

T.C.
ÇANAKKALE ONSEKİZ MART ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZİ

**KLASİK PEYNİR ÜRETİM SÜRECİNDE GSBL ve AmpC ÜRETEN
ENTEROBACTERIACEAE İZOLATLARININ
BELİRLENMESİ**

Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ
Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı
Tezin Sunulduğu Tarih: 07/04/2017

Tez Danışmanı:
Yrd. Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

ÇANAKKALE

Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ tarafından Yrd. Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA yönetiminde hazırlanan ve 07/04/2017 tarihinde aşağıdaki jüri karşısında sunulan “Klasik Peynir Üretim Sürecinde GSBL ve AmpC Üreten Enterobacteriaceae İzolatlarının Belirlenmesi” başlıklı çalışma, Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda DOKTORA TEZİ olarak oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

JÜRİ

Yrd.Doç.Dr Nükhet Nilüfer ZORBA

Başkan



Prof.Dr Ahmet ÜNVER

Üye



Doç.Dr Gülgün YILDIZ TIRYAKI

Üye



Doç.Dr. Handan BAYSAL

Üye



Doç.Dr.Gülten TIRYAKI GÜNDÜZ

Üye



Prof.Dr. Levent GENÇ

Müdür

Fen Bilimleri Enstitüsü

Sıra No:.....

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI



Bu tezde görsel, işitsel ve yazılı biçimde sunulan tüm bilgi ve sonuçların akademik ve etik kurallara uyularak tarafımdan elde edildiğini, tez içinde yer alan ancak bu çalışmaya özgü olmayan tüm sonuç ve bilgileri tezde kaynak göstererek belirttiğimi beyan ederim.

Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ

TEŞEKKÜR

Bu tezin gerçekleŐtirilmesinde, akademik çalıŐmalarımnda 13 yıl boyunca benden bir an olsun yardımlarını esirgemeyen saygı değer danışman hocam Yrd. Doç. Dr. Nükhet Nilüfer Zorba, Tez İzleme Jüri üyeleri, Prof. Dr. Ahmet Ünver ve Doç. Dr. Gülgün Yıldız Tiryaki, alıŐma süresince tüm zorlukları benimle göğüsleyen eŐim Yavuz Selim Tepeli, hayatımın her evresinde bana destek olan değerli babam ve annem Halil Servet-Sabiha Özdikmenli, kardeŐlerim Serap Yünlü, Semra Kara, Seçil Özdikmenli'ye, her daim duaları ile benimle birlikte olan aile büyüklerime, analiz çalıŐmalarımnda bana her konuda destek olan Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesindeki ve Yenice Meslek Yüksekokulundaki iş arkadaşlarıma ve çalıŐanlarına, araŐtırmanın yapılmasında maddi ve manevi desteğini esirgemeyen Kobak Süt Ürünleri yöneticilerine, çalıŐanlarına ve çiftçilerine, en önemlisi özgürce bu çalıŐmayı yapmamı sağlayan minnetle andığımız vatan için, bizler için toprağa düşmüş tüm ŐEHİTLERİMİZE sonsuz teŐekkürlerimi sunarım.

Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ
anakkale, Nisan 2017

SİMGELER VE KISALTMALAR

SHS	Somatik Hücre Sayısı
EI	Elektrik İletkenliği
CMT	California Mastitis Testi
TGKY	Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği
NA	Sodyum
Cl	Klor
PBP	Penisilin Bağlayan Proteinler
GSBL	Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar
ESBL	Extended Spectrum Beta-Lactamase
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Gıda ve Tarım Örgütü)
OIE	World Organisation for Animal Health (Uluslararası Dünya Bulaşıcı Hayvan Hastalıkları Örgütü)
WHO	World Health Organization (Dünya Sağlık Örgütü)
EASSA	European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals (Avrupa Hayvanlarda Antimikrobiyal Duyarlılık İzleme)
CEESA	European Animal Health Study Centre (Avrupa Hayvan Sağlığı Çalışma Merkezi)
JVARM	Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System (Japonya Veteriner Antimikrobiyal Direnç İzleme Sistemi)
AB	Avrupa Birliği
TÜİK	Türkiye İstatistik Kurumu
TBS	Toplam Bakteri Sayısı
TCS	Toplam Canlı Sayısı
EEC	European Economic Community (Avrupa Birliği Kriterleri)
AMR	Antimicrobial Resistance (Antibiyotik Direnci)
DN	Donma Noktası
PCA	Plate Count Agar
VRBA	Violet Red Bile Agar
mTSB	Triptic Soy Broth with Novobiosin
CT-SMAC	Sefiksim Tellurit -Sorbitol MacConkey Agar

NA	Nutrient Agar
C-MAC	Cefotaxime (Sefotaksimli) Mac Conkey Agar
C- EMB	Cefotaxime (Sefotaksimli) Eosin Metilen Blue Agar
F-VRB	Fluorocult- Violet Red Bile
IMVIC	İndol, Metil Red, Voges Proskauer, Sitrat
SIM	Sulfate, İndole, Motility Medium
MR-VP	Metil Red-Voges Proskauer
KOH	Potasyum Hidroksit
MHA	Müller Hinton Agar
KDT	Kombinasyon Disk Difüzyon Testi
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi)
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute (Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu)
NB	Nutrient Broth
CAZ10	Ceftazidime (Seftazidim) 10 µg
CPD10	Cefpodoxime (Sefpodoksim) 10 µg,
CTX5	Cefotaxime (Sefotaksim) 5 µg
CTX30	Cefotaxime (Sefotaksim) 30 µg
CRO30	Ceftriaxone (Seftriakson) 30 µg
R	Resistant (Dirençli)
S	Susceptible (Duyarlı)
IBL	Inducible beta-lactamases (İndüklenebilir beta-laktamaz)
FOX30	Cefoxitin (Sefoksitin) 30 µg
AMC30	Amoxicillin/ clavulanic acid (Amoksisilin- klavulanik asit) 30 µg
CX500	Cloxacillin (Kloksasilin) 500 µg.
IMP10	Imipenem 10 µg
BA	Boronik asit
CA	Klavullanik asit

ÖZET

KLASİK PEYNİR ÜRETİM SÜRECİNDE GSBL ve AmpC ÜRETEN ENTEROBACTERIACEAE İZOLATLARININ BELİRLENMESİ

Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı Doktora Tezi

Danışman : Yrd. Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

07/04/2017, 120

Yetiştiricilikte önemli ekonomik kayıplara neden olan subklinik mastitis hastalığı dünyada ve ülkemizde önemli bir sorundur. Subklinik mastitisin birçok nedeni olmakla birlikte en önemli etmenleri çevreden bulaşan Enterobacteriaceae türleridir. Günümüzde Enterobacteriaceae ile mücadelede beta-laktam antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin aşırı ve uygunsuz kullanımı, patojenlerin direnç geliştirmesine neden olmuştur. İnsan ve hayvanlarda Enterobacteriaceae üyelerinde en sık rastlanan direnç GSBL ve AmpC beta-laktamaz üretimidir.

Çalışmamızda beyaz peynir üretiminin tüm aşamalarından alınan örneklerde GSBL /AmpC beta- laktamaz aktivitesine sahip Enterobacteriaceae varlığı araştırılmış, son ürün olan peynire geçme olasılığı belirlenmeye çalışılmıştır. Alınan 136 çiğ süt, 17 süt toplama tankı ve 20 işletme örneğinden sefotaktimli (2mg/ml) MacConkey ve EMB agar plaklarına ekim yapılmıştır. 490 adet Enterobacteriaceae izolatı alınmıştır. Bunlardan 347 adedi Hicrome ESBL agarda üremiş ve GSBL üreten şüpheli Enterobacteriaceae olarak belirlenmiştir. Bu izolatlardan 64 tanesinin Enterobacteriaceae familyasına ait olduğu doğrulanmıştır. 3 adet izolat GSBL+/ AmpC+, 28 adet izolat GSBL-/AmpC+, ve 5 adet izolat ise GSBL+/AmpC Enterobacteriaceae olarak belirlenmiştir.

GSBL aktivitesine sahip 7 izolatın $D_{55}^{\circ C}$, $D_{60}^{\circ C}$ ve $D_{65}^{\circ C}$ değerlerinin sırasıyla 5,06 ile 11,42dk, 1,82 ile 5,74dk ve 1,45 ile 4,50 dakika arasında değiştiği belirlenmiştir. İzolatların z- değerleri ise $12,72^{\circ C}$ ile $24,4^{\circ C}$ arasında değişmiştir. Sonuç olarak; GSBL aktivitesine sahip 7 izolatın ısıl dirençlerinin yüksek olduğu, klasik peynir üretiminde son ürüne geçebileceği ve halk sağlığı açısından tehlike oluşturabileceği belirlenmiştir.

Anahtar sözcükler: AmpC, Antimikrobiyal direnç, Enterobacteriaceae, GSBL, Peynir, Süt



ABSTRACT

DETERMINATION of ESBL and AmpC PRODUCING ENTEROBACTERIACEAE in CLASSIC CHEESE PRODUCTION PROCESS

Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ

Çanakkale Onsekiz Mart University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Doctoral Dissertation in Food Science

Advisor : Yrd. Doç. Dr. Nükhet Nilüfer ZORBA

07/04/2017, 120

Subclinical mastitis that causes a great economic loss is the most important disease in the world and our country. Many factors are responsible for this disease and the most significant causative agent of mastitis has been described pathogenic Enterobacteriaceae contaminated from environment. Nowadays beta-lactam antibiotics are commonly used for the treatment of disease caused by Enterobacteriaceae. The excess and unnecessary use of antibiotics causes the antibiotic resistance of pathogens. ESBL and AmpC beta-lactamase resistance have been commonly found in Enterobacteriaceae isolated from humans and animals.

The aim of this study was to investigate ESBL and AmpC beta-lactamase activity of Enterobacteriaceae isolated from milk and cheese process line in a dairy and to determine the probability of transmission of these bacteria to the final product. A total of 490 suspected Enterobacteriaceae isolates have been isolated from 136 raw milks, 17 bulk tank and 20 cheese process line samples by using sefotaxim (2mg/ml) containing Macconkey and EMB agar. 347 of these isolates determined as suspected ESBL producing Enterobacteriaceae with Hicrome ESBL agar. 64 of 347 isolates confirmed as Enterobacteriaceae including 3 isolates of ESBL+/AmpC+, 28 isolates of ESBL-/AmpC+ and 5 isolates of ESBL+/AmpC-. The $D_{55}^{\circ C}$, $D_{60}^{\circ C}$, and $D_{65}^{\circ C}$ values of ESBL positive 7 strains have been determined as 5,06 to 11,42min, 1,82 to 5,74min, and, 1,45 to 4,50 minutes respectively. The z-values of isolates were ranged from 12, 72 °C to 24, 74 °C.

As a result; it has been determined that thermal resistances of 7 isolates with ESBL activity were high so they can be transferred to the final product in classical cheese production and may create a public health hazard.

Keywords: GSBL, Milk, Cheese, AmpC, Enterobacteriaceae, Antimicrobial resistance



İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İNTİHAL (AŞIRMA) BEYAN SAYFASI.....	iii
TEŞEKKÜR.....	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	v
ÖZET	vii
ABSTRACT.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiv
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
BÖLÜM 1	
GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2	
ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	4
2.1. Subklinik Mastitisin Tanımı.....	4
2.2. Subklinik Mastitis Etmenleri.....	4
2.2.1. Subklinik Mastitis Nedeni Mikroorganizmalar ve Yapılan Çalışmalar	4
2.2.2. Enterobacteriaceae Familyası	8
2.3. Subklinik Mastitisli Sütlerin Fiziksel, Kimyasal, Biyolojik Özellikleri ve Tanısı	8
2.4. Mastitis Tedavisi ve Kullanılan Antibiyotikler.....	12
2.5. Beta-laktam Antibiyotikler ve Etki Mekanizması.....	13
2.5.1. Beta-laktam Antibiyotikler	13
2.5.2. Beta-laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması.....	15
2.6. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Gelişen Direnç	16
2.6.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz (GSBL) Direnci	18
2.6.2. AmpC Tipi Beta-laktamaz Direnci.....	19
2.7. Gıdalarda Antibiyotik Dirençli Bakteri Sorunu	20
2.7.1. Gıda Üretim Zincirindeki Enterobacteriaceae Türlerinde GSBL ve AmpC Aktivitesi	23
2.8. İnsanlarda, Hayvanlarda ve Gıdalarda Antibiyotik Direncine Karşı Alınan Önlemler	28
BÖLÜM 3	
MATERYAL VE METOT	31
3.1. Materyal	31
3.1.1. Örnekler	31
3.1.2. Bakteri Kültürleri.....	32

3.2. Metot	32
3.2.1. Örneklerin Fiziksel Özellikleri	32
3.2.2. Örneklerin Kimyasal Özellikleri	32
3.2.3. Subklinik Mastitis Bulgusunun Araştırılması	32
3.2.3.1. Somatik Hücre Sayısı	32
3.2.3.2. California Mastitis Testi	32
3.2.4. Örneklerin Mikrobiyolojik Özellikleri	33
3.2.4.1. Dilüsyonların Hazırlanması.....	33
3.2.4.2. Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı	33
3.2.4.3. Toplam Koliform ve <i>E.coli</i> Sayımı	34
3.2.4.4. <i>E.coli</i> O157 Varlığını Araştırılması	34
3.2.4.4.1. İzolatların O157 Olduğunun Latex Aglütinasyon Testi ile Doğrulanması	34
3.2.5. GSBL Şüpheli Enterobacteriaceae İzolasyonu.....	35
3.2.6. GSBL Şüpheli İzolatların Tanımlanması	35
3.2.6.1. Gram Boyama.....	38
3.2.6.2. Oksidaz Testi.....	38
3.2.6.3. Biyokimyasal Testler.....	38
3.2.6.3.1. İndol Oluşumu, Hareket Testi ve H ₂ S Üretimi	38
3.2.6.3.2. Metil Red Testi - Voges-Proskauer Testi	39
3.2.6.3.3. Sitrat Testi.....	40
3.2.6.3.4. Karbonhidrat Oksidasyon ve/veya Fermentasyon (O/F) Testi	40
3.2.6.3.5. API 20E.....	40
3.2.7. Antibiyotik Duyarlılık Testleri	41
3.2.7.1. GSBL Tarama Testi.....	41
3.2.7.2. GSBL Doğrulama Testi.....	42
3.2.7.3. AmpC Tanımlama Testi	42
3.2.7.4. AmpC Doğrulama Testi	42
3.2.7.5. AmpC'ye Bağlı GSBL Negatifliğini veya GSBL'ye Bağlı AmpC Negatifliğini Ortadan Kaldırılması	43
3.2.8. GSBL Pozitif İzolatlarının Isısal Direnci	43
3.2.9. İstatistik Analiz.....	44
BÖLÜM 4	
ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	46
4.1. Çiğ Süt Örneklerinin Özellikleri	46
4.1.1. Fiziksel Özellikler, Kimyasal Özellikler ve Biyolojik Özellikler	46

4.2. Subklinik Mastitisli Sütlerin Bazı Özelliklerinin Karşılaştırılması	49
4.2.1. Somatik Hücre Sayısına Göre “Normal Süt” ve “Subklinik Mastitisli Süt” Gruplarının Fizikokimyasal ve Biyolojik Özelliklerinin İncelenmesi	49
4.2.2. California Mastitis Test Değerine Göre “Normal Süt” ve “Subklinik Mastitisli Süt” Gruplarının Fizikokimyasal ve Biyolojik Özelliklerinin İncelenmesi	52
4.2.3. CMT Değerlerine Göre Gruplandırılan Çiğ Süt Örneklerinin Fizikokimyasal ve Biyolojik Özelliklerin İncelenmesi.....	53
4.3. Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Özellikler Arasındaki İlişki	55
4.4. Çiğ Süt ve Diğer Örneklerde <i>E.coli</i> ve <i>E.coli</i> O157 Varlığının Araştırılması.....	58
4.5. GSBL Şüpheli Enterobacteriaceae İzolatların Elde Edilmesi ve Tanımlanması	59
4.6. HiCrome ESBL Agarda GSBL Pozitif Olan Enterobacteriaceae İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları.....	62
4.6.1. GSBL Aktivitelerinin Klasik Yöntem ile Belirlenmesi.....	62
4.6.2. GSBL Aktivitesi Doğrulama Sonuçları.....	69
4.6.3. AmpC Aktivitesi Sonuçları	73
4.6.4. AmpC Aktivitesi Doğrulama Sonuçları	74
4.6.5. BA-CA Analizi ile AmpC ve GSBL Test Sonuçları	79
4.6.6. Diğer Antibiyotik Dirençleri	80
4.6.7. GSBL ve AmpC Beta-laktamaz Aktivitesi Sonuçların Dağılımı	82
4.7. GSBL Pozitif İzolatların Isısal Direnci	84
BÖLÜM 5	
SONUÇ VE ÖNERİLER.....	91
KAYNAKLAR	94
EKLERİ	I
EK 1. Kullanılan Malzemeler	II
1.1. Besiyerleri, Kimyasal Çözeltiler ve Ekipmanlar.....	II
1.1.1. Besiyerleri.....	II
1.1.2. Biyokimyasal Testler ve Ayıraçlar	V
1.1.3. Antibiyotik Diskleri.....	VI
ÖZGEÇMİŞ	VIII

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1.	Gram negatif ve gram pozitif bakterilerin hücre duvar yapısı.....	15
Şekil 2.2.	GSBL/AmpC aktivitesine sahip suşların bulaşma yolları	22
Şekil 3.1.	CMT testinin yapılış şekli.....	33
Şekil 4.1.	GSBL üretimi pozitif izolat (soldaki şekil), negatif izolat (sağdaki şekil) ların bazı sefalosporinlere karşı zon çapları örneği.....	62
Şekil 4.2.	GSBL aktivitesi doğrulama (kombinasyon disk difüzyon yöntemi) testi negatif (soldaki şekil) ve pozitif (sağdaki şekil) sonuçlara sahip bazı izolatlar.....	69
Şekil 4.3.	AmpC beta-laktamaz aktivitesi tarama testi pozitif (soldaki şekil) ve negatif (sağdaki şekil) izolatlar	73
Şekil 4.4.	AmpC beta-laktamaz aktivitesi doğrulama testi pozitif (soldaki şekil) ve negatif (sağdaki şekil) izolatlar	75
Şekil 4.5.	BA-CA analizi ile negatif sonuç verilen izolat A (örneği sol üstte), GSBL pozitif sonuç alınan izolat B (sağ üstte) ve AmpC beta- laktamaz pozitif sonuç alınan izolat C (alt orta) zon çapları.....	80
Şekil 4.6.	GSBL aktivitesine sahip <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603 GSBL aktivitesi pozitif kontrol suşunun 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri	84
Şekil 4.7.	GSBL aktivitesine sahip İ6 (<i>Edwardsiella</i> spp.) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri.....	85
Şekil 4.8.	GSBL aktivitesine sahip İ4 (<i>Enterobacter</i> spp.) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri.....	85
Şekil 4.9.	GSBL aktivitesine sahip T16 (<i>Klebsiella</i> spp.) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri.....	86
Şekil 4.10.	GSBL aktivitesine sahip T17 (<i>E.coli</i>) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri.....	86
Şekil 4.11.	GSBL aktivitesine sahip T21 (<i>E.coli</i>) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri.....	87
Şekil 4.12.	GSBL aktivitesine sahip T21 (<i>E.coli</i>) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri.....	87
Şekil 4.13.	GSBL aktivitesine sahip T23 (<i>Enterobacter</i> spp.) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri.....	88

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa No

Çizelge 2.1. Beta-laktam antibiyotiklerin sınıflandırılması.....	14
Çizelge 2.2. Gram negatif bakterilerdeki önemli beta-laktamazlar	17
Çizelge 3.1. Örnekleme noktaları	31
Çizelge 3.2. CMT değerlendirme tablosu	33
Çizelge 3.3. <i>Enterobacteriaceae</i> familyasına ait bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikler	36
Çizelge 3.4. <i>Enterobacteriaceae</i> familyasına ait bazı cinslerin biyokimyasal özellikleri I ...	36
Çizelge 3.5. <i>Enterobacteriaceae</i> familyasına ait bazı cinslerin biyokimyasal özellikleri II ..	36
Çizelge 3.6. Gram negatif basillerin tanımlama tablosu.....	37
Çizelge 3.7. CLSI ve EUCAST dokümanlarına göre <i>Enterobacteriaceae</i> için bazı sefalosporinlerin sınır değerleri	41
Çizelge 3.8. GSBL tarama testinde pozitif olan <i>Enterobacteriaceae</i> için kullanılan GSBL doğrulama yöntemi	42
Çizelge 3.9. AmpC'ye bağlı GSBL negatifliğini veya GSBL'ye bağlı AmpC negatifliğini ortadan kaldırılmasında kullanılan antibiyotikler	43
Çizelge 4.1. Müstahsil çiğ süt örneklerinin bazı özellikleri	46
Çizelge 4.2. SHS'e göre "Normal Sütler" ve "Subklinik Mastitisli Sütler" in normal dağılım gösteren değişkenlerinin karşılaştırılması.....	50
Çizelge 4.3. SHS'e göre "Normal Sütler" ve "Subklinik Mastitisli Sütler" in CMT değerlerinin karşılaştırılması.....	51
Çizelge 4.4. SHS'e göre "Normal Sütler" ve "Subklinik Mastitisli Sütler" in normal dağılım göstermeyen değişkenlerinin karşılaştırılması.....	51
Çizelge 4.5. CMT değerine göre "Normal Sütler" ve "Subklinik Mastitisli Sütler" in normal dağılım gösteren değişkenlerinin karşılaştırılması.....	52
Çizelge 4.6. CMT değerine göre "Normal Sütler" ve "Subklinik Mastitisli Sütler" normal dağılım göstermeyen değişkenlerin karşılaştırılması.....	53
Çizelge 4.7. CMT değerlerine göre grupların istatistiksel analiz sonuçları.....	54
Çizelge 4.8. Normal dağılım gösteren fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler arasındaki ilişki.....	55
Çizelge 4.9. Normal dağılım göstermeyen fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler arasındaki ilişki	56
Çizelge 4.10. Örnekleme alanlarından elde edilen <i>Enterobacteriaceae</i> izolat sayıları	60
Çizelge 4.11. İzolat sayılarının grup dağılımları	60
Çizelge 4.12. IMVIC ve bazı biyokimyasal test sonuçları	61
Çizelge 4.13. GSBL şüpheli <i>Enterobacteriaceae</i> türlerinin örnekleme yerlerine göre dağılımı	61
Çizelge 4.14. Müstahsil GSBL şüpheli <i>Enterobacteriaceae</i> izolatların antibiyotik dirençlerinin karşılaştırılması.....	64
Çizelge 4.15. Süt toplama tankları GSBL şüpheli <i>Enterobacteriaceae</i> izolatların antibiyotik dirençlerinin karşılaştırılması.....	65
Çizelge 4.16. İşletme GSBL şüpheli <i>Enterobacteriaceae</i> izolatların antibiyotik dirençlerinin karşılaştırılması	67
Çizelge 4.17. En az bir antibiyotiğe duyarlılık gösteren <i>Enterobacteriaceae</i> izolatları.....	68
Çizelge 4.18. EUCAST ve CLSI sınır değerlerine göre en az bir antibiyotiğe direnç gösteren suşların cins dağılımları.....	68
Çizelge 4.19. GSBL aktivitesi doğrulanmış suşların cins ve tür tanımlamaları	70
Çizelge 4.20. GSBL aktivitesi doğrulanmış suşların cins ve tür oranları.....	70

Çizelge 4.21.GSBL aktivitesi doğrulanan Enterobacteriaceae izolatlarının örnekleme yerlerine göre dağılımı	71
Çizelge 4.22.AmpC beta- laktamaz pozitif Enterobacteriaceae izolatlarının cins düzeyinde dağılımı ve % oranları.....	74
Çizelge 4.23.AmpC beta-laktamaz aktivitesi doğrulanan izolatlar ve % oranları.....	76
Çizelge 4.24.Farklı antibiyotiklere direnç gösteren Enterobacteriaceae izolatları	82
Çizelge 4.25.GSBL ve AmpC beta-laktamaz aktivitesi gösteren izolatlar.....	83
Çizelge 4.26.GSBL aktivitesine sahip suşların D ve z değerleri	88



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Dünyada ve ülkemizde süt sığırcılığının en büyük problemi mastitis hastalığıdır (Atasever ve Erdem, 2008; Alpay ve Yeşilbağ, 2009; Diler ve ark., 2013; Santiago ve ark., 2015; Weiner ve ark., 2015). Mastitis, yetiştiricilikte önemli ekonomik kayıplara neden olmakla birlikte, sütte fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik değişikliklere neden olmaktadır. Subklinik mastitis hastalığı, süt verim ve kalitesinde kayıplara neden olması, üreticiler tarafından çıplak gözle fark edilememesi ve neden olduğu ekonomik kayıplardan dolayı ciddi önem taşımaktadır (Baştan ve ark., 1997a,b; Yalçın, 2000; Rışvanlı ve Kalkan, 2002; Uzman ve ark., 2003; Çoban ve Tüzemen, 2007).

Subklinik mastitisin başlıca etmeni patojen mikroorganizmalardır. Bununla birlikte, barınak koşulları, sağım hijyeni gibi çevre koşulları, cins, yaş, ağırlık ve laktasyon sayısı gibi ineğe ait fizyolojik faktörlerde mastitis nedenleri arasındadır (Kaya ve ark., 2001; Rışvanlı ve Kalkan, 2002; Uzman ve ark., 2003; Kul ve ark., 2006; Atasever ve Erdem, 2008; Alpay ve Yeşilbağ, 2009). Yetiştiricilikte en sık rastlanan mastitis etmeni mikroorganizmalar arasında; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* ve *Enterococcus* spp. gelmektedir (Tel Yaşar ve ark., 2009; Sorensen ve ark., 2010; Şeker ve Özenç, 2010; Cervinkova ve ark., 2013; Özdemir ve Kaymaz 2013). Ayrıca *Klebsiella* spp.'de mastitis etmeni olarak tanımlanmıştır (Brise ve Duijkeren, 2005).

Patojen mikroorganizmaların neden olduğu subklinik ve klinik mastitis tedavisinde antibiyotik tedavisi yaygın olarak kullanılmaktadır (Şeker ve Özenç, 2010; Büyükcangaz ve Mat, 2012; Dinç ve ark., 2012; Ünal, 2012). Ayrıca antibiyotikler hayvanlarda çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Dinç ve ark., 2012; Ünal, 2012). Hayvanlarda uygun olmayan antibiyotik tedavilerinin uygulanmasının mastitis etmeni ve diğer hastalık etmeni patojen mikroorganizmalarda direnç gelişimine neden olduğu son yıllarda araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (Şeker ve Özenç, 2010; Büyükcangaz ve Mat, 2012; Dinç ve ark., 2012; Ünal, 2012; Santiago ve ark., 2015; de Oca ve ark., 2015; İbrahim ve ark., 2016). Hayvanlarda tedavi amacıyla başlıca amoksisilin, tetrasiklinler, aminoglikozidler, florokinolonlar, sulfonamid, tilosin, linkozamidler, kolistin ve pleuromutilinler kullanılmakta olup, *E.coli* ve *Klebsiella* gibi çevresel mastitis patojeni olan Enterobacteriaceae familyasına ait etmenler ile mücadelede beta-laktam antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır (Dilsiz, 2010; Coşkun, 2011; Ünal, 2012; Elmacioğlu, 2013; de

Oca ve ark., 2015; Nguyen, 2016).

Beta-laktamlar bakteri hücre duvarına etki eden antibiyotik sınıfında yer alan güçlü organik asitlerdir (Jehl ve ark., 2003). Penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar ve karbapenemler başlıca beta-laktam antibiyotiklerdir (Coşkun, 2011; Tekiner, 2016). Gram-negatif bakteriler, dış membran proteinlerindeki değişiklik, beta-laktamaz enzim sentezi ve penisilin bağlayıcı proteinlerde oluşan değişiklik gibi farklı yollar ile beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilirler (Jehl ve ark., 2003; Örnek, 2013). Enterobacteriaceae familyasına ait türler başta olmak üzere bir çok mikroorganizma tarafından üretilen beta-laktamaz enzimi en önemli direnç mekanizmasıdır (Yuluğ, 1997; Jehl ve ark., 2003; Dağlar ve Öngüt, 2012; Elmacıoğlu, 2013; Örnek, 2013).

Günümüzde insanoğlunu bekleyen en büyük tehlikenin antibiyotik direnci olduğu bilim insanları tarafından bildirilmektedir (Verraes ve ark., 2013; Lalak ve ark., 2016). Birçok Avrupa ülkesinde beta-laktamaz üreten bakterilerin çiftlik hayvanlarında varlığı rapor edilmiştir (Liebana ve ark., 2012; Hordijk ve ark., 2013; Weiner ve ark., 2015; Huijbers ve ark., 2015; Lalak ve ark., 2016). Ayrıca son zamanlarda sütlerde, kırmızı etlerde ve tavuk etlerinde beta-laktamaz aktivitesine sahip Enterobacteriaceae türleri araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Liebana ve ark., 2012; Schmid ve ark., 2013; Khoshbakht ve ark., 2014; Ibrahim ve ark., 2016). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2015 verilerine göre Türkiye’de 16.933.520 ton inek sütü toplanmıştır. Süt ve süt ürünleri üretimi ülke ekonomisi açısından oldukça önemli bir yere sahiptir (TÜİK, 2015). Ülkemizde toplanan çiğ sütün %40’ı kayıt dışı işlenmekte ve tüketilmektedir. Sosyoekonomik ve kültürel yapının bölgelere göre değişiklik göstermesi sebebiyle Türkiye’de büyük şehirler dışında kalan kırsal alanlarda, mandıra üretimleri büyük üretim payına sahiptir. Yöresel olarak değerlendirilen ürünlerde yetersiz gıda güvenliği uygulamaları ile antibiyotiklere direnç kazanmış gıda patojeni bakterilerin gıda zincirinin son halkası olan tüketicilere geçtiği araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Atabey, 2011; Avcı, 2012; Liebana ve ark., 2012; Schmid ve ark., 2013; Khoshbakht ve ark., 2014; Öndeş, 2015; Yavaş, 2015; Tekiner, 2016).

Çalışmamızda klasik peynir üretimi yapan aile tipi bir işletmeye süt veren 134 müstahsilin çiğ süt güğümlerinden örnek alınmıştır. Örneklerde pH, elektrik iletkenliği (Eİ), donma noktası (DN) ve California mastitis test (CMT) değeri gibi fiziksel özellikleri; su, yağ, protein, laktoz, yağsız kuru madde (YZKM) ve mineral madde oranı gibi kimyasal özellikleri, toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı (TAMB), toplam koliform grubu bakteri sayısı (TKS) ve somatik hücre sayısı (SHS) gibi biyolojik özellikleri analiz edilmiş ve parametreler arasındaki ilişki incelenmiştir.

Ayrıca işletmeye gelen çiğ süt tanklarından ve müstahsil örneklerinde subklinik mastitisli süt varlığı araştırılmış, çiğ sütlerden ve peynir üretim sürecinden izole edilen Enterobacteriaceae'ya ait bakterilerde GSBL aktivitesi varlığı belirlenmiştir. Bu bakterilerin ısısız direnci belirlenerek klasik peynir üretiminde uygulanan ısısız işlemede canlı kalma ve son üründe bulunma olasılıkları belirlenmeye çalışılmıştır.



BÖLÜM 2

ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Subklinik Mastitisin Tanımı

Süt sahip olduğu kalsiyum ve fosfor başta olmak üzere mineral madde içeriği, protein bileşenleri ve vitaminler açısından elzem bir gıda maddesidir (Demirci, 1981; Ayar ve Sert, 2005; Nergiz ve Besler 2008). Mastitis, hayvan meme dokusundaki süt bezlerinde, süt kanal ve boşluklarında meydana gelen hastalıklar olarak adlandırılmakla birlikte çoğunlukla meme bezi yangısı (iltihaplanması) olarak bilinmektedir (Uzmay ve ark., 2003; Sabuncuoğlu ve Çoban, 2006; Çoban ve Tüzemen, 2007; Gürbulak ve ark., 2009). Yetiştiricilikte önemli ekonomik kayıplara neden olmakla birlikte, sütte fiziksel, kimyasal ve bakteriyolojik değişikliklere neden olmaktadır.

Mastitis hastalığı klinik ve subklinik olarak başlıca iki biçimde ortaya çıkmaktadır (Uzmay ve ark., 2003; Sabuncuoğlu ve Çoban, 2006; Çoban ve Tüzemen, 2007; Santiago ve ark., 2015; Weiner ve ark., 2015) . Süt verim ve kalitesinde en fazla kayıplara neden olması, üreticiler tarafından çıplak gözle fark edilememesi ve neden olduğu ekonomik kayıplar nedeniyle subklinik mastitis hastalığı ciddi önem taşımaktadır (Baştan ve ark., 1997a,b; Yalçın, 2000; Rişvanlı ve Kalkan, 2002; Uzmay ve ark., 2003; Çoban ve Tüzemen, 2007). Mastitis hastalığındaki kayıpların ortalama %70-75'nin kaynağının subklinik mastitis olduğu (Baştan ve ark. 1997; Gürbulak ve ark. 2009; Yamin ve ark. 2013) ve her bir klinik mastitise karşılık ortalama 45 subklinik mastitis vakası ile karşılaştığı birçok araştırmacı tarafından ifade edilmiştir (Yalçın 2000; Kaya ve ark. 2001; Çoban ve Tüzemen 2007).

2.2. Subklinik Mastitis Etmenleri

Subklinik mastitis etmenleri patojen mikroorganizmalar başta olmak üzere, barınak koşulları, sağım hijyeni gibi çevre koşulları, cins, yaş, ağırlık ve laktasyon sayısı gibi ineğe ait fizyolojik etmenlerdir (Kaya ve ark., 2001; Rişvanlı ve Kalkan, 2002; Uzmay ve ark., 2003; Kul ve ark., 2006; Atasever ve Erdem, 2008; Alpay ve Yeşilbağ, 2009).

2.2.1. Subklinik Mastitis Nedeni Mikroorganizmalar ve Yapılan Çalışmalar

Mastitise yol açan önemli bakteriyolojik etmenler arasında *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Escherichia (E.coli)*, *Streptococcus zooepidemicus*, *Streptococcus faecalis (Enterococcus faecalis)*, *Streptococcus pyogenes*, *Campylobacter*

jejuni, *Histophilus somnus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Corynebacterium pyogenes*, *Klebsiella* spp, *Enterobacter aerogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Nocardia asteroides* türleri sayılabilir. Bununla birlikte bazı funguslarda (*Trichosporon* spp., *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces* spp. ve *Torulopsis* spp. vb.) mastitis etmeni olarak bildirilmiştir (Alpay ve Yeşilbağ, 2009; Sharif ve Muhammad, 2009). Yetiştiricilikte en sık rastlanan mastitis etmeni mikroorganizmalar arasında; *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus uberis*, *E.coli* ve *Enterococcus* spp. gelmektedir (Tel Yaşar ve ark., 2009; Sorensen ve ark., 2010; Şeker ve Özenç, 2010; Cervinkova ve ark., 2013; Özdemir ve Kaymaz 2013). Ayrıca *Klebsiella* spp. de tanımlanmış mastitis etmenidir (Brise ve Duijkeren, 2005).

Mastitis etmeni patojen mikroorganizmalar kaynağına göre çevresel kaynaktan bulaşanlar ve bulaşıcı kaynaktan (hasta memeden veya hasta hayvandan bulaşma) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Türkyılmaz ve ark., 2010; Cengiz ve ark., 2011; Şahin ve Yıldırım, 2015). Bulaşıcı patojenler *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Mycoplasma* spp. iken çevresel mikroorganizmalar arasında *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Enterococcus* spp., *E.coli* ve *Klebsiella* spp. yer almaktadır. Enterobacteriaceae familyasına ait türlerin çoğu çevresel mastitis etmenleri içerisinde yer almaktadır. *E.coli*, *Enterobacter* ve *Klebsiella* cinsine ait bazı türler koliform grubu içerisinde olup insan ve hayvan sağlığı ve gıda güvenliğinde risk taşıyan mikroorganizmalardır.

Subklinik mastitis etmeni mikroorganizmalar üretim sırasında doğrudan temas ile insanlara bulaşması yanısıra süt ve süt ürünleri üretim sürecinde, kontamine sütün işlenmesi ile birlikte gıda üretim ve tüketim zincirine bulaşabilmektedir. Bu mikroorganizmaların gıda zincirine bulaşmalarının en önemli sebeplerinden biri yetersiz hijyen şartlarında üreticiliğin yapılmasıdır. Klinik mastitis etmeni patojenlerin hayvan ölümlerine neden olduğu bildirilmiştir (Heringstad ve ark., 2000; Burvenich ve ark., 2003).

Kaya ve ark. (2001), İzmir ilindeki süt sığırları işletmelerinde mastitis yaygınlık düzeyini 23 işletme ile 933 inekte incelemişlerdir. İncelenen ineklerin %49,5'inde en az bir meme lobunda subklinik mastitis olduğu saptanmıştır. Tank sütlerinin somatik hücre sayısı ≥ 400.000 adet/mL olarak ve ortalama 933.190 adet/mL olarak saptanmıştır. Tank sütü somatik sayısı ile subklinik mastitislik arasında pozitif korelasyon katsayısı $r= 0,50$ olarak tespit edilmiştir.

Rişvanlı (2001), Elazığ bölgesinde mastitis hastalığı dağılımını araştırmıştır.

İncelenen 1249 ineğin %55,17'sinde subklinik mastitis olgusu görülmüştür. CMT testi ile pozitif sonuç veren sütlerin % 58,86'sında mikrobiyolojik üreme tespit edilmiştir. En fazla tespit edilen mikroorganizmanın % 57,08 oranı ile *S. aureus* olduğu belirlenmiştir. *E.coli* ise %0,46 oranında saptanmıştır.

Tel ve ark. (2009) tarafından Şanlıurfa yöresinde subklinik mastitis olgusunun görülme oranı, mastitis etmenleri ve izole edilen mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıkları araştırılmıştır. CMT değeri pozitif bulunan 181 (%72,4) inekten alınan 332 (%33,2) adet süt örneği mikrobiyolojik olarak incelenmiş, 258'inden (%77,7) aerobik mikroorganizmalar izole edilmiştir. Mikroorganizma izole edilen 258 süt örneğinden 84 adet *Staphylococcus aureus* (%32,5), 71 adet koagulaz negatif *Staphylococcus* (%27,5), 23 adet *Streptococcus* spp. (%8,9), 16 adet *Escherichia coli* (%6,2), 15 adet *Arcanobacterium pyogenes* (%5,8), 9 adet *Bacillus* spp. (%3,4), 8 adet *Corynebacterium bovis* (%3,1), 7 adet *Micrococcus* spp. (%2,7), 5 adet *Enterobacter aerogenes* (%1,9), 5 adet *Candida* spp. (%1,9), 4 adet *Pasteurella multocida* (%1,5), 4 adet *Klebsiella pneumoniae* (%1,5), 4 adet *Citrobacter diversus* (%1,5), 3 adet *Pseudomonas auriginosa* (%1,1) belirlenmiştir. Bu mikroorganizmalara uygulanan antibiyogram analizi sonucunda en etkili antibiyotiklerin, trimetoprim+sulfometaksazol, eritromisin, tetrasiklin ve amoksisilin olduğu belirlenirken, *E. coli* suşlarının ise trimetoprim+sulfometaksazol, tetrasiklin ve streptomisine duyarlı, diğer antibiyotiklere dirençli olduğu saptanmıştır.

Büyükçangaz ve Mat (2012), Bursa bölgesinde 1600 adet sığırı CMT testi ile tarayarak 480 adet süt örneğinde subklinik mastitis tespit etmişlerdir. 201 adet bakteri izolatu arasında 151 adet *Staphylococcus aureus* (%31,45), 48 adet koagulaz negatif *Staphylococcus* spp. (KNS) (%23,88), 32 adet *Streptococcus agalactia* (%15,92), 23 adet *E.coli* (%11,44), 3 adet *Klebsiella pneumonia* (%1,49) tanımlamışlardır. İzolatların imipenem (10 µg) tilmicosin (15 µg), amoksisilin (30 µg), sefoksitin (30 µg), eritromisin (15 µg) mupirosin (10 µg), tetrasiklin (30 µg), gentamisin (10 µg), penisilin (10 unit), sefazolin (30 µg), enfloroksasilin (5 µg), trimetoprim-sulfometoksazol (25 µg), klindamisin (2 µg), siprofloksasin (5 µg) antibiyotiklerine karşı duyarlılıkları incelenmiş ve *E.coli* suşlarının klindamisin, siprofloksasin ve amoksisilin'e orta derece dirençli olduğu, diğer antibiyotiklere ise duyarlı olduğu tespit edilmiştir. *Klebsiella* spp.'nin ise tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

Dinç ve ark. (2012) da Balıkesir ve Çorum'daki işletmelerden toplanan süt örneklerinden izole edilen 92 adet *E.coli* suşunda GSBL aktivitesini araştırmışlardır. Ancak incelenen suşlarda GSBL aktivitesine rastlanılmamıştır. Ayrıca *E.coli* suşları eritromisine

(%69,6), ampisiline (%39,1), tetrasikline (%34,8), nalidiksik aside (%25,0), kloramfenikole (%22,8), trimetoprim-sülfametaksazole (%21,7) ve amoksisilin klavulonik aside (%21,7) karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. İzolatların %54,3'ünün iki ve daha fazla antibiyotiğe direnç gösterdiği tespit edilmiştir.

Koçyiğit (2012), Bolu Mudurnu bölgesinde süt ineklerinde, subklinik mastitis olgu varlığını araştırmıştır. Süt örneklerinin CMT değerleri ve mikrobiyal florası incelenmiştir. İneklerin %51,28'inden alınan süt örneklerinde CMT pozitif olduğu, yine bu süt örneklerinin %63'ünde mikrobiyal üreme olduğu tespit edilmiştir. Üreme olan örneklerde *E.coli* %28,9; Maya %24,21; *S.uberis* ve koagülaz negatif *S.aureus* %19,53; *S.aureus* %3,9; *Proteus* spp. %2,34 ve *Bacillus* spp. %1,56 oranlarında tespit edilmiştir. Üreyen bakterilerin amoksisilin+klavulonik asit ve oksitetrasiklin antibiyotiklerine duyarlı gentamisin, seftiofur, enrofloksasin ve kobaktam'a dirençli olduğu bulunmuştur. *E.coli* için en etkili antibiyotiğin amoksisilin+klavulonik asit ve oksitetrasiklin olduğu gözlemlenmiştir.

Yeşilmen ve ark. (2012), Diyarbakır bölgesinde CMT testi ile subklinik mastitis olgusu pozitif bulunan 134 inekten 268 süt örneğini incelemiştir. Örneklerden 66 adet *Staphylococcus aureus* (%24,63), 30 adet *Staphylococcus epidermidis* (%11,19), 20 adet *Staphylococcus haemoliticus* (%7,46), 27 adet *Streptococcus agalactiae* (%10,07), 10 adet *Streptococcus dysgalactiae* (%3,73), 5 adet *Streptococcus uberis* (%1,87), 10 adet *Bacillus* spp. (%3,73), 23 adet *Escherichia coli* (%8,58), 10 adet *Enterobacter cloacae* (%3,73), 10 adet *Enterobacter faecalis* (%3,73), 5 adet *Klebsiella pneumonia* (%1,87), 5 adet *Pseudomonas aeruginosa* (%1,87), 8 adet *Diplococcus* spp. (%2,99) ve 10 adet *Candida* spp. (%3,73) izole etmişlerdir. İzole edilen suşların sefazolin, siprofloksasin, klindamisin, eritromisin, gentamisin, ofloksasin, oksasilin, rifampin, tetrasiklin, trimetoprim-sulfometoksazol, vankomisin'e karşı dirençleri D-Phoenix Otomatik Mikrobiyoloji İdentifikasyon Sisteminde yapılmış (BD Diagnostic Instrument Systems, Sparks, MD, USA) ve en etkili antibiyotiklerin cefoperazone-sulbactam, sefoksitin ve ampisillin olduğu belirlenmiştir. *E.coli* sefoksitin grubu antibiyotiklere duyarlı bulunurken, izole edilen bütün etkenlerin penisilin'e dirençli olduğu ifade edilmiştir.

Genç (2015), Aydın ilindeki 100 adet subklinik mastitisli süt sığırlarından toplanan süt örneklerinde %28 oranında *Staphylococcus aureus*, %21 oranında *Streptococcus uberis* ve %8 oranında da *Streptococcus dysgalactiae* izolasyonu gerçekleştirmiş, izole edilen suşların %65'inin amoksisilin-klavulanik asit'e duyarlı, %60'ının ampisilin ve sefuroksim'e duyarlı, %100'ünde trimetoprim-sulfometoksazol'e ve florfenikol'e duyarlı olduğunu belirlemiştir. İzole edilen suşların penisilin'e ve neomisin'e %100 oranında, oksitetrasiklin'e

%85 oranında, enrofloksasin'e ve danofloksasin'e ise %70 oranında dirençli olduğunu saptanmıştır.

2.2.2. Enterobacteriaceae Familyası

Enterobacteriaceae familyasının tümü fakültatif anaerobik, gram negatif, katalaz pozitif çubuk şeklinde bakteriler olarak tanımlanmaktadır (Cullimore, 2000). Bazı türleri hareketsizdir, fakat çoğu tür hareket özelliği kazandıran flagellaya sahiptir. Çoğu türleri insanların ve hayvanların bağırsak florasında yer almakla birlikte bazı türleri klinik açıdan önemlidir. Bu bakteriler enterik bakteriler olarak da isimlendirilmektedirler. Enterobacteriaceae familyasının başlıca cinsleri; *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Kelbsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella* ve *Yersinia*'dır (Cullimore, 2000; Ünlütürk ve Turantaş, 2003). Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerin bir kısmı fekal orjinli değildir. Bazı üyeleri doğada saprofit olarak bulunurken bazıları da bitki patojendir. Enterobacteriaceae üyelerinin varlığı gıda güvenliğinde hijyen ve sanitasyon eksikliği göstergesi olarak kabul edilmektedir (Cullimore, 2000; Ünlütürk ve Turantaş, 2003).

