



## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Vet.Derg.  
2018; 32 (3): 155 - 160  
http://www.fusabil.org

### Buzağların Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üreten *Escherichia coli* Taşıyıcılığı\*

Durmuş YILDIRIM<sup>1, a</sup>  
Faruk PEHLİVANOĞLU<sup>2, b</sup>

<sup>1</sup> Burdur İl Tarım Gıda ve Hayvancılık Müdürlüğü, Burdur Gıda Kontrol Laboratuvarı, Burdur, TÜRKİYE

<sup>2</sup> Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Burdur, TÜRKİYE

<sup>a</sup> ORCID: 0000-0001-9674-2583

<sup>b</sup> ORCID: 0000-0001-9358-8007

Gram negatif bakteriler tarafından üretilen genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) bakterinin tüm penisilinlere, 1.-4. kuşak sefalosporinlere ve monobaktamlara dirençli olmasını sağlamaktadır. Bu çalışmada Türkiye'nin Burdur ili'ndeki sağlıklı buzağlarda GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı ve bu izolatlarda yaygın GSBL genlerinin varlığı araştırıldı. Toplanan 150 buzağı dışkı örneğinin herbirinden tamponlanmış peptonlu su içinde %10'luk süspansiyon hazırlandı ve sefotaksim ve seftazidim ilave edilerek hazırlanmış *E. coli* / koliform selektif agar besiyerlerine eş zamanlı ekildi. Besiyerinde görülen kolonilerden *E. coli* identifikasyonu standart metotlarla ve polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile genotipik doğrulama yoluyla yapıldı. Ardından *E. coli* izolatlarının GSBL üretilip üretilmediği kombine disk metodu ile belirlendi ve yaygın GSBL genleri olan Sefotaksimaz-Münih (CTX-M), Temoneira (TEM) ve sülfhidril değişkeni (SHV) PZR ile araştırıldı. Son olarak izolatların çeşitli beta laktam antibiyotiklere ve diğer sınıftan antibiyotiklere duyarlılığı agar disk difüzyon testi ile araştırıldı. Toplam 44 adet *E. coli* selektif agardan izole edildi ancak bunların 36'sı GSBL üreten izolat olarak tespit edildi. CTX-M (grup 1) genleri tüm izolatlarda belirlenirken SHV genine hiçbir izolatta rastlanmadı. GSBL üreten *E. coli* izolatları beta laktam grubu ve diğer grup antibiyotiklere yüksek oranda dirençli bulundu. Sonuç olarak, bu çalışma ile Türkiye'nin Burdur ilindeki işletmelerdeki sağlıklı buzağlarda GSBL üreten *E. coli* varlığı ve GSBL gen tiplerinin yaygınlığı gösterilmiş oldu.

**Anahtar Kelimeler:** Beta laktamaz, buzağı, CTX-M, GSBL, *Escherichia coli*

#### Carriage of Extended Spectrum Beta Lactamase Producing *Escherichia coli* in Calves

Extended spectrum beta lactamases (ESBL) produced by Gram negative bacteria confer resistance to all penicillins, 1<sup>st</sup>-4<sup>th</sup> generation cephalosporins and monobactams. In the present study, existence of ESBL producing *E. coli* isolates and frequency of the most prevalent ESBL genes in such *E. coli* isolates were investigated in the healthy calves in Burdur city of Turkey. A 10% suspension was prepared from each faeces (n=150) in peptone buffered water and spread on *E. coli* / coliform selective agar supplemented with cefotaxime and ceftazidime. The colonies appeared on the media were identified as *E. coli* by standard methods and genetic confirmation for *E. coli* was performed by polymerase chain reaction (PCR). Then ESBL production of *E. coli* isolates were confirmed by combined disc method and the common ESBL genes Cefotaximase-Munich (CTX-M), Temoneira (TEM) and Sulphydryl variable (SHV) were investigated by PCR. Finally, susceptibilities of the ESBL producing *E. coli* isolates to several beta lactams and other classes of antibiotics were investigated by agar disc diffusion test. Forty four *E. coli* isolates were isolated from selective media but 36 of them were confirmed as ESBL producer. CTX-M (group 1) genes were found in all isolates but SHV gene was not detected in the isolates. ESBL producing *E. coli* isolates were found resistant at high rate against to beta lactam group and other groups of antibiotics. Consequently, this study showed the presence of ESBL producing *E. coli* in the healthy calves in Burdur city of Turkey and also prevalence of types of ESBL genes in ESBL producing *E. coli* isolates.

