



T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY İLİNDE TÜKETİME SUNULAN SÜRKLERDE GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) SENTEZLEYEN *ESCHERICHIA*
COLI PREVALANSININ BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Müge HORUZ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY
OCAK-2016



T.C.

MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY İLİNDE TÜKETİME SUNULAN SÜRKLERDE GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) SENTEZLEYEN *ESCHERICHIA*
COLI PREVALANSININ BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER
KARAKTERİZASYONU

Müge HORUZ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATAY

OCAK-2016

T.C.
MUSTAFA KEMAL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HATAY İLİNDE TÜKETİME SUNULAN SÜRKLERDE GENİŞLEMİŞ
SPEKTRUMLU BETA-LAKTAMAZ (GSBL) SENTEZLEYEN
ESCHERICHIA COLI PREVALANSININ BELİRLENMESİ VE
MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

MÜGE HORUZ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

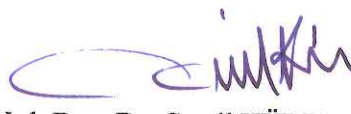
Prof. Dr. Yahya Kemal AVŞAR danışmanlığında hazırlanan bu tez 27/01/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Yahya Kemal AVŞAR
Başkan


Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ
Üye


Prof. Dr. Zehra GÜLER
Üye


Yrd.Doç.Dr. Sevdâ PEHLİVANLAR ÖNEN
Üye


Yrd. Doç. Dr. Cemil KÜREKÇİ
Üye

Kod No:892


Prof. Dr. Okan ŞENER
Enstitü Müdürü

Bu çalışma MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonunca desteklenmiştir.

Proje No:14024

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelgelerin, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

27.01.2016

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını ve tez üzerinde Yükseköğretim Kurulu tarafından hiçbir değişiklik yapılamayacağı için tezin bilgisayar ekranında görüntülendiğinde asıl nüsha ile aynı olması sorumluluğunun tarafıma ait olduğunu beyan ederim.



Müge HORUZ

ÖZET

HATAY İLİNDE TÜKETİME SUNULAN SÜRKLERDE GENİŞLEMİŞ SPEKTRUMLU BETA- LAKTAMAZ (GSBL) SENTEZLEYEN *ESCHERICHIA COLI* PREVALANSININ BELİRLENMESİ VE MOLEKÜLER KARAKTERİZASYONU

Genişlemiş spektrumlu Beta-laktamaz (GSBL) sentezleyen *Escherichia coli*'lerin neden olduğu infeksiyonların toplumda görülme sıklığı giderek artmaktadır. Bu infeksiyonlara neden olan GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarının çoğul antibiyotik direncine sahip olmaları tedavilerin yetersiz kalmasına ve hatta ölümlere neden olmaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, hayvansal kaynaklı gıdaların GSBL sentezleyen *E. coli* suşları için bir rezervuar olabileceği vurgulanmıştır. Bu nedenle, bu çalışma GSBL sentezleyen *E. coli*'nin bölgemizde sıkça tüketilen Sürk'lerdeki prevalansını ve moleküler karakterizasyonunu belirlemek amacıyla yapılmıştır. Bu çalışmada, altı aylık süre içerisinde Hatay merkez ve ilçelerinden satışı sunulan toplam 87 adet Sürk örneği (29 küflü ve 58 taze) toplanmıştır. İncelenen Sürk örneklerinin 12'sinde (%13,8) sefotaksim dirençli *E. coli* izole edilmiş ve bunların hepsi fenotipik olarak GSBL pozitif oldukları doğrulanmıştır. Elde edilen izolatların hiçbirisi imipenem, sefoksitin ve siprofloksasin antibiyotiklerine direnç göstermezken, diğer antibiyotiklere direnç oranı; tetrasiklin %41,7, trimethoprim-sulfamethoxazole %25, doksisisilin %25, kloramfenikol %25, nalidiksik asit %8,3 ve gentamisin %8,3 bulunmuştur. Yapılan polimeraz zincir reaksiyonu ve sekanslama çalışmalarında, 11 adet izolatda *bla*_{CTX-M-15} geni varlığı tespit edilmiş olup bu izolatların dört tanesinde *bla*_{TEM-1} geni varlığı bulunmuştur. PFGE sonuçlarına göre elde edilen 12 GSBL sentezleyen *E. coli* izolatının 8 farklı cluster altında toplandığı bulunmuştur. Sonuç olarak, incelenen Sürk örneklerinde GSBL üreten *E. coli* pozitiflik oranının yüksek olduğu ve halk sağlığı açısından çok önemli GSBL enzimine (CTX-M-15) sahip oldukları bulunmuştur. Bu durum, son yıllarda coğrafî işaret almak için önemi giderek artan Sürk'ün uygun olmayan koşullarda üretildiğini ortaya koymaktadır. Halk sağlığı riskini en aza indirmek için, Sürk üretiminin standardize edilmesi ve hijyen koşullarının artırılması gerekmektedir.

2016, 40 sayfa

Anahtar Kelimeler: GSBL sentezleyen *E. coli*, Sürk, Antibiyotik direnci, Peynir

ABSTRACT

DETERMINATION OF PREVELANCE OF EXTENDED SPECTURUM BETA-LACTAMASE PRODUCING *ESCHERICHIA COLI* IN SÜRK CHEESES CONSUMED IN HATAY PROVINCE and ITS ANTIBIOTIC RESISTANCE AND MOLECULAR CHARACTERIZATION

There has been a notable increase in infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* among people. There are limited options in the treatment of infections caused by ESBL producing *E. coli* because of multiple drug resistance which might even lead to death in some cases. Previous studies showed that foods of animal origins might be reservoir for ESBL producing *E. coli* strains. This study, therefore, was aimed to investigate the prevalence and molecular characterization of ESBL producing *E. coli* isolated from Sürk cheeses which is a very popular traditional dairy product. A total of 87 Sürk samples (29 samples of moldy and 58 samples of fresh) were collected from local supermarkets and street vendors during six months periods. A total of 12 (13.5%) cefotaxime resistant *E. coli* were isolated from all samples and all these isolates were found to be ESBL positive by phenotypic confirmation test. While there was no isolates resistant to imipenem, ceftazidime and ciprofloxacin, 41.7% of strains were resistant to tetracycline, %25 to doxycilin, %25 to trimethoprim-sulfamethoxazole, %25 to chloramphenicol, %8,3 to nalidixic acid and %8,3 to gentamycin. The results of polymerase chain reaction and sequencing revealed that 11 isolates harbored *bla*_{CTX-M-15} gene and the *bla*_{TEM-1} gene were also found in four isolates. According to the PFGE results, eight distinct clones were identified among the 12 isolates. In conclusion, the presence of ESBL producing *E. coli* with CTX-M-15 enzyme which particularly important for public health was found to be widespread in Sürk samples. The results of this study also implied the poor hygiene practices during the production of Sürk which recently gained great popularity due to its geographical indications. Implementation and maintenance of high hygiene standards have to be applied during Sürk manufacturing in order to minimize the public health risks.