2.3. Subklinik Mastitisli Sütlerin Fiziksel, Kimyasal, Biyolojik Özellikleri ve Tanısı

Subklinik mastitis, hafif bulgularla seyrederek gözle tespit edilemez iken, klinik mastitis ise memede veya sütte meydana gelen değişim ile gözle kolayca görülebilmektedir (Kaya ve ark., 2001). Subklinik mastitisin daha fazla oranda görülmesi ve büyük ekonomik kayıplara neden olmasından dolayı tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmuştur (Baştan ve ark., 1997a,b). Subklinik mastitis tanısı için mastitisin neden olduğu fizikokimyasal ve biyolojik değişiklikler göz önünde bulundurularak somatik hücre değeri (SHS), sütün elektrik iletkenliği (Eİ), toplam canlı sayısı (TCS) ve California mastitis test değerleri (CMT) gibi bazı özellikler incelenmiştir (Baştan ve ark., 1997a,b; Kaya ve ark., 2001; Gürbulak ve ark., 2009). İncelenen bu özellikler arasında subklinik mastitis olgu tespitinde en sık ve güvenilir başvuru parametre SHS olmuştur (Sabuncuoğlu ve Çoban, 2006; Gürbulak ve ark., 2009; Tel Yaşar ve ark., 2009; Cervinkova ve ark., 2013).

Mastitisli meme bezlerinden sütün sentezlenmesi sırasında kandan gelen ve memenin epitel hücrelerinden ayrılan SHS artış göstermektedir (Metin, 2005). Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY), Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde SHS $\leq 500\ 000$

adet/mL olan sütleri normal süt olarak bildirmiştir (Anonim, 2000). Somatik hücre sayısı mikroskopi, DNA filter metod, Coulter Counter, Fossamatik ve CMT testleri ile belirlenebilmektedir (Baştan ve ark., 1997a,b; Gürbulak ve ark., 2009; Özdemir ve Kaymaz, 2013; Timurkan, 2014). Son yıllarda yüksek uyum gösterdiğinden ve herhangi bir cihaz ekipman ihtiyacı duyulmayan ekonomik bir yöntem olan CMT değeri kullanılmaktadır (Özdemir ve Kaymaz 2013; Timurkan, 2014). CMT'nin prensibi; sütte SHS artışından faydalanılarak oluşan çökeltinin kıvamına göre derecelendirmektir. Başvurulan diğer yöntem ise Eİ değerinin ölçülmesidir. Mastitisli memenin dokusal geçirgenliğinin artması ile Na ve Cl iyonlarının varlığı artış göstermektedir ve bu artış Eİ değerini yükseltmektedir (Baştan, 1997a,b; Timurkan, 2014). Fakat sütün Eİ değeri, hayvanın cins, yaş, laktasyon dönemi, beslenme ve sağım zamanı gibi faktörlere göre değişmektedir (Timurkan, 2014).

Subklinik mastitisli sütlerin Eİ değeri ile saptanabilirliği Hillerton ve Walton (1991) tarafından ortaya konmuştur. Normal sütün Eİ 25 °C'de $4 \times 10^{-3} - 5.5 \times 10^{-3}$ S/cm arasında değişmektedir (Metin, 2005). Subklinik mastitisli sütlerde bu değer yüksek ölçülmektedir. Günümüzde subklinik mastitis tanısı yapan ve Eİ değerine bağlı sonuç veren "Milk Checker" olarak isimlendirilen el tipi cihazlar kullanılmaktadır (Kaya ve ark., 2001; Uzmay ve ark., 2003; Timurkan, 2014).

Haron ve ark. (2014) tarafından yapılan çalışmada, subklinik mastitisli sütlerin SHS ile Na, Cl ve K değerleri arasındaki ilişki incelenmiştir. SHS ile Na zayıf pozitif anlamlı korelasyon ($r=0,270$, $p<0,01$) SHS ile K arasında negatif anlamlı korelasyon ($r=-0,436$, $p<0,01$) tespit edilmiştir.

Timurkan (2014), 204 adet meme başından alınan süt örneklerinin Eİ ve CMT değerleri arasındaki ilişkiyi araştırmıştır. CMT ve Eİ değerlerinin uyumsuz olduğunu ve süt örneklerinin ortalama CMT test sonuçlarının +1 (zayıf;) değer aldığını bildirmiştir.

Özdemir ve Kaymaz (2013), Sivas, Koyunhisar ilçesindeki aile işletmelerinde subklinik mastitis oranını araştırmak için 118 adet süt örneğinin SHS, CMT ve Eİ değerlerini ölçmüşlerdir. Subklinik mastitisli süt oranını %60,17 olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar CMT değerinin Eİ'ne göre daha güvenilir sonuç verdiğini ifade etmişlerdir. CMT değerleri ile logaritmik SHS (logSHS) sayısının artışlarında paralellik ($p<0,001$), Eİ değerleri ile logSHS değerleri arasında yüksek korelasyon ($p<0,001$) olduğunu bulmuşlardır.

Diler ve ark. (2013) ise 212 inekte subklinik mastitis teşhisinde SHS'nın ve toplam mikroorganizma yükleri arasında ilişkiyi araştırmışlardır. 32 (%15) örnekte SHS 200.000-500.000 hücre/mL arasında ve 34 (%16) örnekte de 500.000 hücre/mL'den fazla olduğunu, SHS artışıyla toplam bakteri sayısının (TBS) ve toplam stafilokok (TSS) sayısının arttığını

tespit etmişlerdir. SHS (logaritma) ile TBS (logaritma), TSS (logaritma) arasında pozitif yönde istatistiksel olarak önemli korelasyon bulunması bu değerlerin subklinik mastitisin bir göstergesi olarak mastitis kontrol programının etkinliğinde değerlendirilebileceğini ifade etmişlerdir.

İkiz ve ark. (2013) Marmara bölgesinde 15 farklı çiftlikten 270 süt örneğinde (132 inek) subklinik mastitis varlığını araştırmışlardır. CMT testi ile pozitif reaksiyon veren örneklerin SHS'nin 237.481 ile 2.213.847 adet/mL arasında değiştiğini tespit etmişlerdir.

Malek dos Reis ve ark. (2013) SHS'nin ve mastitis etmeni patojenlerin süt bileşeni üzerine etkisini araştırdıkları çalışmada 221 ineği incelemişlerdir. Sütlerin ortalama bileşenlerini %4,48 laktoz, %3,67 protein, %3,01 yağ, %9,13 YZKM ve %12,15 toplam katı madde olarak tespit etmişlerdir. Subklinik mastitisin laktoz, YZKM, ve toplam kurumadde miktarını azalttığı, fakat protein ve yağ oranını etkilemediği belirlenmiştir. Ayrıca yine SHS'nin süt bileşen miktarlarını etkilediğini tespit etmişlerdir.

Kaşıkçı ve ark. (2012), Trakya bölgesinde 386 süt örneğinde, subklinik mastitis tanısında kullanılan Eİ yönteminin etkinliğini, SHS ve CMT ile karşılaştırmış, aynı zamanda bu değerlerin toplam canlı mikroorganizma sayısı, yoğunluk, donma noktası ve mineral madde miktarı üzerine etkilerini belirlemişlerdir. Eİ değerleri 25,71- 29,63 mS, SHS 249.453- 2.108.139, toplam canlı sayısı (TCS) 3,48-7,53 log cfu/mL, mineral madde miktarları % 0,65- %0,76; yoğunluk 1,031- 1,029; donma noktası -0,5281 ile -0,5282 değerleri arasında saptanmıştır. Subklinik mastitis teşhisinde Eİ değerlerinin CMT ve SHS ile benzerlik gösterdiği belirlenmiştir. CMT, SHS, TCS, Eİ ve Mineral madde miktarları arasında istatistiksel olarak önemli ($p<0,001$) pozitif korelasyon bulunmuştur.

Gürbulak ve ark. (2009), Kayseri'deki Saray çiftliğinde bulunan 3-9 yaşları arasındaki 296 Holstein ırkı ineklerde laktasyondaki subklinik mastitisli ineklerin teşhisinde CMT, SHS, Eİ, sütün bakteriyolojik analizi ile superfisiyel supramammar lenf yumrusunun büyüklüğü arasındaki ilişkileri incelemiş ve teşhis yönteminde kullanılan CMT, SHS, USG yöntemleri arasında paralellik varken sağım ekipmanlarına bağlı olarak Eİ ölçen değer arasında paralellik bulunmamıştır. Eİ bağlı sonuçlardaki uyumsuzluk, kullanılan ölçüm sisteminin (Milk Checker cihazı) farklı oluşundan kaynaklandığı düşünülmüştür. SHS, CMT, sütün elektrik iletkenliği, superfisiyel supramammar lenf yumrusunun ultrasonografik görüntüleriyle uyumlu olmakla birlikte geçmişte mastitis geçiren hayvanların lenf yumrusunun büyük kalmasından dolayı lenf yumrusunun tek başına teşhis yöntemi olarak kullanılamayacağı kanısına varılmıştır.

Atasever ve Erdem (2008), süt sığırlarında mastitis teşhisinde Eİ değerinin tek başına

kullanımı yerine diğer mastitis testleri ile birlikte kullanılmasının uygun olacağını belirtmişlerdir.

Batavani ve ark. (2007), somatik hücre sayısı >500.000 adet/mL, CMT testi pozitif olan 35 adet subklinik mastitisli inek ile sağlıklı 37 ineğin pH değerlerini sırasıyla 6,69 ve 6,59 bulmuşlardır. Aralarındaki farkın istatistiksel olarak önemli ($p<0,01$) olduğunu tespit etmişlerdir.

El Zubeir ve ark. (2005), subklinik mastitisli sütlerde Ca, Na, K, Mg, P, Fe, Zn ve Cu gibi mineral madde miktarları arasındaki korelasyonu incelediği çalışmalarında, Mg' un Ca ile pozitif korelasyon, Na ile negatif korelasyon gösterdiğini tespit etmişlerdir.

Sağlıklı hayvanın SHS değerinin 200.000 hücre/mL olduğu, 200.000 hücre/mL üzerinde SHS değerinin enfeksiyon belirtisi olarak kabul edilebileceği bildirilmiştir (Kul ve ark., 2006; Diler ve ark., 2013). Bazı araştırmacılar bu değer 100.000 hücre/mL'den az olması gerektiğini ifade etmektedir (Berglund ve ark., 2004). Avrupa Birliği kriterlerinde (Health and Hygiene Directive 92/46/EEC) çiğ ve ısıtılmış sütte SHS değerinin <400.000 adet/mL iken TGKY'de ise <500.000 adetten az olması gerektiği belirtilmektedir (EC, 1992; Anonim, 2000).

Dingwell ve ark. (2003) 1283 meme lobu örneğinde CMT testi ve major mastitis mikroorganizmaların ve minor patojenlerin varlığını bakteriyel kültür yöntemi ile araştırarak karşılaştırmışlardır. CMT testinin meme hastalığını teşhis etmede %82,4 düzeyinde duyarlı, %80,6 oranında özgün olduğunu tespit etmişlerdir.

Rişvanlı ve Kalkan (2002) 271 adet subklinik mastitisli sütlerin CMT ve SHS değerleri arasındaki ilişkiyi incelemiş ve CMT + değerine sahip sütlerde SHS ortalama 313.001, CMT ++ değerinde SHS ortalama 559.007 ve CMT +++ olanlarda ise SHS ortalama 1.563.618 adet/mL olarak bulunmuştur. 271 adet subklinik mastitisli süt örneklerin %60,89'unda mikrobiyolojik üreme tespit edilirken ve en fazla tanımlanan suş *S.aureus* olarak saptanmıştır.

Kaya ve ark. (2001), İzmir ilinde 933 inekte mastitis yaygınlığını araştırmış ve %49,5 oranında subklinik mastitis olgusuna rastlamışlardır. Tank sütlerinin SHS'nın ortalama 933.190 adet/mL olduğu bulunmuş, sütlerdeki SHS'nın 420.000-1.510.000 adet/mL arasında değişim gösterdiğini bildirmişlerdir.

Baştan ve ark. (1997b) tarafından 370 adet süt örneğinde albümin, toplam protein, laktoz, Eİ, CMT ve SHS arasındaki ilişkiyi incelemiş ve SHS, CMT ve Eİ değerleri arasında pozitif bir korelasyon olduğunu tespit etmişlerdir.

2.4. Mastitis Tedavisi ve Kullanılan Antibiyotikler

Mastitis hastalığı oluşmadan önce buna sebebiyet veren çevresel ve fizyolojik nedenler ortadan kaldırılmalıdır. Her ne kadar mastitis hastalığının en önemli etmeninin patojen mikroorganizmalar olduğu ifade edilmiş olsa da, patojen mikroorganizmaların hastalığı oluşturmalarını kolaylaştıran etmenler mevcuttur.

Hayvanların temiz olmayan, dar, havasız, uygun olmayan zemin şartları gibi elverişsiz ortamda bakılması, beslenme ve yöntemin bilinçli yapılmaması, ani sıcaklık değişiklikleri, zararlı böcek ve kemirgenlerin bulunması gibi kontrolsüzlükler, hijyenik sağım şartlarının sağlanmaması, meme başlarının zarar görmesi, sağımın az veya çok yapılması gibi nedenler mastitis etmeninin patojen mikroorganizmaların gelişerek hastalığın ortaya çıkmasına neden olmaktadır (Aydın, 2005; Cengiz, 2009; Özbilgin, 2014).

Mastitis tedavisinden önce, sürüde mastitis kontrol programı uygulanmalıdır. Mastitis kontrol programı kapsamında sağım ekipmanlarının düzenli bakımı yapılmalıdır. İneklere aşı gibi önleyici tedaviler uygulanmalıdır. Sürünün belirli aralıklarda SHS, CMT değerleri Eİ gibi parametreleri izlenmelidir. Ayrıca hayvanlara ait, yaş, cinsiyet, laktasyon sayısı gibi fizyolojik özellikler kayıt altında tutulmalıdır (Aydın, 2005; Cengiz, 2009; Özbilgin, 2014).

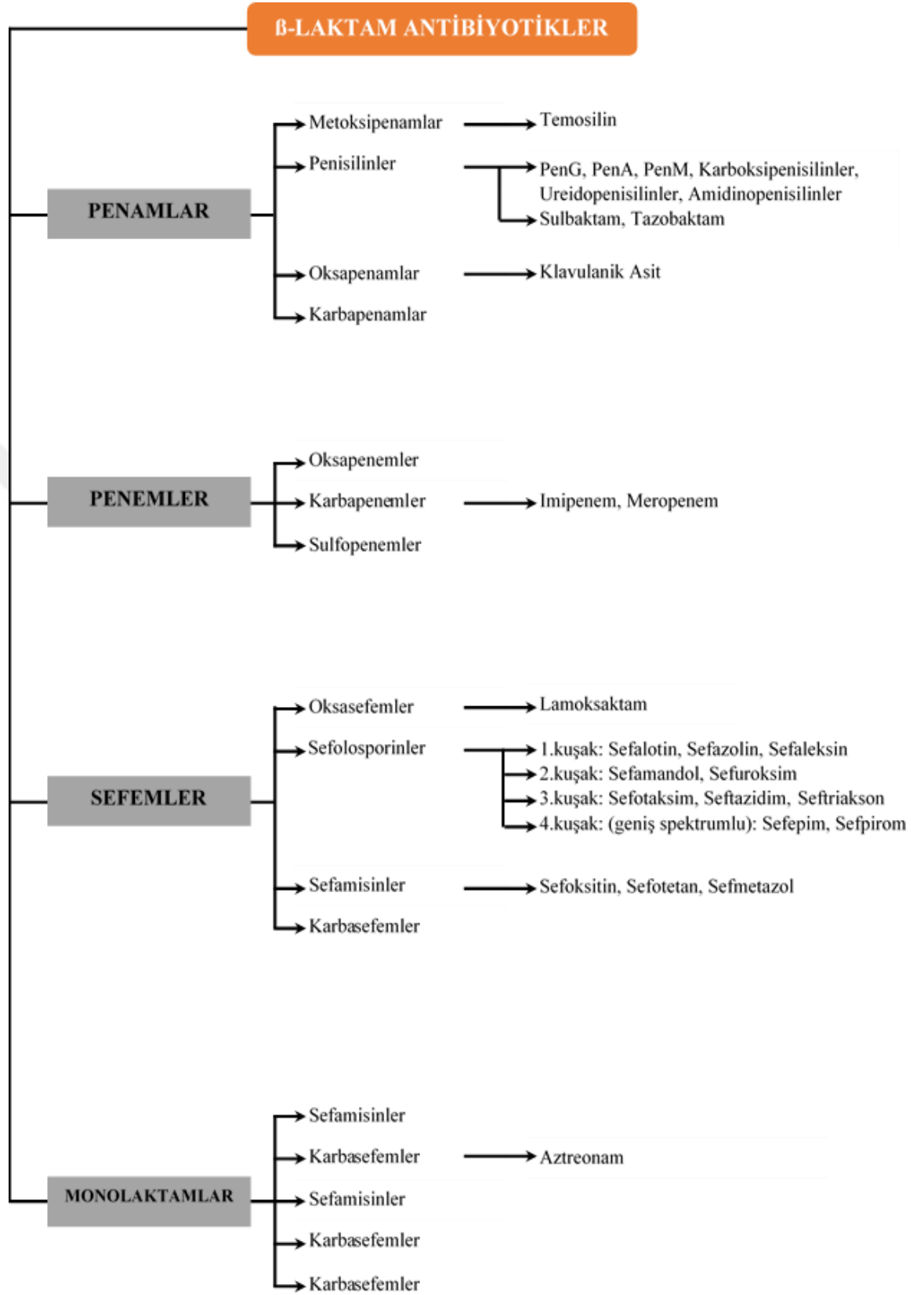
Patojen mikroorganizmaların neden olduğu subklinik ve klinik mastitis tedavisinde antibiyotik tedavisi yaygın olup, doğru antibiyotik tedavisinde mastitis etmeni tespit edilerek çeşitli antibiyotikler ile taranıp uygun antibiyotiğin kullanılması sağlanmalıdır (Şeker ve Özenç, 2010; Büyükcangaz ve Mat, 2012; Dinç ve ark., 2012; Ünal, 2012). Ayrıca antibiyotikler hayvanlarda çeşitli enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde de kullanılmaktadır (Dinç ve ark., 2012; Ünal, 2012). Son yıllarda araştırmacılar, hayvanlarda uygun olmayan antibiyotik tedavilerinin uygulanmasının, mastitis etmeni ve diğer hastalık etmeni patojen mikroorganizmalarda direnç gelişimine neden olduğunu ifade etmektedirler (Şeker ve Özenç, 2010; Büyükcangaz ve Mat, 2012; Dinç ve ark., 2012; Ünal, 2012; Santiago ve ark., 2015; de Oca ve ark., 2015; Ibrahim ve ark., 2016). Hayvanlarda tedavi amacıyla başlıca amoksisilin, tetrasiklinler, aminoglikozidler, florokinolonlar, sulfonamid, tilosin, linkozamidler, kolistin ve pleuromutilinler kullanılmakta olup, *E.coli* ve *Klebsiella* gibi çevresel mastitis patojeni olan Enterobacteriaceae familyasına ait etmenler ile mücadelede beta-laktam antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır (Dilsiz, 2010; Coşkun, 2011; Ünal, 2012; Elmacıoğlu, 2013; de Oca ve ark., 2015; Nguyen, 2016).

2.5. Beta-laktam Antibiyotikler ve Etki Mekanizması

2.5.1. Beta-laktam Antibiyotikler

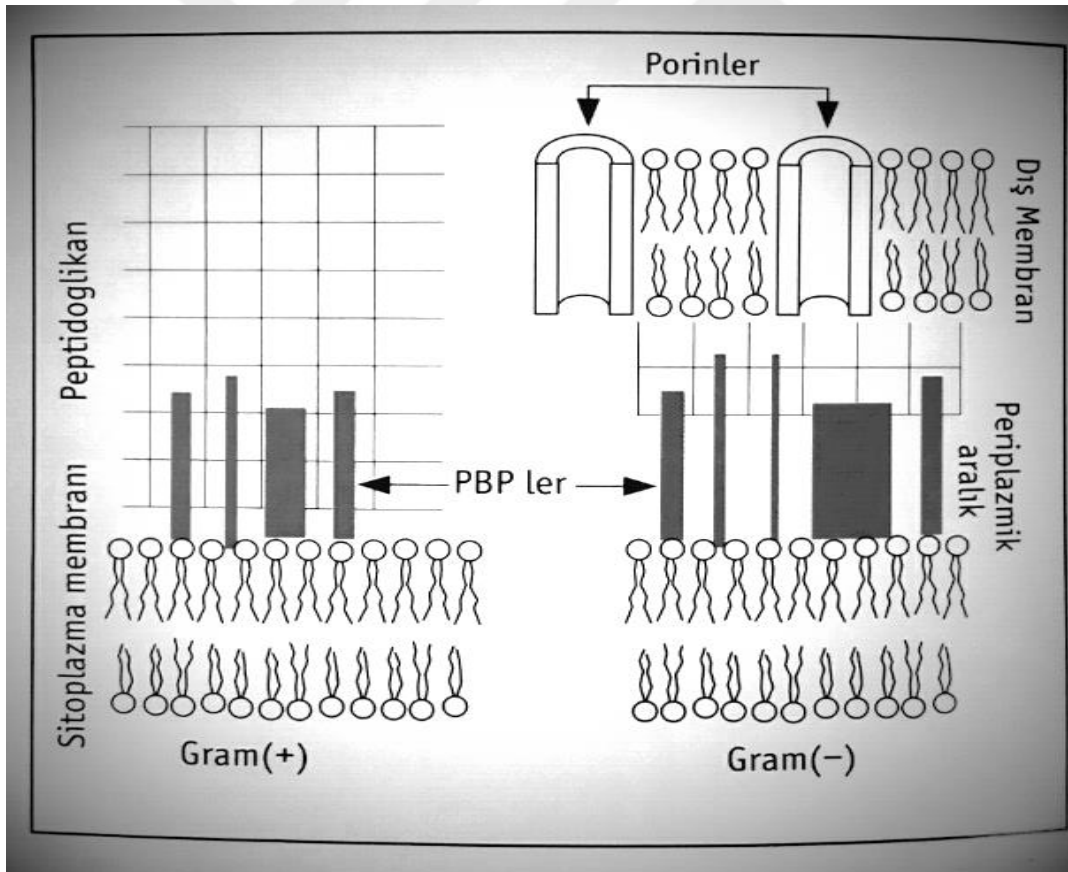
Beta-laktamlar bakteri hücre duvarına etki eden antibiyotik sınıfında yer alan güçlü organik asitlerdir (Jehl ve ark., 2003). Beta-laktam antibiyotikler Çizelge 2.1’de gösterilmiştir. Penamlar, penemler, sefemler ve monolaktamlar başlıca beta-laktam antibiyotiklerdir (Coşkun, 2011; Tekiner, 2016). Kimyasal yapılarında 4 atomlu beta-laktam halkasını bulundurmaktadırlar (Örnek, 2013; Tekiner, 2016). Klavulanik asit, penisillanik asit, sulbaktam ve tazobaktam beta-laktamaz inhibitörleridir. Beta-laktamaz inhibitörleri kombine edildikleri antibiyotiğin beta-laktamazlar tarafından hidrolize edilmesini önlerler ve tek başlarına bakterisid etki göstermezler. Veteriner hekimlikte kullanılan başlıca beta-laktam antibiyotikler; Ampisilin, amoksisilin, benzilpenisilin, kloksasilin, hetasilin, amoksisilin- klavulanat, 1. 2. 3. ve 4. nesil sefalosporinler ve karbapenemlerdir (Tekiner, 2016).

Çizelge 2.1. Beta-laktam antibiyotiklerin sınıflandırılması (Jehl ve ark., 2003)



2.5.2. Beta-laktam Antibiyotiklerin Etki Mekanizması

Beta-laktam grubu antibiyotikler Şekil 2.1’de gösterilen gram negatif ve gram pozitif bakteri hücrelerinde yapısal değişiklik gösteren peptidoglikan katmanının sentezini bozmaktadır (Elmacıoğlu, 2013; Örnek, 2013). Beta-laktamazlar peptidoglikan katmanının sentezinde transpeptidaz aktivitesinden sorumlu penisilin bağlayan proteinlere (PBP) bağlanarak transpeptidasyonu engellemekte ve bakterilerin inaktif olmasına neden olmaktadır (Elmacıoğlu, 2013; Tekiner, 2016). Fakat gram negatif bakterilerde beta-laktamazların hedeflerine bağlanması için dış membranda bulunan porinlerden (protein kanalları) geçmeleri ve periplazmik boşluktaki beta-laktam antibiyotikleri inhibe eden hidrolitik aktiviteye sahip beta-laktamaz enzimlerinden etkilenmemeleri gerektiği ifade edilmiştir (Jehl ve ark., 2003; Örnek, 2013). Gram pozitif bakterilerin peptidoglikan katmanının beta-laktam antibiyotiklerin hedeflerine ulaşmalarını etkilemediği belirtilmiştir (Jehl ve ark., 2003).



Şekil 2.1. Gram negatif ve gram pozitif bakterilerin hücre duvar yapısı (Jehl ve ark., 2003)

2.6. Beta-laktam Antibiyotiklere Karşı Gelişen Direnç

Beta-laktam grubu antibiyotikler yan etkilerinin az olması ve bakterisid olmaları nedeniyle gram-negatif infeksiyonlarda dünyada en sık kullanılan antibiyotiklerdir (Dağlar ve Öngüt, 2012; Weiner, 2015; de Oca ve ark., 2015). Gram-negatif bakteriler, dış membran proteinlerindeki değişiklik, beta-laktamaz enzim sentezi ve penisilin bağlayıcı proteinlerde oluşan değişiklik gibi farklı yollar ile beta-laktam grubu antibiyotiklere karşı direnç geliştirebilmektedir (Jehl ve ark., 2003; Örnek, 2013). Enterobacteriaceae familyasına ait türler başta olmak üzere bir çok mikroorganizma tarafından üretilen beta-laktamaz enziminin en önemli direnç mekanizması olduğu birçok araştırmacı tarafından bildirilmiştir (Yuluğ, 1997; Jehl ve ark., 2003; Dağlar ve Öngüt, 2012; Elmacıoğlu, 2013; Örnek, 2013).

Beta-laktamaz enzimlerinin üretimi mikroorganizmalarda kromozomdaki veya plazmid ya da transpozonlardaki genler tarafından kodlanmaktadır (Dağlar ve Öngüt, 2012; Elmacıoğlu, 2013; Örnek, 2013). Araştırmacılar tarafından son zamanlarda integronlar üzerinde de beta-laktamaz geni (*bla*) tanımlanmıştır (Örnek, 2013). Nadiren de olsa membrana bağlı enzimlerin varlığı bildirilmiştir (Elmacıoğlu, 2013; Örnek, 2013). Çoğunlukla bakterilerdeki direnç genleri plazmidler ile konjugasyon yolu ile yaygınlaşmaktadır (Örnek, 2013). Günümüze kadar bakterilerde 400'ün üzerinde beta-laktamaz enzimi bildirilmiştir (Gümüş, 2015).

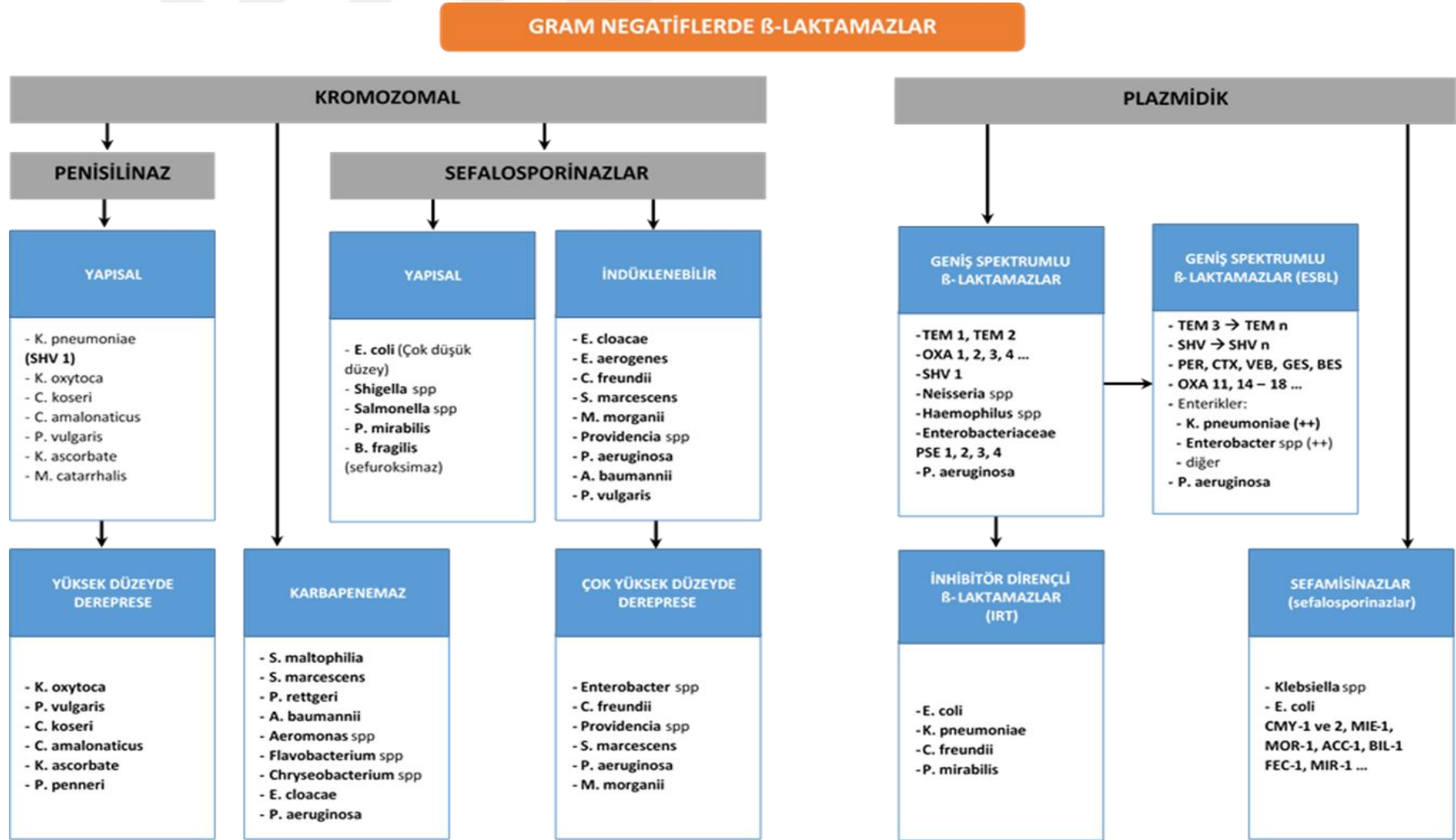
Beta-laktamazlar, beta-laktamların kimyasal yapısındaki beta-laktam halkasını hidrolize etmektedir (Dağlar ve Öngüt, 2012; Elmacıoğlu, 2013; Örnek, 2013; Gümüş, 2015). Böylece beta-laktamların etkinliği ortadan kaldırılmış olmaktadır. Beta-laktamazlar farklı şekilde sınıflandırılmıştır. Klinik öneme sahip gram negatif bakterilerdeki beta-laktamazlar Çizelge 2.2.'de gösterilmiştir. Son olarak Bush ve Jacoby (2009) enzim aktiviteleri ve substratlarına göre aşağıda verildiği gibi sınıflandırmıştır;

Grup 1: Sefalosporinazlar (C sınıfı)

Grup 2: Geniş spektrumlu sefalosporinazlar, inhibitör kombinasyonu, genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (GSBL), serin karbapenemaz (A ve D sınıfı)

Grup 3: Metolla beta-laktamazlar (B sınıfı)

Çizelge 2.2. Gram negatif bakterilerdeki önemli beta-laktamazlar (Jehl ve ark., 2003)



2.6.1. Genişlemiş Spektrumlu Beta-laktamaz (GSBL) Direnci

Beta- laktamaz enzimlerinin yapılarında bir veya birkaç aminoasit değişikliği ile etki spektrumlarının daha da genişlediği bildirilmiştir. Bu özelliğe sahip enzimlere “Genişlemiş spektrumlu beta-laktamazlar (Extended spectrum beta-lactamase, ESBL/GSBL) adı verilmiştir (Bradford, 2001; Özsoy ve ark., 2001; Pitout ve ark., 2005; Örnek, 2013). GSBL’ler, seftriakson, sefpirom ve kısmen sefepim gibi 3. kuşak sefalosporinleri (oksiiminosefalosporinleri) hidroliz edebilen, sefamisin ve karbapeneme duyarlı ve genellikle klavulanik asit, sulbaktam veya tazobaktam gibi beta-laktamaz inhibitörleri ile inhibe olan, aktif bölgelerinde serin bulunan enzimlerdir (Elmacıoğlu, 2013; Örnek, 2013; Gümüş, 2015).

Klebsiella spp., *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. gibi Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerde GSBL üreten gen bölgelerine sık rastlanmakla beraber rastlanan genler bu mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde sorun olmaktadır (Gülay ve ark., 1998; Kuzucu ve ark., 2011; Dağlar ve Öngüt, 2012; Elmacıoğlu, 2013; Nyugen ve ark., 2016). Ayrıca bu mikroorganizmaların toplum kökenli enfeksiyonlara da neden oldukları bildirilmiştir (Kuzucu ve ark., 2011; Öndeş, 2015). İlk defa 1983 yılında Almanya’da GSBL aktivitesi *Klebsiella pneumoniae*’de tespit edilmiş iken ülkemizde ise ilk kez GSBL aktivitesine sahip *Klebsiella* spp. 1992 yılında rapor edilmiştir. (Örnek, 2013). GSBL varlığının en sık tespit edildiği türler *E.coli* ve *Klebsiella* spp.’dir (Eroğlu ve ark., 2007; Kuzucu ve ark., 2011; Elmacıoğlu, 2013; Örnek, 2013; Kolhapure ve ark., 2015).

GSBL enzimler çeşitli şekillerde isimlendirilmektedirler, etkiledikleri substratlara göre (IMP, OXA, CARB vb.), biyokimyasal özelliklerine göre (SHV vb.), lokalize oldukları genlere göre (Amp vb.), izole edildikleri ilk mikroorganizmaya (PSE), ilk hasta isimlerine ve hastaneye (TEM; MIR vb.), ilk görülen eyalete (OHIO vb.) göre de adlandırılabilirler (Orak, 2005). Bazı adlandırmalar zamanla değişmektedir. GSBL enzimlerinin genellikle TEM ve SHV gibi plazmid kaynaklı enzimlerin yapısındaki bir veya birkaç aminoasit değişikliği ile türevlenmekte olduğu araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Orak, 2005; Dağlar ve Öngüt, 2012; Sökmen, 2016). Ayrıca son yıllarda TEM ve SHV enzimlerine benzerlik göstermeyen CTX-M, PER, VEB gibi plazmid kaynaklı GSBL enzimleride tanımlanmıştır (Eroğlu ve ark., 2007; Dağlar ve Öngüt, 2012; Elmacıoğlu, 2013; Örnek, 2013).

2.6.2. AmpC Tipi Beta-laktamaz Direnci

AmpC tipi beta-laktamaz üreten mikroorganizmalar 4. kuşak sefalosporinler ve karbapenemler dışındaki betalaktam grubu antibiyotiklere, beta-laktamaz inhibitörlerine direnç gösterirken kloksasilin ve aztreonam ile inhibe olmaktadır (Balıkçı, 2007; Ak, 2008; Sarı ve ark., 2013; Gümüş, 2015). AmpC tipi beta-laktamazlar, Bush ve Jacoby (2009) sınıflandırmasına göre, Grup 1 (sınıf C)'de yer almakta ve kodlanma yerlerine göre kromozomal ve plazmid olmak üzere ikiye ayrılmaktadır (Balıkçı, 2007; Koldaş ve ark., 2011; Sarı ve ark., 2013).

AmpC beta-laktamaz enzimi ilk olarak 1940 yılında Abraham ve Chain tarafından penisilini hidroliz eden bakteriyel bir enzim olarak bildirilmiştir. 1965 yılında İsveçli araştırmacıların *E.coli*'deki penisilin direnci üzerine yaptıkları genetik çalışmalarında sırasıyla ampA, ampB ve ampC olarak tanımlanmış ve ayrıca AmpC beta-laktamaz enzimi üretiminin ampC geni tarafından kontrol edildiği bildirilmiştir (Jacobcy, 2009; Paşa, 2013).

Kromozomal AmpC enziminin düşük düzeyde üretiminin mikroorganizmalarda direnç oluşturmadığı, indükleyici ajanlar veya mutasyon sonucu yüksek düzeyde sentezlenmesi ile direnç gelişimine neden olduğu bildirilmiştir (Uluslan, 2009). Plazmid aracılı AmpC beta-laktamazların (pAmpC), kromozomal AmpC beta-laktamaz kodlayan genlerin plazmidler vasıtasıyla yeni mikroorganizmalara transfer olmasıyla ortaya çıktıkları araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Ak, 2008; Paşa, 2013).

pAmpC beta-laktamaz enzimleri, GSBL enzimlerine oranla daha az görülmesine rağmen GSBL'ye göre daha geniş spektrumda beta-laktam antibiyotiklere direnç göstermektedirler (Ak, 2008; Coşkun ve Altanlar, 2012a). Günümüzde tespit edilerek GenBank üzerinde kayıt altına alınmış 29 farklı pAmpC beta-laktamaz enzimini kodlayan gen bölgeleri CIT, EBC, ACC, DHA, MOX ve FOX olmak üzere altı grupta toplanmıştır (Coşkun ve Altanlar, 2012a). pAmpC beta-laktamazlar, plazmidler aracılığı ile kolayca aktarılabilir türler arasında yayılabilmeleri, porin kaybı gibi diğer direnç mekanizmaları ile etkileşerek karbapenemlere de direnç geliştirebilmeleri, kromozomal olarak ampC geni taşımayan *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. gibi patojen mikroorganizmalarda da bulunabilmelerinden dolayı önem taşımaktadırlar (Ak, 2008; Koldaş ve ark., 2011; Sarı ve ark., 2013).

Araştırmacılar tarafından klinik durumlarda bazı suşların plazmid ile taşınan ampC beta-laktamaz genleri ile birlikte GSBL genlerini de bulduklarını, bu durumun bir çok antibiyotiğe karşı direnç gelişimine neden olduğu ve bunun da tedavilerde başarısızlığa neden olduğu bildirilmiştir (Uluslan, 2009; Koldaş ve ark., 2011; Paşa, 2013; Sarı ve ark.,

2013; Gümüş, 2015).

2.7. Gıdalarda Antibiyotik Dirençli Bakteri Sorunu

Günümüzde insanoğlunu bekleyen en büyük tehlikenin antibiyotik direnci olduğu bilim insanları tarafından bildirilmektedir (Verraes ve ark., 2013; Lalak ve ark., 2016).

Gıda ve Tarım Örgütü (FAO), Uluslararası Dünya Bulaşıcı Hayvan Hastalıkları Örgütü (OIE) ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) gibi uluslararası kuruluşlar hayvanlardan insanlara geçen ve insanlarda antibiyotik direncini arttıran bu sorun üzerinde önemle durmaktadırlar. Avrupa ülkelerinde, çiftlik hayvanı ve hayvansal gıda kaynaklı bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının gözlemlendiği “Avrupa Hayvanlarda Antimikrobiyal Duyarlılık İzleme (European Antimicrobial Susceptibility Surveillance in Animals, EASSA)” programları bulunmaktadır. Bu programlar 1998 yılında kurulan Brüksel’deki hayvan sağlığı çalışma merkezi (Animal Health Study Center in Brussels, CEESA) tarafından kontrol edilmektedir. Diğer ülkelerde de benzer kuruluşlar yer almaktadır. Japonya’da 1999 yılında, Japonya Veteriner Antimikrobiyal Direnç İzleme Sistemi (JVARM) kurulmuştur. Türkiye’de ise veteriner hekimlik alanında hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin bakterilerdeki direnç artışına etkisini inceleyen herhangi bir izleme programı mevcut değildir. Ancak 2011 yılında yayınlanan “Zoonozlar ve Zoonotik Etkenler, İlgili Antimikrobiyal Direnç ve Gıda Kaynaklı Salgınların İzlenmesi Yönetmeliği” (Anonim, 2011a) ile konunun yasal dayanağı oluşturulmuştur.

Ülkemizde 5996 Sayılı Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu (Anonim, 2010a), Gıda ve Yemin Resmi Kontrolüne Dair Yönetmelik (Anonim, 2011b), Gıda İşletmelerinin Kayıt ve Onay İşlemlerine Dair Yönetmelik (Anonim, 2011c), Gıda Hijyeni Yönetmeliği (Anonim, 2011d), Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği (Anonim, 2011e), Hayvansal Gıdaların Resmi Kontrollerine İlişkin Özel Kuralları Belirleyen Yönetmelik (Anonim, 2011f), Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (Anonim, 2011g) ve Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği (Anonim, 2011h) ile süt ve süt ürünleri sektöründe gıda güvenliği sağlanmaya çalışılmaktadır.

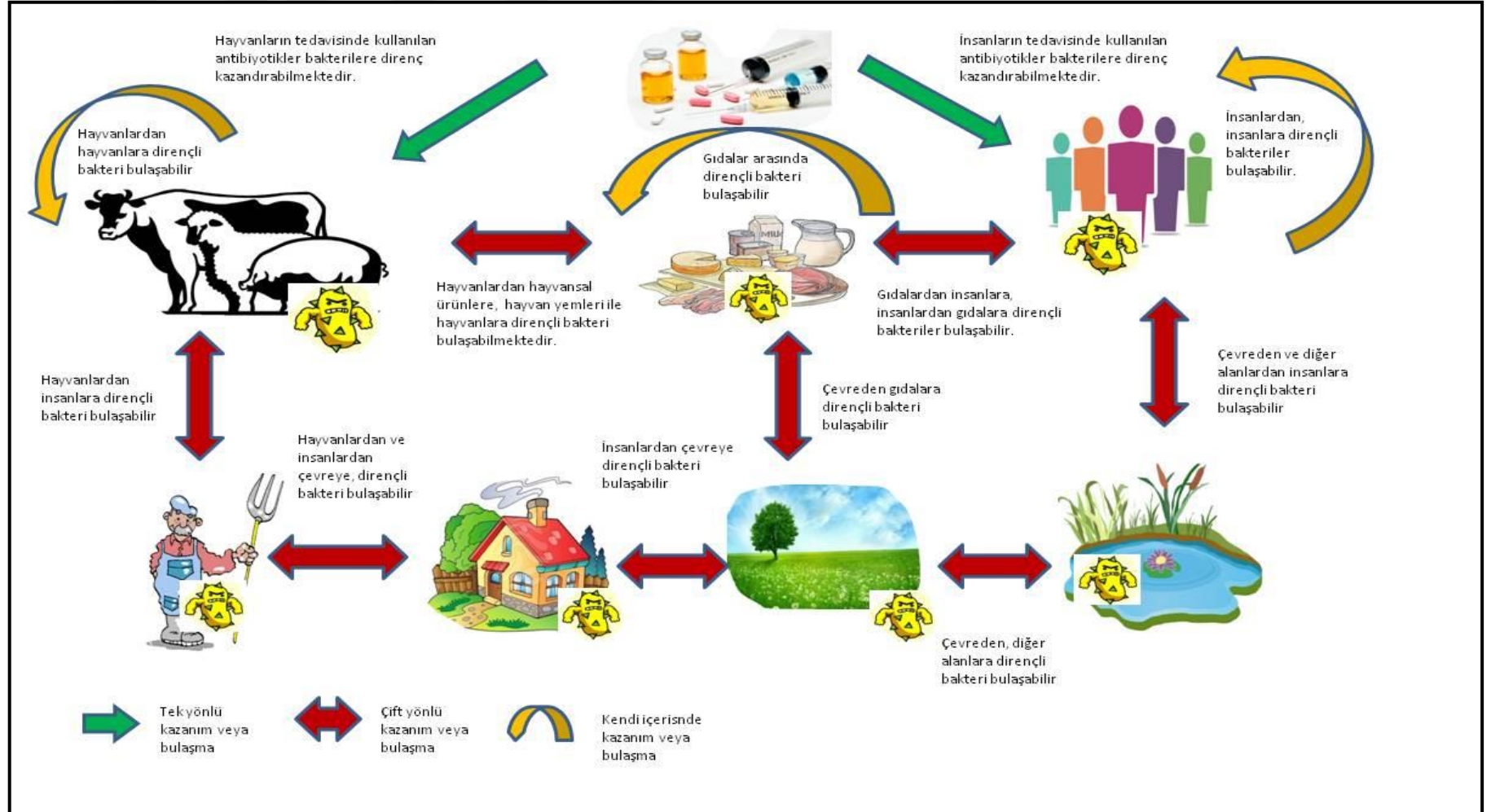
Dünyada üretilen sütün %53’ü modern süt işletmelerinde işlenirken, AB (Avrupa Birliği) ülkelerinde bu oran %94’tür. Türkiye’de ise çiğ sütün sanayiye işlenmesi bu oranların oldukça altındadır ve %40 oranında kayıt dışı tüketim söz konusudur (Mola ve ark., 2011). Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK) 2015 verilerine göre Türkiye’de 16.933.520 ton, Çanakkale bölgesinde 316.396 ton inek sütü toplanmıştır. Süt üretimi ülke ekonomisi açısından oldukça önemli bir yere sahip olmakla birlikte sektörün en önemli sorunu

kaliteliçiğ süt eldesi, çiğ süt üretiminde ve son ürünlerdeki verim düşüklüğüdür.

