T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FERMENTE VE ISIL İŞLEM UYGULANMIŞ SUCUKLARDA BAZI *LACTOBACILLUS* VE PATOJEN BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Muhammet Ali CEBİRBAY

DOKTORA TEZİ

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ahmet GÜNER

KONYA-2014

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FERMENTE VE ISIL İŞLEM UYGULANMIŞ SUCUKLARDA BAZI *LACTOBACILLUS* VE PATOJEN BAKTERİLERİN ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

Muhammet Ali CEBİRBAY

DOKTORA TEZİ

BESİN HİJYENİ VE TEKNOLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof. Dr. Ahmet GÜNER

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 10102042 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ

Lisansüstü eğitimim sürecinde, araştırmamın planlanmasından sonuçlanmasına kadar geçen süreç içerisinde, bilimsel çalışma anlayışını model aldığım, problem çözme ve sorunlarla başa çıkmamda gerek bilimsel deneyim ve birikimini gerekse manevi destek, yardım ve tavsiyelerini esirgemeyen, yol gösterici, paylaşımcı, bilimsel düşünme stilini öğreten, her koşulda sürekli ilgi, anlayış ve sabır gösteren başta danışmanım sayın Prof. Dr. Ahmet GÜNER'e, çalışmalarımın yürütülmesinde bana her zaman destek olan sayın hocam Doç. Dr. Nazan AKTAŞ'a ve Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü öğretim elemanlarına, uygulama deneyimlerini paylaştığım sayın Doç. Dr. Nurhan ERTAŞ'a, kültür koleksiyonundan faydalandığım sayın Prof. Dr. Işıl BALCIOĞLU'na, tezimde maddi kaynaklardan yararlanma olanağı bulduğum Selçuk Üniversitesi Bilimsel Projeler Koordinatörlüğü'ne, akademik hayatımın her anında bana desteğini esirgemeyen aileme ve özellikle Abdullah CEBİRBAY'a, geçen süreç içerisinde her zaman yanımda olan, bana sabır ve anlayış gösteren eşim Saadet CEBİRBAY ve oğlum Abdullah Kağan CEBİRBAY'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER Sayfa

ÖNSÖZ ii
SİMGELER VE KISALTMALAR vi
ÇİZELGE LİSTESİ x
ŞEKİL LİSTESİ xii
RESİM LİSTESİ xiii
1. GİRİŞ 1
1.1. Fermente Et Ürünlerinin Tarihçesi 2
1.2. Fermente ve Isıl İşlem Uygulanmış Sucuğun Tanımı 3
1.2.1. Fermente ve Isıl İşlem Uygulanmış Sucuklara Ait Nitelikler 4
1.3. Sucuk Teknolojisi 5
1.3.1. Fermente Sucuklarda Meydana Gelen Metabolik Reaksiyonlar 9
1.4. Fermente Sucukların Mikroflorasında Yer Alan *Lactobacillus* Cinsi Bakteriler 11
1.4.1. *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curvatus*'un Fermente Sucuklar Üzerindeki Etkinlikleri 15
1.5.Antibiyotiklerin Tanımı ve Sınıflandırılması 17
1.5.1.Hedef Hücreye Etkilerine Göre Antibiyotikler 17
1.5.2.Etki Mekanizmalarına Göre Antibiyotikler 18
1.6. Antibiyotiklerin Hayvansal Üretimde Kullanımı 25
1.7. Antibiyotiklere Karşı Gelişen Dirençlilik Mekanizmaları 29
1.7.1. Doğal (İntrinsik) Direnç 29
1.7.2. Kazanılmış (Genotipik, Kalıtsal) Direnç 30
1.7.3. Genetik (Kromozomal) Direnç Mekanizmaları 31
1.8. *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curvatus*'un Fizyolojik Özellikleri ve Karakterizasyonu 35
1.8.1. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliği 36
1.9. *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Enterococcus faecium* 37
1.9.1. *Staphylococcus aureus*'un Taksonomisi, Morfolojik Özelikleri ve Patojenitesi 37
1.9.2. *Staphylococcus aureus*'un β-Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Dirençlilik Mekanizması 40

1.9.3. *Escherichia coli*'nin Taksonomisi, Morfolojik Özelikleri ve Patojenitesi 43
1.9.4. *Escherichia coli*'nin Tetrasikline Karşı Dirençlilik Mekanizması 45
1.9.5. *Enterococcus faecium*'un Taksonomisi, Morfolojik Özellikleri ve Patojenitesi 48
1.9.6. *Enterococcus faecium*'un Vankomisine Karşı Dirençlilik Mekanizması 49
1.10. Antibiyotik Duyarlılık ve Dirençliliğini Belirlemede Kullanılan Yöntemler 51
2. GEREÇ ve YÖNTEM 55
2.1. Gereç 55
2.1.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanmasında Kullanılan Gereçler ve Hazırlanmaları 55
2.1.2. Liyofilize Referans Suşlar 60
2.1.3. Liyofilize Referans Suşların Aktive Edilmesi, Tanımlanması ve Stoklanması 60
2.1.4. Mikroorganizmalara Uygulanan Antibiyotik Duyarlılık Testi Gereçleri 61
2.1.5. Mikroorganizmaların Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Gereçler 62
2.2. Yöntem 64
2.2.1. Fiziko-Kimyasal Analizler 64
2.2.2. Mikrobiyolojik ve Moleküler Analizler 65
2.3. Verilerin Değerlendirilmesi 87
3.BULGULAR 88
3.1. Sucuk Numunelerine Ait Fiziko-Kimyasal Analiz Sonuçları 88
3.2. Sucuk Numunelerine Ait Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları 90
3.2.1. Toplam Mezofilik Aerobik Mikroorganizma (TMAM) Sayısı 90
3.2.2. *Staphylococcus aureus* Sayısı 90
3.2.3. Koliform Bakteri Sayısı 90
3.2.4. *Enterococcus* ssp. Sayısı 91
3.2.5. Laktik Asit Bakteri Sayısı 91
3.3. Antibiyotik Dirençlilik Bulguları 92
3.4. PCR Bulguları 105

4.TARTIŞMA 109
4.1. Fiziko-Kimyasal Analizler 109
4.2. Mikrobiyolojik Analizler 112
4.3. Antibiyotik Duyarlılık ve Dirençlilik 115
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 120
6. ÖZET 122
7.SUMMARY 123
8.KAYNAKLAR 124
9.EKLER 136
10. ÖZGEÇMİŞ 137

SİMGELER VE KISALTMALAR

α	Alfa
ABD	Amerika Birleşik Devletleri
a_w	Activity of Water
AS	Aggregasyon Substratı
ATCC	American Type Culture Collection
β	Beta
BEA	Bile Esculin Agar
BHI	Brain Heart Infusion
bla	Beta laktamaz gen grubu
blaI	Beta laktamaz indüksiyon gen I
BlaI	Beta laktamaz indüksiyon l proteini
blaR1	Beta laktamaz indüksiyon gen l
*Bla*R*1*	Beta laktamaz indüksiyon proteini l
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
blaZ	Beta laktamaz indüksiyon gen Z
BORSA	Borderline oxacillin resistant *S.aureus*
bp	Baz çifti
BSSA	Borderline methicilline susceptible *S. aureus*
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
dk	Dakika
D-Ala-D-Ala	D-alanil D-alanin
D-laktat	Laktik asidin D izomeri
D-LDH	D-lactate dehydrogenase
dATP	Deoksiadenozin trifosfat
dCTP	Deoksisitozin trifosfat
dGTP	Deoksiguanin trifosfat
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNase	Deoksinükleik asit enzimi
dNTP	Deoksiribonükleik trifosfat
dTTP	Deoksitimin trifosfat
EF-G	Elongation Factor G
EF-Tu	Elongation Factor Tu

EFSA	European Food Safety Association
EN	European Norm
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
E test	Epsilometre Testi
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Demir
FEM	Factors essential for the expression of metisilline resistance
g	Gram
G+C	Guanin ve Sitozin
GTPase	Guanosin trifosfataz
GTP	Guanosin trifosfat
ISO	International Organisation for Standardization
kb	Kilobaz çifti
kDa	Kilodalton
kob	Koloni oluşturma birimi
log_{10}	Logaritma 10 tabanı
LTA	Lipoteikoik asit
Lys-DAsp	Lysine-D-iso-asparagine
L-LDH	L-lactate dehydrogenase
mDAP	Meso-diaminopimelic acid
MBK	Minimal Bakteriositik Konsantrasyon
mecA	Metisilin resistans gen A
mecI	Metisilin resistans gen I
mecR1	Metisilin resistans protein 1
mg	Miligram
Mg	Magnezyum
$MgCl_2$	Magnezyum Klorür
MİK	Minimum İnhibisyon Konsantrasyonu
ml	Mililitre
mm	Milimetre
MODSA	Modified Penicillin Binding Protein *S. aureus*
M	Molarite
mRNA	Messenger ribonükleik asit
MRS	De Man Rogosa Sharpe

MRSA	Methicillin Resistant *S. aureus*
MR-VP	Methyl Red-Voges Proskauer
MSSA	Methicillin Sensitive *S. aureus*
NaCl	Sodyum klorür
NCBI	National Center For Biotechnology Information
NH_3	Amonyak
NOAH	National Office of Animal Health
ONPG	Ortho-Nitrophenyl-β-galactoside
ORF1	Yapısal Transpozaz
ORF2	Yapısal Transpozaz
PABA	Para amino benzoik asit
p	Anlamlılık Düzeyi
PBP	Penicillin Binding Protein
PCR	Polimerase Chain Reaction
pH	Power of hydrogen
PYR	L-pyrrolidonyl arylamidase
R_h	Relative Humidity
RNA	Ribonükleik asit
rRNA	Ribosomal ribonikleik asit
rpm	Revolutions per minute
SBA	Slanetz Bartley Agar
SCCmec	Staphylococcal cassette chromosome mec gen kasedi
SE	Standart Hata
SIMM	Sulfate Indol Motility Medium
SMAC	Sorbitol MacConkey Agar
sn	Saniye
ssp	Sub-species
t	İki Örnek T Testi
tet	Tetrasiklin resistans gen grubu
tetM	Tetrasiklin resistans gen M
tetO	Tetrasiklin resistans gen O
tetQ	Tetrasiklin resistans gen Q
tetP	Tetrasiklin resistans gen P
tetS	Tetrasiklin resistans gen S

tetT	Tetrasiklin resistans gen T
tetW	Tetrasiklin resistans gen W
Tn*916*	Tetrasiklin Resistans Transpozunu
Tn*1546*	VankomisinResistans Transpozonu
Tn*1545*	VankomisinResistans Transpozonu
TMAM	Toplam Mezofilik Aerobik Mikroorganizma
TSA	Tryptic Soy Agar
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultraviole
vanA	Vankomisin resistans gen A
vanB	Vankomisin resistans gen B
vanC	Vankomisin resistans gen C
vanD	Vankomisin resistans gen D
vanE	Vankomisin resistans gen E
VRBA+MUG	Violet Red Bile Agar With MUG
6-apa	6-aminopenisilanik asit
23S	Ribozomun 23S'lik alt birimi
30S	Ribozomun 30S'lik alt birimi
50S	Ribozomun 50 S'lik alt birimi
%	Yüzde
$\bar{X}$	Aritmetik ortalama
$^{\circ}C$	Santigrat derece
~	Yaklaşık
µm	Mikrometre (Mikron)
µg	Mikrogram
<	Büyük
>	Küçük
=	Eşit
+	Pozitif
-	Negatif

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge 1.1	Fermente ve Isıl İşlem Uygulanmış Sucukların Fiziko-Kimyasal Kalite Nitelikleri	4
Çizelge 1.2	Sucuklara Ait Mikrobiyolojik Kriterler	5
Çizelge 1.3	Dünya'da Kuru ve Yarı-Kuru Bazı Fermente Sosislerin Üretim Koşulları ve Karakteristik Özellikleri	7
Çizelge 1.4	Fermente Et Ürünlerinde Kullanılan Başlıca Starter Kültürler	8
Çizelge 1.5	Et Ürünleri İçin Uygulanan Merkez Nokta Sıcaklık Değer ve Süreleri	9
Çizelge 1.6	Etlerdeki Bazı Önemli Proteolitik ve Lipolitik Enzimler	11
Çizelge 1.7	*Lactobacillus* Türlerinin Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakteristikleri	13
Çizelge 1.8	*Lactobacillus* Türlerinin Karbonhidrat Fermantasyon Özellikleri	14
Çizelge 1.9	EFSA Tarafından Besinlerde Nitelikli Güvenilir Olarak Kabul Edilen Bazı *Lactobacillus* Türleri	16
Çizelge 1.10	Etki Mekanizmalarına Göre Antibiyotiklerin Gruplandırılması	18
Çizelge 1.11	Penisilin Spektrumunun Sınıflandırılması	21
Çizelge 1.12	Kazanılmış Direnç Mekanizmaları	30
Çizelge 1.13	Bazı Antibiyotiklerin Etki ve Dirençlilik Mekanizmaları	34
Çizelge 1.14	Bazı *Lactobacillus* Türlerinin Fenotipik Karakterizasyonu	35
Çizelge 1.15	*Staphylococcus aureus*'un Biyokimyasal Özellikleri	39
Çizelge 1.16	Tetrasiklin (*tet*) Direnç Genleri ve Dirençlilik Mekanizmaları	46
Çizelge 1.17	Glikopeptitlerin *Enterococcus* ssp.'lar İçerisindeki Dirençlilik Karakterizasyonu	50
Çizelge 2.1	Agar Difüzyon Yöntemiyle İzolatlara Uygulanan Antibiyotikler	62
Çizelge 2.2	*mecA* Geni İçin Uygulanan Thermal Cycle Koşulları	70
Çizelge 2.3	*tetM* Geni İçin Uygulanan Thermo Cycle Koşulları	75
Çizelge 2.4	*vanA* Geni İçin Uygulanan Thermo Cycle Koşulları	81
Çizelge 2.5	*Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* İzolatlarında *mecA, tetM ve vanA* Genlerinin Belirlenmesinde Yönelik Primer Dizileri	85

Çizelge 2.6	*Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* İzolatlarında *mecA, tetM* ve *vanA* Genlerinin Belirlenmesinde Uygulanan Themal Cycle Koşulları	86
Çizelge 3.1	Sucuk Numunelerine Ait Fiziko-Kimyasal Analiz Sonuçları	88
Çizelge 3.2	Sucuk Numunelerine Ait TMAM Sayısı	90
Çizelge 3.3	Sucuk Numunelerinde *Staphylococcus aureus* Sayısı	90
Çizelge 3.4	Sucuk Numunelerine Ait Koliform BakterileriSayısı	91
Çizelge 3.5	Sucuk Numunelerine Ait *Enterococcus* ssp. Sayısı	91
Çizelge 3.6	Sucuk Numunelerinde Laktik Asit Bakteri Sayısı	92
Çizelge 3.7	*Staphylococcus aureus* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları	93
Çizelge 3.8	*Escherichia coli* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları	95
Çizelge 3.9	*Enterococcus faecium* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları	97
Çizelge 3.10	*Staphylococcus aureus, Escherichia coli* ve *Enterococcus faecium* İzolatlarının MİK Sonuçları	99
Çizelge 3.11	*Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* İzolatlarının Agar Difüzyon Testi Sonuçları	102
Çizelge 3.12	*Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* İzolatlarının MİK Sonuçları	104

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.1	Fermente Sucuk Üretim Şeması	6
Şekil 1.2	Vankomisinin Kimyasal Yapısı	25
Şekil 1.3	Antibiyotiklere Dirençli Bakterilerin Hayvanlardan İnsanlara Geçiş Aşamaları	28
Şekil 1.4	Tn*1546* Transpozonunun Yapısı ve Dizileri	51
Şekil 3.1	Sucuk Numunelerine Ait pH Sonuçlarının Dağılımı	89
Şekil 3.2	*Staphylococcus aureus* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Sonuçlarının Dağılımı	94
Şekil 3.3	*Escherichia coli* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Sonuçlarının Dağılımı	96
Şekil 3.4	*Enterococcus faecium* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Sonuçlarının Dağılımı	98

RESİM LİSTESİ

Resim 3.1	*Staphylococcus aureus* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Görüntüsü	93
Resim 3.2	*Escherichia coli* İzolatlarının Agar Difüzyon Testi Görüntüsü	95
Resim 3.3	*Enterococcus faecium* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Görüntüsü	97
Resim 3.4	*Staphylococcus aureus* İzolatlarının E-Test Görüntüsü	100
Resim 3.5	*Escherichia coli* İzolatlarının E-Test Görüntüsü	100
Resim 3.6	*Enterococcus faecium* İzolatlarının E-Test Görüntüsü	100
Resim 3.7	*Lactobacillus plantarum* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Görüntüsü	101
Resim 3.8	*Lactobacillus curvatus* İzolatlarının E-Test Görüntüsü	105
Resim 3.9	*Staphylococcus aureus* DNA Örneklerinin *mecA* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü	106
Resim 3.10	*Escherichia coli* DNA Örneklerinin *tetM* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü	106
Resim 3.11	*Enterococcus faecium* DNA Örneklerinin *vanA* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü	107
Resim 3.12	*Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* DNA Örneklerinin *mecA* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü	107
Resim 3.13	*Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* DNA Örneklerinin *tetM* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü	108
Resim 3.14	*Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* DNA Örneklerinin *vanA* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü	108

1.GİRİŞ

Et ve et ürünleri insanların ihtiyaç duydukları birçok besin öğesini bünyesinde barındıran, besleyici değeri yüksek besinler arasında yer almaktadır. Yeterli ve dengeli beslenme açısından et ve et ürünlerinin tüketilmesi oldukça önem arz etmektedir. Sucuk, Türkiye'de üretim ve tüketimi yapılan et ürünleri içerisinde yer almaktadır. Sucuk kırmızı et ve yağın kıyma makinesinde veya kuterde çekilmesi ve hazırlanan hamura çeşitli baharat ve diğer maddeler ilave edilerek doğal veya yapay kılıflara doldurulması ve belirli şartlarda (sıcaklık, rutubet, hava akımı) olgunlaştırılması ile üretilen et ürünüdür (Tayar 1989, Caplice and Fitzgerald 1999, Çon ve Gökalp 2000, Gönülalan ve ark 2004).

Fermente sucukların olgunlaşması sürecinde ortaya çıkan kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar ile mikrobiyolojik faaliyetler, ürünlerin karakteristik özellikleri ve niteliklerinin ortaya çıkmasında oldukça büyük önem arz etmektedir (Ertaş 1999, Gökalp ve ark 2004, Lebert ve ark 2007). Fermente sucuklarda aroma, tat, lezzet, renk ve tekstürün oluşmasında glikoliz, lipoliz, proteoliz reaksiyonları etkili olmaktadır. Belirtilen reaksiyonlar başlıca mikrobiyolojik faaliyet ve endojen enzim aktiviteleri sonucunda şekillenmektedir.

Fermente et ürünlerinde starter kültürler, ürün güvenilirliğini sağlamak, ürününün niteliğini iyileştirmek, duyusal özellikleri oluşturmak ve diğer amaçlar için kullanılmaktadır. Ancak fermente et ürünlerinde kullanılan hammaddenin mikrobiyolojik kalitesi ile birlikte üretim aşamalarının hijyenik olmaması dolayısıyla, fermente et ürünleri *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria monocytogenes, Salmonella* ssp. vb patojen mikroorganizmalar açısından risk taşımaktadır (Kaban ve Kaya 2006, Sırıken ve ark 2006, Yalçın ve Can 2013).

Antibiyotiklerin farklı amaçlarla (örn., tedavi edici, profilaktik) bilinçsiz, aşırı ve yaygın kullanımı antibiyotik dirençli bakterilerin çevre üzerinde seçici bir baskısının ortaya çıkmasına neden olmuştur. Antibiyotiklerin beşeri hekimlikte kullanımının yanı sıra veteriner hekimlikte profilaktik olarak hayvan yemlerine ilave edilmesi ve uygulanan doz ve türevlerinin bilinçsiz kullanımı günümüzde ortaya çıkan antibiyotik dirençliliğini artırmaktadır. Bakterilerde çeşitli antibiyotiklere karşı farklı mekanizmalara bağlı olarak dirençlilik fenotipleri (örn., MRSA) ortaya çıkmıştır. Antibiyotik dirençliliği ile ilgili çalışmalar yakın zamana kadar klinik

izolatlarda yürütülmekte iken, son yıllarda besin kaynaklı izolatlar da önemli hale gelmiştir (Pan ve ark 2011).

Fermente et ürünleri ile vücuda alınan yararlı ve patojen bakteriler transfer edilebilen antibiyotik direnç genlerini taşıyabilmektedirler (Mathur ve Singh 2005). Dolayısıyla laktik asit bakterileri başlıca süt ürünlerinde olduğu gibi fermente et ürünlerinde de yakın bir zamana kadar güvenle kullanılmalarına karşın intrinsik veya kazanılmış antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesine bağlı olarak laktik asit bakterilerinin doğrudan veya dolaylı olarak antibiyotik dirençliliği bakımından değerlendirilmesini ortaya çıkarmıştır (Levy 1997, Leroy ve De Vuyst 2004).

Bu araştırmada, fermente ve ısıl işlem uygulanan sucuklarda *S. aureus*, *E. coli* ve *Enterococcus faecium* kontaminasyonunun belirlenmesi ile birlikte sucuk florasında dominant olarak kabul edilen *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curtavus* izolatların antibiyotik dirençlilikleri ve *mecA*, *tetM* ve *vanA* antibiyotik direnç genlerinin saptanması amaçlandı.

1.1. Fermente Et Ürünlerinin Tarihçesi

Besinlere uygulanan fermantasyon ve kurutma işlemleri, en eski muhafaza yöntemleri arasında yer almaktadır. Fermantasyonun M.Ö 2500 ve daha eski yıllarda kullanıldığı belirtilmektedir (Leroy ve ark 2006, Vignolo ve ark 2010, Lindsay 2012, Leroy ve ark 2013). Kıyılmış etin ve çeşitli çeşni maddelerinin karıştırılarak hayvan bağırsağı içerisine doldurulması ve kurutulmasının ilk olarak Orta Asya'da yaşayan Türk kavimleri arasında görüldüğü ileri sürülmektedir (Oğuz 1976). Doğu toplumlarındaki zengin kaynakların ve kültürün batı toplumlarına göç, savaş gibi sosyolojik ve diğer faktörler yoluyla geçişi sonucunda Avrupa toplumlarının fermente besinler ile karşılaştığı tahmin edilmektedir. Avrupa'da fermente besinlerin 13. ve 14. yy'dan itibaren benimsenmeye başladığına dair kanıtlar yazılı kaynaklarda yer almaktadır (Leroy ve ark 2006, Demeyer 2010, Vignolo ve ark 2010). Dünya'da meydana gelen değişmelerin (örn., göç yollarının açılması ve yeni kıtaların keşfi) sonucu olarak yöresel ve bölgesel olarak üretilen fermente et ürünleri dünyanın birçok bölgesine yayılmıştır (Fadda and Vignolo 2007, Demeyer 2010).

Dünya'da fermente et ürünleri üretim ve tüketimi en yoğun olarak Orta ve Doğu Asya, Orta Doğu, Avrupa'da gerçekleşmesine karşın, Amerika ve Afrika kıtalarında bu oranın oldukça düşük olduğu bildirilmektedir (Maddock 2007, Zeuthen 2007). Son 50 yıl içerisinde et teknolojisindeki önemli gelişmelerin geleneksel olarak üretilen et ürünlerinin birbirlerinden farklılaşmasına neden olduğu belirtilmektedir (Leroy ve ark 2013). Bununla birlikte fermente et ürünleri arasındaki farklılıklar ürünün stabilitesi, olgunlaşma ve kuruma süreçlerindeki laktik asit bakterilerinin asidifikasyon karakteristiği ile su aktivitesinin yakından ilişki içerisinde olduğu bildirilmektedir (Lindsay 2012). Başlıca mikroorganizmalara bağlı olarak şekilenen biyokimyasal ve fiziko-kimyasal değişiklikler ile hammadde ve üretim teknolojisi arasındaki etkileşim sonucunda farklı tekstür, aroma ve duyusal niteliklere sahip ürünler ortaya çıkmaktadır (Lindsay 2012, Leroy ve ark 2013).

1.2. Fermente ve Isıl İşlem Uygulanmış Sucuğun Tanımı

1072 yılında Kaşgarlı Mahmud tarafından yazılan Divan-ı Lügat-it Türk adlı eserde sucuk sözcüğünden ilk kez söz edilmiş ve koyun bağırsakları içerisine doldurulan et, yağ ve baharat karışımından oluşan bir yiyecek olarak tanımlanmıştır (Ercoşkun ve Özkal 2011). Benzer şekilde Oğuz (1976), sucuğun kıyılmış etin tuz ve biber ilave edildikten sonra bağırsak (kumbar-bumbar) veya bez kılıflar içerisine doldurulup güneşte asılarak kurutulması ile elde edilen bir et ürünü olduğunu ve Orta Asya'da yaşan bütün Türk toplulukları tarafından erişgi, ilişgin, kumbar, pişkin gibi farklı isimlerle bilindiğini belirtmektedir.

Türk sucuğu genel anlamda "kasaplık büyükbaş hayvan gövde etlerinden hazırlanan hamurun, doğal veya yapay kılıflara doldurulması ve bir süre bekletilerek olgunlaştırılmasıyla elde edilen fermente et ürünü" olarak tanımlanabilmektedir (Tayar 1989, İnal 1992, Dinçer ve ark 1995, Yıldırım 1996, Çon ve ark 2002, Öztan 2003,Gökalp ve ark 2004).

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'nın 28488 numaralı Tebliği'ne (Resmi Gazete 2012a) göre sucuklar, fermente ve ısıl işlem görmüş sucuk olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Fermente sucuklar "büyük baş ve küçük baş hayvan etlerinin ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal ve yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermantasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak nem

oranı %40'ın altına düşürülmüş, kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıl işlem uygulanmamış fermente et ürünü" olarak ifade edilmektedir. Isıl işlem görmüş sucuk ise "büyük baş ve küçük baş hayvan etlerinin ve yağlarının veya kanatlı hayvan etleri ve yağlarının kıyılarak lezzet vericiler ile karıştırıldıktan sonra doğal ve yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda fermantasyon ve kurutma işlemleri uygulanarak nem oranı %50'nin altına düşürülmüş kesit yüzeyi mozaik görünümünde olan ısıl işlem uygulanmış fermente et ürünü" olarak tanımlanmaktadır (Resmi Gazete 2012a). Fermente ve ısıl işlem görmüş sucuklar şekillerine göre kangal, baton (çubuk, baston) ve parmak olmak üzere üç grupta incelenebilmektedir (Öztan 2003).

1.2.1. Fermente ve Isıl İşlem Uygulanmış Sucuklara Ait Nitelikler

Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucukların kalite parametreleri arasında fiziko-kimyasal ve mikrobiyolojik kriterler yer almaktadır. Türk Gıda Kodeksi, Et ve Et Ürünleri Tebliği'ne (Resmi Gazete 2012a) göre fermente ve ısıl işlem görmüş sucukların toplam et proteinleri değerinin kütlece en az sırasıyla %16 ve %14, kollojen miktarı toplam et proteinlerinin kütlesinde en fazla sırasıyla %20 ve %25, nem miktarının toplam et proteinleri miktarına oranı sırasıyla 2,5 ve 3,6'nın altında, pH değerinin en yüksek sırasıyla 5,4 ve 5,6 olması gerektiği belirtilmektedir. Bununla birlikte her iki grupta da yağ miktarının toplam et proteinleri miktarına oranının 2,5'in altında olması gerektiği vurgulanmaktadır. Ayrıca ısıl işlem uygulanmış sucukların nem miktarının kütlece en fazla %50 olabileceği bildirilmektedir. Çizelge 1.1'de fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuklara ait fiziko-kimyasal kalite nitelikleri gösterilmektedir (Resmi Gazete 2012a).

Çizelge 1.1. Fermente ve Isıl İşlem Uygulanmış Sucukların Fiziko-Kimyasal Kalite Nitelikleri.

Nitelik	Fermente Sucuk	Isıl İşlem Uygulanmış Sucuk
Toplam Et Proteini Değeri*	En az %16	En az %14
Kollojen/Toplam Et Proteini Oranı*	En fazla %20	En fazla %25
Nem/Toplam Et Proteini Oranı	<2,5	<3,6
Yağ Miktarı/Toplam Et Proteini Oranı	<2,5	<2,5
pH	En çok 5,4	5,6
Nem Miktarı*	-	En fazla %50

* (Kütlece, %)

Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuklarda et kaynaklı olmayan proteinler, nişasta ve nişasta içeren ürünler ile soya ve soya ürünlerinin kullanılamayacağı, baharat kaynaklı nişasta ve bitkisel protein miktarı toplamının kütlece %1'i aşmaması gerektiği vurgulanmaktadır. Ayrıca fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucukların starter kültürler ilave edilerek üretilmesine de izin verilmektedir. Fermente sucuk üretim ortamın en fazla 12°C sıcaklığa sahip olması gerektiği belirtilmektedir (Resmi Gazete 2012a).

Fermente ve ısıl işlem uygulanan sucukların hammaddeden tüketiciye kadar geçen süreç içerisinde sağlıklı üretimin güvence altına alınabilmesi için sucuğun mikrobiyolojik kalite kriterleri de oldukça önem taşımaktadır. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde (Resmi Gazete 2011) fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucukların mikrobiyolojik kriterleri ortaya koyulmuştur. Çizelge 1.2'de sucuklar için olması gereken mikrobiyolojik kriterler gösterilmektedir (Resmi Gazete 2011).

Çizelge 1.2. Sucuklara Ait Mikrobiyolojik Kriterler.

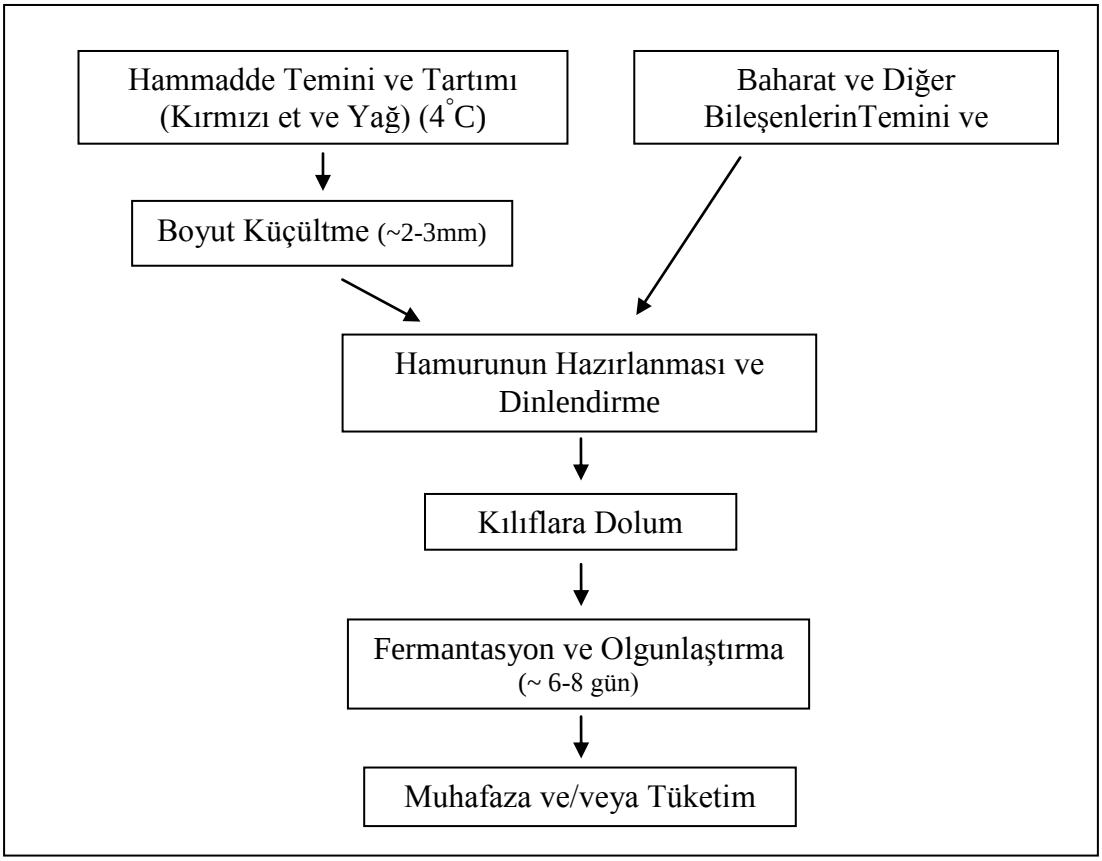
Sucuk	Mikroorganizma	Numune Alma Planı		Limitler		Referans Metot
		n	c	m	M	
Fermente Sucuk	*Salmonella* ssp.	5	0	0/25 g-ml		EN/ISO 6579
	L. monocytogenes	5	0	0/25 g-ml		EN/ISO 11290-1
	Escherichia coli O157	5	0	0/25 g-ml		ISO 16654
Isıl İşlem Uygulanmış Sucuk	*Salmonella* ssp.	5	0	0/25 g-ml		EN/ISO 6579
	L. monocytogenes	5	0	0/25 g-ml		EN/ISO 11290-1

n: deney numune sayısı
c: m ile M arasındaki sayıda mikroorganizma içeren kabul edilebilir en fazla deney numune sayısını
m: (n-c) sayıdaki deney numunesinin gramında kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı
M: c sayıdaki deney numunesinin gramında kabul edilebilir en fazla mikroorganizma sayısı

1.3. Sucuk Teknolojisi

Türkiye'de sucuk üretimi, kırmızı et ve yağın parçalandıktan sonra kıyma makinesinde çekilmesi, içerisine belirli oranlarda baharat, çeşni verici madde ilavesi ile birlikte tüm bileşenlerin karıştırılması ve dinlendirmesiyle elde edilen hamurun, bağırsaklara veya yapay kılıflara doldurularak belirli koşullarda (süre, sıcaklık, nisbi rutubet ve hava akım hızı) olgunlaştırılması neticesinde gerçekleştirilmektedir. Isıl işlem uygulanmış sucuklar, sucuk hamurunun kılıflara dolumu gerçekleştirildikten

sonra kısa bir fermantasyon işlemini takiben belirli süre ve sıcaklıkta ısıl işlem uygulamasıyla elde edilmektedir. Şekil 1.1'de fermente sucuk üretim aşamaları gösterilmektedir (Çon ve ark 2002, Öztan 2003, Erkmen ve Bozkurt 2004, Gökalp ve ark 2004, Ercoşkun 2006). Dünya genelinde üretilen bazı fermente et ürünlerinin üretim koşulları ve karakteristik özellikleri Çizelge 1.3'te gösterilmektedir (Fadda ve Vignolo 2007).



Şekil 1.1. Fermente Sucuk Üretim Şeması.

Çizelge 1.3. Dünya'da Kuru ve Yarı-Kuru Bazı Fermente Sosislerin Üretim Koşulları ve Karakteristik Özellikleri.

Ülke	Adı/Tipi	Olgunlaştırma Sıcaklığı(°C)	R_h (%)	a_w	pH	R_h/Protein Oranı
Yunanistan	Fermente sosis	24-12	32-33	0,80-0,92	4,6-4,9	-
Fransa	Saucission	12	-	0,83-0,93	6,2-6,5	2,0:1
İspanya	Fermente Sosis (Salchichon, Chorizo)	24-12	-	0,85-0,86	5,0	-
		15-10	-	0,77-0,80	5,6-5,9	-
		20-10	44-55	0,92-0,94	5,5-5,6	1,1-1,3:1
Portekiz	Fermente Sosis (Chourica, Salpicao)	15	29-41	0,83	5,3-5,4	1,0-1,1:1
Türkiye	Fermente Sucuk	25-18	30	0,89-0,95	4,6-5,5	-
Hırvatistan	Fermente Sosis	20-16	13-15	0,91-0,96	5,3-5,5	-
ABD	Peperoni	36-13	-	0,90	4,7-4,8	1,6:1
Arjantin	Fermente Sosis	23-15	28	0,90	5,2-5,4	1,4:1
Hollanda	Fermente Sosis	25-16	-	0,95	4,5	-
İrlanda	Fermente Sosis	24-15	45-49	<0,91	5,1	-
Lübnan	Fermente Sosis	35	60-65	-	4,4-4,7	3,5:1
Tayland	Nham	30	70	-	4,4-4,8	3,5:1

Ticari üretilen sucuklarda fermantasyonu sağlayabilmek amacıyla sucuk hamuruna kontrollü şekilde bazı starter mikroorganizma türleri tek başlarına veya belirli oranlarda kombine şekilde sucuk hamuruna ilave edilmektedir. Türkiye'de üretilen sucuklarda genellikle *Lactobacillus, Staphylococcus, Pediococcus ve Micrococcus* cinsi bakteriler başta olmak üzerefarklı cins ve türdeki mikroorganizmalar da kullanılmaktadır (Çon ve ark 2002, Gökalp ve ark 2004). Dünya genelinde fermente et ürünlerinde bulunan starter nitelikteki bazı mikroorganizmaların karakteristik özellikleri Çizelge 1.4'te gösterilmektedir (Hutkins 2006).

Çizelge 1.4. Fermente Et Ürünlerinde Kullanılan Başlıca Starter Kültürler.

Mikroorganizma	Minimum Sıcaklık (°C)	Optimum Sıcaklık (°C)	Glikozdan Asit Üretme[1]	Nitrat İndirgeme	Ana İşlev
L. sake	4	32-35	+	-	Asit Oluşumu
L. curvatus	4	32-35	+	-	Asit Oluşumu
L. plantarum	10	42	+	-[2]	Asit Oluşumu
P. pentasacens	15	28-32	+	-	Asit Oluşumu
P. acidilactici	15	40	+	-	Asit Oluşumu
K. varians	10	25-37	-	+	Tat, Aroma
S. carnosus	10	30-40	-	+	Tat, Aroma
S. xylosus	10	25-35	-	+	Tat, Aroma

[1] Anaerobik şartlar altında
[2] Bazı alt türler nitratı düşük glikoz ve yüksek pH ortamlarda indirgeyebilmektedir.

Fermente sucukların kalitesi, özellikle fermantasyon ve kurutma sürecinde mikroflorayı oluşturan mikroorganizmaların tür ve sayılarına bağlı olarak şekillenmektedir. Sucuklarda fermantasyon hammadde, kullanılan alet ve ekipman, üretim ortamından ürüne geçen mikroorganizmalarla rastgele inokülasyon olarak gerçekleşebileceği gibi, üretim aşamasında sucuk hamuruna starter kültür ilavesi ile de gerçekleşmektedir (Coventry ve Hickey 1991, Çon ve ark 2002, Ercoşkun 2006).

Türkiye'de fermente sucuğun üretim teknolojisinin standart olmayışı, üretim süresinin uzun oluşu, sucuk üreticilerinin ve tüketicilerin sürekli ve değişmeyen standart bir kalitede ürün talep etmeleri vb. faktörler, sucuk üreticilerini ısıl işlem uygulanan sucuk üretimine yönlendirmiştir. Sucuk sektörü açısından sucuklarda ısıl işlem uygulanmasının en önemli avantajı üretim sürecinin birkaç gün içerisinde gerçekleşerek ürünün kısa sürede satışa hazır hale getirilmesidir. Sucuk üretim teknolojisinde ısıl işlemin kullanılmasının diğer nedenleri arasında üründe patojen mikroorganizma riskinin en aza indirilmesi ve ürün kalite stabilitesinin dayanıklı hale getirilmesi gelmektedir.

Türkiye'de fermente sucuklara ısıl işlem %70-%99 arasında rutubetli ortamlarda, farklı sürelerde merkeze 45-72°C arasında değişen sıcaklık uygulanmasıyla gerçekleştirilmektedir (Tayar 1994, Filiz 2002). Bununla birlikte Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'ne (Resmi Gazete 2012a), göre ısıl işlem görmüş sucuklarda uygulanan ısıl işlemin, üretimde kırmızı çiğ eti kullanılması durumunda ise merkez sıcaklığın en az 68°C, çiğ kanatlı etlerin kullanılması durumunda en az 72°C'lik sıcaklık uygulanması gerektiği belirtilmektedir.

Sucuklara ısıl işlem uygulanması ile arzulanan aromatik değişimlere yol açan mikroorganizma faaliyeti ortadan kalkmakta veya yetersiz kalabilmektedir. Dolayısıyla laktik asit oluşumu, lipoliz, proteoliz gibi kimyasal reaksiyonlar tam olarak şekillenememektedir. United States Department of Agriculture (USDA) tarafından işlenmiş et ürünleri için uygulanması öngörülen merkez nokta sıcaklık değer ve süreleri Çizelge 1.5'te belirtilmiştir (Anonim 1998, Ercoşkun 2006).

Çizelge 1.5. Et Ürünleri İçin Uygulanan Merkez Nokta Sıcaklık Değer ve Süreleri.

Sıcaklık (°C)	Süre (dk)
54,4	121
60,5	15
62,7	10
65,5	3
68,3	1

Isıl işlem uygulanmış sucuk üretiminde, kılıflara dolumu yapılan sucuk karışımına genellikle 8-24 saatlik kısa bir fermantasyon süresini takiben ısıl işlem uygulanmaktadır. Buna karşın fermente Türk tipi sucuk üretiminde fermantasyonun sağlanması amacıyla yaklaşık 6-12 günlük bir üretim süresine ihtiyaç duyulmaktadır (Çon ve ark 2002, Filiz 2002, Öztan 2003). Isıl işlem uygulanmış sucuklarda depolama sürecinde kimyasal ve biyokimyasal faaliyetler şekillenememekte, arzu edilen değişikliklerin gerçekleşmesinde rol alan bakteri aktivitesi, enzimatik faaliyetler (örn., proteoliz, lipoliz) ve diğer unsurların aktiviteleri büyük ölçüde yavaşlamakta ve/veya ortadan kalkmaktadır. Ayrıca sucuğa uygulanan ısıl işlem, ürün formülünde kullanılan baharatın ve diğer bileşenlerin özellikleri ile birliktefermantasyon sırasında oluşan tat, lezzet ve aroma bileşiklerinin de olumsuz yönde farklılaşmasına neden olabilmektedir (Ercoşkun 2006).

1.3.1. Fermente Sucuklarda Meydana Gelen Metabolik Reaksiyonlar

Sucuklarda fermantasyon ve olgunlaşma sürecinde karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmasına bağlı olarak farklı birtakım metabolitler oluşmaktadır. Tüm metabolik reaksiyonların birbirleriyle olan tepkimedüzeylerinin kontrol altında tutulması oldukça güçtür. Bu bağlamda metabolik faaliyetlerin etkileşimleri oldukça önem taşımaktadır (Ercoşkun 2006).

Fermente sucuklarda karbonhidrat metabolizması sonucunda genellikle asidik karakterdeki bileşikler ortaya çıkabilmektedir (Cocconcelli ve Fontana 2010). Karbonhidrat metabolizması ile ortaya çıkan aroma, reaksiyona giren şeker çeşidine bağlı olarak oluşankimyasal bileşiklerdenkaynaklanır. Kesim sonrasında kaslarda var olan glikojen bakteriler tarafından mikrobiyal faaliyet sonucunda öncelikle glikoza ve/veya laktik asit-laktata indirgenmektedir. Belirtilen süreç için oldukça uzun bir zamana ihtiyaç duyulmakta ve metabolik faaliyet sınırlı kalabilmektedir. Bu duruma bağlı olarak istenilen pH azalması gerçekleşememekte ve dolayısyla renk, tekstür, diğer duyusal nitelikler de olumsuz yönde etkilenmektedir. Fermente sucuklarda etkili karbonhidrat fermantasyonunun gerçekleşmesi sucukların kalitesine etki edecek faktörlerde (örn., arzu edilen renk, aroma, pH düşmesi, laktik asit oluşumu) olumlu yönde artışlar meydana gelmektedir (Gökalp ve ark 1998, Öztan 2003, Ercoşkun 2006, Cocconcelli ve Fontana 2010).

Sucuklarda fermantasyon sürecindeki protein metabolizması oldukça önemli bir role sahiptir. Et proteinleri fermantasyon aşamasında öncelikle etlerde bulunan enzimler (Çizelge 1.6) ile birlikte proteolize maruz kalmaktadır. Ortaya çıkan proteoliz, etin yapısında bulunan veya mikrobiyolojik aktivite sonucunda ortaya çıkan enzimler (örn., aminopeptidaz), protein yapısında olan bileşikleri parçalayarak uçucu ve uçucu olmayan azotlu bileşikler ile birlikte protein yapısında olmayan polipeptit, dipeptit, nükleotit gibi azotlu bileşiklerin oluşumuna yol açarak sucuklara aroma bileşikleri kazandırılmasında önemli rol oynamaktadır (Gökalp ve ark 1998, Toldra 1998, Ercoşkun ve Çon 2003, Ercoşkun 2006, Toldra 2007). Buna karşın besinlerde bulunan serbest aminoasit ve protein yapısındaki bileşikler, dekarboksilasyon aktivitesiyle biyokimyasal aktif biyojenik aminlerin (örn., histamin, tiramin, triptamin, feniletilamin) oluşmasına yol açabilmektedir (Toldra 1998, Toldra 2007). Çizelge 1.6'da etlerdeki bazı önemli proteolitik ve lipolitik enzimler gösterilmektedir (Toldra 2007).

Çizelge 1.6. Etlerdeki Bazı Önemli Proteolitik ve Lipolitik Enzimler.

Enzim	Ana Substrat	Ortaya Çıkan Bileşik
Katepsin	Miyofibribler proteinler	Protein parçaları
Kalpain	Miyofibribler proteinler	Protein parçaları
20S Proteasome	Miyofibribler proteinler	Protein parçaları
Tripeptidilpeptidaz	Polipeptitler	Tripeptitler
Dipeptidilpeptidaz	Polipeptitler	Dipeptitler
Dipeptidaz	Dipeptitler	Serbest amino asitler
Aminopeptidaz	Peptitler (amino)	Serbest amino asitler
Karboksipeptidaz	Peptitler (karboksil)	Serbest amino asitler
Lizozomal asit lipaz	Triaçilgliseroller	Serbest yağ asitleri
Asit fosfolipaz	Fosfolipit	Serbest yağ asitleri
Esteraz	Triaçilgliseroller	Kısa zincirli serbest yağ asitleri
Hormon Duyarlı lipaz	Triaçilgliseroller	Serbest yağ asitleri
Monoaçilgliserol lipaz	Monoaçilgliserol	Serbest yağ asitleri

Fermente sucuklarda lipoliz olayının mikrobiyolojik (örn., *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*) aktivite sonucunda ortaya çıktığı belirtilmektedir (Hinrichsen ve Andersen 1994, Stahnke 1994, Ercoşkun ve ark 2004). *Micrococcus* ve *Staphylococcus*'lar genelde uzun zincirli trigliseritler, *Lactobacillus*'ların ise kısa zincirli yağ asitlerini hidrolize etme yeteneklerine haiz oldukları bilinmektedir. Lipit metabolizmasının bir kısmı kabul edilen lipit oksidasyonu etlerde kalite parametresi için istenmeyen bir durum olarak karşılanırken, sucuk gibi fermente et ürünlerinde aromatik bileşiklerin ortaya çıkması ve arzu edilen lezzet ve tadın oluşmasında rol oynamaktadır (Toldra 1998).

1.4. Fermente Sucukların Mikroflorasında Yer Alan *Lactobacillus* Cinsi Bakteriler

Lactobacillus'lar, *Firmicutes* alemi, *Lactobacillales* sınıfı, *Lactobacillaceae* familyası, *Lactobacillus* cinsinde yer almakta olup, su ve toprakta az bulunmakla birlikte süt ve ürünleri, et ve ürünleri, hububat ve sebzeler ile bitki ve bitki atıklarında, memelilerin ağız, gastrointestinal ve vajina florasında yaygın şekilde bulunmaktadır (Hensyl 2000a, Güleren 2008, Yeniel 2006).

Lactobacillus cinsi bakterilerinin sınıflandırılmasında morfoloji, glikoz fermantasyon şekli, farklı sıcaklıklarda üreme, asit veya alkali toleransı, DNA baz yapısı, yağ asidi komposizyonu ve hücre duvarının bileşenleri esas alınmaktadır (Madigan ve ark 1997, Hensyl 2000a, Toldra 2007). *Lactobacillus*'lar, gram (+) ve katalaz (-), genellikle hareketsiz, spor oluşturmayan ve fakültatif anaerob, şekeri

fermente ederek karakteristik fermantasyon ürünü olan başta laktik asit olmak üzere birçok asidi üreten (Çizelge 1.8), düzgün veya kıvrımlı uzun basil şeklinde bakteriler olarak tanımlanabilmektedir (Çon 1995, Hensyl 2000a). *Lactobacillus*'lar içerisinde et ve et ürünlerinin fermantasyonunda önem arz eden başlıca bakteriler *L. plantarum, L. fermenti, L. sake, L. casei, L. curvatus, L. farciminis, L. acidophilus* olarak gösterilebilmektedir. Çizelge 1.7'de bazı *Lactobacillus* türü bakterilerin fizyolojik ve biyokimyasal karakteristikleri, Çizelge 1.8'de karbonhidrat fermantasyon nitelikleri belirtilmiştir (Gürakan ve ark 1995, Hensyl 2000a, Güleren 2008,).