2016, 40 page

Key Words: ESBL-producing *E. coli*, Sürk, Antibiotic resistance, Cheese

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince akademik desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle beni yetiştiren, tezimin her aşamasında yanımda olan, ekibinde olmaktan onur duyduğum, ustam, tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Yahya Kemal AVŞAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez konumun belirlenmesinde, araştırmalarım ve analiz aşamalarımında desteğini esirgemeyen ikinci tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Cemil KÜREKÇİ'ye, laboratuvarının kapılarını açan ve deneylerime katkı sağlayan Sayın Prof. Dr. Özkan ASLANTAŞ'a, pulsed-field jel elektroforez analizlerini yapan Dr. Özlem ÜNALDI'ya, maddi destek veren MKÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonuna (Proje No:14024) teşekkürlerimi sunarım. Hayatım boyunca doğru olduğuna inandığım yolda ilerlemem gerektiğini öğreterek, maddi, manevi desteğini esirgemeyen annem Fatoş VURAL ve babam Hüseyin Rahmi HORUZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım. İkinci yüksek lisansımın keyfini çıkarmamı enerjisiyle destekleyen, hayatımı kolaylaştırırken gülümsemeyi hiç ihmal etmeyen, özgürlüğüm, hayat arkadaşım Aliş ARKADAŞ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	I
ABSTRACT	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
ÇİZELGELER DİZİNİ	VI
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VII
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
3. MATERYAL VE YÖNTEM	12
3.1. Materyal.....	12
3.2. Yöntem.....	12
3.2.1. <i>E. coli</i> İzolasyonu.....	12
3.2.2. <i>E. coli</i> Tanımlanması.....	14
3.2.3. <i>E. coli</i> Suşlarının Fenotipik GSBL Doğrulaması.....	14
3.2.4. GSBL Sentezleyen <i>E. coli</i> Suşlarının Filogenetik Gruplarının Belirlenmesi.....	15
3.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi.....	16
3.2.6. Beta-Laktamaz Genlerinin Belirlenmesi.....	16
3.2.7. Pulsed-field Jel Elektroforezi.....	17
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA	18
4.1. GSBL Sentezleyen <i>E. coli</i> İzolasyonu ve Tanımlanması.....	18
4.2. GSBL Sentezleyen <i>E. coli</i> Suşlarının Fenotipik Doğrulaması.....	18
4.3. GSBL Sentezleyen <i>E. coli</i> Suşlarının Filogenetik Gruplarının Belirlenmesi.....	21
4.4. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları.....	23
4.5. GSBL Tip ve Alt Tiplerinin Belirlenmesi.....	27
4.6. Pulsed-field Jel Elektroforezi	30
5. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	32
KAYNAKLAR	34
ÖZGEÇMİŞ	40

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1.	Yayladağ pazarından satın alınan Sürk peynir örneği (a); market ve pazarlardan toplanan Sürk peyniri numuneleri (b).....	12
Şekil 3.2.	İzolasyon için tamponlanmış peptonlu suyun içerisinde inkübasyona bırakılan Sürk peyniri örnekleri.....	13
Şekil 3.3.	Seftazidim ilaveli (a) ve seftazidim ilavesiz (b) TBX Agar üzerinde gelişen tipik yeşil koloniler.....	13
Şekil 3.4.	Antibiyotik duyarlılık testi.....	16
Şekil 4.1	<i>E. coli</i> spesifik 16S rRNA primerleri kullanılarak yapılan PZR bulguları.....	18
Şekil 4.2.	Çift disk sinerji metodu ile belirlenen GSBL pozitifliği.....	19
Şekil 4.3.	Disk kombinasyon metodu ile belirlenen GSBL pozitifliği.....	20
Şekil 4.4.	Multipleks PZR analizi jel görünümü.....	21
Şekil 4.5.	Antibiyotik duyarlılık test görüntüsü.....	23
Şekil 4.6.	GSBL sentezleyen <i>E.coli</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları.....	24
Şekil 4.7.	GSBL negatif <i>E.coli</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları.....	25
Şekil 4.8.	TEM geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	27
Şekil 4.9.	CTX-M geninin agaroz jel elektroforez görüntüsü.....	27
Şekil 4.10.	Pulsedfield jel elektroforez görünümü.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1	<i>E. coli</i> 16S rRNA gen primer sekansı.....	14
Çizelge 3.2	Filogenetik analizde kullanılan primerler ve sekansları.....	15
Çizelge 3.3.	GSBL tip ve alt tiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerler.....	17
Çizelge 4.1	Çift disk sinerji test sonuçları.....	19
Çizelge 4.2	Disk kombinasyon metodu sonuçları.....	21
Çizelge 4.3	PZR ile belirlenen filogenetik gruplar.....	22
Çizelge 4.4	GSBL sentezleyen <i>E.coli</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları.....	24
Çizelge 4.5	GSBL negatif <i>E.coli</i> izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları.....	26
Çizelge 4.6	GSBL izolatlarından belirlenen beta-laktamaz tip ve alt tipleri.....	28
Çizelge 4.7	GSBL sentezleyen <i>E. coli</i> suşlarının filogenetik gruplara göre dağılımı.....	28

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

SİMGELER

≥	:Büyük-eşit
°C	:Santigrat derece
µl	:Mikrolitre
mL	:Mililitre
UV	:Ultra viyole
pmol	:Pikomol
L	:Litre
mm	:Milimetre
dk	:Dakika

KISALTMALAR

PZR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
dNTP	: Deoksi-nükleotit trifosfat
DNA	: Deoksiribo nükleik asit
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
GSBL	: Genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz
MgCl ₂	: Magnezyum klorür
RNA	: Ribonükleik asit
CLSI	: Clinical Laboratory Standards Institute
PFGE	: Pulsed-field jel elektroforezi
IMP	: İmipenem
AMP	: Ampisilin
CN	: Gentamisin
AMC	: Amoksisilin/klavulanik asid
CAZ	: Seftazidim
TE	: Tetrasiklin
CTX	: Sefotaksim
NA	: Nalidiksik asit
ATM	: Aztreonam
FOX	: Sefoksitin
KF	: Sefalotin
DO	: Doksisilin
C	: Kloramfenikol
CIP	: Siprofloksasin
SXT	: Trimetoprim-sulfametoksazol
TBX Agar	: Tryptone Bile X-Glucuronic Agar
kob	: Koloni oluşturma birimi
bç	: Baz çifti

1.GİRİŞ

Sütün pıhtılaştırılmasıyla üretilen; protein, vitamin ve mineral açısından konsantre bir gıda ürünü olan peynir, kahvaltı kültürümüzün önemli bir parçasıdır. Ülkemizde 2013 yılında toplam üretim miktarı 600 bin tondur (TÜİK, 2013) ve 193 çeşit peynir üretimi gerçekleştirilmektedir (Anonim, 2013). Peynir yapımı sütün pastörizasyonu, sütün peynir mayası veya organik asitlerle pıhtılaştırılması, süzülmesi, şekillendirilmesi, tuzlama ve olgunlaştırılması gibi aşamaları içermektedir (Yetişmeyen, 1995). Bu aşamalarda en ufak bir değişiklik son ürünün kalitesini etkilediği gibi yöreye özgünlüğünü de ortaya çıkarmaktadır (Licitra, 2010). Ülkemizde yöresel koşullara, hayvan ırklarına, kuşaktan kuşağa aktarılan yapım tekniklerine bağlı olarak birçok geleneksel peynir çeşiti bulunmaktadır (Elmalı ve Uylaşer, 2012).