**Key Words:** Beta lactamase, calf, CTX-M, ESBL, *Escherichia coli*

#### Giriş

Beta laktam grubu antibiyotikler hayvanların çeşitli enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu antibiyotiklere karşı bakterilerin geliştirdiği dirençte bakterilerin ürettiği oldukça heterojen yapıda olan beta laktamaz enzimleri önemli bir yer tutar (1, 2). Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) olarak bilinen enzimler, beta laktam grubu antibiyotiklerden sefotaksim, seftazidim, seftriakson gibi oksimino beta laktamlara, aztreonama ve penisilinlere direnç kazandıran ve genetik şifresi plazmid üzerinden taşınan enzimlerdir (2, 3). GSBL'ler beta laktamaz inhibitörlerine (klavulanik asit, sulbaktam ve tazobaktam) duyarlıdırlar ve bu özellikleri fenotipik testlerle belirlenmelerine temel oluşturur (2).

Günümüze değin *E. coli* izolatlarında belirlenmiş en yaygın GSBL sınıfları TEM, SHV ve CTX-M'dir (2). Bilinen GSBL sınıfları, her bir sınıftaki beta laktamaz tiplerinin sayıları ve nükleotid dizilerine Bush ve ark. (4) tarafından düzenlenen ilgili web sitesinden ulaşılabilmektedir. Günümüze değin tanımlanmış TEM ve SHV sınıfı beta laktamazların tümü GSBL karakterinde değilken CTX-M sınıfı beta laktamazların tümü GSBL karakterindedir. CTX-M sınıfı beta laktamazlar ayrıca kendi içerisinde de amino

\* Bu çalışma birinci yazarın yüksek lisans tezinden özetlenmiş olup Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 0277-YL-16 nolu proje ile desteklenmiştir.

Geliş Tarihi : 16.04.2018  
Kabul Tarihi : 29.05.2018

#### Yazışma Adresi Correspondence

Faruk PEHLİVANOĞLU  
Mehmet Akif Ersoy  
Üniversitesi,  
Veteriner Fakültesi,  
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı,  
Burdur – TÜRKİYE

pehlivanoglu@mehmetakif.edu.tr

asit dizisi benzerliğine göre grup 1, grup 2, grup 8, grup 9 ve grup 25 diye 5 ayrı alt gruba ayrılmaktadırlar (5). Son 20 yılda yapılan çalışmalar CTX-M genini taşıyan *E. coli* izolatlarının prevalansının arttığını göstermektedir (6, 7).

Türkiye'de sığırlarda yapılmış GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığını ve GSBL genlerinin karakterizasyonunu bildiren çalışma sayısı sınırlıdır (8-11). Ancak bu çalışmalar yetişkin sığırlar üzerinde yapılmış olup yetişkin sığırların GSBL üreten *E. coli* taşıyıcısı oldukları belirlenmiştir. Bahsedilen çalışmalardan sadece Küçükbaşmacı ve ark. (10)'nın çalışması buzağularını da içermekte olup buzağuların GSBL üreten *E. coli*'yi taşımadıkları belirtilmiştir.

Bu çalışmada, Burdur ili'nde sığır işletmelerinde yetiştirilen sağlıklı buzağuların bağırsak mikroflorasında, GSBL üreten *E. coli* suşlarının varlığının ve bu suşların taşıdıkları yaygın GSBL genlerinin belirlenmesi amaçlandı.

### Gereç ve Yöntem

**Örnekleme:** Çalışmada dışkı örneği toplanacak Burdur iline bağlı ilçeler, Holştayn sığır işletmeleri ve sağlıklı buzağular tesadüfi örnekleme metodu ile seçildi. Dışkı örnekleri, 3 ilçeden (Bucak, Merkez ve Tefenni), toplam 44 işletme ziyaret edilerek her ilçeden 50'şer adet olmak üzere toplam 150 adet Holştayn ırkı 6 aylık yaşta ve daha küçük olan sağlıklı buzağulardan toplandı. Çalışmadaki seçilen işletmelerin herbirinden en az 2 ve en fazla 5 buzağudan dışkı örneği alındı. Ayrıca dışkı örneği toplanan buzağuların yaşları (ay) kaydedildi. Yaş dağılımına göre; 0 – ≤2 ay yaş arası 56 buzağudan, 2 ay < – ≤4 ay yaş arası 47 buzağudan ve 4 ay < – ≤6 ay yaş arası 47 buzağudan örnek toplandı. Dışkı örnekleri, steril dışkı numunesi alma kapları içerisine her bir hayvan için ayrı eldiven kullanılarak direkt rektumdan alındı. Numuneler alımı takiben soğuk şartlarda 2 saat içerisinde laboratuvara nakledildi.