AB'ye uyum sürecinde tarım sektörüne etki eden iki müzakere başlığı yer almıştır. Bunlardan ilki, gıda güvenliği, veterinerlik ve bitki sağlığı üzerine düzenlemeler içeren on ikinci fasıldır (Mola ve ark., 2011). Fakat yapılan düzenlemelere rağmen Türkiye'de aile tipi küçük ölçekli olarak yapılan üreticilikte istenilen süt verimine ve kalitesine ulaşamamıştır.

Dünya genelinde beta-laktam antibiyotiklerin insan sağlığında yaygın kullanımı ve veteriner hekimliğinde uygun olmayan kullanımı, bakterilerin özellikle *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, başta olmak üzere Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerin beta-laktamaz üretimi gibi farklı direnç mekanizmaları geliştirmesine neden olmuştur (Kolhapure ve ark., 2015; de Oca ve ark., 2015; Weiner ve ark., 2015; Lalak ve ark., 2016). Ayrıca WHO bu direnç mekanizmalarının gelişiminin kritik önem taşıdığını bildirmiştir (de Oca ve ark., 2015). GSBL dirençli suşların enfekte insanlarla veya tıbbi cihaz ve ekipmanlar aracılığı ile bulaşmasının yanı sıra gıda zinciri yoluyla bulaşma ihtimalini olduğu belirlenmiştir (Verraes ve ark., 2013; Weiner ve ark., 2015; Huijbers ve ark., 2015; Nyugen ve ark., 2016). Şekil 2.2'de GSBL/AmpC aktivitesine sahip suşların bulaşabilecekleri olası yollar gösterilmiştir. Birçok Avrupa ülkesinde yapılan önceki çalışmalarda GSBL/AmpC üreten bakterilerin çiftlik hayvanlarında varlığı rapor edilmiştir (Liebana ve ark., 2012; Hordijk ve ark., 2013; Weiner ve ark., 2015; Huijbers ve ark., 2015; Lalak ve ark., 2016) Ayrıca son zamanlarda süt, kırmızı et ve tavuk ürünlerinde de GSBL/AmpC aktivitesine sahip Enterobacteriaceae familyasına ait bakteriler araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir (Atabey, 2011; Avcı, 2012; Liebana ve ark., 2012; Schmid ve ark., 2013; Khoshbakth ve ark., 2014; Öndeş, 2015; Yavaş, 2015; Ibrahim ve ark., 2016; Tekiner, 2016).

Ülkemizde de yapılan çalışmalarda çiftlik hayvanlarında %8,3' oranında GSBL aktivitesi pozitif *E.coli* tespit edilmiştir (Elmacıoğlu, 2013). Ayrıca süt ve süt ürünlerinde %16,4 ve %23,8 oranında GSBL pozitif Enterobacteriaceae (Avcı, 2012; Yavaş, 2015), kırmızı et ürünlerinde de %26,2 GSBL aktivitesi pozitif Enterobacteriaceae, %7'sinde GSBL pozitif *E.coli* tespit edilmiştir (Öndeş, 2015; Pehlivan-Önen, 2015).



Şekil 2.2. GSBL/AmpC aktivitesine sahip suşların bulaşma yolları (Özdikmenli ve ark., 2015)

2.7.1. Gıda Üretim Zincirindeki Enterobacteriaceae Türlerinde GSBL ve AmpC Aktivitesi

Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerin çoğu çevresel mastitis etmenleri içerisinde yer almaktadır. *E.coli*, *Enterobacter* ve *Klebsiella* gibi bakteriler koliform grubu içerisinde olup insan, hayvan sağlığı ve gıda güvenliği açısından risk taşıyan mikroorganizmalardır. Subklinik mastitis etmeni bu patojen mikroorganizmalar, sağım ve bakım sırasında doğrudan temas ile insanlara bulaşabilecekleri gibi süt ve süt ürünleri üretim sürecinde, kontamine sütün işlenmesi ile birlikte gıda üretim ve tüketim zincirine bulaşma riski söz konusudur. *E.coli* ve *Klebsiella* spp. gibi çevresel mastitis patojeni olan Enterobacteriaceae familyasına ait etmenler ile mücadelede beta-laktam grubu antibiyotikler sıklıkla kullanılmaktadır (Dilsiz, 2010; Coşkun, 2011; Ünal, 2012; Elmacıoğlu, 2013; de Oca ve ark., 2015; Nguyen, 2016). Hayvanlarda uygun olmayan antibiyotik tedavilerinin yapılması, mastitis etmeni ve diğer hastalık etmeni patojen mikroorganizmalarda direnç gelişimine neden olmaktadır (Şeker ve Özenç, 2010; Büyükcangaz ve Mat, 2012; Dinç ve ark., 2012; Ünal, 2012; de Oca ve ark., 2015; Santiago ve ark., 2015; Ibrahim ve ark., 2016). Yıbar ve Soyutemiz (2013), Garcia-Migura ve ark. (2014) ve Wielinga ve ark. (2014)'da hayvanlarda herhangi bir nedenden dolayı kullanılan antibiyotiklerin, antibiyotik dirençli bakterilerin hayvanlarda bulunmasına/tespitine neden olan en önemli etken olduğunu ifade etmişler, özellikle 1990'lı yıllarda büyümeyi teşvik edici olarak kullanılan antibiyotiklerin birçok ülkede bu dirençli bakterilerin alarm seviyesine yükselmesine neden olduğunu belirtmişlerdir.

Gıda olarak tüketilen hayvanlarda meydana gelen direncin risk faktörleri karmaşık olmakla birlikte sefolosporinlerin kullanılmasının bu direnç genlerinin yayılmasında en önemli risk faktörü olduğu, bunun yanısıra uluslararası hayvan ticaretinin de diğer bir risk faktörü olduğu bildirilmektedir. Antibiyotik dirençli suşların yayılımını önlemek için çiftlik biyogüvenliğinin artırılması, hayvan ticaretinin kontrol altına alınması, antimikrobiyal kullanımının azaltılmasının sağlanması gerektiği belirtilmiştir (Liebana ve ark., 2012). Ayrıca antibiyotik atıklarının ve antibiyotik dirençli mikroorganizmaları içeren atıkların, gıda maddeleri, su ve atıklar ile insanlara ve hayvanlara bulaşmasını önlemek için iyi bir atık yönetimi olması gerektiği ifade edilmiştir (Finley ve ark., 2013).

Antibiyotik direnci, insan ve hayvan sağlığı açısından dünyada önemli bir sorundur. Gıdalarda bu dirençli bakterilerin ve genlerin transferinde rol oynamaktadır (Marshall ve Levy, 2011; Verraes ve ark., 2013). Günümüzde araştırmacılar çeşitli gıda olarak tüketilen hayvanlarda ve gıdalarda beta-laktam antibiyotiklere direnç gösteren GSBL ve AmpC beta-

laktamaz aktivitesine sahip Enterobacteriaceae familyasına ait bakteriler üzerine araştırmalarını yoğunlaştırmışlardır (Gezer ve ark, 2012; Dahmen ve ark., 2013). Gıda üretiminde kullanılan hayvanlar ve hayvansal gıdalar GSBL/AmpC üreten bakterilerin insan sağlığı için risk oluşturmasında önemli bir faktördürler (EFSA, 2011, 2013; Geser ve ark., 2012; Hordijk ve ark., 2013). Gıdalar çeşitli yollar ile dirençli bakterilerle veya direnç genleri taşıyan bakteriler ile kontamine olabilirler. Bu yollardan ilki tarımsal ve hayvansal üretimde kullanılan antibiyotikler ile mevcut bakterinin direnç kazanması, ikincisi gıda işleme sırasında ilave edilen kültürlerde, probiyotiklerde ve bakteriyofajlarda direnç genlerinin bulunması ve son yol ise çapraz bulaşma ile gıda prosesine dirençli bakterilerin bulaşmasıdır (Verrae ve ark., 2013).

Aksoy ve ark. (2005), sığır rektal örneklerinden izole ettikleri 114 adet *E.coli* suşunda GSBL aktivitesi tespit edemez iken, bu suşların ampisiline karşı yüksek direnç gösterdiğini belirlemişlerdir.

Atabey (2011), 100 adet peynir örneğinden 11 adet *E.coli* suşu elde etmiş ve bu suşların 11 tanesinin penisiline (%100), 6'sının streptomisin (%55), 2'sinin amoksisilin-klavulanik asite (%18), 6'sının gentamisin (%55)'e dirençli ve tüm suşların enroflaksasine (%100) karşı duyarlı olduğunu bulmuştur.

Dolejska ve ark. (2011) tarafından iki farklı süt çiftliğinde yapılan çalışmada GSBL pozitif *E.coli* suşlarının varlığı, hem rektal swablarda hem de süt filtrelerinde araştırılmıştır. Sefalosporin kullanan çiftlikteki rektal swablarda %39 oranında, süt filtresinin birtanesinde (1/2) GSBL pozitif *E.coli* tespit edilirken, sefalosporin kullanmayan organik çiftlikte GSBL pozitif *E.coli* <%1'den az oranda saptanmış ve süt filtrelerinde ise tespit edilememiştir.

Avcı (2012), 15 adet çiğ süt örneğinden izole edilen 65 adet Enterobacteriaceae izolatının 16'sını *Enterobacter* spp. (%24,6), 14'ünü *Klebsiella* spp. (%21,5), 12'sini *Serratia* spp. (%18,5), 7'sini *Escherichia* spp. (%10,8), 5'ini *Hafnia* spp. (%7,7), 4'ünü *Citrobacter* spp. (%6,1), 3'ünü *Proteus* spp. (%4,6), 2'sini *Morganella* spp. (%3,1), 1'ini *Kluyvera* spp. (%1,5), 1'ini *Pantoea* spp. (%1,5) olarak tanımlamıştır. Bu suşların 12'sini (%18,5) GSBL pozitif bulmuştur. 15 adet peynir örneğinden izole edilen 61 adet Enterobacteriaceae üyesi izolatın ise 16'sını *Klebsiella* spp. (%26,2), 11'ini *Escherichia* spp. (%18), 10'unu *Enterobacter* spp. (%16,4), 6'sını *Hafnia* spp. (%9,8), 6'sını *Providencia* spp. (%9,8), 4'ünü *Serratia* spp. (%6,6), 4'ünü *Morganella* spp. (%6,6), 4'ünü *Proteus* spp. (%6,6), olarak tanımlanmış ve 10 (%16,4) suşu GSBL pozitif olarak tespit etmiştir.

Geser ve ark. (2012) gıda olarak tüketilen hayvanlardan aldıkları fekal örneklerde ve çiftlik toplama tankı çiğ süt örneklerindeki Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerde

ve mastitits etmeni *E.coli* suşlarında GSBL aktivitesini araştırmışlardır. Sığır örneklerinin %13,7 (17/124)'sinin, mastitis etmeni *E.coli* suşlarının ise %1,5 (1/67)'inin GSBL pozitif suşlar olduğunu tespit edilirken, 100 adet süt örneğinde GSBL pozitif bakteri tespit edilemediği bildirilmiştir.

Snow ve ark. (2012), Kuzey Batı İngiltere ve Kuzey Galler'deki 65 süt çiftliğinde 2009 Kasım ve 2010 Mart arasında CTX-M gen bölgesi içeren GSBL pozitif *E.coli* varlığını araştırmış ve çiftliklerin %58,8'inde (10/17) CTX-M gen bölgesine sahip GSBL pozitif *E.coli* tespit etmişlerdir. Ayrıca sefalosporin kullanılan çiftliklerde GSBL pozitif *E.coli* oranının 4 katına çıktığını belirlemişlerdir. Ayrıca hayvan atıklarının bir çukurda toplanmasının, beslenme ekipmanlarının seyrek temizlenmesinin ve açık sürü politikasında riski arttıran faktörler olduğunu bildirmişlerdir.

Elmacıoğlu (2013), Hatay'daki sığırlarda GSBL pozitif *E.coli* prevalansını araştırmıştır. Rektal örneklerin %8,3 (26/312)'ünde GSBL pozitif *E.coli* tespit etmiştir. GSBL pozitif izolatların tamamı sefotetan ve imipenem duyarlı, ampisilin (%100), seftriakson (%100), sefalotin (%96,2), sefaperozon (%88,5), streptomisin (%80,8), sulfametoksazol/trimetoprim (%76,9), tetrasiklin (%73,1), kloramfenikol ve kanamisin (%50), nalidiksik asit ve amoksisilin/klavulanik asit (%46,2), aztreonam (%38,5), siprofloksasin (%34,6), gentamisin (%11,5) ve sefoksitine (%3,8) dirençli olduğunu bulmuştur.

Japonya'da ise Ohnishi ve ark. (2013), 2007-2011 yılları arasında 258.888 mastitisli süt örneğinde 65 adet GSBL Enterobacteriaceae tespit etmişlerdir, en fazla CTX-M-2 gen bölgesi taşıyan *Klebsiella pneumoniae* ve CTX-M-15 geni taşıyan *Escherichia coli* türleri izole etmişlerdir.

Schmid ve ark. (2013) Almanya'da yaptıkları araştırmada, 45 farklı süt ve et çiftliğinden 598 örnek toplamışlardır. Bu örneklerin 196'sında (%32,8) GSBL pozitif *E.coli* tespit etmişlerdir. Ayrıca çiftliklerin %86,7'sinin GSBL pozitif *E.coli* ile kontamine olduğunu belirlemişlerdir.

Garcia-Migura ve ark. (2014) 2005 ile 2011 yılları arasında 9 Avrupa ülkesindeki antibiyotik tüketimini ve *Salmonella*, *E.coli*, *Campylobacter* spp. ve *Enterococcus* spp. gibi bakterilerde gelişen antibiyotik dirençlerini karşılaştırmışlardır. Sonuç olarak gözlenen direncin kullanılan antibiyotiklere göre değiştiği, veteriner uygulamalarının farklılığından dolayı bu değişimin ülkelere görede farklılık gösterdiğini, çiftlikte belirli bir süre antibiyotik kullanımının durdurulmasına rağmen direncin devam edebildiğini belirlemişlerdir. Direncin sadece sefalosporin kullanımı ile sınırlı olmadığını, hayvan türlerine göre antibiyotik

kullanımın izlenmesi ile mevcut direncin ilişkilendirilebileceğini bildirmiş ve direnç gelişimini en aza indirmek için müdahale stratejilerinin belirlenmesi gerektiğini ifade etmişlerdir (EFSA, 2011; 2013).

Khoshbakht ve ark. (2014), İran'daki çiğ peynir ve sütlerden izole edilen 150 adet *E.coli*'nin 57 (%38)'sini GSBL pozitif olarak bulmuşlardır. GSBL pozitif izolatlarda GSBL aktivitesinden sorumlu en az bir gen bölgesi tespit edilmiştir. En fazla görülen gen bölgesinin (%80) CTX-M geni olduğu belirlenmiştir.

Timofte ve ark. (2014), İngiltere'de mastitisli sütlerden izole edilen sefpodoksim dirençli 2 adet *E.coli* ve 3 adet *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* izolatlarının penicillin G, amoksilin-klavulonik asit, ko-trimoxazole, neomisin, streptomisin, tylosin, seftiofur ve sefquinome dirençli olduğunu bulmuşlar ve sadece framisetine duyarlı olduklarını tespit etmişlerdir. Ayrıca fenotipik olarak GSBL dirençleri doğrulanmıştır.

Valentin ve ark. (2014) Almanya da yaptıkları çalışmada, farklı hayvansal kaynaklardan GSBL aktivitesine sahip *E.coli* izolatları elde etmişlerdir. Bu izolatlar arasında antibiyotiklere en yüksek direnç gösterenlerin ineklerden elde edilen izolatlar olduğunu tespit etmişlerdir.

Öndeş (2015), 65 adet kırmızı et örneğinde Enterobacteriaceae familyasına ait *E. coli*, *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Kluyvera* spp, *Serratia* spp. ve *Moraxella* spp. cinslerini tanımlamış, 17 adet (%26,1) izolatta GSBL aktivitesi tespit etmiştir. GSBL aktivitesini en fazla *Citrobacter* (6 adet), *E.coli* (5 adet), ve *Enterobacter* (4 adet) türlerinde bulmuştur.

de Oca ve ark. (2015), sığır karkaslarından izole ettikleri 155 adet *E.coli*'nin 2 tanesinde doğrulanmış GSBL aktivitesi tespit etmişlerdir. Wasyl ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada 174 inekten aldığı rektal swap örneklerinde 24 adet *E.coli* izole etmişlerdir. Fakat bu izolatların hiçbirinde sefalosporin dirençli *E.coli* (ESC-cephalosporin resistant *E.coli*) tespit edememişlerdir. Lalak ve ark. (2016), 2012 yılında 57 sağlıklı ineğin rektal swap örneklerinin 4'ünde (%7,02) ESC izole etmişlerdir.

Pehlivanlar-Önen ve ark. (2015), Türkiye'de satılan kırmızı etlerde GSBL/AmpC beta-laktamaz aktivitesine sahip *E.coli* suşlarını araştırmışlar ve örneklerin %7'sinde GSBL/AmpC pozitif *E.coli* tespit etmişlerdir. Kırmızı etlerden izole edilen suşların sefuroksim, trimetoprim-sülfametaksazole ve nalidiksik asit'e %85,7; tetrasiklin ve streptomisin'e %100 direnç gösterdiğini, amikasin, imipenem ve sefepime duyarlı olduğunu saptamışlardır.

Santiago ve ark. (2015), Brezilya da 339 adet sublinik mastitisli süttten 356 adet

bakteri izole etmişlerdir. Bakterilerin %88,2'sinin gram pozitif (*S. aureus*), %11,8'inin gram negatif olduğunu, bunlarında %78'inin Enterobacteriaceae familyasına ait bakteriler olduğunu bildirmişlerdir. İzole edilen Enterobacteriaceae bakterilerinin dağılımını ise; *Proteus mirabilis* (%45,3), *E.coli* (%40,5), *Citrobacter freundii* (%4,8), *Serratia marcescens* (%4,8), *Serratia rubidae* (%2,4), *Enterobacter aerogenes* (%2,4) olduğunu rapor etmişlerdir. Bu izolatların %47,6'sında AmpC tipi beta-laktamaz aktivitesi tespit edilmiş ve %25'i doğrulanmıştır.

Yavaş (2015), çiğ süt örneklerinden 21 adet Enterobacteriaceae izole etmiştir. 21 izolatın 5'i *Escherichia* spp. (%23,8), 5'i *Klebsiella* spp. (%23,8), 5'i *Enterobacter* spp. (%23,8), 5'i *Serratia* spp. (%23,8), 1'i *Citrobacter* spp. (%4,8) olarak tespit etmiştir. Bu izolatların 4'ünde GSBL aktivitesi bulmuştur. Peynir örneklerinden izole edilen Enterobacteriaceae üyesi 14 izolatın 7'si *Escherichia* spp. (%50), 6'sı *Klebsiella* spp. (%42,9), 1'i *Morganella* spp. (%7,1) olarak tanımlanmış ve bu suşların 5'ini GSBL pozitif olarak tespit etmiştir.

Weiner ve ark. (2015), Polonya'da 650 adet mastitisli süttten izole edilen *E.coli* suşlarının 41'inde GSBL aktivitesi gösteren blaTEM geni tespit etmişlerdir.

Bassi ve ark. (2016), İtalya'da çiğ süt ve pastörize süttten yapılmış 6 farklı peynir örneğinde antibiyotik direnç riskini incelemiş, elde edilen 213 izolatın %17'sinin *E.faecalis*, %13'ünün *K.pneumoniae*, %9'unun *P.vulgaris* olduğunu tanımlamış ve izolatların %35'inde ampR geni olduğunu tespit etmişlerdir.

Ibrahim ve ark. (2016), İngiltere'deki bir süt çiftliğinin farklı bölgelerinden izole ettiği 126 *E.coli* izolatının antibiyotik direnç profillerini incelemişler, izolatların %56,3'ünün ampisiline yüksek direnç gösterdiğini, %1,6'nın imipenem'e direnç gösterdiğini belirlemişler, 53 izolatın da GSBL aktivitesi gösterdiğini saptamışlardır.

Nyugen ve ark. (2016), Vietnam'da yaptıkları araştırmada gıda dağıtım sistemlerinde GSBL ve AmpC aktivitesine sahip *E.coli* yaygınlığını araştırmışlardır. Kırmızı etlerin %34,3'ünde (18/74) GSBL/AmpC pozitif *E.coli* suşları izole etmişlerdir. Slaman ve ark. (2010) Tunus'taki kırmızı et ürünlerinde ise GSBL pozitif *E.coli*'yi %7,14 (1/14) oranında izole etmişlerdir.

Seni ve ark. (2016), Tanzania Mwanza'da 100 ineğin 14'ünde GSBL aktivitesine sahip *E.coli* saptamışlardır.

Stephan (2016) ve Liebana ve ark. (2012), GSBL/AmpC aktivitesine sahip Enterobacteriaceae'ya ait bakterilerin yayılımında gıda zincirinin önemli bir ileti yolu olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca sağlıklı hayvanlarında taşıyıcı olabileceğini ve bu dirençli

bakterilerin yayılımının kromozomlardan çok plazmidlerden kaynaklandığını ve genlerin integronlar, ekleme dizileri, transpozonlar ve plazmidler tarafından aktarıldığını bildirmişlerdir. Yine bu genlerin en fazla *E.coli* ve *Salmonella* türlerinde belirlendiğini ifade etmişlerdir (EFSA, 2011, 2013).

2.8. İnsanlarda, Hayvanlarda ve Gıdalarda Antibiyotik Direncine Karşı Alınan Önlemler

İnsanoğlu antibiyotikler ile 1940'lı yıllarda enfeksiyon hastalıkların kontrolünde tanışmıştır. 1950'lerde ise insanlarda kullanımına izin verilen antibiyotikler hayvan hastalıklarında kullanılmıştır. Ayrıca antibiyotikler gıda olarak tüketilen hayvanlarda antimikrobiyal büyüme promotörleri (AGP) adı altında yaygın olarak kullanılmıştır. 1990'larda bu aşırı ve bilinçsiz kullanım antimikrobiyal direnç olarak alarm vermeye başlamıştır (EC, 2006; Wielinga ve ark., 2014).

Büyüme teşviki için kullanılan AGP'leri ilk önleyen ülke 1986 yılında İsveç olmuştur. 1995 yılında da Danimarka avaparsin'i yasaklamakla başlayarak 1998 tüm AGP'leri yasaklamıştır. Sonrasında İngiltere AGP kullanımlarına kısıtlamalar getirmiş ve farklı Avrupa ülkelerinde zamanla AGP'ler bir bir yasaklanmıştır (Dibner ve Richards, 2005; Wielinga ve ark., 2014).

İngiltere'de Gıda Mikrobiyolojik Güvenliği Danışma Komitesi (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food-ACMSF, UK) antibiyotik dirençli mikroorganizmaların 1996 yıllarından başlayarak gıda zincirine girdiğini bildirmiştir. ACMSF'nin 2007 yılındaki raporunda (ACM/868) gıdalardaki bakterilerdeki antibiyotik direncinin kontrol edilmesi amacıyla hükümet tarafından bir takım düzenlemelere ihtiyaç olduğu belirtilmiştir. Avrupa komisyonu (EU) tarafından ise 2001 yılında antibiyotiklerin hayvanlarda tıbbi olmayan kullanımı için araştırmalar başlatılmıştır (Forsythe, 2013). 2006 yılında tüm AB ülkelerinde ve ülkemizde de kanatlı hayvanlar hariç yemlerde katkı maddesi olarak antibiyotik kullanımı yasaklanmıştır (Anonim, 2006b; Erhan, 2015). Birçok sağlık ve araştırma kuruluşu tarafından kısıtlamalar önerilmesine rağmen Amerika ve Kanada gibi ülkelerde hayvan ihracatında ticari kaygılar nedeniyle, herhangi bir yasak söz konusu değildir (Marshall ve Levy, 2011; FDA, 2012; Maron ve ark. 2013).

Ülkemizde antibiyotik direncini önlemek amacıyla hem insan hem de veterinerlikte bir takım tedbirler alınmaya ve stratejiler belirlenmeye çalışılmaktadır (Akalin, 2011; Aksoy, 2014). 1985 yılında WHO tarafından akılcı ilaç kullanımının (AİK) tanımı yapılmış olup, ülkemizde de 2010 yılında İlaç Eczacılık Genel Müdürlüğü'nde AİK şube müdürlüğü

kurulmuş ve 2014-2017 Eylem planı yürürlüğe girmiştir (Aksoy, 2014). Ayrıca 2010 tarihinde Hıfzıssıhha Mektebi Müdürlüğü'nde Reçete Değerlendirme Projesi (RDP) ile AİK'in yaygınlaştırılması amaçlanmıştır. 2013 tarihinde de tüm sağlık kurumlarında e-reçete uygulamasına geçilmiştir. Böylece hekimler, ilaçlar, iller, hastaneler denetim altına alınmıştır.

“Antibiotic Use in Eastern Europe: A cross-national database study in coordination with the WHO Regional Office for Europe.” tarafından yapılan çalışmada en yüksek tüketim değerlerine sahip ülke, 1000 kişi başına düşen günlük ilaç dozu (DID) 42,28 ile Türkiye olmuştur (Aksoy, 2014). Yine Türkiye Halk Sağlığı Kurumu (THSK) koordinasyonunda “Ulusal Antimikrobiyal Direnç Sürveyans Sistemi (UAMDSS)” kurulmuş, 35 üniversite hastanesi, 19 eğitim ve araştırma hastanesi ve 29 devlet hastanesi olmak üzere değişik bölgelerden seçilmiş toplam 77 hastane sürveyansa dâhil edilmiştir. 2011 yılından itibaren veriler toplanarak WHO'nun WHONET yazılım programı ile işlenmektedir. Ayrıca 2013 yılında UAMDSS, WHO tarafından EU üyesi olmayan Orta Asya ve Doğu Avrupa ülkeleri için kurulan CAESAR'a da üye olmuştur (Şimşek, 2014).

Veteriner hekimlikte ise birçok EFSA, FDA gibi kurumlar tarafından raporlar yayınlamış ve raporlarında hayvanlarda kullanılan antibiyotiklerin hayvanlarda ve mikroorganizmalarda direnç gelişimine neden olduklarına ve bu dirençlerin insan sağlığını tehdit ettiğine yer vermişlerdir (EFSA, 2011; FDA, 2012; Forsythe, 2013).

Bu konudaki ilk çalışma Danimarka'da 1995 yılında çiftlik hayvanlarında antibiyotik direnci izlenmesi için “Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Program” (DANMAP) programı ile yapılmaya başlanmıştır. Bu sistemden üç yıl sonra insanlarda belirlenen antibiyotik direnç raporları ile antibiyotik kullanımı ile ilgili kısıtlamalar başlamıştır (Cogliani ve ark., 2011). 1996 yılında FDA (Food and Drug Administration) ve USDA (U.S Department of Agriculture, and the Centers for Disease Control and Prevention) “The National Antimicrobial Resistance Monitoring System” (NARMS)'ı kurmuştur (McEwen ve Fedorka-Cray, 2002; Maron ve ark., 2013).

1999'da Hollanda, “Monitoring of Antimicrobial Resistance and Antibiotic Usage in Animals in the Netherlands” (MARAN), Almanya 2008'de “Deutsche Antibiotika-Resistenzstrategie” (DART) ile antimikrobiyal direnci izleyen stratejileri hayata geçirmiş ve GERM-Vet, MedVet-Staph, Resistance in Enterobacteriaceae (RESET) programları ile izlemeye almıştır (Cogliani ve ark., 2011; Maron ve ark., 2013) Kanada ise “The Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance” (CIPARS), Japonya'da “The Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System” (JVARM), İsveç'te

“Use of antimicrobials and occurrence of antimicrobial resistance” (SWEDRES/SVARM), İngiltere’de “Veterinary Medicines Directorate surveillance” (VMD) izleme programları hayata geçirilmiştir (Maron ve ark., 2013). Ülkemizde ise veteriner hekimlikte herhangi bir izleme programı bulunmamaktadır (Taşçı, 2016).



BÖLÜM 3

MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Örnekler

Çiğ süt ve klasik inek peyniri üretim aşamalarından alınan örnekler Çanakkale'nin Yenice ilçesinde faaliyet gösteren mandıra tipi küçük ölçekli süt işletmesinden ve bu işletmenin müstahsillerinden toplanmıştır. Örnek sayıları ve yerleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Örnekleme noktaları

Örnekleme Tarihi	Örnekleme Alanları	Örnek Alınan Müstahsil Sayısı
06.10.2015	Çakıroba Köyü	16
02.11.2015	Yenice Merkez	25
24.11.2015	Seyvan Köyü	31
01.12.2015	Bekten Köyü	29
19.10.2015		
10.11.2015	İşletme	8 (Süt Toplama Tankı), 10 (Üretim noktası)
17.11.2015		
25.04.2016	Çakıroba Köyü	15
13.06.2016	Bekten Köyü	20
20.06.2016	İşletme	9 (Süt Toplama Tankı), 10 (Üretim noktası)
TOPLAM	136 Müstahsil, 17 Süt Toplama Tankı ve 20 üretim noktası	

Çiğ süt örnekleri müstahsillerin sağılmış sabah sütlerinden alınmıştır. Çiğ süt örnekleri süt güğümlerinden aseptik şartlarda tek kullanımlık 200 mL'lik plastik kaplara alınmıştır. İşletme örnekleri ise işletme süt kabul bölgesine gelen köy tanklarından başlayarak aşağıda belirtilen noktalardan yaklaşık 250 mL/250 g olacak şekilde alınmıştır.

Örnekleme alanları;

1. Köy çiğ süt toplama tankından,
2. İşletme çiğ süt kabul tankından,
3. Isıl işlem uygulanan süt,

4. Peynir teknesine gelen plastik boru çıkışındaki süttten,
5. Peynir teknesi içindeki pastörize süttten,
6. Peynir teknesindeki mayalama sonrası pıhtıdan,
7. Peynir teknesindeki mayalama sonrası baskıdan çıkan tuzsuz peynirden,
8. Peynir teknesinde bir gece salamurada bekletilmiş peynirden,
9. Tenekelere aktarılan peynirden,
10. 3 ay olgunlaştırılmış peynirden.

3.1.2. Bakteri Kültürleri

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Mikrobiyoloji Laboratuvarı kültür koleksiyonundan temin edilmiştir. GSBL pozitif *K. pneumoniae* ATCC 700603, GSBL negatif *E. coli* ATCC 25922 suşları kontrol suşu olarak kullanılmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Örneklerin Fiziksel Özellikleri

Çiğ süt örneklerinde elektrik iletkenliği (Eİ) ve pH özellikleri pH-iletkenlik ölçer (Hanna Combo HI98129, Almanya) ile belirlenmiştir. Örneklerin donma noktası (DN) ise Krioskop (Funke Gerber- Cryostar 7160, Almanya) ile ölçülmüştür.

3.2.2. Örneklerin Kimyasal Özellikleri

Çiğ Süt örneklerinin yağ, laktoz, protein, kurumadde oranları belirlenmiştir. Ölçümler Lactostar (Funke Gerber-3560, Almanya) cihazı ile yapılmıştır.

3.2.3. Subklinik Mastitis Bulgusunun Araştırılması

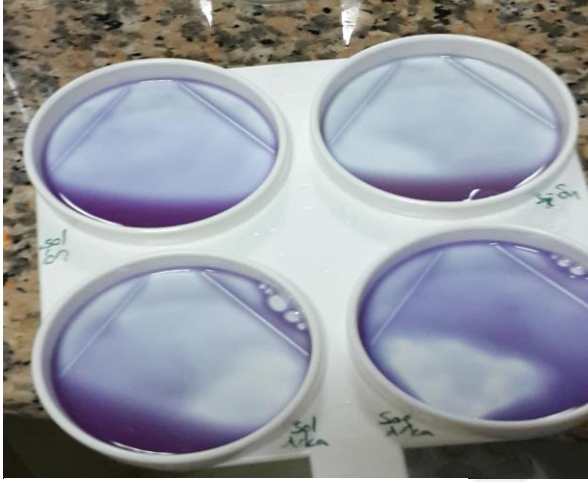
3.2.3.1. Somatik Hücre Sayısı

Çiğ süt örneklerinin somatik hücre sayısı (SHS) NucleoCounter cihazı (Chemometec SCC100, Danimarka) ile ölçülmüştür.

3.2.3.2. California Mastitis Testi

Çiğ süt örneklerinde subklinik mastitis olgusu California mastitis testi (CMT, Gerber, Almanya) ile araştırılmıştır. CMT çiğ sütteki SHS'ını indirekt olarak tespit eden, lökosit artışı ve miktarını hafif çökeltiden yoğun jel kıvamına kadar oluşan değişim ile belirleyen

bir testtir (Şekil 3.1). Test kabına 1 mL çiğ süt, 1 mL California mastitis test solüsyonundan ilave edilmiştir. 1-2 dakika dairesel hareketlerle karıştırılarak oluşan çökelti Çizelge 3.2'deki CMT değerlendirme tablosuna göre değerlendirilmiştir (Riştvanlı ve Kalkan, 2002; Timurkan, 2014).



Şekil 3.1. CMT testinin yapılış şekli

Çizelge 3.2. CMT değerlendirme tablosu

Değerlendirme	Çökeltme
Negatif	-
İz miktarda pozitif	+
Zayıf pozitif	++
Pozitif	+++
Güçlü Pozitif	++++

3.2.4. Örneklerin Mikrobiyolojik Özellikleri

3.2.4.1. Dilüsyonların Hazırlanması

Çiğ süt ve üretim hattından alınan süt örneklerinden 10 mL, pıhtı ve peynir örneklerinden ve 10 g örnek alınarak 90 mL'lik %0,1'lik peptonlu suda stomacher torbasına aktararak homojenize edilmiştir. 10^{-1} 'lik dilüsyon oluşturulmuştur. Daha sonra peptonlu su ile diğer desimal dilüsyonlar hazırlanmıştır.

3.2.4.2. Aerobik Mezofilik Bakteri Sayımı

Tüm örneklerin aerobik mezofilik bakteri sayısı hazırlanan dilüsyonlardan Plate Count Agar (PCA, Merck, Almanya) besiyerine dökme plak yöntemiyle ekim yapılarak belirlenmiştir. Ekim yapılan petripler sonra 35°C'de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda oluşan koloniler sayılarak hesaplanmıştır (Maturin ve Peeler, 2001).

3.2.4.3. Toplam Koliform ve *E.coli* Sayımı

Tüm örnekler hazırlanan uygun dilüsyonlardan Fluorocult Violet Red Bile Agar (F-VRBA, Merck, Almanya) besiyerine çift tabaka dökme yöntemine göre ekim yapılarak 37 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrasında besiyerinde pembe mukoid koloniler sayılarak toplam koliform sayısı hesaplanmıştır. *E.coli* varlığı ise 24 saatlik inkübasyon sonrasında ultraviyole ışık altında (Merck 113203, Almanya) floresan veren koloniler sayılarak belirlenmiştir (Dağdemir ve Özdemir, 2006).

3.2.4.4. *E.coli* O157 Varlığını Araştırılması

Tüm örneklerden 25 mL alınarak 225 mL novobiosin katkılı Tryptic Soy Broth (mTSB, Merck, Almanya) içeren erlenlere aktarılmış, 37 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır (Çiçek, 2008; Aydın ve ark., 2010). 24 saatlik inkübasyon sonrası mTSB besiyerlerinden 0,1 mL alınarak sefiksim tellürit (Merck, Almanya) içeren Sorbitol MacConkey (CT-SMAC, Merck, Almanya) agar plaklarına yayma plak yöntemi ile aktarılmıştır. Plaklar 37 °C’de 24 saat inkübe edildikten sonra şeffaf koloni varlığı kontrol edilmiştir. CT-SMAC agar plaklarında 24 saatte gelişme gözlenmeyen örneklerin 48. saate uzatılan mTSB kültürlerinden tekrar CT-SMAC agar plaklarına ekim yapılarak şeffaf koloni varlığı araştırılmıştır (Zhao ve ark., 1995; Çiçek, 2008; Feng ve ark, 2016). CT-SMAC besiyerinde gelişen şeffaf koloniler Nutrient Agar (NA) plaklarına çizilerek 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası gelişen kolonilere morfolojik, biyokimyasal tanımlama testleri ve O157 lateks aglutinasyon testi uygulanmıştır (Yeşilyurt, 2010; Feng ve ark, 2016).

3.2.4.4.1. İzolatların O157 Olduğunun Latex Aglutinasyon Testi ile Doğrulanması

CT-SMAC besiyerinde oluşan şeffaf koloniler NA’da saflaştırıldıktan sonra morfolojik ve biyokimyasal testleri ile *E.coli* O157 şüpheli olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu izolatlara O157 latex aglutinasyon testi (Biolife, İtalya) uygulanmıştır. Reaksiyon kartında yer alan her iki daireye serum fizyolojikten (%0,85 NaCl) 1 mL damlatıldıktan sonra 24 saatlik taze kültürden 2-4 koloni alınmıştır. Test kartındaki her iki daire içerisinde kültürler partikül kalmayacak şekilde süspansiyon edilmiştir. Karttaki halkalardan birine bir damla pozitif kontrol solüsyonu diğerine ise test solüsyonu damlatılmıştır. Öze yardımı ile süspansiyonlar 60 saniye boyunca karıştırılmıştır. Karıştırma esnasında test daireleri

içerisinde çökme görülmesi O157 pozitif olarak değerlendirilmiştir (Feng ve ark, 2016).

3.2.5. GSBL Şüpheli Enterobacteriaceae İzolasyonu

Hazırlanan dilüsyonlardan sefotaksimli (2 µg/mL) MacConkey (C-MAC) ve sefotaksimli (2 µg/mL) Eosin Metilen Blue Agar (C-EMB) besiyerlerine 0,1 mL aktarılarak yayma plak yöntemine göre ile ekim yapılmıştır. Petriler 37 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası üreme olan plaklardaki kolonilerden ve Fluorocult Violet Red Bile (F-VRB) agarda üreyen Enterobacteriaceae olduğu düşünülen farklı morfolojideki kolonilerden alınarak HiCrome ESBL (HiMedia, Hindistan) agara tek koloni düşürme yöntemine göre çizilerek ekim yapılmıştır. HiCrome ESBL agar plakları 37 °C’de 24-48 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası HiCrome ESBL agar plaklarında gelişen koloniler GSBL şüpheli Enterobacteriaceae olarak değerlendirilmiştir. GSBL şüpheli bu kolonilerin Enterobacteriaceae ailesinden olup olmadıklarını araştırmak için alınan izolatlarda tanımlama işlemine devam edilmiştir.

3.2.6. GSBL Şüpheli İzolatların Tanımlanması

GSBL şüpheli izolatlar NA’ a tek koloni düşürme yöntemine göre çizildikten sonra 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası tek düşen koloniler Çizelge 3.3, 3.4, 3.5 ve 3.6’te verilen fenotipik özelliklere göre tanımlanmıştır (Anonim, 2004; UMS, 2015).

Çizelge 3.3. *Enterobacteriaceae* familyasına ait bazı morfolojik ve biyokimyasal özellikler

	Oksidaz	Hareket	Gram	Şekil	Katalaz
Enterobacteriaceae	-	+/-	-	Çubuk	+

Kaynak: (Cullimore, 2000)

Çizelge 3.4. *Enterobacteriaceae* familyasına ait bazı cinslerin biyokimyasal özellikleri I

	Sitrat kullanımı	H ₂ S üretimi	Hareketlilik
<i>Escherichia</i>	-	-	+
<i>Edwardsiella</i>	-	+	+
<i>Citrobacter</i>	+	+/-	+
<i>Salmonella</i>	+	+/-	+
<i>Shigella</i>	-	-	-

Kaynak: (Cullimore, 2000)

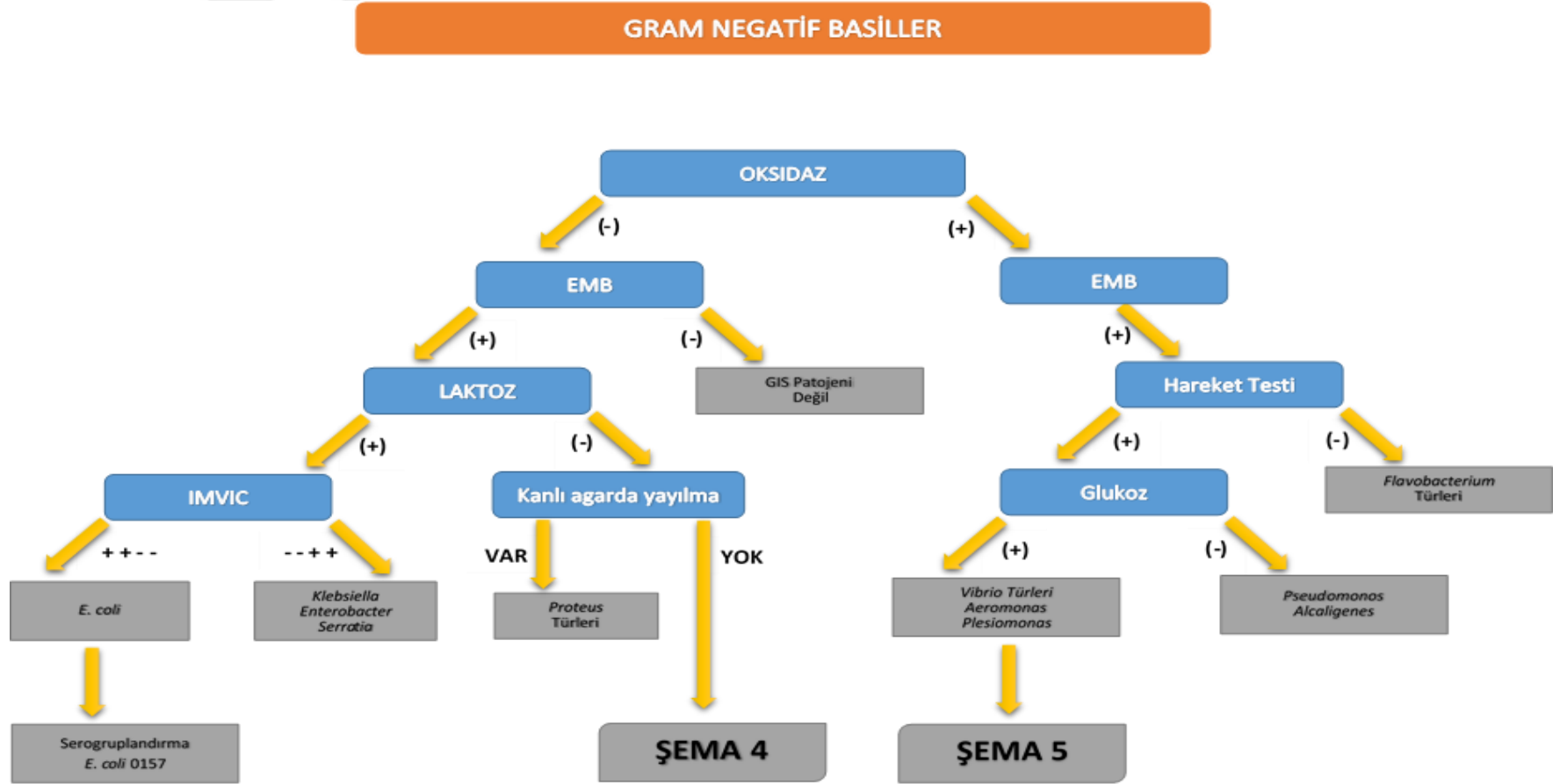
Çizelge 3.5. *Enterobacteriaceae* familyasına ait bazı cinslerin biyokimyasal özellikleri II

	Sitrat kullanımı	İndol üretimi	Hareketlilik
<i>Enterobacter</i>	+	-	+
<i>Serratia</i>	+	+	+
<i>Klebsiella</i>	+	+/-	-
<i>Hafnia</i>	-	-	+

Kaynak: (Cullimore, 2000)

Çizelge 3.6. Gram negatif basillerin tanımlama tablosu (UMS, 2015)

37



3.2.6.1. Gram Boyama

NA'da gelişen koloniden bir öze dolusu kültür alınarak temiz bir lam üzerinde belirli bir alana yayılmıştır. Preparat havada kurutulduktan sonra üç kez alevden geçirilerek sabitleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Preparat kristal viole çözeltisi ile 2-3 dakika boyanmıştır. Boya dökülerek distile su ile yıkanmış, iyot çözeltisi ile 1-2 dakika boyanmıştır. Yine aynı şekilde boyanın fazlası dökülerek distile su ile yıkanmıştır. Preparatın üzerine damla damla alkol çözeltisi damlatılmıştır. Distile su ile yıkama işleminden sonra safranin çözeltisi ile 30 saniye boyandıktan sonra preparat distile su ile yıkanarak kurutulmaya bırakılmıştır. İmmersiyon objektifinde incelenerek Gram negatif ve basil, kokobasil şeklindeki bakteriler Enterobacteriaceae ailesi üyesi olarak değerlendirilmiştir (Ünlütürk ve Turantaş, 2003; Güven ve Zorba, 2011).

3.2.6.2. Oksidaz Testi

Oksidaz testi, sitokrom oksidaz enzimi üretimin gösterilmesini sağlamaktadır. NA'da üreyen 24 saatlik kolonilerden steril swab ile, temiz bir filtre kağıdı üzerine sürülerek, bir damla %1'lik oksidaz ayırıcından (TMpPD, N, N, N', N'-tetra-metil-p-fenilen diamine dihidroklorid) damlatıldıktan sonra 10-15 saniye içerisinde kolonilerin koyu mor renge dönüşmesi oksidaz pozitif, dönüşmemesi oksidaz negatif olarak değerlendirilmiştir (UMS, 2015).

3.2.6.3. Biyokimyasal Testler

Enterobacteriaceae ailesi üyesi olarak değerlendirilen izolatların cins düzeyinde tanımlanması için İndol, Metil red, Voges proskauer, Sitrat (IMViC) testleri ve ayrıca hareketlilik, H₂S üretimi ve karbonhidrat fermantasyon testi vb. gibi biyokimyasal testler uygulanmıştır (UMS,2015).