Türkiye’de peynirin sadece %4-5’lik kısmı modern fabrikalarda üretilirken, geriye kalan kısmı küçük işletmelerde veya evlerde hijyen kontrolü olmadan denetimsiz bir şekilde üretilmektedir (Elmalı ve Uylaşer, 2012; Tekinşen ve Elmalı, 2006). Son yıllarda coğrafi işaretler kavramıyla birlikte geleneksel gıdaların önemi artmakta (Doğan, 2015) aynı zamanda da çok eski bir geleneğe ve çeşitliliğe sahip olan yöresel peynir ürünlerinin endüstriye adaptasyonu için özel ilgi gösterilmektedir (Andiç ve ark., 2015). Geleneksel peynirler coğrafi konumuna ve üretici bireylere bağlı olarak genellikle hijyenik olmayan koşullarda üretilmektedir (Malcata, 1996; Keleş ve ark., 2004; Arslan ve Özdemir, 2008).

Süt ürünleri insan ve hayvan kaynaklı patojen bakteriler ile sütün sağımından itibaren depolanmasından, fabrikada işlenmesi ve sonrasında tüketiciye ulaştığı noktaya kadar kontamine olma riskine sahip ürünlerdir. Yöresel peynirlerin mikrobiyolojik kalitesi üzerine yapılan çalışmalarda, toplam mezofilik aerob bakteri, enterokok ve koliform grubu bakteri yükünün, incelenen peynirlerin çoğunda Türk Gıda Kodeksi’nde belirtilen standartlardan çok yüksek olduğunu ve halk sağlığı açısından sorun teşkil ettiği saptanmıştır (Gülmez ve Güven 2001; Kamber, 2005; Tekinşen ve Elmalı, 2006).

Enterobacteriaceae ailesine bağlı, spor oluşturmayan, çomak şekilli gram negatif bir mikroorganizma olan *Escherichia coli* hayvan ve insanların sindirim sisteminde bulunmaktadır ve gıdalardaki varlığı fekal bulaşmanın bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (Tortora ve ark., 2001). Çoğunlukla hijyen indikatörü olarak görülen bu

zararsız bakteriler bazı durumlarda kazandıkları genetik materyal sayesinde patojenik özellik kazanabilmektedir (Fairbrother ve Nadeau, 2006; Kaper ve ark., 2004).

İnsan ve hayvan patojenlerinin tedavisinde yaygın olarak antibiyotikler kullanılmaktadır. Alexander Fleming'in 1928 yılında ilk antibiyotik olan penisilini keşfetmesinden günümüze kadar birçok sentetik ve doğal antibiyotik geliştirilmiştir. Çeşitli hastalıklarda tedavi amaçlı kullanılan bu ilaçların farklı etki mekanizmaları bulunmaktadır. Beta-laktam antibiyotikleri, bakteri dış membranında yer alan penisilin bağlama proteinlerini hedef alarak, peptidoglikan sentezindeki son aşamayı durdurmaktadır. Böylece gelişen bakterinin hücre duvarı oluşumunu önleyerek etki etmektedirler (Livermore, 1995).

Antibiyotikler hastalıklar için tedavi edici olsa bile, gereğinden fazla ve yanlış kullanımı patojen bakterilerde antimikrobiyel direnç oluşumuna neden olmaktadır (Schwarz ve ark., 2001). Antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç birçok şekilde ortaya çıkmaktadır (McGowan ve Tenover, 1997). Bazı bakteriler doğal olarak bazı antibiyotiklere dirençli olabildiği gibi, bazen de mutasyon ya da antibiyotik baskısı ile de direnç özelliği kazanabilirler. Bunun yanında, direnç genleri bakteriler arasında sıklıkla plasmidler, transpozonlar ve integronlar gibi hareketli genetik materyallerin aracılığı ile de aktarılmaktadır (Droge ve ark., 1998).

E. coli gibi Enterobacteriaceae üyelerinde görülen en önemli antibiyotik direnç mekanizması beta-laktamaz enzimleri aracılığı ile ortaya çıkan dirençtir (Demirtürk ve Demirdal, 2004). Bu enzimler, beta-laktam halkasını parçalayarak beta-laktam antibiyotiklerin etkisini ortadan kaldırmaktadırlar (Dinç ve ark., 2012). Beta-laktamaz enzimlerini kodlayan genler kromozom veya plazmidler üzerinde bulunabilmektedirler (Roy ve ark., 1983). Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar sonucu enzimin etki mekanizması artmakta ve Genişlemiş Spektrumlu beta-laktamaz (GSBL)'lar ortaya çıkmaktadır (Dağlar ve Öngüt, 2012; Sirot, 1995).

Genel tanım itibari ile, GSBL'ler özellikle gram-negatif bakteriler tarafından sentezlenen penisilin, 1., 2. ve 3. nesil sefalosporinlere (sepamisin ve karbapenem hariç) ve monobaktamlara karşı bakteriyel dirence sebep olurken; beta-laktamaz inhibitörleri tarafından inhibe olan yaygın olarak TEM-türevleri, SHV-türevleri, CTX-M-türevleri ve OXA-türevleri şeklinde isimlendirilen bakteriyel enzim grubunun genel adıdır (Kliebe ve ark., 1985; Livermore, 2008). Dolayısı ile daha önceleri kolaylıkla tedavi edilebilen

E. coli kaynaklı infeksiyonların, GSBL sentezleme yeteneği kazanması ile tedavisinin güçleştiği belirtilmiştir (Naesens ve ark., 2010; Yumuk ve ark., 2008). Bu genler arasında, CTX-M genini içeren mikroorganizmaların tüm dünyada sadece klinik ortamlarda değil, toplumda ve hayvanlarda kolaylıkla yaygınlaştığı görülmektedir (Seiffert ve ark., 2013). Bu direnç genlerinin aktarılıyor olması, CTX-M içeren *E. coli* suşlarının hayvanlar ve gıdalar üzerinden yayılmasına neden olabileceğinden ve insan patojenlerinin bu genleri kolaylıkla kazanmasını sağlayacağından toplum sağlığı ile ilgili endişeleri artırmaktadır (Carattoli, 2008).