Çizelge 1.7. *Lactobacillus* Türlerinin Fizyolojik ve Biyokimyasal Karakteristikleri.

	L. agilis	*L. alimentarius*	*L. bavaricus*	*L. casei sub. casei*	*L. curvatus*	*L. maltaromicus*	*L. plantarum*	*L. sake*
Peptidoglikan tipi	mDAP direkt	Lys-DAsp	Lys-DAsp	Lys-DAsp	Lys-DAsp	mDAP direkt	mDAP direkt	Lys-DAsp
Teikoik asit	-	-	-	-	-	-	Gliserol/Ribitol	-
Elektroforetik hareketlilik D-LDH	1.40	0.80	-	1.22	1.20	Belirsiz	1.44	1.20
Elektroforetik hareketlilik L-LDH	1.20	1.10	1.60	0.93	1.60	Belirsiz	1.28	1.60
Allosterik L-LDH	-	-	+	+	+	-	-	+
% mol G+C	43-44	36-37	41-43	45-47	42-44	36	44-46	42-44
Laktik asit İzomerleri	L	L(D)	L	L	D/L	L	D/L	D/L
15°C'de üreme	-	+	+	+	+	+	+	+
Arjininden oluşan NH_3	-	-	-	-	-	Belirsiz	-	-

mDAP :Meso-diaminopimelic acid, Lys-DAsp: Lysine-D-iso-asparagine, D: D laktik asit izomer formu, L: L laktik asit izomer formu, D-LDH: D-Laktat dehidrogenaz, L-LDH: L-laktat dehidrogenaz

Çizelge 1.8. *Lactobacillus* Türlerinin Karbonhidrat Fermantasyon Özellikleri.

Karbonhidrat Fermantasyonları	*L. agilis*	*L. alimentarius*	*L. bavaricus*	*L. casei subsp. casei*	*L. curvatus*	*L. maltaromicus*	*L. murinus*	*L. plantarum*	*L. sake*
Amigdalin	+	o	-	+	-	+	d	+	+
Arabinoz	-	d	-	-	-	-	+	d	+
Sellobioz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Eskulin	+	+	+	+	+	o	+	+	+
Fruktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galaktoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glikoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glukonat	-	+	+	+	+	o	-	+	+
Laktoz	+	-	+	d	d	+	+	+	+
Maltoz	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Mannitol	+	-	-	+	-	+	d	+	-
Mannoz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitoz	+	-	-	+	-	+	-	d	-
Mellibioz	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Rafinoz	+	-	-	-	-	+	+	+	+
Ramnoz	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Riboz	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Salisin	+	+	+	+	+	+	d	+	+
Sorbitol	d	-	-	+	-	+	-	+	-
Sükroz	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Trehaloz	+	+	-	+	-	+	d	+	+
Ksiloz	-	-	-	-	-	-	-	d	-

+:Pozitif -: Negatif d: Değişken

Fermente sucuklardan en fazla izole edilen *Lactobacillus* türleri arasında *L. plantarum, L. sake* ve *L. curvatus*'un olduğu belirtilmektedir (Özdemir 1999). *L. sake*'nin fermente sucuklardan izole edilme oranının %50-65, *L. curvatus*'un ise yaklaşık %25, *L. plantarum'*un ise %10-15 olduğu bildirilmektedir (Schillinger ve Lücke 1987, Özdemir ve ark 1996, Ünlütürk ve Turantaş 1998, Özdemir ve ark 2002, Başyiğit ve ark 2007). Ayrıca fermente sucukların mikroflorasında yer alan *L. bavaricus, L. brevis, L. casei, L. buchneri* ve *L. paracasei, L. rhamnosus* gibi *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin diğer türlere göre daha az şekilde yer aldığı vurgulanmaktadır (Papamanoli ve ark 2003).

Lactobacillus cinsi mikroorganizmaların fermente sucuklarda yeterli oranda bulunması ve/veya üretim aşamalarında ilave edilmesi sonucunda özellikle laktik asit bakterileri asitliğin artmasına, dolayısıyla ürünün pH değerinin azalmasına neden

olmaktadır. Bu durum et proteinlerinin su tutma kapasitesini düşürmekte ve fermantasyon sürecinde sucukların su kaybetme oranının artışına neden olarak fermantasyon sürecinin kısalmasına yol açmaktadır (Leistner 1995, Cocconcelli ve Fontana 2010).

Fermantasyon süresince özellikle laktik asit bakterilerinin curvasin A, sacaicin gibi bakteriyosin özelliği gösteren bileşikler ile diasetil, asetaldehit, hidrojen peroksit, hidrojen sülfür gibi metabolit ürünlerini oluşturdukları ve metabolitlerin patojen mikroorganizmaların (örn., *L. monocytogenes, S. aureus*) üremeleri üzerinde olumsuz etki sağlayabileceği yapılan çalışmalarda vurgulanmaktadır (Messi ve ark 2001, Erdoğrul ve ark 2002, Filiz 2002, Papamanoli ve ark 2003, Dinçer 2007).

Bununla birlikte *Lactobacillus* cinsi bakterilerin fermente sucuklarda kontrolsüz bir şekilde bulunması, diğer saprofit veya patojen bakterilerin yarattığı olumsuz etkilere (örn., lezzet ve aroma kayıpları, renk kaybı, gaz oluşumu, mukoz tabaka oluşumu) sebep olabilmektedir (Hu ve ark 2009, Toomey ve ark 2010).

1.4.1. *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curvatus*'un Fermente Sucuklar Üzerindeki Etkinlikleri

Fermente et endüstrisinde starter kültürlerden ürün güvenliğini sağlama, ürün stabilitesini iyileştirme ve duyusal özellikler kazandırma amacıyla yararlanılmaktadır (Lücke 2000, Kaban 2007, Toldra 2007). Fermente sucuklarda başta *L. plantarum*, *L. sake* ve *L. curvatus* olmak üzere birçok laktik asit bakterileri (örn., *L. lactis, L. casei, P. acidophilus, P. acidilactici, P. pentosaceus*) fermantasyonda rol oynamaktadırlar (Yaman ve ark 1998, Özdemir 1999). Bunun yanında fermente sucuklarda starter kültür olarak katalaz pozitif koklar (örn., *Staphylococcus carnosus, Staphylococcus xylosus, Micrococcus varians*), küfler (örn., *Penicillium nalgiovense*) ve mayalar (örn., *Debaryomyces hanseii*) kullanılabilmektedir (Leistner 1995, Candoğan 2000, Lebert ve ark 2007). Çizelge 1.9'da European Food Safety Authority (EFSA) tarafından besinlerde nitelikli güvenilir olarak kabul edilen (Qualified Presumption Safety) *Lactobacillus* türleri gösterilmektedir (Anonim 2007b, Korhonen 2010).

Çizelge 1.9. EFSA Tarafından Besinlerde Nitelikli Güvenilir Olarak Kabul Edilen Bazı *Lactobacillus* Türleri.

Lactobacillus Türleri		
L. acidophilus	*L. amylolyticus*	*L. amylovorus*
L. alimentarius	*L. aviaries*	*L. brevis*
L. buchneri	*L. casei*	*L. crispatus*
L.curvatus	*L. delbrueckii*	*L. farciminis*
L. fermentum	*L. gallinarum*	*L. gasseri*
L. helveticus	*L. hilgardii*	*L. johnsonii*
L. kefiranofaciens	*L. kefiri*	*L. mucosae*
L. panis	*L. paracasei*	*L. paraplantarum*
L. pentosus	*L. plantarum*	*L. pontis*

L. plantarum, *L. sake* ve *L. curvatus*, sucuk hamurunda bulunan karbonhidratları, lipitleri, azotlu bileşikleri ve diğer küçük molekül ağırlıklı bileşikleri parçalayarak sucuğun kendine has duyusal özelliklerinin (örn., renk, tat, koku, kıvam, yapı ve aroma bileşikleri) oluşumunda önem taşımaktadır (Selgas ve ark 1993, Stahnke 1994, Blom ve ark 1996, Navarro ve ark 1998, Shahidi 1998a, Shahidi 1998b, Ercoşkun 2006, Lebert ve ark 2007).

L. plantarum, fakültatif heterofermantatif olma özelliğinden dolayı sucukların fermantasyonu sürecinde oluşturduğu laktik asit ve diğer organik asitler ile üründe yapısal nitelikler, kıvam, renk ve tadın gelişmesinde etkili rol oynamaktadır (Toksoy ve ark 1999). Bunun yanında her iki D ve L laktik asit izomerlerini üretebilme yeteneğine sahiptir (Candoğan 2000) (Çizelge 1.6). Ancak *L. plantarum*, sucuklarda fermantasyon sıcaklığının azaldığı süreçte laktik asit üretiminde azalma meydana gelmektedir. Buna karşın fermantasyon 25°C ve daha düşük sıcaklıklarda gerçekleştirildiğinde, *L. sake* ve *L. curvatus* tarafından curvasin A ve sacaisin üretiminin sürdürüldüğü (Kongkiattikajorn 2013, Kröckel 2013) ve patojen mikroorganizmaların gelişimlerini inhibe ettiği vurgulanmaktadır. Olgunlaştırma sıcaklığı 20-22°C olan fermente sucuklar ile ilgili yapılan çalışmalarda sucuk mikroflorasında baskın grubu *L. sake* ve *L. curvatus* olduğu, olgunlaştırma sıcaklığının 25°C olduğu ve daha yüksek olduğu koşullarda ise *L. plantarum*'un ortama baskın olduğu vurgulanmaktadır (Özdemir ve Sırıken 1996).

1.5. Antibiyotiklerin Tanımı ve Sınıflandırılması

Antibiyotik terimi "karşıt yaşam" veya "yaşam karşıtı" anlamına gelmektedir. Antibiyotikler başta küf, bakteri ve bitkiler tarafından üretilen ve bazı mikroorganizmalar üzerinde inhibe veya tahrip edici etki yapan, enfeksiyon etkenlerinden korunmada yararlanılan, sentetik, yarı sentetik veya doğal yapılar şeklinde bulunan kimyasal madde olarak tanımlanabilmektedir (Çetinkaya ve ark 2000). Aarestrup ve Jenser (2007)'e göre antibiyotikler, "bazı mikroorganizmaların yok edilmesini veya gelişmesini engelleyen aynı zamanda konakçıya az oranda zarar veren doğal, yarı sentetik ve sentetik yapıdaki bileşikler" olarak tanımlanmaktadırlar. Öner (1992) ve Özşahin ve ark (2005) antibiyotikleri "mantarlar veya benzeri mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, bazı mikroorganizmaların gelişmesini durdurma ve öldürme gücü bulunan doğal veya sentetik maddeler" şeklinde açıklamaktadırlar.

Antibiyotikler ilk kez 1920'li yılların başında ortaya çıkarılmış ancak insan ve hayvanlardaki enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaya 1940'lı yıllarda yoğun olarak geçilmiştir. Daha sonraki süreç içerisinde yeni türdeki antibiyotiklerin bulunması, spektrumların genişlemesi, patojen mikroorganizmalara karşı tedavilerin gelişmesinde ve farklılaşmasında büyük önem kazanmıştır (Barbosa ve Levy 2000, Wheat 2001, Tollefson ve Karp 2004, Sanders 2005, Saga ve Yamaguchi 2009).

Antibiyotikler hedef hücreye etkilerine, etki mekanizmalarına, etki gösterdikleri mikroorganizma grubuna, etki spektrumuna, immünomodülatör etkilerine göre 5 ana grupta incelenebilmektedir (Sáenz ve ark 2001, Wegener 2003, Erol 2007, Kohenski ve ark 2007).

1.5.1. Hedef Hücreye Etkilerine Göre Antibiyotikler

Antibiyotikler, hedef hücreye etkilerine göre bakteriyostatik ve bakteriyositik olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Bakteriyositik etki gösteren antibiyotikler, bakterilerin yıkımlanmasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Bakteriyostatik grupta yer alan antibiyotikler ise ribozom aktivitesini engelleyerek bakterilerin üremesini inhibe etme ve/veya durdurma etkisini göstermektedirler. Ayrıca

antibiyotiklerin kimyasal yapıları hedef hücreye etki durumlarını de etkilemektedir (Pankey ve Sabath 2004, Kohenski ve ark 2007,).

1.5.2. Etki Mekanizmalarına Göre Antibiyotikler

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre hücre duvarı sentezini engelleyenler, protein-DNA-RNA sentezini inhibe edenler, para amino benzoik asit (PABA) sentezinin durduranlar ve membran geçirgenliği inhibisyonunu sağlayanlar olmak üzere 4 grupta incelenebilmektedir. Çizelge 1.10'da etki mekanizmalarına göre antibiyotik grupları gösterilmektedir (Davies ve Webb 1998, Mc Dermott ve ark 2002, Alanis 2005).

Çizelge 1.10. Etki Mekanizmalarına Göre Antibiyotiklerin Gruplandırılması.

Etki Mekanizması	Antibiyotik Grupları
Hücre Duvarı Sentezinin Engellenmesi	β-laktamlar (örn., penisilin, sefalosporin, karbapenemler), glikopeptitler, siklik lipopeptitler
Protein, DNA ve RNA Sentezinin İnhibisyonu	Tetrasiklinler, aminoglikozitler, kloramfenikol, okzazolidonones, (örn., linozolid), makrolitler, linkozamitler, kuinolonlar, florokuinolonlar, rifampin
PABA Sentezinin Engellenmesi	Sülfanomitler, trimethompin
Membran Geçirgenliğinin İnhibisyonu	Polimiksinler (örn., kolistin, polimiksin-B)

Bakteri hücresi, protoplazmik membran ile hücreyi ozmotik etkilerden koruyan sert bir hücre duvarı ile çevrilidir. Bakteri hücre duvarını parçalayan, duvar polimerlerinin sentezini veya duvara inkorporasyonunu engelleyen maddeler, üremekte olan bakterileri ozmotik etkilere duyarlı hale getirip yıkımlanmasına neden olmaktadır. Bakteri hücre duvarı kendine özgü olduğundan ve bu şekildeki biyosentezin ökaryotik hücrelerde bulunmamasından dolayı etkileşimde bu bölgeye etkisi olan ilaçlar spesifik ve non-toksiktirler. Hücre duvarı biyosentezi üzerine öncelikle etki gösteren antibiyotikler başta penisilin ve sefalosporinler olmak üzere fosfomisin, sikloserin, vankomisin ve basitrasin olarak gösterilebilmektedir (Mc Dermott ve ark 2002, Alanis 2005).

Hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotikler, hücre duvarındaki yapıların (örn., peptidoglikogan) işlevlerinde değişikliklere yol açarak etki göstermektedirler. Bu grup içerisinde β-laktam, glikopeptit (örn., vankomisin, teikoplanin), sikloserin, basitrasin gibi antibiyotik grupları yer almaktadır (Davies ve Webb 1998, Kohenski

ve ark 2007). Bazı gram (+) bakteriler (örn., *Enterococcus*) hücre duvarı sentezini engelleyen antibiyotiklere (örn., aminoglikozit, tetrasiklin) karşı intrinsik olarak değil, sonradan kazanılan bir direnç mekanizması geliştirebilmektedirler (Kohenski ve ark 2007).

β-laktam grubu antibiyotiklerin ortaya çıkışı II. Dünya Savaşı'na dayanmakta olup, 1940'lı yıllarda tedavi amacıyla enfeksiyonların tedavisinde oldukça yaygın olarak kullanılmıştır (Wilke ve ark 2005). Günümüzde ise β-laktam grubu antibiyotikler, mikroorganizmalara karşı yüksek etki gücüne sahip olmaları, düşük maliyetle ve kolaylıkla temin edilebilmeleri, geniş spektrum ve düşük yan etkilere sahip olmalarından dolayı yaygın olarak tercih edilmektedir (Wilke ve ark 2005). β-laktam grubu antibiyotikler, transpeptidaz gibi bakteri hücre duvarının sentezinde görev alan enzimler üzerinde olumsuz etki yaratarak mikroorganizmaların oluşturduğu enfeksiyonlarda kullanılmaktadır. Ayrıca hücre duvarı dışında görev alan enzimler üzerinde engelleyici bir rol oynayarak hücre duvarı fonksiyonlarını inhibe etmektedir (Neuhauser ve Danziger 2005, Wilke ve ark 2005). β-laktam grubu antibiyotikler arasında yer alan türevleri hücre duvarının sentezinde görev alan enzimlerin inhibisyonunun yanında kimyasal yapılarına eklenen yan zincirlerde β-laktamaz enzimi aktivitesine karşı dirençli bileşik veya molekülleri içererek mikroorganizmalar üzerindeki olumsuz aktivitelerini artırmaktadırlar (Wilke ve ark 2005).

β-laktam grubu antibiyotikler içerisinde penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler gibi gruplar yer almaktadır. Bu grup antibiyotikler doğal, yarı sentetik veya sentetik olarak üretilmekte olup, mikroorganizmaların β-laktamaz enzimi üretebilir özellikte olma durumuna karşı yapılarında bulunan bileşiklerle belirtilen özellik karşısında dirençli olmasına yol açabilmektedir (Parry 1987, Özşahin ve ark 2005). Antibiyotik tarihinde önemli bir yere sahip olan penisilin, güçlü bakterisitik etkisinin yanında toksikolojik etkileri nisbeten düşük doğal veya yarı sentetik yapıda bulunabilmektedir (Miller 2002). Penisilin çoğunlukla *Penicillium notatum* ve *Penicillium chrysogenum* gibi mikroorganizmalar başta olmak üzere çeşitli küf türlerinden ekstraksiyon ve saflaştırma yöntemleriyle elde edilmektedirler (Miller 2002, Özşahin ve ark 2005). Yarı sentetik penisilinler, doğal penisilin yapısını kimyasal manipülasyonlarla değiştirmek suretiyle veya

penisilin molekülünde ana kimyasal yapıyı oluşturan 6-apa'ya uygun bir yan zincir eklemek suretiyle elde edilmektedirler (Parry 1987, Özşahin ve ark 2005).

Penisilinler thiazoldine halkası, β-laktama bağlanma yapısı ve yan molekül zinciri olmak üzere 3 ana kimyasal yapıdan meydana gelmektedir. Sefalosporin, karbapenem ve monobaktam gibi farklı yarı-sentetik ve sentetik antibiyotikler β-laktam yapısında olup, penisilin özelliği taşımaktadır. Penisilin grubu antibiyotikler doğal, penisilinaz dirençli, amino penisilin, spektrumu genişletilen ve amino penisilin/β-laktamaz inhibitör içerenler olmak üzere 5 ana grupta incelenebilmektedir.

Bütün penisilinler aktif olarak bakteriyositik etkiye sahiptirler. Penisilinler hücre duvarının sentezini inhibe etmekte olup, enzimlere bağlanarak çapraz protein bağları oluşturmakta ve oluşan enzimler penisilin bağlayıcı proteinler olarak bilinmekte olup, hücre duvarının hemen altında yer almaktadırlar. Penisilin bağlayıcı proteinler otolitik enzimlerle birlikte duyarlı bakterilerde hücre duvar yapısını zayıflatmakta ve sonuçta hücrelerin parçalanmasına neden olmaktadır (Miller 2002).

Doğal penisilinler aerobik ve gram (+) bakteriler (örn., *Enterococcus, Streptococcus*) üzerinde etkinliklerini göstermektedirler. Ayrıca bazı β-laktamaz enzimi üretemeyen *Staphylococcus* türlerine karşı da etkindirler. Amino penisilin gibi sentetik penisilinler ise yapılarındaki bileşenlerin etkinlik düzeyine göre gram (-) bakterileri (örn., *Haemophilus influenzae, E. coli, Neisseria gonorrhoeae*) etkileyebilme özellikleri kazanmışlardır (Miller 2002). Çizelge 1.11'de penisilin spektrumunun sınıflandırılması gösterilmektedir (Epstein ve ark 1997, Miller 2002).

Çizelge 1.11. Penisilin Spektrumunun Sınıflandırılması.

Sınıf	Türev	Antibakteriyel Spektrum
Doğal Penisilinler	Penisilin G Sodyum Penisilin G Potasyum Penisilin G Benzatine Penisilin G Prosaine	Gram (+) koklar, penisilinaz üretemeyen aerobik mikroorganizmalar, Gram (+) S*treptococcus,* S*taphylococcus,*
	Penisilin V	Diğer (örn., *Actinomyces israeli, Clostridium* ssp.)
Penisilinaz Enzimine Dirençli Penisilinler	Metisilin Kloksasilin Dikloksasilin	Metisiline duyarlı *S. aureus*
	Nafsilin Oksasilin	Metisiline duyarlı *Streptococcus* ssp.
Amino penisilinler	Ampisilin Amoksisilin	*L. monogytogenes* *Enterococcus* ssp.
	Bakampisilin	*Proteus mirablis, E. coli*
Geniş Spektrumlu Penisilinler	Karbenisilin Mezlosilin Piperasilin Tikarasilin	*Klebsiella* ssp. *Pseudomonas* ssp. *S. aureus, S. pneumonia*
Amino penisilin/ β-Laktamaz İnhibitör Kombinasyonları	Amoksisilin/ Klavulanik asit	Metisiline duyarlı *S. aureus* *H. influenzae*
	Ampisilin/Sulbactam	*Moraxella catarrhalis*

Doğal penisilinler ilk olarak ortaya çıkarıldıkları için klinikte ilk kullanılan antibiyotik olma özelliğindedirler. Doğal penisilinler arasında yer alan penisilin G ve penisilin V dar spektruma sahip olup, penisilin G (benzylpeniciline) parenteral, penisilin V (phenoxymethylpeniciline) ise oral olarak kullanıma uygundur. Çizelge 1.11'den de görüleceği üzere penisilin G dört farklı formda bulunmaktadır. Sodyum ve potasyum içeren penisilin G formları depolama sürecinde değişimini dengelemek, benzathine ve procaine formları ise aktivite esnasında yavaş emilmeyi sağlamak ve yarılanma ömrünü uzatmak amacıyla geliştirilmiştir (Miller 2002). Penisilin G grubu doğal antibiyotiklerin dokulara etkin bir şekilde nüfuz etme, duyarlı mikroorganizmalar için yüksek düzeyde aktivite gösterme gibi niteliklere sahiptir. Buna karşın penisilin G grubu antibiyotiklerin gastrik salgılar karşısında kolay inaktive olma, β-laktamaz enzimi üretebilen mikroorganizmalara karşı etkisiz kalma gibi olumsuz özellikleri de bulunmaktadır.

Sentetik penisilinler, ilk olarak penisilinaz enzimi üretebilen mikroorganizmaların ortaya çıkmasıyla birlikte geliştirilmeye başlanmıştır. Bu grupta yer alan penisilinler yapılarında penisilin molekülüne bağlı büyük yan zincir içermekte olup, *Staphylococcus*'ların penisilinaz enzimini üretebilme ve β-laktam halkasını değiştirebilme yeteneğini engellemektedir. Bu özelliklerinden dolayı sentetik penisilinlerin birçoğu "antistafilokokkal penisilinler" olarak nitelendirilmektedir (Miller 2002).

Metisilin, sentetik penisilinler içerisinde yer alan ve penisilinaz enzimine dirençli penisilinler grubu içerisinde önemli bir yere sahiptir. Metisilin, metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un (MRSA) ortaya çıkmasından dolayı kullanımda kısa süre kalmıştır (Miller 2002, Stapleton ve Taylor 2002). Penisilinaz enzimine dirençli penisilinler grubu içerisinde nafsilin, oksasilin, kloksasilin, dikloksasilin gibi diğer sentetik penisilin türleri yer almaktadır. Penisilinaz enzimine dirençli penisilinlerin etki spektrumları orta düzeyde, deri ve yumuşak dokularda oluşan enfeksiyonların tedavisinde etkin bir şekilde kullanılabilmektedir (Miller 2002, Parry 1987). Ancak günümüzde *Staphylococcus*'lar başta olmak üzere metisiline karşı zamanla direnç kazanmış mikroorganizmaların yol açtığı enfeksiyonlarda kullanımı etkin değildir. Dikloksasilin, penisilinaz enzimi üreten stafilokokkal enfeksiyonların ve mastitisin tedavisinde kısmi olarak kullanılan sentetik penisilinler arasında yer almaktadır (Parry 1987).

Mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavi sürecinde antibiyotiklerin kullanım amaçları arasında geliştirilmiş bir diğer mekanizmayı mikroorganizmaların protein, DNA veya RNA sentezinin engellenmesi oluşturmaktadır. Mikroorganizmaların protein, DNA veya RNA sentezinin engellenmesinde veya durdurulmasında tetrasiklin, aminoglikozit, makrolit, kuinolon ve florokuinolon olarak 4 ana grupta kullanılmakta olup, doğal, yarı-sentetik ve sentetik olarak 3 farklı şekilde üretilmektedir. Protein, DNA veya RNA sentezinin engelleyen veya durduran antibiyotikler, bakterilerin canlılıklarını koruyabilme ve çoğalma sürecinde bakteri için gereksinim duyulan protein ve/veya protein yapısındaki bileşiklerle birlikte, DNA ve RNA sentezi veya aktivitesini olumsuz etkileyerek bakteriler üzerinde bakteriyostatik etki göstermektedirler (Aleksandow ve Simonson 2008).

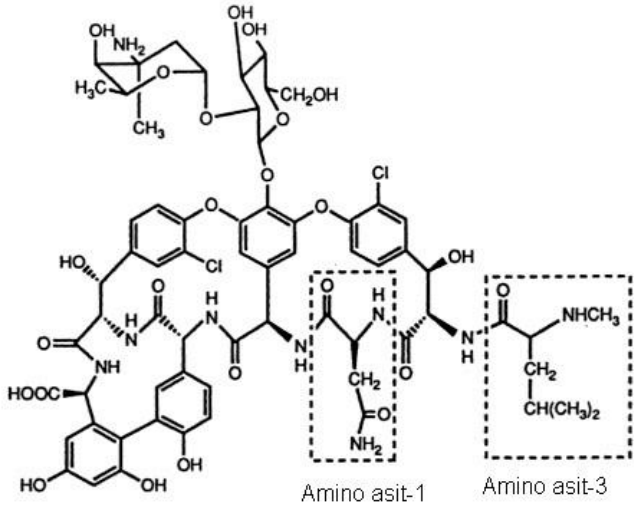
Tetrasiklinler, ilk olarak 1940'lı yıllarda toprak mantarı olarak bilinen *Streptomyces aureofaciens*'in fermantasyonu sonucunda ortaya çıkmıştır (Davies ve Webb 1998). Tetrasiklin grubu içerisinde 1954 yılında kimyasal olarak üretilen ilk antibiyotik klortetrasiklindir (Oka ve ark 2000, Sapadin ve Fleishmajer 2006). Tetrasiklin grubu antibiyotikler kendi aralarında doğal, yarı-sentetik ve kimyasal olarak modifiye edilenler olmak üzere 3 grupta incelenmektedir. Etki mekanizmaları bakımından protein, DNA veya RNA sentezini engelleyen antibiyotik grubundadır (Speer ve ark 1992, Davies ve Webb 1998, Sapadin ve Fleishmajer 2006). Tetrasiklinler, 4 halkalı bir karboksilik yapı olan hidronaftesen çekirdeği bulunmakla birlikte çekirdeğin 5., 6. ve 7. pozisyonlarındaki yan halkalara farklı bileşiklerin eklenmesine göre türevler farklılık göstermektedir (Schnappinger ve Hillen 1996, Fuoco 2012). Yaygın olarak bilinen tetrasiklin grubunda daktiloskilin, doksisiklin, minosiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin gibi ajanlar yer almaktadır (Speer ve ark 1992). Tetrasiklin grubu antibiyotikler, insanlarda bakteri kaynaklı enfeksiyon ve hastalıkların tedavisinde kullanılmalarının yanında veteriner hekimlikte çiftlik hayvanlarının enfeksiyonlarıyla birlikte profilaktik etki göstermesi amacıyla da oral yollardan veya hayvan yemleriyle birlikte kullanılmışlardır (Speer ve ark 1992, Aleksandow ve Simonson 2008).

Tetrasiklinlerin çoğunluğu etkilerini bakteri hücre duvarından giriş yaptıktan sonra ribozomların A konumuna aminoacyl-tRNA'ların bağlanmalarını bloke ederek, bakterilerin protein sentezini durdurmak ve/veya engellemek suretiyle gerçekleştirmektedirler (Speer ve ark 1992, Davies ve Webb 1998, Fluit ve ark 2001, Sapadin ve Fleishmajer 2006). Tetrasiklinlerin bakterilerde ribozomların A konumuna aminoacyl-tRNA'ların bağlanmalarını bloke etmesinin yanında tRNA stabilitesi, rRNA sentezi ve aminoasit metabolizması üzerindeki ikincil etkilerden dolayı protein sentezini engellemektedirler (Speer ve ark 1992). Ancak Rasmussen ve ark (1991) ve Olivera ve Chopra (1992) bazı tetrasiklinlerin (örn., kleokardin, tiatetrasiklin) diğer tetrasiklinlerden farklı olarak sitoplazma mekanizması üzerinde etki göstererek antimikrobiyal etki gösterdiğini bildirilmektedirler. Bakteriler tetrasiklinlere karşı tetrasiklinlerin ribozomlara geçişini sınırlayıcı, tetrasiklinlerin ribozomlara bağlanmasını değiştirici ve tetrasiklinleri inaktive eden enzim sentezleyici olmak üzere 3 şekilde antibiyotik direnç mekanizması geliştirmişlerdir (Speer ve ark 1992). Tetrasiklinler, çiftlik hayvanlarında ve insanlarda ortak

kullanımı olan antibiyotik grupları arasında yer almaktadır. Tetrasiklinlerin yaygın olarak kullanılmasında çoğunluğunun oral yollardan alınması, ucuz olması, az yan etkiye sahip olması gibi etkenler önemli rol oynamaktadır. Ancak bakteriyositik etki yerine bakteriyostatik etki göstermesi, gebe kadınlarda ve çocuklarda iskelet sistemi üzerindeki olumsuz etkileri gibi nedenlerden dolayı kullanımı kısıtlıdır (Speer ve ark 1992).

Antibiyotiklerin bir diğer önemli etkinlik mekanizmasını mikroorganizmaların iç ve dış membranlarındaki geçirgenliğin ve membran mekanizmasının bozulması oluşturmaktadır. Antibiyotiklerin membran geçirgenliği ve mekanizması üzerindeki etkileri, mikroorganizmalara bakteriyostatik etki göstererek canlılıklarının yitirilmesini sağlamaktadır. Mikroorganizmaların membran geçirgenliğinin inhibisyonu, membran yapısındaki bileşiklere (örn., lipopolisakkarit) göre farklılaşmaktadır. Antibiyotikler, lipopolisakkarit yapıdaki membranlara sahip mikroorganizmalara, membrandaki lipitlerde bulunan katyonların aniyonik değerliğe dönüşmesinde, ayrıca bazı proteinlerin yer değiştirmelerini sağlayarak membran geçirgenliği ve yapısını olumsuz şekilde etkilemektedirler (Landman ve ark 2008).

Glikopeptit grubu antibiyotiklerden vankomisin, teikoplanin bakteri hücre duvarı sentezininin inhibisyonu şeklinde etki göstermektedirler. Vankomisin ilk kez 1950'li yılların başında *Amycolatopsis orientalis* tarafından üretilen bileşiğin (compound 05865) penisilin dirençli *Staphylococcus*'lardan kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde başarı elde edilmesi sonucunda ortaya çıkmıştır (Levine 2006, Woodford ve ark 1995, Yao ve Crandall 1994). Geçen süreç içerisinde vankomisinin saf olarak elde edilememesi ve fazla yan etkilerle karşılaşılması nedeniyle önemini yitirmiş olmasına rağmen, sentetik olarak saf şeklinin üretilmesi ve bakteriyel endokarditis tedavisinde başarı elde edilmesi sonucunda 1958 yılında FDA'nın vankomisin kullanımına izin verdiği bildirilmektedir. Metisilinin ortaya çıkması ve kullanımına izin verilmesiyle birlikte penisiline dirençli *Staphylococcus* enfeksiyonların tedavisinde güncelliğini yitiren vankomisinin MRSA'ların ortaya çıkmasıyla birlikte 1980'li yılların başından 1990'lı yılların ortalarına kadar tekrar önem kazandığı vurgulanmaktadır (Yao ve Crandall 1994, Levine 2006, Öncül 2010). Şekil 1.2'de vankomisinin kimyasal yapısı gösterilmektedir (Yao ve Crandall 1994).



Şekil 1.2. Vankomisinin Kimyasal Yapısı.

Sonraki yıllarda vankomisinin kimyasal yapısında değişiklikler ortaya çıkarılarak avoparcin, teikoplanin gibi diğer glikopeptit grubu antibiyotikler elde edilmeye başlanmıştır. Vankomisin, gram (+) bakterilerde hücre duvar yapısını oluşturan peptidlerin terminal D-ala-D-ala dizisine bağlanmak suretiyle transglikolizasyon reaksiyonunu ve peptidoglikan oluşumunu inhibe ederek bakteriyosidal etki göstermektedir. Bu nedenle gram (-) bakterilerin (*Flavobacterium meningosepticum* istisna) hedef yapılarına lipid membranlarından geçememeleri nedeniyle etki gösterememektedirler (Öztürk 2002, Levine 2006, Öncül 2010). Son yıllarda koagulaz (-) *Staphylococcus'*lar (örn., *S. haemolyticus, S. epidermidis*) ve *Enterococcus*'larda glikopeptitlere kaşı direnç geliştiği bilinmektedir. *Enterococcus*'larda vankomisin direncinin D-ala D-ala ligaz enziminin peptidoglikan öncül molekülünün D-ala-D-ala distal ucunun yapısının değiştirilip vankomisinin buraya adhezyonunun engellemesi sonucu geliştiği bildirilmektedir (Yao ve Crandall 1994, Woodford ve ark 1995, Öztürk 2002).

1.6. Antibiyotiklerin Hayvansal Üretimde Kullanımı

Antibiyotiklerin hayvanlarda tedavi ve büyümeyi artırma amaçlı kullanımları 1940'lı yıllara dayanmaktadır (Salisbury ve ark 2002, Mathur ve Singh 2005, Sanders 2005). Antibiyotikler hayvan beslemede ilk kez 1946 yılında streptomisinin üretiminden elde edilen kültür kalıntılarının civciv rasyonlarına katılmasıyla kullanılmaya başlanmıştır. Daha sonraki yıllarda hayvansal üretimde büyüme amaçlı kullanılan en yaygın antibiyotik grubu arasında tetrasiklinler (örn., aureomisin) yer

almıştır (Schwarz ve ark 2001, Aarestrup ve Jenser 2007). Enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmaların etki mekanizması ve patogenezin daha iyi şekilde anlaşılması, yeni antibiyotik türevlerinin ortaya çıkarılması gibi faktörler sonucunda hayvan sağlığı konusunda önemli gelişmelere neden olmuştur (Wegener 2003, Tollefson ve Karp 2004, Saga ve Yamaguchi 2009). Daha sonraki dönemlerde hayvanlarda başarı ile kullanılan antibiyotikler hayvancılıkta kullanılmaya başlanmıştır (Tollefson ve Karp 2004).

Çiftlik hayvanlarında antibiyotikler tedavi edici (terapotik), proflaktik ve büyümeyi artırmak olmak üzere 3 temel amaçla kullanılmaktadırlar (Sáenz ve ark 2001, Teuber 2001, Allerberger ve ark 2003, Wegener 2003, Tollefson ve Karp 2004, Aarestrup ve Jenser 2007, Erol 2007, , Ungemach ve ark 2006).

Hayvansal üretimde antibiyotiklerin tedavide kullanımı, türevlerin çeşitlenmesi ve artışına bağlı olarak oldukça yaygınlaşmıştır. Hayvanlarda enfeksiyonların tedavisinde kullanılan antibiyotikler minimal düzeyde yan etki yaratmaktadırlar. Antibiyotik tedavisi antibiyotiklerin türev ve grupları, uygulama yolları (örn., oral, intravenöz ve intramuskular), üretimi yapılacak hayvanların cins ve türlerine göre değişiklik göstermektedir (Wegener 2003, Florea ve Nightingale 2004, Tollefson ve Karp 2004, Ungemach ve ark 2006).

Antibiyotikler, büyüme amaçlı olarak ilk kez 1940'lı yıllarda kanatlı hayvan üretiminde tetrasiklinlerin kullanılmasıyla başlamış olup, daha sonraki yıllarda diğer çiftlik hayvanlarında da kullanımı geliştirilmiştir. National Office of Animal Health (NOAH)'e göre büyüme amaçlı kullanılan antibiyotikler "hayvanlarda büyüme ve yem randımanını artırma, enfeksiyöz etkenlere karşı hayvanları koruma nitelik taşıyan maddeler" olarak nitelendirilmektedir. Hayvanlarda büyümeyi artırmak amacıyla kullanılan antibiyotikleroral yoldan yemlerle veya intramuskular ve intravenöz yollardan hayvana doğrudan uygulanmaktadır (Hughes ve Heritage 2004).

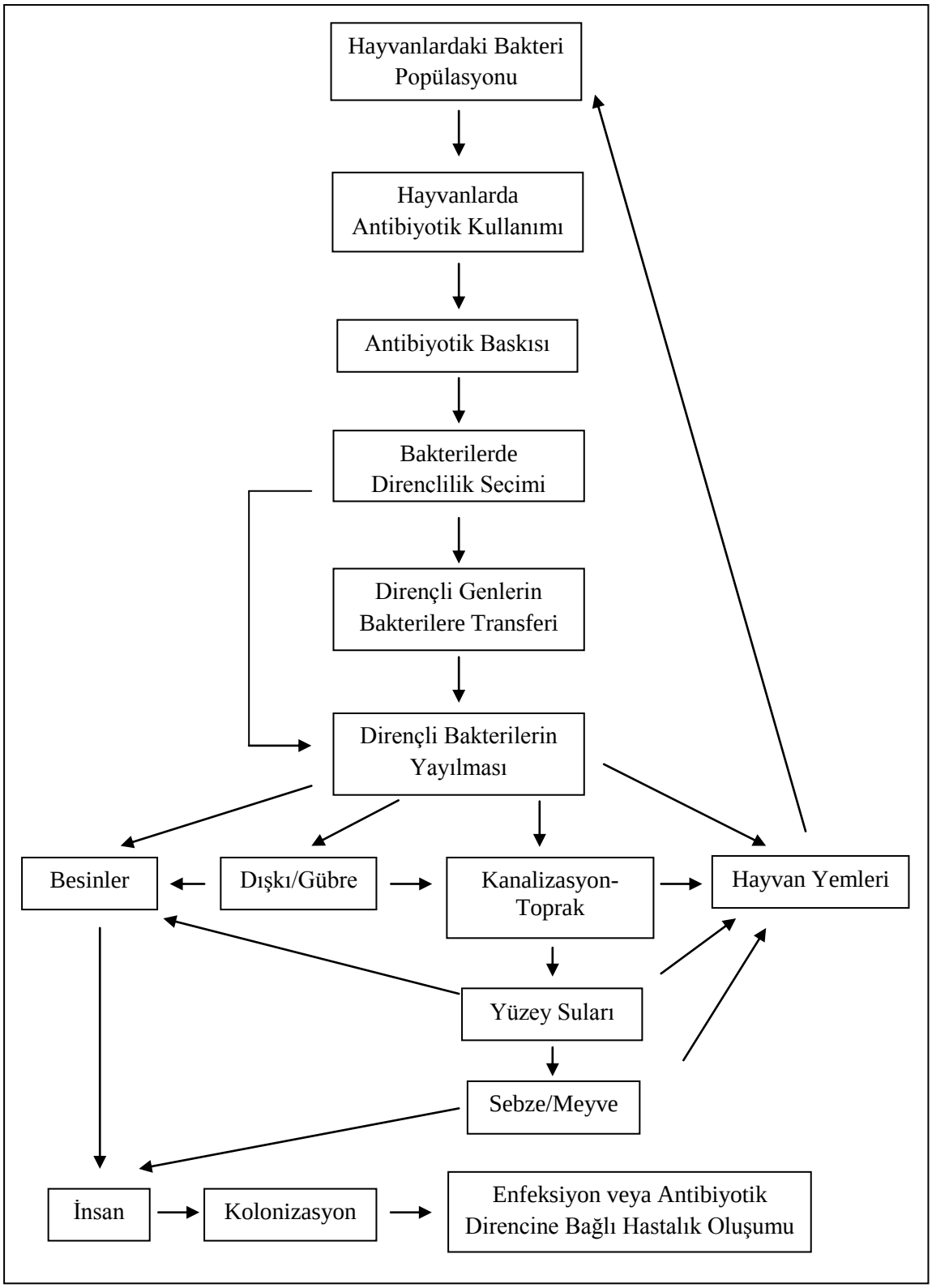
Hayvanlarda büyüme amaçlı kullanılan antibiyotiklerde ülkelere göre uygulama alanı, kullanım çeşit ve dozu farklılıklar gösterebilmektedir. Günümüzde gelişmiş ülkeler büyüme amaçlı antibiyotik kullanımına kısıtlamalar getirirken, gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkeler bu amaçla kullanılan antibiyotiklerin bazı türevlerine izin vermektedir (Hughes ve Heritage 2004).

Büyüme amaçlı kullanılan antibiyotiklerin hayvanların türlerine göre farklılık göstermesinin nedenleri arasında yemlerden daha fazla yararlanmak ve/veya enfeksiyonlardan hayvanları korumak gösterilebilmektedir. Yaygın olarak kanatlı hayvanlarda görülen enfeksiyonlara yönelik büyüme amaçlı antibiyotikler kullanılırken, kasaplık hayvanlarda ise enfeksiyontürüne göre farklı antibiyotik türevleri kullanılabilmektedir (Başustaoğlu 2004a, Hughes ve Heritage 2004).

Çiftlik hayvanlarında büyüme amaçlı kullanılan antibiyotikler arasında bambermisin, streptogramin, basitrasin, streptomisin, tetrasiklin, eritromisin, iyonofor, florokuinolon türevleri veya bileşikleri gösterilebilmektedir. Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği'ne (Resmi Gazete 2012b) göre hayvanlarda kullanımı yasaklanan antibiyotikler arasında kloramfenikol, dimetridazol, metronidazol, nitrofuranlar, ronidazol yer almaktadır.

Hayvansal üretimde kullanılan antibiyotiklerin beşeri hekimlikte kullanılan türevlerle benzerlik göstermesi, antibiyotik direnç gelişiminin yaygınlığını artırmaktadır. Bu durum hayvan mikroflorası (özellikle gastrointestinal sistem) ve yetiştiricilik ortamlarında var olan direncin doğal veya intrinsik olarak insanların yaşadıkları çevre ve mikrofloraya geçişini desteklemektedir.

Hayvansal üretimde büyüme amaçlı kullanılan bazı antibiyotiklerin hayvanlarda proflaktik ve tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler ve ayrıca insanlarda kullanılan antibiyotik türevleriyle benzerlik göstermesi durumunda antibiyotik dirençliliği görülebilmektedir. Bu durum, büyüme amaçlı olarak kullanılan antibiyotiklerin hayvanların intestinal florasında bulunan mikroorganizmaların doğal veya intrinsik olarak direnç kazanması yoluyla gerçekleşmektedir (Butaye ve ark 2003, Hughes ve Heritage 2004). Şekil 1.3'te antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerin hayvanlardan insanlara geçiş aşamaları gösterilmektedir (Khachatourians 1998, Anonim 2004, Claycamp ve Hooberman 2004, Korhonen 2010).



Şekil 1.3. Antibiyotiklere Dirençli Bakterilerin Hayvanlardan İnsanlara Geçiş Aşamaları.

1.7. Antibiyotiklere Karşı Gelişen Dirençlilik Mekanizmaları

Mikroorganizmalarda antibiyotiklere karşı dirençlilik gelişmesinde hastane ve toplum kökenli etmenlerin yanında hayvansal üretimde birçok amaçla antimikrobiyal madde ve antibiyotiklerin kullanılmasıyla gıdalardan kaynaklanan antibiyotik kalıntıları büyük rol oynamaktadır (Öztürk 2002). Bir antimikrobiyal maddeye karşı dirençli hale gelen bir mikroorganizma türünde bu kemoterapötik maddeye yapı veya etki bakımından yakın diğer antimikrobiyallere karşı da direnç gelişebilmektedir. Bu duruma çapraz direnç (cross resistance) adı verilmektedir. Mikroorganizmanın yapısı ve etkisi farklı birçok antibiyotiğe karşı dirençli hale gelmesi durumuna ise birçok ilaca dirençlilik (multiple-drug resistance) olarak tanımlanmaktadır. Mikroorganizmaların antimikrobiyallere karşı gösterdiği direnç doğal (intrinsik) ve kazanılmış (genotipik, kalıtsal) olmak üzere 2 grupta incelenebilmektedir (Vahaboğlu 1993, Öztürk 2002).

1.7.1. Doğal (İntrinsik) Direnç

Mikroorganizmanın yapısı nedeniyle dirençli oluşu anlamına gelir. Kalıtsal bir direnç değildir. Genellikle antimikrobiyal maddenin bağlanarak etkili olduğu hedef molekülün olmaması doğal direnci oluşturur. Bir antimikrobiyal maddeye doğal dirençli olan türün hiç bir kökeni o antibiyotikten etkilenmemektedir. Birçok gram (-) negatif bakteri vankomisine ve metisiline, enterokoklar sefalosporinlere duvar yapıları nedeniyle intrinsik direnç göstermektedir. Aminoglikozitlerin hücre membranından geçişi oksijen bağımlı, enerji gerektiren bir olay olduğundan oksidatif fosforilasyonun olmadığı zorunlu anaerobik bakterilerde yeterli antimikrobiyal madde hücre içine giremediğinden anaerobikler üzerine aminoglikozitlerin etki göstermediği belirtilmektedir (Öztürk 2002).

Genellikle ilaçların etkili olması için mikroorganizmanın aktif üreme döneminde olması gerekmektedir. Bakteri sporları veya dominant haldeki mikobakteriler gibi metabolik olarak inaktif mikroorganizmalar ilaçlara fenotipik olarak dirençli görülebilir, ama bunlardan oluşan yeni kökenler ilaçlara duyarlıdır. Buna benzer şekilde bakterilerin hücre duvarsız L şekilleri, hücre duvarı sentezini etkileyen antibiyotiklerden etkilenmemektedirler. L şekilleri temel şekle dönüşüp

hücre duvarlarını yeniden kazanınca antibiyotiklere duyarlı hale gelmektedirler (Öztürk 2002).

1.7.2. Kazanılmış (Genotipik, Kalıtsal) Direnç

Sonradan kazanılan bir direnç tipidir. Bu tip dirençlilikte bakteri popülasyonu antimikrobiyal madde ile ilk temasa geldiğinde ilaç mikroorganizma üzerine etkilidir, ancak temas süresinde veya tekrarlanan tedaviler sırasında mikroorganizma popülasyonunda antibiyotiklere karşı direnç gelişmektedir. Antimikrobiyellere karşı gelişen direnç esas olarak bu yolla gerçekleşmekte ve genetik değişim sonunda seleksiyonla dirençli kökenler ortaya çıkıp yayılmaktadır. Genetik direnç kromozom, plazmid, transpozonların kontrolü altında şekillenmektedir. Mikroorganizmalar, direnç mekanizmalarından birini ve/veya birkaçını birlikte kullanarak antibiyotiklere karşı direnç kazanmaktadır (Boogaard ve Stobberingh 1999). Çizelge 1.12'de kazanılmış direnç mekanizmaları gösterilmektedir (Öztürk 2002).

Çizelge 1.12. Kazanılmış Direnç Mekanizmaları.