3.2.6.3.1. İndol Oluşumu, Hareket Testi ve H₂S Üretimi

Sülfat, İndol, Motility Medium (SIM) agar kullanılarak Enterobacteriaceae izolatlarının hidrojen sülfür (H₂S), indol meydana getirebilme durumları ve hareket yeteneklerinin varlığı test edilmiştir. İndol, triptofanın bakterileri tarafından oluşturulan triptofanaz enzimi ile hidrolize uğratılması ile oluşmaktadır. İndol testi triptofanaz enziminin bakteride varlığını gösterir. 37 °C'de 24 saat inkübe edilen besiyerine kovacs (Ehrlich, Merck, Almanya) ayırıcı ilave edildikten sonra, meydana gelen indol, reaktifin içerisindeki

benzaldehit ile reaksiyona girerek üst kısımda kırmızı halka oluşumunu sağlar. Kırmızı/pembe renk pozitif aksi durum ise negatif olarak yorumlanmıştır.

Bazı bakteriler 'kamçı' olarak isimlendirilen hareket organellerine sahiptirler. Hareketlilik testi bakterilerin hareketini gösterilmesi amacıyla kullanılır. Hareketlilik testi yarı katı SIM agara batırma kültür şeklinde yapılan ekimde 37 °C de 24-48 saat inkübasyon sonrası mikroorganizmaların çizgi boyunca üremesi hareketsizlik, ekim çizgisinin etrafına veya kenarlarına yayılması ise hareketlilik olarak değerlendirilmiştir.

Bazı mikroorganizmalar metabolizmaları esnasında H₂S (hidrojen sülfür) meydana getirebilirler, oluşan H₂S'in besiyeri ortamındaki demir ile reaksiyonu sonucu siyah renk oluşumu H₂S üretimi varlığını göstermektedir. Yarı katı olan SIM agarın bulunduğu tüpte siyah renk oluşumu H₂S üretiminin pozitif olduğu aksi durum ise negatif olarak değerlendirilmiştir (Önlen, 2013; UMS, 2015).

3.2.6.3.2. Metil Red Testi - Voges-Proskauer Testi

Metil Red-Voges Proskauer (MR-VP, Merck, Almanya) Broth besiyerine ekimi yapılarak izolatların hem metil kırmızısı (MR) hem de voges-proskauer testi yapılmıştır. MR testi mikroorganizmaların glikoz fermentasyonu sonucu meydana gelen pürvik asitten son ürün olarak laktik asit, asetik asit veya formik asit gibi asitleri meydana getirip getirmediğini göstermektedir. Besiyerindeki asitlerin ortam pH'ını 4,5 ve daha düşük seviyeye indirmesi ile metil red'in rengi sarıdan kırmızıya doğru değişmektedir.

VP testi ise bakterinin glikoz fermentasyonu sonrası pürvik asitten butilen-glikol yolunu kullanarak asetoin (asetil metil karbonil) ve butandiol nötr son ürünleri oluşumunu tespit etmek için kullanılmaktadır. Ortamdaki asetoin %40'lık KOH, alfa naftol ve atmosferik oksijen varlığında oksitlenerek diasetil'e dönüşür ve kırmızı renkli bir kompleks oluşumu pozitif olarak değerlendirilir (UMS, 2015).

5 mL'lik MR-VP broth besiyeri içeren tüplere inoküle edilen izolatlar 35-37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası kültür süspansiyonu içeren tüplerden birisine 2-3 damla metil kırmızısı indikatörü damlatılarak pozitif tüplerde kırmızı renk oluşumu gözlenmesi beklenir, negatif izolatların inkübasyonları 4. güne kadar uzatılmıştır. VP testi için ise diğer 5 mL MR-VP broth içerisindeki kültüre önce 0,6 mL %5'lik alfa naftol ayıracından ve hemen arkasından 0,2 mL Potasyum hidroksit (KOH) ayıracından damlatılarak hava ile temas etmesi için çalkalandıktan sonra dik olarak 30 dakika bekletilerek kırmızı rengin oluşması pozitif şeklinde değerlendirilmişken aksi durum negatif olarak değerlendirilmiştir. Negatif izolatların kültürleri 2 gün daha inkübe edilerek analiz

tekrarlanmıştır (Önlen, 2013; UMS, 2015).

3.2.6.3.3. Sitrat Testi

Bazı mikroorganizmalar sitratı tek enerji (karbon) kaynağı olarak kullanmaktadırlar. Sitrat testi bakterilerin sitratı kullanma durumunu belirlemek amacıyla uygulanır. Sitrat testinde Simmons Citrate besiyeri (Biolife, İtalya) kullanılmıştır. Sitrat ve nitrojen kaynağı olarak amonyum tuzları içeren besiyerinde mikrobiyal metabolizma sonucu artan alkali ürünler (amonyak) indikatör madde olan bromtimol mavisi pH'ın yükselmesi (pH>7,6) ile besiyerinin mevcut renginin yeşilden maviye dönmesine neden olmaktadır. Analiz 24 saatlik taze ve saf bakteri kültürlerinden alınarak, yatık Simmons Citrate besiyerine ekim yapılması ve 37 °C'de 24 saat inkübe edilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Sitratı kullanan bakteriler besiyerinde mavi renk oluşturmuş (pozitif), aksi durumda besiyerinin rengi yeşil kalmıştır (negatif). Negatif tüplerin inkübasyonu 72. saate kadar uzatılmıştır (UMS, 2015).

3.2.6.3.4. Karbonhidrat Oksidasyon ve/veya Fermentasyon (O/F) Testi

Bakteriler karbonhidratları oksidatif (aerob) ve fermentatif (anaerob) yollardan birisini veya her ikisi ile kullanma özellikleri gösterirler. Karbonhidratların kullanımı sonucu organik asitler, nötral ürünler ve oksijen, hidrojen, metan ve karbondioksit gibi gazlar oluşmaktadır. Karbonhidratların kullanım şekillerinin belirlenmesi amacı ile Hugh-Leifson Glucose Broth (Ek-1) besiyeri kullanılmıştır. Glikozun oksidatif/fermentatif kullanımı besiyeri içerisinde oluşan asit ürünlerin indikatör olarak kullanılan bromtimol mavisinin rengini maviden sarıya değiştirmesi ile belirlenmiştir. Fermentatif kullanım için besiyerinin üzeri sıvı parafin ile kapatılarak anaerobik ortam sağlanmıştır. 37 °C 24-72 saat inkübasyona bırakılmıştır (UMS, 2015).

3.2.6.3.5. API 20E

GSBL aktivitesi doğrulanmış Enterobacteriaceae izolatları %5 koyun Kanlı Agar (Merck, Almanya)'da 37 °C 24 saat geliştirilerek oluşan kolonilerden API 20E (BioMerieux, Fransa) test kiti prosedürü doğrultusunda ekim yapılarak tanımlanmıştır (Dallenne ve ark., 2010).

3.2.7. Antibiyotik Duyarlılık Testleri

Enterobacteriaceae olarak tanımlanan izolatların antibiyotik duyarlılıkları Ulusal Antimikrobiyal Duyarlılık Prosedürüne göre Kirby-Bauer disk difüzyon testi ile yapılmıştır (UMS, 2015). %5'lik kanlı agarda 18-24 saatlik tek düşmüş koloniler inokülüm hazırlanmasında kullanılmıştır. 2-3 koloni alınarak steril serum fizyolojik su içerisinde 0,5 Mc-Farland bulanıklığına eşdeğer süspansiyon haline getirilmiştir. Bulanıklık DEN-1 Mc-Farland densistometresi (Cambridge Ltd, İngiltere) ile ölçülmüştür. 0,5 Mc-Farland bulanıklığındaki süspansiyondan steril eküvyon ile Müller Hinton Agar (MHA, Merck, Almanya) plaklarına ekim yapılmıştır. Bakteri süspansiyonun plak tarafından absorbe edilmesinden sonra plak üzerine uygun mesafelerde antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. Antibiyotik diskleri yerleştirilen plaklar 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakılmıştır. 24 saat sonra antibiyotik disklerin zon çapları digital kumpas (PM, Çin) ile ölçülmüştür.

3.2.7.1. GSBL Tarama Testi

GSBL beta-laktamaz üretiminin varlığının araştırılması için aşağıdaki tabloda yer alan dozlarda sefpodoksim, seftazidim, aztreonam, sefotaksim ve seftriakson antibiyotik diskleri kullanılmıştır. Avrupa Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri Komitesi (EUCAST, 2013)'sinde ve Klinik ve Laboratuvar Standartları Kurumu (CLSI 2011)'nda belirtilen Çizelge 3.7'da gösterilen zon çaplarına göre yorumlanmıştır. EUCAST ve CLSI değerleri karşılaştırılmıştır.

Çizelge 3.7. CLSI ve EUCAST dokümanlarına göre Enterobacteriaceae için bazı sefalosporinlerin sınır değerleri

EUCAST				CLSI		
Antibiyotik	Kod	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)	Kod	Disk İçeriği	Zon Çapı (mm)
Sefpodoksim	CPD10	10 µg	<21	CPD10	10 µg	≤17
Seftazidim	CAZ10	10 µg	<22	CAZ30	30 µg	≤22
Aztreonam	-	-	-	ATM30	30 µg	≤27
Sefotaksim	CTX5	5 µg	<21	CTX30	30 µg	≤27
Seftriakson	CRO30	30 µg	<23	CRO30	30 µg	≤25

Kaynak (UMS, 2015)

3.2.7.2. GSBL Doğrulama Testi

GSBL beta-laktamaz aktivitesinin olduğu tespit edilen Enterobacteriaceae izolatlarında GSBL aktivitesinin doğrulaması için EUCAST (2013)'te belirtilen antibiyotik diskleri kullanılarak Kombinasyon Disk Difüzyon Testi (KDT) uygulanmıştır. Çizelge 3.8'deki kombinasyon diskleri çevresindeki zon, tek başına sefalosporin içeren diskin inhibisyon zonuna kıyasla > 5 mm daha geniş ise test pozitif olarak kabul edilmiştir.

Çizelge 3.8. GSBL tarama testinde pozitif olan Enterobacteriaceae için kullanılan GSBL doğrulama yöntemi

Yöntem	Antimikrobiyal ajan (disk içeriği)	GSBL doğrulama kriteri
Kombinasyon disk difüzyon testi (KDT)	Sefotaksim (30 µg)	İnhibisyon zonunda \geq 5 mm artış
	Sefotaksim (30 µg) + klavulanik asit (10 µg)	
	Seftazidim (30 µg)	
	Seftazidim (30 µg) + klavulanik asit (10 µg)	

Kaynak (UMS, 2015).

3.2.7.3. AmpC Tanımlama Testi

Tüm Enterobacteriaceae izolatlarında indüklenebilen AmpC aktivitesinin belirlenmesinde Disk Yaklaşım Tekniği uygulanmıştır. Plak merkezine 30 µg seftazidim diski yerleştirilmiştir. Merkezden 20 mm uzaklıklarda 10 µg imipenem, 30 µg sefoksitin ve 20/10 µg amoksisilin- klavulanik asit diskleri yerleştirilerek 35 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası seftazidim diski ile diğer diskler arasında bir körleşme veya düzleşme olması AmpC üretimi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tan ve ark., 2009; Gupta ve ark., 2014).

3.2.7.4. AmpC Doğrulama Testi

AmpC aktivitesinin tespit edildiği Enterobacteriaceae izolatlarında AmpC aktivitesinin doğrulaması kloksasilin ile çift disk sinerji testi ile yapılmıştır. CLSI'nin önerisine göre 500 µg kloksasilin ihtiva eden diskten merkezden merkeze 2,5 cm mesafede olacak şekilde seftazidim 30 µg ve sefotaksim 30 µg diskleri yerleştirilmiştir. 35 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası sefalosporinlerden herhangi birinin kloksasiline doğru görülen zon genişlemesi AmpC varlığı olarak değerlendirilmiştir (Mirelis ve ark., 2006; Coşkun ve Altanlar, 2012a).

3.2.7.5. AmpC'ye Bağlı GSBL Negatifliğini veya GSBL'ye Bağlı AmpC Negatifliğini Ortadan Kaldırılması

GSBL ve/veya AmpC negatif bulunan Enterobacteriaceae izolatlarında AmpC'ye bağlı yanlış GSBL negatifliğini veya GSBL'ye bağlı yanlış AmpC negatifliğini ortadan kaldırmak için boronik asit-klavulanik asit (BA-CA) yöntemi kullanılmıştır. Yönteme göre 0,5 McFarland bakteri süspansiyonunun inoküle edildiği MHA plaklarına Çizelge 3.9'de verilen antibiyotik diskleri yerleştirilmiştir. 35 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldıktan sonra zon çapları değerlendirilmiştir. Sefalosporin + CA+ BA diski etrafındaki inhibisyon zon çapının, sefalosporin + CA diski etrafındaki inhibisyon zon çapından ≥ 5 mm olduğunda, test edilen izolatta fenotipik olarak pAmpC beta-laktamaz olduğu kabul edilmiştir. Sefalosporin + BA+ CA diski etrafındaki inhibisyon zon çapının, sefalosporin + BA diski etrafındaki inhibisyon çapından ≥ 5 mm olması durumunda, test edilen izolatin fenotipik olarak GSBL pozitif olduğu kabul edilmiştir (Coudron, 2005; Song ve ark., 2007; Coşkun, 2011).

Çizelge 3.9. AmpC'ye bağlı GSBL negatifliğini veya GSBL'ye bağlı AmpC negatifliğini ortadan kaldırılmasında kullanılan antibiyotikler

Sefoksitin 30 µg
Sefoksitin 30 µg - Boronik asit (BA) 400 µg
Sefoksitin 30 µg - Klavulonat (CA) 10 µg
Sefoksitin 30 µg - Boronik asit 400 µg- Klavulonat 10 µg

3.2.8. GSBL Pozitif İzolatlarının Isısal Direnci

GSBL aktivitesi doğrulanmış izolatların ısısal direnci belirlenmiştir. Mikroorganizmaların ısısal direncini belirlemek için izolatlar 10 mL Nutrient Broth (NB)'da 18-24 saatlik taze kültür haline getirilmiştir. Taze kültürler 90 mL' lik %0,1'lik peptonlu su bulunan erlenlere ilave edilmiş ve steril tüplere 5'er mL paylaştırılmıştır. İçerisinde sadece 5 mL %0,1 peptonlu su bulunan tüpe termometre konarak sıcaklık kontrol tüpü olarak kullanılmıştır. Isıl işlem 55, 60 ve 65 °C'lerde 0, 5, 10, 20 ve 30 dakika su banyosunda (Mommert, Almanya) uygulanmıştır. Belirlenen ısıl işlem süresi sonrası tüpler su banyosundan çıkarılarak 5 dk buz içerisinde tutularak oda sıcaklığına getirilmiştir. Daha sonra tüplerden desimal dilüsyonlar hazırlanarak PCA (Merck, Almanya) besiyerine dökme plak yöntemine göre ekim yapılmıştır. Petriler 24-48 saat 37 °C'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası koloni sayımları alınmıştır (Ünlütürk ve Turantaş, 2003;

Spinks ve ark., 2006; Jin ve ark., 2008; Rajkowski, 2012).

Birinci derece kinetik modele göre inkübasyon sonrası canlı mikroorganizma sayısının logaritma değerleri, zamana karşı grafiğe aktarılmıştır. Bigelow ve Esty (1920) tarafından Denklem 3.1’de belirtilen formüle göre $(-1/\text{Eğim})$ işlemi kullanılarak D-değerleri hesaplanmıştır (Valladares, 2015). Yine en az üç farklı sıcaklığa ait D değerlerinin logaritması, zamana karşı grafiğe aktarılarak elde edilen grafiğin eğiminden $(-1/\text{Eğim})$ z-değerleri hesaplanmıştır (Schaffner ve Labuza, 1997; Edelson-Mammel ve ark., 2004; Chen, ve Hoover, 2004; Jin ve ark., 2008; Perez-Rodriguez ve Valero, 2013).

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = - \frac{t}{D}, \quad (3.1.)$$

Burada; N_0 : başlangıç hücre sayısı cfu/mL

N: maruz bırakılan t zaman sonrası yaşayan hücre sayısı cfu/mL

D: desimal azalma zamanı

t: uygulanan süre (dakika) olarak tanımlanmıştır.

3.2.9. İstatistik Analiz

İstatistiksel analizlerde IBM SPSS Statistics 20 programı kullanılmıştır (SPSS, 2011). İstatistiksel analiz yöntemlerinde verilerin normallik dağılımı George ve Mallery (2010) göre değerlendirilmiştir. Normal sütler ile subklinik mastitisli sütlerin Eİ, DN, TAMB, TKS, protein, laktoz, YZKM ve mineral madde oranları arasında fark bağımsız örneklem T-testi, CMT değeri kategorik olduğundan dolayı CMT değerleri ile gruplar arasındaki ilişki ki-kare testi ve pH, SHS, DN, su ve yağ oranları arasında fark normal dağılım göstermediklerinden dolayı nonparametrik test olan Mann-Whitney U testi ile araştırılmıştır. CMT değerlerine göre 4 gruba ayırdığımız çiğ sütlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri arasında fark olup olmadığı ise tek yönlü Anova testi ile araştırılmıştır. Varyans homojen olan analiz sonuçlarında Anova test değeri, varyansı homojen olmayan değerlerde ise Welch testi değerleri dikkate alınmıştır. Grupların karşılaştırılmasında ise Tukey ve Games-Howell test sonuçları kullanılmıştır. Gözlem sayısı az olduğundan dolayı CMT 3 ve 4 grupları birleştirilerek istatistiksel analizlerin daha sağlıklı sonuçlar vermesi sağlanmıştır. Müstahsil çiğ süt örneklerinin fizikokimyasal ve biyolojik özellikler arasında korelasyon olup olmadığı örneklerde herhangi bir gruplandırma yapılmaksızın değerlendirilmiştir. Eİ, DN, TCS, TKS,

CMT, protein, laktoz, YZKM ve mineral madde miktarı değerleri normal dağılım gösterdiğinden dolayı Pearson korelasyon katsayısı hesaplanmış, pH, SHS, ilave edilmiş su miktarı ve yağ miktarı normal olmayan dağılım gösterdiğinden dolayı Spearman korelasyon katsayısı hesaplanmıştır.



BÖLÜM 4

ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Çiğ Süt Örneklerinin Özellikleri

4.1.1. Fiziksel Özellikler, Kimyasal Özellikler ve Biyolojik Özellikler

Çalışmamızda 134 müstahsilin çiğ süt örneklerinde pH, Eİ, DN ve CMT gibi fiziksel özellikleri, ilave edilmiş su, yağ, protein, laktoz, YZKM ve mineral madde oranı gibi kimyasal özellikleri ve toplam aerobik mezofilik bakteri sayısı (TAMB), toplam koliform grubu bakteri sayısı (TKB) ve somatik hücre sayısı (SHS) gibi biyolojik özellikleri analiz edilmiştir. Örneklerin temel istatistik bilgileri Çizelge 4.1’de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Müstahsil çiğ süt örneklerinin bazı özellikleri

	<i>Minimum değer</i>	<i>Maksimum değer</i>	<i>Ortalama ± Standart Hata</i>	<i>Referans değerler</i>
<i>pH</i>	5,73	7,03	6,75±0,01	**6,60-6,80
<i>Eİ</i>	4,38	7,6	5,83±0,04	**<5,6
<i>TAMB (log kob/mL)</i>	4,41	9,14	6,88±0,07	*<5
<i>TKB (log kob/mL)</i>	0	8,4	4,62±0,14	-
<i>CMT</i>	0	4	2±0,12	**0
<i>SHS</i>	19.000	2.527.000	521.445±45.522	*< 500.000
<i>DN</i>	-0,4855	-0,5999	-0,5296±-0,0020	**-,0545
<i>% Su</i>	0	6,6	0,58±0,11	0
<i>% Yağ</i>	1,82	6,81	3,10±0,06	**% 2,5- 6,0
<i>% Protein</i>	1,99	4,25	3,37±0,03	**% 2,9- 5,0
<i>% Laktoz</i>	3,97	6,18	4,99±0,03	**% 3,6- 5,5
<i>YZKM</i>	6,36	11,35	9,03±0,07	**en az 8,5
<i>Mineral</i>	0,34	0,82	0,64±0,01	**% 0,6- 0,9

*Anonim, 2000, 2006, 2009; **Metin, 2005

Tüm çiğ süt örneklerin pH değerleri 5,73-7,03 arasında değişim göstermekle birlikte ortalama pH değeri 6,75±0,01 olarak tespit edilmiştir. Sağlıklı çiğ inek sütünün pH değeri 6,60-6,80 değerleri arasında olduğu kabul edilmektedir (Metin, 2005). pH değerlerinin 6,8’in üzerinde olması mastitis hastalığının veya nötralize edici madde katıldığı bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. pH değeri 6,5’den küçük olması asitliğin arttığı veya ağız sütü olmasının bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Metin, 2005). pH değeri

süt ve süt ürünlerinin birçok biyokimyasal olaylarını etkilemek ile birlikte temizlik ve dezenfeksiyon işlemlerini de etkilemektedir (Metin, 2005). Bu nedenden dolayı pH değeri çiğ süt alımlarında kontrol edilen önemli bir gösterge değeridir. Örneklerimizin % 4,5' inin pH değerlerinin 6,5'ten küçük olduğu, %44'ünün pH değerinin 6,8'den büyük olduğu tespit edilmiştir.

Elektrik iletkenliği (Eİ) sütün birleşimindeki iyon miktarına bağlı olmakla birlikte normal süt için Eİ 25 °C de $4 \times 10^{-3} - 5,5 \times 10^{-3}$ S/cm arasında değişmektedir (Metin, 2005). Örneklerin %22,4'ünün Eİ değeri $5,5 \times 10^{-3}$ S/cm' inden küçüktür. Mastitisin sütte neden olduğu Na ve Cl iyonu artışı Eİ değerini yükseltmektedir (Baştan ve ark, 1997). Ayrıca soda katılması, sıcaklığın yükselmesi ve asitliğin artması Eİ'ni yükseltmektedir (Metin, 2005). Çiğ süt örneklerinde Eİ' i değerleri $4,38-7,6 \times 10^{-3}$ S/cm arasında değişim göstermiştir. Ortalama Eİ' i değeri ise $5,83 \pm 0,04 \times 10^{-3}$ olarak hesaplanmıştır.

Çiğ sütte toplam canlı sayısı, Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği (TGKY), Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde 30 °C' de ≤ 5 logkob/mL (100 000 kob/mL) olarak belirlenmiştir. Örneklerimizin TAMB değeri 4,41-9,14 logkob/mL arası değişim göstermiştir. Çiğ süt örneklerinde ortalama toplam canlı sayısı ise $6,88 \pm 0,07$ logkob/mL olarak hesaplanmıştır. Çiğ süt örneklerimizin TAMB sayılarının tebliğde verilen değerin üzerinde olduğu belirlenmiştir. Toplam canlı sayısı artışının birçok nedeni olmakla birlikte en önemli nedenleri; sağım, taşıma, depolama ve işlem sırasında hijyenin sağlanmamasıdır. Örnek değerlerimizdeki yükseklik bizlere örnekleme yaptığımız yerlerin hijyen koşullarındaki zayıflığı işaret etmektedir. İncelenen örneklerin 37°C' de yapılan TAMB sayılarının %0,8'inin 5 logkob/mL' den düşük olduğu, %99,2'sinin ise 5 logkob/mL' den yüksek olduğu bulunmuştur.

TKB sayısından gıda mikrobiyolojisinde sanitasyon indikatörü olarak faydalanılmaktadır. Çiğ sütte koliform grubu bakterilerin varlığı ve miktarı sağım, taşıma, depolama ve işlem sırasında yetersiz hijyenik koşulların varlığını göstermektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 2003). TGKY, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde TKB sayısı için herhangi bir sınır değer söz konusu değildir. Örneklerimizin TKB sayısı değerleri 0-8,4 logkob/mL arası değişmektedir. Örneklerimizin ortalama TKB değeri $4,62 \pm 0,14$ logkob/mL olarak tespit edilmiştir. Örneklerin %32'sinin TKB sayılarının 4 logkob/mL' den düşük olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda CMT değerlendirmelerinde negatif reaksiyon veren örneğe 0 değeri verilmiştir. Farklı derecelerde çökeltme veren örnekler ise 1: çok az, 2: az, 3: orta, ve 4: fazla olacak şekilde 4 farklı değer verilmiştir. 2 ve üzeri değer alan örneklerin subklinik mastitisli

süt olarak değerlendirilmiştir (Bardakcıoğlu ve ark., 2011; Akdağ ve ark., 2017). Örneklerimizin CMT değerleri 0-4 arasında değişmiş ve ortalama $2\pm 0,12$ değerini almışlardır. Örneklerimizin %41'inde 2 (az miktarda) den az skor değerine sahip olduğu tespit edilmiştir. %29,3'ü 2 değeri, %21,1'inin 3 değerini ve %8,3'ünün 4 değerini aldığı tespit edilmiştir.

Sütün sentezlenmesi sırasında kandan gelen ve memenin epitel hücrelerinden ayrılan hücrelere somatik hücre denir (Metin 2005). Mastitis varlığında toplam hücre sayısında bir artış olmaktadır. TGKY, Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde SHS ≤ 500 000 adet/mL olarak sınırlandırılmıştır (Anonim, 2000). Çalışmamızda çiğ süt örneklerimizin SHS'sı 19 000 ile 2 527 000 arası değişmiştir. Çiğ süt örneklerinin %64,7'sinin SHS değerleri 500 000 adet/mL daha az olduğu, %35,32'sinin de bu değer üzerinde olduğu tespit edilmiştir. Örneklerin ortalama SHS'si $521\ 445\pm 45\ 522$ olup TGKY'de sınır değerinin üzerinde bir değerdir.

Normal kabul edilen bir inek sütünün donma noktası (DN) -0.540 °C olarak kabul edilmektedir (Metin, 2005). Sütün donma noktası, sütteki laktoz ve süt tuzlarının konsantrasyonuna bağlı olup, süte su ilave edildiğinde, nötralize edici madde ilave edildiğinde ve biyokimyasal olarak laktozun parçalanması ile bu değer değişmektedir. Değerdeki azalış süte su katıldığına, artış ise süte nötralize edici yabancı maddelerin katıldığına bir göstergesidir (Metin, 2005). Örneklerimizin DN'sı $-0,4855$ ile $-0,5999$ arası değişmiştir.

Müstahsil çiğ süt örneklerinde ana besin öğeleri olan yağ, protein, laktoz ve mineral madde miktarlarının ölçümü de yapılmıştır. Normal inek sütlerinde yağ oranını % 2,5-6,0 olmasını beklemektedir. Yağ oranının cins, mevsim, ırk ve beslenme şekli gibi birçok faktörler etkilemektedir. Örneklerimizde ortalama yağ oranı $\% 3,10\pm 0,06$ olarak tespit edilmiştir.

Protein miktarı TGKY'de en az %2,8 olarak belirtilmiştir. Örneklerimizin ortalama protein miktarı $\%3,37\pm 0,03$ hesaplanmıştır. Protein oranını hayvan cinsi, mevsim ve beslenme olmak üzere birçok etkileyen faktör mevcuttur. Örneklerimizin %8,5'inin kodekte belirtilen değerden daha düşük oranda protein içerdiği, % 91,5'inin protein içeriğinin %2,8'den yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Laktoz miktarı normal sütlerde % 3,6-5,5 değişmektedir. Örneklerimizde ortalama % $4,99\pm 0,03$ laktoz tespit edilmiştir. Örneklerimizin ortalama laktoz değerleri kabul edilebilir sınırlarda tespit edilmiştir.

Mineral madde oranı ise % 0,6–0,9 arasında değişmekle birlikte ortalama mineral madde oranı $\% 0,64\pm 0,01$ olarak belirlenmiştir. Yine örneklerimizin ortalama mineral

madde miktarları da kabul edilebilir değerlerde tespit edilmiştir.

4.2. Subklinik Mastitisli Sütlerin Bazı Özelliklerinin Karşılaştırılması

Çalışmamızın amaçlarından biride subklinik mastitisli sütlerin üretime getirdiği riski aza indirmek amacıyla tespitinde kullanılacak ölçümü kolay parametrelerin belirlenmesidir. Bu amaçla SHS ve CMT testleri ile subklinikli ve normal sütler olarak ayırdığımız sütlerin fiziko-kimyasal ve biyolojik özellikleri karşılaştırılmıştır.

4.2.1. Somatik Hücre Sayısına Göre “Normal Süt” ve “Subklinik Mastitisli Süt” Gruplarının Fizikokimyasal ve Biyolojik Özelliklerinin İncelenmesi

TGKY ‘Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği’nde yer alan, işletmelere kabul edilecek çiğ sütün toplama sırasında uyması gereken standartlarda, SHS $\leq 500\ 000$ adet/mL olarak verilmiştir (Anonim, 2000). Çalışmamızda toplanan 134 müstahsil çiğ sütleri SHS $\leq 500\ 000$ adet/mL olanlar “Normal süt”, SHS $> 500\ 000$ olan müstahsil çiğ sütleri ise “Subklinik mastitisli süt” olarak gruplandırılmıştır. Normal sütler ile subklinik mastitisli sütlerin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri arasında fark olup olmadığı ve fark var ise bu farkın istatistiksel olarak önemli olup olmadığı araştırılmıştır.

Normal sütler ile subklinik mastitisli sütlerin normal dağılım gösteren Eİ, DN, TAMB sayısı, TKB sayısı, protein, laktoz, YZKM ve mineral madde oranları gibi parametreleri karşılaştırılmıştır. Gruplara ait ortalama değerler Çizelge 4.2’de gösterilmiştir. Normal sütler ile subklinik mastitisli sütlerin Eİ, DN, TAMB sayısı, TKB sayısı, protein, laktoz, YZKM ve mineral madde oranları arasındaki farklar istatistiksel olarak önemsiz bulunmuştur ($p > 0,05$).

Çizelge 4.2. SHS'e göre "Normal Sütler" ve "Subklinik Mastitisli Sütler" in normal dağılım gösteren değişkenlerinin karşılaştırılması

Değişkenler	SHS'ye göre süt grupları	X±SE	p değerleri
<i>Eİ</i>	Normal süt	5,76±0,06	0,227
	Subklinik mastitisli süt	5,85±0,06	
<i>DN</i>	Normal süt	-0,5240±0,01	0,479
	Subklinik mastitisli süt	-0,5271±0,00	
<i>TAMB</i> (log kob/ mL)	Normal süt	7,03±0,10	0,282
	Subklinik mastitisli süt	6,78±0,12	
<i>TKB</i> (log kob/ mL)	Normal süt	4,97±0,17	0,852
	Subklinik mastitisli süt	4,46±0,22	
% Protein	Normal süt	3,35±0,04	0,236
	Subklinik mastitisli süt	3,40±0,04	
% Laktoz	Normal süt	4,98±0,03	0,891
	Subklinik mastitisli süt	4,99±0,04	
% YZKM	Normal süt	9,01±0,09	0,381
	Subklinik mastitisli süt	9,09±0,10	
% Mineral	Normal süt	0,65±0,01	0,053
	Subklinik mastitisli süt	0,63±0,02	

X±SE: Ortalama ± Standart hata

Çizelge 4.3. SHS'e göre "Normal Sütler" ve "Subklinik Mastitisli Sütler" in CMT değerlerinin karşılaştırılması

CMT Değerleri	SHS'lere göre gruplar		
	Normal Süt	Subklinik Mastitisli Süt	Toplam
0	23 (%95,8)	1 (%4,2)	24 (%100,0)
1	16 (%76,2)	5 (%23,8)	21 (%100,0)
2	22 (%68,8)	10 (%31,3)	32 (%100,0)
3	7 (%29,2)	17 (%70,8)	24 (%100,0)
4	1 (%11,1)	8 (%88,9)	9 (%100,0)
Toplam	69 (%62,7)	41 (%37,3)	110 (%100,0)

Normal sütlerin CMT test değerleri ile subklinik mastitisli sütlerin CMT değerleri arasındaki fark istatistiksel ($p \leq 0,05$) olarak önemli olduğu bulunmuştur. Normal sütlerin daha düşük CMT değeri aldığı, subklinikli sütlerin daha yüksek CMT değerleri aldığı belirlenmiştir. Bu fark istatistiksel olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3).

Normal sütler ile subklinik mastitisli sütlerin normal dağılım göstermeyen özellikleri pH, su ve yağ oranları arasındaki fark istatistiksel olarak önemsiz iken ($p > 0,05$). SHS değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmıştır ($p \leq 0,05$). Bu iki grubun SHS birbirlerinden farklıdır ve bu fark önemli çıkmıştır (Çizelge 4.4).

Çizelge 4.4. SHS'e göre "Normal Sütler" ve "Subklinik Mastitisli Sütler" in normal dağılım göstermeyen değişkenlerinin karşılaştırılması

Değişkenler	SHS'ye göre süt grupları	X±SE	p değerleri
pH	Normal süt	6,74 ± 0,02	0,539
	Subklinik mastitisli süt	6,75 ± 0,02	
% Su	Normal süt	0,47 ± 0,11	0,518
	Subklinik mastitisli süt	0,75 ± 0,24	
SHS	Normal süt	254.053 ± 15.962	0,001
	Subklinik mastitisli süt	999.476 ± 86.051	
% Yağ	Normal süt	3,04±0,07	0,342
	Subklinik mastitisli süt	3,19±0,12	

X±SE: Ortalama ± Standart hata

4.2.2. California Mastitis Test Değerine Göre “Normal Süt” ve “Subklinik Mastitisli Süt” Gruplarının Fizikokimyasal ve Biyolojik Özelliklerinin İncelenmesi

CMT test değeri 2 ve üzeri olan müstahsil çiğ süt örnekleri “Subklinik mastitisli süt” 2’nin altında değer alan örnekler “Normal süt” olarak gruplandırılmıştır. CMT değerlerine göre oluşturulmuş bu iki grubun bazı özellikleri arasında fark istatistiksel olarak araştırılmıştır. Yapılan normallik testine göre Eİ, DN, TAMB, TKB, CMT, protein, laktoz, YZKM ve mineral madde miktarı değerleri normal dağılım göstermiş, pH, SHS, su ve yağ miktarı normal olmayan dağılım göstermiştir. Normal dağılım gösteren değişken değerlerinin karşılaştırılması Çizelge 4.5’de verilmiştir. DN’ları arasındaki fark Çizelge’den de görüldüğü gibi, istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

Çizelge 4.5. CMT değerine göre “Normal Sütler” ve “Subklinik Mastitisli Sütler” in normal dağılım gösteren değişkenlerinin karşılaştırılması

Değişkenler	CMT değerlerine göre süt grupları	X±SE	p değerleri
<i>Eİ</i>	Normal süt	5,73±0,07	0,369
	Subklinik mastitisli süt	5,78±0,05	
<i>TAMB sayısı (logkob/mL)</i>	Normal süt	6,98±0,13	0,865
	Subklinik mastitisli süt	6,77±0,10	
<i>DN</i>	Normal süt	-0,5229±0,00	0,001
	Subklinik mastitisli süt	-0,5335±0,00	
<i>TKB sayısı (logkob/mL)</i>	Normal süt	5,00±0,21	0,694
	Subklinik mastitisli süt	4,47±0,17	
<i>% Protein</i>	Normal süt	3,36±0,05	0,337
	Subklinik mastitisli süt	3,37±0,04	
<i>% Laktoz</i>	Normal süt	4,96±0,04	0,283
	Subklinik mastitisli süt	5,00±0,04	
<i>% YZKM</i>	Normal süt	9,01±0,10	0,206
	Subklinik mastitisli süt	9,03±0,10	
<i>% Mineral</i>	Normal süt	0,63±0,02	0,069
	Subklinik mastitisli süt	0,64±0,01	

X±SE: Ortalama ± Standart hata

Normal süt ile subklinik mastitisli sütlerin normal dağılım göstermeyen pH, SHS, % su ve % yağ oranları karşılaştırılmıştır (Çizelge 4.6). Non parametrik bağımsız rneklem Mann-Whitney U testine göre pH, % su, SHS, % yağ oranları arasındaki farkın önemli olup olmadığı araştırılmıştır. Grupların SHS değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemli ($p \leq 0,05$) bulunmuştur.

Çizelge 4.6. CMT değerine göre ‘‘Normal Sütler’’ ve ‘‘Subklinik Mastitisli Sütler’’ normal dağılım göstermeyen değişkenlerin karşılaştırılması

Değişkenler	SHS’ye göre süt grupları	X±SE	p değerleri
<i>pH</i>	Normal süt	6,75 ± 0,20	0,264
	Subklinik mastitisli süt	6,77 ± 0,13	
% Su	Normal süt	0,68 ± 0,19	0,188
	Subklinik mastitisli süt	0,52 ± 0,16	
SHS	Normal süt	265 363 ± 27 488	0,001
	Subklinik mastitisli süt	738 444 ± 72 881	
% Yağ	Normal süt	2,99±0,82	0,209
	Subklinik mastitisli süt	3,18±0,94	

X±SE: Ortalama ± Standart hata

4.2.3. CMT Değerlerine Göre Gruplandırılan Çiğ Süt rneklerinin Fizikokimyasal ve Biyolojik zelliklerin İncelenmesi

SHS göre normal ve subklinik mastitisli süt olarak iki gruba ayırdığımız sütlerin CMT değerleri arasındaki fark (bakınız s.66) istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Bu farkın önemli olmasından dolayı çalışmamızda ayrıca CMT değerlerine göre 4 gruba ayırdığımız çiğ sütlerinin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler arasında farkın olup olmadığı araştırılmıştır. İstatsitiksel analiz sonuçları Çizelge 4.7’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.7. CMT değerlerine göre grupların istatistiksel analiz sonuçları

CMT GRUPLARI	Ortalama±SE			
	TAMB sayısı	SHS	DN	% Mineral Madde
0	6,76±0,20 AB*	204 500±30 416 A	-0,5228±0,002 A	0,67±0,13 A
1	7,23±0,14 B	348 571±42 729 B	-0,5231±0,004 AB	0,58±0,29 B
2	6,97±0,13AB	506 938±63 439 B	-0,5356±0,004 BC	0,61±0,18 B
3	6,56±0,13A	960 156±116 938 C	-0,5313±0,004 AC	0,66±0,01 AB

*Harflendirme CMT grupları arasında her bir sütün için ayrı yapılmıştır.

Gruplar arası TAMB sayısı ($p=0,024$), % mineral madde oranları ($p=0,06$), SHS değerleri ($p=0,00$), DN ($p=0,02$) arasındaki fark istatistiksel olarak önemli çıkmıştır. TKB sayısı, Eİ, protein, % laktoz, % yağ, % YZKM, %su ve pH değerleri arasındaki fark ise istatistiksel açıdan önemsiz bulunmuştur ($p>0,05$). Fakat bu grupların ortalama değerlerine bakıldığında SHS dışında standart bir azalış veya artıştan bahsetmek mümkün değildir.

SHS yüksek olan sütün kullanılmasının birçok çeşit inek peynirinde nem içeriğini arttırdığı ve istenmeyen lezzet gelişimine neden olduğu ve pıhtılaşma özelliklerinde olumsuz etkilere neden olduğu belirlenmiştir (Le Maréchal ve ark. 2011). Vianna ve ark. (2008) tarafından Cottage cheese peynirde yapılan çalışmada SHS yüksek olan peynirlerde protein içeriğinin, peynir veriminin düştüğü, nem içeriğinin arttığı bildirilmiştir. Cooney ve ark. (2000) tarafından yapılan çalışmada İsveç tipi peynirde kullanılan sütün yüksek SHS'na sahip olmasının protein içeriğinde düşüşe, yağ içeriğinin ve peynir altı suyu proteinleri miktarında artışa neden olduğu, pH üzerinde ise bir etkisi olmadığı belirlenmiştir.

Çalışmamızda CMT değerlerine göre 4 gruba ayırdığımız sütlerin DN'ları arasındaki farkın istatistiksel olarak önemli olduğu, -0,5228 ile -0,5356 arasında değerler aldığı belirlenmiştir. Fakat Mitchell ve ark. (1989), Ayaşan ve ark. (2011) ile Kaşıkçı ve ark. (2012) CMT skorlarının ve/veya subkilinik mastitisin DN üzerine etkisinin önemsiz olduğunu bildirmişlerdir. Zagorska ve Ciprova (2013) ise laktoz konsantrasyonunun, sütün DN üzerine etkili olduğu, laktoz oranında meydana gelen değişikliklerin sütün DN'nı etkileyeceğini ifade etmişlerdir. Çalışmamızda ise subkilinik mastitisli ve normal sütlerin laktoz konsantrasyonları arasındaki fark önemsiz bulunmuştur.

4.3. Fiziksel, Kimyasal ve Biyolojik Özellikler Arasındaki İlişki

Müstahsil çiğ süt örneklerinin fizikokimyasal ve biyolojik özellikler arasında herhangi bir ilişki olup olmadığı örneklerde herhangi bir gruplandırma yapılmaksızın değerlendirilmiştir. Eİ, DN, TAMB sayısı, TKB sayısı, CMT, % protein, % laktoz, % YZKM ve % mineral madde miktarı değerleri normal dağılım gösterdiğinden dolayı Pearson korelasyon katsayısı hesaplanmış, pH, SHS, % İlave edilmiş su miktarı ve % yağ miktarı normal olmayan dağılım gösterdiğinden dolayı Spearman korelasyon katsayısı hesaplanmıştır. Çizelge 4.8 ve 4.9’da değişkenler arası korelasyon gösterilmiştir.

Çizelge 4.8. Normal dağılım gösteren fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler arasındaki ilişki

	<i>Eİ</i>	<i>TAMB</i>	<i>TKB</i>	<i>CMT</i>	<i>Protein</i>	<i>Laktoz</i>	<i>YZKM</i>	<i>Mineral</i>
Pearson Korelasyon Katsayısı	1							
<i>Eİ</i>	1							
<i>TAMB sayısı</i> (log kob/ mL)	0,159	1						
<i>TKB sayısı</i> (log kob/ mL)	0,036	0,621**	1					
<i>CMT</i>	0,067	-0,166	-0,191	1				
<i>% Protein</i>	0,009	-0,389**	-0,453**	0,034	1			
<i>% Laktoz</i>	-0,044	-0,376**	-0,376**	0,045	0,865**	1		
<i>% YZKM</i>	0,024	-0,418**	-0,446**	0,024	0,970**	0,947**	1	
<i>% Mineral</i>	0,314**	0,032	0,309**	0,027	-0,020	0,018	0,005	1

** .Korelasyon 0.01 seviyesinde anlamlıdır.

* .Korelasyon 0.05 seviyesinde anlamlıdır.

Pearson korelasyon katsayısı $< \pm 0,50$ olan değişkenlerin arasındaki ilişki zayıf olarak değerlendirilmiştir. TKB sayısı ile TAMB sayısı arasında $r = 0,621$ pozitif yönde bir ilişki söz konusudur. Çiğ süt örneklerimizde TKB sayısı arttıkça veya azaldıkça TAMB sayısının da arttığı veya azaldığı anlamına gelmektedir. Yine örneklerimizin % laktoz oranları ile % protein oranları arasında $r=0,865$ pozitif yöne bir ilişki söz konusudur. Laktoz seviyesi yüksek olan sütlerimizin protein seviyesi de yüksek bulunmuştur. % laktoz oranı ile TAMB sayısı arasında negatif zayıf yönlü korelasyon ($r= -0,376$), % protein oranı ile yine TAMB sayısı arasında negatif zayıf yönlü korelasyon ($r= -0,389$) ve YZKM ile TAMB sayısı arasında negatif zayıf korelasyon ($r= -0,418$) tespit edilmiştir. TAMB sayısı artan sütlerde subklinik mastitis olgusu var olma olasılığı yüksektir. Mastitis olgusunun laktoz miktarında azalışa

neden olduğu fakat toplam protein ve yağ içeriği hakkında verilerin çelişkili olduğu herhangi bir eğilim belirlenemediği önceki çalışmalarda araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Le Maréchal ve ark. 2011). Yine örneklerimizdeki TKB sayısı ile % protein, % laktoz ve % YZKM bileşenleri arasında negatif yönlü sırasıyla, -0.453, -0.376, -0.446 zayıf korelasyon söz konusudur. % YZKM oranları ile % laktoz oranları arasındaki pozitif yönlü korelasyon katsayısı $r=0,947$ olarak tespit edilmiştir. Korelasyon yorumlarında neden-sonuç ilişkisi aranmaması gerektiği her zaman belirli bir nedenden kaynaklanmadığı ifade edilmiştir (Köse, 2012; Mendeş, 2012). % laktoz oranı fazla (az) olanlarda % protein oranları da fazla (az) olduğu, % YZKM oranının fazla (az) olan örneklerde % laktoz oranında fazla (az) olduğu belirlenmiştir.

Malek dos Reis ve ark. (2013), subkilinik mastitisin laktoz, yağsız katı madde ve toplam katı bileşenlerin içeriğini azalttığını, fakat yağ ve protein bileşenleri arasında bir fark olmadığını tespit etmişlerdir. Ayrıca mastitise neden olan patojenlerin varlığı protein, laktoz, yağsız katı madde ve toplam katı madde bileşimini etkilerken, yağ bileşimini etkilemediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda TAMB sayısı ve TKB sayısı değerleri ile protein, laktoz ve YZKM miktarları arasında zayıf ($r<0,500$) negatif yönlü korelasyon tespit edilmiştir. Çiğ süt örneklerimizde toplam canlı ve toplam koliform sayısı artarken, % protein, laktoz ve YZKM miktarının azaldığı tespit edilmiştir. Mikrobiyal faaliyet ile besin bileşenlerinin parçalanması beklenen bir sonuçtur. Fakat besin bileşimindeki azalmayı her zaman mikrobiyal faaliyet yoğunluğu ile bağlantı kurmamız doğru olmayacaktır. Çünkü çiğ sütün besin bileşimini etkileyen birçok etken söz konusudur.

Çizelge 4.9. Normal dağılım göstermeyen fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikler arasındaki ilişki

	<i>pH</i>	<i>SHS</i>	<i>DN</i>	<i>Su</i>	<i>Yağ</i>	
Spearman's korelasyon katsayısı	1,000					
	<i>SHS</i>	0,143	1,000			
	<i>% DN</i>	0,130	0,039	1,000		
	<i>% Su</i>	-0,117	-0,002	-0,856**	1,000	
	<i>% Yağ</i>	0,027	0,130	0,240**	-0,206*	1,000

** .Korelasyon 0.01 seviyesinde anlamlıdır.

* .Korelasyon 0.05 seviyesinde anlamlıdır.