Günümüze kadar 150 CTX-M tipi, 216 TEM tipi (Jacoby ve Bush, 2014), 182 SHV tipi ve OXA tipi GSBL tespit edilmiş olup *E.coli* suşlarının %1-10'unda bulunduğu bildirilmektedir (Paterson ve Bonomo, 2005). Yapılan çalışmalar 30'dan fazla ülkede GSBL sentezleyen mikroorganizmaların dünya genelinde giderek yaygınlaştığını ortaya koymaktadır (Paterson ve Bonomo, 2005). Günümüzde, GSBL sentezleyen mikroorganizmaların çokluğu nedeniyle bir gruplandırma yoluna gidilmiş ve "Ambler", "Richmond & Skyes" ve "Bush-Jacoby-Medeiros" sınıflandırmaları geliştirilmiştir. Ambler gruplandırmasında beta-laktamazları aminoasit benzerliğine göre A, B, C ve D olmak üzere dört grup altında sınıflandırılır iken (Ambler ve ark., 1991), Richmond & Skyes gruplandırmasında substrat profili ve ilgili genin bulunduğu bölge esas alınmaktadır (Richmond ve Sykes, 1973). Ambler gruplandırılması A grubu enzimlerin ayırımında yetersiz kalırken, Richmond & Skyes gruplandırması TEM ve SHV tiplerinin artmasıyla bunların arasındaki ayırımıda yetersiz kaldığı için artık pek fazla kullanılmamaktadır (Richmond ve Sykes, 1973).Yakın zamanda enzimlerin biyokimyasal profilleri, moleküler yapıları ve ilgili genin nükleotid sekansları kullanılan Bush-Jacoby-Medeiro sınıflandırılması geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre GSBL'leri 2be (TEM- ve SHV- türevleri) ve 2d (OXA- türevleri) olmak üzere iki altgrup altında toplanmıştır (Bush ve Jacoby, 2010).

Halk sağlığı sorunlarına neden olmaları bakımından gıda kaynaklarının mikrobiyel ekolojilerini daha iyi anlayabilmek ve patojen mikroorganizmaların prevalansını belirlemek gıda mikrobiyolojisi açısından önem arz etmektedir. Nitekim, Çin'de yapılan taramalarda GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarının oranının 2003'de %5.7 iken 2012'de %35.3'e yükseldiği belirlenmiştir (Rao ve ark., 2014). Bu sonuçlar piyasada satışa sunulan gıdalarda antimikrobiyel direnç yaygınlığının izlenmesinin

önemini göstermektedir. Dolayısı ile çiftlik hayvanları ve hayvansal gıda kaynaklı kommensal ve zoonoz bakterilerin antibiyotik duyarlılıklarının sürekli olarak gözleendiği ulusal programlar Avrupa ülkelerinde giderek yaygınlaşmaktadır (Harada ve Asai, 2010). Türkiye’de bu konuda ulusal bir gözlemlene programı olmamasına paralel olarak hayvansal kökenli *E. coli* izolatlarında GSBL üretimi ile ilgili yapılan çalışmalar sınırlı sayıda olmakla beraber, yapılan çalışmaların hepsi izole edilen bakterilerin GSBL olup olmadığını fenotipik olarak belirlenmesi üzerinedir (Arslan ve Özdemir, 2008; Gündoğdu ve Avcı, 2013).

Hatay ilinde yaygın olarak tüketilen geleneksel bir peynir çeşiti olması bakımından, Sürk peynirinin halk sağlığı açısından mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesini gerektirmektedir. Bu peynirin evlerde ve küçük işletmelerde kontrolsüz üretimiyle birlikte değişik baharatlar kullanılarak ve el ile yoğrularak yapılma tekniği kontaminasyon riskini arttırmaktadır (Çelikel ve ark., 2015). Yapılan literatür taramalarında Sürk peynirinin mikrobiyolojik kalitesiyle ilgili sınırlı sayıda çalışma bulunması (Keleş ve ark., 2004; Masatcioğlu ve Avsar, 2005; Aygün ve ark., 2007; Çelikyurt ve ark., 2008), GSBL sentezleyen *E. coli* varlığı ve genotipleme çalışmalarının olmayışı ise konunun önemini ortaya koymaktadır.

Bu çalışmanın amacı Hatay ilinde üretilen ve yörede sıklıkla tüketilen geleneksel Sürk peynirinde GSBL sentezleyen *E. coli* kontaminasyonunu belirlemek ve GSBL tiplerinin moleküler yöntemler ile tespitini yapmaktır. Bu çalışmada ortaya çıkan sonuçların yöredeki uygunsuz üretim koşullarının iyileştirilmesine, düzenleme ve denetleme gerektirdiğine dair somut veri olacağı düşünülmektedir. Böylece, Sürk peynirinin coğrafi işaretler kapsamında yöreye tescillenmesi, iç ve dış pazara tanıtılarak satışının yapılması, yöreye ekonomik katkı sağlaması yönünde en önemli konu olan gıda güvenliği konusunda yapılacak çalışmalara katkı sağlayacaktır.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Hatay'da piyasaya sunulan 50 adet Sürk örneğinin mikrobiyolojik ve kimyasal özelliklerini incelemişler, numunelerin ortalama toplam mezofilik aerobik mikroorganizma, maya ve küf, *Lactobacillus* spp. ve *Staphylococcus* spp. sayıları sırasıyla 1.58×10^7 , 8.17×10^5 , 8.31×10^6 ve 5.80×10^3 kob/g olarak bulmuşlardır (Keleş ve ark., 2004). Araştırmacılar, buldukları değerler sonucunda Sürk örneklerinin mikrobiyolojik kalitesinin yetersiz olduğunu bildirmişlerdir.

Sürk peynirlerinde kullanılan çeşni maddelerinin, depolama koşulları ve depolama süresince *Staphylococcus aureus*'un canlılığı üzerine etkisinin araştırıldığı diğer bir çalışmada *S. aureus*'un canlılığı üzerinde çeşni maddelerinin bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir. Ancak depolama koşulları ve süresinin *S. aureus*'un canlılığında azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir (Masatcıoğlu ve Avşar, 2005).

Aygün ve ark. (2007) Hatay ilinde satışa sunulan 450 küflü Sürk peyniri örneğinin %8.44'ünde *Tyrophagus putrescentiae* (Schrank) akarı tespit etmişlerdir. Araştırmacılar depolama ve satış alanlarından bulaştığı düşünülen akarların kontrolü için, bu yerlerde etkili bir temizliğin ve doğru çevre şartlarının oluşturulması gerektiği belirtmişlerdir.

Çelikyurt ve ark. (2008) 15 farklı kaynaktan seçtikleri Sürk örneklerinde PZR ile 23 izolatı *Pediococcus acidilactici*, 5 izolatı *Enterococcus durans*, bir izolatı *Enterococcus faecium*, 7 izolatı *Lactobacillus brevis*, 10 izolatı ise *Lactobacillus paracasei* olarak tanımlamışlardır. Yaptıkları çalışmada Sürk'ten izole edilen ve tanımlanan laktik asit bakterilerinin (LAB) çok az bir kısmının, ısıl işlem görmesi sebebiyle çökelek ya da ayrandan geçtiğini düşünmüşlerdir. İzole edilen LAB'lerinin büyük çoğunluğunun Sürk'ün hazırlanışı sırasında ilave edilen baharatlar ile işlenmesi ve olgunlaştırılması sırasında meydana gelen bulaşmalardan kaynaklandığını da ileri sürmüşlerdir.

