesi'nde toplanan 15 adet çiğ süt numunelerinden 12 (%80) *K. oxytoca*, 2 (%13,3) *K. pneumoniae*, 7 (%15,5) *E. coli* suşu izole edilmiştir (Gündoğan ve Avcı, 2013). Bu tez sonuçlarıyla karşılaştırıldığında 4 (%2,6) *K. pneumoniae*, 1 (%3,3) *E. coli*, 1 (%0,6) *Enterobacter sakazakii*, 1 (%0,6) *Yersinia enterocolitica* izolatu tespit edilmiştir. 2013 yılında Gündoğan ve Avcı'nın yaptığı çalışmayla karşılaştırıldığında *K. pneumoniae*'nin görülme oranı aynı sonucu verirken *E. coli* suşunun oranı bu tezde daha düşük saptanmıştır.

Bu çalışmalara ek olarak Türkiye'nin Karadeniz Bölgesi'nden toplanan 150 adet çiğ inek sütü numunelerinden izole edilen, GSBL üreten *Enterobacteriaceae* suşlarında, *KPC*, *NDM*, *OXA-48*, *IMP* ve *VIM* genleri ile fenotipik karbapenemaz üretiminin prevalansı, 41 *E. coli* ve 6 *K. pneumoniae* olmak üzere, toplam 47 fenotipik GSBL üreten izolat karbapenemaz aktivitesi açısından araştırılmış; PCR incelemeleri ile 47 izolattan 33'ünün analiz edilen karbapenemaz genlerinden en az birini barındırdığını

ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmada *E. coli* suşlarında GSBL genleri sırasıyla, *CTX-M* % 36,58, *TEM* % 24,39 ve *SHV* %7,31 olarak belirlenmiştir (Uyanik vd., 2022). Tezde ise 120 adet çiğ inek sütü ve marketlerden toplanan 30 farklı markadan alınan çiğ inek süt numunelerinde 1 adet *E. coli* ve 4 adet *K. pneumoniae* olmak üzere toplam 5 adet GSBL, karbapenemaz ve Amp-C genleri araştırılmıştır. Tezde bulunan oranlardan daha yüksek oranda GSBL, karbapenemaz ve Amp-C genleri belirlenmiştir; *SHV*, *CTX-M9* ve *OXA-1* genleri % 100; *CTX-M1*, *TEM-1* ve *FOX* genleri % 80; *KPC* ve *OXA 48* genleri % 60, *VIM* ve *NDM* genleri % 10 bulunurken, *IMP* geni bulunmamıştır. Farklı bölgelerde farklı antimikrobiyal tedavi yaklaşımları uygulanmasının direnç genlerinde farklılıklara neden olduğu düşünülmektedir.



## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bilinçsizce uygulanan antibiyotikler ile pastörize edilmeyen ve/veya pastörizasyon işlemi başarılı olmayan çiğ sütlerin tüketilmesi, antibiyotik direncinin tüm dünyada hızlı bir şekilde yaygınlaşmasında etkilidir. Ankara Bölgesi'nde çiğ sütlerden izole ve identifiye edilen *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatlarında, diğer birçok çalışmadan daha yüksek oranda GSBL, Amp-C ve karbapenemaz genleri saptandı. Bu nedenle inek besleyen küçük aile işletmelerinden elde edilen sütlerin ve marketlerde satışı yapılan çiğ sütlerin mikrobiyolojik kalite ve sonrasında antibiyotik dirençliliği yönünden takip edilmesi gerektiği ve bu ürünleri tüketen insanların antibiyotik dirençliliği açısından risk altında oldukları düşünülmektedir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak, antibiyotik direnç sorunlarının önüne geçmek için, tüketicilerin ve hayvan üreticilerinin bilinçlendirilmesine ihtiyaç olduğu ve bu konuda farkındalık oluşturmanın faydalı olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKÇA

- Ahmed, I. M. (2021). Detection of *CTX-M* gene in extended spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Enterobacteriaceae* isolated from bovine milk. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 35(2), 397-402. doi:10.33899/ijvs.2020.126909.1412
- Al, S., Hızlısoy, H., Ertaş Onmaz, N., Karadal, F., Barel, M., Yıldırım, Y., & Gönülalan, Z. (2020). A molecular investigation of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* and *blaKPC*, *blaNDM* and *blaOXA-48* genes in raw milk. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26(3), 391-396. doi:DOI: 10.9775/kvfd.2019.23329
- Alharbi , N., Khaled, J., Kadaikunnan, S., Alobaidi, A., Sharafaddin, A., Alyahya, S., . . . Shehu, M. (2019). Prevalence of *Escherichia coli* strains resistance to antibiotics in wound infections and raw milk. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7), 1557-1562.
- Athanasakopoulou, Z., Reinicke, M., Diezel, C., Sofia, M., Chatzopoulos, D., Braun, S., . . . Billinis, C. (2021). Antimicrobial resistance genes in ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from animals in Greece. *Antibiotics (Basel)*, 10(4),
- Badri, A. M., Ibrahim, I. T., Mohamed, S. G., Garbi, M. I., Kabbashi, A. S., & Arbab, M. H. (2017). Prevalence of Extended Spectrum Beta Lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from raw milk samples in Al Jazirah State, Sudan. *Molecular Biology*, 7(1). doi:DOI: 10.4172/2168-9547.1000201
- Batabyal, K., Banerjee, A., Pal, S., Dey, S., Joardar, S. N., Samanta, I., Singh, A. D. (2018). Detection, characterization, and antibiogram of extended-spectrum beta-lactamase *Escherichia coli* isolated from bovine milk samples in West Bengal, India. *Veterinary world*, 11(10), 1423-1427.
- Bradley, A. J. (2002). Bovine mastitis: an evolving disease. *The Veterinary Journal*, 164, 116-128.
- Dallenne, C., Costa, A., Decré, D., Favier, C., & Arlet, G. (2010). Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*, 65(3), 490-495.
- D'Andrea, M., Arena, F., Pallecchi, L., & Rossolini, G. (2013). CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol*, 303((6-7)), 305-317.
- Deniz Ögedey, E., Cömert, F., Köktürk, F., Külah, C., & Aktaş, E. (2016). Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) üreten *Escherichia coli* ve

*Klebsiella* spp. izolatlarında CTX-M enzimlerinin belirlenmesi. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Dergisi*, 46(2), 88-96.

Diene, S., & Rolain, J.-M. (2014). Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(9), 831-838.

Ewers, C., Bethe, A., Semmler, T., Guenther, S., & Wie, L. (2012). Extended-spectrum  $\beta$ lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. *Clin Microbiol Infect*, 18(7), 646-655.

Freire, S., Grilo, T., Rodrigues, B., & Oliveira, R. (2023). ESBL- and Carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* among bivalves from Portuguese shellfish production areas. *Microorganisms*, 11(2), 415.

Gelalcha, B., Mohammed, R., Gelgie, A., & Dego, O. (2023). Molecular epidemiology and pathogenomics of extended-spectrum beta-lactamase producing- *Escherichia coli* and - *Klebsiella pneumoniae* isolates from bulk tank milk in Tennessee, USA. *Frontiers in Microbiology*, 14.

Ghanbarpour, R., & Oswald, E. (2010). Phylogenetic distribution of virulence genes in *Escherichia coli* isolated from bovine mastitis in Iran. *Research in Veterinary Science*, 88, 6-10.

Görgeç, S. (2012). Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üreten Nozokomiyal *Escherichia coli* İzolatlarında Beta-Laktamaz Genleri ve Klonal İlişkinin Araştırılması. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi.

Gücüköglü, A., Uyanık, T., Çadirci, Ö., Uğurtay, E., Kanat, S., & Bölükbaş, A. (2023). Determination of extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in raw water buffalo milk and dairy products by conventional multiplex and real-time PCR. *International Dairy Journal*, 140. doi:https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2022.105581

Güler, L., & Gündüz, K. (2007). Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from clinical bovine mastitis. *Turkish Journal of Veterinary And Animal Sciences*, 35(1), 361-365.

Gündoğan, N., & Avcı, E. (2013). Prevalence and antibiotic resistance of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species isolated from foods of animal origin in Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, 7(31).

Halıcı Demir, C., & Kızıl, S. (2022). Sütçü ineklerde meme mikrobiyotası. *Veteriner Farmakoloji ve Toksikoloji Derneği Bülteni*, 70-77.

Hendriksen, R., Munk, P., Njage, P., Bunnik, B., & McNally, L. (2019). Global monitoring of antimicrobial resistance based on metagenomics analyses of urban sewage. *Nature Communications*, 1110-1124.