Normal dağılım göstermeyen pH, SHS, DN, % yağ ve % su değişkenleri arasında Sperman korelasyon katsayıları hesaplanmıştır. DN ile % su oranı arasında $r=-0,856$ olarak bulunmuştur. DN değeri azaldıkça % su (ilave edilmiş su) arttığını veya DN arttıkça % su oranının azaldığı anlamına gelmektedir. Normal sütün DN'sı $-0,540$ °C olarak kabul edilmektedir. Süte su katıldığında bu değer azalmakta olduğu ve ifade edilmiştir (Metin, 2005).

Subklinik masititsin erken ve pratik teşhisi için birçok araştırmacı hayvanın fizyolojik özellikleri ve sütün fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri ile ilgili çalışma yapmıştır (Atasever ve erdem, 2008; Gürbulak ve ark., 2009; Kaşıkçı ve ark., 2012; Dier ve ark., 2013; ikiz ve ark., 2013; Özdemir ve Kaymaz, 2013; Timurkan, 2014).

Timurkan (2004), Görbulak ve ark. (2009), Atasever ve Erdem (2008) Eİ ve CMT değerleri arasında bir ilişki tespit edemezken Eİ'nin tek başına yeterli olmadığını ifade etmişlerdir. Ayrıca Özdemir ve Kaymaz (2013) CMT değerlerinin Eİ'ne göre daha güvenilir sonuç verdiğini bildirmişlerdir. Midleton ve ark. (2004) çiftliklerde CMT testinin SHS'yi dolaylı olarak belirleyen hızlı, uygun maliyetli bir yöntem olduğunu ifade etmişlerdir. Diğer araştırmacılarda süt hayvanlarının kontrol programında meme hastalığının varlığını işaret eden CMT testinin faydalı olacağını bildirmişlerdir (Sargeant ve ark., 2001; Dingwell ve ark., 2003; Midleton ve ark., 2004; Bhutto ve ark., 2012).

Özdemir ve Kaymaz (2013) CMT ile SHS artışı arasında, Eİ ile SHS arasında korelasyon, Kaşıkçı ve ark. (2012) ve Baştan ve ark. (1997) da CMT, SHS, Eİ arasında istatistiksel olarak önemli ($p<0,001$) pozitif korelasyon tespit etmişlerdir. Kaşıkçı ve ark. (2012) CMT, SHS değerleri ile toplam canlı sayısı arasında, Diler ve ark. (2013) SHS ile toplam mikroorganizma yükü arasında pozitif yönlü korelasyon belirlemişlerdir. Bhutto ve ark. (2012) 240 inek üzerinde yaptıkları çalışmada CMT test skorları ile subklinik masitits etmeni patojen mikroorganizma izolasyonu arasındaki ilişkiyi istatistiksel olarak önemli bulmuşlardır ($p<0,001$). Kaşıkçı ve ark. (2012), mineral madde miktarları ile CMT, SHS, TCS, Eİ ve istatistiksel olarak önemli ($p<0,001$) pozitif korelasyon tespit etmişlerdir. El Zubeir ve ark. (2005) da mineral madde miktarları ile subklinik mastitis arasında pozitif yönlü korelasyon olduğunu bildirmişlerdir. Baştan ve ark. (1997) ise toplam protein laktoz, Eİ, CMT ve SHS arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır.

Bu çalışmada da yapılan istatistiksel analiz sonucunda Eİ ile % mineral madde miktarı arasında zayıf pozitif yönlü bir korelasyon ($r=0,314$) saptanırken Eİ ve SHS arasında istatistiksel açıdan önemli bir korelasyon bulunamamıştır.

4.4. Çiğ Süt ve Diğer Örneklerde *E.coli* ve *E.coli* O157 Varlığının Araştırılması

Çiğ süt örneklerinin %13,2 (18/136)'ünde, tank örneklerinin %23,5 (4/17)'inde ve işletme örneklerinin %10 (2/20)'unda *E.coli* varlığı tespit edilmiş fakat yoğun floresans nedeni ile *E.coli* sayıları hesaplanamamıştır.

E.coli O157 varlığının araştırılması ve doğrulanması analizleri sonucunda toplam 173 örnekte (136 Müstahsil çiğ süt örnekleri, 17 süt toplama tankı ve 20 üretim noktası) araştırılmıştır. Sadece bir müstahsil örneğinde lateks aglütinasyon testi sonucu pozitif reaksiyon vermiştir. Buna göre örneklerin %0,58 (1/173)'inde *E.coli* O157'i pozitif bulunmuştur. Müstahsil çiğ sütlerinde ise %0,74 (1/136) oranında tespit edilmiştir.

E.coli günümüzde halen çeşitli gıda kaynaklı salgınların nedeni olarak raporlanmaktadır. Salgınlara neden olan gıda gruplarından biride süt ve süt ürünleridir. Patojen mikroorganizmalar ve toksinleri ile kontamine olmuş süt ve süt ürünlerinin tüketiminin neden olduğu zehirlenmeler ve enfeksiyonlar tüm Dünya'da halen sıklıkla meydana gelmektedir. Demirel ve Karapınar (2002) İzmir de marketlerde ve pazarlarda satılan 75 peynir örneğinin %40'ında *E.coli*, %1,33 (1/75)'ünde *E.coli* O157 tespit etmiştir. Öksüz ve ark. (2004) 100 farklı çiğ süt örneğini ve 50 salamuralı beyaz peynir örneklerini incelemiştir. Sütlerin %1'inde, peynirlerin ise %4 ünde *E. coli* O157:H7 tespit etmişlerdir. Akkaya ve ark. (2007) ise Afyonkarahisar'da tüketilen çiğ süt ve peynirlerde *E.coli* O157:H7 varlığı araştırmışlardır. Çiğ süt ve beyaz peynirin her birinden 100'er adet örnek incelenmiştir. Çiğ süt örneklerinin 3'ünde (%3) ve peynir örneklerinin 1'inde (%1) *E. coli* O157:H7 tespit etmişlerdir. Örgü peynirinde (105 örnek) ise %65,71 *E.coli* ve %7,62 *E.coli* O157:H7 bakteri tanımlanmıştır (Vural ve ark, 2010).

Çalışmamızda 153 çiğ süt örneğinde araştırdığımız *E.coli* O157 varlığı %0,65 (1/153) olarak tespit edilmiştir. Bu oranda önceki çalışmalara göre oldukça düşük bir oran olmasına rağmen, *E.coli* O157 pozitif çiğ süt örneğinin bulunması oldukça ciddi bir sorundur. Bir çok ülkede peynir yapımında kullanılan sütün yetersiz pastörizasyon yapılması, ayrıca starter kültürün çalışmaması gibi sorunlardan dolayı peynirde insan sağlığı için risk oluşturan *Brucella melitensis*, *Salmonella*, *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *S. aureus* gibi patojenlerin varlığı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Evrensel ve ark., 2003; Altun, 2011; Cagri- Mehmetoğlu ve ark., 2011).

4.5. GSBL Şüpheli Enterobacteriaceae İzolatların Elde Edilmesi ve Tanımlanması

Çalışmamızda işletme ve müstahsil örnekleme 2 kez tekrarlanmıştır. Toplamda 136 müstahsil ve 17 tanktan çiğ süt örnekleri ve işletmenin peynir üretim hattından bölüm 3.1.1’de yer alan 10 noktadan 2 kez örnekleme yapılmıştır.

Toplanan örneklerden toplam koliform sayısını belirlemek için ve *E.coli* varlığını araştırmak için Fluorocult Violet Red Bile Agar (F-VRB, Merck, Almanya) besiyerine uygun dilüsyonlardan ekim yapılmıştır. İnkübasyon sonrası F-VRB petrilerinden örnek sayısını temsil edecek sayıda kolonilerden HiCrome ESBL agara transfer edilmek üzere alınmıştır. Yine süt ve peynir örneklerinden C-EMB ve C-MAC agara yayma plak yöntemi ile ekim yapıldıktan sonra inkübasyon süresi sonunda üreme olan plaklardan farklı morfolojik özelliklere sahip kolonilerden de HiCrome ESBL agara transfer edilmek üzere alınmıştır. Ayrıca *E.coli* O157 varlığını belirlemek için kullanılan CT-SMAC besiyerinde inkübasyon süresi sonunda şeffaf koloni özelliklerine sahip izolatlardan da alınmıştır. Toplamda F-VRB, C-EMB, C-MAC ve CT-SMAC besiyerlerinden Enterobacteriaceae şüpheli 490 adet izolat alınmıştır (Çizelge 4.11, 4.12).

490 adet Enterobacteriaceae şüpheli izolat GSBL aktivitesinin ön tarama testi ile belirlenmesi için HiCrome ESBL Agara çizilmiştir. HiCrome ESBL Agar’a 500 mL agar için; ceftazidime 1,50 mg, cefotaxime 1,50 mg; ceftriazone 1,00 mg, aztreonam 1,00 mg, fluconazole 5,00 mg antibiyotik içeren HiCrome ESBL Agar Supplemti (Himedia, Hindistan) ilave edilmiştir. GSBL aktivitesine sahip izolatlar antibiyotik katkısına karşı HiCrome ESBL agarda mavi, mor renkte üreyerek tespit edilmiştir. 490 adet izolatımızın 347 tanesi HiCrome ESBL agarda zayıf ve güçlü üreme özelliği göstererek GSBL pozitif olarak belirlenmiştir (Çizelge 4.10, 4.11).

Çizelge 4.10. Örnekleme alanlarından elde edilen Enterobacteriaceae izolat sayıları

Örnekleme Alanları	Alınan İzolat Sayısı	HiCrome ESBL Agarda Üreyen İzolat Sayısı
Çakıroba Köyü	34	32
Yenice Merkez	27	27
Seyvan Köyü	37	22
Bekten Köyü	49	24
İşletme	Süt Toplama Tankı 31	Süt Toplama Tankı 11
	Üretim 37	Üretim 37
Çakıroba Köyü 2. tur	95	84
Bekten Köyü 2. tur	108	55
İşletme 2. tur	Süt Toplama Tankı 33	Süt Toplama Tankı 24
	Üretim 39	Üretim 31
TOPLAM	490	347

Çizelge 4.11. İzolat sayılarının grup dağılımları

Örnekleme Alanları	Alınan İzolat Sayısı	HiCrome ESBL Agarda Üreyen İzolat Sayısı
Müstahsil	350	244
Süt Toplama Tankları	64	35
İşletme (Üretim)	76	68
TOPLAM	490	347

HiCrome ESBL agardan izole edilen 347 GSBL pozitif şüpheli Enterobacteriaceae izolatı biyokimyasal ve morfolojik olarak incelenmiştir. İlk inceleme sonucunda 347 adet izolattan saf olduğu tespit edilen, gram (-), basil veya kokobasil ve oksidaz (-) olan 64 izolat alınmıştır.

64 (%18,44) izolat Çizelge 4.12’de gösterilen IMVIC, H₂S üretimi, hareketlilik test, karbonhidrat fermantasyonu test sonuçlarına göre Enterobacteriaceae familyasına ait cinsler olduğu tespit edilmiştir. Tespit edilen 64 adet izolat Çizelge 4.13’de belirtildiği gibi cins düzeyinde tanımlanmıştır. 64 adet 33 tanesi *Enterobacter* spp. (%52), 13 tanesi *Klebsiella* spp. (%20), 11 tanesi *Citrobacter* spp. (%17), 5 tanesi *E.coli* (%8), 1’er tanesi *Shigella* spp. ve *Edwardsiella* spp. (%1,5) olarak belirlenmiştir. Tanımlanan 64 izolatın 26 tanesi

müstahsillerden (%41), 23 tanesi çiğ süt toplama tanklarından (%36) ve 15 tanesi (%23) işletmeden elde edilen izolatlara aittir.

Çizelge 4.12. IMVIC ve bazı biyokimyasal test sonuçları

	İndol	Metil Red	Voges- proskauer	Sitrat	H ₂ S üretimi	Hareketlilik
Negatif İzolat Sayısı	49	47	21	10	55	15
Pozitif İzolat Sayısı	15	17	43	54	9	49

Çizelge 4.13. GSBL şüpheli Enterobacteriaceae türlerinin örnekleme yerlerine göre dağılımı

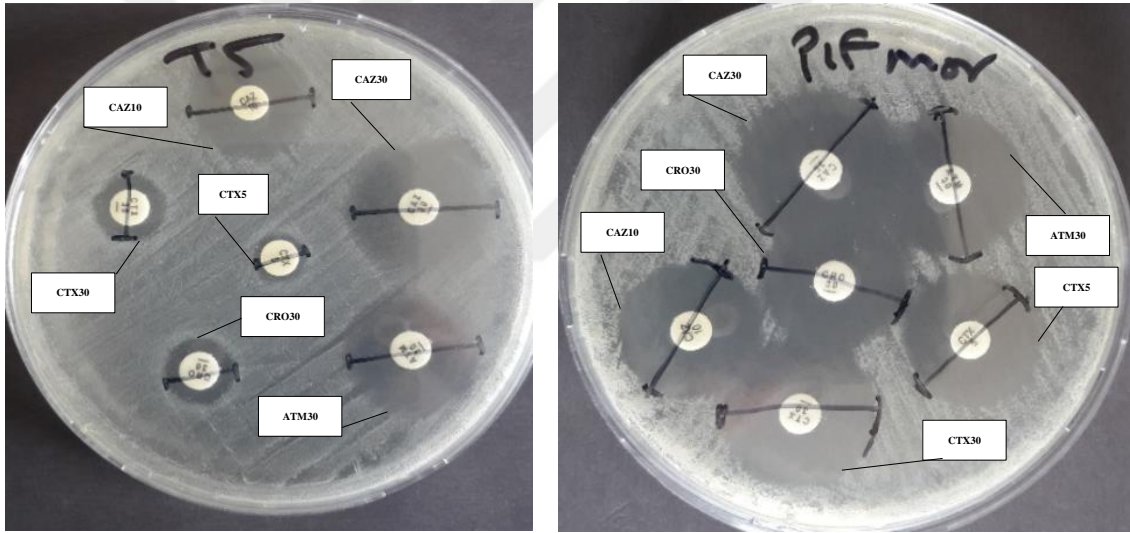
Örnekleme Yerleri	Miktar	n(%)					
		<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Citrobacter</i> spp.	<i>E.coli</i> spp.	<i>Edwardsiella</i> spp.	<i>Shigella</i> spp.
Müstahsil	26 (%41)	10 (%38)	7 (%27)	6 (%23)	2 (%8)	0 (%0)	1 (%4)
Süt Toplam Tankları	23 (%36)	13 (%57)	4 (%17)	3 (%13)	3 (%13)	0 (%0)	0 (%0)
İşletme	15 (%23)	10 (%67)	2 (%13)	2 (%13)	0 (%0)	1 (%7)	0 (%0)
TOPLAM	64 (%100)	33 (%52)	13 (%20)	11 (%17)	5 (%8)	1 (%1,5)	1 (%1,5)

Süt toplama tanklarının bakteri yoğunluğu diğer araştırmacılar tarafından da araştırma konusu olmuştur. Straley ve ark. (2006) ve Berge ve ark. (2007) süt toplama tanklarının önemini ifade ederek *Salmonella* ve *E.coli* gibi enterik patojenlerin kaynağı olacağını belirtmişlerdir. Araştırmacılar tarafından süt toplama tanklarının halk sağlığı açısından ve antibiyotik direncin yayılımı bakımından izlenmesi gerektiğini bildirilmiş olmasına rağmen, ancak son birkaç yılda toplama tankları araştırılmaya başlanmıştır. Sudarwanto ve ark. (2015) Endonezya, Azevedo ve ark. (2016), Portekiz, Decimo ve ark. (2016) İtalya, Odenthal ve ark. (2016) Almanya ve Ntuli ve ark. (2017)'da Güney Afrika'daki süt toplama tanklarını mikrobiyal yüklerini araştırmışlardır. Süt toplama tanklarının önemini ifade ederek *Salmonella* ve *E.coli* gibi enterik patojenlerin kaynağı olacağını belirtmiştir.

4.6. HiCrome ESBL Agarda GSBL Pozitif Olan Enterobacteriaceae İzolatlarının Antibiyotik Duyarlılıkları

4.6.1. GSBL Aktivitelerinin Klasik Yöntem ile Belirlenmesi

HiCrome ESBL agarda GSBL pozitif olan Enterobacteriaceae izolatlarının GSBL üretimi fenotipik tarama test yöntemlerinden disk difüzyon yöntemi ile kontrol edilmiştir. Türkiye'nin yakın çevresi ile ortak çalışmalar yapabilmeleri için 2013 yılı içerisinde Türkiye'de EUCAST standartlarının kullanılmasına karar verildiğinden dolayı çalışmamızda GSBL aktivitesi EUCAST dökümanlarında yer alan sınır değerler kullanılmıştır. Ayrıca ülkemizde uzun yıllar takip edilen CLSI sınır değerleri ile de karşılaştırılması yapılmıştır. Şekil 4.1'de iki Enterobacteriaceae izolatının disk difüzyon testinde EUCAST ve CLSI sınır değerlerine göre bazı sefalosporinlere karşı zon çapları değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4.1. GSBL üretimi pozitif izolat (soldaki şekil), negatif izolat (sağdaki şekil) ların bazı sefalosporinlere karşı zon çapları örneği

64 GSBL Enterobacteriaceae izolatının EUCAST ve CLSI sınır değerlerine göre antibiyotik duyarlılık test sonuçları sırasıyla müstahsil, süt toplama tankları ve işletme örneklerinde dirençli (R), duyarlı (S) olarak işaretlenerek Çizelge 4.15, 4.16 ve 4.17'de gösterilmiştir.

Müstahsil örneklerinde GSBL tarama testinde kullanılan en az bir antibiyotiğe direnç gösteren örnekler Çizelge 4.14'te gösterilmiştir. M17 (*Enterobacter* spp.) izolatının sadece EUCAST tablosunda yer alan seftazidim 10 µg (CAZ10)'e karşı dirençli olduğu fakat CLSI tablosunda yer alan seftazidim 30 µg (CAZ30)'e karşı duyarlı olduğu tespit edilmiştir. M26

(*Enterobacter* spp.) izolatının ise EUCAST ve CLSI tablosundaki sefpodoksim 10 µg, (CPD10), seftriakson 30 µg (CRO30), sefotaksim 5 µg (CTX5) ve sefotaksim 30 µg (CTX30) dirençli bulunmuştur. Diğer müstahsil izolatları tüm antibiyotiklere karşı duyarlı (S) bulunmuştur. M26 (*Enterobacter* spp.) izolatımız her iki standartta da benzer antibiyotiklere direnç göstermiştir. HiCrome ESBL agarda zayıf üreme gösteren izolatlardan bazılarının disk difüzyon testinde kullanılan antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmiştir.

İşletmeye işlenmek üzere köylerden getirilen süt toplama tanklarından GSBL şüpheli olarak izole edilen Enterobacteriaceae izolatlarının EUCAST ve CLSI'ya göre GSBL tarama testi sonuçları Çizelge 4.15'da gösterilmiştir. Çizelgeye göre; T9 (*Citrobacter* spp.), T16 (*Klebsiella* spp.), T21 (*E.coli*) ve T23 (*Enterobacter* spp.) izolatları EUCAST ve CLSI tablosunda yer alan tüm antibiyotiklere karşı dirençli bulunmuştur. T17 (*E.coli*) ve T22 (*E.coli*) izolatları ise sadece seftazidim 30 µg (CAZ30) karşı duyarlılık göstermiştir. T5 (*Enterobacter* spp.) izolatı EUCAST tablosunda CPD10, CTX5, CLSI tablosunda yine CPD10 antibiyotiğine karşı direnç göstermiştir. T6 (*Enterobacter* spp.) ise her iki tabloda sadece CPD10 antibiyotiğine karşı direnç göstermiştir. T11 (*Enterobacter* spp.) örneği ise CLSI tablosunda yer alan CTX30 antibiyotiğine karşı dirençli bulunmuştur. Diğer tüm örneklerin EUCAST ve CLSI'ye göre tüm antibiyotiklere duyarlı olduğu saptanmıştır.

Çizelge 4.14. Müstahsil GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatların antibiyotik dirençlerinin karşılaştırılması.

Kod		EUCAST				CLSI				
		CPD10	CAZ10	CTX5	CRO30	CPD10	CTX30	CAZ30	ATM30	CRO30
M1	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M2	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M3	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M4	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M5	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M6	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M7	<i>E.coli</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M8	<i>Shigella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M9	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M10	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M11	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M12	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M13	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M14	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M15	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M16	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M17	<i>Enterobacter</i> spp.	S	R	S	S	S	S	S	S	S
M18	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M19	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M20	<i>E.coli</i> O157	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M21	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M22	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M23	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M24	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M25	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
M26	<i>Enterobacter</i> spp.	R	S	R	R	R	R	S	S	R

*CPD10: Sefpodoksim (Cefpodoxime) 10 µg, CAZ10: Seftazidim (Ceftazidime) 10 µg, CTX5: Sefotaksim (Cefotaxime) 5 µg, CRO30: Seftriakson (Cetriaxone) 30 µg, CTX30: Sefotaksim (Cefotaxime) 30 µg, CAZ30: (Seftazidim) Ceftazidime 30 µg, ATM30: Aztreonam (Aztream) 30 µg.

Çizelge 4.15. Süt toplama tankları GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatların antibiyotik dirençlerinin karşılaştırılması.

Kod		EUCAST				CLSI				
		CPD10	CAZ10	CTX5	CRO30	CPD10	CTX30	CAZ30	ATM30	CRO30
T1	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T2	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T3	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T4	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T5	<i>Enterobacter</i> spp.	R	S	R	S	R	S	S	S	S
T6	<i>Enterobacter</i> spp.	R	S	S	S	R	S	S	S	S
T7	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T8	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T9	<i>Citrobacter</i> spp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R
T10	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T11	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	R	S	S	S
T12	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T13	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T14	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T15	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T16	<i>Klebsiella</i> spp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R
T17	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R
T18	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T19	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T20	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
T21	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	R	R	R
T22	<i>E.coli</i>	R	R	R	R	R	R	S	R	R
T23	<i>Enterobacter</i> spp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R

*CPD10: Sefpodoksim (Cefpodoxime) 10 µg, CAZ10: Seftazidim (Ceftazidime) 10 µg, CTX5: Sefotaksim (Cefotaxime) 5 µg, CRO30: Seftriakson (Cetrixone) 30 µg, CTX30: Sefotaksim (Cefotaxime) 30 µg, CAZ30: (Seftazidim) Ceftazidime 30 µg, ATM30: Aztreonam (Aztream) 30 µg.

İşletme örneklerinden elde edilen GSBL pozitif Enterobacteriaceae izolatları, işletme girişinde yer alan süt kabul tankından, ısıl işlem uygulanan süttten, peynir teknesine gelen plastik boru çıkışındaki süttten, peynir teknesi içindeki pastörize süttten, peynir teknesindeki mayalama sonrası pıhtıdan, peynir teknesindeki mayalama sonrası baskıdan çıkan tuzsuz peynirden, peynir teknesinde bir gece salamurada bekletilmiş peynirden, tenekelere aktarılan peynirden ve olgunlaştırma aşamasındaki peynirden alınan örneklerden elde edilmiştir.

İşletme izolatlarının disk difüzyon yöntemi ile GSBL tarama test sonuçları Çizelge 4.16'de gösterilmiştir. Sonuçlara göre; İ2 (*Enterobacter* spp.), İ4 (*Enterobacter* spp.) ve İ6 (*Edwardsiella* spp.) EUCAST ve CLSI tablosunda yer alan tüm antibiyotiklere direnç göstermiştir. İ8 (*Enterobacter* spp.) izolatı ise EUCAST tablosunda yer alan CTX5 antibiyotiğine direnç CLSI tablosundaki CTX30'a duyarlılık göstermiştir. İ11 (*Enterobacter* spp.) izolatı EUCAST tablosunda yer alan CAZ10 antibiyotiğine direnç, CLSI tablosunda yer alan CAZ30 antibiyotiğine duyarlılık göstermiştir.

Çalışmamızda müstahsil, çiğ süt toplama tankları ve işletme örneklerinden elde edilen GSBL pozitif olduğu düşünülen Enterobacteriaceae izolatlarında yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde EUCAST ve CLSI sınır değerleri karşılaştırılmıştır. Sonuç olarak her iki standartta da benzer antibiyotikler olmakla birlikte örneklerin en fazla farklılık gösterdiği antibiyotiklerin EUCAST'ta CTX5 ve CAZ10 olduğu CLSI'da ise CTX30 ile CAZ30 olduğu tespit edilmiştir. İzolatların yüksek konsantrasyonda antibiyotik içeren disklere direnç gösterirken, düşük konsantrasyonda antibiyotik içeren disklere duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu aşamada hangi standart ve antibiyotiklerin tercih edileceği önem taşımaktadır. Örneklerde uygulanacak antibiyotik standartlarında hangisinin kullanılması gerektiği konusunda halen belirsizlik söz konusudur.

Araştırmacılar son yıllarda EUCAST'ın laboratuvar iş yükünü kolaylaştırdığı, klinik sınır değerlerin yanı sıra epidemiyolojik eşik değerlerin yabanıl (wild type) kökenli mikroorganizmalar hakkında bilgi edinmeyi sağladığı, erişiminin daha kolay olduğu ve ülkemiz coğrafi yakınlığı ve politikaları açısından CLSI'ın yerine tercih edilmesinin uygun olduğu ifade edilmiştir (Söyletir, 2013).

Çizelge 4.16. İşletme GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatların antibiyotik dirençlerinin karşılaştırılması

Kod		EUCAST				CLSI				
		CPD10	CAZ10	CTX5	CRO30	CPD10	CTX30	CAZ30	ATM30	CRO30
İ1	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İ2	<i>Enterobacter</i> spp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R
İ3	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İ4	<i>Enterobacter</i> spp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R
İ5	<i>Citrobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İ6	<i>Edwardsiella</i> spp.	R	R	R	R	R	R	R	R	R
İ7	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İ8	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	R	S	S	S	S	S	S
İ9	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İ10	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İ11	<i>Enterobacter</i> spp.	R	R	R	R	R	R	S	R	R
İ12	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İ13	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İ14	<i>Klebsiella</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S
İ15	<i>Enterobacter</i> spp.	S	S	S	S	S	S	S	S	S

*CPD10: Sefpodoksim (Cefpodoxime) 10 µg, CAZ10: Seftazidim (Ceftazidime) 10 µg, CTX5: Sefotaksim (Cefotaxime) 5 µg, CRO30: Seftriakson (Cetriaxone) 30 µg, CTX30: Sefotaksim (Cefotaxime) 30 µg, CAZ30: (Seftazidim) Ceftazidime 30 µg, ATM30: Aztreonam (Aztream) 30 µg.

Elde edilen 64 GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatına uygulanan GSBL tarama testi sonuçlarına göre en az bir antibiyotiğe dirençli izolatlar Çizelge 4.17’de verilmiştir.

Toplam 16 adet Enterobacteriaceae izolatı GSBL tarama testi sonucu pozitif olarak değerlendirilmiştir. Direnç gösteren izolatların %12,4 (2 adet) müstahsilere ait örneklerle, %56,3 (9 adet)’ü süt toplama tankı örneklerinden elde edilen izolatlara, %31,3 (5 adet)’ü işletme izolatlarına aittir.

Çizelge 4.17. En az bir antibiyotiğe duyarlılık gösteren Enterobacteriaceae izolatları

Müstahsil örnekleri	Süt toplama tank örnekleri	İşletme örnekleri
	T5 <i>Enterobacter</i> spp.	
	T6 <i>Enterobacter</i> spp.	
	T9 <i>Citrobacter</i> spp.	İ2 <i>Enterobacter</i> spp.
M17 <i>Enterobacter</i> spp.	T11 <i>Enterobacter</i> spp.	İ4 <i>Enterobacter</i> spp.
M26 <i>Enterobacter</i> spp.	T16 <i>Klebsiella</i> spp.	İ6 <i>Edwardsiella</i> spp.
	T17 <i>E.coli</i>	İ8 <i>Enterobacter</i> spp.
	T21 <i>E.coli</i>	İ11 <i>Enterobacter</i> spp.
	T22 <i>E.coli</i>	
	T23 <i>Enterobacter</i> spp.	
2 (%12,4)	9 (%56,3)	5 (%31,3)

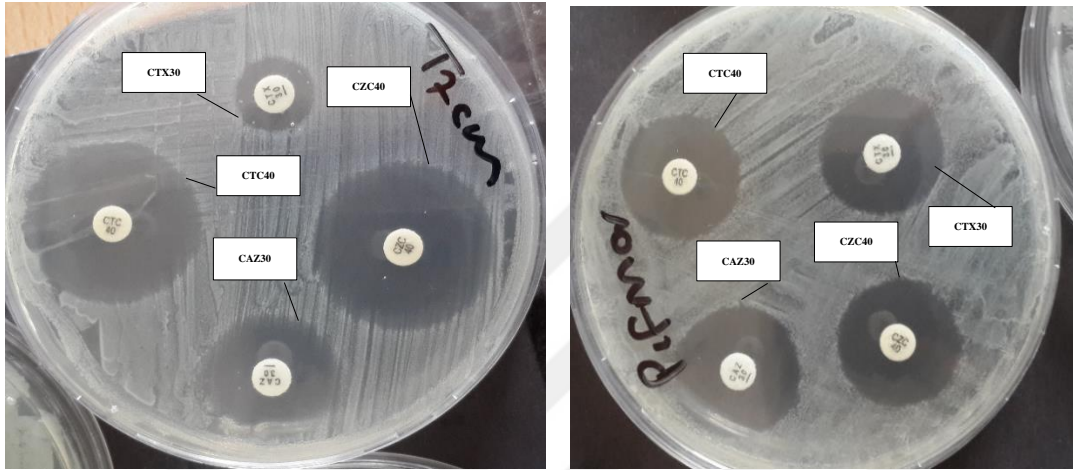
GSBL tarama test sonucu pozitif kabul edilen Enterobacteriaceae izolatlarının tür düzeyinde dağılımı Çizelge 4.18’de gösterilmiştir. Tarama testi pozitif çıkan 16 adet izolatın %62,5’i *Enterobacter* spp. (10 adet), %18,8’i *E.coli* (3 adet) ve % 6,3 oranında da *Citrobacter* spp. (1 adet), *Edwardsiella* spp. (1 adet), *Klebsiella* spp. (1 adet) olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.18. EUCAST ve CLSI sınır değerlerine göre en az bir antibiyotiğe direnç gösteren suşların cins dağılımları

Enterobacteriaceae	Sayı (%)
<i>Enterobacter</i> spp.	10 (62,5)
<i>Citrobacter</i> spp.	1 (6,3)
<i>Edwardsiella</i> spp.	1 (6,3)
<i>Klebsiella</i> spp.	1 (6,3)
<i>E.coli</i>	3 (18,8)
Toplam	16 (100)

4.6.2. GSBL Aktivitesi Doğrulama Sonuçları

GSBL aktivitesinin *in vitro* olarak klavulanik asit ile inhibisyonu temelli fenotipik yöntemlerden Ulusal Mikrobiyoloji Standartları GSBL Saptama ve Karbapenemaz Testleri Prosedüründe yer alan Kombinasyon Disk Testi (KDT) kullanılmıştır (UMS, 2015). GSBL doğrulama KDT, GSBL tarama testinde en az bir antibiyotiğe direnç gösteren 16 adet izolat için gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.2 KDT sonuçları negatif ve pozitif olan izolatlar gösterilmiştir.



Şekil 4.2. GSBL aktivitesi doğrulama (kombinasyon disk difüzyon yöntemi) testi negatif (soldaki şekil) ve pozitif (sağdaki şekil) sonuçlara sahip bazı izolatlar

16 izolattan 7 (%43,8) tanesinin GSBL aktivitesi KDT yöntemine göre doğrulanmıştır. Toplam alınan izolat sayısına göre elde edilen GSBL Enterobacteriaceae oranı %1,43 (7/490), Hicrome ESBL agardan elde ettiğimiz GSBL şüpheli Enterobacteriaceae sayısına göre GSBL aktivitesi doğrulanmış izolat oranı %2,02 (7/347) ve biyokimyasal testler ile Enterobacteriaceae olduğu tanımlanmış izolat sayısına göre GSBL pozitif Enterobacteriaceae oranı ise %10,94 (7/64) olarak tespit edilmiştir.

64 adet GSBL pozitif Enterobacteriaceae izolatlarından 7 (%10,9) tanesinin doğrulanmış GSBL aktivitesine sahip olduğu saptanmıştır. Bu izolatların 5 tanesi tank örnekleri (%71,43) ve 2 tanesi ise işletme örneklerine (%28,73) aittir. Çizelge 4.19 ve 4.20’de GSBL aktivitesi doğrulanan örneklerin biyokimyasal testler ve API 20E test kiti ile cins ve tür bazında dağılımı gösterilmiştir. GSBL aktivitesi doğrulanmış örneklerin biyokimyasal testler ile 3 tanesi *E.coli*, 2 tanesi *Enterobacter* spp. ve 1’er taneleri ise *Klebsiella* spp. ve *Edwardsiella* spp. olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.19. GSBL aktivitesi doğrulanmış suşların cins ve tür tanımlamaları

İzolat Kodları	IMVIC ve bazı biyokimyasal testlere göre GSBL aktivitesine sahip izolatların cins ve türleri	API 20E'e tanımlama testine göre GSBL aktivitesine sahip izolatların cins ve türleri
T16	<i>Klebsiella</i> spp.	<i>Klebsiella pneumonia</i> subsp. <i>ozonae</i>
T17	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>
T21	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>
T22	<i>E.coli</i>	<i>E.coli</i>
T23	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>E.coli</i>
İ4	<i>Enterobacter</i> spp.	<i>Enterobacter cloacae</i>
İ6	<i>Edwardsiella</i> spp.	<i>E.coli</i>

Çizelge 4.20. GSBL aktivitesi doğrulanmış suşların cins ve tür oranları

IMVIC ve bazı biyokimyasal testlere göre GSBL aktivitesine sahip izolatların cins ve türleri	n(%)	API 20E'e tanımlama testine göre GSBL aktivitesine sahip izolatların cins ve türleri	n(%)
<i>E.coli</i>	3(%43)	<i>E.coli</i>	5(%72)
<i>Klebsiella</i> spp.	1(%14)	<i>Enterobacter cloacae</i>	1(%14)
<i>Enterobacter</i> spp.	2(%29)	<i>Klebsiella pneumonia</i> subsp. <i>ozonae</i>	1(%14)
<i>Edwardsiella</i> spp.	1(%14)		
Toplam	7(%100)	Toplam	7(%100)

GSBL aktivitesi doğrulanmış izolatların örnekleme yerlerine göre dağılımı Çizelge 4.21'de gösterilmiştir. Bu örneklerden %71'i çiğ süt tank örneklerine ait iken %29'u peynir üretim hattından alınan işletme örneklerine aittir. Müstahsil güğümlerinden alınan çiğ süt örneklerinde elde edilen herhangi bir Enterobacteriaceae izolatının GSBL aktivitesi KDT ile doğrulanmamıştır.

Çizelge 4.21. GSBL aktivitesi doğrulanmış Enterobacteriaceae izolatlarının örnekleme yerlerine göre dağılımı

Örnekleme yerleri	GSBL aktivitesi doğrulanmış Enterobacteriaceae izolatlarındaki oran	Tanımlanmış Enterobacteriaceae izolatlarındaki oran	HiCrome ESBL agardan üreyen Enterobacteriaceae şüpheli izolatlardaki oran	Alınan Tüm Enterobacteriaceae şüpheli izolatlardaki oran
Müstahsil	0	0/26 (%0,00)	0/244 (%0,00)	0/350 (%0,00)
Süt Toplama Tankları	5/7 (%71,43)	5/23 (%21,74)	5/35 (%14,29)	5/64 (%7,81)
İşletme	2/7 (%28,57)	2/15 (%13,33)	2/68 (%2,94)	2/76 (%2,63)
TOPLAM	7 (%100)	7/64 (%10,94)	7/347 (%2,02)	7/490 (%1,43)

Türkiye’de yapılan çalışmalarda süt ve peynirlerden izole edilen GSBL pozitif Enterobacteriaceae cinsleri %17 ile %35 arasında değişen oranlarda tespit edilmiştir. Gundogan ve Yakar (2007), çiğ süt ve peynir örneklerinde %34,9 (15/43) oranında GSBL pozitif *Klebsiella* spp. belirlemiştir. Çalışmamızda GSBL pozitif 7 adet izolattan 1 tanesi (%14) *Klebsiella* spp. olarak tanımlanmıştır. Gundogan ve Avcı (2013) Ankara’da piyasadan topladığı, süt ve peynir örneklerinden elde ettiği 48 adet *Enterobacteriaceae* izolatlarının %23 (11/48)’ünü GSBL pozitif bulmuşlardır. Çalışmamızda ise 64 adet GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatın %10,4 (7/64)’ünün GSBL pozitif olduğu doğrulanmıştır ve daha düşük bir oranda olduğu tespit edilmiştir. Kürekci ve ark. (2016) Türkiye’deki peynirlerde %13,8 oranında GSBL pozitif *E.coli* tespit etmişlerdir.

Peynir üretim aşamalarından aldığımız toplam 76 izolatın %2,63 (2/76)’ünün GSBL pozitif olduğu tespit edilmiştir. Özadam ve Özpınar (2016), 83 adet peynir örneğinden elde ettiği 18 adet *E.coli* ve *Klebsiella* spp. suşunun %50 (9/18)’sini GSBL pozitif olarak tespit etmişlerdir. Çalışmamızda GSBL pozitif suşların % 60 (3/5)’i *E.coli*, % 7,69 (1/13)’ü *Klebsiella* spp. olarak belirlenmiştir. Tekiner ve Özpınar (2016) ise piyasadan toplanan 150 adet çiğ süt ve peynir örneklerinde %17 (26/150) oranında GSBL pozitif Enterobacteriaceae izolasyonu yapmışlardır.

Çalışmamızda toplam 173 örnek incelenmiş olup %4,05 (7/173)’inden GSBL pozitif izolat elde edilmiştir. Bu çalışmada önceki çalışmalara göre daha düşük oranlarda GSBL pozitif Enterobacteriaceae bulmamızın nedeni önceki çalışmalarda örneklerin farklı piyasa koşullarından toplanması, çalışmamızın ise üretim hattından alınan örneklerde gerçekleştirilmesi olabilir. Üretim sonrası depolama, taşıma ve satış aşamalarında olabilecek kontaminasyonlar düşünüldüğünde piyasadan toplanan örneklerde elde edilen GSBL pozitif

izolatların oranının daha yüksek olması beklenen bir sonuçtur.

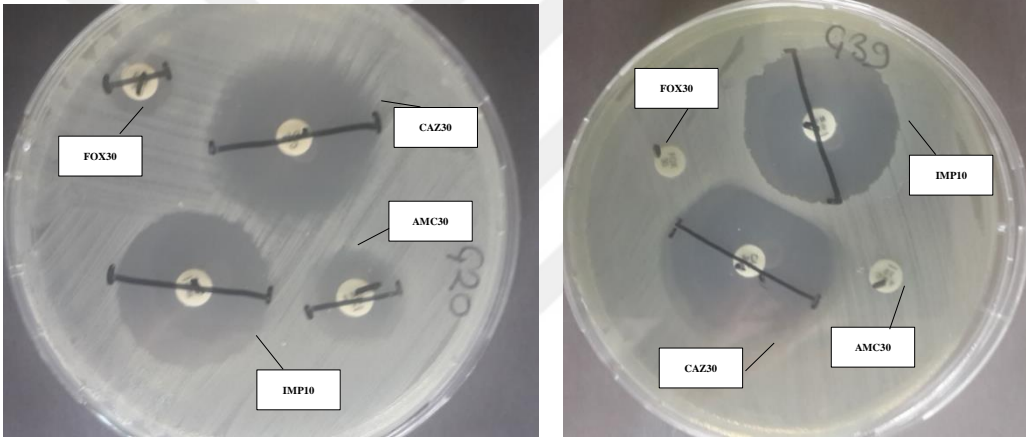
Dias ve ark (2012) ise Rio de Janeiro da ticari olarak satılan Minas yumuşak peynirlerden izole ettikleri *E.coli* suşlarının seftazidim ve sefotaksime %100 duyarlı olduğunu bulmuşlardır ve izolatların GSBL aktivitesini negatif olarak ifade etmişlerdir. Ahmed ve Shimamoto, (2015) Mısır'da 800 adet süt ve süt ürünleri örneğinden 29 adet STEC O157:H7 izole etmiş, 19 izolatta (%65,5) beta-laktamaz geni olduğunu bildirmişlerdir. Vrabec ve ark. (2015) tarafından taze Slovak peynirinden izole edilen *E.coli* izolatlarının %42,22'sinde GSBL üretiminin pozitif olduğunu bulmuşlardır. Odenthal ve ark. (2016) yaptıkları çalışmada toplama tanklarında sefotaksim dirençli GSBL şüpheli *Enterobacteriaceae*'ları %9,5 (82/866) oranında tespit etmişlerdir. Bu çalışmada ise toplama tanklarından alınan 64 izolatın %54,69 (35/64)'ü GSBL şüpheli, %7,81 (5/64)'i ise GSBL pozitif olarak tespit edilmiştir. Diğer çalışmalarda elde edilen sonuçlar ile bu çalışmadaki oranlar benzerdir. Fakat ülkemizde süt toplama tanklarına yönelik diğer çalışmalar eklendiğinde ülke bazında karşılaştırmalar yapılabilir.

Ntuli ve ark. (2017) Güney Afrika'nın farklı bölgelerinden çiğ ve pastörize süt toplama tank örneklerinden izole edilen 121 *E.coli*'nin %97,5'inin sefotaksime duyarlı, %66,1'inin sefodoksime dirençli olduğunu tespit etmişlerdir. İzolatların %3,3'ünde GSBL üretimi tespit edilmiştir. Daha öncedeki çalışmalarda süt toplama tanklarının kontrolünün önemi vurgulanmıştır (Straley ve ark., 2006; Berge ve ark., 2007; Sudarwanto ve ark., 2015; Azevedo ve ark., 2016; Decimo ve ark., 2016; Odenthal ve ark., 2016; Ntuli ve ark., 2017).

Çalışmada GSBL aktivitesi pozitif örnek oranı %4,05 (7/173) olarak belirlenmiştir. Bu sonucun süt ve süt ürünlerini kapsayan ve piyasa taraması olarak Tekiner ve Özpinar (2016), Odenthal ve ark. (2016) tarafından yapılan çalışmaların sonuçlarından az olduğu tespit edilmiştir. Piyasa taraması şeklinde yapılan örnekleme sonucu GSBL aktivitesi araştırılan süt ve süt ürünlerinde oranların yüksek çıkmasının en önemli nedeni, ürünlerin üretim sonrası taşıma ve depolama gibi aşamalarda kontamine olma olasılığının olmasıdır. Çalışmamızda peynir üretim süreci ele alınmış ve depolama, paketlenme ve satış gibi üretim sonrasındaki aşamalarda olabilecek kontaminasyonlar bertaraf edilmiştir. Araştırmalardaki örnekleme yöntemlerini ve sonuçları karşılaştırdığımızda süt ve süt ürünlerinin üretim sonrası kontaminasyonun daha fazla olduğunu ve üretim sonrası GSBL aktivitesine sahip mikroorganizmalar ile kontaminasyonun en önemli kaynağının taşıyıcısı olan insanların olduğunu düşünmemiz yanlış olmayacaktır. Kesin bir yargıya varılması için üretim hattı çalışmaları dünyada ve ülkemizde arttırılmalıdır. Bunu yanı sıra örnek alınan bölgenin sınırlı olması sonuçları etkilemiş olabilir.

4.6.3. AmpC Aktivitesi Sonuçları

AmpC beta-laktamazlar GSBL'lere göre daha az yaygın olmakla beraber, daha geniş bir antibiyotik direnç profili sergilemeleri açısından önemlidir (Black ve ark., 2005; Sarı ve ark., 2013). İndüklenebilir AmpC beta-laktamaza sahip bakteriler tedavide başarısızlığa ve infeksiyonlarda mortalite artışına neden oldukları için, gram negatif bakterilerin indüklenebilir beta-laktamaz (İBL) aktivitesi yönünden de tetkik edilmesi gerektiği araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Coşkun ve Altanlar, 2012b; Öcal, 2012; Gupta ve ark., 2014). Bu çalışmada 64 adet GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatlarında AmpC beta-laktamaz aktivitesi fenotipik olarak araştırılmıştır. Şekil 4.3'te görüldüğü gibi seftazidim 10 µg (CAZ10) zonunun imipenem 10 µg (IMP10) diski yönüne bakan kısmında görülen düzleşme gösteren izolatların AmpC beta-laktamaz aktivitesi pozitif olarak kabul edilmiştir.



Şekil 4.3. AmpC beta-laktamaz aktivitesi tarama testi pozitif (soldaki şekil) ve negatif (sağdaki şekil) izolatlar

64 GSBL şüpheli Enterobacteriaceae izolatlarının 31 (%48,4) tanesi AmpC beta-laktamaz ön tarama analizinde pozitif reaksiyon vermiştir. AmpC beta-laktamaz fenotipik tarama testi pozitif olan örneklerin 13 (%42)'ünü süt toplama tankı örneklerinden elde edilen izolatlar oluşturmuştur. AmpC beta-laktamaz pozitif 31 adet Enterobacteriaceae izolatlarının cins düzeyindeki dağılımı Çizelge 4.22'de gösterilmiştir. Pozitif izolatların 23'ü *Enterobacter* spp. (%74,2), 5'i *Citrobacter* spp. (%16,1), 2'si *Klebsiella* spp. (%6,5) ve 1'i de *E.coli* (%3,2) olarak tanımlanmıştır.