Bolu ilinde toplanan ev yapımı beyaz peynirlerden izole edilen 223 *E. coli* suşunun %48'inin fenotipik olarak GSBL pozitif olduğunu saptamışlardır (Arslan ve Özdemir, 2008). Bütün suşların disk difüzyon test sonuçlarına göre imipenem ve sefepime duyarlı olduğunu tespit etmişlerdir. *E. coli* suşlarının seftazidim, seftriakson, sefotaksim ve aztreonam antibiyotiklerine duyarlılıklarını sırasıyla %93.7, %96.4, %81.2, %90.6 olarak bildirmişlerdir. Ampisilin ve sefuroksime karşı ise sırasıyla %68.6

ve %69.1 oranında dirençli bulmuşlardır. GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarının antibiyotik dirençlerinin düşük seviyede olduğu tespit edilse bile gıda kaynaklı bakteri antibiyotik direnç oranının yayılışını izlenmesi gerektiğini öngörmüşler fakat GSBL tiplendirmesi yapmamışlardır.

Altı farklı Portekiz peynirinden izole edilen 172 bakterinin beta-laktam dirençleri araştırılmış ve ampisilin direncin 4.7×10^2 ile 1.5×10^7 kob/g arasında değişim gösterdiği, rastgele seçilen beta-laktamaz dirençli 172 bakterinin %31'inde ise çoklu ilaç direncine sahip olduğu saptanmıştır (Amador ve ark., 2009). Ayrıca çalışmada, izolatların %80.9'unda *bla_{tem}* geninin varlığı tespit edilmiştir. Isıl işlem uygulanmayan süt ve iyi hijyen uygulamaları yapılmadan üretilen peynirlerin beta-laktam dirençli bakterilerin tüketiciye gastrointestinal yolla aktarımın bir araç olduğunu bildirilmiştir.

Sakarya ilinde, 4 farklı mevsimde, iki fabrikada, Kaşar peyniri işleme ortamında toplanmış 264 örneğin %2.7'sinde *E.coli* ve *Listeria* spp. izole edilmiştir (Çağrı-Mehmetoğlu ve ark., 2011). Çiğ süt örneklerinin %50'sinin *Listeria* spp. içerdiğini ve işleme kanallarında bulunduğunu, *E. coli* suşlarının ise işçi kaynaklı olduğunu eldiven ve işçilerin ellerinden izolasyonunun yapıldığı, sadece 1 çiğ süt örneğinde *E. coli* bulunduğunu bildirilmiştir. Araştırmacılar, her iki patojenin görülme sıklığının yaz aylarında diğer aylardan daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir.

Rio De Janeiro'da ticarileşmiş geleneksel peynir olan Minas peynirlerinde izole edilen enteropatojenik *E. coli* suşlarının %40'ının ampisiline dirençli ve ampisilin-sulbaktama ise orta düzeyde dirençli olduğunu tespit etmişlerdir (Dias ve ark., 2012). Minas peynirinin küçük ticarethanelerde kontrolsüz yapılmasının potansiyel sağlık riski oluşturduğu, bu ürünü sık sık düzenli tüketen insanların hastalandığını bildirmişlerdir.

Balıkesir'de farklı marketlerden toplanan Mihalic peynirlerinin %5'inde (n=100) ve hoşmerim tatlılarının %3'ünde (n=100) *Listeria* spp. tespit edilmiş ve *Salmonella* spp. bulunamamıştır (Çokal ve ark., 2012). Peynir örneklerinde *E.coli* oranı %43 (ortalama $1.23 \log$ kob/g) iken hoşmerim tatlısında *E. coli* tespit edilememiştir. Geleneksel gıda olan bu ürünlerden izole edilen patojenlerin halk sağlığı için ciddi risk oluşturduğu bildirilmiştir. Araştırmacılar, üretim, depolama ve satış sürecinde kötü hijyen koşullarının iyileştirilmesini, HACCP uygulamalarıyla imalat ve işleme sonrası çapraz kontaminasyon faktörlerinin kontrol altına alınması gerekliliğini bildirmişlerdir.

Aly ve ark. (2012), Kahire’de sağlık kliniklerinde ve gıda örneklerinde 147 *E. coli* suşu belirlemişlerdir. Araştırma sonucu *E. coli* varlığının gıda örneklerinde daha yüksek oranda bulunduğu, test edilen *E. coli* suşlarından %90’nın test edilen 26 antibiyotikten en az birisine duyarlı olduğu ve beta-laktam antibiyotiklere en yüksek dirence sahip olduğunu ortaya koymuştur. Ancak antibiyotik direncinin beta-laktam kombinasyonları ve sefalosporin kullanıldığında önemli oranda düştüğü belirlenmiştir. İzolatlardaki en yüksek duyarlılık imepenem ve polimiksin-B’ye bulunmuştur. Tetrasiklinlere, makrolidlere ve sülfonamid/trimetoprimlere direnç %30-37 oranında bulunmuştur. Kinolonlara ve aminoglyozitlere direnç düzeyi sırasıyla %19 ve %10 oranında saptanmıştır. İzole edilen 52 suş (%37), farklı etki mekanizmaları olan 3 veya daha fazla antibiyotik sınıfına karşı çoklu direnç göstermiştir. Çoklu direnç gösteren *E. coli* izolatları gıda örneklerinde daha fazla bulunmuştur.

Şihca ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada piyasadaki farklı kaynaklardan elde edilen 11 farklı Sürk örneğinden laktik asit bakterileri izole etmiş ve bu bakterilerin tür tayinini moleküler yöntemlerle gerçekleştirmişlerdir. Ayrıca hazırlanan Sürk peynirinin mikrobiyolojik, fiziksel ve kimyasal özelliklerini de incelemişlerdir. Çalışma sonucunda Sürk örneklerinden 86 adet bakteri izole edilmiş, yapılan morfolojik, biyokimyasal ve fizyolojik testler sonucunda 16’sının *Streptococcus* cinsine ait olduğu, moleküler tanımlama (PZR) sonucunda ise 10 izolatin *Salmonella thermophilus* olduğu tespit edilmiştir. İzolatların *E. coli*’nin gelişmesini en fazla engellediği görülmüştür (40 mm inhibisyon zonu). Ayrıca *Bacillus subtilis*, *Streptococcus epidermidis* ve *Salmonella typhimurium*’un gelişmesini de farklı oranlarda inhibe ettiği tespit edilmiştir.

Queensland’da (Avustralya), arıtılmamış hastane atık sularından ve 2 kanalizasyon suyu arıtma tesisinden izole edilen 252 GSBL sentezleyen *E. coli* izolatının %87’si hastane atık sularından, %35 izolat ise bütün örneklerden belirlenmiştir (Gündoğdu ve ark., 2013). Hastane atık sularından elde edilen izolatların %73’ü SHV tip GSBL içerirken, kanalizasyon atık suyu arıtma tesislerinden elde edilen izolatlar ise CTX-M tip GSBL içerdiği rapor edilmiştir. Sonuçlar belli tip GSBL sentezleyen *E. coli*’lerin hastane atık sularında baskın halde bulunduğunu ve içerdikleri beta-laktamaz genlerinin kanalizasyon atık sularında elde edilenlerden farklı olduğunu göstermektedir.