Gruplar	Mekanizma
1	İlacın hedefinde değişiklik olması Penisilin bağlayan proteinlerin değişimi (β-laktamlara karşlı direnç) Ribozomal hedefin değişimi (aminoglikozit, makrolitlere karşı direnç) Değişmiş enzimatik hedef (sülfonamid, trimethoprim, rifampin, kuinolon)
2	Sentezlenen enzimle ilacın inaktive veya modifiye edilmesi, β-laktamaz Aminoglikozid modifiye eden enzimler (asetilaz, adenilaz, fosforilaz) Kloramfenikol asetil transferaz
3	Hücreye giren veya biriken ilaç miktarının azalması a. Geçirgenliğin (permeabilite) azalması b. Antibiyotiğin alım ve transport sisteminin zayıflığı veya yokluğu c. Aktif pompalama ile ilacın dışarı atılması (Efflux)
4	Antimikrobiyal maddenin etkisinin sonuçlarını önlemek İlaç hedefi veya yardımcı substratların aşırı oluşumu (sülfonamit, trimethoprim)
5	Tolerans (bakteriyositik etki gösterebilen dozun inhibe edici dozdan normale göre çok yüksek olması)

Kromozomal direnç, mikroorganizmaların kromozomlarında kendiliğinden bir mutasyon sonucu oluşmaktadır. Her hücre bölünmesinde mutasyon sıklığı 10^{-5} ile 10^{-10} düzeylerindedir.Ancak bazı antibiyotikler için bu oran (örn., rifampisin için 10^{-5} ile10^{-7}) daha yüksektir. Kromozomal mutasyonla kazanılan direnç tek aşamalı veya çok aşamalı mutasyon olmak üzere 2 şekilde gerçekleşmektedir (Vahaboğlu 1993).

Tek aşamalı mutasyondamikroorganizmaların antibiyotik ile bir veya birkaç etkileşimi sonucunda hızlı derecede direnç (örn., streptomisin direnci) gelişmektedir. Rifampisine karşı *E. coli* ve *S. aureus*'da bu tipte bir direnç gelişimi örnek olarak gösterilebilmektedir. Mutasyon, bu mikroorganizmalarda sefalosporinlerin yıkımlanmasını sağlayan β-laktamaz enzimi üretiminde artışa neden olmaktadır (Öztürk 2002).

Çok aşamalı mutasyon direnç derecesi artarak devam eden şekilde (örn., penisilin tipi direnç) gelişen direnç tipidir. Penisilin ve tetrasikline direnç gelişimi bu şekilde gelişmektedir. Mutasyonla porin üretimi bozulması sonucunda bakterinin ilaca geçirgenliği azalabilir, ilacın bağlandığı hedef değişebilir (örn., rifampisin direnci mutant hücrede bu ilaca duyarsız bir RNA polimeraz oluşumuna, kinolon direnci bu ilaca duyarsız yeni bir DNA gyrase sentezine, stafilokoklarda metisilin direnci mutant bir kromozal gen olan *mecA* geninin PBP 2 yerine penisilinlere duyarsız PBP 2a oluşumuna neden olması) veya bakteriyi parçalayan bir enzim (örn., kromozomal β-laktamazlar) sentezlenebilmektedir. Kromozomal mutasyonla gelişen direnç başka türden bakterilere yayılmadığından ve mutasyona uğrayan bakterinin metabolizması da değişebilip üremesi kısıtlanabileceğinden dolayı plazmidle oluşan dirence göre karşılaştırıldığında daha seyrek görülmektedir. Kromozomal mutasyonla gelişip klinik öneme sahip direnç örnekleri rifampisin, izoniazid ve kuinolon direnci ile stafilokoklarda metisilin direnci olarak gösterilebilmektedir (Boogaard ve Stobberingh 1999, Öztürk 2002).

1.7.3. Genetik (Kromozomal) Direnç Mekanizmaları

Genetik direnç mekanizmaları, mikroorganizmaların genetik yapılarında meydana gelen değişiklikler sonucunda kalıcı olarak ortaya çıkan direnci oluşturmaktadır. Bu oluşum plazmid, transpozon ve tolerans olmak üzere 3 grupta değerlendirilebilmektedir (Boogaard ve Stobberingh 1999, Öztürk 2002).

Plazmidler, kromozomdan bağımsız olarak çoğalan, kromozom dışı genetik elementlerdir. Plazmidler antimikrobiyallere ve ağır maddelere direnç genleri yanında değişik virülans faktörlerini de taşıyabilirler. Klinikte görülen direncin ana sorumlusu plazmide bağlı dirençtir. R-plazmidi adı verilen direnç plazmidleri bir veya daha çok sayıda antibiyotiğe karşı direnç genlerini taşımaktadır. Direnç

plazmidleri diğer duyarlı bakterilere *transdüksiyon* (direnç plazmidleri bakteriyofajlarla birleşir ve bakteriyofajlar bu direnç genlerini taşıyarak diğer bakterilere aktarır, örn., β-laktamaz geninin hassas *Staphylococcus*'lara aktarımı), *transformasyon* (diğer bakterilerin lizisiyle ortamda bulunan plazmid veya DNA kalıntıları duyarlı başka bakteriler tarafından alınması) ve *konjugasyon* (temasla oluşan sitoplazma köprüsü aracılığı ile R-plazmidleri dirençli bakteriden duyarlıya geçişi) mekanizmalarıyla geçerek direnç gen materyallerini aktarmakta ve böylece direncin yayılmasına neden olmaktadır.

Plazmidlere bağlı direnç genellikle antibiyotiği inaktive eden veya bakterinin geçirgenliğini değiştiren enzimler ile oluşmaktadır. Vücuttaki normal mikrofloranın plazmid transferine karşı bir koruma sağladığı belirtilmektedir. Bağırsak mikroflorasının çoğunluğunu anaerobik organizmaların oluşturduğu ve anaerob koşullarda plazmid transferinin inhibe edildiği, bu nedenle normal sağlıklı bağırsak florasının R-plazmidlerine karşı en iyi savunma mekanizması olduğu düşünülmektedir. Aminoglikozitler, sefalosporinler, kloramfenikol, makrolitler, penisilinler, sülfanomitler, nitrofurantoin ve fusidik aside karşı gelişen dirençten genellikle plazmidlerin sorumlu tutulduğu belirtilmektedir (Vahaboğlu 1993).

Transpozonlar bir DNA molekülünden diğerine (kromozomdan plazmide, plazmidden kromozoma) geçebilen DNA dizileridir. Plazmidden farklı olarak bağımsız şekilde replike olamamaktadır. Ampisilin, kloramfenikol, kanamisin, tetrasiklinler ve trimethoprime karşı direç gelişiminden sorumludurlar. İntegronlar, hücre içinde bazı transpozon veya plazmidlerde bulunan genetik yapılar olup yeni genlerin kazanılmasını sağlamaktadırlar.

Özellikle çok kısa süre içerisinde birçok ilaca dirençli fenotiplerin ortaya çıkıp yayılışında integronların rolü oldukça büyüktür. R plazmidleri ve transpozonlar sadece aynı tür bakteriler arasında değil, başka türden bakterilere de geçiş yeteneği göstermektedirler. R plazmidleri ve transpozonların etkisiyle aşağıda belirtilen değişimler sonucu direnç gelişimi gerçekleşmektedir.

- ✓ Antimikrobiyel maddeyi parçalayan enzim oluşturulması (örn., β-laktamazlar, kloramfenikol asetil transferaz, aminoglikozitleri asetilasyona, nukleotidilasyona ve fosforilasyona uğratan enzimler)
- ✓ Hücre çeperi geçirgenliğinin bozulması: Gram (-) bakterilerde lipoprotein dış tabaka nedeniyle bunlarda daha sık görülmesi vedirençli kökenlerde porusları oluşturan porin proteinlerin sentezinde bozulma
- ✓ İlacın hücreden dışarı atılması yanı pompalanması (efflux) hızlanabilir (örn., tetrasiklinlere direnç gelişimi)
- ✓ İlacın ortamdan alınışında (uptake) azalma
- ✓ İlacın hücre içindeki etki yerine bağlanmasının azalması (Öztürk 2002).

Tolerans bir antimikrobiyal maddenin veya antibiyotiğin in vitro testlerde minimal bakteriyositik konsantrasyonunun (MBK) artması sonucu MBK/MİK oranının 32'nin üstüne çıkışını ifade etmekte olup, 2-4 arasındaki değerler normal olarak kabul edilmektedir. Tolerans otolizinlerin etkinliğinin azalması sonucu olup *S. aureus* ve bazı *Streptococcus*'larda görülmektedir. Otolizinler mutasyon sonucu yitirilmekte veya lipoteikoik asit tarafından inhibe edilebilmektedir. Ancak bazı antibiyotik türevlerinin otolizinleri aktive yeteneği bulunmamaktadır. Sonuçta ilgili antibiyotikle bakterinin üremesi durduğu halde bakteri bu ilaçların öldürücü ve olumsuz etkisine karşı direnç göstermektedir (Vahaboğlu 1993, Öztürk 2002). Çizelge 1.13'te bazı antibiyotiklerin etki ve dirençlilik mekanizmaları gösterilmektedir (Guardabassi ve Courvalin 2006, Egervarn 2009).

Çizelge 1.13. Bazı Antibiyotiklerin Etki ve Dirençlilik Mekanizmaları.

Antibiyotik	Sınıf	Etki Mekanizması	Direnç Mekanizması
Ampisilin	β-laktam	Peptidoglikan sentezinin transpeptidasyon aşamasında PBP'lerin bağlanmasının engellenmesi	β-laktamaz enziminin üretimi ve PBP'lerde mutasyonun oluşması
Vankomisin	Glikopeptid	D-Ala-D-Ala peptidoglikan prekürsörlerine bağlanarak PBP'lerin etkisinin engellenmesi	D-Ala-D-Ala laktat oluşumu ile peptidglikan prekürsörlerinin sınırlandırılması
Streptomisin Amikasin Gentamisin Kanamisin	Aminoglikozid	Ribozomların 30S'lik alt birimlerine bağlanarak protein sentezinin inhibisyonu	N-Acetyltransferaz,O-Adenyltransferaz,O-Phosphotransferaz gibi aminoglikozitleri dönüştüren enzim aktivitesi
Oksitetrasiklin Tetrasiklin	Tetrasiklin	Ribozomların 30S'lik alt birimlerine bağlanarak protein sentezinin inhibisyonu	Ribozom korunma gen aktivitesi, effluks pompa aktivitesi, enzimatik inaktivasyon
Eritromisin	Makrolid	Ribozomların 50S'lik alt birimlerine bağlanarak protein sentezinin inhibisyonu	Metilasyon veya rRNA'nın 23S'lik alt biriminde mutasyon, effluks pompa aktivitesi
Kloramfenikol	Fenikol	Ribozomların 50S'lik alt birimlerine bağlanarak protein sentezinin inhibisyonu	Metilasyon veya rRNA'nın 23S'lik alt biriminde mutasyon, effluks pompa aktivitesi
Trimethoprim Sülfanomid	Trimethoprim Sülfanomid	Tetrahidrofolat dönüşümünün inhibisyonu	Hedef enzimlerde gerçekleşen mutasyonlar

1.8. *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curvatus*'un Fizyolojik Özellikleri ve Karakterizasyonu

Lactobacillus'lar metabolik ürünler ve fenotipik özellikler bakımından homofermantatif ve heterofermantatif olmak üzere 2 gruba ayrılmaktadırlar. *L. plantarum, L. sake ve L. curvatus* fakültatif heterofermantatif özellik göstermektedir (Stiles ve Holzapfel 1997, Hammes ve Vogel 2005, Hammes ve Hertel 2006, Egervarn 2009). Çizelge 1.14'de bazı *Lactobacillus* türlerinin fenotipik karakterizasyonu gösterilmektedir (Stiles ve Holzapfel 1997).

Çizelge 1.14. Bazı *Lactobacillus* Türlerinin Fenotipik Karakterizasyonu.

Oligat Homofermantatif	Fakültatif Heterofermantatif	Obligat Heterofermantatif
L. acidophilus	*L.acetolerans*	*L.brevis*
L.delbrueckii sub. bulgaricus	*L.alimentarius*	*L. buchneri*
L.delbrueckii sub. delbrueckii	*L. bifermantas*	*L.fermentum*
L.delbrueckii sub. lactis	*L.curvatus*	*L.hilgardii*
L. helveticus	*L. paracasei sub.paracasei*	*L.parabuchneri*
L. johnsonii	*L. plantarum*	*L.parakefir*
L. kefiranofaciens	*L. sake*	*L.reuteri*

L. plantarum türü, doğada yaygın halde bulunmakla birlikte yoğun olarak bitkiler ve bitkisel fermente ürünler, et ve ürünleri, süt ve ürünleri, insan ve hayvanların mukozal yüzeyleri ile gastrointestinal sistemlerinde saptanmıştır. Bunun yanında paketlenmiş veya vakumlanmış fermente et ürünlerinin de florasında yer almaktadırlar (Smith ve Despain 1957, Ammor ve ark 2007, Ammor ve ark 2008). *L. plantarum*'un morfolojik ve fizyolojik özellikleri fakültatif anaerob, tek veya kısa çubuk zincirler şeklinde üreme, hareketsiz, gram (+), glikoz, galaktoz, mannoz, früktoz, laktoz, rafinoz, salisin'den laktik asit açığa çıkarabilme (Çizelge 1.8), 10-40°C sıcaklık aralıklarında üreyebilme (optimum 30°C) ve %5.5'den daha yüksek NaCl konsantrasyonlarında gelişebilme şeklinde gösterilebilmektedir (Smith ve Despain 1957).

L. sake, ilk olarak pirinç şaraplarından izole edilmiş olup, diğer *Lactobacillus* türleri ile birlikte et ve ürünleri, süt ve ürünlerinin yanısıra bira, malt ve fermente içeceklerdebulunmaktadır (Klein ve ark 1996, Aras Hisar ve ark 2005).

L. curvatus ise *L. plantarum*'a benzer fizyolojik ve morfolojik özellik göstermesine karşın 4°C ve daha düşük sıcaklıklarda gelişebilme, melibiyoz ve maltozu fermente edebilme, DNA'larında var olan G+C oranı gibi farklılıklarla birbirlerinden ayrılmaktadır (Stiles ve Holzapfel 1997).

1.8.1. *Lactobacillus* Cinsi Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliği

Yaklaşık 2000'li yılların başına kadar *Lactobacillus* cinsi bakterilerin antibiyotik dirençlilikleriyle ilgili yapılan sistematik araştırma sayısı ve konu ile elde edilen sonuçlar oldukça azdır. 2000'li yıllardan sonra araştırmalar, çevresel kaynaklardan elde edilen dirençlilik genleri ve materyallerin plazmidler, transpozonlar gibi farklı genetik materyal ve mekanizmalar ile aktarılabildiği ve dirençli fenotiplerin ortaya çıktığı yönünde birçok bulguyu ortaya koymuştur. Teuber ve ark (1999) *Lactobacillus* cinsi bakterilerin çevresel kaynaklarda var olan antibiyotik genlerinin besinlere ve hatta insanların bağırsak florasında yer alan bakterilere geçiş gösterebildiğini belirtmektedir.

Lactobacillus cinsi bakterilerin sahip oldukları biyokimyasal nitelikler (örn., metabolit ürünleri) sonucunda fermente et ürünlerinde başta *E. coli, S. aureus* gibi mikroorganizmalar başta olmak üzere antibiyotiklere karşı dirençli bakterilerde dahil olmak üzere birçok patojene karşı inhibe edici aktivite göstererek antogonistik etki göstermektedir. Ancak fermantasyon sürecinde veya gastrointestinal sistem içerisinde bakteriler arasında gerçekleşen etkileşimler sonucunda *Lactobacillus*'ların hücre duvarlarını antibiyotik dirençli patojenlere karşı bir hedef haline getirmektedir (Korhonen 2010, Maxton ve ark 2013).

Hayvan yetiştiriciliğinde ve beşeri hekimlikte yoğun olarak antibiyotik kullanımı çevresel kaynaklarda veya besinlerde bulunan mikroorganizmaları dirençli genlere maruz bırakabilmektedir. Bu durum da dirençli fenotiplerin gen seçiciliği üzerinde bir baskı yaratmaktadır (Teuber ve ark 1999). Son zamanlarda birçok araştırmacı rezervuar kaynaklı bakterilere benzer nitelikte insanlar için patojen olan gıda kaynaklı bakterilerin dirençlilik profillerinin benzerlik taşıdıkları sonucuna ulaşmıştır (Perreten ve ark 1997, Salyers ve ark 2004, Wang ve ark 2006). Bu bağlamda, rezevuar bakterilerin gıdalarda bulunabilecek patojen ve diğer bakterilere

dirençli genleri farklı mekanizmalar vasıtasıyla transferettiği yönünde bulgular elde edilmiştir (Toomey ve ark 2010).

Özellikle fermente sucuk gibi ısıl işlem uygulanmayan fermente et ürünleri, antibiyotik dirençliliği açısından insan gastrointestinal sistem mikroflorasını direkt olarak bağlayıcı bir rol üstlenmekte ve bu durumda direnç fenotiplerinin ortaya çıkmasında ve yaygınlaşması konusunda en önemli faktörü oluşturmaktadır (Teuber ve ark 1999). Son yıllarda yapılan araştırmalar (Threllfal ve ark 2000, White ve ark 2002, Wang ve ark 2006, Walsh ve ark 2008, Toomey ve ark 2010) insan gastrointestinal sistem mikroflorasında bulunan patojen bakterilerin sahip oldukları genetik antibiyotik dirençliliği özelliklerinin, çevrede rezervuar bakteri türlerindeki özellikler ve nitelikler ile benzerliklerin ve ilişkilerin ortaya çıkarılması neticesinde rezervuar bakteriler ile insan ve hayvan mikrofloralarında yer alan patojen bakteriler arasında antibiyotik dirençli gen transferlerinin gerçekleşebileceğini ortaya çıkarmaktadır.

1.9. *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Enterococcus faecium*

Hammadde kalitesinin düşük olması, üretim sürecinin uzunluğu, üretimin hijyenik şartlarda gerçekleştirilememesi ve standardizasyon eksiklikleri gibi etkenler sucukları patojen (örn., *S. aureus*, *E. coli* ve *Salmonella* ssp.) ve saprofit mikroorganizmaların neden olabileceği mikrobiyolojik risklere açık bir ürün haline getirmektedir (Öztan 2003, Gökalp ve ark 2004,). Ancak sucukların üretim sürecinde uygulanan bazı işlemler (örn., fermantasyon, ısıl işlem) patojen ve saprofit mikroorganizma varlığını baskılamak veya minimum düzeye indirmek amacıyla uygulanmaktadır.

1.9.1. *Staphylococcus aureus*'un Taksonomisi, Morfolojik Özelikleri ve Patojenitesi

Staphylococcus'lar ilk olarak 1880'li yıllarda Alexander Ongston tarafından insan kaynaklı apselerden izole edilmiş ve üzüm salkımı anlamına gelen "*staphyle"* kelimesi ile yuvarlak tane anlamına gelen *"coccus"* kelimelerinin birleştirilmesinden ortaya çıktığı bildirilmektedir (Evans 1957). Daha sonraki yıllarda Rosenbach tarafından beyaz renkli koloniler *Staphylococcus pyogenes aureus, Staphylococcus pyogenes albus, Staphylococcus pyogenes citreus* olarak 3 tür izole edildiği

belirtilmektedir (Evans 1957, Kloos ve Bennerman 1995, Cengiz 1999, Boone ve Castenholz 2001). Biyomoleküler teknolojideki gelişmeler ışığında, immunokimyasal ve biyokimyasal özellikler temel alınarak *Staphylococcus* cinsi içerisinde 22 tür tanımlanmıştır (Boone ve Castenholz 2001, Wang ve ark 2003, Çakır 2007).

Staphylococcus aureus, Firmicutes şubesi, *Bacilli* sınıfı, *Bacillates* takımı, *Staphylococcaceae* familyası, *Staphylococcus* cinsi içerisinde yer alan bir mikroorganizma türüdür. Daha sonraki yıllarda koagülaz reaksiyonlarına göre üç tür olarak (*S. aureus, S. epidermidis, S. saprophyticus*) tanımlamıştır.

S. aureus, gram (+), aerobik veya fakültatif anaerobik, optimum üreme sıcaklığı 37°C olan ve 10-45°C'ler arasında gelişme özelliği gösterebilen, 0.5-1.5 µm çapında yuvarlak-düzgün koloni şekli ve/veya ikili, dörtlü kok olarak kısa zincir oluşturabilen ve genellikle üzüm salkımı şeklinde düzensiz kümeler halinde görülen, hareketsiz ve sporsuz, mikrokapsül ve toksin oluşturma yeteneklerine sahip, %10'luk NaCl konsantrasyonlarına tolerant özellik gösterebilen birmikroorganizma olarak bilinmektedir (Bannerman 2003, Evans 1957). Ayrıca koagulaz, mannitolve diğer karbonhidratlardan trehaloz, mannoz, maltoz, sükroz ve laktozu parçalarlarken, ksiloz, sellobioz, arabinoz ve rafinozu parçalayamamaktadır. Nitratı nitrite indirgeme yetenekleri bulunmaktadır (Cengiz 1999, Waldvogel 2000). Çizelge 1.15'te *S. aureus*'un biyokimyasal özellikleri gösterilmiştir (Hensyl 2000b, Duman 2007).

Çizelge 1.15. *Staphylococcus aureus*'un Biyokimyasal Özellikleri.

Özellikler	Koagulaz (+) *S. aureus*	Koagulaz (-) *S. aureus*
Pigment	(+), z	(-)
Aerobik üreme	(+)	(+)
Fakültatif anaerobik üreme	(+)	(+)
%10 NaCl'de üreme	(+)	z
%15 NaCl'de üreme	z	d
Acetoin sentezi	(+)	(+)
Sükroz	(+)	(+)
Maltoz	(+)	(+)
D-Mannitol	(+)	d
D-Mannoz	(+)	(+)
α- toksin	(+)	(-)
Hiyolüronidaz	(+)	(+)
Koagulaz	(+)	(-)
Üreaz	(+), z	(+)
Hemoliz	(+)	(-), z
DNase	(+)	(-), z
Novobiocin direnci	(-)	(-)
Isıya dirençli nükleaz	(+)	(-), z

+: %90'dan fazla pozitif **-:** %90'dan fazla negatifz: zayıf gelişme d: değişken

Doğada *S. aureus*, insan ve hayvanların normal florasında yaygın bulunan bir mikroorganizmadır. Genellikle hayvanların ve insanların deri, kıl, nazal boşlukları ve mukozada yer almaktadır. *S. aureus*, sepsis, toksik şok sendromu, endokarditis, tromboflebit, solunum sistemi enfeksiyonları, pnömoni, menenjit, idrar yolu enfeksiyonları başta olmak üzere birçok enfeksiyonun etkenini teşkil etmektedir (Bayrakal ve ark 2007, Todar 2013).

Staphylococcus cinsi bakteriler içerisinde *S. aureus*'un patojenitesinin diğer türlere oranla daha yüksek olduğu belirtilmektedir. *S. aureus*'un patojenitesini etkileyen faktörler arasında hücre duvarı yapıları, kapsül, toksin ve enzimleri yer almaktadır. Patojenitenin de belirleyici unsuru, *S. aureus*'un konak hücrenin savunma sistemi ile girdiği etkileşimdir (Tünger 2004).

1.9.2. *Staphylococcus aureus*'un β-Laktam Grubu Antibiyotiklere Karşı Dirençlilik Mekanizması

β-laktam grubu antibiyotiklere karşı *S. aureus*'un direnç göstermesi 1930'lu yılların başında sülfanomid grubu antibiyotiklere karşı başladığı ve ardından günümüzdeki linezolid ve daptomisin gibi yeni türevlere kadar yayıldığı belirtilmektedir (Fuller ve ark 2005). Penisilinler, 1940'lı yıllarda yaygın bir şekilde *Staphylococcus*'lardan kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde kullanılmış olup, yaygın kullanım sonucunda kısa sürede penisiline dirençli suşların ve olguların ortaya çıktığı bildirilmektedir. 1944 yılında *S.aureus*'un penisilinaz olarak adlandırılan ve penisilinin β-laktam halkasını hidrolizasyonunu gerçekleştirdikten sonra penisilonik asidin ortaya çıkmasını sağlayan ve dolayısıyla penisilinleri inaktive eden bir enzimi üretebildiği bulunmuştur (Fuda ve ark 2005, Fuller ve ark 2005).

Geçen süreç içerisinde *Staphylococcus*'ların eritromisin, tetrasiklin, streptomisin gibi türevlere karşı da direnç gelişimi gösterdikleri belirtilmektedir (Çetinkaya ve Ünal 1996, Fuller ve ark 2005). 1960'lı yıllarda penisiline dirençli suşların ortaya çıkışını takiben yeni türevlerin ortaya çıkmasında rol oynamış, bu süreçte *Staphylococcus*'lardan kaynaklanan enfeksiyonların tedavisinde β-laktam grubu antibiyotiklerden yarı sentetik yapıda olan metisilin yaygın bir şekilde kullanılmıştır. 1961'de metisilinin penisilinin yerine kullanımının ardından kısa sürede dirençli *S. aureus*'lar ortaya çıktığı ve dünya genelinde hızla yayıldığı belirtilmektedir. β-laktam grubu antibiyotiklere karşı dirençli *S. aureus*'ların ve Metisilin Resistant *S. aureus* (MRSA)'un 1970'li yıllardan itibaren Avrupa ülkeleri, 1980'li yıllardan sonra ABD başta olmak üzere dünyanın birçok ülkesinde sağlık problemlerine yol açtığı bildirilmektedir (Fuda ve ark 2005). Bununla birlikte β-laktam grubu antibiyotiklerin beşeri ve veteriner hekimlikte kullanımının yaygınlaşması ve kullanım miktarlarının artışı, *S. aureus'*un antibiyotiklere karşı dirençliliğinde diğer bir önemli faktörü oluşturmaktadır.

β-laktamaz enzimiyle hidrolize olmayan β-laktam antibiyotiklere (metisilin, oksasilin, nafsilin, kloksasilin, dikloksasilin) karşı olan direnç metisilin direnci olarak adlandırılmaktadır (Chambers 1988, Mulligan ve ark 1993, Chambers 1997, Maranan ve ark 1997, Sancak 2007). Metisiline duyarlı *S. aureus* (MSSA)'larda beş

adet penisilin bağlayan protein (PBP) bulunurken, MRSA'larda bunlara ek olarak PBP2 ve/veya PBP2a olarak adlandırılan 78 kDa ağırlıkta olan farklı bir PBP sentezlenmektedir (Deurenberg ve ark 2007). PBP2a, diğer PBP'lerden farklı olarak β-laktam yapısındaki antibiyotiklere karşı düşük afinite göstermektedir. Dolayısıyla, β-laktam grubu antibiyotik varlığında, yüksek afiniteli PBP'lerin fonksiyonunu yerine getirerek peptidoglikan sentezini sürdürebilme yeteneğine sahip olan tek transpeptidazdır (Chambers 1997).

β-laktam grubu antibiyotikler, normalde hücre duvarında yer alan PBP'lere bağlanarak peptidoglikan sentezini inhibe etmektedir. MRSA'larda ise bu antibiyotikler PBP2a'ya bağlanamamakta ve bunun sonucunda hücre duvarında peptidoglikan sentezi devam etmektedir. PBP2a'yı kodlayan gen, 2.1 kb büyüklüğünde olan ve *mecA* olarak adlandırılan bir gendir (Sancak 2007, Deurenberg ve ark 2007). Tüm MRSA'lar bu gene sahipken metisiline duyarlı olan suşlarda *mecA* geni bulunmamaktadır. *mecA* geni, bakteri kromozomunda "*Staphylococcal Casette Chromozome*" (*SCCmec*) kaseti üzerinde yer almaktadır. *SCCmec* kasetinin büyüklükleri 20 kb'dan 68 kb'a kadar değişkenlik gösteren 5 alt tipi (Tip I-V) bulunmaktadır. Tip I, IV ve V, sadece yapısal ve regülatuar genler ile rekombinaz genlerine sahiptir. Bu alt tiplerde, transpozon elemanları ve β-laktam grubu dışındaki antibiyotiklere dirençten sorumlu olan genler bulunmamaktadır. Hastane kökenli MRSA'lar *SCCmec* alt tip I-III'ü içerirken, toplum kaynaklı MRSA'lar *SCCmec* alt tip IV ve V'i içermektedir (Chambers 1997, Katayama ve ark 2000, Hiramatsu ve ark 2001, Deurenberg ve ark 2007).

PBP2 veya PBP2a'nın sentezine yönelik genetik bilginin *S.aureus*'ların kromozomlarında bulunan *mecA* geninde bulunduğu ve bakteriler arası transfer olmadığı belirtilmektedir (Chambers 1988, Derbentli 1996, Chambers 1997). *mecA* geninin ekspreksiyonuna bağlı olarak *S. aureus*'larda görülen metisilin dirençliliği homojen ve heterojen direnç olmak üzere iki şekilde ortaya çıkmaktadır. Homojen direnç bir bakteri popülasyonundaki tüm *S. aureus*'ların *mecA* geni taşımaları ile ortaya çıkarak şekillenmektedir. Bu tür dirençlilikte çevre koşullarının rolü oldukça düşük olmakla birlikte, daha çok genetik materyal aktarımlarıyla ilgili gelişmektedir. *S. aureus*'larda homojen dirençlilik yaygın olarak görülmemektedir.

Heterojen tip direnç ise, popülasyondaki bakterilerin tümünün *mecA* geni taşımalarına karşın, direnç durumu sadece 10^4-10^8 düzeyindeki sayının içerisinden birkaçında görülmektedir (Karabiber ve Karahan 1995). Bununla birlikte *S. aureus*'larda intrinsik olarak ortaya çıkan metisiline karşı gelişen dirence ilave olarak iki farklı mekanizma da ortaya çıkarılmıştır. Bu direnç tiplerinden ilki, aşırı β-laktamaz üretimi nedeniyle meydana gelen direnç (Borderline Resistant *S. aureus*-BORSA), ikincisi ise β-laktam grubu antibiyotiklere ilgisi azalmış olan modifiye PBP'lerin üretimi ile gerçekleşen direnç tipi (Modified Penicillin Binding Protein *S. aureus*-MODSA) olarak şekillendiği bildirilmektedir (Karabiber ve Karahan 1995). Her iki mekanizma da düşük düzeyde bir metisilin direnci ortaya çıkarmakta ve tedavi edilebilirliği diğer direnç tiplerine göre daha kolay şekilde sağlanabilmektedir (Karabiber ve Karahan 1995).

Metisiline karşı direnci ortaya çıkaran *mecA* geni, *mecR1* ve *mecI* olmak üzere 2 düzenleyici görevi gören gen tarafından kontrol edilmektedir. *mecR1* ve *mecI* genleri β-laktamaz geninin düzenleyicisi olan *blaR1* ve *blaI* genleri ile yapı, fonksiyon ve düzenleme mekanizması açısından benzerlik göstermektedir (Mulligan ve ark 1993, Kuwahara-Arai ve ark 1996, Chambers 1997). *Bla*I proteini, *blaI* geni tarafından kodlanmakta ve β-laktamaz enziminin transkripsiyonunu inhibe etmektedir. *Bla*R1 ise *blaR1* geni tarafından kodlanmakta ve β-laktamaz enzimi varlığında β-laktamaz gen transkripsiyonuna neden olmaktadır. *mecR1* ve *mecI* genleri, *mecA* için aynı düzenleyici rolü üstlenmektedir. Mekanizma olarak *mecI*, *mecA*'yı baskılayan bir protein, *mecR1* ise sinyal uyarıcı bir proteini kodlamaktadır (Kuwahara-Arai ve ark 1996, Kobayashi ve ark 1998, Sancak 2007).

Direnç fenotipini etkileyen bir diğer faktör ise β-laktamaz plazmidi olarak belirtilmektedir. β-laktamaz geninin üretimi, *blaZ* adı verilen bir gen tarafından kodlanmakta ve antirepresör olan *blaR1* ve represör olan B*laI* tarafından kontrol edilmektedir. Transmembran proteini olan *Bla*R1, β-laktam varlığında ona bağlanarak ve hücre dışından hücre içine sinyal iletimini sağlayarak β-laktamaz enziminin üretilmesinin başlamasına yol açmaktadır (Maranan ve ark 1997, Fuda ve ark 2005, Sancak 2007). MRSA'ların çoğunluğunda β-laktamaz genini taşıyan plazmid bulunması ve *mecR1* ve *mecI* sisteminin defektif olması nedeniyle *mecA* geninin esas olarak *bla* sistemi ile indüklendiği ortaya koyulmaktadır. Ancak β-laktamaz genlerini taşıyan plazmid, alıcı bakteriye verildiğinde PBP2a yapımı

konstütatif halden indüklenebilen hale gelebilmekte, PBP2a miktarı veya indüklenebilir olma durumu ile direnç gelişim profili arasında bir ilişki gerçekleşmemektedir. Bu durum PBP2a'nın konstütatif olabileceğini fakat bakterinin heterojen direnç gösterebileceğini işaret etmekte, böylece *S. aureus*'ların metisilin direnç fenotipinde başka faktörlerinde yer alabileceği sonucunu ortaya çıkarmaktadır (Chambers 1997, Fuda ve ark 2005, Sancak 2007).

MRSA suşlarında PBP2a miktarının konstütatif veya indüklenebilir olma durumunun metisilin direncinde homojen ve heterojen direnç arasındaki ilişkinin gösterilememesi "*factors essential for the expression of metisilline resistance*" (FEM) olarak tanımlanan faktörlerin (örn., ortamın NaCl konsatrasyonu ve sıcaklığı) ortaya çıkarılmasına ışık tutmuştur. Transpozonlar kullanılarak inaktivasyon yoluyla metisiline dirençli *S. aureus* suşlarından duyarlı suşlar elde edilmesi, *mec* dışındaki genlerin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. FEM faktörleri, *mecA* geninden farklı olarak hem duyarlı hem de dirençli *S. aureus* suşlarında bulunmaktadır (Henze ve ark 1993, Sancak 2007). Yapılan çalışmalar FEM faktörlerinin hücre otolizisindeki değişikliklerle ilişki içerisinde olduğunu ortaya koymaktadır. *S. aureus*'ların üreme ortamlarına %4 NaCl ilave edilmesinin, PBP2a miktarında artışa neden olmadığı fakat direncin eksprese edilmesini artırdığı, benzer şekilde 30°C'lik inkübasyon sıcaklığının otolizi inhibe ettiği, tüm *S. aureus* suşlarında PBP2a varlığına rağmen direnci oluşmasına yol açtığı vurgulanmaktadır (Fuda ve ark 2005, Sancak 2007).

1.9.3. *Escherichia coli*'nin Taksonomisi, Morfolojik Özelikleri ve Patojenitesi

E. coli, ilk kez Theodor Escherich tarafından 1885 yılında yeni doğan bebeklerin dışkılarından izole edilmiş ve "*Bacterium coli commune*" adı verilmiştir. Daha sonraki yıllarda taksonomik çalışmalar neticesinde 1919 yılında Castellani ve Chalmer tarafından Escherich'in adı verilerek "*Escherichia coli*" olarak tanımlanmıştır. *E. coli, Bacteria* alemi, *Enterobacteriales* takımı, *Enterobactericaea* familyası içerisinde yer alan *Escherichiaceae* cinsi bakteri grubu içerisinde yer alan bir bakteri türüdür (Smith ve Despain 1957, Töreci 2002, Bilgin 2006). *Escherichiacea* cinsi içerisinde bulunan *E. coli*'nin en önemli türlerden biri olduğu, ekosistem içinde toprakta, sularda, hayvan ve insanların gastrointestinal kanalında doğal olarak bulunduğu belirtilmiştir (İzgür 2006, Şenman 2010).

E. coli'nin morfolojik özellikleri 0.5-3.0 µm boyutlarında, genelde çubuk formunda, tek, çift veya kısa zincirler oluşturan, peritrik flagellaya sahip ancak hareket özelliği değişken olan, genellikle kapsülsüz, spor özelliği olmayan, gram boyama neticesinde negatif özellik gösterdiği belirtilmektedir. Sıvı besiyerlerinde bulanıklık oluşturan, katı besiyerlerinde ise düzgün kenarlı, ortası kalkık, 1-3 mm çapında pigmentsiz koloniler oluşturmaktadır (Smith ve Despain 1957). *E. coli*'nin fizyolojik özellikleri arasında fakültatif anaerobik özellikte, 8-45°C'lik sıcaklık aralıklarında üreyebilen ve en uygun üreme sıcaklığının 37°C olduğu, pH 5.0-8.0 aralıklarında yavaş ancak en uygun nötr ortamda üreme gösterdiği belirtilmektedir (Smith ve Despain 1957). Ayrıca biyokimyasal özellikleri glikozdan asit ve gaz oluşturması, laktoz, D-mannitol, D-sorbitol, L-arabinoz, L-ramnoz, maltoz, D-ksiloz, trehaloz ve D-mannozu fermente etmesine karşın adonitol, inositol, sellobioz, eritrol, D-arabitolü fermente etmemesi, nitratı nitrite indirgemesi, katalaz, metil red, lizin dekarboksilaz, ONPG deneylerinin pozitif olmasına rağmen, oksidaz, Voges Proskauer, fenilalanin deaminaz, lipaz, 25°C'de DNase deneylerinin negatif olması, indol oluşturması, H_2S, üreaz oluşturmaması, tek karbon kaynağı olarak sitratta üretememesi ve jelatini hidrolize etmemesi olarak gösterilebilmektedir (Erdem 1999, Bilgin 2006, Winn ve ark 2006). *E. coli*'nin hareketsiz, laktozu fermente etmeyen, glikozdan gaz oluşturmayan suşları inaktif suşlar olarak kabul edilmekte ve bu suşlar birçok özellikleri ile *Shigella* cinsine daha yakın şekilde tanımlanmaktadırlar (Erdem 1999, Töreci 2002). *E. coli*'nin çevresel faktörlere duyarlılık düzeyi diğer gram negatif bakterilerin özelliklerine benzerlik göstermektedir. *E. coli* suşlarının çoğunluğu 60°C'de 30 dakika, 70°C'de 2 dakikada inaktive olduğu belirtilmektedir (Himathongham ve ark 2000).

Kaufmann tarafından 1944 yılında yapılan serotiplendirme sonucunda bakteri yüzey antijenlerine (O), flagella (H) ve kapsül (K) antijenlerinin varlığı belirlenmiştir (Lior 1996, Nataro ve Kaper 1998, Clarke ve ark 2003). Bir serotip genetik anlamda homojen olmasa da genelde belli serotiplerin hastalık etkileri aynı olduğu için halk sağlığı ve tıbbi mikrobiyoloji açısından pratik bir sınıflandırma yöntemi olarak kullanılmaktadırlar. Diyareye yol açan *E. coli* suşları virülans özellikleri, patojenite mekanizmaları, ürettikleri toksin tipleri, neden oldukları klinik semptomlar, epidemiyolojik farklılıklarına göre sınıflandırılmaktadır. Ayrıca O:H antijenlerine

göre enteropatojenik, enterotoksijenik, enteroinvaziv, enteroagregatif ve enterohemorajik olarak klasifiye edilmektedir (Clarke ve ark 2002, Arslan 2008).

E. coli'nin patojenitesini oluşturan temel unsurlar olarak fimbriumlar, eksotoksinler, kapsül, hemolizin, sideroforlar, K1 antijeni, endotoksinler gösterilebilmektedir. *E. coli*'nin patojenitesi üzerinde rol oynayan faktörler hücre yüzeyinde ve hücre içerisinde oluşturulan olmak üzere iki şekilde gösterilebilmektedir. Bununla birlikte hücre yüzeyinde yer alan faktörler, *E. coli*'nin konak hücrelere tutunmasında rol oynamakla birlikte doku invazyonu, biyofilm oluşumu veya sitokin indüksiyonu gibi farklı işlevleri de yerine getiren faklı fimbria şekillerini içermektedir. Hücre içersinde yer alan faktörler ise, Fe^{++}'in sınırlı olduğu ortamlarda *E. coli*'nin biyolojik faaliyetlerine ve üremelerine devam etmesine yardımcı olmaktadırlar (Erdem 1999, Emody ve ark 2003, Murray ve ark 2005, Kim ve ark 2006, Taşdemir 2009).

1.9.4. *Escherichia coli*'nin Tetrasikline Karşı Dirençlilik Mekanizması

Tetrasiklinler, hücre içerisine geçiş yaptıktan sonra ve ribozomların 30S alt birimlerine bağlanarak protein sentezinin bozulması sonucunda etkilerini göstermektedirler. Protein sentezinin inhibisyonu aminoasitlerin tRNA'ya bağlanmasını engelleme, mRNA'nın ribozomlara bağlanmasını veya aminoasil-tRNA bileşiğinin ribozom mRNA kompleksine bağlanmasını inhibe etme, peptidil transferaz etkinliğini azaltarak peptid bağları oluşumunu engelleme ve mRNA üzerindeki kodonların tRNA'lar tarafından yanlış okunmasına neden olma etkilerine neden olmaktadırlar. Bununla birlikte tetrasiklinlerin en yaygın etki mekanizması aminoacyl-tRNA'nın ribozomların 30S'lik alt birimlere bağlanmasını engelleyerek protein sentezinin durdurulması olduğu belirtilmektedir (Suzuki 2010). Temelde ribozomal korunma mekanizması, bakteri ribozomlarında protein sentezinin inhibisyonu ile gerçekleşmektedir (Öztürk 2002). Mikroorganizmalarda tetrasiklin dirençliği*tet* genleri tarafından kodlanmaktadır. Yaklaşık 40'dan fazla *tet* geni tetrasiklin dirençliliğin oluşumunda görev almaktadır. Çizelge1.16'da tetrasiklin (*tet*) direnç genleri ve dirençlilik mekanizmalarının sınıflandırılması gösterilmektedir (Speer ve ark 1992).

Çizelge1.16. Tetrasiklin (*tet*) Direnç Genleri ve Dirençlilik Mekanizmaları.

Gen Sınıfı	Konum	Dirençlilik	Mekanizma	Protein	Mikroorganizma
A-E	Plazmid	Tc^r, Mn^r (A,C,E) Tc^r, Mn^s, (C,D)	Efflux pompası	43 kDa, membran	*Vibrio, Aeromonas, Haemophilus, Moraxella, Enterobacteriacea*
K	Plazmid	Tc^r, Mn^r	Efflux pompası	35 kDa, membran	*Staphylococcus, Bacillus*
L	Plazmid	Tc^r, Mn^s	Efflux pompası	50 kDa, membran	*Streptococcus, Enterococcus, Bacillus*
M	Transpozon, Plazmid	Tc^r, Mn^r	Ribozom koruması	72 kDa, sitoplazmik membran	Birçok gram (-) ve gram (+) mikroorganizma
O	Plazmid, Kromozom	Tc^r, Mn^r	Ribozom koruması	72 kDa, sitoplazmik membran	*Campylobacter, Streptococcus, Enterococcus, Peptostreptococcus*
P	Plazmid	-	Efflux pompası	-	*Clostridium* ssp.
Q	Kromozom	Tc^r, Mn^r	Ribozom koruması	72 kDa, sitoplazmik membran	*Bacteroides* ssp.

Tc^r: Tetrasiklin Dirençliliği Mn^r: Minosiklin Dirençliliği

Birçok mikroorganizma türünde olduğu gibi tetrasiklinlere karşı temel dirençlilik mekanizması efflux pompa aktivitesi, ribozomlarda protein sentezinin inhibisyonu, enzimatik inaktivasyon olmak üzere 3 şekilde gerçekleşmektedir (Connel ve ark 2003, Koo ve Woo 2011). Çizelge 1.16'dan da görüldüğü üzere *tetM* geni transpozon ve plazmidlerde yer almaktadır. *tetM* geni Tn*916* tipi conjugatif transpozonu üzerinde diğer mikroorganizmalara taşınabileceği belirtilmektedir (Roberts 1990, Speer ve ark 1992).

Tetrasiklin dirençliliğinde ribozomal korunmayı sağlayan proteinlerin oluşumunda temelde *tetM, tetO* ve *tetQ* genleri yaygın olarak görev almaktadırlar. *tetM* geni ilk olarak oral ve enterik *Streptococcus*'larda Tn*916* ve Tn*1545* konjugatif tronspozonlarda tanımlanmış olup, ribozom proteinlerinin oluşumunun inhibisyonuna yol açan en yaygın genler arasında yer almaktadır (Clewell ve Gawron-Burke 1986, Roberts 1990, Taylor ve Chau 1996, Taylor ve ark 1998, Chopra ve Roberts 2001). Bunun yanında son yıllarda yapılan çalışmalar neticesinde *tetP, tetS, tetT, tetW*'nin de ribozomal korunma şeklinde dirençliliğe yol açtığı

belirtilmektedir. Bakterilerde *tetP* haricinde yukarıda belirtilen genlerin efflux pompa aktivasyonuna yol açan genlerden daha baskın ve yaygın şekilde bulunmakta oldukları vurgulanmaktadır (Taylor ve ark 1998, Chopra ve Roberts 2001). Bu durumun bir diğer sebebinin de *tetM* gensekansının %70 oranında ribozomal korunma mekanizmasında yer alan diğer genler ile benzerlik göstermesi olabileceği vurgulanmaktadır (Taylor ve Chau 1996, Taylor ve ark 1998).

Ribozomlardan tetrasiklinlerin uzaklaştırılmasını sağlamakta en büyük rolü *tetM* geni üstlenmektedir. *tetM* ribozomlarda tetrasiklinlerin aktivitelerine karşı görev alan sitoplazmik protein yapısında bulunmaktadırlar (Suzuki 2010). *tetM*, ribozomlarda elongasyon faktörleri olarak bilinen EF-G ve EF-Tu ile sekans benzerliğine sahiptir. EF-G ve EF-Tu ise guanosin trifosfataz (GTPase) üst familyasında yer alan translasyon mekanizmasında gruplandırılmaktadırlar (Connel ve ark 2003, Roberts ve Schwarz 2009). *tetM* guanosin trifosfata (GTP) bağlanması ve GTP'yi hidrolize etmesine rağmen invivo veya invitro ortamda elongasyon faktörlerinin (EF-G ve EF-Tu) yerini alamamaktadır. Bu niteliği ile *tetM* efflux pompa aktivitesi gösteren proteinlerden ayrılmaktadır. *tetM,* ribozomların 30S alt birimlerinin h4 bölgesine bağlanarak tetrasiklinlerin ribozomlarda ilk olarak bağlandığı bölgenin protein yapısının allosterik olarak bozulma ve/veya değişmesine neden olmakta, böylece tetrasiklinler ribozomlara bağlanamamakta ve protein sentezi devam etmektedir (Taylor ve Chau 1996, Connel ve ark 2003, Roberts ve Schwarz 2009). Böylece hücre içerisinde tetrasiklin varlığına rağmen ribozomlarda protein sentezi devam etmekte, bununla birlikte efflux pompa aktivitesi ve enzimatik inaktivasyona neden olan diğer genlerin varlığında da tetrasiklinler kolayca aktif transport yoluyla hücre dışına aktarılmakta veya enzim aktiviteleri ile inaktive edilmektedirler (Suzuki 2010). Ayrıca ribozomal koruma genlerinin varlığı transpozonlar ve plazmidler vasıtasıyla bir bakteri hücresinden diğer bakteri hücresine veya ortama geçiş yapabilmekte ve süreç içerisinde kazanılmış çoklu dirençlilik de oluşabileceği vurgulanmaktadır (Roberts ve Schwarz 2009).

E. coli, çevresel ortamlarda en yaygın bulunan bakteri türlerinden birisi olmakla birlikte gıdalar içerisinde de özellikle et ve ürünlerinde önem arz edebilecek patojen mikroorganizmalar arasında yer almaktadır. *E. coli*'de var olan tetrasiklin dirençliliği daha çok ribozomal korunma şeklinde ortaya çıkmakta olup, ribozomal korunmada görev alan en yaygın genler arasında *tetM* yer almaktadır. Bu durumun

en önemli nedenleri arasında tetrasiklinlerin geçmişten itibaren yüksek miktarlarda ve bununla birlikte çiftlik hayvanları üretiminde de kullanılmış olmaları düşünülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalar *E. coli*'de var olabilecek *tetM* geninin çevresel kaynaklardan veya tetrasiklinlere dirençli bakterilerden geçiş yapabileceğini göstermektedir (Koo ve Woo 2011). *tetM* gibi ribozomal korunma genleri, plazmid veya transpozonlar ile bir hücreden diğer bir hücreye veya çevresel ortamlardan bakteriye geçebileceği ve dolayısıyla geçen süreç içerisinde direncin bu şekilde ortaya çıkmış olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte *E.coli*'de var olabilecek olan *tetM* geni, tetrasiklinlere dirençli *E. coli* izolatlarının varlığına dikkati çekmektedir (Cengiz ve ark 2010, Koo ve Woo 2011).