Çizelge 4.22. AmpC beta- laktamaz pozitif Enterobacteriaceae izolatlarının cins düzeyinde dağılımı ve % oranları

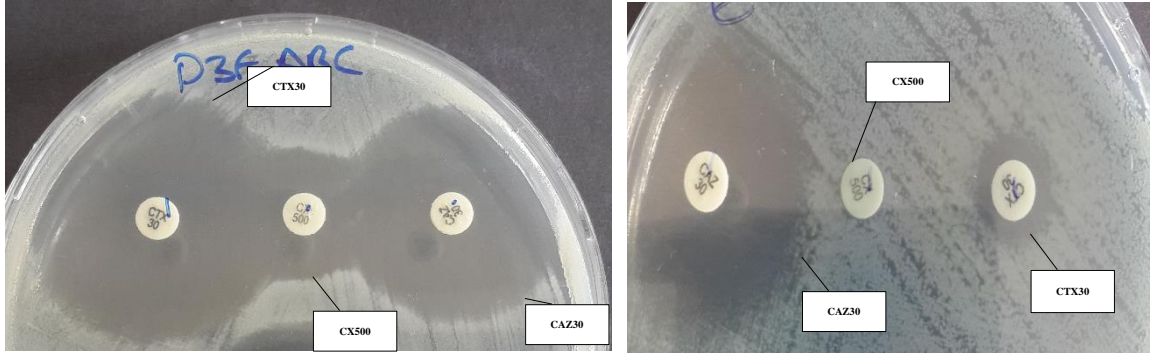
	Süt toplama			Toplam AmpC + n (%)
	Müstahsil AmpC + n (%)	tankları AmpC + n (%)	İşletme AmpC + n (%)	
<i>Enterobacter spp.</i>	5 (55,6)	11 (84,6)	7 (77,8)	23 (74,2)
<i>Citrobacter spp.</i>	2 (22,2)	1 (7,7)	2 (22,2)	5 (16,1)
<i>E.coli</i>	1 (11,1)	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (3,2)
<i>Klebsiella spp.</i>	1 (11,1)	1 (7,7)	0 (0,0)	2 (6,5)
Toplam	9 (100,0)	13 (100,0)	9 (100,0)	31 (100,0)

+: pozitif

4.6.4. AmpC Aktivitesi Doğrulama Sonuçları

AmpC beta-laktamaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilen suşların, AmpC beta-laktamaz aktivitesi ikinci bir yöntem ile doğrulanmıştır. CLSI'nın önerisine göre kloksasilin ile çift disk sinerji testi uygulanmıştır. Şekil 4.4'te gösterildiği gibi test yönteminde kullanılan sefalosporinlerden herhangi birinde kloksasiline doğru görülen zon genişlemesi AmpC beta-laktamaz aktivitesi pozitif olarak değerlendirilmiştir (Mirelis ve ark., 2006; Empel ve ark., 2008; Coşkun, 2011; Coşkun ve Altanlar, 2012b). Ön tarama testinde AmpC beta-laktamaz aktivitesi gösteren 31 adet izolatın 27 (%97,1) tanesi çift disk sinerji testi ile doğrulanırken, 4 izolat (%12,9) doğrulanmamıştır. AmpC beta-laktamaz aktivitesi doğrulanmayan izolatlar; M20 (*E.coli* O157), T19 (*Enterobacter spp.*), T23 (*Enterobacter spp.*) ve İ7 (*Enterobacter spp.*) izolatlarıdır.

Çalışmamızda toplam alınan 490 adet izolatın %5,5'inde, GSBL aktivitesi HiCrome ESBL agarda tespit edilen 347 izolatın %7,8'inde, biyokimyasal testleri ile Enterobacteriaceae olarak tanımlanan 64 adet izolatın ise %42,2'sinde AmpC beta-laktamaz aktivitesi doğrulanmıştır. Sonuçlar Çizelge 4.23'de gösterilmiştir.



Şekil 4.4. AmpC beta-laktamaz aktivitesi doğrulama testi pozitif (soldaki şekil) ve negatif (sağdaki şekil) izolatlar

Toplam 490 izolattan %5,51 (27/490)'inde, 173 örnekten %15,61 (27/173)'inde AmpC beta-laktamaz aktivitesi fenotipik olarak iki farklı yöntem ile tespit edilmiştir. GSBL aktivitesi oranları sırasıyla %1,42 (7/490) ve %4,05 (7/173) olarak belirlenirken, AmpC beta-laktamaz aktivitesi daha yüksek oranlarda tespit edilmiştir. AmpC üretiminin fazla olması GSBL üretimini baskılayabilmektedir (Song ve ark., 2007).

Amerika'da mastitisli hayvanlardan izole edilen 135 adet *E.coli* izolatının %94,1 (127)'inin GSBL pozitif olduğu, %91,1 (123)'inin ampC geni taşıdığı tespit edilmiştir. Almanya'daki süt ve et çiftliklerinden elde edilen 598 izolattın %32,8'inin (196) GSBL pozitif *E.coli* olduğu, bu 196 izolatın %23,5 (46 adet)'inin ampC geni taşıdığı belirlenmiştir (Schmid ve ark., 2013). 42 adet *E.coli*, 22 adet *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatlarından sadece *E.coli* izolatlarının %19'u (8 adet) fenotipik olarak ampC pozitif bulunmuştur (Alp ve ark., 2013). 83 adet peynir örneğinden elde edilen *Enterobacteriaceae* izolatlarının %50 (9/18)'sinin AmpC pozitif olduğu bulunmuştur (Özadam ve Özpınar, 2016). Çalışmamızda ise 173 örneğin %15,6 (27 adet)'sının, 64 adet *Enterobacteriaceae* cinsinin %42,2 (27 adet)'sinin fenotipik olarak AmpC beta-laktamaz aktivitesi pozitif olduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.23. AmpC beta-laktamaz aktivitesi doğrulanmış izolatlar ve % oranları

Örnekleme yeri	AmpC beta-laktamaz +izolatlar	N (%)	Tanımlanan Enterobacteriaceae izolatlarındaki oran	HiCrome ESBL agardan üreyen Enterobacteriaceae şüpheli izolatlardaki oran	Alınan Tüm Enterobacteriaceae şüpheli izolatlardaki oran
Müstahsil	M4 <i>Citrobacter</i> spp.				
	M10 <i>Enterobacter</i> spp.				
	M12 <i>Citrobacter</i> spp.				
	M18 <i>Enterobacter</i> spp.	8	8/26	8/244	8/350
	M19 <i>Enterobacter</i> spp.	(%29,6)	(%30,8)	(%3,3)	(%2,3)
	M21 <i>Enterobacter</i> spp.				
	M22 <i>Klebsiella</i> spp.				
	M26 <i>Enterobacter</i> spp.				
Süt Toplama Tankları	T4 <i>Citrobacter</i> spp.				
	T5 <i>Enterobacter</i> spp.				
	T6 <i>Enterobacter</i> spp.				
	T7 <i>Enterobacter</i> spp.				
	T8 <i>Enterobacter</i> spp.				
	T10 <i>Klebsiella</i> spp.	11	11/23	11/35	11/64
	T12 <i>Enterobacter</i> spp.	(%40,7)	(%47,8)	(%31,4)	(%17,2)
	T14 <i>Enterobacter</i> spp.				
	T15 <i>Enterobacter</i> spp.				
	T18 <i>Enterobacter</i> spp.				
T20 <i>Enterobacter</i> spp.					
İşletme	İ1 <i>Enterobacter</i> spp.				
	İ3 <i>Citrobacter</i> spp.				
	İ5 <i>Citrobacter</i> spp.				
	İ8 <i>Enterobacter</i> spp.	8	8/15	8/68	8/76
	İ9 <i>Enterobacter</i> spp.	(%29,6)	(%53,3)	(%11,8)	(%10,5)
	İ10 <i>Enterobacter</i> spp.				
	İ12 <i>Enterobacter</i> spp.				
İ15 <i>Enterobacter</i> spp.					
TOPLAM		27 (%100)	27/64 (%42,2)	27/347 (%7,8)	27/490 (%5,5)

AmpC beta-laktamaz üreten suşların hepsi amoksisilin klavulanik asite (AMC) dirençli (<19mm) bulunmuştur. Bu sonuçlara göre bölgede yoğun olarak penisilin ve beta-laktamaz inhibitörü konsantrasyonlarının kullanılması ile AmpC direncinin geliştiğini söylenebilir (Jacoby, 2009; Gümüş, 2015). Beta-laktamaz inhibitörlerine direnç, yüksek oranda penisiliaz üretimi, dış membran proteinlerindeki değişim, kromozomal AmpC tipi enzimlerin üretimi gibi bilinen mekanizmaların sorumlu olduğu ifade edilmiştir (Gülay ve ark., 2001). *E.coli* ve diğer Enterobacteriaceae suşlarında beta-laktam/beta-laktamaz inhibitör kombinasyonlarından birisi olan AMC'lere direnç ilk defa 1987 yılında

tanımlanmış olup, bu direncin TEM-1'kökenli olduğu ve beta-laktamaz inhibitörlerine direnç gösteren TEM mutantlarının da bu dirençten sorumlu olduğu bildirilmiştir (Martinez ve ark., 1987; Gülay ve ark., 2001). GSBL'lerin aksine plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz enzimlerinin beta-laktamaz inhibitörlerine karşı direnç gösterdiği ifade edilmiştir (Philippon ve ark., 2002). AmpC direncinin beta-laktamaz inhibitörlerine dirençli genlerin (TEM) varlığında veya fazla üretilen GSBL enzimlerinin ve OXA tipi enzimlerin varlığında da görülebildiği belirtilmiştir (Coşkun, 2011).

Plazmid kökenli AmpC beta-laktamazlar ilk olarak 1988 yılında *E.coli* ve *K.pneumoniae*'da rapor edilmiş olup, yapılan araştırmalar *E. cloacae*, *C. freundii*, *M. morgani*, *H.alvei* gibi kromozomal AmpC geni taşıyan bakterilerdeki direnç genlerinin plazmidlere aktarılması sonucu ortaya çıktıklarını göstermiştir (Moland ve ark., 2008; Uluşan, 2009). Kromozomal enzimlerden farklı olarak yüksek düzeyde enzim ürettikleri de araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Moland ve ark., 2008; Uluşan, 2009). Plazmid aracılı AmpC betalaktamaz aktivitesinin tanımlanmasında kullanılacak fenotipik testlerinden biri sefoksitine karşı azalmış duyarlılığın (≤ 14 mm) varlığı olduğu ifade edilmiştir (Doi ve Paterson, 2007; Thomson, 2010; EFSA, 2011; CLSI, 2011). Bu çalışmada AmpC beta-laktamaz aktivitesini pozitif bulunan M19 (*Enterobacter* spp.) ve M21 (*Enterobacter* spp.) izolatları sefoksitine orta derecede dirençli, diğer AmpC beta-laktamaz pozitif olan izolatlar ise sefoksitine dirençli bulunmuştur. Araştırmacıların önerdiği sefoksitine karşı azalmış duyarlılığın belirlenmesi AmpC beta-laktamaz aktivitesinin tanımlanması bu sonuçlar ile desteklenmiştir.

Diğer taraftan AmpC beta-laktamaz taramasında sefoksitin (FOX) yerine sefpodoksim (CPD) kullanılması bazı araştırmacılar tarafından önerilmiştir. Sefpodoksimin, porin kaybı ve metallobeta-laktamazdan kaynaklı sefoksitin direncini önleyerek sadece AmpC beta-laktamazları belirlediği araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Nadjar ve ark., 2000; Arora ve Bal, 2005; Brenwald ve ark., 2005; Ak, 2008 ;Coşkun, 2011). Bu çalışmada ise AmpC pozitif suşları FOX30'a direnç gösterirken CPD10'a karşı T5 (*Enterobacter* spp.), T6 (*Enterobacter* spp.), ve M26 (*Enterobacter* spp.) izolatları haricinde duyarlı (direnç <17 mm) bulunmuştur. Araştırmacılar tarafından sefoksitin direnci veya azalmış duyarlılık plazmid aracılı AmpC beta-laktamaz pozitif olarak yorumlansada sefoksitine duyarlı AmpC beta-laktamazlarda tespit edilmiştir (Nadjar ve ark., 2000; Ak, 2008). Ayrıca AmpC pozitif izolatlarda porin kaybı veya değişimi, membran geçirgenliğinin azalması gibi nedenlerden dolayı sefoksitin direnci gözlenmişse olabileceği bildirilmiştir (Doi ve Paterson, 2007).

Paşa, (2013) klinik izolatlarda imipenem (IMP) gibi zayıf AmpC üretimini

indükleyiciler varlığında zon küçülmesi gösteren izolatları indüklenebilir AmpC tipi beta-laktamaz varlığı açısından pozitif değerlendirmiş, sefoksitine direnç gösterirken imipeneme duyarlı bakterileri ise indüklenmeyen-stabil dereprese mutant AmpC beta-laktamaz pozitif olarak yorumlamıştır. Çalışmamızda T12 (*Enterobacter* spp.) izolatı IMP'e dirençli (≤ 23 mm) tespit edilmiştir. Diğer AmpC beta-laktamaz pozitif suşlar ise IMP'e duyarlılık göstermiştir. İndüklenebilen plazmid aracılı AmpC enzimleri üreten izolatlar, kromozomal AmpC enzimlerini taşıyan izolatlar gibi 3. kuşak sefalosporinlere duyarlı gözükmekte fakat indükleyici ajan varlığında inhibitörlere direnç göstermektedir. Bu durum klinikte önemli bir sorun haline gelmiştir (Pai ve ark., 2004; Black ve ark., 2005; Coşkun, 2011). *Enterobacter* türleri arasında bu sorunun %20 düzeyinde olduğu bildirilmiştir (Ak, 2008). Ayrıca imipenem, meopenem gibi karbapenemler, GSBL ve/veya AmpC tipi beta-laktamaz üreten birçok Enterobacteriaceae üyelerine karşı tedavi amaçlı kullanılmakla beraber son yıllarda direnç gösteren suşlara rastlanıldığı araştırmacılar tarafından ifade edilmektedir (Pillai ve ark., 2009; Michalopoulos ve ark., 2010; Kuzucu ve ark., 2011). T12 (*Enterobacter* spp.) izolatının IMP direncinde karbapenemaz üretimi söz konusu olabilir. Fakat karbapenemaz üretiminin doğrulanması için sadece IMP karşı direnç göstermesi yeterli değildir. Karbapenemaz üretiminin doğrulanması için ileri araştırmaların yapılması gerekmektedir.

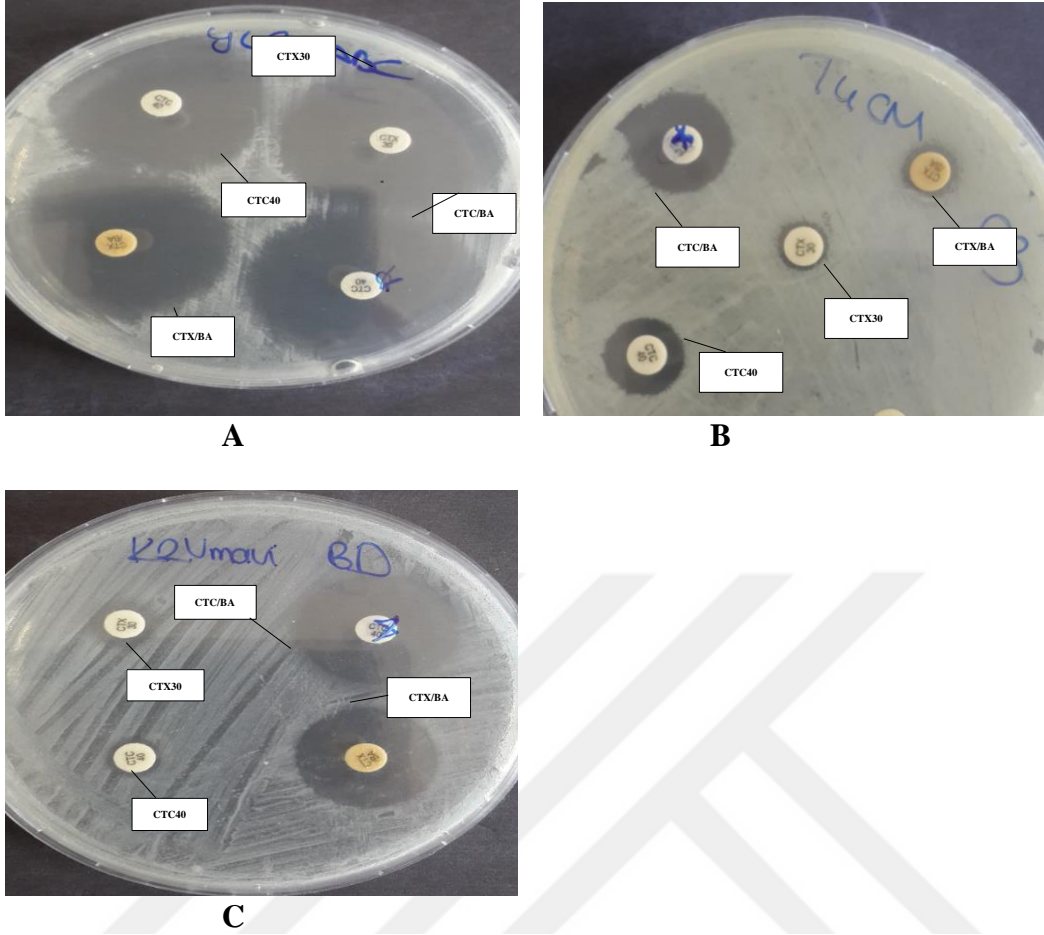
Kromozomal AmpC beta-laktamaz üretiminin uyarılması ile bakterilerin aminopenisilinlere ve betalaktamaz inhibitörlerine karşı direnç oluşturması, sefotaksim ve seftazidim gibi üçüncü kuşak sefalosporinlere ve karbapenemlere karşı duyarlılık göstermesi doğal beta-laktamaz direnci olarak ifade edilmiştir (Livermore ve Brown, 2001; Coşkun, 2011). Bu çalışmada AmpC pozitif olarak değerlendirilen izolatlar buradaki tanımlamaya da uymaktadır. Bu izolatlar sefotaksim (CTX30) ve seftazidime (CAZ30) duyarlılık, amoksisilin klavulanik asite direnç göstermişlerdir. Bu ise izolatların kromozomal indüklenebilir ampC geni taşıdığı düşüncesini getirmektedir. Bu genler *Enterobacter* spp., *C. freundii*, *H. alvei*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *Providencia* spp., *P. aeruginosa* ve *Aeromonas* spp. gibi gram negatif bakterilerde bulunurken, *E.coli* ve *Shigella* spp.'da kromozomal AmpC beta-laktamazların düşük düzeyde sentezlendikleri, *K. pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *P. mirabilis* ve *Salmonella* spp.'da ise kromozomal ampC geninin olmadığı ifade edilmiştir (Jacoby, 2009; Thomson, 2010; Uluşan, 2009). Kromozomal ampC geni tarafından AmpC beta-laktamaz enziminin düşük düzeyde sentezlenmesi mikroorganizmalarda direnç oluşturmaz iken mutasyonlar sonucu veya uyarıcı ajanlar nedeniyle kromozomal ampC geni tarafından yüksek düzeyde AmpC beta-laktamaz

enziminin sentezlenmesi ve mikroorganizmaların direnç göstermesinin mümkün olduğu araştırmacılar tarafından bildirilmiştir (Jacoby, 2009; Uluşan, 2009).

AmpC beta-laktamaz aktivitesinin nedeninin kromozomal mı yoksa plazmid kökenli mi? olduğunu belirlemek için fenotipik yöntemler yetersiz kalmaktadır (Thomson, 2010). Çalışmamızda fenotipik yöntemler ile AmpC beta-laktamaz aktivitesinin varlığı tespit edilmeye çalışılmıştır. Ancak en doğru sonuçlar gen analizleri ile alınabilmektedir. İleride yapılacak çalışmalarda moleküler analizler ile doğrulanması öngürüsü ile izolatlar sadece AmpC beta-laktamaz pozitif olarak değerlendirilmiştir.

4.6.5. BA-CA Analizi ile AmpC ve GSBL Test Sonuçları

GSBL ve/veya AmpC beta-laktamaz aktivitesi negatif bulunan Enterobacteriaceae izolatlarında AmpC beta-laktamaza bağlı yanlış GSBL negatifliğini veya GSBL'ye bağlı yanlış AmpC beta-laktamaz negatifliğini ortadan kaldırmak için BA (boronik asit) –CA (klavulanik asit) yöntemi uygulanmıştır. Sefalosporin+BA+CA diski etrafındaki inhibisyon zon çapının, sefalosporin+BA diski etrafındaki inhibisyon çapından ≥ 5 mm olması durumunda, test edilen izolatin fenotipik olarak GSBL olduğu kabul edilmiştir (Coudron, 2005; Song ve ark., 2007; Coşkun, 2011). Şekil 4.5'da pozitif ve negatif sonuçlar gösterilmiştir. Bu testin sonucunda M25 (*Klebsiella* spp.) kodlu müstahsil izolatu GSBL aktivitesi pozitif bulunmuştur. Sefalosporin +CA+BA diski etrafındaki inhibisyon zon çapının, sefalosporin+CA diski etrafındaki inhibisyon zon çapından ≥ 5 mm olduğunda, test edilen izolatta fenotipik olarak AmpC beta-laktamaz olduğu kabul edilmiştir. M25 (*Klebsiella* spp.), İ2 (*Enterobacter* spp.) ve İ4 (*Enterobacter* spp.) örneklerinde AmpC beta-laktamaz pozitif olarak bulunmuştur.



Şekil 4.5. BA-CA analizi ile negatif sonuç verilen izolat A (örneği sol üstte), GSBL pozitif sonuç alınan izolat B (sağ üstte) ve AmpC beta- laktamaz pozitif sonuç alınan izolat C (alt orta) zon çapları

4.6.6. Diğer Antibiyotik Dirençleri

Yapılan antimikrobiyal duyarlık testlerinde farklı antibiyotik disklerine karşı direnç gösteren izolatlar Çizelge 4.24'te gösterilmiştir. Tüm doğrulanmış AmpC pozitif (T8, *Enterobacter* spp. hariç) izolatlarda sefoksitin (FOX30) ve amoksisilin-klavulanik asit (AMC30) direnci tespit edilmiştir. Klavulanik asit bir betalaktamaz inhibitörüdür. AMC30 direnci önceki çalışmalarda TEM-1 ve TEM-2 gen varlığı göstergesi olarak değerlendirilmiştir (Gülay ve ark., 2001). Ayrıca klavulanik asit ile inhibe olmayan OXA-24 tipi karbapenamaz varlığını düşündürmüştür (Dağlar ve Öngüt, 2012; UMS, 2015).

M20 izolatı *E.coli* O157 olarak tanımlanmıştır. Bu izolatın GSBL ve AmpC aktivitesi doğrulanmaz iken sefoksitin, imipenem ve amoksisilin-klavulanik asite karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Kim ve ark. (1994) tarafından Washington'da yapılan bir çalışmada 1984-1987 yılları arasında elde edilen 56 adet *E.coli* O157:H7 izolatlarının amoksisilin-

klavulanik, ampisilin, seftazidim, seftriakson, tetrasiklin gibi antibiyotiklere duyarlı olduğu tespit edilmişken, 1989-1991 yılları arasında elde edilen 176 adet *E.coli* O157:H7 izolatın 13 tanesi streptomisin, sulfafurazole ve tetrasikline karşı dirençli olduğu tespit edilmiştir. Benzer şekilde Meng ve ark. (1998) sığırlardan, gıdalardan ve insanlardan izole edilen *E.coli* O157:H7 ve O157:NM izolatların en fazla streptomisin, sonra tetrasikline direnç gösterdiğini tespit etmişlerdir. Schroeder ve ark. (2002) ve Mora ve ark. (2005) farklı kaynaklardan izole edilen *E.coli* O157:H7 ve non O157 suşların sırasıyla en fazla sülfametoksazol (%74) ve sulfafurazol (%36)'e karşı dirençli olduklarını belirlemişlerdir.

M20 (*E.coli* O157) ve T12 (*Enterobacter* spp.) izolatlarında imipenem (IMP10) direnci karbapenem direnç varlığını gösterebilir. Fakat doğrulaması yapılmamıştır.

M18 (*Enterobacter* spp.), M22 (*Klebsiella* spp.), M26 (*Enterobacter* spp.), T23 (*Enterobacter* spp.) ve İ1 (*Enterobacter* spp.) izolatlarında kloksasilin (CX500) direnci gözlemlenmiştir. Bu direnç farklı bir (OXA) gen varlığının göstergesi olabilir. Kloksasilin AmpC inhibitörüdür. Testlere aşırı AmpC üretimi ve porin kaybı ile ortaya çıkan karbapenem direnci ile karbapenemaz üretiminin bir birinden ayrılması amacıyla ilave edilmektedir (EUCAST, 2013). CX500'e direnç gösteren izolatlarda karbapenemaz üretimi olup olmadığı ileriki çalışmalarda araştırılabilir.

Çizelge 4.24. Farklı antibiyotiklere direnç gösteren Enterobacteriaceae izolatları

Örnekleme yeri	Antibiyotik İsmi = Sınır değeri (zon çapı mm)			
	FOX30 <18 mm	IMP10<=23 mm	AMC30<19mm	CX500<=18mm
Müstahsil	M4, <i>Citrobacter</i> spp.		M4, <i>Citrobacter</i> spp.	
	M10, <i>Enterobacter</i> spp.		M10, <i>Enterobacter</i> spp.	
	M12, <i>Citrobacter</i> spp.		M12, <i>Citrobacter</i> spp.	
	M18, <i>Enterobacter</i> spp.		M18, <i>Enterobacter</i> spp.	M18, <i>Enterobacter</i> spp.
	M19, <i>Enterobacter</i> spp.	M20, <i>E.coli</i> O157	M19, <i>Enterobacter</i> spp.	M22, <i>Klebsiella</i> spp.
	M20, <i>E.coli</i> O157		M20, <i>E.coli</i> O157	M26, <i>Enterobacter</i> spp.
	M21, <i>Enterobacter</i> spp.		M21, <i>Enterobacter</i> spp.	
	M22, <i>Klebsiella</i> spp.		M22, <i>Klebsiella</i> spp.	
Süt Toplama Tankları	M26, <i>Enterobacter</i> spp.		M26, <i>Enterobacter</i> spp.	
	T4, <i>Citrobacter</i> spp.		T4, <i>Citrobacter</i> spp.	
	T5, <i>Enterobacter</i> spp.		T5, <i>Enterobacter</i> spp.	
	T6, <i>Enterobacter</i> spp.		T6, <i>Enterobacter</i> spp.	
	T7, <i>Enterobacter</i> spp.		T7, <i>Enterobacter</i> spp.	
	T8, <i>Enterobacter</i> spp.		T8, <i>Enterobacter</i> spp.	
	T10, <i>Klebsiella</i> spp.		T10, <i>Klebsiella</i> spp.	
	T12, <i>Enterobacter</i> spp.	T12, <i>Enterobacter</i> spp.	T12, <i>Enterobacter</i> spp.	T23, <i>Enterobacter</i> spp.
	T14, <i>Enterobacter</i> spp.		T14, <i>Enterobacter</i> spp.	
	T15, <i>Enterobacter</i> spp.		T15, <i>Enterobacter</i> spp.	
	T18, <i>Enterobacter</i> spp.		T18, <i>Enterobacter</i> spp.	
İşletme	T19, <i>Enterobacter</i> spp.		T19, <i>Enterobacter</i> spp.	
	T20, <i>Enterobacter</i> spp.		T20, <i>Enterobacter</i> spp.	
	T23, <i>Enterobacter</i> spp.		T23, <i>Enterobacter</i> spp.	
	İ1, <i>Enterobacter</i> spp.		İ1, <i>Enterobacter</i> spp.	
	İ3, <i>Citrobacter</i> spp.		İ3, <i>Citrobacter</i> spp.	
	İ5, <i>Citrobacter</i> spp.		İ5, <i>Citrobacter</i> spp.	
	İ7, <i>Enterobacter</i> spp.		İ7, <i>Enterobacter</i> spp.	
	İ8, <i>Enterobacter</i> spp.	-	İ8, <i>Enterobacter</i> spp.	İ1, <i>Enterobacter</i> spp.
İ9, <i>Enterobacter</i> spp.		İ9, <i>Enterobacter</i> spp.		
İ10, <i>Enterobacter</i> spp.		İ10, <i>Enterobacter</i> spp.		
İ12, <i>Enterobacter</i> spp.		İ12, <i>Enterobacter</i> spp.		
İ15, <i>Enterobacter</i> spp.		İ15, <i>Enterobacter</i> spp.		

*FOX30= Sefoksitin (Cefoxitin) 30 µg, IMP10= İmipenem (İmipenem) 10 µg, AMC30= Amoksisilin – klavulanik asit (Amoxicillin-clavulanate) 30 µg, CX500= Kloksasilin (Cloxacillin) 500 µg.

4.6.7. GSBL ve AmpC Beta-laktamaz Aktivitesi Sonuçlarının Dağılımı

Bu çalışmada toplanan Enterobacteriaceae şüpheli 490 adet izolatın %0,61'i GSBL+/AmpC +, %5,71'i GSBL - /AmpC +, %1,02'si GSBL +/AmpC - olarak belirlenmişken, HiCrome ESBL agarda üreyen 347 adet Enterobacteriaceae şüpheli izolatın ise %0,86'sı GSBL+/AmpC +, %8,07'si GSBL - /AmpC +, %1,44'ü ise GSBL +/AmpC - olarak tespit edilmiştir.

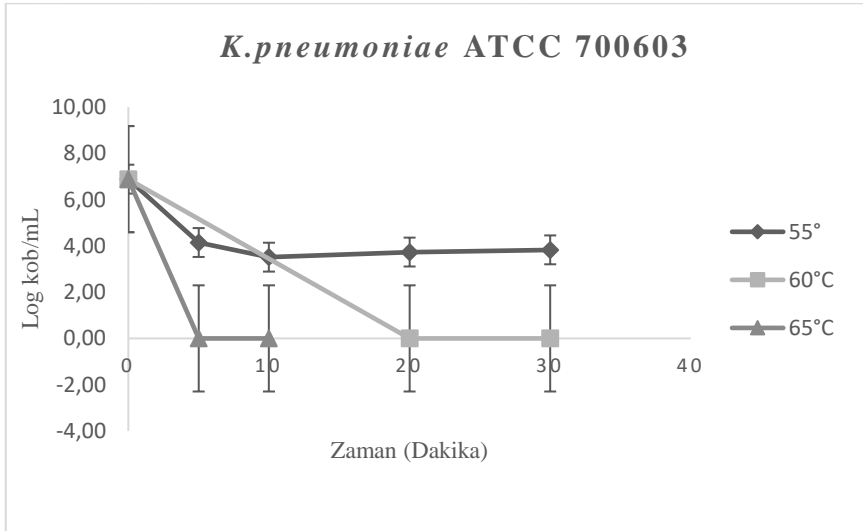
Bu çalışmada tespit edilen 64 adet Enterobacteriaceae izolatlarının %4,69'u GSBL+/AmpC +, %43,75'i GSBL - /AmpC +, %7,81'i ise GSBL +/AmpC - olarak tespit edilmiştir. Çizelge 4.25'te GSBL aktivitesi ve AmpC beta-laktamaz aktivitesi pozitif olan Enterobacteriaceae izolatları ve örnekleme yerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.25. GSBL ve AmpC beta-laktamaz aktivitesi gösteren izolatlar

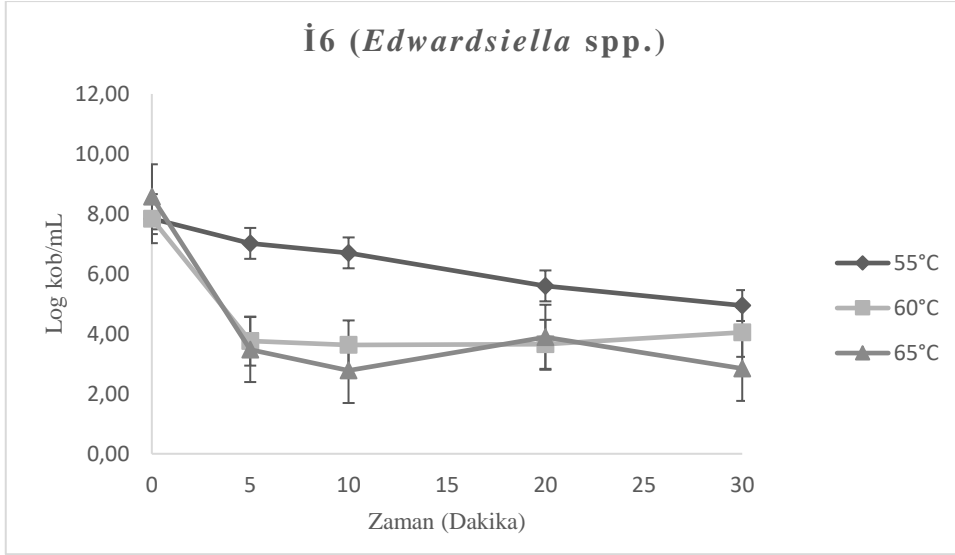
Örnekleme yerleri	GSBL + /AmpC +	GSBL- /AmpC +	GSBL+/AmpC -
Müstahsil	M25 <i>Klebsiella</i> spp.	M4 <i>Citrobacter</i> spp. M10 <i>Enterobacter</i> spp. M12 <i>Citrobacter</i> spp. M18 <i>Enterobacter</i> spp. M19 <i>Enterobacter</i> spp. M21 <i>Enterobacter</i> spp. M22 <i>Klebsiella</i> spp. M26 <i>Enterobacter</i> spp.	-
Süt Toplama Tankları	T16 <i>Klebsiella</i> spp.	T4 <i>Citrobacter</i> spp. T5 <i>Enterobacter</i> spp. T6 <i>Enterobacter</i> spp. T7 <i>Enterobacter</i> spp. T8 <i>Enterobacter</i> spp. T10 <i>Klebsiella</i> spp. T12 <i>Enterobacter</i> spp. T14 <i>Enterobacter</i> spp. T15 <i>Enterobacter</i> spp. T18 <i>Enterobacter</i> spp. T20 <i>Enterobacter</i> spp.	T17 <i>E.coli</i> T21 <i>E.coli</i> T22 <i>E.coli</i> T23 <i>Enterobacter</i> spp.
İşletme	İ4 <i>Enterobacter</i> spp.	İ1 <i>Enterobacter</i> spp. İ2 <i>Enterobacter</i> spp. İ3 <i>Citrobacter</i> spp. İ5 <i>Citrobacter</i> spp. İ8 <i>Enterobacter</i> spp. İ9 <i>Enterobacter</i> spp. İ10 <i>Enterobacter</i> spp. İ12 <i>Enterobacter</i> spp. İ15 <i>Enterobacter</i> spp.	İ6 <i>Edwardssiella</i> spp.
Toplam İzolat Sayısı	3	28	5
Tanımlanan Enterobacteriaceae izolatlarındaki oran	%4,69 (3/64)	%43,75 (28/64)	%7,81 (5/64)
HiCrome ESBL agardan üreyen Enterobacteriaceae şüpheli izolatlardaki oran	%0,86 (3/347)	%8,07 (28/347)	%1,44 (5/347)
Alınan Tüm Enterobacteriaceae şüpheli izolatlardaki oran	%0,61 (3/490)	%5,71 (28/490)	%1,02 (5/490)

4.7. GSBL Pozitif İzolatların Isısal Direnci

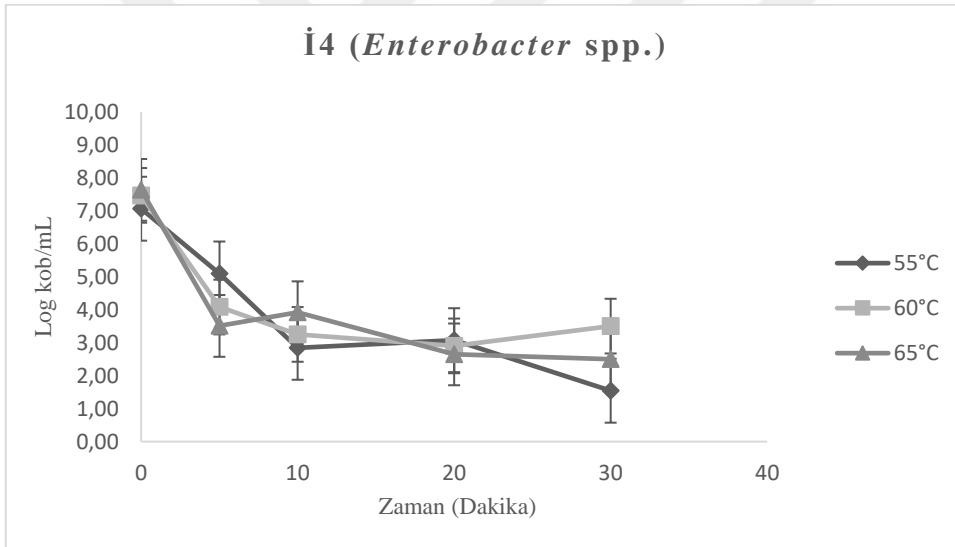
GSBL aktivitesi doğrulanmış T16 (*Klebsiella* spp.), T17 (*E.coli*), T21 (*E.coli*), T22 (*E.coli*), T23 (*Enterobacter* spp.), İ4 (*Enterobacter* spp.) ve İ6 (*Edwardsiella* spp.) izolatlarının 55, 60, ve 65 °C lerde 0, 5, 10, 20 ve 30. dakikalardaki termal inaktivasyon grafikleri çizilmiştir. Şekil 4.6'dan 4.13'e kadar GSBL aktivitesi doğrulanmış şuşların termal inaktivasyon eğrileri gösterilmiştir. D-değeri, belirli bir ortamda belirli bir miktarda varolan mikroorganizmaların % 90'ının (1 logaritmik) öldürülmesi için belirli bir sıcaklıkta uygulanması gereken süre olarak tanımlanmaktadır. Z-değeri ise belirli sıcaklıktaki D değerinin 10 kat azaltılması için sıcaklığın kaç derece yükseltilmesi gerektiğini ifade etmektedir (Ünlütürk ve Turantaş, 2003; Cemeroğlu, 2005; Spinks ve ark., 2006).



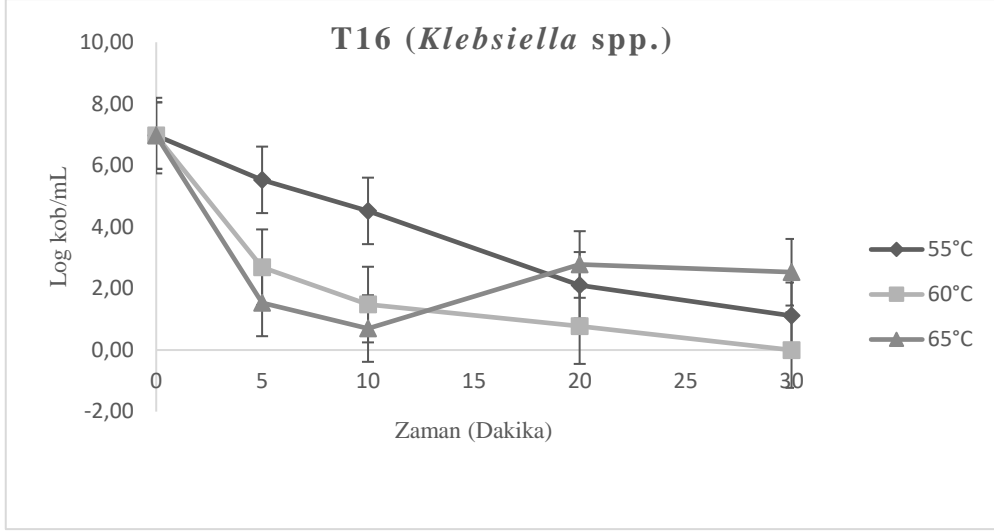
Şekil 4.6. GSBL aktivitesine sahip *K. pneumoniae* ATCC 700603 GSBL aktivitesi pozitif kontrol şuşunun 55, 60 ve 65 °C'lerdeki termal inaktivasyon eğrileri



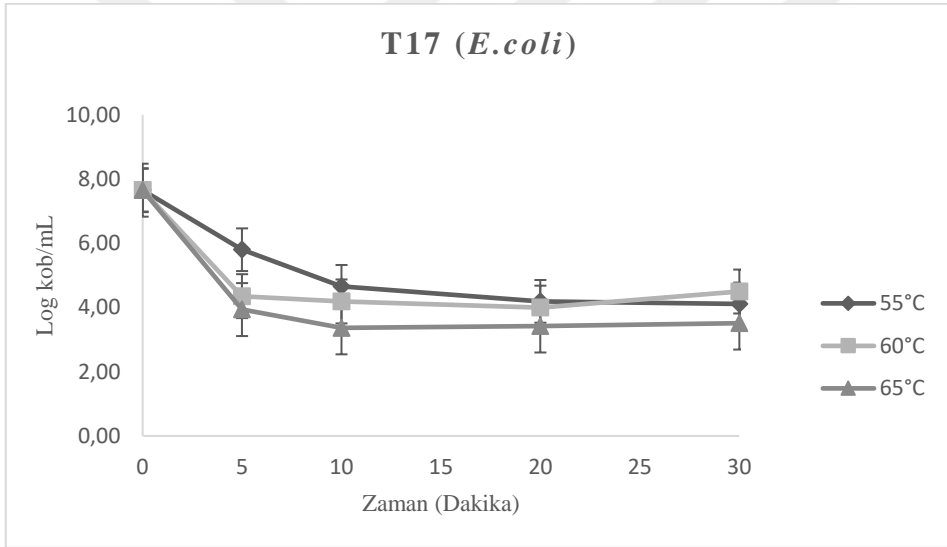
Şekil 4.7. GSBL aktivitesine sahip İ6 (*Edwardsiella* spp.) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri



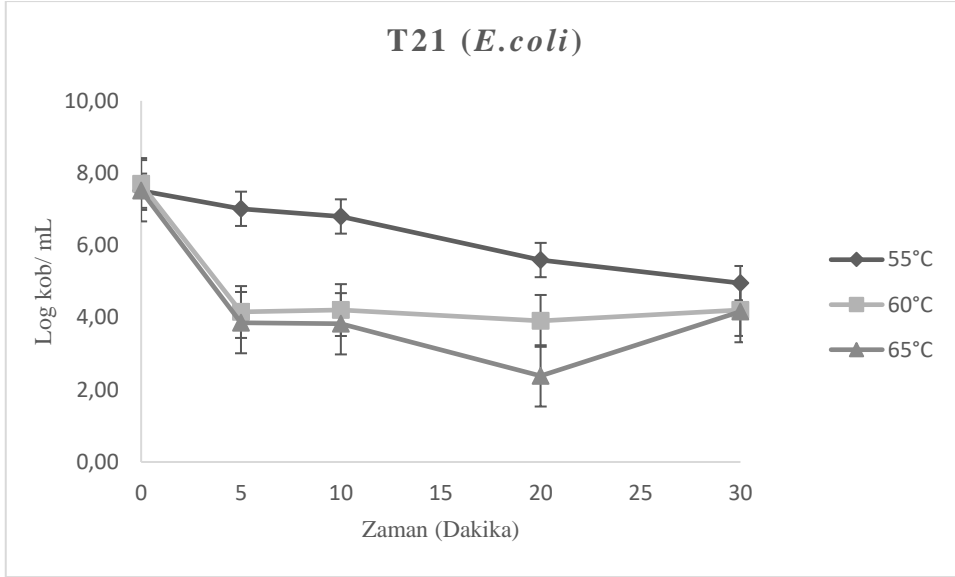
Şekil 4.8. GSBL aktivitesine sahip İ4 (*Enterobacter* spp.) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri



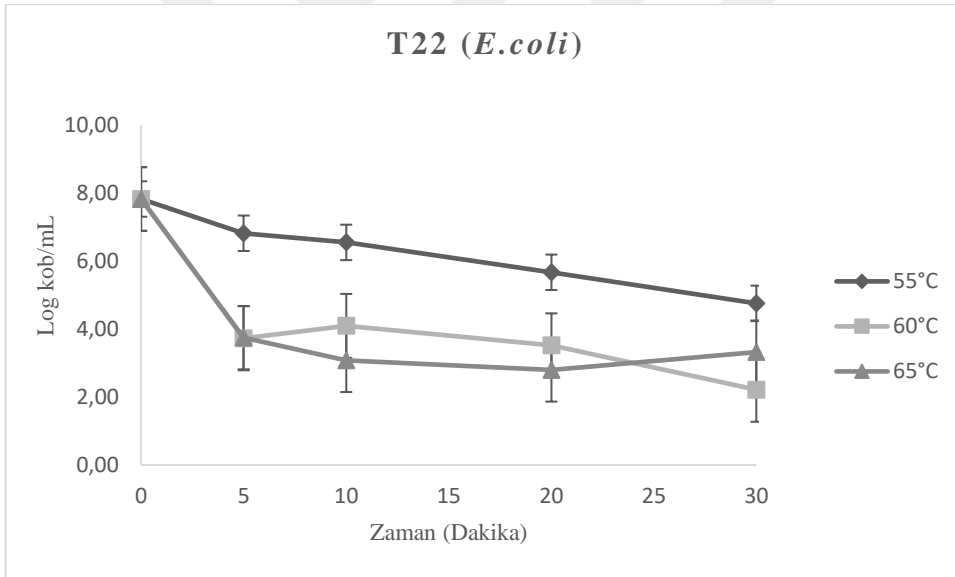
Şekil 4.9. GSBL aktivitesine sahip T16 (*Klebsiella* spp.) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri



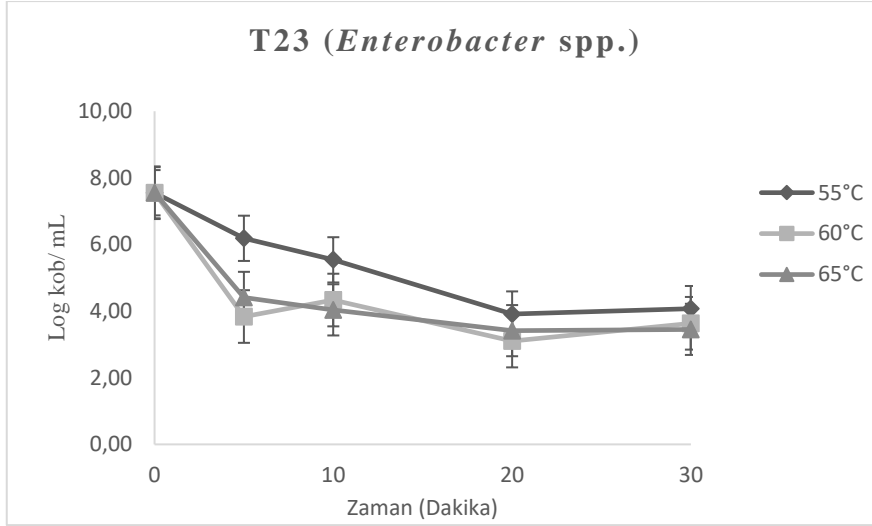
Şekil 4.10. GSBL aktivitesine sahip T17 (*E.coli*) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri



Şekil 4.11. GSBL aktivitesine sahip T21 (*E.coli*) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri



Şekil 4.12. GSBL aktivitesine sahip T21 (*E.coli*) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri



Şekil 4.13. GSBL aktivitesine sahip T23 (*Enterobacter spp.*) izolatının 55, 60 ve 65 °C’lerdeki termal inaktivasyon eğrileri

GSBL aktivitesi doğrulanmış suşların 55, 60 ve 65 °C için D-değerleri ve z-değerleri hesaplanmış ve Çizelge 4.26’da gösterilmiştir.