- Jacoby , G. (2009). AmpC  $\beta$ -lactamases. *American Society for Microbiology Journals Clinical Microbiology Reviews*, 22(1).
- Jones, R., Baquero, F., Privitera, G., Inoue, M., & Wiedemann, B. (1997). Inducible  $\beta$ -lactamase-mediated resistance to third-generation cephalosporins. *Clinical Microbiology and Infection*, 3(1), 7-20.
- Junaid, K., Ejaz, H., Younas, S., Alanazi, A., Yasmeen, H., & Rehman, A. (2022). Detection of *Klebsiella pneumoniae* antibiotic-resistant genes: An impending source of multidrug resistance dissemination through raw food. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 3347–3353.
- Kaipainen, T., Pohjanvirta, T., Shpigel, N., Shwimmer, A., Pyörala, S., & Pelkonen, S. (2002). Virulence properties of *Escherichia coli* isolated from clinical bovine mastitis. *Veterinary Microbiology*, 85, 37-46.
- Kamburoğlu, A. (2011). Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. izolatlarında Beta Laktamaz Direncinin Polimeraz Zincir Reaksiyonu İle Araştırılması. MSc, Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü.
- Kayış, U. (2019). Antimikrobiyal direnç mekanizmaları. *Aydın Sağlık Dergisi*, 5(1), 1-12.
- Khider Abd Alrahim Ahmed, M. (2017). Hayvansal kaynaklı *Escherichia coli* izolatlarında bazı virulens genlerinin PCR ile saptanması.
- Kılıç, Ü., Demiray, T., & Altındış, M. (2016). Karbapenamaz üreten *Enterobacteriaceae* izolatlarının saptanmasında fenotipik ve genotipik metotlar. *ANKEM Dergisi*, 30(2), 62-75.
- Koovapra, S., Bandyopadhyay, S., Das, G., Bhattacharyya, D., Banerjee, J., Mahanti, A., Singh, R. K. (2016). Molecular signature of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from bovine milk in Eastern and North-Eastern India. *Infection, Genetics and Evolution*(44), 395-402.
- Langoni, H., Guiduce, M., Nóbrega, D., Silva, R., Richini-Pereira, V., Salina, A., & Guimarães, F. (2015). Research of *Klebsiella pneumoniae* in dairy herds. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 35(1), 9-12.
- Lenchenko, E., Blumenkrants, D., Sachivkina, N., Shadrova, N., & Ibragimova, A. (2020). Morphological and adhesive properties of *Klebsiella pneumoniae* biofilms. *Vet World*, 13(1), 197-200.
- Losnedahl, K. J., Wang, H., Mueen, A., Zou, S., & Hurley, W. L. (1996, January). *ResearchGate GmbH*. 11 6, 2022 tarihinde ResearchGate Web Sitesi: [https://www.researchgate.net/publication/260171252\\_Antimicrobial\\_Factors\\_in\\_Milk/references](https://www.researchgate.net/publication/260171252_Antimicrobial_Factors_in_Milk/references) adresinden alındı.
- Martínez, J., Coque, T., & Baquero , F. (2014). What is a resistance gene? Ranking risk in resistomes. *Nature Reviews Microbiology*, 1-8.

- Mathers, A., Peirano, G., & Pitout, J. (2015). The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinical Microbiology Reviews*, 28(3).
- Meijs, A., Gijsbers, E., Hengeveld, P., Dierikx, C., Greeff, S., & Duijkeren, E. (2021). ESBL/pAmpC-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* carriage among veterinary healthcare workers in the Netherlands. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 10(147).
- Moya, C., & Maicas, S. (2020). Antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains: Mechanisms and outbreaks. *The 1st International Electronic Conference on Microbiology*, 66, s. 11.
- Nataro, J., & Kaper, J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 11(1), 142.
- Odenthal, S., Akineden, Ö., & Usleber, E. (2016). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae* in bulk tank milk from German dairy farms. *International Journal of Food Microbiology*, 72-78.
- Omerovic, M., Müştak, H., & Kaya, İ. (2017). *Escherichia coli* patotiplerinin virülens faktörleri. *Etilik Vet Mikrobiyol Dergisi*, 28(1), 1-6.
- Öngen, B. (2008). *Escherichia coli* ishallerinde laboratuvar tanısı. *ANKEM Dergisi*, 22(2), 197-210.
- Özad Düzgün, A., & Saral, A. (2018). Investigation of antibiotic resistance genes and class 1 integron in multi-drug resistant *P. aeruginosa* and *E. coli* strains. *Cumhuriyet Science Journal*, 39(4), 1063-1068.
- Padhye, N., & Doyle, M. (1992). *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis, and methods for detection in food. *J Food Protect*, 55(7), 555-565.
- Paterson, D., & Bonomo, R. (2005). Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases: a clinical update. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 657-686.
- Pehlivanoğlu, F. (2019). Gram negatif bakterilerin beta-laktamaz enzim çeşitliliği ve Türkiye'deki hayvan orjinli bakterilerdeki durum. *F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.*, 33(2), 113-122.
- Peirano, G., Matsumura, Y., Adams, M., Bradford, P., Motyl, M., Chen, L., . . . Pitout, J. (2018). Genomic epidemiology of global carbapenemase-producing *Enterobacter* spp., 2008–2014. *Emerging Infectious Diseases*, 24(6).
- Philippon, A., Arlet, G., & Lagrange, P. (1994). Origin and impact of plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamases. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 13(1), 17-29.
- Poirel, L., Madec, J.-Y., Lupo, A., Schink, A.-K., Kieffer, N., Nordmann, P., & Schwarz, S. (2018). Antimicrobial resistance in *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, 6(4).