1.9.5. *Enterococcus faecium*'un Taksonomisi, Morfolojik Özelikleri ve Patojenitesi

Enterococcus faecium, Enterobacteriaceae familyası *Enterococcus* cinsi içerisinde yer almaktadır. *E. faecium*, 1980'li yıllara kadar *Steptococcus faecium* olarak tanımlanmakta, ilerleyen yıllarda yapılan moleküler ve biyokimyasal çalışmalar neticesinde *Enterococcus* familyası içerisinde yer aldığı ortaya çıkarılmıştır. Toprak, su, yiyeceklerde, insan ve hayvanların bağırsak, safra yolları, ağız ve bazen de derilerinde (özellikle perineal deri) normal florada bulunmaktadırlar (Koneman ve ark 1997). *E. faecium*, gram (+), oval kok tarzında, kısa zincirler halinde yaklaşık 0.6-2.0x0.6-2.5 µm boyutlara sahip olan, fakültatif anaerob, katalaz (-), 10-45°C arasındaki sıcaklıklarda üreyebilen, optimum üreme sıcaklığının 35°C olduğu, %6.5'lik NaCl çözeltisinde ve 2.5 ile 12 pH değerleri arasında üreme gösterebilen ve %40'lık safra çözeltisi ortamında eskulini hidrolize etme ve Blood Agar'da gama tipi hemoliz özelliğine sahip, bununla birlikte L-pyrolidonylbetanaphthylamid (PYR) maddesini hidrolize etme yeteneği bulunan, Lancefield serolojik sınıflandırmasında D grubu içerisinde yer alan bir bakteri türüdür (Willet 1992, Facklam ve ark 1999, Moellering 2000, Laport ve ark 2003, Nakajo ve ark 2006, Daane 2008).

İnsanlarda ve hayvanlarda *E. faecium'*un patojenitesi yapışma ve kolonizasyon, konakçı hücre savunmasına karşı gelişen direnç, bakteri inhibisyonu, doku hasarı, yangı indüksiyonu olmak üzere 5 temel işleve dayanmaktadır. *E. faecium*, yapışma ve kolonizasyon işlevini, aggregasyon substratı, diğer yüzey

adhezinleri, lipoteikoik asit (LTA) ile konakçının ökaryotik hücrelerine yapışma faktörleri ile gerçekleşmektedir. Konakçı hücre savunmasına karşı oluşan direnç, plazmidler tarafından kodlanan aggregasyon substratı, alıcı ve verici hücrelerin birleşmesini sağlayarak plazmid transferini kolaylaştırmaktadır. Aggregasyon substratı (AS) 37 kDA uzunluğa sahip bir protein olmakla birlikte, plazmidler tarafından kodlanmakta ve adhezyon işlevi üstlenmekte ve plazmid transferini kolaylaştırmaktadır. Bu şekilde antibiyotik direnç genleri başta olmak üzere pek çok gen de bakteriler arasında transfer edilebilmektedir (Rakita ve ark 1999, Süßmuth ve ark 2000, Kayaoğlu ve ark 2004).

1.9.6. *Enterococcus faecium*'un Vankomisine Karşı Dirençlilik Mekanizması

Vankomisin, glikopeptit grubu antibiyotikler arasında yer almakta olup, beşeri ve veteriner hekimlikte kullanımı 1950'li yıllara kadar dayanmaktadır. Yüksek dozlarda ve oldukça yaygın olarak kullanım sonucunda *Enterococcus*'lar başta vankomisin olmak üzere birçok antibiyotiğe karşı direnç kazanmışlardır. Geçen süreç içerisinde özellikle hayvansal üretimde profilaktik, metaflaktik gibi farklı amaçlarla vankomisinin kullanımı sonucunda bakteriler tarafından çevresel kaynaklara dirençlilik aktarılmaya başlanmış, sonuçta hayvan sağlığı problemlerinin ve toplum veya hastane kaynaklı dirençli *Enterococococcus* enfeksiyon vakalarının artmasına neden olmuştur. 1980'li yıllarda ilk kez vankomisin dirençli *E. faecium*'un neden olduğu sorunlar irdelenmeye başlamış ve günümüzde hem hayvan sağlığı hem de insan sağlığı üzerinde bir baskı yaratır hale gelmiştir.

E. faecium'un birçok antibiyotiğe karşı dirençlilik mekanizması doğal veya kazanılmış direnç şeklinde gelişmektedir. Vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptit grubu antibiyotikler temelde hücre duvarı sentezinde peptidoglikan polimerlerinin oluşumunda D-alanil-D-alanin (D-ala-D-ala) peptidinin terminal ucuna bağlanarak hücre duvarı sentez mekanizmasının bozulmasına yol açmaktadırlar (Walsh 1989, Arthur ve ark 1996, Ghidan 2007). Vankomisin dirençli *E. faecium* sahip olduğu ligaz enzimi yardımıyla D-ala-D-ala proteininin uç kısmındaki bağlanma noktasının yapısını D-ala-D-ala-laktat veya D-ala-D-ala-serin şekline dönüştürmektedir. Bu şekilde glikopeptit grubu antibiyotiklerin, hücre duvarının D-ala-D-ala ucuna bağlanma yetenekleri azalmakta ve dolayısıyla hücre duvarı sentezi devam etmektedir. Günümüzde vankomisin direnç profili, ligaz enzimini kodlayan genlerin

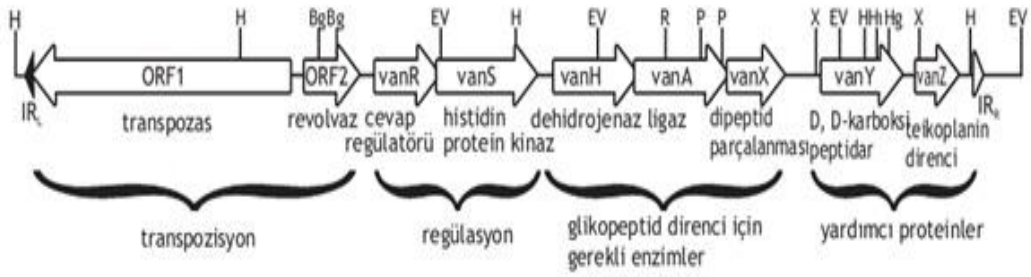
durumuna ve ortaya çıkan dönüşüme göre sınıflandırılmaktadır. D-ala-D-ala-laktat dönüşümüne *vanA*, *vanB*, *vanD*, D-ala-D-serin tipinde ise *vanC* ve *vanE* en yaygın şekilde görülen genlerdir. Çizelge 1.17'de *Enterococcus* cinsi bakterilerde glikopeptit grubu antibiyotiklere karşı gelişen dirençlilik fenotipleri gösterilmektedir (Dutka-Malen ve ark 1992, Navarro ve Courvalin 1994, Arthur ve ark 1996, Fines ve ark 1999, Quintiliani ve Courvalin 1996, Ghidan 2007).

Çizelge 1.17. Glikopeptitlerin *Enterococcus* ssp.'lar İçerisindeki Dirençlilik Karakterizasyonu.

Karakter	Glikopeptit Dirençlilik Fenotipi		
	vanA	*vanB*	*vanC*
Direnç Tipi	Kazanılmış	Kazanılmış	Doğal
Vankomisin (MİK)	64>1000	8>1000	8-32
Teikoplanin (MİK)	16>1000	0.5-1	0.5-1
Ekspresyon	İndüklenebilen	İndüklenebilen	-
Gen Lokasyonu	Plazmid veya kromozomal	Kromozomal veya plazmid	Kromozomal
Transpozon	Tn*1546*	Tn*1547*,Tn*3382*	-
Transferedilebilirlik	+	+	-
Terminal Dönüşümü	D-ala-D-laktat	D-ala-D-laktat	D-ala-D-ser
Türler	*Enterococcus* ssp.	*Enterococcus* ssp., *Strep. bovis*	*E. casseliflavus, E. gallinarum*

E. faecium'un *vanA* tipi ortaya çıkan dirençlilik mekanizması, yüksek düzeyde vankomisin (>64 µg/ml) ve teikoplanine (>16 µg/ml) karşı gelişen direnç tipidir. Geçmişte *vanA* tipi dirençlilik, izolatların MİK değerlerine göre belirlenirken günümüzde moleküler tekniklerin kullanılmasıyla spesifik ligaz genlerinin varlığına göre gerçekleşmektedir (Başustaoğlu 2004b, Çiçekler Tok 2006).

E. faecium'da *vanA* tipi direncin oluşumunda Tn*1546* transpozonu görev almaktadır. Tn*1546* transpozonu 10851 bp boyutunda, dirençliliğin oluşumunda Tn*3* ile birlikte 9 polipeptit tarafından kodlanmakta ve ilişkilendirilmektedir (Çetinkaya ve ark 2000). Şekil 1.4'te Tn*1546* transpozonun yapısı gösterilmektedir (Çöleri ve Çökmüş 2008).



Şekil 1.4. Tn*1546* Transpozonunun Yapısı ve Dizileri.

Şekil 1.4'ten görüldüğü üzere Tn*1546* transpozonunun ön ve arka dizileri sayesinde direnç genleri üzerinde bulunduğu plazmid ile başka bir plazmide bağlanabilmektedir. Bu aktarımın sağlanmasına ORF1 yapısal transpozazı, ORF2 ise relovazın kodlanmasından sorumludur. *vanR* ve *vanS* genleri glikopeptitlere cevap olarak regülasyon sistemi ile v*anH, vanA* ve *vanX* genlerinin transkripsiyonunun aktivasyonuna yol açarak depsipeptit oluşumunu kontrol etmektedir. *vanA* geni geniş bir substrat özgüllüğüne sahip bir ligazı, *vanH* ise peptidoglikan sentezinde alanin ile laktatın yer değiştirmesine yol açan depsipeptitin sentezinde gerekli olan dehidrojenazı kodlamaktadır. Böylece *vanA* tipi dirençlilikte direnç genleri çoğunlukla plazmid ve konjugatif transpozonlar aracılığıyla diğer türlere (örn., *S. aureus*) aktarılabilmektedir (Handwerger ve ark 1992, Bozdoğan ve Leclercq 1999, Çetinkaya ve ark 2000, Hanrahan ve ark 2000, Çöleri ve Çökmüş 2006).

1.10. Antibiyotik Duyarlılık ve Dirençliliğini Belirlemede Kullanılan Yöntemler

Günümüzde bakterilerin antibiyotik duyarlılığı ve dirençliliğine ilişkin birçok metot ve analiz yöntemi kullanılmakta olup, her yöntemin kendine özgü bir değerlendirme sistemi bulunmaktadır. Antibiyotik duyarlılık ve dirençlilikte kullanılan yöntemler dilüsyon (örn., sıvı besiyeri ve katı besiyeri), disk difüzyon (örn., Kirby-Bauer), epsilometre (E-Test), otomatize, spesifik mekanizma testleri ve moleküler-genotipik yöntemler (örn., PCR, DNA hibridizasyon) olmak üzere 6 ana grupta incelenebilmektedir (Richter ve Ferrano 2007, Jorgensen ve Ferrano 2009).

Dilüsyon metodu, antibiyotik duyarlılığında kullanılan ilk test olma özelliği taşımaktadır. Metodun uygulanması sıvı besiyeri ve katı besiyeri dilüsyon olmak üzere iki şekilde gerçekleştirilmektedir. Broth dilüsyon yönteminde test tüplerine ilgili bakterinin gelişebileceği sıvı besiyeri içerisine farklı dilüsyonlarda hazırlanmış antibiyotik türevi (örn., 1, 2, 4, 8 ve 16 mg/ml) eklenerek farklı konsantrasyonlarda antibiyotik içeren tüpler elde edilmekte, 1-5x10^5 kob/g düzeyinde standardize edilmiş bakteri süspansiyonu hazırlanmaktadır. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan farklı antibiyotik konsantrasyonuna sahip tüplere inokülasyon yapılmakta ve bakterinin optimum üreme koşulları altında inkübasyona bırakılmakta, sonuçta test tüplerinin tubiditesi değerlendirilmekte ve bu şekilde bakterinin minimum ve maksimum konsantrasyonlara karşı duyarlılığı belirlenebilmektedir (Jorgensen ve Turnidge 2007, Jorgensen ve Ferrano 2009). Katı besiyeri (agar) dilüsyon metodu da sıvı besiyeri dilüsyon metoduna benzerlik göstermekte olup, katı besiyerinde farklı antibiyotik konsantrasyonlarında ilgili bakterinin üreme özelliklerinin değerlendirilmesi ile birlikte minimum ve maksimum inhibisyon konsantrasyonları hakkında değerlendirmenin yapılabilmesini sağlamaktadır (Jorgensen ve ark 1994, Rennie ve ark 2008).

Disk difüzyon yöntemi, temelde 1-2x10^8 kob/g düzeyinde standardizasyonu yapılmış bakteri süspansiyonunun hazırlanan Mueller Hinton Agar'a inkübasyonunun yapılması ve belirli konsantrasyonlarda antibiyotik türevi içeren disklerin belirli prosedürler izlenerek inkübasyonun gerçekleştirilmesi ve sonuçların değerlendirilmesi esasına dayanmaktadır (Jorgensen ve Turnidge 2007, Anonim 2009).

Bakterilerde antibiyotik duyarlılık ve dirençliliğin belirlenmesinde kullanılan bir diğer yöntem epsilometre (E Test) testidir. Belirtilen yöntem steril katı besiyeri üzerine (genellikle Mueller Hinton Agar) 1-2x10^8 kob/g düzeyinde standardizasyonu yapılmış bakteri süspansiyonu yayılmakta ve ardından belirli konsantrasyonlarda antibiyotik emdirilmiş test plakalarının yerleştirilmesi ve izolatın optimum koşullarda inkübasyonunun sağlanması ve ortaya çıkan sonucun değerlendirilmesi prensibine dayanmaktadır. Neticede test edilen izolatın antibiyotik türevine karşı MİK değeri belirlenebilmektedir. Son yıllarda epsilometre testi, disk difüzyon yöntemiyle birlikte bakterilerin antibiyotik duyarlılık profillerinin ortaya çıkarılmasının yanında geçerlik ve güvenilirliğinin artırılmasıamacıyla tercih edilen

bir yöntem olarak değerlendirilmektedir (Jorgensen ve Turnidge 2007, Richter ve Ferrano 2007, Prakash ve ark 2008, Rennie ve ark 2008, Jorgensen ve Ferraro 2009).

Antibiyotik duyarlılık ve dirençliliğinde kullanılan bir diğer yöntem şeklini de otomatize test sistemleri oluşturmaktadır. Otomatize test sistemleri uygun ve kalibre edilmiş mikrodilüsyon içeren plakalara, belirli prosedürler eşliğinde izolatın inoküle edilerek değerlendirme olanağı sağlamaktadır. Otomatize test sistemleri, uygulama ve sonuç alma süreçlerinin hızlı ve kısa sürede gerçekleştirilmesi, teknik prosedür hatalarını büyük ölçüde ortadan kaldırması, çok sayıda izolata kısa sürede uygulanabilinmesi gibi nedenlerden dolayı tercih edilebilen bir yöntem olarak gösterilebilmektedir. Bunun yanında otomatize test sistemlerinin yüksek maliyetli olması ve test cihazlarına periyodik olarak kalibrasyon ve bakımlarının yapılması gibi gerekliliklerinden dolayı diğer metotlarla karşılaştırıldığında işlevsellik açısından oldukça yetersiz kalmaktadır (Jorgensen ve Ferrano 2009, Barenfanger ve ark 1999). Otomatize sistem testlerine Vitek System (BioMerieux, France), Walk-Away System (Dade International, Sacramento, Amerika Birleşik Devletleri), Sensititre ARIS (Trek Diagnostic Systems, East Grinstead, İngiltere), Avantage Test System (Abbott Laboratories, Irving, Texas, Amerika Birleşik Devletleri), Micronaut (Merlin, Bornheim-Hesel, Almanya), Phoenix (BD Biosciences, Maryland, Amerika Birleşik Devletleri) örnek olarak gösterilebilmektedir (Barenfanger ve ark 1999).

Spesifik mekanizma testleri, doğrudan ilgili bakterinin antibiyotiğe karşı belirli bir direnç mekanizmasını tanımlamak amacıyla gerçekleştirilmektedir. Uygulama prensibi, izolatın belirli bir antibiyotiğe karşı geliştirmiş olduğu belirli direnç mekanizmasını belirli bir reaktif ajan kullanılarak ortaya çıkarılması şeklinde gerçekleşmekte ve kalorimetrik esaslara dayanarak sonuçların değerlendirilmesini içermektedir (Richter ve Ferrano 2007, Jorgensen ve Ferrano 2009). Bu yöntemde ticari olarak farklı firmalarca üretilmiş birçok spesifik dirençlilik testleri bulunmaktadır. Burada antibiyotiklere karşı izolatın geliştirmiş olduğu direnç türleri ortaya çıkarılmasına karşın dirençlilik düzeyleriyle ilgili herhangi bir değerlendirme ortaya koyulamamaktadır.

Genotipik ve moleküler yöntemler, antibiyotik dirençliliği konusunda bakterinin sahip olduğu DNA, RNA gibi genetik materyallerde var olan spesifik direnç genlerinin veya gen bölgelerinin tespit edilmesi amacına dayanmaktadır. Böylece plazmid, transpozon gibi farklı materyaller üzerinde kompleks dirençlilik ajanları ve mekanizmalarının ortaya çıkarılabilmesi ve özelleştirilebilmesinin yanında bakteriler arasında dirençlilik materyallerinin sahip olduğu mutajenik özellikleri de ortaya çıkarılabilmektedir (Fluit ve Schmitz 2001, Ledeboer ve Hodinka 2011).

2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Gereç

Araştırma için Konya il merkezindekimarketlerde tüketime sunulan 50 adet ısıl işlem uygulanmış ve 50 adet fermente sucuk numunesi toplandı.

2.1.1. Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Tanımlanmasında Kullanılan Gereçler ve Hazırlanmaları

Gram Boyama Testi

Kristal Viyole Solüsyonu

Kristal viyole stok solüsyonunu için 40 g kristal viyole (Merck 1.01408) 400 ml etil alkol ile cam balon jojede karıştırıldı. Amonyum oksalat stok solüsyonu için ise 16 g amonyum oksalat (Merck 101190) 1600 ml distile su ile balon jojede karıştırıldıktan sonra filtre kâğıdından süzüldü. Kristal viyole stok solüsyonundan 40 ml, amonyum oksalat stok solüsyonundan ise 160 ml koyu renkli cam şişeye aktarıldı ve muhafaza edildi.

Lugol Solüsyonu

Lugol stok solüsyonu için balon jojeye 25 g iyot (Merck 1.04763) 50 g potasyum iyodür (Merck 1.05051) 500 ml distile su konuldu. İyice karıştırıldıktan sonra filtre kağıdından koyu renkli cam şişelere süzüldü. Stok solüsyonundan 60 ml, 220 ml distile su ile karıştırıldı ve koyu renkli cam şişelerde muhafaza edildi.

Safranin Solüsyonu

0.5 g Safranin (Merck 1.15948) 10 ml etil alkolde eritildi. Solüsyona 100 ml distile su eklendi ve karıştırılarak 24 saat bekletildi. Koyu renkli cam şişelere süzüldü ve muhafaza edildi.

Mikrobiyolojik Analizler

Plate Count Agar (PCA)

PCA (Merck, 1.05463) besiyerinden 22.5 g 1000 ml distile suda çözündürüldü. 121°C'de otoklavda 15 dakika sterilize edildi.

Katalaz Solüsyonu (%3)

Katalaz solüsyonu için 3 ml H_2O_2 (Merck 1.08600) 97 ml distile su ile karıştırıldı.

Oksidaz Testi

Oksidaz aktivitesini belirlemek amacıyla oksidaz test çubukları (Oxoid BR 0064A) kullanıldı.

Koagulaz Testi

Mikroorganizmaların otoaglutinasyonunu belirlemek amacıyla 1 ml steril tavşan kanı plazması vida kapaklı steril tüplere aktarıldı.

Baird Parker Agar

Baird Parker Agar (Oxoid CM 0275) besiyerinden 63 g 1000 ml distile suda çözündürüldü. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Besiyeri soğutulduktan sonra içerisine % 5 Egg Yolk Tellurit ilave edildi ve karıştırıldı.

Buffered Peptone Water

Buffered Peptone Water (Oxoid CM 0509)'dan 20 g 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda (Kottermann D-3162) eritilerek cam pyrex şişelere 225'er ml aktarıldı ve otoklavda (DH-WAC 010080-Daihan Scientific-Wice Clave™) 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

Egg Yolk Tellurite Emulsion

Ticari steril Egg Yolk Tellurite Emulsion (Oxoid SR0054) kullanıldı.

Mannitol Fermantasyon Test Reagenti

Buffered Peptone Water'dan 20 g 1000 ml distile suda eritildi ve su banyosunda çözündürüldü. İçerisine %0.01 oranında fenol red (Merck 1.07241) ayıracı ilave edildikten sonra vida kapaklı test tüplerine 5 ml olacak şekilde aktarıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. 5 g Mannitol (Merck 1.05982) 95 ml distile su ile karıştırılarak %5'lik mannitol solüsyonu hazırlandı. %5'lik mannitol solüsyonundan steril peptonlu su besiyerlerine %1 oranında ilave edildi.

API Staph Testi

API Staph (Biomerieux 20500) test stripleri üreticinin belirlemiş olduğu prosedürler doğrultusunda kullanıldı.

Brucella Broth Muhafaza Besiyeri

Brucella Broth (Becton Dickinson Company, Sparks MD 21152-211088) besiyerinden 28 g ve Agar (Merck 1.01614)'dan 1.6 g 850 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda karıştırılarak eritildikten sonra 160 g gliserin (Merck 5.00190) ilave edildi. Vida kapaklı Eppendorf tüplerin içerisine cam boncuklar koyuldu ve hazırlanan besiyerinden 5 ml steril pipet yardımıyla aktarıldı ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

Brain Hearth Infusion (BHI) Broth

BHI Broth'dan (Merck 1.10493) 37 g 1000 ml distile suda çözündürüldü. Vida kapaklı tüplere aktarıldı ve 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

Violet Red Bile Agar (VRBA)

VRBA (Oxoid CM0485)'dan 38.5 g 1000 ml distile suda çözündürüldü. Sıcak su banyosunda tamamen çözününceye kadar karıştırılarak bekletildi.

Sorbitol MacConkey Agar (SMAC)

SMAC (Oxoid CM0813)'dan 51.5 g 1000 ml distile suda çözündürülerek 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

Tryptone Soy Agar (TSA)

TSA (Oxoid CM0131)'dan 40 g 1000 ml distile suda çözündürüldü. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

Tryptone Soy Broth (TSB)

TSB (Oxoid CM0129)'den 30 g 1000 ml distile suda çözdürüldü ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

Kovack's Indole Reagent

İndol testinin analizinde Kovack's Indole Reagent (Merck 1.09293) kullanıldı.

Metil Red Ayıracı

Methyl Red (Merck 1.06076)'den %5'lik stok solüsyonu koyu renkli cam şişelere hazırlandı ve kullanılmak üzere muhafaza edildi.

Methyl Red-Voges Proskauer (MR-VP) Broth

MR-VP Broth (Merck-1.05712) besiyerinden 17 g 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine 5 ml olarak aktarıldı ve otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

VRBA with MUG

VRBA+MUG (Oxoid CM0978) besiyerinden 38.6 g tartıldı ve 1000 ml distile su eklendi ve su banyosunda tamamen eriyinceye kadar karıştırılarak çözündürüldü.

API 20 E Testi

API 20 E (Biomerieux 20100) test stripleri üreticinin vermiş olduğu uygulama prosedürlerine göre uygulandı.

Slanetz Bartley Agar (SB)

SB (Oxoid CM0377)'den 42 g 1000 ml distile su içerisindesu banyosunda tamamen çözündürüldü.

Bile Esculin Agar (BEA)

BEA (Oxoid CM0888)'dan 44.5 g 1000 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

%6.5 NaCl BHI Broth

BHI Broth'dan (Oxoid CM1136) 47 g 1000 ml distile su ile çözündürüldü. 1000 ml için 65 g NaCl tartıldı ve karışıma eklendi ve vida kapaklı tüplere aktarıldı. Ardından 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

L-pyrrolidonylarylamidase(PYR) Testi

İzolatlarının L-pyrrolidonylarylamidase (PYR) aktivitesini belirlemek amacıyla PYR test kiti (Oxoid ID 580) kullanıldı.

Sulfate Indole Motility Medium (SIMM)

SIMM (Merck 1.05470)'den 30 g 1000 ml distile suda çözündürüldü. Vida kapaklı test tüplerine 10'ar ml aktarıldı ve tüpler otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi.

%10 Steril Koyun Kanlı Blood Agar

Blood Agar (Oxoid CM0271)'dan 40 g 1000 ml distile suda çözündürüldü. 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. 42-48 °C'ye soğutulduktan sonra %10 oranında steril koyun kanı ilave edildi.

API 20 Strep Testi

API 20 Strep (Biomerieux 20600) test stripleri üreticinin vermiş olduğu uygulama prosedürlerine göre kullanıldı.

De Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar

MRS Agar'dan (Oxoid CM0361) 62 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda çözündürüldükten sonra 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Petrilere aktarıldıktan sonra sterilitesi kontrol edildi. Steril petriler kullanılmak üzere +4 °C'de muhafaza edildi.

De Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth

MRS Broth'dan (Oxoid CM0359) 52 g, 1000 ml distile suda çözündürüldü. Su banyosunda eritildikten sonra vida kapaklı test tüplerine 5'er ml olacak şekilde aktarıldı. Otoklavda 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Kullanılıncaya kadar +4 °C'de muhafaza edildi.

API 50 CH Testi

API 50 CH (Biomerieux 50300) test stripleri kullanıldı. İzolatların aktivasyonu için API 50 CHL Medium (Biomerieux 50410) kullanıldı. Üreticinin vermiş olduğu uygulama prosedürlerine yönelik test gerçekleştirildi.

2.1.2. Liyofilize Referans Suşlar

Araştırmada moleküler tanımlanmada kullanılmak üzere *Staphylococcus aureus* (American Type Culture Collection, ATCC 43300, ATCC 25922*)*, *Escherichia coli* (Louis Pasteur Institute, Inra Centre de Jouy en Josas, *E. coli* HB101, ATCC 25923) ve *Enterococcus* (ATCC 51559 *E. faecium*, ATCC 29212 *E. faecalis*) cinsi mikroorganizmalar kullanıldı.

2.1.3. Liyofilize Referans Suşların Aktive Edilmesi, Tanımlanması ve Stoklanması

Liyofilize referans suşlar (*S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 25922, *E. coli* HB101, *E. coli* ATCC 25923, *E. faecium* ATCC 51559, *E. faecalis* ATCC 29212) biyogüvenlik kabininde (Chemocell LRCx-UV) 1.5 ml Brain Heart Infusion Broth bulunan vida kapaklı test tüplerine aktarıldı. Üreticilerin uygulama protokolleri doğrultusunda öngörülen besiyerleri kullanılarak 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. Aktive edilen referans suşlar ilgili besiyerlerinde çoğaltıldı. Referans

suşların muhafazaları %15 gliserin içeren besiyerlerinde vida kapaklı kriyo tüplerde -86°C'de gerçekleştirildi.

2.1.4. Mikroorganizmalara Uygulanan Antibiyotik Duyarlılık Testi Gereçleri

Mueller Hinton Broth

Mueller Hinton Broth (Oxoid CM0405)'dan 21 g 1000 ml distile suda çözündürüldü ve su banyosunda eritildi. Vida kapaklı test tüplerine aktarıldı ve 121°C'de 15 dakika sterilize edildi. Kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Mueller Hinton Agar

38 g Mueller Hinton Agar (Oxoid CM0337)'a 1000 ml distile su eklendi. Su banyosunda çözündürüldü. Steril petrilere aktarıldı ve petrilere sterilite testi yapıldı. Kullanılıncaya kadar +4°C'de muhafaza edildi.

Antibiyotik Dirençlilik Test Diskleri

S. aureus, *E. coli*, *E. faecium*, *L. plantarum* ve *L. curvatus* izolatlarının antibiyotik dirençliliklerini belirlemek amacıyla Çizelge 2.1'de yer alan antibiyotikler agar difüzyon metoduyla uygulandı.

Çizelge 2.1.Agar Difüzyon Yöntemiyle İzolatlara Uygulanan Antibiyotikler.

Antibiyotik	Konsantrasyon	*S. aureus*	*E. coli*	*E. faecium*	*L. plantarum* ve *L. curvatus*
Amikasin	30 µg		X		
Amoksisilin/ Klavulanik asit	30 µg	X	X	X	X
Ampisilin	10µg		X	X	X
Eritromisin	15 µg	X	X	X	X
Gentamisin	120 µg	X	X	X	X
Kanamisin	30µg		X	X	X
Klindamisin	2 µg	X			
Kloramfenikol	30µg		X	X	X
Nalidiksik asit	30µg		X		
Oksasilin	1 µg	X			X
Penisilin G	10 U	X		X	X
Sefalothin	30 µg	X		X	X
Siproflaksosin	5 µg	X		X	X
Streptomisin	300µg		X	X	X
Teikoplanin	30 µg	X			
Tetrasiklin	30 µg	X	X	X	X
Trimethoprim/ Sulfamethakzol	25µg		X	X	X
Vankomisin	30 µg	X		X	X

Epsilometre Testi (E test)

İzolatların MİK değerlerini belirlemek amacıyla 0.015-256 µg/ml aralığında *S. aureus* için oksasilin (Oxoid MA0114F), *E. coli* için tetrasiklin (Oxoid MA0105F), *E. faecium* için ise vankomisin (Oxoid MA0102F) içeren antibiyotik E Test şeritleri kullanıldı.

2.1.5.Mikroorganizmaların Antibiyotik Direnç Genlerinin Belirlenmesi İçin Kullanılan Gereçler

Primerler

S. aureus izolatlarına bazı araştırmacıların (Mukarami ve ark 1993, Lee 2003, Koluman ve ark 2011, Özen ve ark 2011) bildirdikleri *mecA* metisilin direnç geni primerleri (533 bp) kullanıldı. *E. coli* izolatları için *tetM* tetrasiklin direnç geni primerleri (171 bp) (Aminov ve ark 2001, Gueimonde ve ark 2006 ve Cengiz ve ark 2010), *E. faecium* için Bell ve ark (1998)'nın belirttiği *vanA* vankomisin direnç geni primerleri (231 bp) kullanıldı. Tüm primer dizileri kullanılmadan önce National

Center For Biotechnology Information (NCBI) veritabanında yer alan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) veritabanında doğrulandı. Primerler Bioneer firmasına sentezlettirildi ve liyofilize şekilde tedarik edildi. Üreticinin vermiş olduğu protokoller çerçevesinde bidistile saf su kullanılarak seyreltimler hazırlandı.

DNA Ekstraksiyon

İzolatlarınDNA ekstraksiyonlarının gerçekleştirilmesi amacıyla Fermentas Genomic DNA Purification Kit (K0512, Lot:00075751) kullanıldı.

dNTP Set

Araştırmada Fermantas (798 Cromwell Park Drive, Suites R-S Glen Burnie, Maryland, USA) firmasının üretmiş olduğu 100 mM'lık dATP, dCTP, dGTP, dTTP setler (≠ R0181 Lot: 00072998) kullanıldı.

Taq DNA Polimeraz

Fermantas marka Taq DNA Polymerase (≠EP0402, Lot:00064242) enzimi kullanıldı.

Gen Ruler

Fermantas marka GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder (≠SM0321 Lot:00072044) solüsyonu kullanıldı.

Elektroforez Buffer Yürütme Solüsyonu (1X Tris Borate EDTA-TBE Buffer)

10X TBE buffer stok solüsyonu hazırlamak amacıyla 108 g Tris Base (Appli Chem-Ottoweg 4 DE-64291, A2264), 55 g Borik asit (Merck 12015), 20 ml 0.5 M Etilen Diamin Tetra Asetik Asit-EDTA (Merck 1.08418) 1000 ml distile suda çözündürüldü. Hazırlanan solüsyondan 100 ml alındı ve 900 ml distile su ilave edilerek çalışma solüsyonu hazırlandı.

Etidyum Bromid

20 mg etidyum bromid (Sigma, Eschenstrasse 5, 82024 Taufkirchen Germany, E 7637) 19.8 µl distile su ile sulandırıldı.

Agaroz Jel Solüsyonu

Agaroz jel'in hazırlanması amacıyla 2.7 g Agaroz (Sigma A 9539), 150 ml 1X'lik TBE solüsyonunda çözündürüldü. Mikrodalga (Beko MD 1505) fırında eritildi. Soğutularak içerisine 15 µl etidyum bromid eklendi.

2.2. Yöntem

Sucuk numunelerine fiziko-kimyasal analizler ile mikrobiyolojik analizler uygulandı. Numunelerden identifiye edilen *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *L. plantarum* ve *L. curvatus* izolatları kriyo tüplerde içerisinde %15 gliserin bulunan Brucella Broth'a aktarılarak -86°C'de muhafaza edildi. Sucuk numunelerinden izole edilen mikroorganizmalara agar difüzyon ve E test metodu ile antibiyotik duyarlılık/dirençlilik ölçümleri gerçekleştirildi. Polimerase Chain Reaction (PCR) metoduyla *mecA*, *tetM* ve *vanA* antibiyotik direnç genleri araştırıldı.

2.2.1. Fiziko-Kimyasal Analizler

pH Analizi

Sucuk numunelerinin pH değerleri elektronik pH ölçüm cihazında (WTW marka, pH 7110 masa tipi model) kaydedildi.

Su Aktivitesi (a_w) Analizi

Numunelerin su aktiviteleri su aktivite tayin cihazı (Duratherm marka Aw-Wert-Messer model) kullanılarak gerçekleştirildi.

Toplam Rutubet Analizi

Numuneler rutubet cihazının (AND Marka MX-50 Moisture Analyzer) haznesine 5 g tartıldı. Cihaz 105°C sıcaklığa ayarlandı ve analiz sonucunda elde edilen değer yüzde olarak hesaplandı.

Toplam Kuru Maddede Yağ Analizi

Rutubet analizinden sonra numunelerin üzerini kapatacak kadar karbontetraklorür (Sigma Aldrich Ref. 319961) ilave edildi. Karbontetraklorürün

rengi değişmeyinceye kadar ekstraksiyon işlemine devam edildi. İşlem sonucunda numuneler oda sıcaklığındabekletilerek kurutuldu. Hassas terazi kullanılarak (AND Marka, EK-600H model) tartıldı.

2.2.2. Mikrobiyolojik ve Moleküler Analizler

Numuneler plastik steril stomacher torbalarına 25 g tartıldı, 225 ml steril peptonlu su ilave edildi. Stomacher cihazında karıştırıldı ve steril pyrex şişelere aktarıldı. Steril ringer solüsyonuile 10^{-1}'den 10^{-15}'e kadar vida kapaklı tüplere sulandırmalar gerçekleştirildi.

Toplam Mezofilik Aerobik Mikroorganizma (TMAM) Sayısının Tespiti

Dilüsyonlardan 1'er ml alınarak steril petrilere aktarıldı. Plate Count Agar'dan petrilere dökme plak yöntemi şeklinde petrilere aktarıldı. 30°C'de 48-72 saat inkübasyona bırakıldı ve üreme gösteren koloniler sayıldı.

Staphylococcus aureus'un İzolasyonu ve Tanımlanması, Antibiyotik Dirençlilik Testleri ve *mecA* Geninin PCR ile Belirlenmesi

S. aureus'un izolasyon ve tanımlanmasında Food and Drug Administration (FDA) tarafından önerilen metot kullanıldı. Hazırlanan seyreltimler sonrasında %5 Egg Yolk Tellurite içeren Baird Parker Agar'a dökme plak yöntemi kullanılarak ekim yapıldı ve petriler 37°C'de 24-48 saat arasında aerobik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Tellurite içeren Baird Parker Agar'da siyah renkte, 1 mm çapında yuvarlak, konveks şekilde, etrafında hale bulunan şüpheli koloniler değerlendirmeye alındı. Şüpheli kolonilere gram boyama, katalaz, oksidaz, koagulaz, mannitol karbonhidrat testi uygulandı. Tür düzeyinde tanımlanması için ise API Staph test kiti uygulandı.

Gram Boyama

Şüpheli koloniler yuvarlak uçlu öze yardımıyla alınarak lam üzerine tespit yapıldı. Kristal viyole solüsyonu ile 1 dk boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra lugol solüsyonu döküldü ve 30 sn bekletildi. Saf etil alkol ile dekolorasyon uygulandı ve distile su ile yıkandı. Ardından safranin solüsyonu ile 30 sn boyama işlemi gerçekleştirildi ve distile su ile yıkandı. Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Lamlar kuruduktan sonra üzerine immersiyon yağı (Merck 1.04699) damlatıldı.

Mikroskobun 100'lük objektifiyle incelendi. Mor renge boyanan, kok, üzüm salkımı tarzında şekilleri olan bakteri hücreleri şüpheli *S. aureus* olarak değerlendirmeye alındı.

Katalaz Testi

Pastör pipeti ile %3'lük H_2O_2 solüsyonundan birkaç damla lam üzerine döküldü. İğne uçlu platin öze yardımıyla alınan şüpheli koloniler lam üzerinde %3'lük H_2O_2 solüsyonu ile karıştırıldı. 10-20 sn içerisinde lam üzerinde kabarcık ve gaz oluşumu katalaz pozitif olarak değerlendirildi.

Oksidaz Testi

Öze yardımıyla şüpheli koloniler oksidaz test kiti üzerine alındı. Renk değişiminin gözlenmemesi pozitif olarak değerlendirildi.

Koagulaz Testi

Lam üzerine steril fizyolojik tuzlu su damlatıldı. Yuvarlak uçlu öze yardımıyla steril tavşan kanı plazmasından alındı ve öze ile yayıldı. İğne uçlu öze yardımıyla şüpheli olarak alınan 1-2 koloni lam üzerinde karıştırıldı. Lam üzerinde 5-10 sn içerisinde bakteri hücreleri arasında otoaglutinasyon görülen izolatlar pozitif olarak değerlendirildi.

Mannitol Karbonhidrat Fermantasyon Testi

Şüpheli kolonilerden iğne uçlu öze yardımıyla %5'lik mannitol bulunan vida kapaklı karbonhidrat testi tüplerine aktarıldı. 35°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında kırmızı-kahverengi renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi.

API Staph Testi

TSA'da 37°C'de 24 saat kültive edilen *S. aureus* izolatları API Staph test striplerine üreticinin öngördüğü aşamalar dahilinde uygulandı. 37°C'de 24 saat aerobik şartlar altında stripler inoküle edildi. API Web Software (Biomerieux) programı yardımıyla izolatların identifikasyonları değerlendirildi.

İzolatların Muhafazası

S. aureus olarak tanımlanan izolatlar Brucella broth muhafaza besiyeri içeren eppendorf tüplere aktarıldı. İzolatlar antibiyotik dirençlilik testleri ve PCR ile direnç geninin belirlenmesinde kullanılmak üzere -86°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

S. aureus izolatlarının antibiyotiklere karşı duyarlılıklarının belirlenmesi amacıyla Çizelge 2.1'de gösterilen antibiyotik diskleri kullanıldı. *S. aureus*'ların antibiyotik duyarlılığı National Committee for Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) (Anonim 2007a) ve European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) (Anonim 2009, Anonim 2011) prosedürlerine uygun olarak agar difüzyon yöntemiyle gerçekleştirildi. -86°C'de muhafaza edilen izolatlar TSB'ye ekilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. TSB'de üreyen izolat TSA'ya aktarıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üreme gösteren kolonilerden 5 adet yuvarlak uçlu öze yardımıyla Mueller Hinton Broth'a bulunan test tüplerine aktarıldı. 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüplerde bulunan izolatların bulanıklığı Mc Farland cihazında 0.5 bulanıklık standardına göre ayarlandı. 0.5 Mc Farland bulanıklık standardında bulunan izolatlardan 120x120 mm boyutlarındaki steril petrilerde bulunan Mueller Hinton Agar'ın tüm yüzeyine yayma metodu ile ekim yapıldı. Antibiyotik test diskleri petrilere birbirlerine 3-4 cm, petri kenarına 1 cm olacak şekilde yerleştirildi. İnkübasyon sonrasında antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çapları ölçüldü. Elde edilen zon çapları CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2009, Anonim 2011) kriterlerine göre değerlendirildi.

***Staphylococcus aureus* için Epsilometre Testi (E Test)**

S. aureus'un antibiyotiklere karşı MİK değerinin ölçülmesi amacıyla 0.012-256 µg/ml aralığında oksasilin (Oxoid MA 0114F) içeren test şeritleri kullanıldı. Mueller Hinton Broth'da Mc Farland 0.5 standartlarına göre hazırlanan süspansiyon 120x120 mm boyutlarındaki Mueller Hinton Agar içeren petrilere yayma metoduyla tüm yüzeye Drigalski çubuğu kullanılarak yayıldı. Epsilometre test şeridi petrilere

yerleştirilerek 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda üreme görülen alanlar ölçüldü. CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2009, Anonim 2011) standartlarına göre değerlendirilerek izolatların duyarlı olduğu en düşük ve en yüksek doz belirlendi.

PCR Yöntemiyle *Staphylococcus aureus* Olarak Tanımlanan İzolatlarda *mecA* Gen Tespiti

Örnek Hazırlanması

Eppendorf tüpler içerisinde Brucella Broth'da -86°C'de muhafaza edilen izolatlar ve referans suşlar (*S. aureus* ATCC 43300 ve *S. aureus* ATCC 25923) çözündürüldü ve TSB içeren steril vida kapaklı tüplere aktarıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Mc Farland cihazında (DEN-IB Mc Farland Dansitometer) optik dansitesi 4'e ayarlandı.

DNA Ekstraksiyonu

TSB'de optik dansitesi Mc Farland 4'e ayarlanan izolatlara DNA ekstraksiyonu amacıyla Fermentas Genomic DNA Purification Kit (K0512, Lot:00075751) kullanıldı. Üreticinin yönergelerine uygun olarak DNA ekstarksiyonu gerçekleştirildi. İzolatlardan 1 ml alınarak santrifüj (VWR Micro centrifuge tubes 211-0015) tüplerine aktarıldı. 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj (Nüve NF 1200R) edilerek üst kısımda kalan supernatant atıldı. Alt kısımda kalan bakteri pelleti ekstraksiyon aşamaları için kullanıldı. Pelletin üzerine otomatik pipet (Nichiryo Nichipet EX) ile 200 µl steril distile su eklendi ve vortekslendi. Pelletin üzerine 400 µl lizis solüsyonu (Fermantas K0512 Lot:00066035) eklendi ve ısıtıcı bloğa (Bioneer My Genie 96 Thermal Block Cycler) yerleştirilerek 65°C'de 5 dk bekletildi. Pelletin üzerine 600 µl kloroform (Merck 1.02445) ilave edildi ve 3-5 kez el yardımıyla yavaşça çalkalandı. 10000 rpm'de 2 dk santrifiye edildi. DNA içeren supernatant kısım mikropipet yardımıyla yeni bir eppendorf tüpe aktarıldı ve 800 µl prespitasyon solüsyonu (Fermantas K0512 Lot:00064865) eklendi ve oda sıcaklığında karıştırıldı. 10000 rpm'de 2 dk santrifiye edildi ve mikropipet yardımıyla süpernatant uzaklaştırıldı. DNA pelleti 100 µl 1.2 M NaCl (Fermantas K0512 Lot:00066034) ile hafifçe vortekslenerek çözündürüldü. Üzerine 300 µl soğutulmuş etanol eklendi ve -20°C'de 10 dk bekletildi. Ardından 10000 rpm'de 4 dk santrifüj edildi ve etanol

içeren supernatant kısım atıldı ve elde edilen pellet 100 µl steril distile su ile çözündürüldü. Kullanılıncaya kadar +4 °C'de bekletildi.

PCR Mix Solüsyonu Hazırlama

PCR mix solüsyonu için önceden hazırlanmış (Bioneer Accupower Multiplex PCR Premix) olan premiks kullanıldı. Premiks seti, DNA polymerase, dNTP set, $MgCl_2$, stabilizer ve tracking dye'dan oluşmaktadır. Ekstrakte edilen DNA'lardan 2.5 µl, forward ve reverse primerlerden 1 µl olacak şekilde ayarlandı ve 20 µl steril distile su ilave edildi.

Primerler

S. aureus'un metisiline karşı direnç geninin tespit edilmesinde National Center For Biotechnology Information (NCBI) veritabanında yer alan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak *mecA* geninin aşağıda belirtilen forward ve reverse primer dizileri kullanıldı. *mecA* forward (5'AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C 3') *mecA* reverse (5'AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C 3') olarak belirlendi. Kullanılan her iki primer 533 bp uzunluğundaki bir bölgeyi amplifiye etmektedir.

Agaroz Jelin Dökülmesi

%1.5'luk agaroz jel elektroforez tankının (Thermoscientific OWL Easy Cast B2) içerisine döküldü. Jel, katılaşması için elektroforez tankının içerisinde 30-45 dk arasında bekletildi.

PCR Amplifikasyonu

Elde edilen bakteri DNA'larının PCR amplifikasyonu için Lee (2003) ve Mukarami ve ark (1993)'nın belirttikleri thermal cycle koşulları farklı sıcaklık ve sürelerde doğrulandıktan sonra uygulandı (Çizelge 2.5).

Çizelge 2.2. *mecA* Geni İçin Uygulanan Thermal Cycle Koşulları.

Sıcaklık	Süre	İşlem
94°C'de*	30 sn	Denaturasyon
55°C'de*	30 sn	Annealing (Primer bağlanması)
72°C'de*	1 dk	Extension (Primer uzaması)
72°C'de	5 dk	Final Extension (Son Uzama)

* 40 döngü

Elektroforez

İçerisinde %1.5'luk agaroz jel bulunan elektoforez tankının kuyucuklarına amplifiye edilen DNA, pozitif kontrol amacıyla *mecA* geni taşıyan ATCC 43300 referans suş ile negatif kontrol amacıyla *mecA* geni taşımayan ATCC 25923 referans suş örneklerinden 5'er µl mikropipet yardımıyla aktarıldı. Loading dye (Fermentas 6X DNA Loading Dye ≠R0611 Lot:00066284) ve marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ≠SM0321 Lot: 00050227) karışımından 5 µl alınarak en baştaki ve en sondaki kuyucuklara aktarıldı. Elektroforez cihazında (Thermo Scientific EC-300XL2) 90 volt 40 miliamper akım şiddetinde 1 saat bekletildi.

UV Transilluminatör ile Görüntüleme

Elektoforez işleminin ardından *S. aureus* için *mecA* gen varlığını gösteren amplifiye DNA sonuçları UV transilluminatörde (DNR Bio Imaging Systems Minibispro) görüntülendi.

***Escherichia coli*'nin İzolasyonu ve Tanımlanması, Antibiyotik Dirençlilik Testleri ve *tetM* Geninin PCR ile Belirlenmesi**

E. coli'nin tespit edilmesi amacıyla dilüsyonlardan 1'er ml alınarak içerisinde Violet Red Bile Agar (VRBA) (Oxoid CM0485) bulunan steril petrilere çift kat şeklinde dökülerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyounun ardından pembe-mor renkli üreyen koloniler hazırlanan steril TSB içeren tüplere aktarıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ardından Sorbitol MacConkey (SMAC) Agar (Oxoid CM0813)'a tek koloni düşecek şekilde çizme plak yöntemiyle aktarıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda SMAC Agar'da sorbitol negatif olan renksiz koloniler şüpheli olarak değerlendirildi ve gram boyama, katalaz, oksidaz, indol, metil red, Voges-Proskauer ve β-glukoronidaze aktivite testleri gerçekleştirildi. *E. coli* izolatlarının identifikasyonunun doğrulanması

amacıyla TSA'da 37°C'de 24saat inoküle edilen izolatlar, API 20 E (Biomerieux 20100) test striplerine üreticinin belirlemiş olduğu uygulama prosedürleri dahilinde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Elde edilen sonuçlar kaydedildi ve API Web Software (Biomerieux) programında identifikasyonlar doğrulandı. -86°C'de muhafaza etmek amacıyla Brucella Broth'a aktarıldı.

Gram Boyama

Şüpheli koloniler yuvarlak uçlu öze yardımıyla alınarak lam üzerine tespit yapıldı. Kristal viyole solüsyonu ile 1 dk boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra lugol solüsyonu döküldü ve 30 sn bekletildi. Saf etil alkol ile dekolorasyon uygulandı ve distile su ile yıkandı. Ardından safranin solüsyonu ile 30 sn boyama işlemi gerçekleştirildi ve distile su ile yıkandı. Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Lamlar kuruduktan sonra üzerine immersiyon yağı (Merck 1.04699) döküldü. Mikroskobun 100'lük objektif kullanılarak incelendi. Pembe renge boyanan, gram negatif, basil tarzında şekilleri olan, bakteri hücreleri *Escherichia* şüpheli olarak değerlendirmeye alındı (Harrigan 1998).

Katalaz Testi

Pastör pipeti ile %3'lük H_2O_2 solüsyonundan birkaç damla lam üzerine döküldü. İğne uçlu platin öze yardımıyla şüpheli kolonilerden alındı ve lam üzerinde %3'lük H_2O_2 solüsyonu ile karıştırıldı. 10-20 sn içerisinde lam üzerinde kabarcık ve gaz oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Harrigan 1998).