Bu çalışma Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu tarafından 09.09.2015 tarih ve 139 sayılı kararı ile uygun bulunmuştur.

**Ön Zenginleştirme ve Selektif İzolasyon:** Alınan her bir dışkı örneğinden tamponlanmış peptonlu su (Lab M, İngiltere) içinde %10'luk süspansiyon hazırlandı ve 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat süreyle inkübe edildi. Ardından her bir dışkı süspansiyonundan 25 µL alınıp içerisine 2 µg/ml sefotaksim (Sigma, ABD) veya 2 µg/mL seftazidim (Sigma, ABD) ilave edilerek hazırlanmış Brilliance *E. coli* / koliform selektif besi yerlerine (Oxoid, İngiltere) eş zamanlı olarak ekildi ve petriler 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat süreyle inkübasyona alındı. Petrilerde üreyen seftazidim ve sefotaksime dirençli mor renkli kolonilerden MacConkey Agar (BD, ABD) besi yerine pasajlar yapıldı ve 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi. MacConkey Agar (BD, ABD) besiyerinde üreyen pembe renkli laktöz pozitif koloniler Tryptic Soy Agar (Oxoid, İngiltere) besi yerine pasajlandı ve 37 °C'de aerobik koşullarda 24 saat inkübe edildi.

***E. coli* İdentifikasyonu ve Genetik Doğrulama:** *E. coli* identifikasyonu amacıyla üçlü tüp sistemi (12) ve

ayrıca katalaz testi, metil red testi, oksidaz testi, sitrat testi ve Voges-Proskauer testi uygulandı (13). Elde edilen suşlardan DNA ekstraksiyonu kaynatma yöntemi ile yapıldı. Bunun için, Tryptic Soy Agar (Oxoid, ABD)'da üretilmiş *E. coli* izolatlarının her birinin steril ultra saf su içinde süspansiyonları hazırlandı (McFarland 5.0) ve süspansiyonlar 99 °C'de 15 dakika termal blokta tutuldu. Ardından süspansiyonlar 14000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilip hücre partikülleri çöktürüldü. DNA'nın olduğu üst sıvıdan 100 µL alınıp steril ependorf tüplere aktarıldı. İzolatlardan elde edilen bu DNA örnekleri ile *E. coli* 16S rRNA genine özel primer çifti (Thermo Fisher Scientific Inc) kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapıp izolatların genetik doğrulaması gerçekleştirildi (14). PZR'de pozitif kontrol suşu olarak *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı.

**GSBL Fenotipik Doğrulama Testi (Kombine Disk Metodu):** İdentifikasyonları gerçekleştirilen *E. coli* izolatlarının GSBL üreten izolatlar olup olmadığının tespiti amacıyla Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)'nin önerdiği fenotipik doğrulama testi uygulandı (15). Test, 0.5 McFarland'a göre yoğunluğu hazırlanmış *E. coli* izolatı süspansiyonu ile Mueller Hinton Agar (BD, ABD) besi yerinde, sefotaksim (30 µg) (BD, ABD) ve sefotaksim-klavulanik asit (30/10 µg) (BD, ABD), seftazidim (30 µg) (BD, ABD) ve seftazidim-klavulanik asit (30/10 µg) (BD, ABD) diskleri kullanılarak gerçekleştirildi. Sefalosporin klavulanik asit kombinasyonunu içeren diskin etrafında oluşan inhibisyon zon çapı, aynı sefalosporin antibiyotiği içeren diskin etrafında oluşan zonun çapından 5 mm ve daha fazla ise, bu izolat GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edildi (15). Testte, pozitif ve negatif kontrol suşları olarak sırasıyla *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 ve *E. coli* ATCC 25922 kullanıldı (15).

**Antimikrobiyel Duyarlılık Testi:** GSBL üretimi doğrulanan *E. coli* izolatlarının beta laktam antibiyotiklere olan duyarlılıkları agar disk difüzyon testi ile belirlendi (15). Bu amaçla, aztreonam (30 µg), sefpodoksim (10 µg), seftriakson (30 µg), sefoksitin (30 µg) ve seftiofur (30 µg) diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanıldı. Test Mueller Hinton Agar (BD, ABD)'da gerçekleştirildi. Aztreonam, sefpodoksim ve seftriakson inhibisyon zon çapları CLSI'nin GSBL tarama testi zon çapları kriterlerine göre değerlendirildi (15). Sefoksitin değerlendirilmesinde ise CLSI'nin Enterobacteriaceae familyası için standart zon çapları kullanıldı (15).