Çizelge 4.26. GSBL aktivitesine sahip suşların D ve z değerleri

İzolat Kodları	D _{55 °C} (dakika)	D _{60 °C} (dakika)	D _{65 °C} (dakika)	z –değeri (°C)
<i>K. pneumoniae ATCC 700603</i>	7,84	4,07	1,45	13,66
<i>T16 (Klebsiella spp.)</i>	5,06	1,82	1,60	19,96
<i>T17 (E.coli)</i>	9,57	2,89	2,33	16,32
<i>T21 (E.coli)</i>	11,42	5,28	4,50	24,74
<i>T22 (E.coli)</i>	10,47	5,74	2,11	14,36
<i>T23 (Enterobacter spp.)</i>	8,58	4,49	2,84	20,86
<i>İ4 (Enterobacter spp.)</i>	6,03	3,62	2,29	23,73
<i>İ6(Edwardsiella spp.)</i>	10,56	2,37	1,73	12,72

GSBL aktivitesine sahip suşların D_{55 °C} değerleri 5,06 ile 11,42; D_{60 °C} değerleri 1,82 ile 5,74; D_{65 °C} değerleri ise 1,45 ile 4,50 dakika arasında değişmektedir. z- değerleri ise 12, 72 °C ile 24, 74 °C arasında değişmiştir.

Ryu ve Beuchat (1999) tripton soy broth (TSB) ortamında ısıl dirençlerini belirlediği *E.coli* türlerinin z-değerlerinin 4,4 ile 12,4 °C arasında değişen değerlerde olduğunu bulmuştur. Yine D_{54 °C} değerlerini ise 6,3 ile 29,7 dakika (dk) arasında değişen değerlerde

olduğunu belirlemiştir. Whiting ve Golden (2002) brian heart infusion broth (BHI) ortamında yaptığı araştırmada *E. coli* O157:H7 suşlarına ait $D_{55}^{\circ C}$ değerlerini 2,6 ile 21,5 dk arasında değişen değerlerde, $D_{60}^{\circ C}$ değerlerini ise 0,69 ile 2,13 dk arasında değişen değerlerde bulmuştur. Spinks ve ark. (2006) saf su ortamında yaptıkları çalışmada $D_{55}^{\circ C}$ değerini *Escherichia coli* O3:H6 için 6,68 dk, *Escherichia coli* O157:H7 (ATCC 43895) için 3,72 dk ve *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883) için 0,37 dk olarak bulmuştur. Bu çalışmada ise *Klebsiella* spp. olarak belirlenen T16 izolatının $D_{55}^{\circ C}$ değeri 5,06 dk olarak tespit edilmiştir.

Sörqvist (2003) *E.coli*'nin z-değerlerinin 3,4 ile 6,0 °C arasında değiştiğini bildirmiş, $D_{55}^{\circ C}$ değerinin 4,43 dk, $D_{60}^{\circ C}$ değerini 0,65 dk olduğunu belirlemiştir. Peng ve ark. (2014) peynirden izole ettikleri 9 adet *E.coli* izolatlarının z değerini ortalama 4,3 °C bulmuşlardır. $D_{60}^{\circ C}$ değerini en fazla 2,51 dk, $D_{65}^{\circ C}$ değerini ise en fazla 2,40 dk olarak belirlemiştirlerdir. Çalışmamızda *E.coli* olarak tanımlanan T17, T21, T22 izolatlarının $D_{55}^{\circ C}$ değerleri 9,57 ile 10,47 dk ve $D_{60}^{\circ C}$ değerleri ise 2,89 ile 5,74 dk arasında, $D_{65}^{\circ C}$ değerleri 2,33 ile 4,50 dk arasında değişmiştir. Yine z-değerleri de 14,36 ile 24,74°C olarak tespit edilmiştir. Bu çalışmada GSBL aktivitesini pozitif olarak doğruladığımız izolatlarımızın D ve z değerleri önceki çalışmalara benzer veya daha yüksek bulunmuştur.

Denis ve ark. (2006) ise *E.cloacae*'nin $D_{55}^{\circ C}$ değerini 4,31 dk iken z –değerinin 7,48 °C bulmuşlardır. Gajdosova ve ark. (2011) gıdadan izole edilen *E.cloacae*'nin $D_{58}^{\circ C}$ değerini 3,22 dk olarak belirlemiş ve yüksek termotolerans özellik göstergesi olan *orfI* DNA biriminin varlığını belirlemiştirlerdir. Çalışmamızda ise API 20E kiti ile İ4 örneği *E.cloacae* olarak tanımlanmış ve $D_{55}^{\circ C}$ değeri 6,03 dk, z-değeri ise 23,73 °C olarak saptanmıştır. Bu değerler diğer izolatlar göre oldukça yüksektir.

Hücrelerin ısı, asit gibi strese maruz kalması proteinlerin yanlış katlanmasına, toplanmasına ve biyolojik işlevselliğini kaybetmesine neden olmaktadır (Valladares, 2015). Hücre stres durumlarına karşı hücre savunma mekanizmasını harekete geçirirerek şaperon proteinlerinin üretimini artırır. Bu proteinler proteinlerin katlanmasını düzenlemekte ve üç boyutlu yapı almasını sağlamaktadırlar. Bu proteinler ısı şok proteinleri veya stres proteinleri olarak da adlandırılmaktadır (Ellis ve ark., 1989, 1991). Stres proteinleri hücrelerin ısıya karşı toleransını arttırabilmekte ve hücrenin maruz kaldığı zararlanmaların azaltılmasına yardımcı olmaktadır (Landry ve ark., 1987; Mackey ve ark., 1991). Isı şoku, antibiyotik direci, ultraviyole, ışık, dezenfektan ve ağır metal gibi belirli bir strese maruz kalmanın, bakterilerin strese karşı daha iyi direnmesini sağlamakla kalmayıp diğer stres faktörlerin karşı çapraz koruyucu etki geliştirerek diğer stres faktörlerine karşı direnç geliştirebileceği

araştırmacılar tarafından ifade edilmiştir (Lou and Yousef 1997; Davies ve ark.,1998; Rowan, 1999).

Meyve suları, süt ve tavuk suyu gibi gıda ürünlerinde asidik ortama maruz kalan mikroorganizmalarda çapraz koruma (cross-protection) ile ısısız dirençlerinin artacağı, hücrelerin asidik koşullara adapte edilmemesi bile önceden stres koşullarına maruz kalınması sonucu benzer direnç gösterebilecekleri belirtilmiştir (Valladares, 2015). Gabriel ve Nakano (2011) *E.coli* O157:H7'nin elma suyundaki D-değerinin peptonlu sudakinden daha yüksek olduğunu, hücrenin asidik ortamlara adapte olmasıyla açıklamıştır. Ryu ve Beuchat (1999)'da asit ile uyarılmış *E.coli* O157:H7 ve O157:H7 olmayan *E.coli*'lerin ısıl dirençlerinde artış olduğunu göstermişlerdir. Asit ile uyarılma veya asit ile şok edilen hücrelerin sonraki denemelerde de ısı veya asit streslerine karşı koruma sağlayabileceği ifade edilmiştir. Wang ve Doyle (1998) *E.coli* O157:H7'nin ısı şoku ile aside karşı toleransının arttırdığını bildirmiştir.

Walsh ve ark. (2005) laboratuvar ortamında belirli oranda antibiyotikle muamele edilmiş *Salmonella* türleri ile antibiyotik ile muamele edilmemiş olan tavuk etinden izole edilen *Salmonella* türlerinin ısısız dirençleri arasında istatistiksel olarak önemli bir fark bulamamışlardır. Duffy ve ark. (2005) da kıymaya inokule edilen antibiyotikle muamele edilmiş *E.coli* ile antibiyotik ile muamele edilmemiş *E.coli*'nin ısısız dirençleri arasında bir fark bulamamışlardır. Araştırmacılar aynı çalışmada ısıl şoklama uygulanan izolatların ısıl direncinin arttığını fakat antibiyotik duyarlı ve antibiyotik dirençli suşlar arasında ısısız direnç açısından bir fark bulunmadığı bildirmişlerdir. Fakat Collis and Griss (1989) *E.coli*'de antibiyotik dirençten dolayı ısıl direncin artışını rapor etmişlerdir. Ayrıca Niedhart ve ark. (1984) antibiyotik direncinin ısısız direnç artışını indükleyebileceğini bildirmiştir. Poole (2012a,b) gram pozitif bakterilerdeki ClpL ısı şok proteininin beta-laktamaz direnci ile bağlantılı olduğunu, yine gıda kaynaklı patojen olan *Cronobacter sakazaki*'de antimikrobiyal dirençle ClpL ısı şok proteininin ilişkili olduğunu bildirmiştir. Isı şok tepkisinin *Lactococcus lactis*'te makrolid direncine yol açtığı fakat mekanizmaların net olmadığı ve yine ısı şokunun *Pseudomonas aeruginosa*'da karbapenem direncini arttırdığını bildirmiştir (Poole, 2014).

Tüm bu bilgilere ve verilere dayanarak GSBL aktivitesini doğruladığımız 7 izolatımızın D-değerlerinin ve z-değerlerinin herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamış mikroorganizmalara göre yüksek değerler olması normaldir. Bununla birlikte nedenleri moleküler analizler ile ileriki çalışmalarda araştırılmalıdır.

BÖLÜM 5

SONUÇ VE ÖNERİLER

Çanakkale ili Yenice bölgesinde faaliyet gösteren bir mandıranın klasik peynir üretim sürecini incelediğimiz çalışmada, mandıraya süt sağlayan 134 müstahsilin çiğ sütlerinde subkilinik masititis olgusunun prevalansı araştırılmış, subkilinik masititisli sütlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri normal sütler ile karşılaştırılmıştır. Bunun yanısıra çevresel kaynaklı subkilinik mastitis etmeni olan insan ve hayvanlarda patojenik özellik gösterebilen Enterobacteriaceae familyasına ait bakterilerin varlığı incelenmiş, bu bakterilerin fenotipik ve biyokimyasal tanımlamaları yapılmış, GSBL ve AmpC beta-laktamaz üretip üretmediği fenotipik yöntemler ile taranarak doğrulama analizleri yapılmıştır. GSBL aktivitesine sahip olduğu doğrulanan bakterilerin (Enterobacteriaceae) ısısız direnç özellikleri belirlenmiştir. Çalışmamızda subkilinik mastitis etmeni olan GSBL ve AmpC beta laktamaz aktivitesine sahip Enterobacteriaceae'ya ait bakterilerin gıda zincirinde gıda üretim sürecine geçme olasılığı belirlenmiştir.

490 Enterobacteriaceae şüpheli izolattan 347 adet GSBL şüpheli izolat elde edilmiş, bu izolatlarda 64 tanesi Enterobacteriaceae olarak doğrulanmıştır. Bu bakterilerden 11 adedi *Citrobacter* spp. (%17,18), 33 adedi *Enterobacter* spp. (%51,56), 13 adedi *Klebsiella* spp. (%20,31), 1 adedi *Shigella* spp. (%1,56), 5 adedi *E.coli* (%7,81) ve 1 adedi de *Edwardsiella* spp. (%1,56) olarak tanımlanmış ve bu izolatların 7 (%10,9) tanesinin GSBL aktivitesine sahip olduğu doğrulanmıştır. Bu izolatların 5 tanesi (%71,43) tank örneklerine ve 2 tanesi (%28,73) ise işletme örneklerine aittir. Ayrıca ön tarama testinde AmpC beta-laktamaz aktivitesi gösteren 31 adet izolatın 27 (%97,1) tanesi çift disk sinerji testi ile doğrulanmıştır. Isısız direnci en yüksek GSBL dirençli suşlar süt toplama tanklarından elde edilen izolatlar olmuştur. D-değerleri ve z-değeri en yüksek izolatın T21 (*E.coli*) olduğu belirlenmiştir.

Yapılan araştırmalar ışığında izole edilen 7 adet GSBL pozitif izolatın 2 tanesinin işletmeden alınmış olması bu izolatların ısıl işlem gören süttten gelmiş olabileceğini düşündürmüştür. Bu tür izolatlarda maruz kaldıkları ısı şoku ile antibiyotik direnç taşıyan genlerin indüklenmiş olma olasılığı vardır. Bunun tersi olarak antibiyotik dirençli tüm izolatların Poole (2012a,b; 2014)'in belirlediği gibi ısıl şok genleri indüklenmiş olabilir. Bu nedenle araştırmamızda GSBL pozitif olarak tespit edilen 7 izolatın herhangi bir stres faktörüne maruz kalmamış Enterobacteriaceae'ya göre daha yüksek D ve z değerlerine sahip olması beklenebilir. Fakat bunun nedenleri hakkında indüklenmiş ısıl şok proteinlerinin veya

genlerinin varlığının moleküler yöntemlerle araştırılmasıyla tam bir yorum yapılabilir. Ayrıca ısısız direncin varlığının AmpC pozitif izolatlarda da bakılması sonucun doğrulanması açısından önerilebilir.

Araştırma sonucunda elde edilen verilere dayanarak;

1. Bölgede sığırlarda subkilinik masititis bulgusunun yaygın olduğu ve bu sütün peynir üretim sürecinde ürüne işlendiği,
2. Peynir üretim sürecinde hammaddeden son ürüne kadar olan tüm basamaklardan GSBL aktivitesi pozitif Enterobacteriaceae cinslerinin varlığının %1,43 (7/490) olduğu,
3. Çiğ süt toplama tanklarında % 7,81 (5/64) GSBL pozitif Enterobacteriaceae varlığı,
4. İşletme örneklerinde ise %2,63 (2/76) oranında Enterobacteriaceae varlığı,
5. AmpC beta laktamaz aktivitesinin görülme oranının %5,51 (27/490) olduğu ve GSBL görülme oranından yüksek olduğu,
6. GSBL aktivitesinin doğrulandığı antibiyotik dirençli 7 suşun yüksek D ve z değerlerine sahip olduğu ve bunun antibiyotik direncinden kaynaklı olabileceği tespit edilmiştir.

GSBL ve AmpC aktivitesine sahip suşların gıda zinciri vasıtasıyla insanlara bulaşması insanlarda ve hayvanlarda bilinçli antibiyotik kullanımını arttırmak ile sağlanabilir. Hayvanlarda mastitis tedavisinde etkene göre antibiyotik kullanımı yapılmalıdır, böylece yanlış ve gereksiz antibiyotik kullanımından kaçınılmış olacaktır. Ayrıca çiftlikte antibiyotik kalıntılı atıkların kontrolünde önemlidir. Tüm bunlarla birlikte çevresel subkilinik masititis etmeni Enterobacteriaceae türlerinin çiftliklerde yayılımını önlemek için temizlik son derece önemlidir. Hayvanlara bulaşan bu etmenlerin çiğ süte geçmesi sağım hijyenine dikkat ederek önlenir. İşletmelerin ise müstahsillerini antibiyotik kullanımında ve sağım hijyeni konusunda bilinçlendirmesi, farkındalık oluşturması ve hatta çiğ sütün SHS, CMT değerlerine göre ödül programı uygulaması gerekmektedir. Nitekim antibiyotik kalıntısının önüne benzer ödül yöntemi ile geçilmiştir. Toplama tankları bu dirençli suşların yayılmasında çok önemli bir rol oynadıklarından dolayı periyodik temizlik ve bakımları yapılmalı ve kontroller kayıt altına alınmalıdır. İşletmede TGKY’de belirtilen pastörizasyon normu olan klasik peynir üretiminde en az 63 °C’de 30 dakika değerine uyarak tanklar ile gelen dirençli Enterobacteriaceae türlerin mayalanacak süte geçmesi engellenebilir. Son olarak işletmede gıda güvenliği ve hijyen kuralları etkili bir şekilde uygulanarak çapraz bulaşmaların önüne geçilmelidir.

Çalışmada elde edilen izolatların antibiyotik dirençlerinin ve ısı dirençlerinin moleküler yöntemler ile doğrulanması, ayrıca çiğ sütteki antibiyotik dirençli

Enterobacteriaceae türleri ile işletme ve son üründen elde edilen türlerin klonal ilişkisinin araştırılması sorunun kaynağının ortaya konması açısından önemlidir.



KAYNAKLAR

- Abraham E.P., Chain E., 1940. An Enzyme from Bacteria Able to Destroy Penicillin. Nature 146: 837-837.
- Ahmed A.M., Shimamoto T., 2015. Molecular Analysis of Multidrug Resistance in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 Isolated from Meat and Dairy Products. International Journal of Food Microbiology, 193: 68-73.
- Ak S., 2008. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* spp. Klinik İzolatlarında Plazmid Aracılı AmpC Beta-laktamaz Tespiti. Uzmanlık Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.82s
- Akalın H., 2011. Antimikrobiyal Direnç ve Önleme Politikaları. Ankem Derg, 25 (3): 190-195.
- Akdağ F., Gürler H., Teke B., Uğurlu M., Koçak Ö., 2017. Jersey Irkı ineklerde CMT Skorlarının ve Skorların Değerlendirilmesindeki Farklılığın Süt Verimi, Süt Bileşimi ve Subklinik Mastitis Tanısına Etkisi. İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 43 (1); 44-51.
- Aksoy A., Göçmen S.J, Kaçmaz B., Canver S., 2005. İnsan ve Sığırlardan İzole Edilen Fekal *Escherichia coli* Suşlarında Antibiyotik Direnci ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Üretimi. Ankem Dergisi, 19 (3): 130-34.
- Aksoy M., 2014. Verilerle Antibiyotik Kullanımı. İstanbul ‘Akılcı İlaç Kullanımı ve Farkındalık’ Sempozyumu. 11-12.
- Alp F., Dağı H. T., Tuncer İ., Fındık D., Arslan U., 2013. Çeşitli Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Plazmid Aracılı Ampc Tipi Beta-Laktamaz Varlığının Fenotipik Olarak Araştırılması. Ankem Dergisi, 27 (1): 19-24.
- Alpay G., Yeşilbağ K., 2009. Mastitis Olgularında Virusların Rolü. Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 28 (1): 39-46.
- Altun İ., 2011. Süt ve Ürünlerinde HACCP Uygulaması. Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 1 (2): 63-67.
- Anonim, 2000. Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliği. Resmi Gazete. 14 Şubat 2000- Sayı: 23964. <http://www.resmigazete.gov.tr/arsiv/23964.pdf>.

(Erişim tarihi: 23.02.2017).

Anonim, 2004. ISO 21528-2:2004 Specifies a Method, Mithout Pre-enrichment, for The Enumeration of Enterobacteriaceae.

Anonim, 2006a. Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ. Sayı 26267, Tebliğ No: 2006/38. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2006/08/20060822-4.htm>. (Erişim tarihi: 23.02.2017).

Anonim, 2006b. Yem Katkıları ve Premikslerin Üretimi, İthalatı, İhracatı, Satışı ve Kullanımı Hakkında Tebliğde Değişiklik Yapılmasına Dair Tebliğ (Tebliğ No: 2006/1). <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2006/01/20060121-8.htm>. (Erişim tarihi: 27.02.2015).

Anonim 2009. Türk Gıda Kodeksi Çiğ Süt ve Isıl İşlem Görmüş İçme Sütleri Tebliğinde Değişiklik Yapılması Hakkında Tebliğ. Sayı 27133, Tebliğ No 2009/14. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2009/02/20090206-16.htm>. (Erişim tarihi: 23.02.2017).

Anonim 2010a. Veteriner Hizmetleri, Bitki Sağlığı, Gıda ve Yem Kanunu, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2010/06/20100613-12.htm>. (Erişim tarihi: 25.05.2015).

Anonim, 2011a. “Zoonozlar ve Zoonotik Etkenler, İlgili Antimikrobiyal Direnç ve Gıda Kaynaklı Salgınların İzlenmesi Yönetmeliği”. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111223-6.htm>. (Erişim tarihi 22.05.2015).

Anonim, 2011b. Gıda ve Yemin Resmi Kontrollerine Dair Yönetmelik, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111217-7.htm>. (Erişim 25.05.2015

Anonim, 2011c. Gıda İşletmelerinin Kayıt ve Onay İşlemlerine Dair Yönetmelik, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111217-6.htm>. (Erişim tarihi: 25.05.2015).

Anonim, 2011d. Gıda Hijyeni Yönetmeliği, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111217-5.htm>. (Erişim tarihi: 25.05.2015).

- Anonim, 2011e. Hayvansal Gıdalar İçin Özel Hijyen Kuralları Yönetmeliği, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111227-10.htm>. (Erişim tarihi: 25.05.2015).
- Anonim, 2011f, Hayvansal Gıdaların Resmi Kontrollerine İlişkin Özel Kuralları Belirleyen Yönetmelik, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111217-9.htm>. (Erişim tarihi: 25.05.2015).
- Anonim, 2011g. Türk Gıda Kodeksi Yönetmeliği. <http://mevzuat.basbakanlik.gov.tr/metin.aspx?mevzuatkod=7.5.15688&sourcexmlsearch=g%fdda&mevzuatiliski=0>. (Erişim tarihi: 25.05.2015).
- Anonim, 2011h, Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>. (Erişim tarihi: 25.05.2015).
- Arora S., Bal M., 2005. AmpC β -lactamase Producing Bacterial Isolates from Kolkata Hospital Indian. Journal of Medical Research, 12: 224-233.
- Atabey C., 2011. Piyasada Satışa Sunulan Peynirlerden Elde Edilen Jenerik *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* Suşlarının Antibiyotik Dirençlerinin Belirlenerek, Mastitis Kontrol ve Tedavi Programlarında Kullanılan Antibiyotiklerle İlişkinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü. Besin Hijyeni ve Teknolojisi Anabilim Dalı, Türkiye.
- Atasever S., Erdem H., 2008. Süt Sığırlarında Mastitis ile Sütün Elektriksel İletkenliği Arasındaki İlişkiler. OMÜ Ziraat Fakültesi Dergisi, 23 (2): 131-136.
- Avcı E., 2012. Gıdalardan İzole Edilen Enterobacteriaceae Türlerinde Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretimi ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Ayar A., Sert D., 2005. Toplum Beslenmesinde Süt ve Ürünlerinin Yeri ve Önemi. Gıda Yem Bilimi Teknolojisi, 7: 1-5.
- Ayaşan T., Hızlı H., Yazgan E., Kara U., Gök K., 2011. Somatik Hücre Sayısının Süt Üre Nitrojen ile Süt Kompozisyonuna Olan Etkisi. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 17: 659-662.

- Aydın F., İa T., Yontar A., 2010. Kayseri Yöresinde Süt Sığırlarında *Escherichia coli* O157: H7'nin Konvansiyonel ve Moleküler Yöntemlerle Araştırılması. Sağlık Bilimleri Dergisi, 19 (3): 159-166.
- Aydın L., 2005. Meme Yangısı Mastitis. Türk Eczacıları Birliği Eczacı Odası Yayınları, Pharma Karadeniz, 1 (5). http://www.ekutuphane.teb.org.tr/arsiv.php?anabelge_no=913. (Erişim tarihi: 22.05.2017).
- Azevedo C., Pacheco D., Soares L., Romão R., Moitoso M., Maldonado J., Guix R., Simões, J., 2016. Prevalence of Contagious and Environmental Mastitis-Causing Bacteria in Bulk Tank Milk and Its Relationships with Milking Practices of Dairy Cattle Herds in São Miguel Island (Azores). Tropical Animal Health and Production, 48 (2): 451-459.
- Balıkçı A., 2007. *Escherichia coli* ve *Klebsiella* Cinsi Bakterilerden Plazmidik AmpC Tipi Beta Laktamaz Ditenci. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi, Türkiye.
- Bassi D., Gazzola S., Esposito R., Cocconcelli P.S., 2016. Risk Assessment of Antimicrobial Resistance in Dairy Foods: Prevalence, Gene Exchange and Consumer Exposure. Foodmicro2016, Dublin. http://www.foodmicro2018.com/wp-content/uploads/2016/07/14.20-Daniela_Bassi-FoodMicro2016.pdf. (Erişim tarihi: 22.05.2017).
- Baştan A., Kaymaz M., Fındık M., Erünal N., 1997a. İneklerde Subklinik Mastitislerin Elektriksel İletkenlik, Somatik Hücre Sayısı ve California Mastitis Test ile Saptanması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 44: 1-6.
- Baştan A., Fındık M., Kaymaz M., Duru Ö., 1997b. İnek Sütlerinde Somatik Hücre Sayısı, Serum Proteinleri, Laktoz Ve Elektriksel İletkenlik Arasındaki İlişkinin Araştırılması. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 44: 1-5.
- Bardakcıoğlu H.E., Sekin S., Oral Toplu H.D., 2011. Relationship Between Some Teat and Body Measurements of Holstein Cows and Sub-clinical Mastitis and Milk Yield. Journal of Animal and Veterinary Advances, 10; 1735-1737.
- Batavani R.A., Asri S., Naebzadeh H., 2007. The Effect of Subclinical Mastitis on Milk Composition in Dairy Cows. Iranian Journal of Veterinary Research, 8 (3): 205-211.
- Berglund I., Pettersson G., Ostensson K., Svennersten-Sjaunja K., 2004. Quarter Milking-

- A Possibility for Detection of Udder Quarters with Elevated SCC. Automatic Milking. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands, 321-328.
- Black J.A, Thomson K.S, Buynak J.D, Pitout J.D., 2005. Evaluation of Beta-Lactamase Inhibitors in Disk Tests for Detection of Plasmid Mediated Ampc Beta-Lactamases in Well-Characterized Clinical Strains of *Klebsiella* spp., Journal of Clinical Microbiology, 43 (8): 4168-71.
- Berge A.C.B., Champagne S.C., Finger R.M., Sicho W.M., 2007. The Use of Bulk Tank Milk Samples to Monitor Trends in Antimicrobial Resistance on Dairy Farms. Foodborne Pathogens and Disease, 4 (4): 397-407.
- Bhutto A. L., Murray R.D., Woldehiwet Z., 2012. California Mastitis Test Scores As Indicators of Subclinical Intra-Mammary Infections at The End of Lactation in Dairy Cows. Research in Veterinary Science, 92 (1): 13-17.
- Bigelow W.D., Esty J.R., 1920. The Thermal Death Point in Relation to Typical Thermophilic Organisms. Journal of Infectious Diseases, 27 (6): 602-617.
- Bradford P.A., 2001. Extended-Spectrum β -lactamases in The 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. Clinical Microbiology Reviews, 14 (4): 933-951.
- Brisse S., Van Duijkeren E., 2005. Identification and Antimicrobial Susceptibility of 100 *Klebsiella* Animal Clinical Isolates. Veterinary Microbiology, 105: 307–12.
- Burvenich C., Van Merris V., Mehrzad J., Diez-Fraile A., Duchateau L., 2003. Severity of *E.coli* Mastitis is Mainly Determined by Cow Factors. Veterinary Research, 34 (5): 521-564.
- Bush K., Jacoby G.A., 2010. Updated Functional Classification of B-Lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 54 (3): 969-976.
- Büyükçangaz E., Mat B., ABD Alrahim M.K., 2012. Sublinik Mastitisli Sığır Sütlerinin Mikrobiyolojik Analizi ve İzolatların Antimikrobiyal Direnç Profili. Uludag University Journal Faculty Veterinary Medicine, 31: 35–44.
- Brenwald N.P., Jevons G., Andre W.S J., Ang L, Fraise AP., 2005. Disc Methods for Detecting AmpC β -lactamases Producing Clinical Isolates of *Escherichia coli* and

- Klebsiella pneumoniae*. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56: 600 - 601.
- Cagri -Mehmetoglu A., Yaldirak G., Bodur T., Simsek M., Bozkir H., Eren N.M., 2011. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 in Two Kasar Cheese Processing Environments. Food Control, 22 (5): 762-766.
- Cemeroğlu B., Soyer A., 2005. Gıda Mühendisliğinde Temel İşlemler. Gıda Teknolojisi Derneği Yayınları, Ankara. 461s-.
- Cengiz M., 2009. İneklerde Kuru Dönem Mastitise Karşı Koruyucu Yaklaşımlar. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 4 (3): 215-222.
- Cengiz S, Tekin O., Akan M., 2011. Mastitislerden İzole edilen Enterokokların Moleküler Tiplendirilmesi. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 58 (1): 17–20.
- Cervinkova D., Vlkova H., Borodacova I., Makovcova J., Babak V., Lorencova A., Jaglic Z., 2013. Prevalence of Mastitis Pathogens in Milk from Clinically Healthy Cows. Veterinarni Medicina, 58 (11): 567-575.
- Chen H., Hoover D.G., 2004. Use of Weibull Model to Describe and Predict Pressure Inactivation of *Listeria monocytogenes* Scott A in Whole Milk. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 5 (3): 269-276.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2011. “Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement”, Clinical and Laboratory Standards Institute, document M100-S21.
- Cogliani C., Goossens H., Greko C., 2011. Restricting Antimicrobial Use in Food Animals: Lessons from Europe. Microbe, 6 (6): 274-279.
- Collis C.M., Grigg G.W., 1989. An *Escherichia coli* Mutant Resistant to Phleomycin, Bleomycin and Heat Inactivation is Defective İnubiquinone Synthesis. Journal of Bacteriology, 171 (9): 4792–4798.
- Cooney S, Tiernan D, Joyce P, Kelly A. L., 2000. Effect of Somatic Cell Count and Polymorphonuclear Leucocyte Content of Milk on Composition and Proteolysis During Ripening of Swiss-Type Cheese. Journal of Dairy Research, 67: 301–307.
- Coşkun, S., 2011. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarında Plazmid Aracılı Ampc Betalaktamaz Tespiti. Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Farmasötik

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Türkiye.

- Coşkun S., Altanlar, N., 2011. Sadece Gsbl Üreten, Sadece Ampc Beta-Laktamaz Üreten ve Gsbl+ Ampc Beta-Laktamaz Üreten Sefoksitin Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* İzolatlarındaki Antibiyotik Direnç Profillerinin Karşılaştırılması. *Ankem Dergisi*, 25 (4): 244-249.
- Coşkun S., Altanlar N., 2012a. Ampc Beta-Laktamazlar. *Ankem Dergisi*, 26 (4): 203-214.
- Coşkun S., Altanlar N., 2012b. Sefoksitine Dirençli *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatlarında Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamaz Tespiti. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 46 (3): 375-385.
- Coudron P.E., 2005. Inhibitor-Based Methods For Detection of Plasmid-Mediated Ampc B-Lactamases in *Klebsiella Spp.*, *Escherichia Coli*, and *Proteus Mirabilis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 43 (8): 4163-4167.
- Cullimore R., 2000. *Proctical Atlas for Bacterial Identification*. CRC Pres, Jun 21. p37.
- Çiçek E., 2008. Ege Bölgesindeki Sığırların Süt ve Dışkı Örneklerinden *Esherichia coli* O157: H7 İzolasyonu ve Verotoksinlerinin Belirlenmesi. Yüksek lisans Tezi, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Çoban Ö., Tüzemen N., 2007. Siyah Alaca ve Esmer İneklerde Subklinik Mastitis İçin Risk Faktörleri. *Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26 (1-2): 27-31
- Dağdemir E., Özdemir S., 2006. Salamura Beyaz Peynirlerden İzole Edilen Laktik Asit Bakterilerinin Tanımlanması ve Seçilen Bazı İzolatların Kültür Olarak Kullanılabilme Olanakları. Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi, Türkiye.
- Dahmen S., Métayer V., Gay E., Madec J.Y., Haenni M., 2013. Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-Carrying Plasmids and Clones of Enterobacteriaceae Causing Cattle Mastitis in France. *Veterinary Microbiology*, 162(2-4): 793-799. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.10.015>
- Dallenne, C., Da Costa, A., Decré, D., Favier, C., Arlet, G., 2010. Development of A Set of Multiplex PCR Assays For The Detection of Genes Encoding Important B-Lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3): 490-495.
- Davies J., Webb V., 1998. Antibiotic Resistance in Bacteria. In: Krause, R.M., Eds.

- Emerging Infections Biomedical Research Reports. Academic Press, London. 239-273.
- Decimo M., Silveti T., Brasca M., 2016. Antibiotic Resistance Patterns of Gram-Negative Psychrotrophic Bacteria from Bulk Tank Milk. *Journal of Food Science*. 81 (4): 944-951.
- de Oca S.A.M., Talavera-Rojas M., Soriano-Vargas E., Barba-León, J., Vazquez-Navarrete J., 2015. Determination of Extended Spectrum B-Lactamases/Ampc B-Lactamases and Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in *Escherichia Coli* Isolates Obtained From Bovine Carcasses in Mexico. *Tropical Animal Health and Production*, 47 (5): 975-981.
- Demirci M., 1981. Sütün Mineral Maddeleri ve İnsan Beslenmesindeki Önemi. *Journal of The Faculty of Agriculture*, 12 (1): 195- 207.
- Demirel, N. ve Karapınar, M. 2002. “İzmir İli Piyasasında Satılan Bazı Peynirlerin Mikrobiyolojik Özellikleri”, Türkiye 7. Gıda Kongresi, 22-24 Mayıs, 391-398, Ankara.
- Denis C., Cadot P., Leguériel I., Thuault D., Sohier D. 2006. Heat Resistance of Coliform Species Isolated From Cooked Ham, Snail Flesh, and ‘Bouchées À La Reine’. *Letters in Applied Microbiology*, 42 (2): 160-164.
- Dias M.T., Bricio S.M.L., Almeida D.O., Oliveira L.A.T., de Filippis I., Marin V.A., 2012. Molecular Characterization and Evaluation of Antimicrobial Susceptibility of Enteropathogenic *E. Coli* (EPEC) Isolated From Minas Soft Cheese. *Food Science and Technology (Campinas)*, 32 (4): 747-753.
- Dibner J.J., Richards J.D., 2005. Antibiotic Growth Promoters in Agriculture: History and Mode of Action. *Poultry Science*, 84 (4): 634-643.
- Diler A., Baran A., Erdoğan A., 2013. Çiğ İnek Sütlerinde Somatik Hücre Sayısı, Süt Kompozisyonu ve Mastitis Etkeni Mikroorganizmaların İdentifikasyonu. 8. Ulusal Zootekni Bilim Kongresi, 5-7 Eylül 2013. Çanakkale.
- Dilsiz B., 2010. Subklinik Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* Suşlarında Metisilin Direncinin Fenotipik ve Genotipik Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi, Türkiye.

- Dinç G., Ata Z., Temelli S., 2012. Sığır Mastitislerinden İzole Edilen *Escherichia coli* Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Aktivitesi ve Antibiyotik Dirençlilik Profilinin İncelenmesi Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 59: 85-88.
- Dingwell R.T., Leslie K.E., Schukken Y.H., Sargeant J.M., Timms L.L., 2003. Evaluation of The California Mastitis Test to Detect An İntramammary Infection With A Major Pathogen in Early Lactation Dairy Cows. Canadian Veterinary Journal 44: 413–416.
- Doi Y., Paterson D.I., 2007. Detection of Plasmid-mediated Class C Beta-lactamases. International Journal of Infectious Diseases, 11: 191-197.
- Duffy W.A., Lucia L.M., Kells J.M., Castillo A., Pillai S.D., Acuff G.R., 2005. Concentrations of *Escherichia coli* and Genetic Diversity and Antibiotic Resistance Profiling of *Salmonella* Isolated From İrrigation Water, Packing Shed Equipment, and Fresh Produce in Texas. J Food Prot 68: 70–79.
- Ellis R., van der Vies S., 1991. Molecular Chaperones. Ann Rev Biochem. 60: 321-347.
- Ellis R.J., Hemmingsen S.M., 1989. Molecular Chaperones – Proteins Essential for The Biogenesis of Some Macromolecular Structures. Trends Biochemical Sciences, 14: 339-342.
- European Commission (EC), 1992. Health and Hygiene Directive 92/46/EEC of 16 June 1992 Laying Down the Health Rules for the Production and Placing on the Market of Raw Milk, Heat-Treated Milk and Milk-Based Products. http://ec.europa.eu/food/fs/sfp/mr/mr03_en.pdf. (Erişim tarihi 01.02.2017).
- European Commission (EC), 2006. Ban on Antibiotics as Growth Promoters in Animal Feed Enters into Effect. European Commission. http://europa.eu/rapid/press-release_IP-05-1687_en.htm. (Erişim tarihi: 26.02.2017).
- Edelson-Mammel S.G., Buchanan R.L., 2004. Thermal Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in Rehydrated Infant Formula. Journal of Food Protection, 67 (1): 60-63.
- European Food Safety Authority (EFSA), 2011. Scientific Opinion on The Public Health Risks of Bacterial Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases and/or AmpC β -lactamases in Food and Food-producing Animals. EFSA Journal, 9 (8): 2322. 95p.

- European Food Safety Authority (EFSA), 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011, EFSA Journal, 11 (4): 3129. 250p.
- Elmacioğlu S., 2013. Sığırlarda Geniş Spektrumlu Beta- Laktamaz Sentezleyen *Escherichia coli* Prevalansının Belirlenmesi. Y¼ksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi, T¼rkiye.
- El Zubeir E.M.I., El Owni O.A.O., Mohamed, G.E., 2005. Correlation of Minerals and Enzymes in Blood Serum and Milk of Healthy and Mastitic Cows. Research Journal Agriculture and Biological Science, 1: 45-49.
- Empel J., Baraniak A., Literacka E., Mrowka A., Fiett J., Sadowy E., Hryniewicz W., Gniadkowsk Y., 2008. Molecular Survey of B-Lactamases Conferring Resistance to Newer B- Lactams in Enterobacteriaceae Isolates From Polish Hospitals. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 52: 2449-2454.
- Erhan M.K., 2015. Kanatlı Beslemesinde Antibiyotiklere Alternatif Olarak Kullanılan Bitki Ekstraktlarının Performans Değerleri ve Diğer Bazı Parametreler Açıısından Değerlendirilmesi. Alinteri Zirai Bilimler Dergisi, 28 (1): 45-54.
- Eroğlu ., Cömert F.B., K¼lah C., Aktaş E., 2007. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz (GSBL) reten *Klebsiella pneumoniae* ve *Klebsiella oxytoca* Kökenlerinde Enzim Tiplerinin İzoelektrik Odaklama Yöntemi ile Belirlenmesi. T¼rk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 37: 76-84.
- EUCAST 2013. European Committee On Antimicrobial Susceptibility Testing Guidelines For Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical And/Or Epidemiological Importance. EUCAST, Basel, Switzerland: http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Resistance_mechanisms/EUCAST_detection_of_resistance_mechanisms_v1.0_20131211.pdf. (Erişim tarihi: 08.03.2016).
- Evrensel S.S., Temelli S., Anar ř., 2003. Mandıra D¼zeyindeki İşletmelerde Beyaz Peynir retiminde Kritik Kontrol Noktalarının Belirlenmesi. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences, 35: 27-29.
- Feng P., Weagant S.D., Jinneman K., 2016. BAM: Diarrheagenic *Escherichia coli*. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm070080.htm>.

(Erişim tarihi: 23.03.2017).

Finley R.L., Collignon P., Larsson D.J., McEwen S.A., Li X.Z., Gaze W.H., Topp E., 2013. The Scourge of Antibiotic Resistance: The Important Role of The Environment, *Clinical Infectious Diseases*, 57 (5): 704-710.

Food and Drug Administration, 2012. FDA Releases 2012 NARMS Retail Meat Annual Report, 2013 Preliminary Data; Some Encouraging Early Trends Seen.

<https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm442221.htm>.

(Erişim tarihi: 23.03.2017).

Forsythe S., 2013. Advisory Committee On Animal Feedingstuffs. https://acaf.food.gov.uk/sites/default/files/mnt/drupal_data/sources/files/multimedia/pdfs/committee/acaf1318.pdf . (Erişim tarihi: 27.02.2017).

Gabriel A.A., Nakano H., 2011. Effects of Culture Conditions on The Subsequent Heat Inactivation of *E. coli* O157: H7 in Apple Juice. *Food Control*, 22 (8): 1456-1460.

Gajdosova J., Benedikovicova K., Kamodyova N., Tothova L., Kaclikova E., Stuchlik S., Turna J., Drahovska H., 2011. Analysis of The DNA Region Mediating Increased Thermotolerance at 58°C in *Cronobacter* sp. and Other Enterobacterial Strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 100 (2): 279-289.

Garcia-Migura L., Hendriksen R.S., Fraile L., Aarestrup F.M., 2014. Antimicrobial Resistance of Zoonotic and Commensal Bacteria in Europe: The Missing Link Between Consumption and Resistance In Veterinary Medicine. *Veterinary Microbiology*, 170 (1): 1-9.

Genç F., 2015. Subklinik Mastitisli Sığırlardan *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus uberis* Ve *Streptococcus dysgalactiae* Etkenlerinin İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıklarının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Türkiye.

George D., Mallery M., 2010. SPSS for Windows Step by Step: A Simple Guide and Reference, 17.0 update (10a ed.) Boston.