Clermont ve ark. (2013) tarafından *E. coli*'nin filogenetik sınıflandırılması ile ilgili olarak yeni bir PZR tabanlı yeni bir geliştirilmiştir. Böylece daha önce 4 filo-grup sınıf (A, B1, B2 veya D) olarak belirlenen filogrup sayısı, yeni bulguların ışığı altında 8 grup olarak revize edilmiştir. Belirlenen 8 grubun 7'si (A, B1, B2, C, D, E, F) *E. coli Sensu stricto* olarak belirlenir iken, 8. grup *Escherichia cryptic* clade I olarak belirlenmiştir. Test edilen *E. coli* izolatlarının %95'inin bu yöntem ile filo-grupları doğru olarak sınıflandırılabilmiştir. Bu yöntem kullanılarak insan dışkısından yapılan tarama çalışmaları sonucunda, izolatların %13'ünün yeni belirlenen C, E, F ve clade I grubuna ait olduğu saptanmıştır.

Danimarka'daki 21 tavuk çiftliğinde yapılan bir çalışmada, elde edilen *E. coli* izolatlarının sırasıyla %19.1, % 5.9, %52.9 ve %22.1 oranlarında A, B1, B2 ve D filogenetik grubuna ait olduğu belirlenmiştir (Pires-dos-Santos ve ark., 2013).

Portekiz'de farklı mezbahanelerde kesilen sığır ve koyunlar üzerinde GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarında beta-laktamaz tiplerinin belirlenmesi ile ilgili yapılan bir çalışmada, (Ramos ve ark., 2013), 127 fekal örneğin %7'sinde CTX-M tipi GSBL bulduklarını rapor etmişlerdir. Araştırmacılar bu izolatlarda, sırasıyla CTX-M-32 (n=4), TEM-1+CTX-M-1 (n=3) ve CTX-M-1 (n=2) genlerini belirlemişlerdir. CTX-M içeren bütün izolatlarda çoklu direnç fenotipine sahip olduğu bulunmuştur.

Gündoğan ve Avcı (2013) tavuk, kıyım, süt ve beyaz peynirlerde GSBL sentezleyen *E. coli* ve *Klebsiella pneumoniae* varlığı üzerine yaptıkları çalışmada, süt örneklerinin ve beyaz peynir örneklerinin %15.5'i ve %24.4'ünün GSBL sentezleyen *E. coli* ile kontamine olduğunu rapor etmişlerdir. Fakat gıda örneklerinden bulunan GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarında GSBL türünün belirlenmesine yönelik moleküler çalışmalar yapmamışlardır.

Fransa'da klinik mastitise neden olan 1427 *E. coli* ve *K. pneumoniae* izolatının 6'sının (%0.4) GSBL geni taşıdığını belirlenmiştir (Dahmen ve ark., 2013). Her ne kadar GSBL sentezleyen izolatların oranı oldukça düşük ise de, masititise neden olan izolatlar arasında GSBL genleri arasındaki moleküler çeşitliliğin düşük olmasının ilgi çekici olduğu ve hayvanlardaki GSBL epidemiyolojisi açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu sonucuna varmışlardır.

Diyarbakır'da çeşitli marketlerden toplanan 100 adet taze inek peynirinin tamamında *E. coli*, 8 tanesinde *E.coli* 0157:H7 ve 12 tanesinde ise *Aeromonas*

hydrophila varlığı bildirilmiştir (Erkan ve ark., 2014). Araştırmacılar, izolatlardaki gram negatif bakteri varlığının yüksek seviyede olduğunu, üretimdeki kötü hijyen koşullarının peynir kalitesini ve raf ömrünü olumsuz etkilediğini, tespit edilen mikroorganizmaların ve bulunma düzeylerinin halk sağlığı için risk olduğunu bildirmişlerdir.

Khoshbakht ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada Güney İran'da süt ve peynirlerden izole edilen 150 *E. coli* suşunda GSBL varlığını araştırmışlar ve moleküler karakterizasyonunu yapmışlardır. Çift disk sinerji metodu kullanarak GSBL üretimini ve PZR yöntemiyle 4 GSBL geninin (PER, VEB, TEM ve CTX-M) varlığını tespit etmişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre 150 *E. coli* izolatının %38'inin GSBL ürettiğini, bu izolatların %80.7'sinde CTX-M geni varlığını, imipenem ve sefoksitine yüksek duyarlılık gösterdiğini bildirmişlerdir. Günlük süt ve süt ürünlerinde GSBL sentezleyen *E. coli* yaygınlığı olduğunu ve bu ürünlerden insanlara GSBL sentezleyen bakterilerin transferinin mümkün olduğunu rapor etmişlerdir.

Slovenya'da satışa sunulan çiğ et, balık, salata, fırıncılık ürünleri gibi farklı gıda ürününde elde edilen 84 *E. coli* izolatının Clermont ve ark. (2000) yöntemine göre 42'sinin (%50) filogenetik grubunun A ve 30'unun (%35.7) ise B1 grubuna, 10'nun (%11.9) D grubuna ve 2'sinin (%2.4) ise B2 ait olduğu saptanmıştır (Trkov ve ark., 2014). Araştırmacılar, gıda maddelerinin büyük bir çoğunluğunun bağırsak kökenli daha az oranda ise bağırsak dışı patojenik *E. coli* ile bulaşık olduğunu bildirmişlerdir.

Guillen ve ark. (2014) Merida'da (Venezuela) satışa sunulan çeşitli ev yapımı süt ürünlerinde izole edilen 45 *E. coli* suşundan 33'ünün (%73.3) test edilen bütün antibiyotiklere duyarlı iken 11'nin (%24.4) ampisilin direnci gösterdiğini tespit etmişlerdir. İzolatların filogenetik gruplandırmasında %82.2'sinin A, %8.9'unun B1 ve D grubuna ait olduğunu saptamışlardır. B2 grubuna ait bir izolat bulunmadığı gibi, izolatların heterojeni bir populasyon yapısında olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar, *E. coli* izolatlarının moleküler karakterizasyonunun, izolatların genetik olarak bağlantılı olmadığını ve çoğunlukla düşük patojenite gösteren komensal suşlardan oluştuğunu göstermişlerdir. Süt ürünlerindeki *E. coli* suşlarının varlığının fekal kontaminasyonun göstergesi olduğunu, bu durumun ise diğer enterik patojen varlığını da gösterebileceğini bildirmişlerdir.