Oksidaz Testi

Özeyardımıyla şüpheli koloniler oksidaz test kiti üzerine alındı. Renk değişiminin gözlenmemesi oksidaz testi negatif, *E. coli* yönünden pozitif olarak değerlendirildi.

İndol Testi

Şüpheli koloniler öze yardımıyla alındı ve Buffered Peptone Water bulunan tüplere aktarıldı. 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüplere 0.5 ml Kovac's ayıracı ilave edildi ve hafifçe karıştırıldı. Tüplerin üst kısımlarında oluşan kırmızı renk pozitif olarakdeğerlendirildi.

Metil Red Testi

MR-VP Broth besiyerine şüpheli koloniler inoküle edildi. 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında her bir tüpe 4 damla %5'lik Metil Red ayıracından ilave edildi ve hafifçe çalkalandı. Kırmızı renk oluşumu pozitif olarak değerlendirildi (Harrigan 1998).

Voges-Proskauer Testi

MR-VP Broth'a şüpheli koloniler ekildi. 37°C'de 2-7 gün inkübasyona bırakıldı. Barrit yöntemine göre inkübasyon sonrası tüplere 1 ml %40'lık KOH ve 3 ml %5'lik alfanaftol eriyiğinden ilave edildi ve karıştırıldı. 2-5 dk içerisinde renk oluşumu görülmeyen izolatlar pozitif olarak değerlendirildi (Harrigan 1998).

β-glukoronidaze Aktivite Testi

β-glukoronidaze aktivitesini saptamak amacıyla methyl-umbellipherylglucorunidase ihtiva eden Violet Red Bile Agar+MUG (Oxoid CM 0978B)'a öze ile ekimleri yapılarak 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Ultra viole lamba yardımı ile floresan özellik gösteren koloniler *E. coli* olarak değerlendirildi.

API 20 E Testi

E. coli izolatlarının identifikasyonunun doğrulanması amacıyla TSA'da 37°C'de 24saat inkübe edilen izolatlar, API 20 E test striplerine üreticinin belirlemiş olduğu prosedürler dahilinde 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Elde edilen sonuçlar kaydedildi ve API Web Software programında identifikasyonlar doğrulandı.

İzolatların Muhafazası

E. coli olarak tanımlanan izolatlar Brucella broth içeren muhafaza besiyeri içeren eppendorf tüplere aktarıldı. İzolatlar antibiyotik dirençlilik testleri ile PCR uygulaması amacıyla -86°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

İzolatların Antibiyotik Duyarlılıklarının Belirlenmesi

E. coli olarak tanımlanan izolatların antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi için Çizelge 2.1'de belirtilen antibiyotik diskleri kullanıldı. Antibiyotik duyarlılık testleri CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2009, Anonim 2011) standartlarına göre agar difüzyon yöntemiyle yapıldı. -86°C'de muhafaza edilen izolatlar TSB'ye ekilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. TSB'de üreyen izolat TSA'ya aktarıldı ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Üreme gösteren kolonilerden 5 adet yuvarlak uçlu öze yardımıyla Mueller Hinton Broth bulunan test tüplerine aktarıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında tüplerde bulunan izolatların bulanıklığı Mc Farland cihazında 0.5 bulanıklık standardına göre ayarlandı. 0.5 Mc Farland bulanıklık standardında bulunan izolatlardan 120x120 mm boyutlarındaki steril petrilerde bulunan Mueller Hinton Agar'ın tüm yüzeyine yayma metodu ile ekim yapıldı. Antibiyotik diskleri petrilere birbirlerine 3-4 cm, petri kenarına 1 cm olacak şekilde yerleştirildi. İnkübasyon sonrasında antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çapları ölçüldü. Elde edilen zon çapları CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2009, Anonim 2011) kriterlerine göre değerlendirildi.

Escherichia coli İçin Epsilometre Testi (E Test)

E. coli izolatlarının MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla 0.012-256 µg/ml düzeyleri arasında tetrasiklin içeren antibiyotik E Test şeritleri (Oxoid MA0105F) kullanıldı. Mueller Hinton Broth'da Mc Farland 0.5 standartlarına göre hazırlanan süspansiyon 120x120 mm boyutlarındaki Mueller Hinton Agar içeren petrilere yayma metoduyla tüm yüzeye Drigalski çubuğu kullanılarak yayıldı. Epsilometre test şeridi petrilere yerleştirilerek 35°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda üreme görülen alanlar ölçüldü. CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2009, Anonim 2011) standartlarına göre değerlendirilerek izolatların dirençli olduğu en düşük ve en yüksek antibiyotik dozu belirlendi.

PCR Uygulamasıyla *Escherichia coli* İzolatlarında *tetM* Gen Tespiti

Örnek Hazırlanması

Brucella Broth'da -86°C'de muhafaza edilen izolatlar ve referans suşlar (*E. coli* HB101 ve *E. coli* ATCC 25922) çözündürüldü ve vida kapaklı tüplerde bulunan TSB'ye aktarıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tüplerin Mc Farland değerleri tespit edildi ve DNA ekstraksiyonu için Mc Farland optik dansite değerleri 4'e ayarlandı.

DNA Ekstraksiyonu

Araştırmada Fermentas Genomic DNA Purification Kit (K0512, Lot:00075751) kullanıldı. Üreticinin yönergelerine uygun olarak DNA ekstraksiyonu gerçekleştirildi. DNA ekstaksiyonu amacıyla TSB'de Mc Farland değeri 4' ayarlanan izolatlardan 1 ml alındı ve mikro santrifüj (VWR Micro centrifuge tubes 211-0015) tüplerine aktarıldı. 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj (Nüve NF 1200R) edilerek üst kısımda kalan supernatant döküldü. Alt kısımda kalan bakteri pelleti ekstraksiyon aşamaları için kullanıldı. Pelletin üzerine otomatik pipet (Nichiryo Nichipet EX) ile 400 µl lizis solüsyonu eklendi ve vortekslendi. 65°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 600 µl kloroform ilave edildi ve 3-5 kez pipete edildi. 10000 rpm'de 2 dakika santrifiye edildi. 80 µl presipitasyon solüsyonu 720 µl steril distile su ile karıştırıldı. DNA içeren üstteki faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu ilave edildi ve oda sıcaklığında ters düz edilerek karıştırıldı. 10000 rpm'de 2 dakika santrifiye edildi. Oluşan supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Pellet 100 µl NaCl solüsyonu içerisinde çözündürüldü ve vortekslendi. Pellete presipite olması amacıyla 300 µl soğutulmuş etanol eklendi ve -20°C'de 10 dakika bekletildi. 10000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Etanol mikrotüpten tamamen uzaklaştırıldı. Pellet 100 µl steril distile su ile vortekslenerek çözündürüldü. Kullanılıncaya kadar +4°C'de bekletildi.

PCR Mix Solüsyonu Hazırlama

PCR mix solüsyonu için önceden hazırlanmış premiks (Bioneer Accupower Multiplex PCR Premix) kullanıldı. Premiks seti, DNA polymerase, dNTP set, $MgCl_2$, stabilizer ve tracking dye'dan oluşmaktadır. Ekstrakte edilen DNA'lardan 2.5 µl,

forward ve reverse primerlerden 1µl olacak şekilde ayarlandı ve 20 µl steril distile su ilave edildi.

Primerler

E. coli'nin tetrasikline karşı direnç geninin tespit edilmesinde National Center For Biotechnology Information (NCBI) veritabanında yer alan Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) kullanılarak *tetM* geninin aşağıda belirtilen forward ve reverse primer dizileri kullanıldı. *tetM* Forward (5'ACA GAA AGC TTA TTA TAT AAC 3') *tetM* Reverse (5' TGG CGT GTC TAT GAT GTT CAC 3') olarak belirlendi. Kullanılan primerler 171 bp uzunluğundaki bir bölgeyi amplifiye etmektedir (Aminov ve ark 2001).

Agaroz Jelin Dökülmesi

%1.5'luk agaroz jel elektroforez tankının (Thermoscientific OWL Easy Cast B2) içerisine döküldü. Jel, katılaşması için elektroforez tankının içerisinde 30-45 dk arasında bekletildi.

PCR Amplifikasyonu

Elde edilen bakteri DNA'larının PCR amplifikasyonu için bazı araştırmacıların (Aminov ve ark 2001, Cengiz ve ark 2010, Gueimonde ve ark 2006) belirttikleri thermal cycle koşulları uygulandı (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. *tetM* Geni İçin Uygulanan Thermal Cycle Koşulları.

Sıcaklık	Süre	İşlem
94°C'de	3 dk	İlk denaturasyon
94°C'de*	30 sn	Denaturasyon
55.2°C'de*	30 sn	Annealing (Primer bağlanması)
72°C'de*	45 sn	Extension (Primer uzaması)
72°C'de	7 dk	Final Extension (Son Uzama)

* 35 döngü

Elektroforez

İçerisinde %1.5'luk agaroz jel bulunan elektoforez tankının kuyucuklarına amplifiye edilen DNA, pozitif kontrol amacıyla *tetM* geni taşıyan *E. coli* HB101

referans suş ile negatif kontrol amacıyla *tetM* geni taşımayan ATCC 25922 *E. coli* referans suş örneklerinden 5'er µl mikropipet yardımıyla aktarıldı. Loading dye (Fermentas 6X DNA Loading Dye ≠R0611 Lot:00066284) ve marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ≠SM0321 Lot: 00050227) 5 µl alınarak en baştaki ve en sondaki kuyucuklara aktarıldı. Elektroforez cihazında (Thermo Scientific EC-300XL2) 90 volt 40 miliamper akımda 1 saat bekletildi.

UV Transilluminatör ile Görüntüleme

Elektoforez işleminin ardından *E. coli* için *tetM* gen varlığını gösteren amplifiye DNA numune sonuçları UV transilluminatörde (DNR Bio Imaging Systems Minibispro) görüntülendi.

***Enterococcus faecium'*un İzolasyonu ve Tanımlanması, Antibiyotik Dirençlilik Testleri ve *vanA* Geninin PCR ile Belirlenmesi**

E. faecium'un izolasyonunda, numunelere ait seyreltimler hazırlandıktan sonra Slanetz Bartley Agar (SBA)'a ekimleri gerçekleştirildi ve 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında petrilerde kahverengi-kırmızı renkte, konveks şekilde, etrafında hale olmayan yuvarlak-oval koloniler şüpheli olarak değerlendirildi. Ardından şüpheli kolonilerden Bile Esculin Agar (BEA)'a yuvarlak uçlu öze yardımıyla tek koloni düşecek şekilde ekimler gerçekleştirildi. 35°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. BEA'da parlak siyah renkli, yuvarlak, konveks şekilli şekilde üreyen koloniler şüpheli *Enterococcus* olarak değerlendirildi. BEA'da üreyen kolonilere gram boyama, katalaz, %6.5 NaCl BHI Broth'da üreme, L-pyrrolidonyl arylamidase(PYR), hareket, hemoliz ve API 20 Strep testi uygulandı.

Gram Boyama

Şüpheli kolonilerden yuvarlak uçlu öze yardımıyla lam üzerine tespit yapıldı. Kristal viyole solüsyonu ile 1 dk boyandı. Distile su ile yıkandıktan sonra lugol solüsyonu döküldü ve 30 sn bekletildi. Saf etil alkol ile dekolorasyon uygulandı ve distile su ile yıkandı. Ardından safranin solüsyonu ile 30 sn boyama işlemi gerçekleştirildi ve distile su ile yıkandı. Oda sıcaklığında kurumaya bırakıldı. Lamlar kuruduktan sonra üzerine immersiyon yağı (Merck 1.04699) damlatıldı ve ışık mikroskobunda 100'lük objektifle incelendi. Mor renge boyanan, gram pozitif,

yuvarlak kok tarzında şekilleri olan, bakteri hücreleri şüpheli *Enterococcus* olarak değerlendirmeye alındı.

Katalaz Testi

Pastör pipeti ile %3'lük H_2O_2 solüsyonundan birkaç damla lam üzerine döküldü. İğne uçlu öze yardımıyla şüpheli koloniler %3'lük H_2O_2 solüsyonu ile karıştırıldı. 10-20 sn içerisinde lam üzerinde kabarcık ve gaz oluşumunun gözlemlenmemesiyle analiz pozitif olarak değerlendirildi (Harrigan 1998).

Bile Esculin Hidrolizi Testi

Şüpheli kolonilerden Bile Esculin Agar içeren petrilere yuvarlak uçlu öze yardımıyla tek koloni düşecek şekilde ekim yapıldı. 35 °C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında besiyerinde üreyen ve esculini hidrolize ederek parlak siyah renkli, yuvarlak, konveks şekilde üreyen koloniler pozitif olarak değerlendirildi (Harrigan 1998).

%6.5 NaCl BHI Broth'da Üreme

Şüpheli koloniler vida kapaklı tüplere hazırlanan steril %6.5 NaCl BHI Broth'a inoküle edildi. 37°C'de 6 saat aerobik koşullarda inkübasyona bırakıldı. Üremenin gerçekleşmesi ve besiyerinin bulanık hale gelmesi pozitif olarak değerlendirildi (Harrigan 1998).

L-pyrrolidonylarylamidase (PYR) Testi

İzolatlarının L-pyrrolidonylarylamidase (PYR) aktivitesini belirlemek amacıyla PYR test kiti (Oxoid ID 580) kullanıldı. Üreticinin yönergeleri doğrultusunda izolatlar analize tabi tutuldu. Analiz sonucunda kartlarda sabit mor rengin oluşması pozitif olarak değerlendirildi.

Hareket Testi

Vida kapaklı tüplerdeki 5 ml Sulfate Indol Motility Medium (SIMM) besiyerine şüpheli kolonilerden iğne uçlu öze yardımıyla koloniler dik bir şekilde

ekildi. 25°C'de aerobik ortamda 2-5 gün inkübasyona bırakıldı. Yüzeye doğru şemsiye tarzındaki üremenin oluşmaması *E. faecium* pozitif olarak değerlendirildi.

Hemoliz Testi

Steril petrilerde %10 koyun kanı içeren Blood Agar hazırlandı. BEA'da üreyen kolonilerden katalaz, PYR, %6.5 NaCl BHI broth'da üreme analizlerinde pozitif olarak değerlendirilen izolatlar vida kapaklı tüplerde hazırlanmış TSB'ye aktarıldı. 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. TSB'de üreyen kolonilerden %10 steril koyun kanı ilave edilmiş Blood Agar'a tek koloni düşecek şekilde yuvarlak uçlu öze yardımıyla çizme metoduyla ekim yapıldı. 37°C'de aerobik ortamda 24-48 saat arasında inkübasyona bırakıldı. Her 12 saatte hemoliz özellikleri bakımından ışık altında inceleme yapıldı. Ekim çevresinde şeffaf veya beyaz renkte üreme gösteren ve etrafında hemoliz zonu oluşturmayan koloniler gama hemoliz şeklinde *E. faecium* bakımından pozitif yönde değerlendirildi (Harrigan 1998).

API 20 Strep Testi

E. faecium izolatlarının identifikasyonlarının doğrulanması amacıyla API 20 Strep testi uygulandı. İzolatlar TSA'da 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Taze kültürlerden üreticinin ugulanma prosedürleri doğrultusunda 37°C'de mikroaerofilik ortamda (%10 CO_2) 24 saat inkübasyona bırakıldı. Elde edilen sonuçlar kaydedildi ve API Web Software programı yardımıyla izolatlar doğrulandı.

İzolatların Muhafazası

Tanımlama testleri sonucunda *E. faecium* olarak tanımlanan izolatlar Brucella Broth muhafaza besiyeri içeren eppendorf tüplere aktarıldı ve antibiyotik dirençlilik testleri ile PCR uygulaması amacıyla -86°C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Testleri

-86°C'de muhafaza edilen *E. faecium* izolatları TSB'ye ekilerek 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Tüplerde üreme gösteren 3-5 koloni alınarak steril vida kapaklı tüplerde bulunan Mueller Hinton Broth'a aktarıldı ve 37°C'de 24 saat inkübe edildi. 0.5 Mc Farland optik dansite olacak şekilde bakteri süspansiyonları hazırlandı. Oluşan süspansiyon yayma plak şeklinde 120x120 mm'lik petrilerde bulunan

Mueller Hinton Agar'a inoküle edildi. İnokülasyondan sonra petriler 37°C'de 5 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında güvenlik kabininde antibiyotik diskleri CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2009, Anonim 2011)'a göre yerleştirilerek 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. *E. faecium*'un antibiyotik duyarlığının belirlenmesinde Çizelge 2.1'de yer alan antibiyotik diskleri kullanıldı. İnkübasyon sonrasında antibiyotik disklerinin etrafında oluşan zon çapları ölçüldü. Elde edilen zon çapları CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2009, Anonim 2011) kriterlerine göre değerlendirildi.

Enterococcus faecium İçin Epsilometre Testi (E Test)

E. faecium olarak identifiye edilen izolatlardan 0.5 Mc Farland düzeyinde hazırlanan süspansiyondan 2 ml alınarak Mueller Hinton Agar'a ekim yapıldı. Ardından vankomisin (Oxoid MA 0102F) test şeritleri uygulandı. 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra E test sonuçları CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2009, Anonim 2011) önerileri doğrultusunda vankomisin için belirtilen kriterlere göre değerlendirildi.

Enterococcus faecium'un PCR Uygulamasıyla *vanA* Gen Tespiti

Örnek Hazırlanması

-86°C'de muhafaza edilen *E. faecium* izolatları ve referans suşlar (ATCC 51559 *E. faecium* ve ATCC 29212 *E. faecalis*) çözündürüldü. Ardından izolatlar TSB bulunan vida kapaklı test tüplerine aktarıldı. 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında DNA ekstraksiyonu için Mc Farland cihazında mikroorganizmaların optik dansitesi 4'e ayarlandı.

DNA Ekstraksiyonu

Araştırmada Fermentas Genomic DNA Purification Kit (K0512, Lot:00075751) kullanıldı. Üreticinin yönergelerine uygun olarak DNA ekstarksiyonu gerçekleştirildi. DNA ekstaksiyonu amacıyla TSB'de Mc Farland değeri 4' ayarlanan izolatlardan 1 ml alındı ve mikro santrifüj (VWR Micro centrifuge tubes 211-0015) tüplerine aktarıldı. 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj (Nüve NF 1200R) edilerek üst kısımda kalan supernatant döküldü. Alt kısımda kalan bakteri pelleti ekstraksiyon

aşamaları için kullanıldı. Pellete otomatik pipet (Nichiryo Nichipet EX) ile 400 µl lizis solüsyonu eklendi ve vortekslendi. 65°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 600 µl kloroform ilave edildi ve 3-5 kez pipete edildi. 10000 rpm'de 2 dakika santrifiye edildi. 80 µl presipitasyon solüsyonu 720 µl steril distile su ile karıştırıldı. DNA içeren üstteki faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 800 µl presipitasyon solüsyonu ilave edildi ve oda sıcaklığında karıştırıldı. 10000 rpm'de 2 dakika santrifiye edildi. Supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Oluşan pellet 100 µl NaCl solüsyonu içerisinde çözündürüldü ve vortekslendi. Pellete presipite olması amacıyla 300 µl soğutulmuş etanol eklendi ve -20°C'de 10 dakika bekletildi. 10000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Etanol mikrotüpten tamamen uzaklaştırıldı. Pellet 100 µl steril distile su ile vortekslenerek çözündürüldü. Kullanılıncaya kadar +4°C'de bekletildi.

PCR Mix Solüsyonu Hazırlama

PCR mix solüsyonu için önceden hazırlanmış (Bioneer Accupower Multiplex PCR Premix) olan premiks kullanıldı. Premiks seti, DNA polymerase, dNTP set, $MgCl_2$, stabilizer ve tracking dye'dan oluşmaktadır. Ekstrakte edilen DNA'lardan 2.5µl, forward ve reverse primerlerden 1 µl olacak şekilde ayarlandı ve 20 µl steril distile sudan ilave edildi.

Primerler

E. faecium'un vankomisine karşı direnç geninin tespit edilmesinde NCBI-BLAST programı kullanılarak *vanA* geninin aşağıda belirtilen forward ve reverse primer dizileri kullanıldı. *vanA* Forward (5' GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC 3') *vanA* Reverse (5' CGA TTC AAT TGC GTA GTC CAA 3') olarak belirlendi. Kullanılan primerlerin 231 bp uzunluğundaki bir gen bölgesini amplifiye ettiği doğrulandı.

Agaroz Jelin Dökülmesi

%1.5'luk agaroz jel elektroforez tankının (Thermoscientific OWL Easy Cast B2) içerisine döküldü. Jel, katılaşması için elektroforez tankının içerisinde 30-45 dk arasında bekletildi.

PCR Amplifikasyonu

Elde edilen bakteri DNA'larının PCR amplifikasyonu için bazı araştırmacıların (Bell ve ark 1998, Yayla 2007) bildirdikleri thermal cycle koşulları uygulandı (Çizelge2.4).

Çizelge 2.4. *vanA* Geni İçin Uygulanan Thermal Cycle Koşulları.

Sıcaklık	Süre	İşlem
94°C'de	3 dk	İlk Denaturasyon
94°C'de*	30 sn	Denaturasyon
55°C'de*	30 sn	Annealing (Primer bağlanması)
72°C'de*	1 dk	Extension (Primer uzaması)
72°C'de	5 dk	Final Extension (Son Uzama)

* 30 döngü

Elektroforez

İçerisinde %1.5'luk agaroz jel bulunan elektoforez tankının kuyucuklarına amplifiye edilen DNA, pozitif kontrol amacıyla *vanA* geni taşıyan ATCC 51559 *E. faecium* referans suş ile negatif kontrol amacıyla *vanA* geni taşımayan ATCC 29212 *E. faecalis* referans suş örneklerinden 5'er µl mikropipet yardımıyla aktarıldı. Loading dye (Fermentas 6X DNA Loading Dye ≠R0611 Lot:00066284) ve marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ≠SM0321 Lot: 00050227) karışımından 5 µl alınarak en baştaki ve en sondaki kuyucuklara aktarıldı. Elektroforez cihazında (Thermo Scientific EC-300XL2) 90 volt 40 miliamper akım şiddetinde 1 saat bekletildi.

UV Transilluminatör ile Görüntüleme

Elektoforez işleminin ardından *E. faecium* için *vanA* gen varlığını gösteren amplifiye DNA numune sonuçları UV transilluminatörde (DNR Bio Imaging Systems Minibispro) görüntülendi.

Lactobacillus Cinsi Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması, Antibiyotik Dirençlilik Testleri ve *mecA, tetM ve vanA* Genlerinin PCR ile Belirlenmesi

Lactobacillus Cinsi Bakterilerin İzolasyonu ve Tanımlanması

Lactobacillus cinsi bakterilerin izolasyon ve tanımlanması amacıyla hazırlanan dilüsyonlardan De Man Rogosa Sharpe (MRS) Agar'a (Oxoid CM 0361) dökme plak yöntemiyle ekim yapıldı. 37°C'de anaerobik koşullarda 48-72 saat inkübasyona bırakıldı. MRS Agar'da yuvarlak, etrafında hale bulunmayan, beyaz renkli üreme gösteren koloniler şüpheli *Lactobacillus* olarak değerlendirildi (Harrigan 1998). Şüpheli kolonilerden 3-5 adet yuvarlak uçlu öze yardımıyla alındı ve steril vida kapaklı tüp içerisinde bulunan De Man Rogosa Sharpe (MRS) Broth'a (Oxoid CM 0359) aktarıldı. 37°C'de 48 saat anaerobik ortamda inkübasyona bırakıldı. Ardından yuvarlak uçlu öze yardımıyla tek koloni düşecek şekilde MRS Agar'a ekimleri gerçekleştirildi. 37°C'de anaerobik ortamda 48 saat inkübe edildi. Üreyen şüpheli kolonilere API 50 CH test kiti yardımıyla tanımlayıcı analizler gerçekleştirildi. *L. plantarum* ve *L. curtavus*'u tanımlayıcı testler yapıldı ve sonuçlar API Web Software programı ile değerlendirildi.

Gram Boyama

Yuvarlak uçlu öze ile MRS Agar'dan alınan kolonilerin lama tespiti yapıldı. Şüpheli kolonilerden hazırlanan preparat kristal viyole ile 1 dk boyandı. Distile suyla yıkandıktan sonra lugol ile 30 sn muamele edildi. Preparat saf etil alkol ile 10-15 sn kolorasyon işlemine tabi tutuldu. Distile suyla yıkandı. Safranin ile 30 sn boyandı. Mikroskobun 100'lük objektifinde immersiyon yağı (Merck 1.04699) vasıtasıyla incelendi. Pembe renkle boyanmış gram pozitif (+), basil tarzında, tek tek veya zincir şeklinde olanlar değerlendirildi (Harrigan 1998).

API 50 CH Testi

Lactobacillus cinsi olarak tanımlanan izolatların türünün belirlenmesi için API 50 CH test kitlerinden yararlanıldı. API 50 CH tanımlama kiti farklı biyokimyasal test substratlarını içeren ve mikroorganizmaların karbonhidrat metabolizmasının çalışılmasını sağlayan 49 adet mikrotüp ve 1 adet kontrol tüpünden oluşmaktadır. API 50 CHL Medium'a MRS Agar'da üreyen bakteri kültüründen

aktarma yapılarak bakteri süspansiyonu üreticinin belirlediği aşamalar dahilinde hazırlandı. 50 kuyucuğa, steril pipet kullanılarak inokülasyonlar yapıldı. Daha sonra kuyucukların üst kısmı mineral yağ kullanılarak kapatıldı. 37ºC'de anaerobik koşullarda 48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda indikatör içeren mikrotüplerdeki besi ortamı renginin söz konusu karbonhidrat fermantasyonuna ve ortam içinde yer alan bir pH indikatörü aracılığıyla saptanan asit üretimine bağlı olarak mordan sarıya dönüşmesi durumunda sonuç pozitif, rengin aynı kalması durumunda ise negatif olarak değerlendirildi. API Web Software yazılımprogramı vasıtasıyla tür düzeyinde identifiye edildi.

İzolatların Antibiyotik Duyarlılık Testleri

L. plantarum ve *L. curvatus* olarak tanımlanan ve -86°C'de muhafaza edilen izolatlar MRS Broth'a ekilerek 37°C'de anaerobik ortamda 48 saat inkübasyona bırakıldı. Tüplerde üreme gösteren 3-5 koloni steril vida kapaklı tüplerde bulunan Mueller Hinton Broth'a aktarıldı. 37°C'de 24 saat anaerobik ortamda inkübe edildi. Mueller Hinton Broth'da üreyen izolatlardan Mc Farland optik dansitesi 0.5 olan bakteri süspansiyonları hazırlandı. Süspansiyondan yayma plak şeklinde 120x120 mm'lik petrilerde bulunan Mueller Hinton Agar'a inoküle edildi. İnokülasyondan sonra petriler 37°C'de 5 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra güvenlik kabininde antibiyotik diskleri CLSI (Anonim 2007a)'nin önerileri doğrultusunda yerleştirildi. 37°C'de anaerobik ortamda 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İzolatlara Çizelge 2.1'de gösterilen antibiyotik diskleri uygulandı. Sonuçlar CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2011) kriterlerine göre değerlendirildi.

***Lactobacillus plantarum* ve*Lactobacillus curvatus* Olarak Tanımlanan İzolatlar İçin Epsilometre Testi (E Test)**

L. plantarum ve *L. curvatus* izolatlarının MİK seviyelerinin tespiti amacıyla izolatlara E Test uygulandı. Mueller Hinton Broth'da 0.5 Mc Farland optik dansite şeklinde hazırlanan bakteri süspansiyonlarından 2 ml Mueller Hinton Agar'a yayma plak şeklinde güvenlik kabininde ekildi. Ardından steril pens yardımıyla 0.012-256 µg/ml düzeyinde oksasilin (Oxoid MA 0114F), tetrasiklin (Oxoid MA 0105F), vankomisin (Oxoid MA 0102F) E test şeritleri kullanıldı. Sonuçlar CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2011) kriterlerine göre değerlendirildi.

Lactobacillus plantarum ve *Lactobacillus curvatus'un* PCR Uygulamasıyla *mecA*, *tetM* ve *vanA* Genlerinin Tespiti

Örnek Hazırlanması

L. plantarum ve *L. curvatus* olarak tanımlanan ve -86°C'de muhafaza edilen izolatlar TSB bulunan vida kapaklı test tüplerine aktarıldı. 37°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında izolatlara DNA ekstraksiyonu yapabilmek amacıyla mikroorganizmaların optik dansitesi Mc Farland cihazında 4'e ayarlandı.

DNA Ekstraksiyonu

Araştırmada Fermentas Genomic DNA Purification Kit (K0512, Lot:00075751) kullanıldı. Üreticinin yönergelerine uygun olarak DNA ekstarksiyonu gerçekleştirildi. DNA ekstaksiyonu amacıyla TSB'de Mc Farland değeri 4' ayarlanan izolatlardan 1 ml alındı ve mikro santrifüj (VWR Micro centrifuge tubes 211-0015) tüplerine aktarıldı. 10.000 rpm'de 2 dk santrifüj (Nüve NF 1200R) edilerek üst kısımda kalan supernatant döküldü. Alt kısımda kalan bakteri pelleti ekstraksiyon aşamaları için kullanıldı. Pelletin üzerine otomatik pipet (Nichiryo Nichipet EX) ile 400 µl lizis solüsyonu eklendi ve vortekslendi. 65°C'de 5 dakika inkübasyona bırakıldı. 600 µl kloroform ilave edildi ve 3-5 kez pipete edildi. 10000 rpm'de 2 dakika santrifiye edildi. 80 µl presipitasyon solüsyonu 720 µl steril distile su ile karıştırıldı. DNA içeren üstteki faz yeni bir mikrosantrifüj tüpüne alındı ve 800 µl presipitasyon solüsyonu ilave edilerek oda sıcaklığında karıştırıldı. 10000 rpm'de 2 dakika santrifiye edildi. Oluşan supernatant mikropipet yardımıyla uzaklaştırıldı. Pellet 100 µl NaCl solüsyonu içerisinde çözündürüldü ve vortekslendi. Pellete presipite olması amacıyla 300 µl soğutulmuş etanol eklendi. -20°C'de 10 dakika bekletildi. 10000 rpm'de 4 dakika santrifüj edildi. Etanol mikrotüpten tamamen uzaklaştırıldı. Pellet 100 µl steril distile su ile vortekslenerek çözündürüldü. Kullanılıncaya kadar +4°C'de bekletildi.

PCR Mix Solüsyonu Hazırlama

PCR mix solüsyonu için önceden hazırlanmış (Bioneer Accupower Multiplex PCR Premix) olan premiks kullanıldı. Premiks seti, DNA polymerase, dNTP set,

$MgCl_2$, stabilizer ve tracking dye'dan oluşmaktadır. Ekstrakte edilen DNA'lardan 2.5 µl, forward ve reverse primerlerden 1 µl olacak şekilde ayarlandı ve 20 µl steril distile sudan ilave edildi.

Primerler

L. plantarum ve *L. curvatus* izolatlarının *mecA, tetM* ve *vanA* genlerinin belirlenmesine yönelik yapılacak uygulamalarda Çizelge 2.5'te belirtilen primer dizileri kullanıldı.

Çizelge 2.5. *Lactobacillus plantarum ve Lactobacillus curvatus* İzolatlarında *mecA, tetM ve vanA* Genlerinin Belirlenmesinde Yönelik Primer Dizileri.

Gen	Primer (5'-----3')	Uzunluk (bp)
mecA1	AAA ATC GAT GGT AAA GGT TGG C	533
mecA2	AGT TCT GCA GTA CCG GAT TTG C	
tetM1	ACA GAA AGC TTA TTA TAT AAC	171
tetM2	TGG CGT GTC TAT GAT GTT CAC	
vanA1	GTA GGC TGC GAT ATT CAA AGC	231
vanA2	CGA TTC AAT TGC GTA GTC CAA	

Agaroz Jelin Dökülmesi

%1.5'luk agaroz jel elektroforez tankının (Thermoscientific OWL Easy Cast B2) içerisine döküldü. Jel, katılaşması için elektroforez tankının içerisinde 30-45 dk arasında bekletildi.

PCR Amplifikasyonu

Numunelerden izole edilen *L. plantarum* ve *L. curvatus* DNA'larının PCR amplifikasyonu için Çizelge2.6'da belirtilen thermal cycle koşulları uygulandı.

Çizelge 2.6. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* İzolatlarında *mecA*, *tetM* ve *vanA* Genlerinin Belirlenmesinde Uygulanan Themal Cycle Koşulları.

Gen	Sıcaklık	Süre	İşlem
mecA	94°C'de*	30 sn	Denaturasyon
	55°C'de*	30 sn	Annealing (Primer bağlanması)
	72°C'de*	1 dk	Extension (Primer uzaması)
	72°C'de	5 dk	Final Extension (Son Uzama)
tetM	94°C'de	3 dk	İlk Denaturasyon
	94°C'de**	30 sn	Denaturasyon
	55.2°C'de**	30 sn	Annealing (Primer bağlanması)
	72°C'de**	45 sn	Extension (Primer uzaması)
	72°C'de	7 dk	Final Extension (Son Uzama)
vanA	94°C'de	3 dk	İlk Denaturasyon
	94°C'de***	30 sn	Denaturasyon
	55°C'de***	30 sn	Annealing (Primer bağlanması)
	72°C'de***	1 dk	Extension (Primer uzaması)
	72°C'de	5 dk	Final Extension (Son Uzama)

* 40 döngü, ** 25 döngü, *** 30 döngü

Elektroforez

Her bir izolat için yapılan elektroforez aşamasında, içerisinde %1.5'luk agaroz jel bulunan elektoforez tankının kuyucuklarına amplifiye edilen DNA, ilgili gene ait pozitif kontrol referans suş örneklerinden 5'er µl mikropipet yardımıyla aktarıldı. Loading dye (Fermentas 6X DNA Loading Dye ≠R0611 Lot:00066284) ve marker (Fermentas GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder ≠SM0321 Lot: 00050227) karışımından 5 µl alınarak en baştaki ve en sondaki kuyucuklara aktarıldı. Elektroforez cihazında (Thermo Scientific EC-300XL2) 90 volt 40 miliamper akım şiddetinde 1 saat bekletildi.

UV Transilluminatör ile Görüntüleme

Elektoforez işleminin ardından *L. plantarum* ve *L. curvatus* bakterileri için *mecA, tetM ve vanA* gen varlığını gösteren amplifiye DNA sonuçları UV transilluminatörde (DNR Bio Imaging Systems Minibispro) görüntülendi ve sonuçlar değerlendirildi.

2.3. Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırmadan elde edilen verilerin analizinde SPSS paket programı (versiyon 17) kullanıldı. Verilere yüzde (%), aritmetik ortalama ($\bar{X}$) kullanılarak temel tanımlayıcı istatistikler uygulandı ve ortaya çıkan sonuçlar değerlendirildi. İstatistiksel ilişkilerin belirlenmesi amacıyla verilere iki örnek bağımsız t testi uygulandı ve ortaya çıkan farklılıklar $p<0.05$ anlamlılık düzeyi temel alınarak değerlendirildi (Sümbüloğlu ve Sümbüloğlu 2005, Büyüköztürk 2007).

3. BULGULAR

Araştırmada Konya piyasasından farklı firmalara ait 50 adet fermente ve 50 adet ısıl işlem uygulanmış toplam 100 sucuk numunesi, Kasım 2012-Nisan 2013 tarihleri arasında toplandı. Numunelerde *S. aureus, E. coli* ve *E. faecium* kontaminasyonu ile *L. plantarum ve L. curvatus* varlığı araştırıldı. İzolatlara CLSI (Anonim 2007a) ve EUCAST (Anonim 2009, Anonim 2011) tarafından önerilen prosedürler dahilinde agar difüzyon metodu ve epsilometre testi (E Test) kullanılarak farklı antibiyotiklere karşı dirençlilik profilleri ölçüldü. Bununla birlikte moleküler yöntemlerle antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi amacıyla izolatlara PCR metodu kullanılarak *mecA, tetM* ve *vanA* antibiyotik direnç genlerinin varlığı incelendi.

3.1. Sucuk Numunelerine Ait Fiziko-Kimyasal Analiz Sonuçları

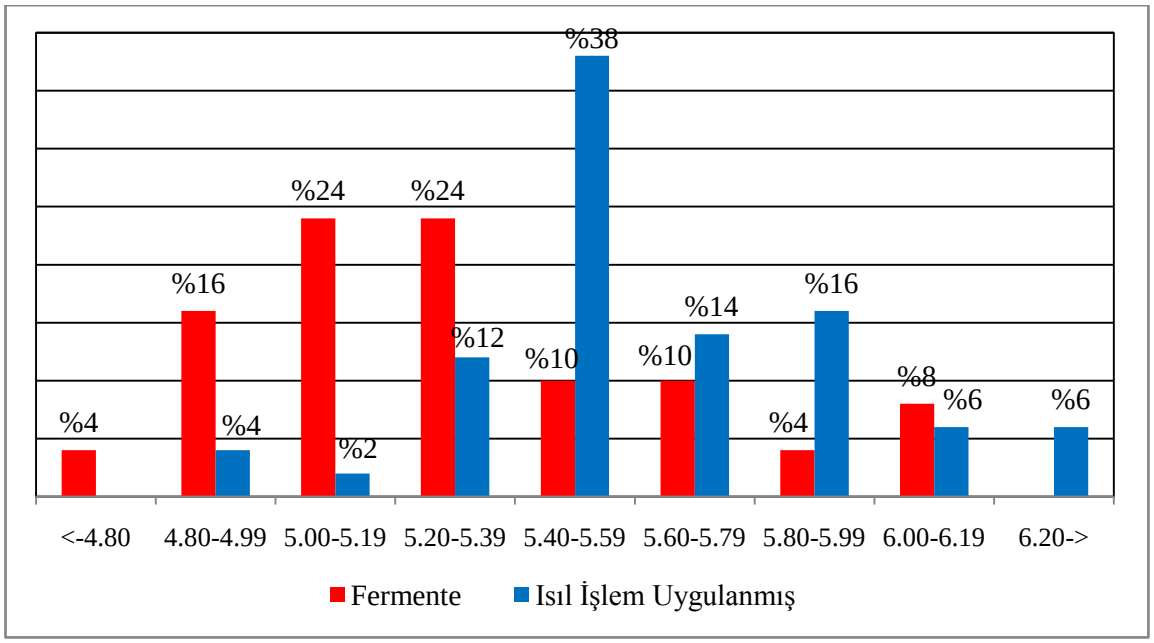
Piyasadan temin edilen fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerine ilişkin ortalama ($\bar{X}$±SE) pH, su aktivitesi (a_w), nisbi rutubet (%), toplam kuru madde (%), toplam kuru maddede yağ (%) değerleri Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Sucuk Numunelerine Ait Fiziko-Kimyasal Analiz Sonuçları.

	Grup	n	$\bar{X}$±SE	t	p
pH	1	50	5,29±0,05	4,140	0,000
	2	50	5,59±0,04		
Su aktivitesi (a_w)	1	50	0,94±0,00	3,689	0,000
	2	50	0,95±0,00		
Nisbi Rutubet (%R_h)	1	50	34,47±0,54	1,307	0,194
	2	50	35,87±0,92		
Toplam Kuru Madde (%)	1	50	65,52±0,54	1,307	0,194
	2	50	64,12±0,92		
Toplam Kuru Maddede Yağ Oranı (%)	1	50	29,05±0,55	5,377	0,000
	2	50	32,68±0,38		

[1] Fermente Sucuk [2] Isıl İşlem Uygulanmış Sucuk

Çizelge 3.1 incelendiğinde, fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinden elde edilen pH değerlerinin ortalaması ($\bar{X}$±SE) sırasıyla 5,29±0,05; 5,59±0,04 olarak belirlendi. Ortaya çıkan farklılıkların anlamlı olduğu saptandı ($p<0,000$). Şekil 3.1'de fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuklardan elde edilen pH değerlerinin dağılımı gösterilmektedir.



Şekil 3.1. Sucuk Numunelerine Ait pH Sonuçlarının Dağılımı.

Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuklarda su aktivitesi (a_w) ortalama değerlerinin sırasıyla 0,94±0,00, 0,95±0,00 olduğu tespit edildi. Her iki grup arasındaki farklılıklar anlamlı bulundu ($p<0.000$). Sucuk numuneleri nisbi rutubet bakımından değerlendirildiğinde, fermente sucuklarda ortalama 34,47±0,54, ısıl işlem uygulanmış numunelerde ise ortalama 35,87±0,92 değerleri saptandı. Her iki grupta nisbi rutubet değerleri bakımından istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir farklılık ortaya çıkmadı ($p>0,194$) (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1'den görüleceği üzere, fermente sucuklarda toplam kuru madde ortalama 65,52±0,54, ısıl işlem uygulanmış numunelerde ise 64,12±0,92 olarak belirlendi. Her iki grup arasında anlamlı bir farklılığın ortaya çıkmadığı saptandı ($p>0,194$). Araştırma sonuçlarına göre fermente sucuk numunelerinde toplam kuru maddede yağ oranı (%) ortalama 29,05±0,55, ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinde ise ortalama 32,68±0,38 olarak tespit edildi. Gruplar arasında istatistiksel açıdan anlamlı düzeyde farklılığın olduğu belirlendi ($p<0,000$) (Çizelge 3.1).

3.2. Sucuk Numunelerine Ait Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

3.2.1. Toplam Mezofilik Aerobik Mikroorganizma (TMAM) Sayısı

Mikrobiyolojik analizler sonucunda sucuk numunelerine ilişkin TMAM analiz sonuçları Çizelge 3.2'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. Sucuk Numunelerine Ait TMAM Sayısı (log_{10} kob/g).

	Grup	n	$\bar{X}$±SE	t Değeri	p
TMAM	1	50	10,84±0,68	6,393	0,000
	2	50	5,72±0,41		

[1] Fermente Sucuk [2] Isıl İşlem Uygulanmış Sucuk

Fermente sucuk numunelerinde ortalama ($\bar{X}$ ±SE) TMAM sayıları (log_{10} kob/g) 10,84±0,68, ısıl işlem uygulanmış numunelerde ise 5,72±0,41 olarak tespit edildi. Her iki grup TMAM sayıları arasında anlamlı farklılık tespit edildi ($p<0,000$) (Çizelge 3.2).

3.2.2. *Staphylococcus aureus* Sayısı

Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinden mikrobiyolojik analizler sonucunda elde edilen *S. aureus* sonuçları Çizelge 3.3'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.3. Sucuk Numunelerinde *Staphylococcus aureus* Sayısı (log_{10} kob/g).

	Grup	n	$\bar{X}$±SE
S. aureus	1	50	1,84±0,34
	2	50	-

[1] Fermente Sucuk [2] Isıl İşlem Uygulanmış Sucuk

Çizelge 3.3 incelendiğinde, fermente sucuk numunelerine ait *S. aureus* sayı ortalamasının 1,84±0,34 olduğu, ısıl işlem uygulanmış numunelerden ise izole edilemediği belirlendi. *S. aureus* numuneleri içerisinden yapılan API Staph tanımlama testleri sonucunda 9 izolat *S. aureus* olarak belirlendi.

3.2.3. Koliform Bakteri Sayısı

Koliform bakterileri yönünden fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuk numuneleri incelendiğinde (Çizelge 3.4) sayı ortalamalarının sırasıyla 1,07±0,31,

0,26±0,11 olduğu saptandı. Her iki gruba ait tespit edilen sayı ortalamaları arasında anlamlı farklılığın oluştuğu belirlendi ($p<0,05$).

Çizelge 3.4. Sucuk Numunelerine Ait Koliform Bakteri Sayısı (log_{10} kob/g).

	Grup	n	$\bar{X}$±SE	t Değeri	p
Koliform Bakteri	1	50	1,07±0,31	2,449	0,016
	2	50	0,26±0,11		

[1] Fermente Sucuk [2] Isıl İşlem Uygulanmış Sucuk

Şüpheli izolatlara API 20 E uygulanarak gerçekleştirilen identifikasyon testleri sonucunda, koliform bakteri şüpheli izolatlardan 2'si *E. coli* olarak identifiye edildi.

3.2.4. *Enterococcus* ssp. Sayısı

Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinden elde edilen *Enterococcus* soyuna ait bakteri sayı ortalamasının sırasıyla 2,88±0,42 ve 0,70±0,23 olduğu, gruplar arasında anlamlı farklılığın ortaya çıktığı tespit edildi ($p<0,000$) (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5. Sucuk Numunelerine Ait *Enterococcus* ssp. Sayısı (log_{10} kob/g).

	Grup	n	$\bar{X}$±SE	t Değeri	p
Enterococcus ssp.	1	50	2,88±0,42	4,494	0,000
	2	50	0,70±0,23		

[1] Fermente Sucuk [2] Isıl İşlem Uygulanmış Sucuk

Numunelerden elde edilen şüpheli izolatlara yapılan API Strep test sonucunda 12 izolat *E. faecium* olarak tanımlandı.

3.2.5. Laktik Asit Bakteri Sayısı

Sucuk numunelerinin laktik asit bakteri sayıları Çizelge 3.6'da gösterilmektedir. Fermente sucuklarda laktik asit bakteri sayı ortalaması 10,59±0,81, ısıl işlem uygulanmış sucuklarda ise 2,75±0,76 olarak belirlendi.

Çizelge 3.6. Sucuk Numunelerinde Laktik Asit Bakteri Sayısı (log_{10} kob/g).

	Grup	n	$\bar{X}$±SE	t Değeri	p
Laktik Asit Bakterileri	1	50	10,59±0,81	7,010	0,000
	2	50	2,75±0,76		

[1] Fermente Sucuk [2] Isıl İşlem Uygulanmış Sucuk

Gruplar arasında laktik asit bakteri sayı ortalamaları bakımından anlamlı düzeyde farklılığın olduğu saptandı (p<0,000) (Çizelge 3.6). İzolatlara API 50 CH test kiti uygulandı ve sonuçlar API Web Software programı yardımıyla değerlendirildi. Değerlendirme neticesinde 17 izolat *L. plantarum*, 11 izolat *L. curvatus*, 19 izolat *L. brevis*, 3 izolat *L. salivarius*, 5 izolat *Leuconostoc mesenteroides*, 3 izolat *L. delbrueckii*, 1 izolat *Carnobacterium maltoramaticum*, 1 izolat *C. divergens*, 4 izolat *L. acidophilus*, 7 izolat *L. paracasei*, 3 izolat *Weissella confusa*, 5 izolat *L. lactis*, 2 izolat *W. viridescens*, 1 izolat *P. pentosaceus*, 3 izolat *Leu. lactis*, 1 izolat *L. fermentum* olarak tanımlandı. Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinde 16 farklı mikroorganizma türü tespit edilmiş olup, *Lactobacillus* cinsi bakterilerin dominant olduğu ve *L. brevis* (%22,09), *L. plantarum* (%19,76) ve *L. curvatus* (%12,79)'un en yaygın bulunan türler olduğu belirlendi. Buna karşın izole edilen türler arasında *L. sake* identifiye edilmedi.

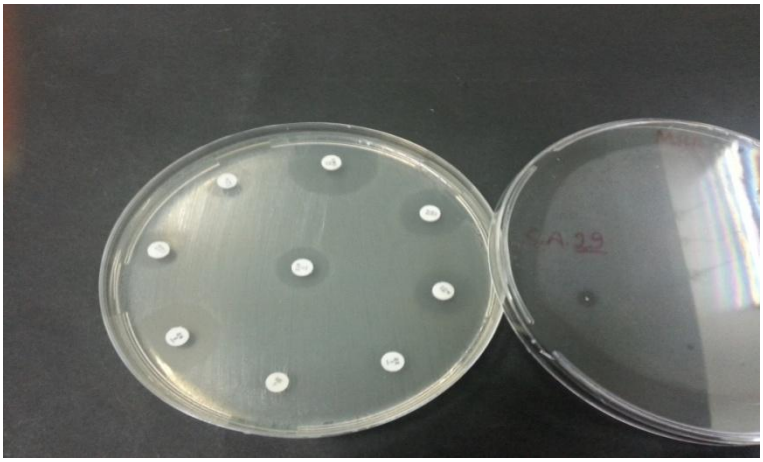
3.3. Antibiyotik Dirençlilik Bulguları

Kültürel yöntemlerle izolasyon ve identifikasyonu yapılan *S. aureus*, *E. coli*, *E. faecium*, *L. plantarum* ve *L. curvatus* türlerine ait izolatlara antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi için yapılan agar difüzyon yöntemine göre *S. aureus* izolatlarının %100'ünün amoksisilin/klavulanik aside, %66,6'sının gentamisine, %55,6'sının klindamisine, %44,4'ünün siproflaksosine, %66,7'sinin teikoplanine, %77,8'inin tetrasikline, %66,7'sinin vankomisine duyarlı olduğu tespit edildi (Çizelge 3.7) (Resim 3.1).

Çizelge 3.7. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları.