Elde edilen GSBL üreten *E. coli* izolatlarının, diğer sınıf antibiyotiklere olan duyarlılıkları CLSI protokolüne göre agar disk difüzyon testi ile Mueller Hinton Agar (BD, ABD)'da belirlendi (15). Bu amaçla, enrofloksasin (5 µg), florfenikol (30 µg), gentamisin (10 µg), tetrasiklin (30 µg) ve sulfametoksazol - trimetoprim (25 µg) diskleri (Oxoid, İngiltere) kullanıldı. Enrofloksasin ve tetrasiklinin değerlendirilmesinde CLSI'nin hayvan patojenleri için önerdiği zon çapları baz alındı (16). Florfenikolün değerlendirilmesinde hayvan patojenleri *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* ve *Histophilus somni* için kabul edilmiş zon çapları baz alındı (17). Gentamisin ve sulfametoksazol – trimetoprim inhibisyon zon

çaplarının değerlendirilmesinde ise CLSI'nin hayvan patojenleri için güncellenmiş kritik zon çapları baz alındı (17).

**GSBL Genleri İçin PZR:** DNA örneklerinin her biri, TEM (18, 19), SHV (19, 20) ve CTX-M (19, 21) genlerine özel primerler (Thermo Fisher Scientific Inc) kullanılarak PZR ile test edildi. CTX-M geninin belirlenmesi için önce universal primer (19, 21) kullanılarak CTX-M geni taşıyan izolatlar belirlendi. Ardından CTX-M grup 1 primerleri ile CTX-M geni taşıyan izolatlar PZR yapıldı (19, 22). PZR'da pozitif kontrol izolatları olarak, TEM geni için *E. coli* ATCC 35218 (TEM-1), SHV geni için *K. pneumoniae* ATCC 700603 (SHV-18), CTX-M universal ve CTX-M grup 1 PZR için *E. coli* NTCC 13461 izolatları kullanıldı. Çalışmada uygulanan PZR protokolleri Pehlivanoglu ve ark. (11)'dan alındı. PZR ürünleri, %1'lik agaroz jel içerisinde yürütülerek ultraviyole ışığı altında görüntülendi.

**İstatistiksel Analiz:** Buzağuların yaş grupları arasında GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı açısından farkın önemli olup olmadığını belirlemek amacıyla Pearson ki kare testi uygulandı (23). Değerlendirmede  $P < 0.05$  değeri istatistiksel olarak önemli kabul edildi.

## Bulgular

Seftazidim ve seftoksim içeren Brilliance *E. coli* / koliform selektif besiyerlerinin her ikisinde de üreyen mavi-mor renkli muhtemel *E. coli* izolat sayısı; Bucak ilçesinde 8, Merkez ilçede 18 ve Tefenni ilçesinde 18 olmak üzere toplam 44 olarak bulundu. Her bir petriden rastgele 1 koloni seçildi ve MacConkey Agar besiyerine pasajlandı. İzolatların tümü MacConkey agarda üredi ve tümünün laktoz pozitif olduğu görüldü. Fenotipik testlerle yapılan identifikasyon sonucunda 44 izolatın tümünün *E. coli* olduğu belirlendi. *E. coli* 16S rRNA genine özel primer çifti kullanılarak yapılan PZR'a göre de 44 izolatın tümünün *E. coli* olduğu doğrulandı.

*E. coli* / koliform selektif besiyerinde üreyen toplamda 44 izolatın 36'sının GSBL üreten *E. coli* olduğu kombine disk metodu ile belirlendi. Böylece çalışmada toplanan 150 dışkı örneğinin 36'sından GSBL üreten *E. coli* izole edilmiş ve izolasyon oranının %24 olduğu belirlenmiş oldu. İlçelere göre izolasyon oranları Bucak ilçesi için %16 (8/50), Merkez ilçe için %32 (16/50) ve Tefenni ilçesi için % 24 (12/50) olarak belirlendi.

Çalışmada toplanan örnekler her bir yaş grubunda değerlendirildiğinde, GSBL üreten *E. coli* izolasyon oranlarının birbirine yakın olduğu görüldü. Bu oranların, 0 - ≤2 ay yaş grubunda % 23.21 (13/56), 2 ay < - ≤4 ay yaş grubu için %25.53 (12/47) ve 4 ay < - ≤6 ay yaş grubu için ise %23.40 (11/47) olduğu belirlendi. Buzağuların yaş gruplarına göre GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı arasındaki fark istatistiksel olarak önemli bulunmadı ( $P = 0.957$ ).

Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre GSBL üreten *E. coli* izolatlarının yüksek direnç profiline sahip olduğu belirlendi. İzolatların tümü aztreonam, seftodoksime, seftriakson ve seftiofura dirençli ve seftoksime duyarlı bulundu. Diğer sınıflardan antibiyotiklerden en yüksek direnç oranı

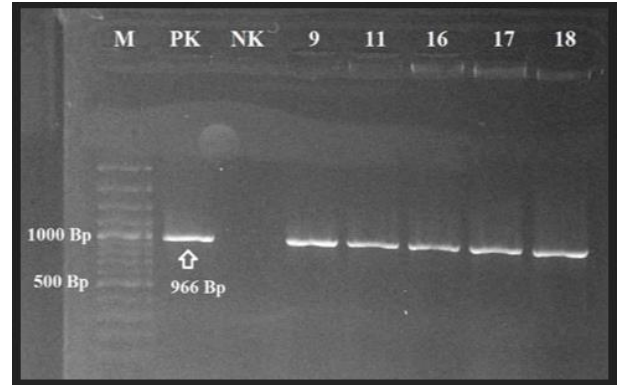
sulfametoksazol-trimetoprim kombinasyonuna karşı %88.88 (32/36) olarak tespit edildi. İzolatların enrofloksasin, florfenikol, gentamisin ve tetrasikline karşı direnç oranlarının sırasıyla %77.8, %55.6, %72.2 ve %86.1 olduğu belirlendi.

TEM geni için yapılan PZR'da 36 adet GSBL üreten *E. coli* izolatının 33 (%91.66)'ünde TEM geni belirlendi (Şekil 1).

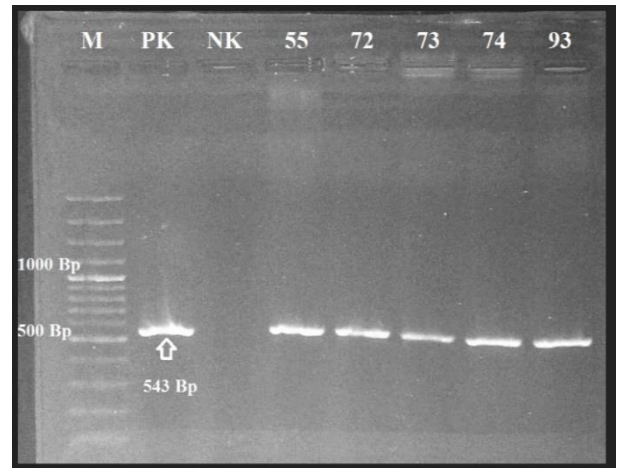
SHV geni için yapılan PZR'da ise *E. coli* izolatlarının tümünün SHV geni taşımadığı belirlendi.

CTX-M universal primerleri kullanılarak yapılan PZR'da tüm izolatların CTX-M genine sahip olduğu belirlendi (Şekil 2). Ardından CTX-M grup 1 primerleri kullanılarak yapılan PZR'da ise tüm izolatların CTX-M grup 1'e ait CTX-M genlerini taşıdığı belirlendi. (Şekil 3).

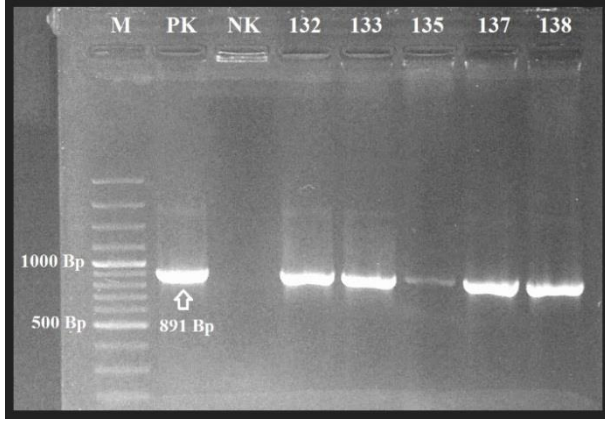
PZR sonucunda, 33 *E. coli* izolatının TEM ve CTX-M geninin her ikisini de taşıdığı belirlendi. Üç *E. coli* izolatının ise sadece CTX-M genini taşıdığı görüldü.