Çin’de 2003 ve 2012 yıllarında gıda amaçlı yetiştirilen hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda CTX-M geni içeren *E. coli* varlığının on yıl içinde %5.7’den %35.3’e yükseldiği belirlenmiştir (Rao ve ark., 2014). Çalışmada 18 farklı CTX-M geni belirlendiği gibi araştırmacılar bunlar arasında yüksek hidrolize aktivitesine sahip CTX-M-55 genin giderek artan bir şekilde belirlemiş olmasının Çin’de acil bir kontrol stratejisinin uygulamaya konması gerektiğini bildirmişlerdir.

Avusturya, Almanya ve Slovenya havaalanlarında kaçak olarak geçirilen hayvansal kaynaklı gıdalarda belirlenen 113 konakçı *E. coli* izolatından 14’ünün çoklu antibiyotik direnci gösterdiği bildirilmiştir (Nagy ve ark., 2015). Bu izolatlarda 6-11 arası antibiyotik direnç geni varlığı gösterilir iken, 14 izolatın 2’si CTX-M içeren tip GSBL olarak saptanmıştır.

Slovenya’da taze Bryndza peynirlerinde izole edilen 45 *E. coli* suşundan 19’unun GSBL tip olduğu belirlenmiştir (Vrabec ve ark., 2015). Çalışmada belirlenen enterekokların (n=74) tetrasikline olan direncin yüksek olmasına karşın (%29.97), vankomisine karşı duyarlı oldukları gösterilmiştir.

Pehlivanlar Önen ve ark. (2015), Türkiye’de satışa sunulan dondurulmuş veya buzdolabı koşullarında satışa sunulan tavuk (n=100) ve sığır (n=100) etlerinde, genişlemiş spektrum beta-laktamaz ve plasmid ile taşınan AmpC ve beta-laktamaz sentezleyen *E. coli* prevelansını belirledikleri çalışmada, tavuk etlerinde 81 sığır etlerinde 7 olmak üzere toplam 88 beta-laktamaz sentezleyen *E. coli* saptamışlardır. PZR analizi sonucunda, 88 izolatın 84’ünün *bla*_{CTX-M-1} (n=39), *bla*_{CTX-M-3} (n=5), *bla*_{CTX-M-15} (n=4), *bla*_{TEM-1b} (n=2), *bla*_{SVH-12} (n=1), *bla*_{CTX-M-1/bla}_{TEM-1b} (n=10), *bla*_{CTX-M-1/bla}_{TEM-1b/bla}_{SHV-5} (n=1), *bla*_{CTX-M-1/ bla}_{CYM-2} (n=6), *bla*_{CTX-M-15/bla}_{SHV-12} (n=1), *bla*_{CTX-M-15/bla}_{TEM-1b} (n=1), *bla*_{TEM-1b/bla}_{SHV-12} (n=1) ve *bla*_{CYM-2} (n=12) genleri içerdiği tespit edilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi sonuçlarına göre, tavuk ve sığır etinden elde edilen izolatların sırasıyla, %75.6 ve %85.7 oranında sefuroksim, %89 ve %85.7 oranında nalidiksik asite, %91.4 ve %100 oranında tetrasiklin, %40.2 ve %100 oranında streptomisin ve %36.6 ve %85.7 oranında Trimetoprim-sulfametoksazol direnç gösterdiği saptanmıştır. Diğer yandan, bütün izolatların amikasin, imipenem ve sefepime duyarlı olduğu bulunmuştur. Ampisilin ve sefotaksim olan direnç önemli oranda *bla*_{CYM-2} geni ile ilişkili bulunur iken sefuroksim ve streptomisin olan direnç CTX-M tip GSBL ile ilişkili bulunmuştur (p<0.05). Elde edilen sonuçlar, Türkiye’de

satışa sunulan çiğ tavuk etlerinin yüksek oranda GSBL sentezleyen *E. coli* ile bulaşık olduğu ve insan sağlığını tehdit ettiği saptanmıştır.



3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Bu çalışmada Hatay ilinde pazar ve marketlerde satışa sunulan yöresel Sürk peyniri araştırma materyali olarak kullanılmıştır. Reyhanlı, Kırıkhan, Yayladağ, İskenderun, Samandağ, Harbiye ve Antakya merkez olmak üzere 29 tanesi küflü ve 58 tanesi taze, toplamda 87 adet Sürk örneği toplanmıştır (Şekil 3.1). Sürk peyniri numunelerinin her biri orjinal ambalajında soğuk zincir altında laboratuvara getirilmiştir.



Şekil 3.1. Yayladağ pazarından satın alınan Sürk peynir örneği (a); market ve pazarlardan toplanan Sürk peyniri numuneleri (b)

3.2. Yöntem

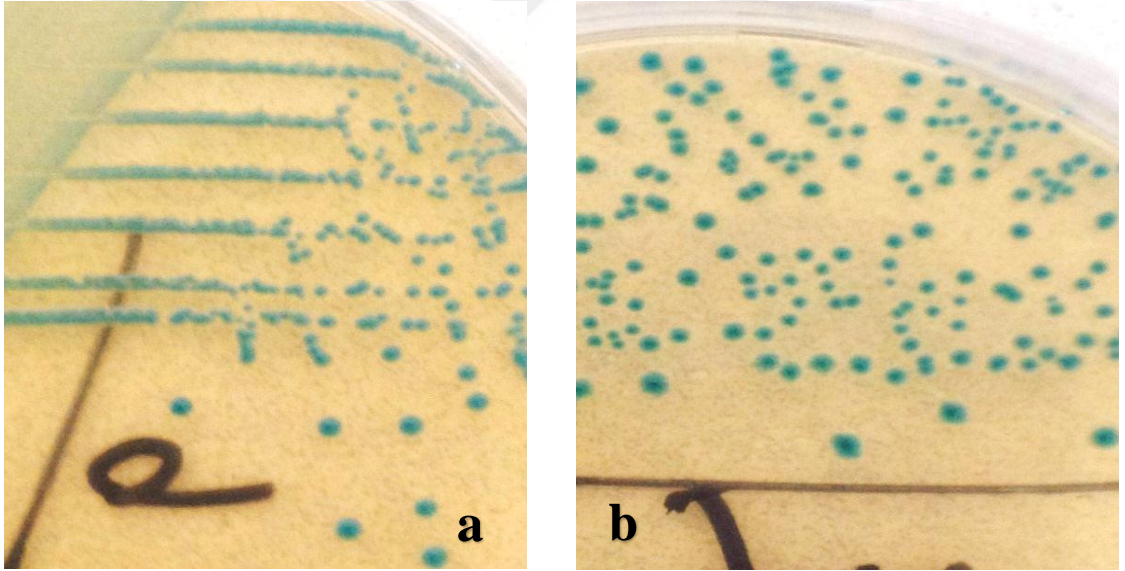
3.2.1. *E. coli* İzolasyonu

Toplanan Sürk peyniri örneklerinin her birinden aseptik koşullarda 10 gr tartılarak 90 mL tamponlanmış peptonlu su (TPS) içerisinde 37°C’de 20 saat inkübasyona bırakılarak ön zenginleştirme yapılmıştır (Şekil 3.2). Ön zenginleştirme işleminden sonra 100 µL alınarak içerisine 4 µg/mL seftazidim ilave edilmiş ve seftazidim ilave edilmemiş olan TBX Agar (Oxoid) plaklarına ekilmiş ve 44°C’de 3 saat daha sonra 41°C’de bir gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyonun ardından her bir petride tipik

yeşil kolonilerden bir adet muhtemel *E. coli* kolonisi rastgele seçilmiş (Şekil 3.3) ve kanlı agara ekimleri yapılarak saf suşlar elde edilmiştir.