Gündogan N., Avci E., 2013. Prevalence and Antibiotic Resistance of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Producing *Escherichia Coli* and *Klebsiella* Species Isolated

- From Foods of Animal Origin in Turkey. African Journal of Microbiology Research, 7 (31): 4059-4064.
- Gundogan, N., Yakar U.A., 2007. Siderophore Production, Serum Resistance, Hemolytic Activity And Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Klebsiella* Species Isolated From Milk And Milk Products. Journal of Food Safety, 27 (3): 251-264.
- Gupta G., Tak V., Mathur P., 2014. Detection of AmpC β -lactamases in Gram-Negative Bacteria. Journal of Laboratory Physicians, 6 (1): 1-6.
- Gülay Z., Biçmen M., Amyes S.G.B., Yuluğ N., 2001. *Escherichia coli* Suşlarında Amoksisilin/Klavulanik Asit Direnci ve Bununla İlişkili Beta- Laktamaz ve plazmid Profilleri. Ankem Dergisi, 15 (1): 1-10.
- Gülay Z., Küçüküven M., Yuluğ N., 1998. Genişlemiş Spektrumlu Beta- Laktamaz Varlığının Saptanmasında Kullanılan Çeşitli Yöntemlerin Değerlendirilmesi. Ankem Dergisi, 12 (4): 514-521.
- Gümüş B., 2015. Köpek ve Kedi Dışkılarında Genişletilmiş Spektrumlu Beta-Laktamaz ve AmpC Beta- Laktamaz Üreten *Escherichia coli*'nin Prevalansının Belirlenmesi. Doktora Tezi. İstanbul Üniversitesi, Türkiye.
- Gürbulak K., Canoğlu E., Abay M., Atabay Ö., Bekyürek T., 2009. İneklerde Subklinik Mastitisin Farklı Yöntemlerle Saptanması. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15 (5): 765-770.
- Güven S., Zorba N.N. 2011. Genel Mikrobiyoloji ve Laboratuvar Kılavuzu (3. Baskı), Nobel Yayın Evi, Ankara.
- Haron A.W., Abdullah F.F.J., Tijjani A., Abba Y., Adamu L., Mohammed K., Amir A.M.M., Sadiq M.A., Lila M.A. M., 2014. The use of Na⁺ and K⁺ Ion Concentrations as Potential Diagnostic Indicators of Subclinical Mastitis in Dairy Cows. Veterinary World, 7: 966-969.
- Heringstad B., Klemetsdal G., Ruane, J., 2000. Selection For Mastitis Resistance in Dairy Cattle: A Review With Focus on The Situation in The Nordic Countries. Livestock Production Science, 64 (2): 95-106.
- Hillerton J. E., Walton A.W., 1991. Identification of Subclinical Mastitis with A Hand-

- Held Electrical Conductivity Meter. *The Veterinary Record*, 128 (22): 513-515.
- Hordijk J., Wagenaar J. A., Kant A., Van Essen-Zandbergen A., Dierikx C., Veldman K., Mevius D. 2013. Cross-Sectional Study on Prevalence and Molecular Characteristics of Plasmid Mediated ESBL/Ampc-Producing *Escherichia coli* Isolated From Veal Calves At Slaughter. *Plos One*, 8 (5): 1-7.
- Huijbers P.M.C., Hoek A.H.A.M., Van Graat E.A.M., Haenen A.P.J., Florijn A., Hengeveld P.D., Duijkeren E.Van., 2015. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and Extended-Spectrum and Ampc B -Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Broilers and in People Living and /or Working on Organic Broiler Farms. *Veterinary Microbiology*, 176 (1–2): 120–125. <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.12.010>.
- Ibrahim D.R., Dodd C.E., Stekel D.J., Ramsden S.J., Hobman J.L., 2016. Multidrug Resistant, Extended Spectrum B-Lactamase (ESBL)-Producing *Escherichia coli* Isolated From A Dairy Farm. *Fems Microbiology Ecology*, 92 (4): <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw013>.
- Ikiz S., Başaran B., Bingöl E.B., Çetin Ö., Kaşıkçı G., Özgür N.Y., Sabuncu A., 2013. Presence and Antibiotic Susceptibility Patterns of Contagious Mastitis Agents (*Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae*) Isolated from Milks of Dairy Cows With Subclinical Mastitis. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 37 (5): 569-574.
- Jacoby G. A., 2009. AmpC β -lactamases. *Clinical Microbiology Reviews*, 22 (1): 161-182.
- Jehl F., Chomar M., Weber M., Gerard A., 2003. Antibiyotik Duyarlılık Testlerinden Reçeteye.(Çeviri: Söyletir G., Bal Ç., Gür D., Topçu A.W), s.76, BioMerioux yayınları, İstanbul
- Jin T., Zhang H., Boyd G., Tang J., 2008. Thermal Resistance of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* K12 in Liquid Egg Determined by Thermal-Death-Time Disks. *Journal of Food Engineering*, 84 (4): 608-614.
- Jones T.O., 1999. *E. coli* Mastitis-The Past, The Present and The Future. *Proceedings of The British Mastitis Conference*, 62-72.
- Kaşıkçı G., Çetin Ö., Bingöl E.B., Gündüz M.C., 2012. Relations Between Electrical Conductivity, Somatic Cell Count, California Mastitis Test and Some Quality

- Parameters in The Diagnosis of Subclinical Mastitis in Dairy Cows. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences,36 (1): 49-55.
- Kaya A., Uzmay C., Kaya İ., Kesenkaş H., 2001. İzmir İli Holstein Damızlık Süt Sığırı Yetiştirici Birliği İşletmelerinde Mastitisin Yaygınlık Düzeyi ve Etkileyen Etmenler Üzerine Araştırmalar II. Mastitisin Yaygınlık Düzeyi. Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi, 38 (1): 63-70.
- Khoshbakht R., Shahed A., Aski H.S., 2014. Characterization of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated From Dairy Products. The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences,3 (4): 333-336.
- Kim H. H., Samadpour M., Grimm L., Clausen C.R., Besser T. E., Baylor M., Kobayashi J.M., Neill M.A., Schoenknecht F.D., Tarr P.I., 1994. Characteristics of antibiotic-resistant *Escherichia coli* O157: H7 in Washington State, 1984–1991. Journal of Infectious Diseases,170(6): 1606-1609.
- Koçyiğit R., 2012. Bolu Mudurnu Bölgesinde Bulunan Süt İneklerinde Subkilinik Mastitis İnsidansının Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Afyon Kocatepe Üniversitesi, Türkiye.
- Koldaş K., Mumcuoğlu İ., Karahan Z.C., Coşkun F.A., Kurşun Ş., Aksu N., 2011. Enterobacteriaceae Suşlarında Plazmid Kökenli Ampc Beta-Laktamaz Varlığının Multipleks PZR ve Fenotipik Yöntemlerle Araştırılması. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi. 41 (2): 65-72.
- Kolhapure R.M., Kumar A., Rajkumar H.R.V., 2015. Coexpression of ESBL , AmpC and MBL in Gram Negative Bacilli, International Journal of Research in Medical Sciences, 3 (10): 2698–2703.
- Köse S.K., 2012. Korelasyon ve Regresyon Analizi. http://file.toraks.org.tr/TORAKSFD23NJKL4NJ4H3BG3JH/mse-ppt-pdf/Kenan_KOSE3.pdf. (Erişim tarihi: 23.02.2017).
- Kul E., Erdem H., Atasever S., 2006. Süt Sığırlarında Farklı Meme Özelliklerinin Mastitis ve Süt Somatik Hücre Sayısı Üzerine Etkileri. Journal of Faculty of Agricultural Omu, 21 (3): 350-356.
- Kuzucu Ç., Yetkin F., Görgeç S., Ersoy Y., 2011. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz

- Üreten *Escherichia coli* Ve *Klebsiella* spp. Suşlarının Ertapenem ve Diğer Karbapenemlere Karşı Duyarlılıklarının Araştırılması. Mikrobiyol Bülteni, 45 (1): 28-35.
- Kürekci C., Arkadaş M., Avşar Y.K., 2016. Occurrence, Genetic Characterization and Antimicrobial Resistance of Extended Spectrum B-Lactamase Producing *Escherichia coli* Isolated from Sürk Samples, A Traditional Turkish Cheese. Journal of Food Measurement and Characterization, 10 (3): 709-714.
- Lalak A., Wasyl D., Zając M., Skarżyńska M., Hoszowski A., Samcik I., Wozniakowski G., Szulowski K., 2016. Mechanisms of Cephalosporin Resistance In Indicator *Escherichia coli* Isolated from Food Animals. Veterinary Microbiology, 194: 69-73.
- Landry, J., S. Lamarche, and P. Chr6tien. 1987. Heat shock proteins: a lead to the understanding of cell thermotolerance. In Thermotolerance. Vol 1. K. J. Henle, editor. CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. 145-174.
- Le Maréchal C., Thiéry R., Vautor E., Le Loir, Y. 2011. Mastitis Impact on Technological Properties of Milk and Quality of Milk Products—A Review. Dairy Science & Technology, 91 (3): 247-282.
- Liebana E., Carattoli A., Coque T. M., Hasman H., Magiorakos A.P., Mevius D., Peixe L., Poirel L., Schuepbach-Regula G., Torneke K., Torren-Edo J., Torres, C., Threlfall J., 2012. The Public Health Risks of Enterobacterial Isolates Producing Extended-Spectrum B-Lactamases (ESBL) or Ampc B-Lactamases In Food and Food-Producing Animals: An EU Perspective of Epidemiology, Analytical Methods, Risk Factors And Control Options. Clinical Infectious Diseases, 56 (7): 1030-1037.
- Livermore D.M., Brown D.F.J., 2001. Detection of β -lactamase - Mediated Resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48: 59-64.
- Lou Y., Yousef A.E., 1997. Adaptation to Sublethal Environmental Stresses Protects *Listeria Monocytogenes* Against Lethal Preservation Factors. Applied and Environmental Microbiology, 63 (4): 1252-1255.
- Mackey B.M., Miles, C.A., Parsons S.E., Seymour D.A., 1991. Thermal Denaturation of Whole Cells and Cell Components of *Escherichia coli* Examined By Differential Scanning Calorimetry. Journal of General Microbiology, 137: 2361-74.

- Malek dos Reis C.B.M., Barreiro J.R., Mestieri L., de Felício Porcionato M. A., dos Santos, M.V.,2013. Effect of Somatic Cell Count and Mastitis Pathogens on Milk Composition In Gyr Cows. BMC Veterinary Research, 9 (67): 1-7.
- Maron D.F., Smith T.J., Nachman K.E., 2013. Restrictions on Antimicrobial Use in Food Animal Production: An International Regulatory and Economic Survey. Globalization and Health, 9 (48): 1-11.
- Marshall B.M., Levy S.B., 2011. Food Animals and Antimicrobials: İmpacts on Human Health, Clinical Microbiology Reviews, 24 (4): 718-733.
- Martinez J.L., Cercenado E., Rodriguez-Creixems M., Vincente-Perez M.F., Delgado-Iribarren A., Baquero F., 1987. Resistance to Beta-lactam/clavulanate. The Lancet, 19 (2): 1473- 1473.
- Maturin L.J., Peeler J.T., 2001. Aerobic plate count. In, Bacteriological Analytical Manual, Chapter 3. <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm063346.htm>, (Erişim tarihi: 26.02.2017).
- McEwen S.A., Fedorka-Cray P.J., 2002. Antimicrobial Use and Resistance in Animals.Clinical Infectious Diseases,34 (3): 93-106.
- Mendeş M., 2012.Uygulamalı Bilimler İçin İstatistik ve Araştırma Yöntemleri. Kriter Yayınevi, İstanbul. 72-73p.
- Meng J., Zhao S., Doyle M. P., Joseph S. W. 1998. Antibiotic Resistance of *Escherichia coli* O157: H7 and O157: NM Isolated from Animals, Food, and Humans.Journal of Food Protection,61 (11): 1511-1514.
- Merza S.M., 2014. Detection of Shıga Toxin Genes (*Stx1* And *Stx2*) in *Escherichia coli* O157:H7 Isolated from Meat Products. Master Thesis. Kahramanmaraş Sütü İmam University. Kahramanmaraş, Turkey.
- Metin M., 2005. Süt Teknolojisi, Sütün Bileşimi ve İşlenmesi. Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.
- Michalopoulos A., Virtzili S., Rafailidis P., Chalevelakis G., Damala M., Falagas M.E., 2010. Intravenous Fosfomycin for The Treatment of Nosocomial Infections Caused

- By Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Critically Ill Patients: A Prospective Evaluation. Clin Microbiol Infect. 16 (2): 184-6.
- Middleton J.R., Hardin D., Steevens B., Randle R., Tyler J.W., 2004. Use of Somatic Cell Counts and California Mastitis Test Results from Individual Quarter Milk Samples to Detect Subclinical Intramammary Infection in Dairy Cattle from A Herd with A High Bulk Tank Somatic Cell Count. JAVMA. 224: 419-423.
- Mirelis B., Riveara A., Miro E., Mesa R.J., Navarro F., Coll P., 2006. A Simple Phenotypic Method for Differentiation Between Acquired and Chromosomal Ampc Beta-Lactamases in *Escherichia coli*. Enferm. Infectious Microbiology Clinical, 24: 370-372.
- Mitchell G.E., 1989. The Contribution of Lactose, Chloride, Citrate and Lactic Acid to The Freezing Point of Milk. Australian Journal of Dairy Technology, 44: 61-64.
- Mola A.O., Avcı E., Mert İ., Yılmazbilen A.R., Yıldız S., 2011. Dünya ve Türkiye Süt Endüstrisi Raporu, ASÜD (Ambalajlı Süt ve Süt Ürünleri Sanayicileri Derneği), Ankara.
- Moland E., Kim S., Hong S., Thomson K., 2008. Newer β -Lactamases: Clinical and Laboratory Implications, Part II. Clinical Microbiology Newsletter, 30: 79-85.
- Mora A., Blanco J. E., Blanco M., Alonso M.P., Dhahi G., Echeita A., Gonzalez E.A., Bernardez M.I., Blanco J., 2005. Antimicrobial Resistance of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* O157: H7 and Non-O157 Strains Isolated from Humans, Cattle, Sheep and Food in Spain. Research in Microbiology, 156 (7): 793-806.
- Nadjar, D., Rouveau, M., Verdet, C., Donay, J. L., Herrmann, J. L., Lagrange, P. H., Philippon A., Arlet, G., 2000. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing Transferable Ampc-Type β -Lactamase (ACC-1) Originating from *Hafnia alvei*. FEMS Microbiology Letters, 187 (1): 35-40.
- Nergiz Ü. R., Besler H.T., 2008. Beslenmede Sütün Önemi. Sağlık Bakanlığı Klamat Matbaacılık, Ankara.
- Nguyen D.P., Nguyen T.A.D., Le T.H., Tran N.M.D., Ngo T.P., Dang V.C., Kawai T., Kanki M., Kawahara R., Jinnai M., Yonogi S., Hirai Y., Yamamoto Y., Kumeda Y.,

2016. Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamase-and AmpC β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* within the Food Distribution System of Ho Chi Minh City, Vietnam. BioMed Research International, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/8182096>.
- Niedhart F.G., Vanbogolen R.A., Vaughn V., 1984. The Genetics and Regulation of Heat Shock Proteins. Annual Reviews in Genetics 18: 295–329.
- Ntuli V., Njage P.M., Buys E.M., 2017. Extended-Spectrum B-Lactamase, Shigatoxin and Haemolysis Capacity of O157 and Non-O157 *E. coli* Serotypes from Producer-Distributor Bulk Milk. International Dairy Journal, 66: 126-134.
- Odenthal S., Akineden Ö., Usleber E., 2016. Extended-Spectrum B-Lactamase Producing Enterobacteriaceae in Bulk Tank Milk From German Dairy Farms. International Journal of Food Microbiology, 238: 72-78.
- Ohnishi M., Okatani A.T., Harada K., Sawada T., Marumo K., Murakami M., Uchida N., 2013. Genetic Characteristics of CTX-M-Type Extended-Spectrum-B-Lactamase (ESBL)-Producing Enterobacteriaceae Involved In Mastitis Cases on Japanese Dairy Farms, 2007 to 2011. Journal of Clinical Microbiology, 51 (9): 3117-3122.
- Orak- Farsak F., 2005. Hastane Enfeksiyonuna Neden Olan Gram-Negatif Bakterilerde Direnç Paterni ve Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz Tayini. Uzmanlık Tezi. Çukurova Üniversitesi. Türkiye.
- Öcal D., 2012. Gram Negatif Bakterilerde Antibakteriyal Direncin Fenotipik Yöntemler ile Tayin ve Bildirimi. Ankem Dergisi, 26 (3): 154-164.
- Öksüz Ö., Arıcı M., Kurultay S., Gümüş T., 2004. Incidence of *Escherichia coli* O157'in Raw Milk and White Pickled Cheese Manufactured from Raw Milk in Turkey”, Food Control, 15: 453-456.
- Öndeş N., Özpınar H., 2016. Occurrence of ESBL-Producing Enterobacteriaceae in Cubed Beef Samples. Kafkas Univ Vet Fak Derg., 22 (1): 79-83, DOI: 10.9775/kvfd.2015.13944.
- Önlen C., 2013. Gıda Kaynaklı *Escherichia coli* Kökenlerinde Toksin Genlerinin Multipleks PCR Yöntemiyle Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Türkiye.

- Örnek G., 2013. Atların Dışkılarında İzole Edilen *Escherichia coli* İzolatlarında Antimikrobiyal Direnç ve Genişlemiş Spektrumlu Beta Laktamaz Üretiminin Fenotipik Olarak Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Özadam A., Özpınar H., 2016. Phenotypic Determination of Esbl-and Ampc-Producing Enterobacteriaceae in Cheese Samples. International Journal of Food Engineering Research (IJFER), 2 (2): 43-58.
- Özbilgin S., 2014. Mastitisler ve Korunma Yöntemleri. <http://www.slideserve.com/ingrid-stevenson/prof-dr-selda-zb-lg-n-mast-t-s-ler-meme-hastali-i-ve-korunma-y-ntemler>. (Erişim tarihi: 21.12.2016).
- Özdemir S., Kaymaz M., 2013. Küçük Aile İşletmelerinde Yetiştirilen İneklerde Subklinik Mastitis İnsidensi ve Tanı Yöntemlerinin Karşılaştırılması. Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi, 8 (1): 71-79.
- Özdikmenli S., Yalman M., Zorba N.N., 2015. Gıdalarda Antibiyotik Dirençli Bakteriler (Özet). 5. Gıda Güvenliği Kongre Kitabı. İstanbul. 158-159.
- Özsoy M.F., Pahsa A., Yıldırım A., Erdemoğlu A., Emekdaş G. Öncül O., 2001. *Klebsiella* ve *Escherichia coli* Suşlarında Beta-Laktam Antibiyotiklere Direnç ve “Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz” sıklığı. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi, 31 (1-2): 46-53.
- Pai H, Kang C.I, Byeon J.H., Lee K.D., Park – Beon W., Kim H.B., Kim E.C., Oh M.D., Choe K.W., 2004. Epidemiology and Clinical Features of Bloodstream Infections Caused by Ampc Type Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 48 (10): 3720-8.
- Paşa Ö., 2013. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Pseudomonas aeruginosa* Kökenlerinden Genişlemiş Spektrumlu, Metallo Ve Ampc Tipi Beta Laktamaz Varlığının Araştırılması, Ampc Tipi Beta Laktamaz Üretiminin Genotipik Olarak Saptanması. Uzmanlık Tezi. Mustafa Kemal Üniversitesi, Türkiye.
- Pehlivanlar-Önen S., Aslantaş Ö., Şebnem Yılmaz E., Kürekci C., 2015. Prevalence of β -Lactamase Producing *Escherichia coli* from Retail Meat in Turkey. Journal of Food Science, 80 (9), M2023-M2029.

- Peng S., Hummerjohann J., Stephan R., Hammer P., 2014. Erratum to “Short Communication: Heat Resistance of *Escherichia coli* Strains in Raw Milk at Different Subpasteurization Conditions” (J. Dairy Sci. 96: 3543–3546). Journal of Dairy Science, 97 (10): 6623.-6623.
- Perez-Rodriguez F., Valero A., 2013. Predictive Microbiology in Foods. Springer Briefs in Food, Health, and Nutrition 5, Springer New York. 31-32.
- Pitout J.D., Nordmann P., Laupland K.B., Poirel L., 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 56 (1): 52-59.
- Phillipon A., Arlet G., Jacoby A., 2002. Plasmid-determined AmpC type β -lactamases. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 46: 1-11.
- Pillai D.R., Melano R., Rawte P., Lo S., Tijet N., Fuksa M., Roda N., Farrell D.J., Kraiden S., 2009. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, Canada. Emerging Infectious Diseases, 15(5): 827-836.
- Poole K., 2012a. Bacterial Stress Responses as Determinants of Antimicrobial Resistance. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 67 (9): 2069-2089.
- Poole K., 2012b. Stress Responses as Determinants of Antimicrobial Resistance in Gram-Negative Bacteria. Trends in Microbiology, 20 (5): 227-234.
- Poole K., 2014. Stress Responses as Determinants of Antimicrobial Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: Multidrug Efflux and More 1. Canadian Journal of Microbiology, 60 (12): 783-791.
- Rişvanlı A., 2001. Elazığ Bölgesi Süt İneklerinde Klinik ve Subklinik Mastitislerin Dağılımı, Mastitislere Sebep Olan Mikroorganizmaların İzolasyonu ve Antibiyotiklere Duyarlılıkları Üzerine Çalışma. Doktora Tezi. Fırat Üniversitesi, Türkiye.
- Rişvanlı A., Kalkan C., 2002. Sütçü İneklerde Yaş ve Irkın Subklinik Mastitisli Memelerin Sütlerindeki Somatik Hücre Sayıları ile Mikrobiyolojik İzolasyon Oranlarına Etkisi. Veteriner Fakültesi Dergisi, 13 (1-2): 84-87.
- Rowan N.J.,1999. Evidence That Inimical Food Preservation Barriers Alter Microbial Resistance, Cell Morphology and Virulence. Trends in Food Science and

- Technology, 10: 261–270.
- Ryu J.H., Beuchat L.R., 1999. Changes in Heat Tolerance of *Escherichia coli* O157: H7 After Exposure to Acidic Environments. *Food Microbiology*, 16 (3): 317-324.
- Sabuncuoğlu N., Çoban Ö., 2006. Mastitis ekonomisi. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 1 (1-2): 1-5.
- Santiago G.S., Lasagno M.C., Alencar T. A., Ribeiro L., Dubenczuk F.C., Oliva M. S., Souza M.M.S., Coelho S.M., 2015. AmpC-lactamase Production in Enterobacteria Associated With Bovine Mastitis in Brazil. *African Journal of Microbiology Research*, 9 (8): 503-508.
- Sarı A.N., Biçmen M., Gülay Z., 2013. *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Kan Kültürü İzolatlarında Plazmid Aracılı AmpC Beta-Laktamaz Varlığının Araştırılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 47 (4): 582-591.
- Sargeant J.M., Leslie K.E., Shirley, J.E., Pulkrabek B.J., Lim G.H., 2001. Sensitivity and Specificity of Somatic Cell Count and California Mastitis Test for Identifying Intramammary Infection In Early Lactation. *Journal of Dairy Science* 84: 2018– 2024.
- Schaffner D.W., Labuza T.P., 1997. Predictive Microbiology: Where Are We, and Where Are We Going?. *Food Technology (USA)*. 51 (4): 95-99.
- Schroeder C.M., Zhao C., DebRoy C., Torcolini J., Zhao S., White D. G., Wagner D.D., McDermott P.F., Walker R.D., Meng J., 2002. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O157 Isolated from Humans, Cattle, Swine, and Food. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(2): 576-581.
- Schmid A., Hörmansdorfer S., Messelhäusser U., Käsbohrer A., Sauter-Louis C., Mansfeld R., 2013. Prevalence of Extended-Spectrum B-Lactamase-Producing *Escherichia coli* on Bavarian Dairy and Beef Cattle Farms. *Applied and Environmental Microbiology*, 79 (9): 3027-3032.
- Seni J., Falgenhauer L., Simeo N., Mirambo M. M., Imirzalioglu C., Matee M., Rweyemamu M., Chkraborty T., Mshana S.E., 2016. Multiple ESBL-Producing *Escherichia coli* Sequence Types Carrying Quinolone and Aminoglycoside Resistance Genes Circulating in Companion and Domestic Farm Animals in Mwanza, Tanzania, harbor commonly occurring plasmids. *Frontiers in Microbiology*, 7 (142): doi:

10.3389/fmicb.2016.00142.

- Sharif A., Muhammad G., 2009. Mastitis Control in Dairy Animals. *Pakistan Vet. J*, 29 (3): 145-148.
- Snow L. C., Warner R.G., Cheney T., Wearing H., Stokes M., Harris K., Teale N.G., Coldham N.G., 2012. Risk Factors Associated with Extended Spectrum Beta-Lactamase *Escherichia coli* (CTX-M) on Dairy Farms in North West England and North Wales. *Preventive Veterinary Medicine*, 106 (3): 225-234.
- Song W., Bae I.K., Lee Y.N., Lee CH., Lee S.H., Jeong S.H., 2007. Detection of Extended-Spectrum B-Lactamases by Using Boronic Acid as an Ampc B-Lactamase Inhibitor in Clinical Isolates of *Klebsiella* Spp. and *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (4): 1180-1184.
- Sørensen L.P., Mark T., Sørensen M.K., Østergaard S., 2010. Economic Values and Expected Effect of Selection Index for Pathogen-Specific Mastitis Under Danish Conditions. *Journal of Dairy Science*, 93 (1): 358-369.
- Sökmen Ç., 2016. Sebzelelerde Genişlemiş Spektrumlu Beta laktamaz Üreten Enterobacteriaceae spp. İzolatlarının Antibiyotiklere Dirençlilik Durumlarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Aydın Üniversitesi, Türkiye.
- Sörqvist, S., 2003. Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 44 (1-2): 1-19.
- Söyletir G., 2013. EUCAST ve CLSI Tercihleri: Türkiye’de Nereye Gitmeliyiz. *Ankem Dergisi*, 27, 19-20.
- Spinks A.T., Dunstan R.H., Harrison T., Coombes P., Kuczera G., 2006. Thermal Inactivation of Water-Borne Pathogenic and Indicator Bacteria at Sub-Boiling Temperatures. *Water Research*, 40 (6), 1326-1332.
- SPSS I., 2011. IBM SPSS Statistics Base 20. Chicago, IL: SPSS Inc.
- Srinivasan V., Gillespie B. E., Lewis M. J., Nguyen L. T., Headrick S. I., Schukken, Y. H., Oliver S. P., 2007. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolated from dairy cows with mastitis. *Veterinary Microbiology*, 124

(3): 319-328.

- Stephan R., 2016. Prevalence and Molecular Epidemiology of ESBL and Carbapenemase Producing Enterobacteriaceae Along The Food Chain. Foodmicro2016. Dublin.
- Straley B.A., Donaldson S.C., Hedge N.V., Sawant A.A., Srinivasan V., Oliver S.P., Jayarao B.M., 2006. Public Health Significance of Antimicrobial-Resistant Gram-Negative Bacteria in Raw Bulk Tank Milk. Foodborne Pathogens & Disease, 3 (3): 222-233.
- Sudarwanto M., Akineden Ö., Odenthal S., Gross M., Usleber E., 2015. Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL)–Producing *Klebsiella pneumoniae* in Bulk Tank Milk from Dairy Farms in Indonesia. Foodborne Pathogens and Disease, 12 (7): 585-590.
- Şahin A., Yıldırım A., 2015. Mandalarda Mastitis Olgusu. Türk Tarım - Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi, 3 (1): 1–8.
- Şeker E., Özenç E., 2010. Mastitisli İnek Sütlerinden İzole Edilen Koagülaz Negatif Stafilkokların Antibiyotik Dirençlilikleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 21 (2): 107-111.
- Şimşek H., 2014. ‘Akılcı İlaç Kullanımı ve Farkındalık’ Sempozyumu. 19 Kasım 2014. P13-14.
- Tan T.Y., Ng L.S.Y., He J., Koh T.H., Hsu L.Y., 2009. Evaluation of Screening Methods to Detect Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53 (1): 146-149.
- Taşçı F., Seçilmiş-Canbay H., 2016. Gıda Amaçlı Yetiştirilen Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımının Halk Sağlığı Üzerine Etkileri. Ayrıntı Dergisi, 4 (45): 32-36.
- Tekiner İ.H., 2016. Gıdalardan İzole Edilen Enterobacteriaceae Suşlarında Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazların Moleküler Yöntemle Araştırılması. Doktora Tezi. İstanbul Aydın Üniversitesi, Türkiye.
- Tekiner İ.H., Özpınar H., 2016. Occurrence and Characteristics of Extended Spectrum Beta-Lactamases-Producing Enterobacteriaceae from Foods of Animal Origin. Brazilian Journal of Microbiology, 47(2): 444-451.
- Tel O.Y., Keskin O., Zonturlu A.K., Kaya N.B.A., 2009. Şanlıurfa Yöresinde Subklinik Mastitislerin Görülme Oranı, Aerobik Bakteri İzolasyonu ve Duyarlı Antibiyotiklerin

- Belirlenmesi. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 23 (2): 101-106.
- Timofte D., Maciuca I. E., Evans N. J., Williams H., Wattret A., Fick J.C., Williams N.J., 2014. Detection and molecular characterization of *Escherichia coli* CTX-M-15 and *Klebsiella pneumoniae* SHV-12 β -lactamases from bovine mastitis isolates in the United Kingdom. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58 (2): 789-794.
- Timurkan H., 2014. İneklerde California Mastitis Testi ve Sütün Elektrik İletkenliğinin Karşılaştırılması. Fırat Üniversitesi Sağlık Bilimleri Veteriner Dergisi, 28 (3): 135–136.
- Thomson K.S., 2010. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. *Journal of Clinical Microbiology*, 48 (4): 1019-1025.
- Türkiye İstatistik Kurumu (TÜİK), 2015. Süt ve Süt Ürünleri Üretim Miktarı (Ton), <https://biruni.tuik.gov.tr/medas/?kn=85&locale=tr>. (Erişim tarihi: 20.02. 2017).
- Türkyılmaz S., Yıldız Ö., Oryaşın E., Kaynarca S., Bozdoğan B., 2010. Molecular Identification of Bacteria Isolated from Dairy Herds with Mastitis. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 16 (6): 1025-1032.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2012. Guidance for Industry The Judicious Use of Medically Important Antimicrobial Drugs in Food-Producing Animals. USDA, Washington, DC.
- U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2015. Testing Methodologies for *E. coli* O157:H7 and *Salmonella* species in Spent Sprout Irrigation Water (or Sprouts). October, Version 1
- Ulusal Mikrobiyoloji Standartları (UMS) 2015. Bulaşıcı Hastalıklar Laboratuvar Tanı Rehberi. T.C. Sağlık Bakanlığı Ankara Cilt 1,2, 3.
- Uluslan D.Z., 2009. Klinik Örneklerden İzole Edilen *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* Suşlarında Plazmidik AmpC Tipi Beta-Laktamaz Direncinin Araştırılması. Uzmanlık Tezi. İstanbul Üniversitesi. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi. İstanbul, Türkiye.
- Uzmay C., Akbafı Y., Kaya A., 2003. Siyah Alaca İneklerde Meme ve Meme Başı Formu ile Laktasyon Sırası ve Laktasyon Döneminin Subklinik Mastitis Üzerine Etkisi.

- Turkish Journal Veterinary Animal Sciences, 27: 695–701.
- Ünal N., 2012. Mastitisli Hayvanlardan İzole Edilen Stafilokokların Antibiyotik Direnci ve Hayvanlarda Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*. Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 9 (3): 221-231.
- Ünlütürk A., Turantaş F., 2003. Gıda Mikrobiyolojisi, Meta Basım, İzmir, s16.
- Valentin L., Sharp H., Hille K., Seibt U., Fischer J., Pfeifer Y., Michael G.B., Nickel S., Schmiedel J., Falgenhauer L., Friese A., Bauerfeind R., Roesler U., Imirzalıoğlu C., Chakraborty T., Helmuth R., Valenza G., Werner G., Schwarz S., Guerra B., Appel B., Kreienbrock L., Käsbohrer A., 2014 . Subgrouping of ESBL-Producing *Escherichia coli* from Animal and Human Sources: An Approach to Quantify The Distribution of ESBL Types Between Different Reservoirs. International Journal of Medical Microbiology, 304 (7): 805–811. <http://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.015>.
- Valladares M.D., 2015. Thermal Inactivation of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in Foods. Doctor of Philosophy. The University of Tennessee, Knoxville, USA.
- Verraes C., Boxstael S., Meervenne E.V., Coillie E.V., Butaye P., Catry B., Schaetzen M.A., Huffel X.V., Imberechts H., Dierick K., Daube G., Saegerman C., Block J., Dewulf J., Herman L., 2013. Antimicrobial Resistance in The Food Chain: A Review. International Journal of Environmental Research Public Health, 10: 2643-2669.
- Vianna P.C.B., Mazal G., Santos M.V., Bolini H.M.A., Gigante M.L., 2008. Microbial and Sensory Changes Throughout The Ripening of Prato Cheese Made From Milk With Different Levels of Somatic Cells. Journal of Dairy Science, 91: 1743–1750.
- Vural A., Erkan M.E., Güran H.Ş., 2010. The Examination of The Microbiologic Quality in Örgü Cheese (Braided Cheese) Samples. Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 16: 53-58.
- Vrabec M., Lovayová V., Dudriková K., Gallo J., Dudriková E., 2015. Antibiotic Resistance and Prevalence of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* Isolated from Bryndza Cheese. Italian Journal of Animal Science, 14(4), 3968.
- Walsh C., Duffy G., Sheridan J.J., Fanning S., Blair I. S., McDowell D.A., 2005. Thermal Resistance of Antibiotic-Resistant and Antibiotic-Sensitive *Salmonella* spp. on Chicken Meat. Journal of Food Safety, 25 (4): 288-302.

- Wang G., Doyle M.P., 1998. Heat-Shock Response Enhances Acid Tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 31-4.
- Wasyl D., Hasman H., Cavaco L. M., Aarestrup F.M., 2012. Prevalence and Characterization of Cephalosporin Resistance in Nonpathogenic *Escherichia coli* from Food-Producing Animals Slaughtered in Poland. *Microbial Drug Resistance*, 18 (1): 79-82.
- Weiner M., Rózańska H., Kubajka M., Szulowski K., Krajewska M., Wasiński B., 2015. Occurrence and Characterisation of MRSA and Extended-Spectrum ??-Lactamases Producing *Escherichia coli* Isolated from Mastitic Cows'milk. *Bulletin of The Veterinary Institute in Pulawy*, 59 (2): 191–195. <http://doi.org/10.1515/bvip-2015-0029>.
- Whiting R.C., Golden M.H., 2002. Variation among *Escherichia coli* O157: H7 Strains Relative to Their Growth, Survival, Thermal Inactivation, and Toxin Production In Broth. *International Journal of Food Microbiology*, 75(1): 127-133.
- Wielinga P.R., Jensen V.F., Aarestrup F.M., Schlundt J., 2014. Evidence-Based Policy for Controlling Antimicrobial Resistance in The Food Chain in Denmark. *Food Control*, 40: 185–192. <http://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.11.047>.
- Yalçın C., 2000. Cost of Mastitis in Scottish Dairy Herds with Low and High Subclinical Mastitis Problems. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 24: 465-472.
- Yavaş E.S., 2015. Gıdalardan İzole Edilen Enterobacteriaceae Türlerinin Amino Asit Dekarboksilaz Aktivitesi Biyofilm Oluşumu ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Belirlenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi. Biyoloji Anabilimdalı, Türkiye.
- Yeşilmen S., Özyurtlu N., Bademkiran S., 2012. Diyarbakır Yöresinde Sublinik Mastitisli İneklerde Etken İzolasyonu ve Duyarlı Antibiyotiklerin Belirlenmesi, *Dicle Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi* 1: 24-29.
- Yeşilyurt C., 2010. Aydın İli Mezbahalarında *E.coli* O157: H7 ve *Listeria Monocytogenes* Varlığının Araştırılması. Doktora Tezi. Adnan Menderes Üniversitesi, Türkiye.
- Yıbar A., Soyutemiz E., 2013. Gıda Değeri Olan Hayvanlarda Antibiyotik Kullanımı ve Muhtemel Kalıntı Riski. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 8 (1): 97-104.

- Yılmaz İ., 2006. Verilerin Çözümlemesi-İlişki-Korelasyon. Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- Yuluğ N., 1997. Beta-Laktamazlar ve Klinik Açından Önemi. Ankem Dergisi, 11 (2): 205-207.
- Zagorska J., Ciprova I., 2013. Evaluation of Factors Affecting Freezing Point of Milk. International Journal of Biological, Biomolecular, Agricultural, Food and Biotechnological Engineering, 7: 106-111.
- Zhao T., Doyle M.P., Shere J., Garber L., 1995. Prevalence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 in a Survey of Dairy Herds. Applied and Environmental Microbiology, 61 (4): 1290-1293.



EKLERİ

EK 1. Kullanılan Malzemeler

1.1. Besiyerleri, Kimyasal Çözeltiler ve Ekipmanlar

1.1.1. Besiyerleri

1.1.1.1. Plate Count Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 22,5 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. 45- 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 mL besiyeri olacak şekilde ekim sırasında paylaştırılmıştır.

1.1.1.2. Fluorocult Violet Red Bile Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 39,6 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. 45- 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 mL besiyeri olacak şekilde ekim sırasında paylaştırılmıştır.

1.1.1.3. CT- Sorbitol MacConkey Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 25,75 g/500 mL olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. 45- 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra CT- Supplement (Merck 1.09202) 1 mL steril distile su ile çözülerek 1 mL/ 500 mL hesabı ile ilave edilerek karıştırılan besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 mL besiyeri olacak şekilde ekim sırasında paylaştırılmıştır.

1.1.1.4. Sefotaksim Katkılı MacConkey Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 50 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. 45- 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra sefotaksim 2 mg/L olacak şekilde ilave edilerek karıştırılan besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 mL besiyeri olacak şekilde ekim sırasında paylaştırılmıştır.

1.1.1.5. Sefotaksim Katkılı Eosin Methylene- blue Lactose Sucrose agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 36 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. 45- 50

°C'ye kadar soğutulduktan sonra sefotaksim 2 mg/L olacak şekilde ilave edilerek karıştırılan besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 mL besiyeri olacak şekilde ekim sırasında paylaştırılmıştır.

1.1.1.6. mTSB Broth Novobiocin Katkılı (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 33 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra 225'er mL dağıtılıp otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

1.1.1.7. HiCrome ESBL Agar (Himedia, Hindistan)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 40 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. 45- 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra, HiCrome ESBL Selective Supplement (FD278) te 5 mL distile steril su ilave edilerek çözüldürüldükten sonra 5 mL/ 500mL oranında besiyerine ilave edilerek karıştırıldı. Besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 mL besiyeri olacak şekilde paylaştırılmıştır.

1.1.1.8. Tryptone Water (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 15 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, 5'er mL cam tüplere dağıtıldı. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

1.1.1.9. SIM Besiyeri (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 30 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, 5'er mL cam tüplere dağıtıldı. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

1.1.1.10. MV-VP Broth (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 17 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, 5'er mL cam tüplere dağıtıldı. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir.

1.1.1.11. Simmons Citrate Agar (Biolife, İtalya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 22,3 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, 5'er mL cam tüplere dağıtıldı. Otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrasında tüpler eğilmiş, eğik besiyeri hazırlanmıştır.

1.1.1.12. Mueller Hinton Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 34,0 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. 45- 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 mL besiyeri olacak şekilde paylaştırılmıştır.

1.1.1.13. Nutrient Agar (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edilen toz haldeki besiyerinden 20,0 g/L olacak şekilde tartılarak distile suda çözüldükten sonra, otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edildi. 45- 50 °C'ye kadar soğutulduktan sonra besiyeri 9 cm çapındaki steril petrilere her petride 20 mL besiyeri olacak şekilde paylaştırılmıştır.

1.1.1.14. %16 Gliserollü Stok Besiyeri (UMS, 2015)

Tryptic Soy Broth (TSB)	1 g
Gliserol	10 mL
Distile su	40 mL
pH 7.2 115 °C'de 15 dk	

1.1.1.14. Hugh- Leifson Glukoz Broth (UMS, 2015)

Pepton	2.0 g
Sodyum klorid	5.0 g
Bromtimol mavisi	0.03 g
Agar	3.0 g
Dipotasyum fosfat	0.30 g
Distile su	1000 mL

1.1.2. Biyokimyasal Testler ve Ayıraçlar

1.1.2.1. O157 Antiserumu (Biolife, İtalya)

Ticari olarak temin edildi. Kullanım talimatına göre uygulandı.

1.1.2.2. Kovacs İndol çözeltisi (Merck, Almanya)

Ticari olarak temin edildi. Analiz talimatına göre kullanıldı.

1.1.2.3. Metil Red Çözeltisi (UMS, 2015)

Metil Red (Merck, Almanya)	0,050 g
Etil Alkol	150 mL
Distile Su	100 mL

1.1.2.4. %10 Potasyum Hidroksit (KOH) Çözeltisi (UMS, 2015)

Potasyum Hidroksit (Merck, Almanya)	10 g
Distile su	100 mL

1.1.2.5. Alfa Naftol Çözeltisi (UMS, 2015)

Alfa Naftol (Merck, Almanya)	5 g
Etil Alkol	100 mL

1.1.2.6. Oksidaz Ayıracı (UMS, 2015)

N,N,N',N'-Tetrametil-1,4-fenilen diamin dihidroklorür	0,05 g
Distile steril su	5 mL

1.1.2.7. Boronik Asit Çözeltisi (UMS, 2015)

Boronikasit (Bioanalyze, Türkiye)	120 mg
DMSO (Merck, Almanya)	3 mL
Distile Steril Su	3 mL

1.1.3. Antibiyotik Diskleri

1.1.3.1. GSBL Aktivitesinin Belirlenmesinde Kullanılacak Antibiyotik Diskleri

Sefpodoksim	10 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Seftazidim	30 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Aztreonam	30 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Sefotaksim	30 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Seftriakson	30 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Seftazidim	10 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Sefotaksim	5 µg	(Bioanalise, Türkiye)

1.1.3.2. GSBL Aktivitesinin Doğrulanmasında Antibiyotik Diskleri

Seftazidim	30 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Seftazidim /Klavulanik asit	30/10 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Sefotaksim	30 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Sefotaksim/ Klavulanik asit	30/10 µg	(Bioanalise, Türkiye)

1.1.3.3. AmpC Beta- laktamaz Enzim Varlığının Araştırılmasında Kullanılan Antibiyotik Diskleri

Sefoksitin	30 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Seftazidim	30 µg	(Bioanalise, Türkiye)
İmipenem	10 µg	(Bioanalise, Türkiye)
Amoksisilin/ Klavulanik asit	30 µg	(Bioanalise, Türkiye)

1.1.3.4. AmpC Beta- laktamaz Enzim Varlığının Doğrulanmasında Kullanılan Antibiyotik Diskleri

Seftazidim	30 µg	(Bioanalize, Türkiye)
Sefotaksim	30 µg	(Bioanalize, Türkiye)
Kloksasilin	500 µg	(Bioanalize, Türkiye)

1.1.3.5. AmpC'ye Bağlı GSBL Negatifliğini veya GSBL'ye Bağlı AmpC Negatifliğini Ortadan Kaldırmak İçin Kullanılan Antibiyotik Diskleri

Sefotaksim	30 µg	(Bioanalize, Türkiye)
Sefotaksim/ Boronik asit	30 µg/ 400 µg	(Bioanalize, Türkiye)
Sefotaksim/ Klavulanik asit	30 µg/ 10 µg	(Bioanalize, Türkiye)
Sefotaksim/ Boronik asit/ Klavulanik asit	30 µg/ 400 µg/ 10 µg	(Bioanalize, Türkiye)

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Seda ÖZDİKMENLİ TEPELİ

Doğum Yeri: Gaziosmanpaşa /İstanbul

Doğum Tarihi: 10.08.1987

EĞİTİM DURUMU

Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi/ Mühendislik Fakültesi/ Gıda Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans Öğrenimi: Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi/ Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilimdalı

Bildiği Yabancı Diller: İngilizce

BİLİMSEL FAALİYETLERİ

a) Yayınlar -SCI -Diğer

Özdikmenli, Seda; ZORBA, N.Nükhet, 2016Evaluation of usage of essential oils instead of spices in meat ball formulation for controlling *Salmonella* spp., , Food Science and Technology International. 22(2), 93-101

Yalman,M., Özdikmenli, S., Zorba, Nükhet. 2016. Türkiye’de Geleneksel Yöntemlerle Üretilen Peynirlerin Küf Florası. Turkish Journal of Agriculture- Food Science And Technology, 4(11).

Özdikmenli Tepeli, S., Zorba, N. N. 2015. Közlenmiş Kırmızı Biber (Kapyra) Konservesi Üretiminde Gıda Güvenliği, Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi. 12(1)

Özdikmenli, S., Zorba, N.N. 2014. Uçucu Yağların *Staphylococcus aureus* Üzerine Etkisi., 2014, Turkish Journal of Agriculture- Food Science And Technology. 2(5).

b) Bildiriler -Uluslararası -Ulusal

1. Gıda Üretim Sürecinde Antibiyotik Dirençli Mikroorganizmaların Varlığı: Klasik Peynir Üretiminde Gsbl Üreten *E.coli* Varlığının Araştırılması. 12. Antimikrobik Kemoterapi Günleri. 01-03. Nisan 2016.
2. The Food Safety of Traditional Pickled Red Beetroot- Identification of Critical Control Points, 3.International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 2015.
3. The antimicrobial effect of essential oils and their combinations with other treatments on *Staphylococcus aureus* in foods, IJFST 50th Celebration Conference, 2015.
4. The Role of farmer Hygiene Training for Sustainable Safety of dairy Industry: A Case Study from Çanakkale Region, Turkey, Regional Workshop on Sustainable Management of Food Security, TÜBA, İstanbul, 2015.
5. Gıdalarda Antibiyotik Dirençli Bakteriler, 5. Gıda Güvenliği Kongresi, 2015.
6. Gıdaların Probiyotik Maya Florası, 2. Ulusal Mikoloji Günleri, 2015.
7. The Importance of Water Quality for Irrigation, 2. International Conference on sustainable Agriculture and Environment, 2015.
8. Chickpea tarhana: Descriptive Sensory Analysis, 3.International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 2015.
9. Milky Göce Production: Nutritional Value, 3.International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 2015.
10. Çanakkale'de Üretilen Bazı Geleneksel Ürünlerdeki Küflerin Tanımlanması, 1. Ulusal Mikoloji Günleri, 2014.
11. Gıdalarda Yaygın Olarak Bulunan Küfler ve Mikotoksinleri, 1. Ulusal Mikoloji Günleri, 2014.
12. Türkiye'de Geleneksel Yöntemler ile üretilen Küflü Peynirlerin Küf Florası, 1.Ulusal Mikoloji Günleri, 2014.
13. The Antimicrobial Effect of *Origanum Onites* and *Ocimum Basilicum* Essential Oils Against *Staphylococcus aureus* in Minced Meat, 59th International Congress of Meat Science and Technology, 2013.
14. Tradational Capia Pepper Paste, The 2nd International Symposium on Traditional Foods from Adriatic to Caucasus, 2013.

15. Traditional Homemade of Capia Pepper Paste Some Physical, Chemical and Microbiological Properties (TFP_1784). , The 2nd International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus" , 2013.
16. Traditional Red Roasted Pepper (TFP_1780), The 2nd International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus" , 2013.
17. Critic Control Point of Traditional Red Roasted Pepper Canned (TFP_1781) , The 2nd International Symposium on "Traditional Foods from Adriatic to Caucasus", 2013.
18. The Antimicrobial Effect of Origanum onites and Ocimum basilicum Essential Oils Against Salmonella Serovar Typhimurium in Minced Beef Meat, 23. International ICFMH Symposium, FoodMicro, 2012.
19. Taze Sebze ve Meyvelerin Mikrobiyal Yükünü Azaltma Yöntemleri ve Bazı Uygulamaların Etkinliklerinin Karşılaştırılması., 6. Gıda Mühendisliği Kongresi, 2009.

c) Katıldığı Projeler

PROJE ADI	TARİH	GÖREV
Subklinik Mastitis Etmenlerinin Araştırılması ve Süt Kalite Parametrelerine Etkisinin Belirlenmesi (ÇOMÜ- BAP)	26.11.2015- 26.11.2016	Araştırmacı /Uzman
Tarımsal Sulamada Kullanılan Yenice ve Davutköy Göletlerinin (Yenice, Çanakkale) Fiziko kimyasal Özelliklerinin ve Mikrobiyolojik Kalitesinin Araştırılması (ÇOMÜ – BAP)	12.02.2015- 12.02.2017	Araştırmacı /Uzman
Kırsal Kesimdeki Süt Üreticilerinin Bilinçlendirilmesi ve Kalite kontrol Merkezinin Geliştirilmesi (KB- GMKA)	19.03.2012- 19.09.2012	Yürütücü Yardımcısı

Baharat Uçucu Yağlarının Köftelik
Kıymalardaki *Salmonella* spp. ve
Staphylococcus aureus Patojenleri
Üzerine inhibitör Etkisi (ÇOMÜ-
BAP)

29.04.2009- 25.07.2011

Araştırmacı /Uzman

İŞ DENEYİMİ

Çalıştığı Kurumlar	Görev	Yıl
Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi Yenice Meslek Yüksekokulu	Gıda İşleme Bölümü Öğretim Görevlisi	Aralık 2011- Devam Ediyor
Royal Foods. A.Ş	Kalite Güvence Sorumlusu	Eylül 2009- Mart 2011

İLETİŞİM

E-posta Adresi : sdikmenli@hotmail.com; sedaozdikmenli@comu.edu.tr