**Şekil 1.** TEM genine özel primerler ile bazı *E. coli* izolatlarında yapılan PZR sonucu (966 bç). M: Marker (100 bp), PK: TEM geni pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 35218), NK: Negatif kontrol (kalıp DNAsız PZR karışımı), buzağı *E. coli* izolatları (9, 11, 16, 17, 18).



**Şekil 2.** CTX-M universal primerleri ile bazı *E. coli* izolatlarında yapılan PZR sonucu (543 bç). M: Marker (100 bp), PK: CTX-M gene pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 13461), NK: Negatif kontrol (kalıp DNAsız PZR karışımı), buzağı izolatları (55, 72, 73, 74, 93).



**Şekil 3.** CTX-M grup 1 primerleri ile bazı *E. coli* izolatlarında yapılan PZR sonucu (891 bç). M: Marker, PK: CTX-M grup 1 pozitif kontrol (*E. coli* ATCC 13461), NK: Negatif kontrol (kalıp DNAsız PZR karışımı), buzağı *E. coli* izolatları (132, 133, 135, 137, 138).

### Tartışma

Dünyanın çeşitli bölgelerinde buzağılar üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur. Hollanda'da Hordijk ve ark. (24) tarafından 1997-2010 yılları arasında 14 yıllık bir süreçte sefotaksime dirençli bakterilerin prevalansındaki değişimi araştırmak için buzağılarda yapılan bir çalışmada, 1998 ve 1999 yıllarında prevalans %4 iken 2010 yılında %39 olduğu bulunmuştur. Yine Hollanda'da Hordijk ve ark. (25) tarafından buzağılarda 3 farklı çiftlikte 0., 3., 6., 8. ve 10. haftalarda yapılan prevalans çalışmasında, 0. haftada çiftliklerde prevalansın %18 ile %26 arasında değiştiği, 10. haftada ise prevalansların giderek düştüğü görülmüştür. Ewers ve ark. (26) tarafından Almanya'da ishali buzağılarda Şiga toksin üreten GSBL fenotipine sahip 2 farklı *E. coli* izolatında yapılan bir çalışmada, 1. izolatın CTX-M-1 ve TEM-1, 2. izolatın ise sadece CTX-M-1 geni taşıdığı rapor edilmiştir. Schmid ve ark. (27)'de buzağılarda içeren çalışmalarında (Almanya), buzağılardan topladıkları dışkı örneklerinin % 56.2'sinde GSBL üreten *E. coli* tespit etmişlerdir. Geser ve ark. (28) 'nın İsviçre'de yaptığı çalışmada topladıkları buzağı dışkı örneklerinin %25.3'ünde GSBL üreten Enterobacteriaceae izolatları tespit etmişlerdir.

Türkiye'de yetişkin sığırlarda günümüze kadar GSBL üreten *E. coli* prevalansı ve GSBL genlerinin belirlenmesine ilişkin yapılmış sınırlı sayıda çalışma mevcuttur (8-11). Aksoy ve ark. (8) tarafından yapılan çalışmada GSBL üreten *E. coli* suşuna yetişkin sığırlarda rastlanmamıştır. Hatay ili'nde yapılmış çalışmada prevalans yetişkin sığırlarda %8.3 olarak bulunmuştur (9). İstanbul ve Tekirdağ'da yapılmış çalışmalarda yetişkin sığırlarda sadece 3 adet GSBL üreten *E. coli* suşu izole edilmiş ve prevalans %1.2 olarak bildirilmiştir (10). Aynı çalışmada (10) İstanbul ve Tekirdağ'da bulunan iki sığır çiftliğindeki buzağılardan toplanan rektal sıvap örneklerinde GSBL üreten *E. coli*'ye rastlanmamıştır. Burdur bölgesinden yetişkin sığırlardan toplanan dışkı örneklerinde yapılan çalışmada ise, GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı sığırlarda %15.5 olarak bulunmuştur (11). Yapılan bu çalışmada ise Burdur

ilindeki sağlıklı buzağıların dışkı örneklerinde GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılık oranı %24 olarak bulundu. Çalışma öncesinde buzağıların antibiyotiklere daha az maruz kalmış olmaları veya antibiyotik tedavisi görmemiş olmaları dolayısıyla, izolasyon oranının Pehlivanoglu ve ark. (11)'nin Burdur ilindeki yetişkin sığırlarda bulunduğu taşıyıcılık oranından daha düşük bulunacağı tahmin edilmişti. İki çalışma arasında farklı taşıyıcılık oranlarının çıkmamasının nedeni, buzağıların dışkı örnekleri toplandıkları sırada yetişkin hayvanlar ile birlikte olmalarına ve doğumdan sonra yetişkin hayvanlardan GSBL üreten *E. coli* izolatlarını almış olabileceğine bağlandı. Nitekim, bu çalışmada aynı zamanda buzağıların yaşı ile GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı arasında bir ilişkinin olmadığı belirlendi.