- Poirel, L., Potron, A., & Nordmann, P. (2012). OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *Journal of Antimicrob Chemother*, *67*, 1597–1606.
- Potron, A., Poirel, L., Rondinaud, E., & Nordmann, P. (2013). Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Eurosurveillance*, *18*(31).
- Prescott, J., Rycroft, A., Boyce, J., MacInnes, J., Immerseel, F., & Vázquez-Boland, J. (2022). *Pathogenesis of bacterial infections in animals*.
- Qi, C., Pilla, V., Yu, J., & Reed, K. (2010). Changing prevalence of *Escherichia coli* with Ctx-M-Type extended-spectrum B-lactamases in outpatient urinary *E. coli* between 2003 And 2008. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *67*, 87-91.
- Reygaert, W. (2018). An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiol*, *4*(3), 482-501.
- Rossolin, G., D'Andrea, M., & Mugnaioli, C. (2008). The spread of Ctx-M-Type extended-spectrum B-lactamases. *Clinical Microbiology and Infection*, *14*(1), 33-41.
- Rupp, M., & Fey, P. (2003). Extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*. *Drugs*, *63*(4).
- Shulman, S., Friedmann, H., & Sims, R. (2007). Theodor Escherich: the first pediatric. *Clinical Infectious Diseases*, *45*, 1025-1029.
- Sordillo, L. M., Shafer-Weaver, K., & DeRosa, D. (1997). Immunobiology of the mammary gland. *J Dairy Sci.*, *80*(8), 1851-1865. doi:doi: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76121-6
- Sudarwanto, M., Akineden, Ö., Odenthal, S., Gross, M., & Usleber, E. (2015). Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL)–producing *Klebsiella pneumoniae* in bulk tank milk from dairy farms in Indonesia. *Foodborne Pathogens and Disease*, *12*(7).
- Sudarwanto, M., Akineden, Ö., Sukmawinata, E., Pisestyani, H., Lukman, D., & Latif, H. (2017). CTX-M-15 and CTX-M-55 producing *Escherichia coli* in milk from dairy farms in West Java, Indonesia. *International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR)*, *31*(1).
- Temiz, A. (2000). Genel Mikrobiyoloji Uygulama Teknikleri. Ankara: Hatipoğlu Yayinevi.
- Timofte, D., Maciuca, I., Evans, N., Williams, H., Wattret, A., Fick, J., & Williams, N. (2014). Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12  $\beta$ -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *58*(2).

- Topal, M., Uslu Şenel, G., Arslan Topal, E., & Öbek, E. (2015). Antibiyotikler ve kullanım alanları. *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31(3), 121-127.
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS). (2015). T. S. Bakanlığı içinde, *Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi* (Cilt 1, 2, 3). Ankara.
- Uyanık, T., Çadirci, Ö., 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2021.105315>.
- Wenz, J., Barrington, G., Garry, F., Ellis, R., & Magnuson, R. (2006). *Escherichia coli* isolates' serotypes, genotypes, and virulence genes. *Journal of Dairy Science*, 89(9).
- Willke, A. (2008). *Escherichia coli* ishallerinde etiyoloji ve patogenezi. *ANKEM Dergi*, 22(2), 188-191.
- Yıldırım, D., & Pehlivanoglu, F. (2018). Buzağuların genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üreten *Escherichia coli* taşıyıcılığı. *Firat University Journal of Health Sciences*, 32(3), 155-160.
- Yüce, A. (2001). Antimikrobik ilaçlara direnç kazanma mekanizmaları. *Klinik Dergisi*, 14(2), 41-46.