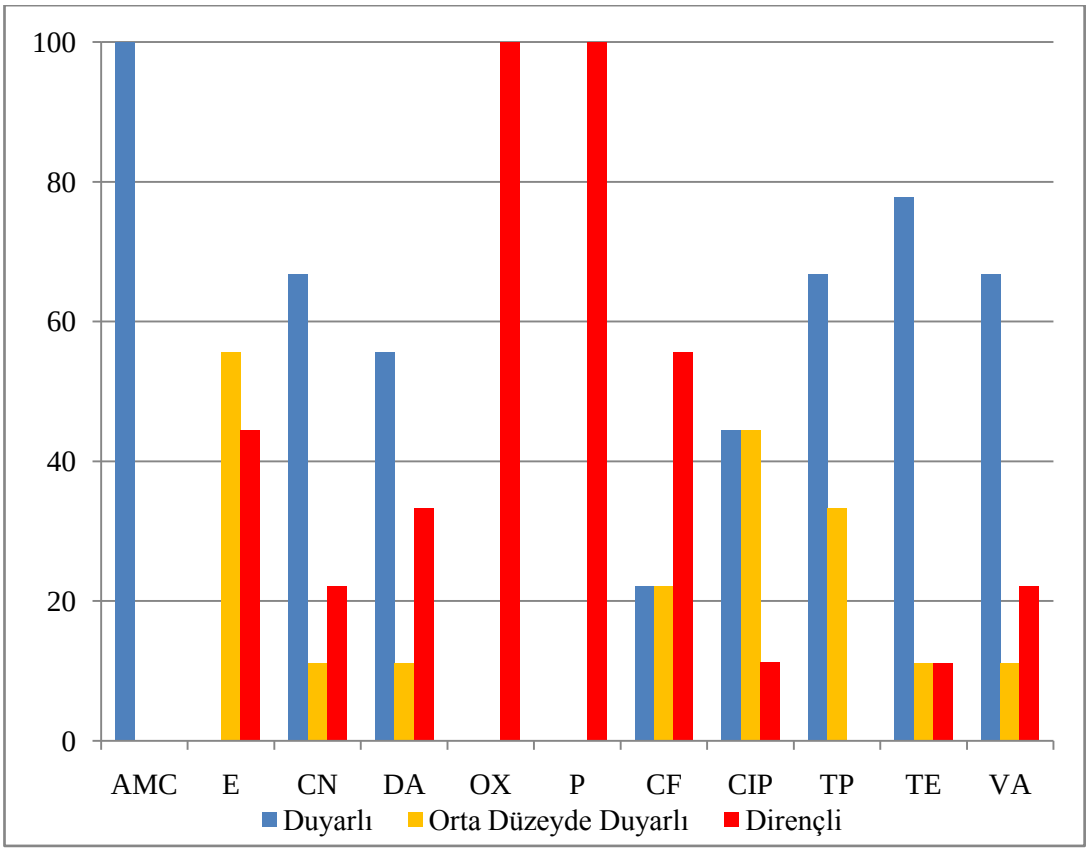
Antibiyotik	İzolatlar								
	1	2	4	5	6	7	8	28	29
Amoksilin/Klavulanik Asit	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Eritromisin	I	R	I	I	I	R	R	I	R
Gentamisin	R	I	S	S	R	S	S	S	S
Klindamisin	I	R	S	S	S	R	R	S	S
Oksasilin	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Penisilin G	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Sefalothin	I	R	R	R	R	I	R	S	S
Siproflaksosin	I	I	I	S	S	S	S	R	I
Teikoplanin	S	I	I	I	S	S	S	S	S
Tetrasiklin	I	S	S	S	R	S	S	S	S
Vankomisin	S	R	R	I	S	S	S	S	S

S: Duyarlı, I:Orta Düzeyde Duyarlı, R: Dirençli



Resim 3.1. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Görüntüsü.

Bununla birlikte *S. aureus* izolatlarının %55,5'inin eritromisine, %11,1'inin gentamisine, %11,1'inin klindamisine, %22,2'sinin sefalothine, %44,4'ünün siproflaksosine, %33,3'ünün teikoplanine, %11,1'inin tetrasikline ve %11,1'inin vankomisine orta düzeyde duyarlı profilde olduğu belirlendi (Şekil 3.2).



AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit, E: Eritromisin, CN: Gentamisin, DA: Klindamisin, OX: Oksasilin, P: Penisilin G, CF: Sefalothin, CIP: Siproflaksosin, TP: Teikoplanin,TE: Tetrasiklin, VA: Vankomisin

Şekil 3.2. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Sonuçlarının Dağılımı.

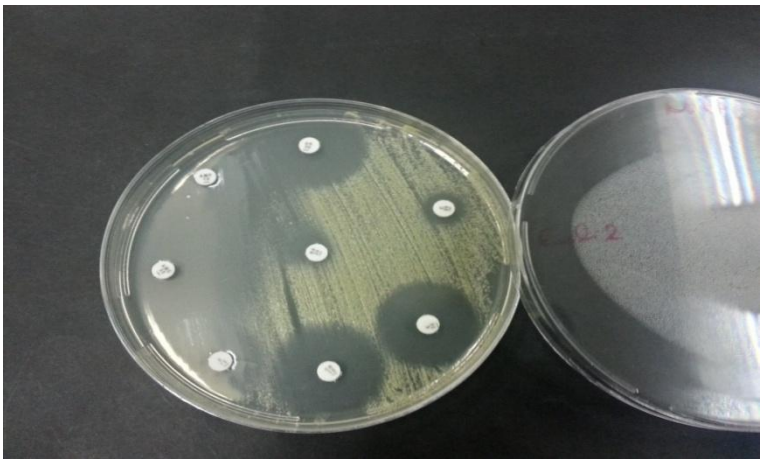
S. aureus izolatlarının %44,4'ünün eritromisin, %22,2'sinin gentamisin, %33,3'ünün klindamisin, %100'ünün oksasilin ve penisilin G, %55,6'sının sefalothin, %11,1'inin siproflaksosin, tetrasiklin ve vankomisine dirençli olduğu tespit edildi (Şekil 3.2).

Antibiyotik duyarlılık sonuçları bakımından *E. coli* izolatlarının %100'ünün amikasin, ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit, eritromisin, gentamisin, kanamisin, streptomisin, trimethoprim/sulfamethakzol ve tetrasikline karşı duyarlı, %50'sinin kloramfenikole karşı orta düzeyde duyarlı, %50'sinin ise kloramfenikol ve nalidiksik aside karşı dirençli profile sahip olduğu saptandı (Şekil 3.3) (Resim 3.2).

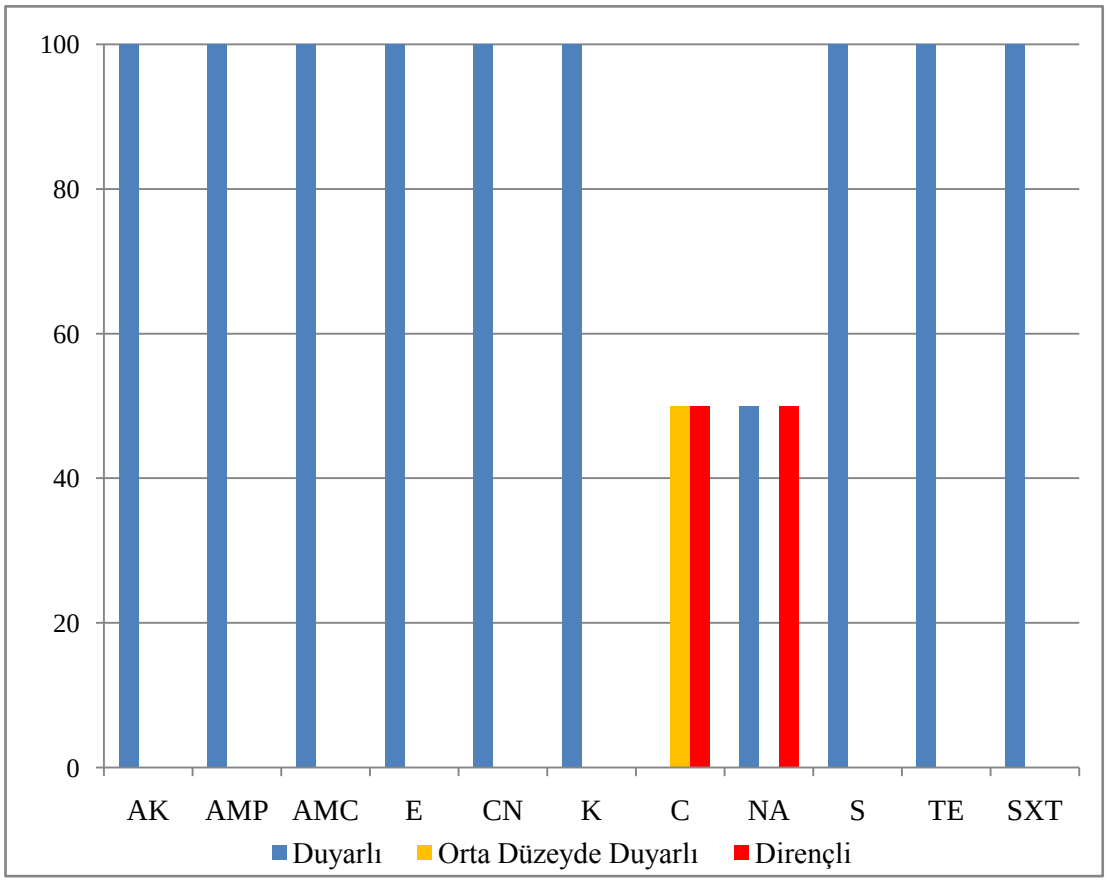
Çizelge 3.8. *Escherichia coli* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları.

Antibiyotik (Konsantrasyon)	İzolatlar	
	2	5
Amikasin	S	S
Ampisilin	S	S
Amoksislin/Klavulanik Asit	S	S
Eritromisin	S	S
Gentamisin	S	S
Kanamisin	S	S
Kloramfenikol	R	I
Nalidiksik Asit	R	S
Streptomisin	S	S
Tetrasiklin	S	S
Trimethoprim/Sulfamethakzol	S	S

S: Duyarlı, I:Orta Düzeyde Duyarlı, R: Dirençli



Resim 3.2. *Escherichia coli* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Görüntüsü.



AK: Amikasin, AMP: Ampisilin, AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit, E: Eritromisin, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, C: Kloramfenikol, NA: Nalidiksik Asit,S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin, SXT:Trimethoprim/Sulfamethakzol

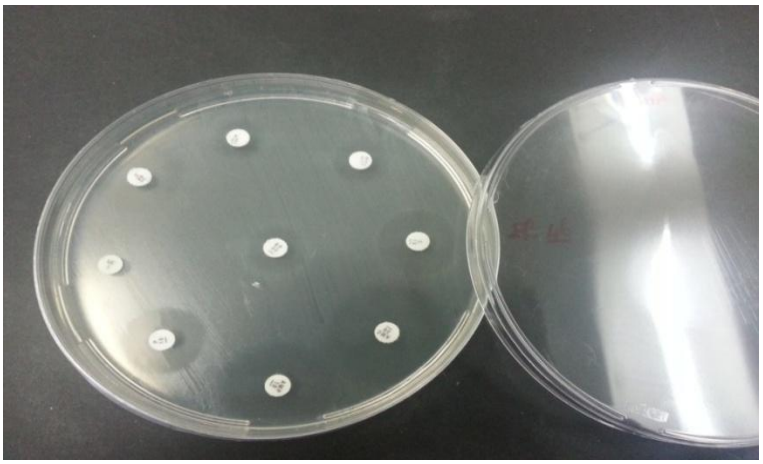
Şekil 3.3. *Escherichia coli* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Sonuçlarının Dağılımı.

E. faecium izolatlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları Çizelge 3.9'da gösterilmektedir. İzolatların %100'ünün ampisilin, amoksisilin/klavulanik asit ve kloramfenikole, %33,3'ünün eritromisine, %33,3'ünün gentamisine, %91,7'sinin penisilin G'ye, %8,3'ünün siproflaksosine, %91,6'sının streptomisine, %50'sinin tetrasikline, %25'inin trimethoprim/sulfamethakzole, %33,3'ünün vankomisine karşı duyarlı olduğu tespit edildi (Şekil 3.3) (Resim 3.3).

Çizelge 3.9. *Enterococcus faecium* İzolatlarının Antibiyotik Dirençlilik Sonuçları.

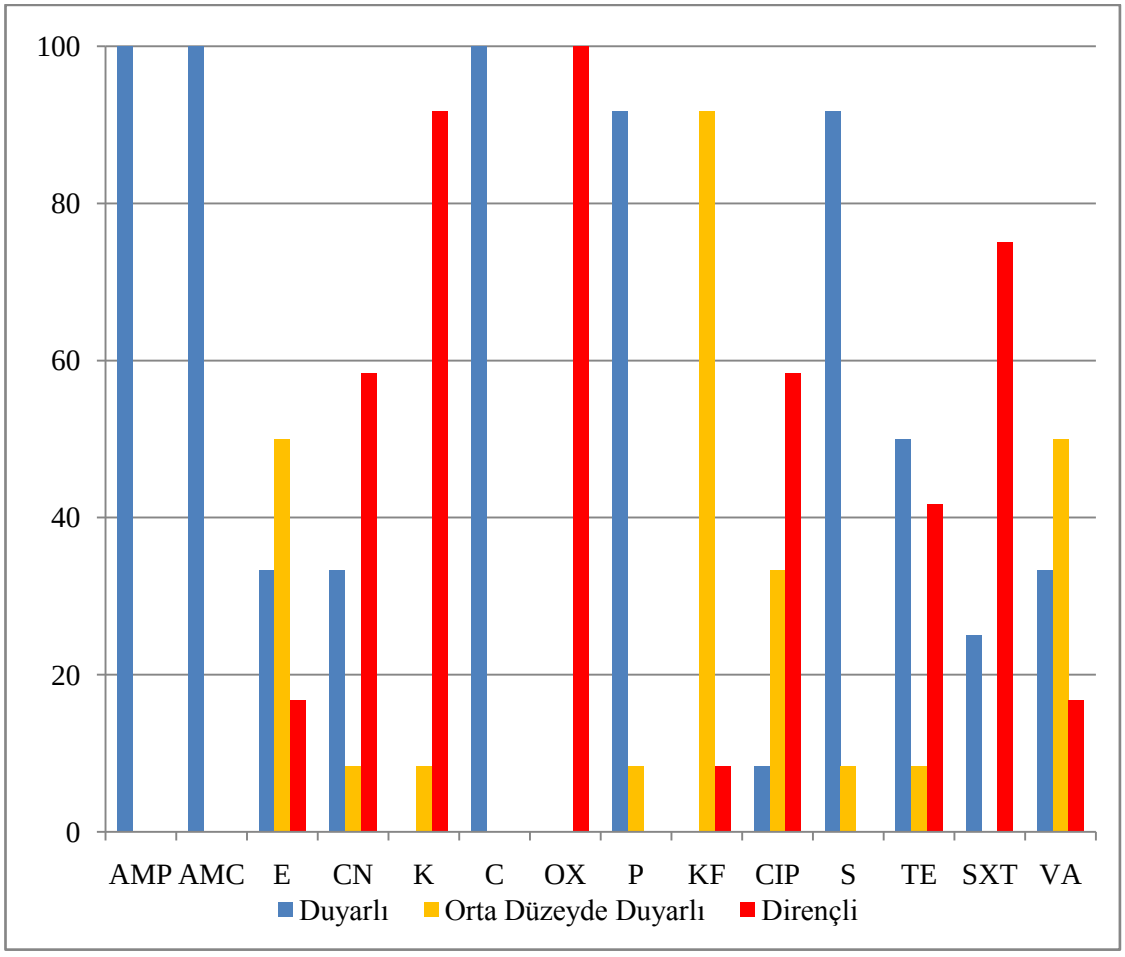
Antibiyotik	İzolatlar											
	1	4	5	6	19	28	29	30	42	46	47	48
Ampisilin	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Amoksisilin/ Klavulanik Asit	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Eritromisin	R	S	I	S	I	I	S	I	I	I	S	R
Gentamisin	R	I	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R
Kanamisin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R
Kloramfenikol	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Oksasilin	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Penisilin G	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	I
Sefalothin	I	I	I	I	I	I	R	I	I	I	I	I
Siproflaksosin	I	I	R	I	R	R	R	R	I	R	S	R
Streptomisin	S	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S
Tetrasiklin	S	S	S	R	S	I	R	S	S	R	R	R
Trimethoprim/ Sulfamethakzol	R	S	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R
Vankomisin	S	S	S	I	R	I	I	R	I	I	S	I

S: Duyarlı, I:Orta Düzeyde Duyarlı, R: Dirençli



Resim 3.3. *Enterococcus faecium* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Görüntüsü.

Ayrıca *E. faecium* izolatlarının %50'sinin eritromisine, %8,3'ünün gentamisin, kanamisine, penisilin G, streptomisin ve tetrasikline, %91,7'sinin sefalothine, %33,3'ünün siproflaksosine, %50'sinin vankomisine karşı orta düzyede duyarlı olduğu belirlendi. Bununla birlikte izolatların %16,7'sinin eritromisine, %58,4'ünün gentamisine, %91,7'sinin kanamisine, %100'ünün oksasiline, %8,3'ünün sefalothine, %58,4'ünün siproflaksosine, %41,6'sının tetrasikline, %75'inin trimethoprim/sulfamethakzole, %16,7'sinin vankomisine dirençli olduğu saptandı (Şekil 3.4).



AMP: Ampisilin, AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit, E: Eritromisin, CN: Gentamisin, K: Kanamisin, C: Kloramfenikol, OX: Oksasilin, P: Penisilin G, KF:Sefalothin,CIP: Siproflaksosin, S: Streptomisin, TE: Tetrasiklin, SXT:Trimethoprim/Sulfamethakzol, VA: Vankomisin

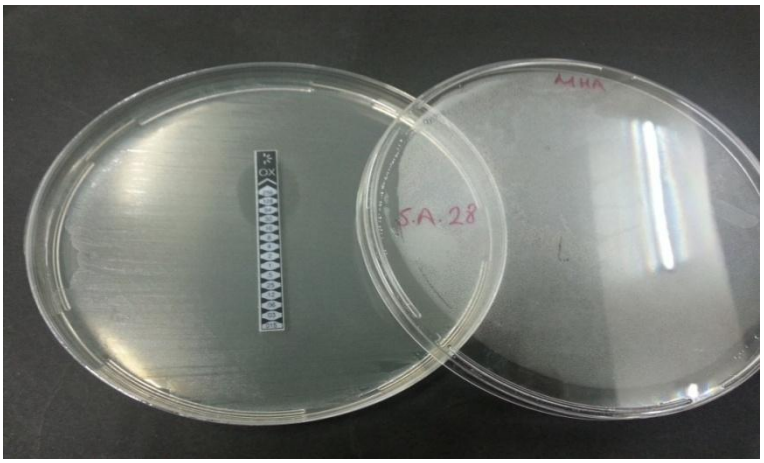
Şekil 3.4. *Enterococcus faecium* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Sonuçlarının Dağılımı.

S. aureus izolatlarının MİK değerinin belirlenmesine yönelik yapılan oksasilin (0,012-256 µg/ml) E test sonuçlarının 4-64 µg/ml, *E. coli* izolatlarının tetrasiklin değerinin 1-4 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi. *E. faecium* suşlarının 1-4 µg/ml vankomisin değerine sahip olduğu belirlendi (Çizelge 3.10) (Resim 3.4, Resim 3.5, Resim 3.6). *S. aureus* izolatlarının %100'ünün oksasiline, *E. coli* izolatlarının %50'sinin tetrasikline, *E. faecium* izolatlarının ise %58,3'ünün vankomisine dirençli olduğu belirlendi.

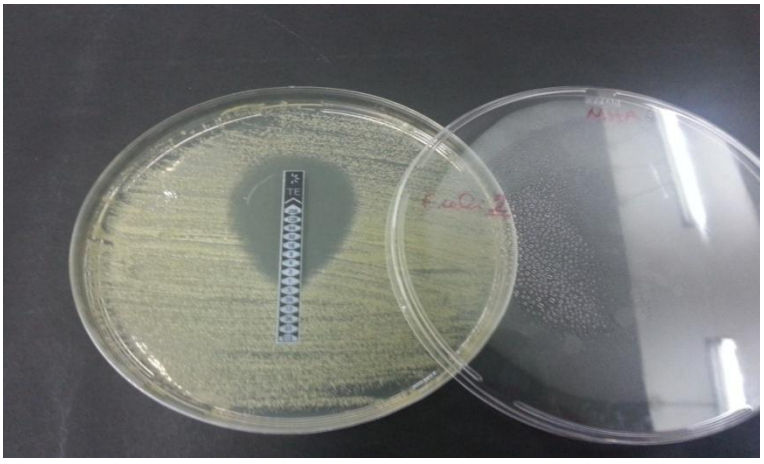
Çizelge 3.10. *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* ve *Enterococcus faecium* İzolatlarının MİK Sonuçları.

Antibiyotik*	İzolat	Üst Limit
Oksasilin	S.A 1	4
	S.A 2	8
	S.A 4	8
	S.A 5	8
	S.A 6	16
	S.A 7	32
	S.A 8	64
	S.A 28	16
	S.A 29	16
Tetrasiklin	E.C 2	4
	E.C 5	1
Vankomisin	E.F 1	2
	E.F 4	2
	E.F 5	4
	E.F 6	4
	E.F 19	4
	E.F 28	2
	E.F 29	2
	E.F 30	4
	E.F 42	4
	E.F 46	4
	E.F 47	1
	E.F 48	4

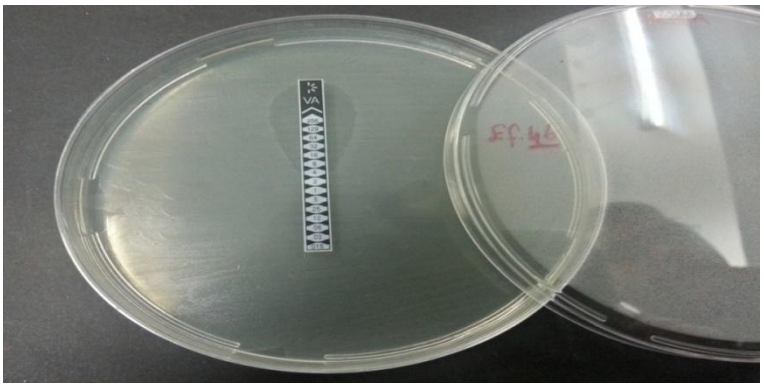
* (0,012-256 µg/ml)
S.A: *S. aureus*, E.C: *E. coli*, E.F: *E. faecium*



Resim 3.4. *Staphylococcus aureus* İzolatlarının E-Test Görüntüsü.



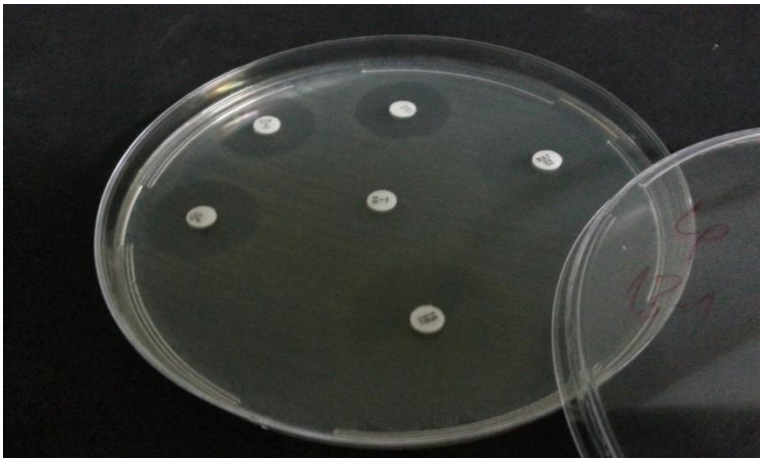
Resim 3.5. *Escherichia coli* İzolatlarının E-Test Görüntüsü.



Resim 3.6. *Enterococcus faecium* İzolatlarının E-Test Görüntüsü.

L. plantarum ve *L. curvatus* izolatlarının %96,4'ü amoksisilin/klavulanik asite, %85,7'sinin eritromisine, %64,2'sinin gentamisine, %42,8'inin kanamisine,

%89,3'ünün kloramfenikole, %53,6'sının penisilin G'ye, %100'ünün ampisiline, %64,3'ünün sefalotine, %57,1'inin siproflaksosine, %92,9'unun streptomisine, %60,7'sinin tetrasikline, %35,7'sinin trimethoprim/sulfamethakzole ve oksasiline, %46,4'ünün vankomisine karşı duyarlı oldukları sonucuna varıldı (Çizelge 3.11) (Resim 3.7).



Resim 3.7. *Lactobacillus plantarum* İzolatlarının Agar Difüzyon Test Görüntüsü.

Belirtilen izolatların %3,6'sının amoksisilin/klavulanik asite, eritromisine ve sefalothine, %14,4'ünün gentamisine, %10,7'sinin kanamisine ve kloramfenikole, %17,9'unun penisilin G'ye, %7,1'inin streptomisin ve tetrasikline karşı orta duyarlılığa sahip oldukları tespit edildi (Çizelge 3.11).

Ayrıca *L. plantarum* ve *L. curvatus* izolatlarının %10,7'sinin eritromisin, % 21,4'ünün gentamisine, %46,5'inin kanamisine, %28,5'inin penisilin G'ye, %32,1'inin sefalothine, %42,9'unun siproflaksosine, %7,1'inin streptomisine, %32,2'sinin tetrasikline, %64,3'ünün trimethoprim/sulfamethakzole ve oksasiline, %53,6'sının vankomisine karşı dirençli oldukları belirlendi (Çizelge 3.11).

Çizelge 3.11. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* İzolatlarının Agar Difüzyon Testi Sonuçları.

İzolat	Antibiyotik						
	AMC	E	CN	K	C	P	AMP
LP 11	S	S	S	S	S	S	S
LP 13	S	S	S	R	S	R	S
LP 15	S	R	R	R	S	R	S
LP 24	S	S	S	R	S	R	S
LP 31	S	S	S	S	S	S	S
LP 41	S	S	I	I	S	S	S
LC 45	S	S	I	R	I	R	S
LP 51	S	S	S	R	S	R	S
LP 61	S	S	I	R	S	R	S
LP 64	S	S	S	R	S	R	S
LP 73	I	I	I	I	I	I	S
LP 74	S	S	R	I	I	S	S
LP 84	S	S	S	S	S	S	S
LP 131	S	S	R	R	S	I	S
LP 143	S	R	R	R	S	I	S
LP 401	S	S	I	R	S	I	S
LC 405	S	R	R	R	S	I	S
LP 482	S	S	R	S	S	S	S
LC 554	S	S	S	S	S	S	S
LP 802	S	S	S	R	S	S	S
LC 813	S	S	S	S	S	S	S
LC 814	S	S	S	R	S	R	S
LC 822	S	S	S	S	S	S	S
LC 871	S	S	S	S	S	S	S
LC 873	S	S	S	S	S	S	S
LC 982	S	S	S	S	S	S	S
LC 983	S	S	S	S	S	S	S
LC 984	S	S	S	S	S	S	S

AMC: Amoksisilin/Klavulanik Asit (30 µg), E: Eritromisin (15 µg), CN: Gentamisin (120 µg), K: Kanamisin (30 µg), C: Kloramfenikol (30 µg), P: Penisilin G (10 U), AMP: Ampisilin (10 µg)
LP: *L. plantarum*, LC: *L. curvatus* İzolatları

Çizelge 3.11 (Devam). *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* İzolatlarının Agar Difüzyon Testi Sonuçları.

İzolat	Antibiyotik						
	KF	CIP	S	TE	SXT	VA	OX
LP 11	S	R	S	S	R	R	R
LP 13	R	R	S	R	R	R	R
LP 15	R	R	S	R	R	R	R
LP 24	R	R	S	R	R	R	R
LP 31	S	R	S	S	R	R	R
LP 41	S	R	S	S	R	R	R
LC 45	R	R	S	S	R	R	R
LP 51	R	R	S	I	R	R	R
LP 61	R	R	I	R	R	R	R
LP 64	R	R	S	R	R	R	R
LP 73	S	R	I	I	R	R	R
LP 74	S	R	S	R	R	R	R
LP 84	S	S	S	S	S	S	S
LP 131	I	S	S	S	R	S	R
LP 143	S	S	S	S	R	S	R
LP 401	S	R	S	R	R	R	R
LC 405	R	S	S	S	R	S	R
LP 482	S	R	S	S	S	S	S
LC 554	S	S	S	S	S	S	S
LP 802	S	R	S	R	R	R	R
LC 813	S	S	S	S	S	S	S
LC 814	R	R	S	R	R	R	R
LC 822	S	S	S	S	S	S	S
LC 871	S	S	S	S	S	S	S
LC 873	S	S	S	S	S	S	S
LC 982	S	S	S	S	S	S	S
LC 983	S	S	S	S	S	S	S
LC 984	S	S	S	S	S	S	S

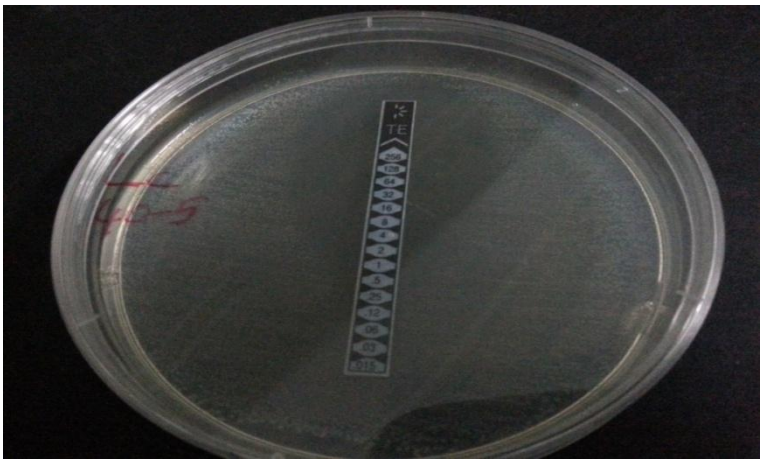
KF: Sefalothin (30 µg), CIP: Siproflaksosin (5 µg), S: Streptomisin (300 µg), SXT: Trimethoprim/Sülfamethakzol (25 µg), TE: Tetrasiklin (30 µg), VA: Vankomisin (30 µg), OX: Oksasilin (1 µg)
LP: *L. plantarum*, LC: *L. curvatus* İzolatları

Çizelge 3.12. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* İzolatlarının MİK Sonuçları.

İzolat	Antibiyotik*		
	Oksasilin	Tetrasiklin	Vankomisin
LP 11	4	2	4
LP 13	8	16	4
LP 15	8	8	4
LP 24	16	16	4
LP 31	2	2	4
LP 41	16	2	2
LC 45	32	16	32
LP 51	8	8	32
LP 61	32	8	32
LP 64	16	32	32
LP 73	2	4	2
LP 74	2	2	2
LP 84	0,5	0,25	0,5
LP 131	8	0,5	2
LP 143	32	2	0,5
LP 401	2	1	2
LC 405	1	0,25	1
LP 482	0,5	0,25	0,25
LC 554	0,5	0,5	0,5
LP 802	4	16	32
LC 813	0,5	0,25	0,25
LC 814	8	≤0,12	≥256
LC 822	≤0,12	0,25	0,25
LC 871	0,25	0,5	0,5
LC 873	0,5	0,25	0,5
LC 982	≤0,12	0,5	0,25
LC 983	≤0,12	0,25	0,25
LC 984	0,5	≤0,12	0,5

* 0,012-256 µg/ml
LP: *L. plantarum*, LC: *L. curvatus* İzolatları

L. plantarum izolatlarının oksasilin MİK değerinin ≤0,012-32 µg/ml, tetrasiklin değerinin ≤0,012-32 µg/ml, vankomisin değerinin ise 0,25-≥256 µg/ml düzeyinde olduğu tespit edildi. *L. curvatus* izolatlarının ise ≤0,012-1 µg/ml düzeyinde oksasilin, ≤0,012-0,5 µg/ml düzeyinde tetrasiklin, 0,25-1 µg/ml arasında vankomisin MİK değerine sahip olduğu saptandı (Çizelge 3.12) (Resim 3.8).

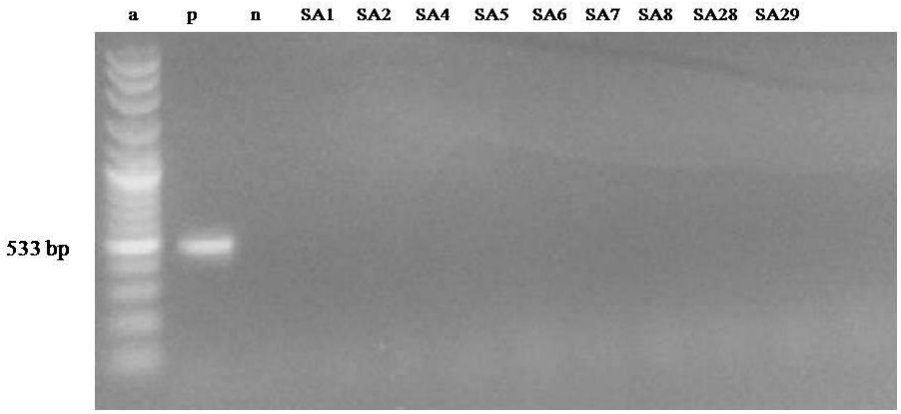


Resim 3.8. *Lactobacillus curvatus* İzolatlarının E-Test Görüntüsü.

L. plantarum izolatlarının MİK değerleri incelendiğinde %71,4'ünün oksasiline, %61,9'unun tetrasikline, %66,6'sının vankomisine dirençli olduğu tespit edildi. *L. curvatus* izolatlarının MİK değerlerine göre %18,8'inin oksasilin, %9,1'inin tetrasikline, %9,1'inin vankomisine direnç gösterdiği ortaya koyuldu.

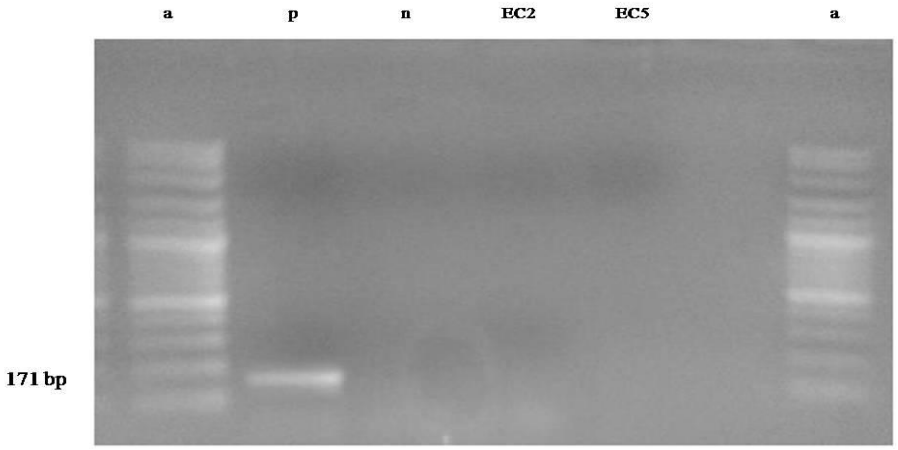
3.4. PCR Bulguları

Numunelerden identifiye edilen *S. aureus* izolatlarına *mecA* gen sekansı PCR ile moleküler düzeyde analiz gerçekleştirildi. İzolatların tamamının *mecA* genini taşımadığı belirlendi (Resim 3.9). *E. coli* izolatlarına gerçekleştirilen analiz sonucunda *tetM* gen bölgesi tespit edilmedi (Resim 3.10). *E. faecium* izolatlarının da benzer şekilde *vanA* geni taşımadığı saptandı (Resim 3.11). Sucuk numunelerinden izole edilen *L. plantarum ve L. curvatus* suşlarının tamamının *mecA, tetM* ve *vanA* gen bölgelerine sahip olmadığı belirlendi (Resim 3.12, Resim 3.13, Resim 3.14).



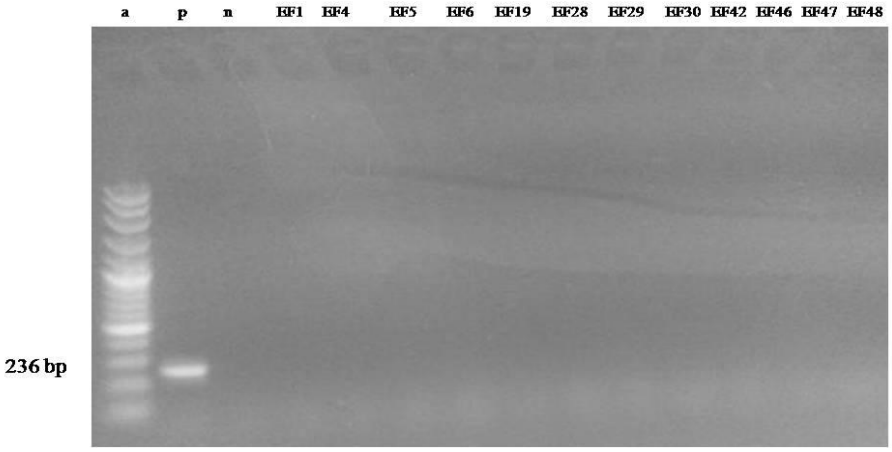
a: 100 bp DNA Marker, p: Pozitif Kontrol (*S. aureus* ATCC 43300),
n: Negatif Kontrol (*S. aureus* ATCC 25923), SA1-SA29: *S. aureus* İzolatları

Resim 3.9. *Staphylococcus aureus* DNA Örneklerinin *mecA* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü.



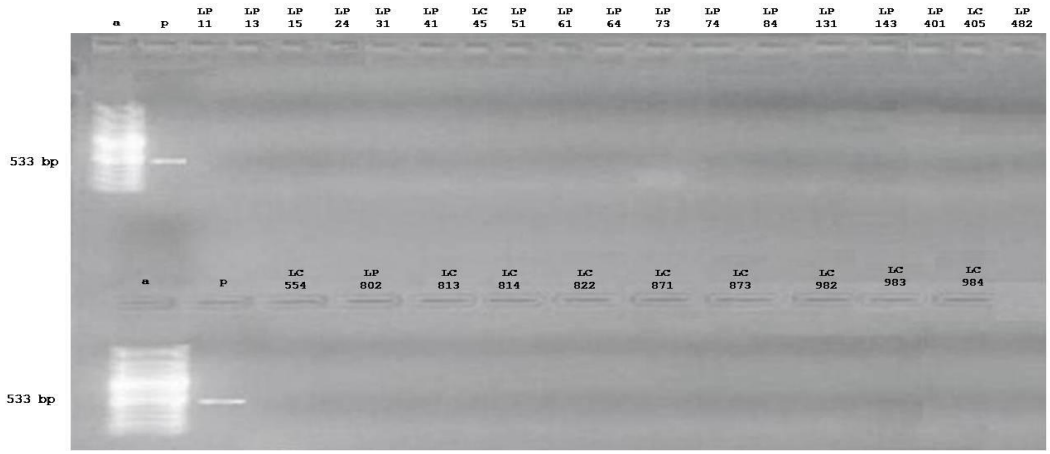
a: 100 bp DNA Marker, p: Pozitif Kontrol (*E. coli* HB101),
n: Negatif Kontrol (*E. coli* ATCC 25922), EC2, EC5: *E. coli* İzolatları

Resim 3.10. *Escherichia coli* DNA Örneklerinin *tetM* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü.



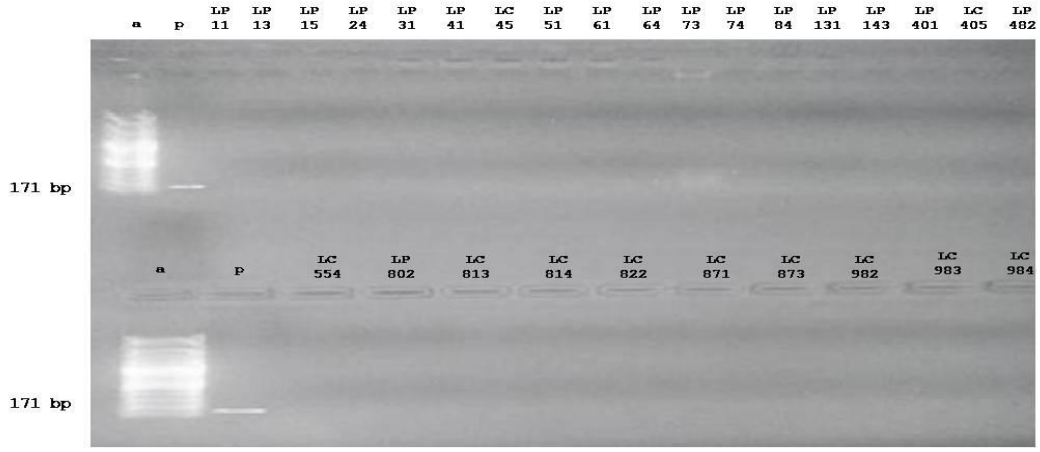
a: 100 bp DNA Marker, p: Pozitif Kontrol (*E. faecium* ATCC 51559),
n: Negatif Kontrol (*E. faecalis* ATCC 29212), EF1- EF48: *E. faecium* İzolatları

Resim 3.11. *Enterococcus faecium* DNA Örneklerinin *vanA* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü.



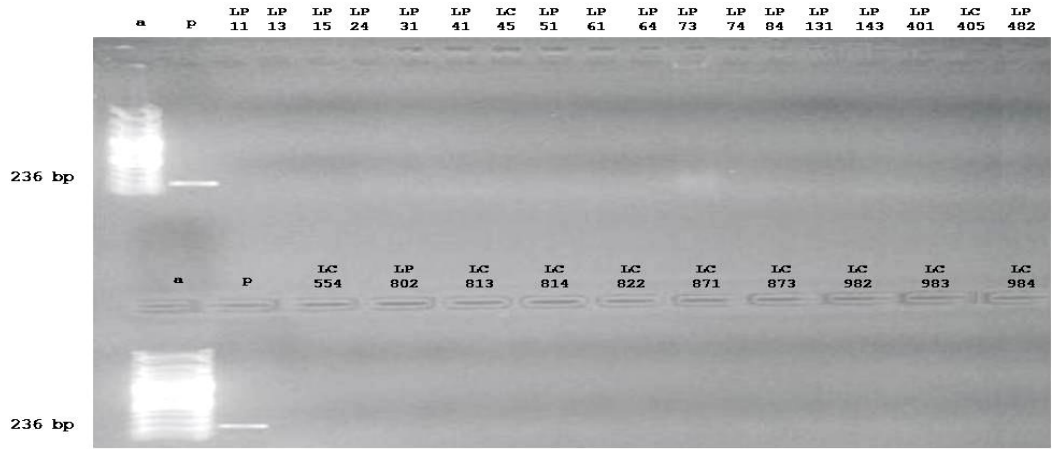
a: 100 bp DNA Marker, p: Pozitif Kontrol (*S. aureus* ATCC 43300), LP: *L. plantarum*,
LC: *L. curvatus* İzolatları

Resim 3.12. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* DNA Örneklerinin *mecA* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü.



a: 100 bp DNA Marker, p: Pozitif Kontrol (*E. coli* HB101), LP: *L. plantarum*, LC: *L. curvatus* İzolatları

Resim 3.13. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* DNA Örneklerinin *tetM* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü



a: 100 bp DNA Marker, p: Pozitif Kontrol (*E. faecium* ATCC 51559), LP: *L. plantarum*, LC: *L. curvatus* İzolatları

Resim 3.14. *Lactobacillus plantarum* ve *Lactobacillus curvatus* DNA Örneklerinin *vanA* Geni UV Transilluminatör Görüntüsü.

4. TARTIŞMA

Araştırma, fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuklarda fiziko-kimyasal analizler ile birlikte bazı patojen ve *Lactobacillus* cinsi bakteri varlığının tespit edilmesi ve elde edilen izolatların antibiyotik duyarlılık profilleri ve *mecA, tetM* ve *vanA* antibiyotik direnç genlerinin PCR yöntemiyle belirlenmesi amacıyla gerçekleştirildi.

4.1. Fiziko-Kimyasal Analizler

Fermente sucuklarda pH değeri, hammadde kalitesi ve bileşimine (özellikle NaCl ve şeker miktarı), spontan laktik asit ve diğer bakteri yükü ve çeşitliliğine, sucuklara uygulanan teknolojik işlem (özellikle ısıl işlem), kullanılan starter mikroorganizma kompozisyonu ve sayısına bağlı olarak şekillenmektedir. Fermente sucuk üretiminin başlangıcında sucuk hamurunun pH düzeyi yaklaşık 6,10-6,20 düzeylerindedir. Fermantasyon süresince pH değerinde kademeli şekildeki azalma fermantasyon süresi ile birlikte kuruma parametrelerine bağlı olarak şekillenmektedir. Isıl işlem uygulanmış sucuklarda pH değeri, ısıl işlemin sıcaklık/zaman kombinasyonu ve proteinlerin denaturasyonuna bağlı olarak değişmektedir. Bununla birlikte sucuklarda üretim başlangıcından itibaren varolan saprofit veya patojen mikroorganizma çeşitliliği veya sayısının da pH düzeyine etki edebileceği vurgulanmaktadır (Çon ve ark 2002, Öztan 2003). Nitekim bazı araştırmacılar (Bozkurt ve Erkmen 2002, Filiz 2002, Ercoşkun 2006) doğal fermente sucuklarda büyük ölçüde spontan fermantasyon bakterileri veya starter kültür ilavesi sonucunda bakteriler tarafından üretilen laktik asidin hızlı bir şekilde pH azalmasına neden olduğunu ayrıca ısıl işlem uygulanan sucuklarda proteinlerin ısıl işlem uygulamasıyla birlikte denatüre olarak tamponlanması sonucunda pH değerinin durağan veya yükselme eğilimi gösterdiğini belirtmektedirler. Bununla birlikte sucukların sahip olduğu mikroflora çeşitliliği ve saprofit ve/veya patojen mikroorganizma yükünün de pH değerine etki eden bir diğer unsur olduğu vurgulanmaktadır.

Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'nde (Resmi Gazete 2012a) yer alan değerlere göre pH değerinin fermente sucuklarda en yüksek 5,4, ısıl işlem uygulanan sucuklarda ise en yüksek 5,6 değerlerinde olması gerektiği belirtilmektedir. Araştırmada her iki gruptan elde edilen pH değeri ortalamalarının

(Çizelge 3.1) Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'nde (Resmi Gazete 2012a) belirlenen değerler arasında olduğu saptandı. Buna karşın fermente sucuk numunelerinin %32'sinin, ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinin ise %42'sinin belirtilen değerlerden (Resmi Gazete 2012a) yüksek olduğu belirlendi (Şekil 3.1).

Fermente sucuk numunelerinden elde edilen ortalama pH değerleri bazı çalışmalarla (Atasever ve ark 1998, Erdoğrul ve Ergün 2005, Gençcelep 2006, Kaban 2013) benzerlik göstermesine karşın bazı araştırmacıların (Yaman ve ark 1998, Ercoşkun 2006, Kaban 2007, Ercoşkun ve ark 2010) elde ettikleri pH bulgularından yüksek, bazı araştırmacılardan (Ulusoy 2007) düşük olduğu belirlendi. Isıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinden elde edilen pH değerleri ise Ercoşkun (2006)'un değerleri ile benzerlik göstermektedir. Ayrıca bazı çalışmalarda (Tayar 1989, Bozkurt ve Erkmen 2002, Filiz 2002, Ercoşkun 2006) fermente sucuklarda büyük ölçüde spontan fermantasyon bakterileri veya starter kültür ilavesi sonucunda bakteriler tarafından üretilen laktik asidin hızlı bir şekilde pH azalmasına neden olduğu ve ısıl işlem uygulanan sucuklarda proteinlerin ısıl işlem uygulamasına bağlı olarak denatüre olmasıyla pH değerinin durağan veya yükselme eğilimi gösterdiği belirtilmektedir.

Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuklarda su aktivite düzeyi fermantasyon ve olgunlaşma süresi ve sıcaklığı, uygulanan ısıl işlemin niteliği, ortamın bağıl nemi, sucuk bileşimi (özellikle NaCl ve yağ oranı), kullanılan kılıfın kalibrasyonu ve geçirgenlik düzeyi ve ortamın sahip olduğu hava akım hızı ile yakından ilişki içerisindedir. Sucuklarda fermantasyon aşamasının sonunda su aktivitesinin özellikle 0,85-0,90 düşmesiyle patojen ve saprofit mikroorganizmaların gelişebilmesini olumsuz olarak etkilemektedir.

Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'nde (Resmi Gazete 2012a) sucuklarda su aktivite değerine ilişkin herhangi bir değer yer almamaktadır. Fermente sucuklarda tespit edilen su aktivitesi değerlerinin Ulusoy (2007)'un elde ettiği değerlerden düşük olduğu saptanmıştır. Buna karşın bazı araştırmacıların (Gençcelep 2006, Kaban ve Kaya 2006, Gençcelep ve ark 2008, Kaban 2013) elde ettikleri değerlerle araştırma sonuçları paralellik göstermektedir. Araştırmadan elde edilen ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerine ilişkin su aktivitesi değerinin ile Kaban ve Kaya (2006) ile Dalmış (2007)'ın elde ettiği değerlerle benzerlik gösterdiği belirlenmiştir.

Fermente sucuklarda nem miktarı olgunlaşma süresine, ortamın sahip olduğu bağıl nem ve sıcaklığına ısıl işlem uygulanmış sucuklarda ise uygulanan ısıl işlemin süresi ve sıcaklığına bağlı olarak şekillenmektedir. Araştırma sonuçlarına göre (Çizelge 3.1), sucuk numuneleri, içerdikleri toplam rutubet miktarı (%) bakımından değerlendirildiğinde, fermente sucuklarda ortalama %34,47, ısıl işlem uygulanmış numunelerde ise %35,87 değerleri saptanmıştır. Her iki grupta nem değerleri bakımından istatistiksel açıdan anlamlı herhangi bir farklılık ortaya çıkmamıştır ($p>0,05$). Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'nde (Resmi Gazete 2012a) fermente sucuklarda nem miktarının toplam et proteini miktarına oranının 2,5'in altında, ısıl işlem uygulanmış sucuklarda ise 3,6'nın altında ve/veya nem miktarının kütlece en çok %50 olması gerektiği belirtilmiştir.

Fermente sucuklarda yapılan çalışmalar sonucunda ortalama toplam rutubet değerini Ercoşkun ve ark (2010) %32,48, Yaman ve ark (1998) %37,20, Ercoşkun (2006) %35,29 ve Gençcelep (2006) %34,83 olarak tespit etmişlerdir. Belirtilen değerler araştırma sonuçları ile benzerlik göstermektedir. Buna karşın Atasever ve ark (1998) ile Erdoğrul ve Ergün (2005)'ün elde ettiği sonuçlar araştırma sonuçlarından daha düşük düzeyde bulunmuştur. Isıl işlem uygulanmış sucuk numunelerine ait toplam rutubet değeri ortalamasının Ercoşkun (2006) ile Kaban ve Kaya (2006) tarafından elde edilen değerlerden daha düşük olduğu saptanmıştır.

Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinden elde edilen toplam kuru madde miktarı (%) sırasıyla ortalama 65,52 ve 64,12 olarak tespit edilmiştir. Atasever ve ark (1998) fermente sucuklarda toplam kuru madde değeri ortalamasının 70,51 olduğunu bildirmektedirler.

Araştırma sonuçlarına göre, fermente sucuk numunelerindeki toplam yağ miktarı (%29,05), ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinden daha düşük değerde (%32,68) tespit edilmiştir. Fermente sucuklara ilişkin toplam yağ miktarı sonuçları bazı araştırmacıların (Atasever ve ark 1998, Yaman ve ark 1998) elde ettikleri sonuçlar ile benzerlikler göstermesine karşın birçok araştırmacının (Sancak ve ark 1996, Erdoğrul ve Ergün 2005, Ercoşkun 2006, Erçoşkun ve ark 2010) elde ettiği değerlerden farklı bulundu. Isıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinden elde edilen yağ miktarı, Ercoşkun ve ark (2010)'nın elde ettiği değerlerile benzerlik göstermiştir. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği (Resmi Gazete 2012a)'ne göre fermente sucuklarda yağ miktarının toplam protein miktarına oranının 2,5, ısıl işlem uygulanmış sucuklarda ise 3,2'nin altında olması gerektiği belirtilmektedir.

4.2. Mikrobiyolojik Analizler

Fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinden elde edilen TMAM sayıları karşılaştırıldığında, fermente numunelere ait TMAM sayı ortalaması ısıl işlem uygulanmış numunelerden daha yüksek bulundu. Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği'nde (Resmi Gazete 2012a) sucuklarda toplam mezofilik mikroorganizma veya bakteri sayılarına ilişkin herhangi bir ölçüt yer almamaktadır. Fermente ve ısıl işlem uygulanmış numuneler arasında TMAM sayıları bakımından ortaya çıkan farklılık, sucuklarda ısıl işlem uygulamasının toplam mikroorganizma yükü üzerinde etkili olduğu yönünde birçok araştırmacı tarafından elde edilen sonuçlarla uyuşmaktadır. Çon ve ark (2002), Afyon ilinde büyük kapasiteli et işletmelerinde üretilen sucukların mikrobiyolojik kalitelerini belirlemek amacıyla yürüttükleri araştımada, TMAM sayısını $3{,}0x10^4$-$2{,}2x10^8$ kob/gdüzeyleri arasında olduğunu bildirmektedirler. Kök ve ark (2007) fermente sucuklarda TMAM sayı ortalamasının 4,20 $\log_{10}$ kob/g olduğunu tespit etmişlerdir. Sancak ve ark (1996) Van'da fermente Türk sucuklarının mikrobiyolojik kalitesini belirlemeye yönelik yaptıkları araştırmalarında, TMAM sayısının ortalama $3{,}3x10^8$ kob/g olduğunu saptamışlardır. Araştırmada fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinde elde edilen TMAM sayısı bazı araştırmacıların (Atasever ve ark 1998, Sancak ve ark 1996, Şenol ve Nazlı 1996) elde ettikleri sonuçlardan oldukça yüksek bulunmuştur. Bu sonuç fermente sucukların hammadde kalitesi, üretim/depolama aşamalarındaki hijyenik yetersizlikler, ısıl işlem uygulamasının yetersizliği ve sucuk üretiminde starter kültür kullanılıp kullanılmamasından kaynaklanabilmektedir.

Fermente sucuk numunelerinde *S. aureus*'un izole edilmesi, hammaddenin mikrobiyolojik kalitesinin düşük olduğu, hammadde seçiminden itibaren geçen üretim süreci içerisinde ve/veya muhafaza koşulları dahilinde mikrobiyolojik kontaminasyonun gerçekleştiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Isıl işlem uygulanmış numunelerde ise *S. aureus*'un izole edilememesinin temel nedeni ısıl işlemin mikroorganizma yükü üzerinde inhibe edici etkisinden kaynaklanabileceği sonucuna varılabilir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde (Resmi Gazete 2011) yer alan kriterlerde *S. aureus* bakımından fermente ve ısıl işlem uygulanmış sucuklara ilişkin herhangi bir ölçüt yer almamaktadır. Türk Standartları Enstitüsü sucuk standardına (Anonim 2012) göre incelenen her 5 örnekten *S. aureus* için bir örnekte $5x10^3$ kob/g, 4 örnekte 10^2 kob/g'ı aşmaması gerektiği belirtilmektedir.

Yalçın ve Can (2013), 60 fermente sucuk numunesinin 10'unda (%16,8) koagulaz (+) *S. aureus* izole ettiklerini, ortalama koagulaz (+) *S. aureus* sayısının ise $<0,1x10^3$ kob/g değerleri arasında olduğunu belirtmektedirler. Çon ve ark (2002) geleneksel fermente sucuklarda *S. aureus* sayısının $2,0x10^1$-$7,1x10^5$ kob/g arasında değiştiğini bildirmektedirler. Sancak ve ark (1996) çalışmalarında fermente sucuklarda ortalama *Staphylococcus* ve koagulaz (+) *Staphylococcus* sayılarının sırasıyla $6,7x10^4$, $1,9x10^3$ kob/g olduğunu tespit etmişlerdir.

Türk Standartları Enstitüsü'nün yayınlamış olduğu sucuk standardında (Anonim 2012) koliform bakterilerin 10^1 kob/g'ı geçmemesi gerektiği belirtilmektedir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde (Resmi Gazete 2011) koliform bakteriler ile ilgili herhangi bir kriter olmamasına karşın *E. coli* 0157'nin fermente ve ısıl işlem görmüş et ürünlerinde bulunmaması gerektiği bildirilmektedir. Yalçın ve Can (2013) Mersin ve Adana'da geleneksel şekilde üretilmiş 60 fermente sucuk numunesinin %30'unda $<0,1$-10^3 kob/g arasında koliform bakteri tespit etmişlerdir. Çon ve ark (2002) geleneksel fermente sucuklarda *Enterobacteriaceae* sayısını <10-$1,1x10^4$ kob/g arasında olduğunu belirlemişlerdir. Sancak ve ark (1996) çalışmalarında fermente sucuklarda ortalama koliform bakteri ve *E. coli* sayısının sırasıyla $5,2x10^3$, $4,6x10^3$ kob/g olduğunu bildirmişlerdir. Bazı araştırma (Sancak ve ark 1996, Çon ve ark 2002, Yalçın ve Can 2013) sonuçlarının çalışmadan elde edilen ortalama koliform bakteri sayılarından yüksek olduğu belirlenmiştir. Buna karşın Kök ve ark (2007), Aydın'da satışa sunulan fermente sucuklarda koliform bakteri sayı ortalamasının 1,62 $\log_{10}$ kob/g, Noveir ve ark (2000), Türkiye'de 75 sucuk numunesinde koliform bakteri sayısının 0-$4,6x10^2$ kob/g, *E.* coli sayısının ise 0-$2,4x10^2$ kob/g düzeyleri arasında değiştiğini bildirmekte olup, araştırmadan elde edilen koliform sonuçları ile benzerlik göstermektedirler. Villani ve ark (2005), İtalya'da yaptıkları çalışmada 126 taze domuz sosislerinin %16'sında verotoksin üreten *E. coli* izole ettiklerini ve antibiyotik dirençli *E. coli* O157:H7 suşunun domuz sosislerinde 4°C'de bir hafta canlılığını koruduğunu bildirmektedirler.

Fermente ve ısıl işlem uygulamış sucuklardan elde edilen *Enterococcus* ssp. sayılarına ($2,88\pm0,42$, $0,70\pm0,23$) ilişkin Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği'nde (Resmi Gazete 2011) herhangi bir kriter yer almamaktadır. Özmen Toğay ve ark (2010) doğal yollardan fermente edilen besinler üzerinde yürüttükleri araştırmalarında, besinlerden 16 *E. faecium*, 68 *E. faeacalis* izolatı elde ettiklerini,

fermente sucuklardaki *Enterococcus* sayısının 2-4 $\log_{10}$ kob/g düzeyinde olduğunu belirtmektedirler. Karakaş (2005) çalışmasında, fermente sucuklarda *Enterococcus* ssp. sayısının $9,4x10^5$ kob/g düzeyinde bulunduğunu, elde edilen izolatların vankomisine karşı direnç göstermediğini tespit etmiştir. Franz ve ark (1999), çeşitli sucuklardan *Enterococcus* izole edildiğini belirterek, bu ürünlerdeki *Enterococcus* sayısının $1x10^2$-$2,6x10^5$ kob/g arasında olduğunu bildirmişlerdir. Quednau ve ark (1998) İsveç ve Danimarka'da domuzların ve kanatlıların florasında bulunan *Enterococcus* cinsi bakteriler içerisinde *E. faecium*'un en sıklıkla izole edilen bakteri türü olduğunu bildirmektedirler.

Fermente sucuk numunelerine ait laktik asit bakteri sonuçların ısıl işlem uygulanmış numunelerden yüksek olması, uygulanan ısıl işlemin mikroorganizmalar üzerinde tahrip edici etkisinden kaynaklanmaktadır. Buna karşın, ısıl işlem uygulanmış sucuk numunelerinde yüksek düzeylerde *Lactobacillus* soyuna ait bakteri tespit edilmesi, teknolojik işlemlerin farklılığını (örn., ısıl işlemin sıcaklık ve süresi) ortaya koymakta ve/veya starter kültür kullanımını düşündürmektedir. Özdemir (1999) Türk tipi fermente sucuklar üzerinde yürüttüğü çalışmasında izolasyon ve identifikasyonu yapılan toplam 252 suştan 207 suş (% 82)'un *L. sake*, 20 suş (% 7,9)'un *L. curvatus*, 7 suş (% 2,8)'un *L. plantarum*, 7 suş (% 2,8)'un *L. viridescens*, 9 suş (% 3,5)'un muhtemelen *L. agilis* benzeri bir tür, 1 suşun ise (% 0,4) *L. carnis* olduğunu, fermente sucuklarda dominant grubun *L. sake, L. curvatus ve L. plantarum* şeklinde tespit edildiğini bildirmektedir. Benzer şekilde Özdemir ve ark (1996), araştırmalarında 3 hafta 25°C'de olgunlaştırılan sucuklarda toplam 80 *Lactobacillus* izolatından %80'inin *L. sake,* %15'inin *L. plantarum,* %5'inin *L. curvatus* olduğunu tespit etmişlerdir. Toksoy ve ark (1999), çalışmalarında, sucuk ve sosis numunelerinden izole edilen 97 *Lactobacillus* cinsi bakteri içerisinde %41,1'inin *L. plantarum* olduğunu belirtmektedirler. Yalanca (2009), analize alınan 35 sucuk örneğinden toplam 29 laktik asit bakterisi izole ettiğini bildirmektedir. Çon ve Gökalp (2000) tarafından gerçekleştirilmiş ve 51 sucuk örneğinden 19 adet *L. plantarum,* 4 adet *L. curvatus,* 4 adet *P. pentosaceus,* 3 adet *P. acidilactici,* 2 adet *L. pentosus,* 2 adet *L. sake,* 1 adet *L. delbrueckii,* 1 adet *L. rhamnosus* ve 21 *Lactobacillus* spp. suşu izole etmişlerdir. Araştırmacının laktik asit bakterlerine ilişkin bulguları, araştırmadan elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermektedir.

4.3. Antibiyotik Duyarlılık ve Dirençlilik

Araştırmada, *S. aureus* izolatlarında dirençlilik düzeyinin en yüksek oksasilin ve penisilin G'ye, duyarlılık düzeyinin en yüksek amoksisilin/klavulanik asit, oksasilin, tetrasiklin, kanamisin ve vankomisine karşı olduğu belirlendi. Gündoğan ve ark (2005), et ve kanatlı hayvan etlerinde bulunan *S. aureus* suşlarının metisilin, basitrasin, penisilin G ve eritromisine karşı olan dirençlilik düzeylerini sırasıyla %67,5, %87,5, %53,8 ve %7,5 olarak tespit etmişlerdir. Araştırmacıların sonuçları ile elde edilen bulgular arasında benzerlikler bulunmaktadır. Bununla birlikte Gündoğan ve ark (2005), penisilin G'ye olan dirençliliği, penisilin grubu antibiyotiklerin beşeri ve veteriner hekimlikte uzun süredir kullanılmasına bağlamaktadırlar. Normanno ve ark (2007), et ve süt ürünleri, insan, çevresel kaynaklardan izole ettikleri *S. aureus* suşlarının %68,8'inin en az bir antibiyotiğe, ayrıca et ve et ürünlerinden izole edilen suşların en yüksek ampisilin ve eritromisin türevlerine karşı dirençlilik gösterdiğini bildirmektedirler. Chao ve ark (2007) Çin'de 365 çiğ et örneğinin 39'unda (%10,7) pişirilmiş 384 ürünün 12'sinde (%3,1) *S. aureus* saptamışlardır. İzole edilen *S. aureus*'ların %93,1 oranında penisiline, %49,4 oranında tetrasikline ve %37,9 oranında oksasiline dirençli olduğunu, ayrıca izole edilen 87 *S. aureus* izolatının 69'unun çoklu antibiyotik dirençlilik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Shahraz ve ark (2012) İran'da 256 paketlenmiş hamburger numunesinin %25'inden *S. aureus* izole ettiklerini, izolatların metisilin, eritromisin, penisilin G, sefazolin, siproflaksosin, vankomisin ve amoksisilin/klavulanik aside karşı sırasıyla %89, %20,3, %18,7, %15,6, %14, %26,6 ve %12,5 düzeyinde direnç gösterdiğini bildirmektedirler.

Araştırmada elde edilen *S. aureus* izolatlarının oksasilin MİK değerleri 4-64 µg/ml olarak saptandı. Ancak yapılan moleküler analizde *mecA* geni tespit edilmedi. Buna karşın Lee (2003) hayvansal kaynaklı besinlerden izole ettiği *S. aureus* izolatlarının 15'inde *mecA* genini tespit etmiş, hayvansal kaynaklı besinlerde bulunan *S. aureus*'un insanlarda MRSA'ya neden olabileceğini ileri sürmüştür. Benzer şekilde De Boer ve ark (2009) 2217 et numunesi üzerinde MRSA prevelansını belirlemek amacıyla yürüttükleri araştırmalarında kırmızı et numunelerinin %25,8'inde MRSA tespit ettiklerini, MRSA pozitif hayvanlardan elde edilen ürünlerde MRSA'nın izole edildiğini, ortaya çıkan durumun kesim sürecindeki kontaminasyon sonucunda ortaya çıkabileceğini belirtmektedirler. Shahraz ve ark (2012) oksasilin ve metisiline dirençli *S. aureus* izolatlarının tümünde *mecA* genini

tespit ettiklerini belirtmektedirler. Lee (2006), Güney Kore'de hayvansal besin numunelerinin 19'unda *mecA* geni taşıyan *S. aureus* tespit ettiğini, izolatlarda *mecA* geni ile birlikte *mecR1* ve *mecI* genlerinin de bulunduğunu belirtmektedir. Araştırmamızda *S. aureus* izolatlarında *mecA* geninin tespit edilmemesi, *mecA* geninin transkripsiyonu ve represyonundaki dirençlilik mekanizmasının şekillenemediği sonucunu ortaya koymaktadır. Ancak metisilin duyarlılığı sınırda olan fenotiplerin Borderline Methicilline Susceptible *S. aureus* (BSSA) veya Borderline Oxacilline Resistant *S. aureus* (BORSA) ortaya çıkma riski bulunmaktadır. Perreten ve ark (1998) fermente süt ve et ürünlerinden elde ettikleri *S. xylosus*, *S. lentus* gibi fermantasyonda yer alan koagulaz (-) *Staphylococcus*'larda kloramfenikol (*cat, ermA, ermB*) ve tetrasiklin (*tetK*) direnç genlerinin bulunduğunu ve taşınabildiğini bildirmektedirler. Ayrıca Wysocki ve ark (2010), et ve süt ürünlerinden izole edilen *L. acidophilus* ve *L. casei* ile doğrudan MRSA'nın interaksiyonu sonucunda %99 oranında elimine olduğunu tespit etmişlerdir.

Sucuk numunelerinden elde edilen *E. coli* izolatlarının sadece kloramfenikol ve nalidiksik aside karşı direnç gösterdiği tespit edilmiştir. Ortaya çıkan sonuç doğal dirençlilik yönünde bir ihtimali düşünüdürmektedir. Bununla birlikte tetrasiklin MİK değerlerinin 1-4 μg/ml düzeyinde olması ve *tetM* direnç geninin belirlenmemesi izolatların duyarlı olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Buna karşın Lei ve ark (2010) çalışmalarında, hayvansal gıdalarda bulunan *E. coli* suşlarının amfisilin, sefazolin, seftriakson, kanamisin, gentamisin, amikasin, kloramfenikol, tetrasiklin, nalidiksik asit, norflaksosin, siproflaksosin, enroflaksosin, levoflaksosin, trimethoprim-sulfamethakzole karşı sırasıyla %64, %6,5, %1,7, %36,5, %32,6, %2,8, %47,8, %86,5, %55,1, %28,1, %30,7, %40,2, %28,1, %68,5 düzeyinde dirençlilik tespit etmişlerdir. Araştırmacılar çiftlik hayvanlarından elde edilen *E. coli* izolatlarına ait dirençlilik sonuçlarının gıdalarda var olan izolatlar ile benzerlik gösterdiklerini de vurgulamaktadırlar. Van ve ark (2003), kırmızı etlerden izole edilen antibiyotiklere dirençli *E. coli* izolatlarının ampisilin, amoksisilin, tetrasiklin, streptomisin, kloramfenikol, trimethoprime karşı direnç düzeylerinin sırasıyla %20, %20, %60, %15, %20, %20, çoklu direnç gösterme oranını %15 olarak bildirmektedirler.

Sucuk numunelerinden elde edilen *E. faecium* izolatlarında en yüksek dirençliliğin eritromisin, gentamisin, kanamisin, oksasilin, siproflaksosin, tetrasiklin ve trimethoprim/sulfamethakzole karşı görüldüğü, buna karşın vankomisin

dirençliliğinin oldukça düşük düzeyde (%16,7) olduğu belirlendi. Vankomisin MİK değerinin 1-4 µg/ml olması *E. faecium* izolatlarının duyarlılık ve dirençlilik profillerinin benzerlik gösterdiğini, bununla birlikte *vanA* geninin tespit edilmemesi de ortaya çıkan sonucu açıklamaktadır. Ancak farklı türevlere karşı dirençliliğin tespit edilmesi, çoklu antibiyotik dirençliliğinin şekillenebileceğini ortaya koymaktadır. Quednau ve ark (1998) *E. faecium* izolatlarının 9 ayrı antibiyotik türevi içerisinde en yüksek tetrasiklin ve eritromisine dirençlilik gösterdiğini belirtmekte olup araştırma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Ben Belgacem ve ark (2007), Tunus'da fermente et ürünlerinden izole ettikleri *E. faecium* suşlarının eritromisin, rifampsin, siproflaksosin, lavoflaksosin ve nitrofurantoine karşı dirençliliğe sahip olduklarını saptamışlardır. Sustackova ve ark (2004) çiğ et, ısıl işlem uygulanan ve uygulanmayan fermente et ürünlerinde bulunan *E. faecium* suşlarının eritromisin, tetrasiklin, streptomisin, sefalothin, klindamisine sırasıyla %72, %17,4, %4,3, %83, %67 düzeyinde dirençlilik gösterdiğini, ısıl işlem uygulanan fermente et ürünlerinde görülen dirençliliğin üretim aşamalarında oluşan enterokokkal kontaminasyona rağmen artış gösterdiğini, ısıl işlem uygulanmayan fermente kuru salamlarda kontaminasyona rağmen dirençlilikte azalmanın kaydedildiğini bildirmektedirler. Özmen Toğay ve ark (2010) sucuk örneklerinden izole edilen 3 *E. faecium* ve 8 *E. faeacalis* izolatının gentamisin, eritromisin, tetrasiklin ve kanamisine karşı dirençli olduğunu belirtmektedirler.

Jahan ve ark (2013), fermente sosislerden izole ettikleri 29 *Enterococcus* (15 adet *E. faecalis,* 13 adet *E. faecium,* 1 adet *E. gallinarum*) suşunda klindamisine %89,6, tetrasikline %65,5, tilosine %62, eritromisine %45, streptomisine ve neomisine %17, kloramfenikole %10,3, penisiline %10,3, siproflaksosine %10,3 ve gentamisine %3,4 oranında dirençlilik tespit ettiklerini, tüm örneklerde vankomisin ve ampisilin direncinin tespit edilmediğini belirtmektedirler. Pesavento ve ark (2014) araştırmalarında et ve et ürünlerinden elde ettikleri 312 *Enterococcus* izolatında en yaygın türlerin *E. faecium* ve *E. faecalis* olduğunu, izolatların %3,5'inin vankomisin, %2,2'sinin teikoplanine karşı dirençli olduklarını saptamışlardır. Terkuran ve ark (2011) Türkiye'de sucuk, peynir gibi fermente gıdalardan izole ettikleri 51 *Enterococcus* ssp. izolatının %21,5'inin vankomisine orta düzeyde dirençli olduğunu belirtmektedirler.

Lester ve ark (2006), araştırmalarında tavuk kökenli *E. faecium* izolatlarının *vanA* geni taşıdığını, bu geninin ise insan bağırsaklarında bulunan *E. faecium*

izolatlarına direnç kazandırdığını, sonuçta enterokokkal dirençlilikten sorumlu olan etkenlerin farklı vektörler vasıtasıyla (örn., hayvanlar, dışkı) çevreye yayılabileceğini ve insanların florasında bulunan bakterilerin direnç kazanabileceğini bu durumun da insan sağlığı açısından bir risk taşıdığını belirtmektedirler. Quednau ve ark (1998), vankomisine dirençli tüm suşların *vanA* genine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Benzer şekilde Descheemaeker ve ark (1999), gıdalardan, hastanelerden ve hayvan üretiminin gerçekleştiği çiftliklerden izole ettikleri *vanA* geni pozitif 132 glikopeptit dirençli *E. faecium* izolatının, Pulsed Field Jel Electroforez yöntemiyle *SmaI* homolojilerinin yüksek düzeyde birbirlerine benzerlik gösterdiğini, izolatlarda en yaygın Tn*1546* tranpozonunun bulunduğunu ve farklı numunelerden izole edilen izolatların hayvanlar ile insanlar arasında muhtemel olarak ilişki içerisinde olduğunu bildirmektedirler. Cocconcelli ve ark (2003) çalışmalarında, fermente sosislerde tetrasiklin ve vankomisin dirençliliğinde büyük öneme sahip olan genlerin ve transkonjugatif plazmidlerin fermantasyon aşamasında mikroflorada yer alan *Enterococcus* türlerine aktarılabileceğini belirtmektedirler. Özmen Toğay ve ark (2010) sucuk numunelerinden izole ettikleri 2 adet *E. faecalis* izolatına *vanA* genini saptamışlardır.

Gazzola ve ark (2012)'nın fermente sosislerde antibiyotik dirençliliği üzerinde yaptıkları çalışmalarında tetrasiklin ve eritromisin dirençliliğinde rol alan *E. faecalis* OG1rf transkonjugat suş sayısında fermantasyonun ikinci gününden itibaren selektif antibiyotik baskısı yaratarak olgunlaşma süreci boyunca bir artışın meydana geldiğini ve fermente sosislerden identifiye edilen *Enterococcus, Pediococcus, Lactobacillus* ve *Staphylococcus* gruplarında tetrasiklin ve eritromisin dirençliliğine yol açan genleri tespit ettiklerini, bu durumunda et ürünlerine uygulanan fermantasyon aşamasının horizontal konjugatif plazmid ve antibiyotik dirençlilik genlerinin aktarılabileceği uygun bir ortam olduğunu vurgulamaktadırlar.

Araştırma sonuçlarına göre *L. plantarum* ve *L. curvatus* izolatlarının %10,7'sinin eritromisin, %21,4'ünün gentamisine, %46,5'inin kanamisine, %28,5'inin penisilin G'ye, %32,1'inin sefalothine, %42,9'unun siproflaksosine, %7,1'inin streptomisine, %32,2'sinin tetrasikline, %64,3'ünün trimethoprim/sulfamethakzol ve oksasiline, %53,6'sının vankomisine karşı dirençli oldukları belirlendi. Benzer şekilde Dinçer (2007) araştırmasında pastırma, sucuk gibi et ürünlerinden izole ve identifiye ettiği 163 laktik asit bakterisi içerisinde 52'sinin yüksek düzeyde antimikrobiyal aktivite gösterdiğini, ayrıca izole edilen *L.*

plantarum suşlarının siproflaksosin, gentamisin, penisilin G, netilmisin sülfat ve seftriaksona karşı oldukça dirençli olduklarını vurgulamaktadır. Yalanca (2009) 35 sucuk numunesinden izole ettiği 29 laktik asit bakterisinin % 100'ünün vankomisine, % 97'sinin siprofloksasine, % 26,4'ünün nitrofurantoine, %13,2'sinin gentamisine ve % 6,6'sının rifampsine dirençli olduğunu bildirmektedir.

Zhou ve ark (2005) çalışmalarında, probiyotik olarak kullanılan *Lactobacillus ve Bifidobacterium* cinsi bakteriler içerisinde *L. plantarum* suşlarının gentamisin, neomisin, kanamisin ve streptomisine karşı direnç gösterdiğini bildirmektedirler. Katla ve ark (2001) çalışmalarında izole edilen *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* ve *Streptococcus* izolatlarının vankomisine karşı dirençli olduğunu, Zarazaga ve ark (1999)'da benzer sonuçların ortaya çıktığını belirtmektedirler.

L. plantarum izolatlarının oksasilin, tetrasiklin ve vankomisin MİK değerinin sırasıyla ≤0,012-32, ≤0,012-32, 0,25-≥256 µg/ml *L. curvatus* izolatlarının ise ≤0,012-1 µg/ml düzeyinde oksasilin, ≤0,012-0,5 µg/ml düzeyinde tetrasiklin, 0,25-1 µg/ml arasında vankomisin MİK değerine sahip olduğu saptandı. Bununla birlikte araştırmadan elde edilen *L. plantarum* ve *L. curvatus* izolatlarının *mecA*, *tetM* ve *vanA* genlerine sahip olmadığı belirlendi. Buna karşın Comunian ve ark (2010), İtalya'da fermente gıdalarda bulunan *L. paracasei* suşlarının tetrasiklin ve eritromisine karşı sırasıyla 128 µg/ml ve >1024 µg/ml düzeyinde dirençlilik gösterdiğini, ayrıca suşların *tetM* ve *ermB* genlerini taşıdıklarını belirtmişlerdir. Gevers ve ark (2002), fermente sosislerde *Lactobacillus* cinsine ait bakterilerin PCR metodu ile antibiyotik dirençliliklerini inceledikleri çalışmalarında, *L. plantarum* suşlarının >256 µg/ml düzeyinde, *L. sakei* subs. *carnosus* 32->256 µg/ml arasında, tetrasiklin türevlerine karşı dirençlilik gösterdiğini ve suşlarda *tetM* geninin var olduğunu, ayrıca *Lactobacillus* cinsi bakterilerin %79'unun gentamisin, %64'ünün penisilin G ve %79'unun kanamisine dirençlilik gösterdiğini saptamışlardır. Pan ve ark (2011) Çin'de fermente gıdalardan izole ettikleri üzerinde 202 antibiyotik dirençli laktik asit bakterisinin 14'ünde (%6,93) *tetM* genini tespit etmişlerdir. Gevers ve ark (2000) et ürünleri arasında tetrasiklin dirençli laktik asit bakterilerinin en yüksek fermente sucuklarda görüldüğünü, laktik asit bakterileri arasından elde ettikleri *L. plantarum* ve *L. curvatus* gibi mikroorganizmaların tetrasiklin direnç genlerini taşıyabildiklerini bildirmektedirler.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Araştırmada, her iki grupta yer alan sucuklarda ortalama pH ve su aktivitesi değeri, toplam rutubet miktarı ve toplam kuru maddede yağ miktarlarının üretim için izin verilen kriterler dahilinde gerçekleştiğini göstermektedir. Isıl işlem uygulanmış sucukların bakteri yükünün fermente sucuklardan düşük bulunması ısıl işlemin etkinliğini açıklamaktadır. Ancak sucuklardan *S. aureus*, koliform, *Enterococcus* ssp. gibi bakterilerin izole edilmesi, hijyenik üretimin gerçekleşmediğini ve dolayısıyla kontaminasyon riskini ortaya koymaktadır.

Isıl işlem uygulanmış sucuklarda laktik asit bakteri varlığının yüksek bulunması, ürünlere uygulanan teknolojik işlemlerin farklılık gösterdiği sonucunu ortaya koyar niteliktedir. Sucuklarda laktik asit bakterileri bakımından dominant türlerin *L. brevis, L. plantarum* ve *L. curvatus* olduğu sonucuna varılmış, belirtilen türlerin sucukların üretim aşamalarında ortaya çıkan farklılıklar (örn., fermantasyon süresi ve sıcaklığı) ile birlikte ürünlerin sahip olduğu fiziko-kimyasal (örn., pH, su aktivitesi) değerlere bağlı olarak şekillendiği sonucuna varılabilir.

Sucuk numunelerinden izole edilen *S. aureus* izolatlarının agar difüzyon test sonucunda oksasilin ve penisilin G'ye dirençli bulunması ancak PCR analizi sonucunda *mecA* geni taşımadığının tespit edilmesi, antibiyotik dirençliliğinin belirlenmesinde kullanılan yöntemlerin güvenilirliklerinden kaynaklandığı sonucunu ortaya çıkarmaktadır. *E. coli* izolatlarının yapılan antibiyotik dirençlilik analizleri sonucunda tetrasiklin dirençliliği ve *tetM* varlığı açısından önem taşımadığı sonucuna varılmıştır. *E. faecium* izolatlarının agar difüzyon yöntemiyle ortaya çıkarılan sonucun E test ile paralellik gösterdiği ve PCR analizi sonucunda *vanA* geni taşımadığı sonucuna varılmıştır. Bu bağlamda sucuklarda MRSA, VRE gibi fenotiplerin tespit edilmemesi önem taşımaktadır.

L. plantarum ve L. curvatus izolatlarının tetrasiklin, trimethoprim/sulfamethakzol, oksasilin ve vankomisine karşı agar difüzyon metoduyla dirençli olarak tespit edilmiş ancak E test ve moleküler analizlerde dirençlilik saptanmamıştır.

Sucuklardan izole edilen patojen bakteriler ile birlikte *L. plantarum* ve *L. curvatus* izolatlarının antibiyotik dirençlilik düzeyleri halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Bu bağlamda veteriner hekimlikte antibiyotik kullanımı ve seçimi konusunda gerekli tedbirlerin alınması, antibiyotik dirençliliği konusundaki

hassasiyetin sağlanması ve antibiyotik dirençliliği konusundaki bilinçliliğin artırılması gerekmektedir.

6.ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Fermente ve Isıl İşlem Uygulanmış Sucuklarda Bazı *Lactobacillus* ve Patojen Bakterilerin Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi

Muhammet Ali CEBİRBAY

Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2014

Araştırma, Konya il merkezinde satışa sunulan fermente ve ısıl işlem uygulanmış 100 sucuk numunesine fiziko-kimyasal analizler ile bazı *Lactobacillus* cinsi bakteriler, *S. aureus, E. coli* ve *E. faecium*'un belirlenmesi ve izolatların antibiyotik dirençliliklerinin ve *mecA, tetM* ve *vanA* genlerinin tespit edilmesi amacıyla gerçekleştirildi. Fermente sucuk numunelerinin TMAM, *S.aureus,* koliform ve *Enterococcus* ssp. sayı ortalamaları sırasıyla 10,84±0,68, 1,84±0,34, 1,07±0,31 ve 2,88±0,42 $\log_{10}$ kob/g olarak belirlendi. Isıl işlem uygulanmış numunelerde ise TMAM, koliform ve *Enterococcus* ssp. sayı ($\log_{10}$ kob/g) ortalamaları sırasıyla 5,72±0,41, 0,26±0,11 ve 0,70±0,23 olarak saptandı. Fermente ve ısıl işlem uygulanmış numunelerin laktik asit bakteri sayı ortalamaları sırasıyla 10,59±0,81 ve 2,75±0,76 $\log_{10}$ kob/g olarak tespit edildi. Laktik asit bakteri izolatları arasından en yaygın izole edilen türlerin *L. brevis* (%22,0), *L. plantarum* (%19,7) ve *L. curvatus (*%12,7) olduğu, diğer izolatların (%45,6) *L. salivarius, L. delbrueckii, L. lactis, L. paracasei* ve *Weissella confusa* türlerden oluştuğu saptandı.

S. aureus izolatlarının oksasilin, penisilin G, sefalothin ve eritromisine sırasıyla %100, %100, %55,6 ve %44,4 oranında dirençli, *E. faecium* izolatlarının ise oksasilin, kanamisin, trimethoprim/sulfamethakzol, siproflaksosin ve gentamisine sırasıyla %100, %91,7, %75,0, %58,4 ve %58,4 oranında dirençli oldukları belirlendi. *S. aureus* izolatlarında oksasilin MİK değerinin 4-64 µg/ml, *E. coli* izolatlarında tetrasiklin MİK değerinin 1-4 µg/ml, *E. faecium* izolatlarında vankomisin MİK değerinin ise 1-4 µg/ml aralığında olduğu tespit edildi.

L. plantarum ve *L. curvatus* izolatlarının %46,5'inin kanamisine, %42,9'unun siproflaksosine, %64,3'ünün trimethoprim/sulfamethakzole ve oksasiline, %53,6'sının vankomisine karşı dirençli oldukları belirlendi. *L. plantarum* izolatlarının MİK değerinin oksasilin ≤0,012-32 µg/ml, tetrasiklin ≤0,012-32 µg/ml, vankomisin 0,25-≥256 µg/ml, *L. curvatus* izolatlarının ise oksasilin ≤0,012-1 µg/ml, tetrasiklin ≤0,012-0,5 µg/ml ve vankomisin 0,25-1 µg/ml arasında olduğu saptandı. PCR analizi sonucunda tüm izolatlarda *mecA, tetM* ve *vanA* genleri tespit edilmedi.

Sonuç olarak sucuklarda patojen bakterilerin izole edilmesi mikrobiyolojik kalite açısından önem arz etmektedir. Sucuklardan izole edilen patojen bakteriler ile birlikte *L. plantarum* ve *L. curvatus* izolatlarının yüksek antibiyotik dirençlilik düzeyleri halk sağlığı açısından önem arz etmektedir. Konu ile ilgili ileri düzeyde moleküler çalışmaların yanı sıra halk sağlığını korumak üzere gerekli tedbirlerin alınması gerekmektedir.

Anahtar Sözcükler: Antibiyotik Dirençliliği; *Lactobacillus;* Patojen; PCR; Sucuk.

7. SUMMARY

Determination of Antibiotic Resistance of Some Pathogen Bacteria and *Lactobacillus* Species in Fermented and Heat Treated Sucuks

The study was performed physico-chemical analysis and the isolation of the some *Lactobacillus* bacteria species, *S. aureus*, *E. coli* and *E. faecium* and in order to identify the antibiotic resistance of isolates and *mecA*, *tetM* and *vanA* genes in fermented and heat-treated 100 sucuk samples offered in Konya city center. The average (log_{10} cfu/g) TMAM, *S. aureus*, coliform and *Enterococcus* bacteria counts of fermented sausage samples were found as 10,84±0,68, 1,84±0,34, 1,07±0,31, 2,88±0,42 respectively. In heat treatment applied samples, the average (log_{10} cfu/g) TMAM, coliform and *Enterococcus* ssp. counts (log_{10} cfu/g) were determined as 5,72±0,41, 0,26±0,11 and 0,70±0,23 respectively. The average lactic acid bacteria counts (log_{10} cfu/g) of fermented samples were found 10,59±0,81 and 2,75±0,76 respectively. Most common species among the lactic acid bacteria was detected *L. brevis* (22,0%), *L. plantarum* (19,7%) ve *L. curvatus* (12,7%) respectively, and other isolates (45,6%) were generated by *L. salivarius*, *L. delbrueckii*, *L. lactis*, *L. paracasei* ve *Weissella confusa* species.

The *S. aureus* isolates resistant to oxacillin, penicillin G, cefazolin and erythromycin were 100%, 100%, 55,6%, 44,4% respectively, the resistance of *E. faecium* isolates to oxacillin, kanamycin, trimethoprim/sulfamethoxazole, ciprofloxacin, gentamicin were determined as 100%, 91,7%, 75,0%, 58,4%, 58,4%, respectively. The oxacillin MIC values in *S. aureus* isolates were between 4-64 µg/ml, the tetracycline MIC values in *E. coli* isolates were between 1-4 µg/ml, the vancomycin MIC values in *E. faecium* were found between 1-4 µg/ml ranges.

L. plantarum and *L. curvatus* isolates were found to have 46,5% resistance to kanamycin, 42,9% to ciprofloxacin, 64,3% to trimethoprim/sulfamethoxazole and oxacillin, and 53,6% to vancomycin. The oxacillin MIC values of *L. plantarum were* ≤0,012-32 µg/ml, tetracycline MIC values were ≤0,012-32 µg/ml, vancomycin MIC values were 0,25-≥256 µg/ml, and the oxacillin MIC values of *L.curvatus* were ≤0,012-1 µg/ml, tetracycline MIC values were ≤0,012-0,5 µg/ml, and vancomycin MIC values were found as 0,25-1 µg/ml. *mecA*, *tetM* ve *vanA* genes could not be detected in all isolates with PCR analysis.

In conclusion, the isolation of pathogenic bacteria in sausages is crucial in terms of microbiological quality. Along with these isolated pathogenic bacteria, the high antibiotic resistance levels of *L. plantarum* and *L. curvatus* isolates are also of great importance as regards the public health. It is essential for sanitation that necessary measures be taken as well as advanced molecular studies conducted into the issue.

Keywords: Antibiotic Resistance; *Lactobacillus;* Pathogen; PCR; Sucuk.

8. KAYNAKLAR

1.Aaerstrup FM, Jenser LB. Use of antimicrobials in food animal production. In: Simjee S, Editor. Foodborne diseases. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007. p. 405-417.

2.Alanis AJ. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. Arch. Med. Res. 2005; 36: 697-705.

3.Aleksandow A, Simonson T. Molecular mechanics for tetracycline analogs. Journal of Compotational Chemistry. 2008; 30: 243-255.

4.Allerberger F, Fida P, Grossgut R, Schönbauer M, Würzner H. Antibiotics in horticulture and antibiotic feed additives in animal husbandry, Austria. Wien Klin Wochenschrift. 2003; 115 (17-18): 615-617.

5.Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. Appl. Environ. Microbiology. 2001; 67(1): 22-32.

6.Ammor MS, Florez AB, Mayo B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. Food Microbiology. 2007; 24: 559-570.

7.Ammor MS, Florez AB, Van Hoek AH, de Los Reyes-Gavilan CG, Aarts HJ, Margolles A, Mayo B. Molecular characterization of ıntrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. J Mol. Mic. Biotechnology. 2008; 14: 6-15.

8.Anonim. United States Department of Agriculture (USDA). Food safety inspection service code of federal regulation 318.23. Heat-processing and stabilization requirements for uncured meat patties. 1998.

9.Anonim. Antibiotic resistance. GAO-04-490 Antibiotic Use in Animals. 2004.

10.Anonim. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, seventeenth informational supplement (M100-S17). Clinical and Laboratory Standards Institute. 2007a.

11.Anonim. Opinion of the scientific committee on a request from efsa on the introduction of a qualified presumption of safety (QPS) approach for assessment of selected microorganisms referred to EFSA. EFSA Journal. 2007b; 587: 1-16.

12.Anonim. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2–A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

13.Anonim. European committee on antimicrobial susceptibility testing breakpoint tables for interpretation of mics and zone diameters. Verison 1.3. January 5. 2011.

14.Anonim. Türk Standartları Enstitüsü TS 1070 Sucuk Standardı. 2012. Ankara.

15.Aras Hisar Ş, Kaban G, Hisar O, Yanık T, Kaya M. Effect of *Lactobacillus sakei* lb706 on behavior of *Listeria monocytogenes* in vacuum-packed rainbow trout fillets. Turk J Vet Anim Sci. 2005; 29: 1039-1044.

16.Arslan D. İshal Oluşturan *Escherichia coli* infeksiyonları: Epidemiyoloji, Klinik, Tedavi. ANKEM Dergisi. 2008; 22(Sup.2):192-196.

17.Arthur M, Reynolds P, Courvalin P. Glycopeptide resistance in enterococci. Trends in Microbiology. 1996; 4: 401-407.

18.Atasever M, Keleş A, GünerA, Uçar G. Konya'da tüketime sunulan fermente sucukların bazı kalite nitelikleri. Veteriner Bilimleri Dergisi. 1998; 14(2): 27-32.

19.Bannerman TL. *Staphylococcus*, *Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. *Manual of clinical microbiology.* In: Murray PR, Baron EJ, Jorhensen JH, Pfaller MA, Yolken RH Editors. Washington DC: American Society for Microbiology. 2003. p. 384-404.

20.Barbosa TM, Levy S. The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. Drug Resistant Updates. 2000; 3: 303-311.

21.Barenfanger J, Drake C, Kacich G. Clinical and financial benefits of rapid bacterial identification and antimicrobial susceptibility testing. J Clin Microbiol. 1999; 37: 1415-1418.

22.Başustaoğlu A. Hayvan yemlerinde büyütme faktörü olarak kullanilan antibiyotiklerin direnç gelişimindeki rolü. Hastane İnfeksiyonları Dergisi. 2004a; 8(4): 286-291.

23.Başustaoğlu A. Enterokoklarda antibakteriyel direnç mekanizmaları ve direnç sorunu. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S Editors. Gram Pozitif Bakteri İnfeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004b. p.141-158.

24.Başyiğit G, Karahan AG, Kılıç B. Fermente Et ürünlerinde fonksiyonel starter kültürler ve probiyotikler. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 2007; 64(2): 60-69.

25.Bayrakal V, Doğan Y, Baskın H, Bahar İH. Gentamisine Duyarlı S*taphylococcus aureus* suşlarında gentamisin biyofilm ve koagulaz oluşumuna etkisi. Ankem Dergisi. 2007; 21 (3): 175-178.

26.Bell JM, Paton JC, Turnidge J. Emergence of vancomycin-resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. J Clin Microbiol. 1998; 36(8): 2187-2190.
27.Ben Belgacem Z, Abriouel H, Ben Omar N, Lucas R, Martinez-Canamero M, Galvez A, Mania M. Antimicrobial activity, safety aspects, and some technological properties of bacteriocinogenic *Enterococcus faecium* from artisanal Tunisian fermented meat. Food Control. 2007; 21**:** 462-470.
28.Bilgin Y. *Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii* ve *Staphylococcus aureus* suşlarında çesitli aminoglikozidlerin duyarlılıklarının araştırılması. İstanbul, Haseki Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği. Tıpta Uzmanlık Tezi. 2006.
29.Blom H, Hagen BF, Pedersen BO, Holck AL, Axelsson L, Naes H. Accelerated production of dry fermented sausage. Meat Science. 1996; 43: 229-242.
30.Boogaard AE, Stobberingh EE. Antibiotic usage in animals. Drugs. 1999; 58(4): 589-607.
31.Boone DR, Castenholz RW. Bergey's manual of systematic bacteriology. In: Boone Dr, Castenholz RW Editor. New York: Springer. Second Edition. 2001.
32.Bozdoğan B, Leclercq R. Plasmid-Mediated coresistance to streptogramins and vancomycin in *Enterococcus faecium* HM103. Antimicrobial Agents Chemoheraphy. 1999; 43: 2097-2098.
33.Bozkurt H, Erkmen O. Effects of starter culture and additives on the quality of Turkish style sausage(sucuk). Meat Science. 2002; 61: 149-156.
34.Butaye P, Devriese LA, Haesebrouck F.Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well known antibiotics on gram-positive bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16: 175-188.
35.Büyüköztürk Ş. Veri analizi el kitabı. 7. Baskı. Pagema Yayıncılık. 2007; 67-77.
36.Candoğan K. Bacterial starter cultures, aging and fermantation effects on some characteristics of fermented beef sausages. Clemson University, Food Technology, Doctor of Philosophy Thesis. 2000.
37.Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation, International J Food Microbiology. 1999; 50: 131-49.
38.Cengiz AT. *Staphylococcus*. In:Ustaçelebi Ş Editor. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitapevi. 1999. p. 339-347.
39.Cengiz M, Uslu MO, Balcıoğlu I. Treatment of *E. coli* HB101 and the *tetM* gene by fenton's reagent and ozone in cow manure. J Environ. Management. 2010; 91: 2590-2593.
40.Chambers HF. Methicillin-resistant staphylococci. Clin. Microbiol. Rev. 1988: 1; 173-186.
41.Chambers HF. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. Clin Microbiol Rev. 1997; 10: 781-791.
42.Chao G, Zhou X, Jiao X, Qian X, and Xu L. Prevalence and antimicrobial resistance of foodborne pathogens isolated from food products in China. Foodborne Pathogens and Diseases. 2007; 4: 277-284.
43.Chopra I, Roberts M. Tetracycline Antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. Micro. Mol. Bio. Rev. 2001; 65(2): 232-260.
44.Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. Clin. Microbiol. Rev. 2003; 16(3): 365-378.
45.Claycamp HG, Hooberman BH. Antimicrobial resistance risk assessment in food safety. Journal of Food Protection. 2004; 67: 2063-2071.
46.Clewell DB, Gawron-Burke C. Conjugative transposons and the dissemination of antibiotic resistance in *Streptococci.* Annu. Rev. Microbiol. 1986; 40: 635-659.
47.Cocconcelli PS, Fontana C. Starter culture for meat fermantation. In: Toldra F Editor. Handbook of meat processing. Ames,Iowa: Wiley-Blackwell Publishing. First Edition. 2010. p. 200-205.
48.Cocconcelli PS, Cattivelli D, Gazzola S. Gene transfer of vancomycin and tetracycline resistances among *Enterococcus faecalis* during cheese and sausage fermentations. Food Microbiology. 2003; 88: 315-323.
49.Comunian R, Daga E, Dupre I, Paba A, Devirgiliis C, Piccioni V, Perozzi G, Zonenschain D, Rebecchi A, Morelli L, Lorentiis A, Giraffa G. Susceptibility to tetracycline and erythromycin of *Lactobacillus paracasei* strains isolated from traditional Italian fermented foods. International J Food Microbiol. 2010; 138(1-2): 151-156.
50.Connel SR, Tracz DM, Nierhaus KH, Taylor DE. Ribosomal protection proteins and their mechanism of tetracycline resistance. Antimicrobial Agents and Chemotheraphy. 2003; 47(12): 3675-3681.
51.Coventry J, Hickey MW. Growth characteristics of meat starter cultures. Meat Science. 1991; 30: 41-48.