Bu çalışmadaki *E. coli* izolatlarının taşıdığı GSBL genlerinin dağılımının Burdur ilindeki yetişkin sığırlarda Pehlivanoglu ve ark. (11) tarafından yapılmış çalışma sonuçları karşılaştırıldığında en dikkat çekici farkın bu çalışmadaki izolatların SHV genini taşımaması idi. CTX-M genleri açısından ise bu çalışmadaki izolatlarda belirlenen CTX-M genlerinin tümü Pehlivanoglu ve ark. (11)'nin çalışmasındaki gibi grup 1'e ait olduğu görüldü.

GSBL'ları kodlayan genlerin genellikle plazmidlerde lokalize olduğu bilinmektedir (2). Yapılan araştırmalarda (7, 29, 30) bu plazmidlerde aynı zamanda aminoglikozid, kinolon, tetrasiklin, kloramfenikol ve trimetoprim-sulfametoksazol dirençliliğini sağlayan genlerin de taşındığı ve bu nedenle GSBL üreten *E. coli* izolatlarının bu antibiyotiklere de yüksek oranda direnç gösterdikleri görülmektedir. Bu çalışmada da GSBL genlerini tespit edilen *E. coli* izolatlarında diğer gruptan antibiyotiklere (aminoglikozid, kinolon, tetrasiklin, fenikol ve trimetoprim-sulfametoksazol) karşı yüksek oranda direnç görülmüştür.

Özellikle gelişmiş ölkelerde, Bakteriyel Dirençlilik İzleme Programları düzenli olarak yürütölmekte ve indikatör, patojenik ve zoonotik bakterilerin antibiyotiklere dirençlilik durumlarına ilişkin sonuçlar periyodik olarak yayınlanmaktadır (31, 32). *E. coli* insan ve hayvan bağırsak mikroflorasının doğal üyesi olması sebebiyle, hayvanlarda çeşitli amaçlarla kullanılan antibiyotiklere sıklıkla maruz kalabilmekte ve böylece çeşitli direnç mekanizmalarını kolaylıkla geliştirmektedir. *E. coli*'nin diğer bir özelliği, direnç genlerini patojenik ve zoonotik bakterilere kolaylıkla transfer etmesi ve *E. coli*'nin antibiyotik dirençliliğinin izlenmesinde indikatör bakteri olarak kabul edilmesidir (33-35). Bu nedenle, antibiyotik dirençliliğinin izlenmesinde patojen bakteriler kadar normal flora üyesi *E. coli* izolatlarına da bakılması önem arz etmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma Türkiye'de sağlıklı buzağılarda CTX-M tipi beta laktamaz üreten *E. coli* varlığını gösteren ilk çalışma olması açısından ve CTX-M geni taşıyan *E. coli* izolatlarının yaygınlığını gösteren çalışmaları desteklemesi açısından önemlidir. Ayrıca bu çalışmada örneklenen buzağılarda yaş ile GSBL üreten *E. coli* taşıyıcılığı arasında bir ilişkinin olmadığı belirlenmiştir. Bu nedenle buzağıların yaşamlarının ilk günlerinde antimikrobiyellere dirençli bakteriler ile kolonize oldukları sonucuna varılabilmektedir.