52.Çakır P. Gıda ve insan kaynaklı *Staphylococcus aureus* strainlerinin karakterizasyonu. Eskişehir, Anadolu Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. 2007.
53.Çon AH. Sucuktan bakteriosin benzeri antimikrobiyal metabolit üreten laktik asit bakterilerinin izolasyon ve identifikasyonu ve çeşitli gıda zararlısı ve/veya gıda kaynaklı patojen bakterilere karşı antagonistik aktivite araştırılması. Erzurum, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü. Doktora Tezi. 1995.
54.Çon AH, Doğu M, Gökalp HY. Afyon'da büyük kapasiteli et işletmelerinde üretilen sucuk örneklerinin bazı mikrobiyolojik özelliklerinin periyodik olarak belirlenmesi. Türk Veteriner ve Hayvancılık Bilimleri Dergisi. 2002; 26(1): 11-16.
55.Çon AH, Gökalp HY. Production of bacteriocin-like metabolites by lactic acid cultures isolated from sucuk samples. Meat Science. 2000; 55: 89-96.
56.Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall CG. Vancomycin resistant enterococci. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 13(4): 686-707.
57.Çetinkaya Y, Ünal S. Metisilin dirençli *Staphylococcus aureus* infeksiyonları: Epidemiyoloji ve Kontrol. Flora. 1996; 1 (Ek 3): 3-16.
58.Çetinkaya Y, Falk P, Mayhall G. Vancomycin-resistant enterococci. Clin. Microbiol. Rev. 2000; 13(4): 686-707.
59.Çöleri A, Çökmüş C. Enterokok türlerinde glikopeptid grubu antibiyotiklere direncin moleküler mekanizmaları ve gen aktarım yolları. Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi. 2008; 65 (2): 87-96.
60.Daane AR. A microbiological survey and characterization of enterococci and vancomycin resistant enterococci in compost. Clemson University, Microbiology. Master of Science. 2008.
61.Davies J, Webb V. Emerging infections. antibiotic resistance in bacteria. emerging infections. Biomedical Research Reports. In: Krause RM Editor. New York: Academic Press. 1998. p.239-273.
62.De Boer E, Zwartkruis-Nahuis JTM, Wit B, Huijsdens XW, De Neeling AJ, Bosch T, Van Oosterom RAA, Vila A, Heuvelink AE. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in meat. International J Food Microbiology. 2009;134(1-2): 52-56.
63.Descheemaeker PRM, Chapelle S, Devriese LU, Butaye P, Vandamme P, Goossens H. Comparison of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* isolates and glycopeptide resistance genes of human and animal origins. Antimicrobial Agents and Chemotheraphy. 1999; 43(8): 2032-2037.
64.Demeyer D. Meat Fermentation: Principles and applications. In: Hu H, Meunier-Goddik L, Hansen A, Josephsen J, Nip WK, Stanfield P. In: Toldra F Editor. Handbook of food and beverage fermentation technology. New York: Marcel Dekker Publishing. 2010.
65.Derbentli Ş. Stafilokok ve enterokoklarda antibiyotik duyarlılık deneylerinin özellikleri. ANKEM Dergisi. 1996; 10(2): 211-219.
66.Deurenberg RH, Vink C, Kalenic S, Friedrich AW, Bruggeman CA, Stobberingh EE. The Molecular evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Clin. Microbiol. Infect. 2007; 13: 222-235.
67.Dinçer B, Mutluer B, Erol İ, Özdemir H, Yağlı Ö, Akgün S. Türk fermente sucuğuna özgü starter kültür bakterilerinin izolasyon, identifikasyon ve üretimleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1995; 42: 285-293.
68.Dinçer E. Et ve et ürünlerindenlaktik ait bakterilerinin izolasyonu ve bunların antimikrobiyal aktivitelerinin belirlenmesi. Eskişehir, Anadolu Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. 2007.
69.Duman T. Tavuk karkaslarından izole edilen *Staphylococcus*'ların virülans faktörleri ve antibiyotik dirençliliği. Ankara, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı. Yüksek Lisans Tezi. 2007
70.Dutka-Malen S, Molinas C, Arthur M, Courvalin P. Sequence of the *vanC* gene of *enterococcus gallinarum* BM4174 encoding a d-alanine:d-alanine ligase related protein necessary for vancomycin resistance. Gene, 1992; 112: 53-58.
71.Egervarn M. Antibiotic Resistance in *L. reuteri* and *L. plantarum*. Uppsala: Swedish University of Agricultural Sciences, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences, Department of Microbiology, Doctoral Thesis. 2009.
72.Emody L, Kerenyi M, Nagi G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. Int. J Antimicro. Agents. 2003: 22; 29-33.
73.Epstein M E, Amodio-Groton M, Sadick NS. Antimicrobial agents for the dermatologist-beta lactam antibiotics and related compounds. Journal of the American Academy of Dermatology. 1997; 37(2): 149-165.

74.Ercoşkun H. Isıl işlem uygulanarak üretilen sucukların bazı kalite özelliklerine fermantasyon süresinin etkileri. Ankara, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi, 2006.
75.Ercoşkun H, Çon AH. Fermente et ürünlerinde lipoliz ve aroma üzerine etkileri. Ondokuz Mayıs Üniversitesi Ziraat Bilimleri Dergisi. 2003; 18(2): 45-53.
76.Ercoşkun H, Kıralan M. ve Işıksal S. Fermente et ürünlerinde lipit reaksiyonları. Gıda Mühendisleri Odası Gıda Mühendisliği Dergisi, 2004; 8(18): 38-46.
77.Ercoşkun H, Özkal SG. Kinetics of traditional Turkish sausage quality aspects during fermentation. Food Control. 2011; 22: 165-172.
78.Ercoşkun H, Tağı Ş, Ertaş AH. The effect of different fermentation intervals on the quality characteristics of heat-treated and traditional sucuks. Meat Science. 2010; 85: 174-181.
79.Erdem B. *Enterobacteriaceae*. In: Ustaçelebi Ş Editor. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş Kitabevi, 1. Baskı. 1999. p. 471-515.
80.Erdoğrul Ö, Ergün Ö. Kahramanmaraş piyasasında tüketilen sucukların bazı fiziksel, kimyasal, duyusal ve mikrobiyolojik özellikleri. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2005; 31(1): 55-65.
81.Erdoğrul ÖT, Çetin Ö, Ergün Ö. Fermente sucuklardan izole edilen *Pediococcus pentosaceus* suslarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktiviteleri üzerine çalışmalar. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2002;28 (1): 294-254.
82.Erkmen O, Bozkurt H. Quality characteristics of retail sucuk (Turkish dry fermented sausage). Food Technology and Biotechnology. 2004; 42(1): 63-69.
83.Erol İ. Gıda hijyeni ve mikrobiyolojisi. Ankara: Pozitif Yayıncılık. 1. Baskı. 2007. p. 299-302.
84.Ertaş AH. Fermente sosislerde lezzet oluşumu. Gıda. 1999; 24(5): 303-317.
85.Evans JB. *Micrococcaceae*, *Eubacteriales*, genus II, S*taphylococcus.* Bergey's manual of determinative bacteriology. In: Breed RS, Murray EGD, Smith NR. Editor. Baltimore: The Williams&Wilkins Company. Seventh Edition. 1957. p. 464-475.
86.Facklam RR, Sahm DF, Teixeria LM. *Enterococcus*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH Editors. Manual of Clinical Microbiology. 7th Edition. Washington: American Society for Microbiology. 1999. p. 255-287.
87.Fadda S, Vignolo G. Central and South American Products. In: Toldra F, Hui YH, Astiasaran I, Nip WK, Sebranek JG, Silveria ETF, Stahnke L, Talon R. Handbook of Fermented Meat and Poultry. Ames IA:Blackwell Publishing. 2007. p.387-391.
88.Filiz N. Yüksek ısı uygulaması ile üretilen Türk sucuklarında starter kültür kullanımı. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2002; 28(1): 17-29.
89.Fines M, Perichon B, Reynolds P, Sahm DF, Courvalin P. *VanE*, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* BM4405. Antimicrobial Agents Chemotheraphy. 1999; 43: 2161-2164.
90.Florea NF, Nightingale CH. Review of the pharmacodynamics of antibiotic use in animal food production. Diag. Microbiol. Infect. Disease. 2004; 49: 105-108.
91.Fluit AC, Schmitz JF. The use of molecular techniques to detect antimicrobial resistance in clinical bacterial isolates. Microbiology Today. 2001; 28(1): 14-15.
92.Fluit ADC, Visser MR, Schmitz FJ. Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin. Microbiol. Rev.. 2001; 14(4): 836-871.
93.Franz C, Holzapfel MAP, Stiles ME. Enterococci at the crossroad of food safety?. Int. J Food Microbiology. 1999: 47; 1-24.
94.Fuda CC, Fisher JF, Mobashery S. Beta-lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. Cellular Molecular Life Sciences. 2005; 62(22): 2617-2633.
95.Fuller E, Elmer C, Nattress F, Ellis R, Horne G, Cook P. Fawcett T. β- Lactam resistance in *Staphylococcus aureus* cells that do not require a cell wall for integrity. Antimicrobials and Chemotheraphy. 2005; 49(12): 5075-5080.
96.Fuoco D. Classification framework and chemical biology of tetracycline-structure-based drugs. Antibiotics. 2012: 1; 1-12. Doi:10.3390/antibiotics1010001
97.Gazzola S, Fontana C, Bassi D, Cocconcelli PS. Assessment of tetracycline and erythromycin resistance transfer during sausage fermentation by culture-dependent and independent methods. Food Microbiology. 2012; 30: 348-354.
98.Gençcelep H. Sucuk üretiminde değişik starter kültürler ve farklı nitrit seviyelerinin biyojen amin oluşumu üzerine etkileri. Erzurum, Atatürk Üniversites, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi. 2006.
99.Gevers D, Danielsen M, Huys G, Swings J. Molecular characterization of *tet(m)* genes in *Lactobacillus* isolates from different types of fermented dry sausage. Appl. Environ. Microbiology 2003; 69(2): 1270-1275.

100.Gevers D, Huys G, Devlieghere F, Uyttendaele M, Debevere J, Swings J. Isolation and identification of tetracycline resistant lactic acid bacteria from pre-packed sliced meat products. Systematic and Applied Microbiology. 2000; 23: 279-284.
101.Ghidan A. Epidemiology of *vanA* gene carrier enterococci: molecular characterization, antibiotic sensitivity and phylogenetic relationship of hungarian isolates. Hungary, Semmelweis University, Institute of Medical Microbiology. Doctoral Thesis. 2007.
102.Gökalp HY, Ercoşkun H, Çon AH. Fermente et ürünlerinde bazı biyokimyasal reaksiyonlar ve aroma üzerine etkileri. Pamukkale Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi. 1998; 4(3): 805-811.
103.Gökalp HY, Kaya M, Zorba Ö. Et ürünleri işleme mühendisliği. Erzurum:Atatürk Üniversitesi Yayınları Yayın No:786. Beşinci Baskı. 2004. syf.203-210.
104.Gönülalan Z, Yetim H, Köse A. Quality characteristics of döner kebab made from sucuk dough which is a dry fermented Turkish sausage. Meat Science. 2004; 67: 669–674.
105.Guardabassi L, Courvalin P. Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance, In: Aarestrup FM Editor. Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. Washington: ASM Press. 2006. p. 1-18.
106.Gueimonde M, Salminen S, Isolauri E. Presence of specific antibiotic (*tet*) resistance genes in infant faecal microbiotia. FEMS Immunal Medical Microbiology. 2006; 48: 21-25.
107.Güleren A. Et ve fermente et ürünlerinden izole edilen *Lactobacillus sake* ve *Lactobacillus curvatus* suşlarının moleküler ve biyokimyasal identifikasyonu ve bazı teknolojik özelliklerinin belirlenmesi. Bursa, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 2008.
108.Gündoğan N, Çıtak S, Yücel N, Devren A. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. Meat Science. 2005; 69(4): 807-810.
109.Gürakan GC, Bozoğlu TF, Weiss N. Identification of *Lactobacillus* strains from Turkish-style dry fermented sausages. Lebensmittel-Wissenschaft&Technologie. 1995; 28: 139-144.
110.Hammes W, Hertel C. (2006). The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: The prokaryotes.2006. p. 320-403. DOI: 10.1007/0-387-30744-3-10.
111.Hammes WP, Vogel RF. The genus *Lactobacillus*. In: Wood BJB, Holzapfel WH Editor. The genera of lactic acid bacteria. London: Blackie Academic & Professional. 2005. pp. 19-54.
112.Handwerger S, Perlman DC, Altarac D, McAuliffe V. Concominant high-level vancomycin and penicilin resistance in clinical ısolates of enterococci. Clin. Infect. Disease. 1992; 14: 655-661.
113.Hanrahan J, Hoyen C, Rice LB. Geographic distribution of a large mobile element that transfers ampicillin and vancomycin resistance between *Enterococcus faecium* strains. Antimicrobial Agents Chemotheraphy. 2000; 44: 1349-1351.
114.Harrigan WF. Laboratory methods in food microbiology. In: Harrigan WF. Academic Press. Third Edition. 1998.
115.Hensyl WR. Bergey's manual determinative bacteriology. In: Hensyl WR Editor. Philadelphia:Lippincott&Williams. Ninth Edition. 2000a. p.556-585.
116.Hensyl WR. Bergey's manual determinative bacteriology. In: Hensyl WR Editor. Philadelphia:Lippincott&Williams. Ninth Edition. 2000b. p.532-540.
117.Henze U, Sidow T, Wecke J, Labischinski H, Berger-Bachi B. Influence of *femb* on methicillin resistance and peptidoglycan metabolism in *Staphylococcus aureus*. Journal of Bacteriology. 1993; 175: 1612-1620.
118.Himathongkham S, Riemann H, Baharı S, Nuanualsuwan S, Kass P, Cliver DO. Survival of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in poultry manure and manure slurry at sublethal temperatures. Avian Diseases. 2000; 44: 853-860.
119.Hinrichsen LL, Andersen HJ. Volatile compounds and chemical changes in cured pork: role of three halotolerent bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1994; 42: 1537-1542.
120.Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends in Microbiology. 2001; 9: 486-493.
121.Hu P, Zhou G, Xu X, Li C, Han Y. Characterization of the predominant spoilage bacteria in sliced vacuum-packed cooked ham based on 16S rdna-dgge. Food Control. 2009; 20: 99-104.
122.Hughes P, Heritage J. Antibiotic growth promoters in food animals. Food and Agriculture Organisation Report. Amerika Birleşik Devletleri. [cited 11 October 2004]. Available from URL: http://www.fao.org/docrep/007/y5159e/y5159e08.htm#bm08
123.Hutkins WR. Meat fermentation. Microbiology of fermented foods. In: Hutkins WR. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. 2006. p.213.
124.İnal T. Besin hijyeni, hayvansal gıdaların sağlık kontrolü. İstanbul: Final Ofset. 1992.

125.İzgür M. Enterobakteri infeksiyonları (*Enterobactericeae*). In: Aydın N, Paracıkoğlu J. Veteriner mikrobiyoloji (Bakteriyel Hastalıklar). Ankara: İlke-Emek Yayınevi. 2006.
126.Jahan M, Krause DO, Holley R. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* species from meat and fermented meat products isolated by a PCR-based rapid screening method. Int. J. Food Microbiol. 2013; 163(2-3): 89-95.
127.Jorgensen JH, Ferrano MJ. Antimicrobial Susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. clinical ınfestious disease. 2009; 49: 1749-1755.
128.Jorgensen JH, Turnidge JD. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA, eds. Manual of clinical microbiology. 9th ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2007. p.1152-1172.
129.Jorgensen JH, Ferraro MJ, McElmeel ML, Spargo J, Swenson JM, Ten-over FC. Detection of penicillin and extended-spectrum cephalosporin resistance among *Streptococcus pneumoniae* clinical ısolates by use of the e-test. J Clin. Microbiol.. 1994; 32: 159-163.
130.Kaban G. Sucuk and pastırma:microbiological changes and formation of volatile compounds. Meat Science. 2013; 95: 912-918.
131.Kaban G. Geleneksel olarak üretilen sucuklardan laktik asit bakterileri ile katalaz pozitif kokların izolasyonu-identifikasyonu, üretimde kullanılabilme imkanları ve uçucu bileşikler üzerine etkileri. Erzurum, Atatürk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı, Doktora Tezi. 2007.
132.Kaban G, Kaya M. Effects of starter culture on growth of Staphylococcus aureus in sucuk. Food Control. 2006; 17: 797-801.
133.Karabiber N, Karahan M. *Staphylococcus aureus* suşlarında metisilin direncinin saptanmasında agar tarama (screen) ve disk difüzyon yöntemlerinin karşılaştırılması. Mikrobiyoloji Bülteni. 1995; 29: 20-25.
134.Karakaş A. Beyaz peynir ve fermente sucuklardan *Enterococcus faecium*'un izolasyonu ve tanımlanması. Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek lisans tezi. 2005. Adana.
135.Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, *staphylococcus* cassette chromosome mec, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents Chemotheraphy. 2000; 44: 1549-1555.
136.Katla AK, Kruse H, Jonsen G, Herikstad H. Antimicrobial susceptibility of starter culture bacteriaused in Norwegian dairy products. Int. J Food Microbiology. 2001; 67: 147-152.
137.Kayaoğlu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis:* relationship to endodontic disease. Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 2004; 15(5): 308-320.
138.Khachatourians GG. Agricultural Use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. Can. Med. Ass. Journal. 1998; 159: 1129-1136.
139.Klein G, Dicks LMT, Pack A, Hack B, Zimmermann K, Dellaglio F, Reuter G. Emended description of *Lactobacillus sake* (abo-elnaga and kandler): numerical classification revealed by protein fingerprinting and ıdentification based on biochemical patterns and dna-dna hybridizations. Int. J Systematic Bacteriol. 1996; 46(2): 367-376.
140.Kloos WE, Bannerman TL. *Staphylococcus* and *Micrococcus*, Manual of clinical microbiology, In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Yolken RH, Editor. Washington DC: ASM Press. 1995. p.282-298.
141.Kim SH, Jia W, Parreira VR, Bishop RE, Gyles CL. Phosphoethanolamine substitution in the lipid a of *Escherichia coli* O157:H7 and its association with pmrc. Microbiology. 2006: 152: 657-666.
142.Kobayashi N, Taniguchi K, Urasawa S. Analysis of diversity of mutations in the *mecI* gene and *mecA* promoter/operator region of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis*. Antimicrobial Agents Chemotheraphy. 1998; 42: 717-720.
143.Kohenski MA, Dwyer DJ, Hayete B, Lawrence CA, Collins JJ. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. Cell. 2007; 130: 797-810.
144.Koluman A, Ünlü T, Dikici A, Tezel A, Akçelik EN, Burkan ZT. Presence of *Staphylococcus aureus* and stahylococcal enterotoxins in different foods. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2011; 17(Sup.A): 55-60.
145.Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC. The Gram positive cocci. part II. Streptococci, enterococci and the streptococci like bacteria. In: Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC Editors. Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. Fifth Edition. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997. p.577-629.
146.Kongkiattikajorn J. Potential of fermented sausage-associated lactic acid bacteria to degrade biogenic amines during storage. lactic acid bacteria-r&d for food, health and livestock purposes. In: Kongo M. Editor. Croatia: InTech Press. First Edition. 2013. p.97-127.

147.Koo H, Woo G. Distribution and transferability of tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli* isolated from meat and meat products. Int. J. Food Microbiology. 2011; 145 (2-3): 407-413.
148.Korhonen J. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria. Kuopio, University of Eastern Finland, Faculty of Forestry and Natural Sciences, Department of Biosciences, Doctor of Philosophy Thesis. 2010.
149.Kök F, Özbey G, Muz A. Aydın ilinde satışa sunulan fermente sucukların mikrobiyolojik kalitelerinin incelenmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi. 2007; 21(6): 249-252.
150.Kröckel L. The Role of lactic acid bacteria in safety and flavour development of meat and meat products. lactic acid bacteria for food, health and livestock purposes. In: Kongo M. Editor. Croatia: InTech Press. First Edition. 2013. p. 135-146.
151.Kuwahara-Arai K, Kondo N, Hori S, Tateda-Suzuki E, Hira-Matsu K. Suppression of methicillin resistance in a *mecA* containing pre-methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* strain is caused by the *mecI* mediated repression of pbp 2' production. Antimicrobial Agents Chemotheraphy. 1996; 40: 2680-2685.
152.Landman D, Georgescu C, Martin DA, Quale J. Polymxins revisited. Clin. Microbiol. Rev. 2008; 21(3): 449-465.
153.Laport MS, Da Silva MR, Silva CC, De Friere Bastos MDC, Giambiagi-de Marval M. Heat-resistance and heat-shock response in the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium*. Current Microbiology. 2003; 46: 313-317.
154.Lebert I, Leroy S, Talon R. Microorganisms in traditional fermented meats. In: Toldra F Editor. Handbook of fermented meat and poultry. First Edition. Australia: Blackwell Publishing; 2007a. p.113-124.
155.Ledeboer NA, Hodinka RL. Molecular detection of resistance determinants. J. Clin. Microbiol. 2011: 49(9) Sup.; 20-24.
156.Lee JH. Methicillin (oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. Appl. Environ. Microbiology. 2003; 69: 6489–6494.
157.Lee JH. Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains from cattle and chicken, and analyses of their *mecA*, *mecR1* and *mecI* genes. Vet. Microbiology. 2006;114:155-159.
158.Lei T, Tian W, He L, Hui-Huang X, Sun-Yong X, Deng YT, Sun Y, Lv DH, Wu CM, Huang LZ, Shen-Zuhong J, Hua-Liu J. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. Vet. Microbiology. 2010; 146(1-2): 85-89.
159.Leistner L. Principles and applications of hurdle technology in new methods of food preservation. In: Gould GW. New York: Blackie Academic & Professional. 1995. p.122.
160.Leroy F, De Vuyst L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends in Food Science&Technology. 2004; 15: 67-78.
161.Leroy F, Geyzen A, Janssens M, De Vuyst L, Scholliers P. Meat fermantation crossroads of innovation and tradition: a historical outlook. Trends in Food Science&Technology. 2013; 31: 130-137.
162.Leroy F, Verluyten J, De Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. International Journal of Food Microbiology. 2006; 106: 270-285.
163.Lester CH, Frimodt Moller N, Sorensen TL, Monnet DL, Hammerum AM. In vivo transfer of the vana resistance gene from an *Enterococcus* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers. Antimicrobial Agents and Chemotheraphy. 2006: 50(2); 596-599.
164.Levine DP. Vancomycin:a history. Clin. Infect. Dis. 2006; 42: 5-12.
165.Levy SB. Antibiotic resistance: an ecological imbalance. DJ. Chadwick&J Good (Eds.), Antibiotic resistance. Origins, evolution, selection and spread. Chichester: John Wiley & Sons Inc. 1997. p. 1-14.
166.Lindsay H. Food representations. In: Erdkamp P Editor. A cultural history of food in antiquity. London & NewYork: Berg Publishers; 2012. p.163-179.
167.Lior H. Classification of *Escherichia coli*, In: Gyles CL Editor. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford, UK: CAB International. 1996. p. 31-72.
168.Lücke KF. Utilization of microbes to process and preserve meat. Meat Science. 2000; 56: 105-115.
169.Maddock R. U.S. products. In: Toldra F. Editor. Handbook of fermented meat and poultry. Iowa: Blackwell Publishing. 2007. p.327-332.

170.Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Biology of microorganisms. 8th Edition. Prentice Hill International, Inc. 1997.
171.Maranan MC, Moreira B, Boyle-Vavra S, Daum RS. Antimicrobial resistance in staphylococci. Infection disease clinical north american. 1997; 11: 813-849.
172.Maxton A, Benjamin JC, Ram GD, Bailey SB, Ramteke PW. Antibacterial activity of isolated human intestinal microbiota *Lactobacillus* strains against methicillin resistant and susceptible *Staphylococcus aureus*. Afr. J. Microbiol. Res. 2013; 7(18): 1802-1808.
173.Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review. International Journal of Food Microbiology. 2005; 105: 281-295.
174.Mc Dermott PF, Zhao S, Wagner DD, Simjee S, Walker RD, White DG. The food safety perspective of antibiotic resistance. Anim. Biotechnology. 2002; 13(1): 71-84.
175.Messi P, Bondi M, Sabia C, Batini R, Manicardi G. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. Int. J. Food Microbiology. 2001;64: 193-198.
176.Miller EL. The penicillins: a review and update. Journal of Midwifery&Women's Health. 2002; 47(6): 426-434.
177.Moellering JC. *Enterococcus* species. In: Mandell GL ve ark Editors. Principles and practise of ınfectious diseases. 5th Edition. NewYork: Churcill Livingstone; 2000. p.2147-2156.
178.Mukarami K, Minamide W, Wada K, nakamura E, Teraoka H, Watanebe S. Identification of metisilin resistant strains of staphylococci by polimerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. 1991; 29(10): 2240-2244.
179.Mulligan ME, Murray-Leisure KA, Standiford HC. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a consessus review of themicrobiology, pathogenesis and epidemiology with ımplications for prevention and management. Am. J. Med. 1993; 94: 313-328.
180.Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Staphylococcus* and related organisms. Medical microbiology. Philadephia: Elsevier Mosby. 5th Edition. 2005. p. 221-236.
181.Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N. Resistance to acidic and alkaline environements in the endodontic pathogen enterococci. Oral Microbial Immu. 2006; 5: 283-288.
182.Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11(1): 142-201.
183.Navarro F, Courvalin P. Analysis of genes encoding d-alanine-d-alanine ligase related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. Antimicrobial Agents Chemotheraphy. 1994; 38: 1788-1793.
184.Navarro JL, Nadal MI, Nieto P, Flores J. Effect of nitrate curing salts on lipolysis in dry sausages produced using a rapid fermentation process. Food Sci. and Tech. 1998; 206: 217-221.
185.Neuhauser MM, Danziger HL. β-Lactam antibiotics. Infectious disease: drug interactions in infectious diseases.In: Piscitelli SC, Rodvold KA Editor. New York: Humana Press Included. 2nd Edition.2005.
186.Normanno G, La Sandra G, Dambrosio A, Quaglia DC, Corrette M, Parisi A, Greco G, Bellacicco AL, Virgilio S, Celano GV. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int. J. Food Microbiology. 2007;117 (2): 219-222.
187.Noveir MR, Doğan HB, Halkman AK. Çeşitli hayvansal gıdalarda *Enterobacteriacaea* üyelerinin varlığı. Gıda. 2000; 25(6): 423-428.
188.Oğuz B. Türkiye halkının kültür kökenleri, teknikleri, müesseseleri, inanç ve adetleri I. İstanbul: Anadolu Aydınlatma Vakfı Yayınları. İstanbul Matbaası. 1976. p.646-647.
189.Oka H, Ito Y, Matsumoto H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. J. Chromatography A. 2000; 882: 109-133.
190.Olivera B, Chopra I. Tet Determinants provide poor protection against some tetracyclines: further evidence for division of tetracyclines into two classes. Antimicrobial Agents Chemotheraphy. 1992; 36: 876-878.
191.Öner M. Genel Mikrobiyoloji. İzmir: Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Kitaplar Serisi No: 94. 1992. p. 231-245.
192.Özdemir H, Sırıken B. Pastırmadan izole edilen laktobasillerin bazı biyokimyasal ve fizyolojik özellikleri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1996; 43: 307-310.
193.Özdemir H. Türk fermente sucugunun florasındaki dominant laktobasil türlerinin sucugun organoleptik nitelikleri ile ilişkisi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1999; 46: 189-198.
194.Özdemir H, Çelik TH, Erol İ, Sireli UT, Sırıken B. Yüksek sıcaklık derecesinde olgunlaştırılan Türk fermente sucuklarından Laktobasillerin seyir, izolasyon ve identifikasyonu. Gıda. 1996; 21(6): 465-470.

195.Özdemir H, Küplülü Ö, Çelik TH. Türk fermente sucuğundan izole edilen laktobasillerin antibakteriyel etkilerinin saptanması. Gıda. 2002; 27(6): 539-544.
196.Özen NS, Dağlar D, Özhak Baysan B, Yıldırım Ç, Yazısız H, Öğünç D, Öngüt G, Çolak D, Gültekin M. Metisilin dirençli *Stahylococcus aureus* suşlarının saptanmasında mrsa ıd kromojenik besiyerinin değerlendirilmesi. ANKEM Dergisi. 2011; 25(1): 31-34.
197.Özmen Toğay S, Çelebi Keskin A, Açık L, Temiz A. Virulence genes, antibiotic resistance and plasmid profiles of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from naturally fermented Turkish foods. J. Appl. Microbiol. 2010; 109(3):1084-1092.
198.Özşahin AD, Diğrak M, Kıran ÖE. *Escherichia coli*'nin beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç kazanmasının araştırılması. Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen ve Mühendislik Dergisi. 2005; 8(2): 8-12.
199.Öztan A. Et bilimi ve teknolojisi. Ankara: TMMOB Gıda Mühendisleri Odası Kitaplar Serisi Yayın No:1. Genişletilmiş 4. Baskı. 2003. p. 346-354.
200.Öztürk R. Antimikrobik ilaçlara karşi direnç gelişme mekanizmalari ve günümüzde direnç durumu. İstanbul Üniversitesi. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi. Dizi No:31. 2002. p. 83-100.
201.Papamanoli E, Tzanetakis N, Lipopoulou-Tzanetaki E, Kotzekidou P. Characterization of lactic acid bacteria ısolated from greek dry fermented sausage in respect of tehir technological and probiotic properties. Meat Science. 2003; 65: 859-867.
202.Pan L, Hu X, Wang X. Assessment of antibiotic resistance of lactic acid bacteria in Chinese fermented foods. Food Control. 2011; 22: 1316-1321.
203.Pankey GA, Sabath LD. Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of gram-positive bacterial ınfections. Clin. Infect. Dis. 2004: 38; 864-870.
204.Parry MF. The penicillins. Medical Clinics of North America. 1987; 7(6): 1093-1095.
205.Pesavento G, Calonicao C, Ducci B, Magnanini A, Lo Nostro A. Prevalence and antibiotic resistance of e*nterococcus* spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. Food Microbiology. 2014; 41: 1-7.
206.Perreten V, Giampa N, Schuler-Schmid U, Teuber M. Antibiotic resistance genes in coagulase-negative staphylococci isolated from food. Systematic and Appl. Microbiol. 1998; 21: 113-120.
207.Perreten V, Schwarz F, Cresta L, Boeglin M, Dasen G, Teuber M. Antibiotic resistance spread in food. Nature. 1997; 389: 801-802.
208.Prakash V, Lewis JS II, Jorgensen JH. Vancomycin MIC's with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (mrsa) isolates differ based upon the susceptibility test method used. Antimicrobial Agents Chemotheraphy. 2008; 52: 4528.
209.Quednau M, Ahrne S, Petersson AC, Molin G. Antibiotic-resistant strains of *Enterococcus* isolated from Swedish and Danish retailed chicken and pork. J. Appl Microbiol. 1998; 84: 1163-1170.
210.Quintiliani R Jr, Courvalin P. Characterization of Tn*1547*, a composite transposon flanked by the IS16 and IS256-like elements, that confers vancomycin resistance in *Enterococcus faecalis* BM4281. Gene, 1996; 172: 1-8.
211.Rakita RM, Vanek NN, Jacques-Palaz K, Mee M, Mariscalco MM, Dunny GM, et al. *Enterococcus faecalis* bearing aggregation substance is resistant to killing by human neutrophils despite phagocytosis and neutrophil activation. Infect. Immunology. 1999; 67: 6067-6075.
212.Rasmussen B, Noller HF, Daubresse G, Oliva B, Misulovic S, Rothstein DM, Ellestad GA, Gluzman Y, Tally FP, Chopra I. Molecular basis of tetracycline action: identification of analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 1991; 35: 2306-2311.
213.Rennie R, Turnbull L, Brosnikoff C. Comparison of oxoid m.ı.c. evaluator device with broth microdilution and e-test device from ab biodisk for antimicrobial susceptibility testing of *Enterobacteriaceae* [abstract P859]. In: Program and abstracts of the 18th annual meeting of the european congress on clinical microbiololgy and ınfectious diseases (Barcelona). European congress on clinical microbiololgy and infectious diseases, 2008.
214.Resmi Gazete. 28157 sayılı "Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Tebliği". 29.12.2011. 3. Mükerrer Sayısı.
215.Resmi Gazete. 28488 sayılı "Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Türk Gıda Kodeksi Et ve Et Ürünleri Tebliği". 05.12.2012a.

216.Resmi Gazete. 28282 sayılı "Gıda Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı Türk Gıda Kodeksi, Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği". 04.05.2012b.
217.Richter SS, Ferraro MJ. Susceptibility testing instrumentation and computerized expert systems for data analysis and interpretation. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA Editors. Manual of Clinical Microbiology. 9th Edition. Washington DC: American Society for Microbiology. 2007. p. 245-256.
218.Roberts MC. Characterization of the *tetM* determinants in urogenital and respiratory bacteria. Antimicrobial Agents Chemotheraphy. 1990; 34: 476-478.
219.Roberts MC, Schwarz S. Tetracycline and chloramphenicol resistance mechanism. In: Gorgiev V St Editor. Antimicrobial Drug Resistance. New York: Springer Pub. 2009. p. 183-193.
220.Sáenz Y, Zarazaga M, Brinas L, Lantero M, Ruiz-Larrea F, Torres C. Antibiotic resistance in *Escherichia coli* isolates obtained from animals, foods and humans in Spain. Int. J Antimicrobial Agents. 2001; 18: 353-358.
221.Saga T, Yamaguchi K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. Jap. Med. Ass. Journal. 2009: 52(2); 103-108.
222.Sancak B. *Staphylococcus aureus*'ta metisilin ve vankomisin direnci. Hacettepe Tıp Dergisi. 2007; 38: 127-134.
223.Sancak YC, Kayaardı S, Sağun E, İşleyici Ö, Sancak H. Van piyasasında tüketime sunulan fermente Türk sucuklarının fiziksel, kimyasal, mikrobiyolojik ve organoleptik niteliklerinin belirlenmesi. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1996; 7(1-2): 67-73.
224.Sanders P. Antibiotic use in animals-policies and control measures around europe. Antibiotic policies: theory and practice. In: Gould IM, Van Der Meer JWM, Editor. New York:Kluwer Academic Publishers. 2005. p. 649-672.
225.Salisbury JG, Nicholls TJ, Lammerding AM, Turnidge J, Nunn MJ. A risk anaylsis framework fort he long term management of antibiotic resistance in food producing animals. Int. J. Antimicrobial Agents. 2002; 20: 153-164.
226.Salyers AA, Gupta A, Wang Y. Human ıntestinal bacteria as reservoirs for antibiotic resistance genes. Trends Microbiology. 2004; 12: 412-416.
227.Sapadin AN, Fleishmajer R. Tetracyclines: nonantibiotic properties and their clinical implications. J. American Academia of Dermatology. 2006; 54: 258-265.
228.Schillinger U, Lücke FK. Identification of lactobacilli from meat and meat products. Food Microbiology. 1987; 4: 199-208.
229.Schnappinger D, Hillen W. Tetracyclines: antibiotic action, uptake, and resistance mechanisms. Arch. Microbiol. 1996; 165(6): 359-369.
230.Schwarz S, Kehrenberg C, Walsh TR. Use of Antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int. J. Antimicrobial Agents. 2001; 17: 431-437.
231.Selgas D, Garcia L, De Fernando GG, Ordonez J. Lipolytic and proteolytic activity of micrococci ısolated from dry fermented sausages. Fleischwirtschaft. 1993; 733(10): 1164-1166.
232.Shahraz F, Dadkhah H, Khaksar R, Mahmoudzadeh M, Hosseini H, Kamran M, Bourke P. Analysis of antibiotic resistance patterns and detection of mecA gene in *Staphylococcus aureus* isolated from packaged hamburger. Meat Science. 2012; 90: 759-763.
233.Shahidi F. Flavour of muscle foods - an overview. Flavor of meat, meat products and seafood. In: Shahidi F. Editor. 2nd Edition. London:Blackie Academic and Professional. 1998a. p. 429.
234.Shahidi F. Assesment of lipid oxidation and off-flavour development in meat, meat products and seafoods. In: Shahidi F. Editor. 2nd Edition. London:Blackie Academic and Professional. 1998b. p. 429.
235.Sırıken B, Pamuk Ş, Özakın C, Gedikoğlu S, Eyigör M. A note on the incidence of *Salmonella* spp., *Listeria* spp. and *Escherichia coli* O157:H7 serotypes in Turkish sausage (soudjouck). Meat Science.2006; 72: 177-181.
236.Smith NR, Despain L. *Lactobacillaceae*. Bergey's manual of determinative bacteriology. In: Breed RS, Murray EGD, Smith NR. Editor. Baltimore: The Williams&Wilkins Company. Seventh Edition. 1957. p. 505-515.
237.Speer BS, Shoemaker NB, Salyers AA. Bacterial resistance to tetracycline: mechanisms, transfer and clinical significance. Clin. Microbiol. Rev. 1992; 5(4): 387-399.
238.Stahnke LH. Aroma components from dried sausages fermented with *S. xylosus*. Meat Science. 1994: 38(1); 39-53.
239.Stapleton PD, Taylor PW. Methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: mechanisms and modulations. Science Progress, 2002; 85: 57-72.
240.Stiles ME, Holzapfel WH. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiology. 1997; 36: 1-29.

241.Sustackova A, Napravnikova E, Schlegelova J. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* ssp. isolates from raw beef and meat products. Folia Microbiologica. 2004; 49(4): 411-417.
242.Suzuki S. Tetracycline resistance gene in asian aquatic environments. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry-Biological Responses to Contaminants. 2010: 1-8.
243.Süßmuth SD, Muscholl-Silberhorn A, Wirth R, Susa M, Marre R, Rodzinski E. Aggregation substance promotes adherence, phagocytosis, and ıntracellular survival of *Enterococcus faecalis* within human macrophages and suppresses respiratory burst. Infect. Immunology. 2000; 68: 4900-4906.
244.Sümbüloğlu V, Sümbüloğlu K. Klinik ve saha araştırmalarında örnekleme yöntemi ve örneklem büyüklüğü. 1. Baskı. Alp Ofset Matbaacılık Ltd. Şti. 2005; 58-133.
245.Şenman AO. Kafes kuşlarından izole edilen *Escherichia coli* suşlarının tetrasiklin dirençliliğinin klasik ve moleküler yöntemlerle saklanması. Ankara, Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi. 2010.
246.Şenol A, Nazlı B. Fermente sucuklarda bozulmalara neden olan faktörlerin tespiti üzerine çalışmalar. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 1996; 22(2): 355-370.
247.Taşdemir C. Toplum ve hastane kaynaklı infeksiyonlardan izole edilen *Escherichia coli* suşlarının antimikrobiyal direnç fenotiplerinin araştırılması. İstanbul, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Klinik Mikrobiyoloji Bölümü. Uzmanlık Tezi. 2009.
248.Tayar M. Yerli sucuklarımızın pastörize olarak üretilmeleri üzerine araştırmalar. Bursa, Uludağ Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 1989.
249.Tayar M. Türk sucuğuna uygulanan ısıl işlemlerinin kaliteye etkisi. Gıda. 1994; 19(1): 17-21.
250.Taylor DE, Chau A. Tetracycline resistance mediated by ribosomal protection. Antimicrobial Agents and Chemotheraphy. 1996; 40(1): 1-5.
251.Taylor DE, Trieber CA, Trescher G, Bekkering M. Host mutations (*miaA* and *rpsL*) reduce tetracycline resistance mediated by *tet*(O) and *Tet*(M). Antimicrobial Agents and Chemotheraphy. 1998; 42(1): 59-64.
252.Terkuran M, Erginkaya Z, Ünal E, Akçimen B, Köksal F. The determination of vancomycin resistance and hemolytic activities of enterococci from cheese, sucuk and chicken meat, fruit and vegetables in Adana region of Turkey. Current Opinion in Biotechnology. 2011; 225: 93.
253.Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. Antonie Van Leeuwenhoek. 1999; 76: 115-137.
254.Teuber M. Veterinary use and antibiotic resistance. Current Opinion in Microbiology. 2001;4: 493-499.
255.Threlfall EJ, Ward LR, Frost JA, Willshaw GA. The emergence and spread of antibiotic resistance in food-borne bacteria. International Journal of Food Microbiology. 2000; 62: 105.
256.Todar K. *Staphylococcus*, pathogenesis of *Staphylococcus aureus* infections. [cited 2013 July 7]. Available from URL: http://textbookofbacteriology.net/staph_2.html
257.Toksoy A, Beyatlı Y, Aslım B. Sucuk ve sosislerden izole edilen lactobacillus plantarum suşlarının bazı metabolik ve antimikrobiyal aktivitelerinin incelenmesi. Turk J. Vet. Anim. Sci. 1999; 23: 533-540.
258.Toldra, F. Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products. Meat Science. 1998; 49(1): 101-110.
259.Toldra F. Biochemistry of meat and fat. In: Toldra F Editor. Handbook of fermented meat and poultry. First Edition. Australia: Blackwell Publishing; 2007. p.54-55.
260.Tollefson L, Karp BE. Human health impact from antimicrobial use in food animals. Medicine Et Maladies Infectieuses. 2004; 34: 514-521.
261.Toomey N, Bolton D, Fanning S. Characterisation and transferability of antibiotic resistance genes from lactic acid bacteria ısolated from ırish pork and beef abattoirs. Research in Microbiology. 2010; 161: 127-135.
262.Töreci K. *Escherichia* türleri. In: Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M Editors. İnfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri. 2002. Cilt 2. p.1564-1574.
263.Tünger A. *Staphylococcus aureus*: mikrobiyoloji, patogenez ve epidemiyoloji. In: Ulusoy S, Usluer G, Ünal S Editors. Gram-pozitif bakteri infeksiyonları. Ankara: Bilimsel Tıp Yayınevi. 2004. p. 9-65.
264.Ulusoy HB. Kefir kültürü ile fermente sucuk üretimi. İstanbul, İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Doktora Tezi. 2007.
265.Ungemach FR, Dagmar MB, Abraham G. Guidelines for prudent use of antimicrobials and their implications on antibiotic usage in veterinary medicine. Int. J. Medical Microbiology. 2006; 296(Sup.2): 33-38.
266.Ünlütürk A, Turantaş F. Gıda mikrobiyolojisi. İzmir: Mengi Tan Basımevi. 1. Baskı. 1998. p.469.
267.Vahaboğlu HM. Antibiyotik direnç mekanizmalari. Klimik Dergisi. 1993; 6(1): 6-8.

268.Van TT, Chin J, Chapman T, Tran LT, Coloe PJ. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: an analysis of *Escherichia coli* isolations for antibiotic resistance and virulence genes. Int. J. Food Microbiology. 2003; 124: 217-223.
269.Vignolo G, Fontana C, Fadda S. Semi dry and dry fermented sausages. In: Toldra F Editor. Handbook of meat processing. First Edition. Australia: Blackwell Publishing; 2010. p.380-400.
270.Villani F, Russo F, Blaiotta G, Moschetti G, Ercolini D. Presence and characterisation of verotoxin producing *E. coli* in fresh Italian pork sausages, and preparation and use of an antibiotic-resistant strain for challenge studies. Meat Science. 2005; 70(1): 181-188.
271.Waldvogel FA. *Staphylococcus aureus* (including staphylococcal toxic shock). In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R Editors. Mandell, Douglas and Bennet's principles and practice of ınfetious diseases. New York: Churchill Livingstone. 2000. p. 2069-2090.
272.Walsh C, Duffy G, Nally P, O'Mahony R, McDowell DA, Fanning S. Transfer of ampicillin resistance from *salmonella typhimurium* DT104 to *Escherichia coli* K12 in food. Let. Appl. Microbiology. 2008; 46: 210-215.
273.Walsh CT. Enzymes in the d-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. Journal of Biolology& Chemistry. 1989; 264: 2393-2396.
274.Wang HH, Manuzon M, Lehman M, Wan K, Luo H, Wittum TE, Yousef A, Bakaletz LO. Food commensal microbes as a potentially ımportant avenue ıntransmitting antibiotic resistance genes. FEMS Microbiology Let.. 2006; 254: 226-231.
275.Wang J, Huang T, Chang Y, Shih DY. Subtyping of enterotoxin c strains isolated from food poisoning outbreak in Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis. 2003; 11(3): 239-245.
276.Wegener HC. Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. Current Opinion in Microbiology. 2003; 6: 439-445.
277.Wheat PF. History and development of antimicrobial susceptibility testing methodology. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2001; 48 (Sup.1): 1-4.
278.White DG, Zhao S, Simjee S, Wagner DD, McDermott PF. Antimicrobial resistance of foodborne pathogens. Microbes infection. 2002; 4: 405-412.
279.Wilke MS, Lovering AL, Strynadka CJN. β-Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. Current Opinion Microbiology. 2005; 8: 525-533.
280.Willett HP. Energy metabolism. In: Joklik WK, Willett HP, Amos DB, Wilfert CM, Editors. Zinsser Microbiology. 20th Edition. East Norwalk (CT): Appleton & Lange. 1992. p. 53-75.
281.Winn Jr W, Allen S, Janda W, Koneman E, Procop G, Schreckenberger P, Woods G. *Enterobacteriaceae*. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6th Edition. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 2006. p.211-308.
282.Woodford N, Johnson AP, Morrison D, Speller DCE. Current perspectives on glycopeptide resistance. Clin. Microbiol. Rev. 1995; 8: 585-615.
283.Wysocki BK, Bazo M, Smoragiewicz W. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). Microbiological Research. 2010; 165: 674-686.
284.Yalanca İ. Geleneksel et ürünlerinden izole edilen laktik asit bakterilerinin antibiyotik direncinin belirlenmesi. Çukurova Üniversitesi. Fen Bilimleri Enstitüsü. Biyoteknoloji Anabilim Dalı. 2009. Adana.
285.Yalçın H, Can ÖP. Geleneksel yöntemlerle üretilen sucuklarda *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ve koliform varlığının araştırılması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi. 2013; 19(4): 705-708.
286.Yaman A, Gökalp HY, Çon AH. Some characteristics of lactic acid bacteria present in commercial sucuk samples. Meat Science, 1998; 49: 387-397.
287.Yao RC, Crandall LW. Glycopeptides: classification, occurence and discovery. In: Nagarajan R. Editors. Marcel Dekker Inc. New York, N.Y. 1994, p-1-29.
288.Yeniel N. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* ve *Streptococcus thermophilus* suşlarının melas, peynir altı suyu ve pancar suyunda ekzopolisakkarit (eps) ve laktik asit üretimlerinin belirlenmesi. Ankara, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi. 2006.
289.Yıldırım Y. Et endüstrisi, Ankara:Kozan Yayınları, 4. Baskı, 1996.
290.Zarazaga M, Saenz Y, Portillo A, Tenorio C, Ruiz-Larrea F, Del Campo R, Baquero F, Torres C. In vitro activities of ketolide HMR3647, macrolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc* and *Pediococcus* isolates. Antimicrobial Agents and Chemotheraphy. 1999; 43(12): 3039-3041.
291.Zeuthen P. A Historical perspective of meat fermantation. In: Toldra F. Editor. Handbook of Fermented Meat and Poultry Iowa: Blackwell Publishing. 2007. p. 3-8.
292.Zhou JS, Pillidge CJ, Gopal PK, Gill HS. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. Int. J. Food Microbiology. 2005; 98: 211-217.

10. ÖZGEÇMİŞ

1983 yılında Bolu ili Mengen ilçesinde doğdu. İlköğrenimini Mengen Atatürk İlköğretim okulunda tamamladı. Orta ve lise öğrenimini Mengen Anadolu Aşçılık Meslek Lisesi'nde bitirdi. 2000 yılında Selçuk Üniversitesi Mesleki Eğitim Fakültesi Çocuk Gelişimi ve Ev Yönetimi Bölümü Aile Ekonomisi ve Beslenme Öğretmenliği'ni kazandı. 2004 yılında teknik öğretmen ünvanı ile mezun oldu. 2004-2005 eğitim öğretim yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. 2006 yılında Selçuk Üniversitesi Mesleki Eğitim Fakültesi Beslenme Eğitimi Bilim Dalı'na Araştırma Görevlisi olarak atandı. 2007 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimini tamamladı. 2008 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2013 yılından itibaren Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görevini sürdürmektedir.