**Kaynaklar**

- Frere JM. Beta-lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Mol Microbiol* 1995; 16: 385-395.
- Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: A clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18: 657-686.
- Bradford PA. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21<sup>st</sup> century: Characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 933-951.
- Bush K, Palzkill T, Jacoby G. "Beta-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended spectrum and inhibitor resistant enzymes". <http://www.lahey.org/Studies/01.03.2018>.
- Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: The CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 1-14.
- Ewers C, Bethe A, Semmler T, Guenther S, Wieler LH. 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* 2012; 18: 646-655.
- Livermore DM. Current epidemiology and growing resistance of Gram negative pathogens. *Korean J Int Med* 2012; 27: 128-142.
- Aksoy A, Göçmen JS, Kaçmaz B, Canver S. İnsan ve sığırlardan izole edilen fekal *Escherichia coli* suşlarında antibiyotik direnç ve genişlemiş spektrumlu beta laktamaz üretimi. *Ankem Dergisi* 2005; 19: 130-134.
- Aslantaş Ö, Elmacioğlu S, Yılmaz EŞ. Prevalence and characterization of ESBL-and AmpC-producing *Escherichia coli* from cattle. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 2017; 23: 63-67.
- Küçükbasmacı O, Çiftçioğlu G, Midilli K, Issa G. Detection of extended spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae from food animals in Turkey. *Revue Méd Vét* 2008; 159: 586-592.
- Pehlivanoglu F, Turutoglu H, Ozturk D, Yardimci H. Molecular characterisation of ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from healthy cattle and sheep. *Acta Vet Beograd* 2016; 66: 520-533.
- Lassen J. Rapid identification of Gram-negative rods using a three-tube method combined with a dichotomic key. *Acta Path Microbiol Scand Sect B* 1975; 83: 525-533.
- Winn W, Allen S, Janda W, et al. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. 6th edition, Philadelphia: Lippincott, 2006.
- Wang G, Clark CG, Rodgers FG. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3613-3619.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twenty-Sixth edition, CLSI Supplement M100S, Wayne, PA, USA, 2016.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 3rd Edition, Approved Standards M31-A3. Wayne, PA, USA, 2010.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Disc and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals. 2<sup>nd</sup> Informational Supplement VET01-S2. 2013. Wayne, PA, USA, 2013.
- Arpin C, Dubois V, Coulange L, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3506-3514.
- Heffernan HM, Woodhouse RE, Pope CE, Blackmore TK. Prevalence and types of extended-spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in New Zealand. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34: 544-549.
- Tenover FC, Rasheed JK. Detection of antimicrobial resistance genes and mutations associated with antimicrobial resistance in microorganisms. In: Persing DH, Tenover FC, Versalovic J, et al. (Editors). *Molecular Microbiology: Diagnostic Principles and Practice*. Washington DC: ASM Publishing 2004: 391-406.
- Saladin M, Cao VT, Lambert T, et al. Diversity of CTX-M  $\beta$ -lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 209: 161-168.
- Jeong SH, Bae IK, Know SB, et al. Dissemination of transferable CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *E. coli* in Korea. *J Appl Microbiol* 2005; 98: 921-927.
- SPSS Inc. SPSS for windows version 11.00, Chicago, USA, 2007.
- Hordijk J, Wagenaar JA, van de Giessen A, et al. Increasing prevalence and diversity of ESBL/AmpC-type  $\beta$ -lactamase genes in *Escherichia coli* isolated from veal calves from 1997 to 2010. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 1970-1973.
- Hordijk J, Mevius D J, Kant A, et al. Within-farm dynamics of ESBL/AmpC-producing *Escherichia coli* in veal calves: A longitudinal approach. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 2468-2476.
- Ewers C, Stamm I, Stolle I, et al. Detection of shiga toxin- and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* O145: NM and Ont: NM from calves with diarrhoea. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 2005-2007.
- Schmid A, Hörmansdorfer S, Messelhäuser U, et al. Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* on Bavarian dairy and beef cattle farms. *Appl Environ Microbiol* 2013; 79: 3027-3032.
- Geser N, Stephan R, Hächler H. Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC Vet Res* 2012; 8: 21.
- Carattoli A. Animal reservoirs for extended spectrum beta-lactamase producers. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14 (Suppl 1): 117-123.
- Dağlar D, Öngüt G. Genişlemiş spektrumlu beta laktamazlar (GSBL) ve tanı yöntemleri. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi 2012; 1: 1-9.

31. EFSA (European Food Safety Authority). EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. EFSA J 2018; 16: 5182.
32. FDA-CDC-USDA (The Food and Drug Administration-The center for Disease Control and Prevention- The U.S. Department of Agriculture). 'NARMS (The National Antimicrobial Resistance Monitoring System)- 2015 NARMS Integrated Report'. <https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/SafetyHealth/AntimicrobialResistance/NationalAntimicrobialResistanceMonitoringSystem/default.html/> 01.03.2018.
33. Jordan D. Surveillance for antibiotic resistant *Escherichia coli* in food animals. Commun Dis Intell 2003; 27 Suppl: 117-120.
34. Van Den Boogaard AE, Stobberingh EE. Epidemiology of resistance to antibiotics, links between animals and humans. Int J Antimicrob Agents 2000; 14: 327-35.
35. Wray C, Gnanou JC. Antibiotic resistance monitoring in bacteria of animal origin: analysis of national monitoring programmes. Int J Antimicrob Agents 2000; 14: 291-294.