Şekil 3.2. İzolasyon için tamponlanmış peptonlu suyun içerisinde inkübasyona bırakılan Sürk peynir örnekleri



Şekil 3.3. Seftazidim ilaveli (a) ve seftazidim ilavesiz (b) TBX Agar üzerinde gelişen tipik yeşil koloniler

3.2.2. *E. coli* Tanımlanması

Toplanan *E. coli* suşlarından DNA standart kaynatma yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Bunun için, elde edilen koloniler DNA/RNA içermeyen saf suyun içerisinde homojenize edilmiş ve 100°C'de 10 dk tutulmuştur, daha sonra 5000 x g devirde santrifüj edilmiştir. *E. coli* izolatları 16S rRNA bölgesi spesifik primer kullanılarak (Wang ve ark. 2002) doğrulanmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerin sekans ve amplifikasyon boyutu Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Reaksiyon ürünleri %1.5'lük agaroz jel dökülerek 45 dk elektroforezde yürütüldükten sonra UV ışığı altında görüntülenmiştir.

Çizelge 3.1. *E. coli* 16S rRNA gen primer sekansı

Primer İsmi	Primerin Sekansı (5' - 3')	Amplikon Boyutu (bp)	Kaynaklar
16S rRNA	F:CCCCCTGGACGAAGACTGAC R:ACCGCTGGCAACAAAGGATA	401	Wang ve ark., 2002

3.2.3. *E. coli* Suşlarının Fenotipik GSBL Doğrulaması

GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarının konfirmasyonu Clinical Laboratory Standards Institute kriterlerine göre çift disk sinerji ve disk kombinasyon metotları kullanılarak yapılmıştır (CLSI 2015).

Çift disk sinerji metodunda bakteri süspansiyonu McFarland 0.5 standardı yoğunluğuna göre ayarlanarak hazırlanmış ve Mueller Hinton (MH) agarın üzerine yayılmıştır. Agarın ortasına amoksisilin/klavulanik asit (AMC) (1/2 30 µg) diski ve etrafına ise disk merkezine uzaklığı 25 mm olacak şekilde aztreonam (ATM) (30 µg), seftazidim (CAZ) (30 µg) ve sefotaksim (CTX) (30 µg) diskleri yerleştirilmiştir ve antibiyogram plakları 37±1°C 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda amoksisilin/klavulanik asit (AMC) ile etrafındaki disklerden birinin arasında amoksisilin/klavulanik asit (AMC) diskine doğru genişleme olması veya AMC ile etrafındaki disklerden herhangi biri arasında bakterinin üremediği bir sinerji alanının oluşması GSBL olarak yorumlanmıştır.

Disk kombinasyon metodunda ise yine McFarland 0.5 standardına göre ayarlanmış bakteri süspansiyonu MH besiyerine yayılmış ve üzerine seftazidim (CAZ) (30 µg), sefotaksim (CTX) (30 µg), sefotaksim (30 µg) / klavulanik asit (10 µg) (CTC)

ve seftazidim (30 µg) / klavulanik asit (10 µg) (CZC) diskleri yerleştirilmiştir ve 37±1°C 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Klavulanik asit içeren ve içermeyen diskler arasındaki inhibisyon zonu ölçülerek karşılaştırma yapılmıştır. Klavulanik asit içeren ve içermeyen diskler arasındaki inhibisyon zonu ≥ 5 mm daha geniş olan suşlar, GSBL üretimi açısından pozitif olarak kabul edilmiştir (CLSI 2015).

3.2.4. GSBL Sentezleyen *E. coli* Suşlarının Filogenetik Gruplarının Belirlenmesi

GSBL sentezleyen *E. coli* izolatları *chuA*, *yjaA*, *acek* ve *arpA* genleri ve *TspE4C* DNA parçasının varlığına göre Clermont ve ark. (2013) tarafından bildirilen protokol kullanılarak multipleks PZR ile filogenetik gruplara (A, B1, B2, C, D, E, F) ayrılmıştır. Master miks için 5 µl DNA, 0,5 µL dNTP miks, 2,5 µl PZR buffer, 2 µl MgCl, 0,4 µl Taq polimeraz enzimi ve *chuA*, *yjaA*, *arpA*, *TspE4C* ve *acek* primerlerinin her birinden 20 pmol, 12,8 µl ultra steril saf su ile toplam karışım 26 µl hazırlanmış PZR analizinde kullanılan primer sekansları Çizelge 3.2.'de verilmiştir.

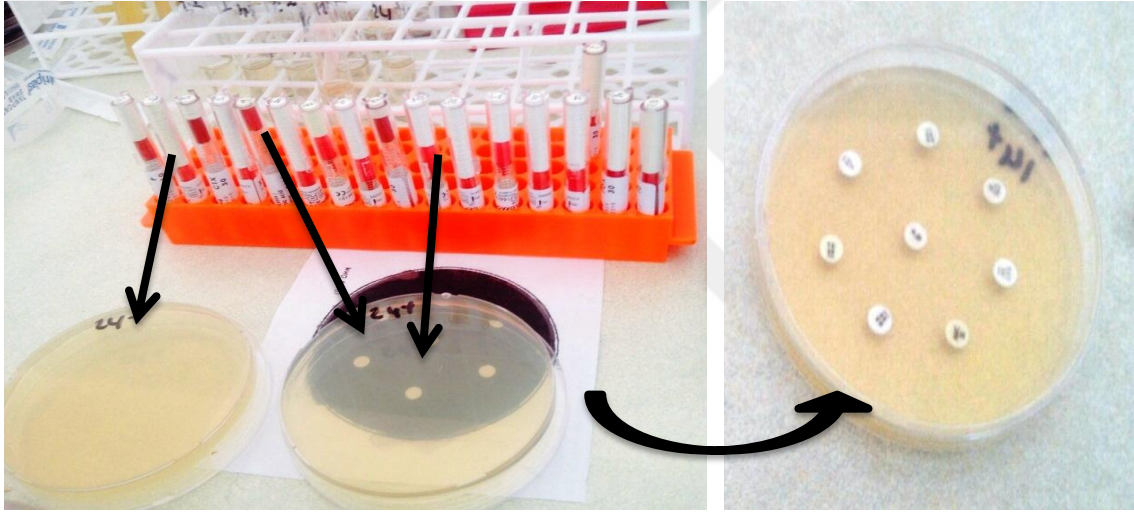
Çizelge 3.2. Filogenetik analizde kullanılan primerler ve sekansları

Primerin İsmi	Primerin Sekansı (5' - 3')	Amplikon Boyutu (bp)	Kaynaklar
<i>chuA</i> - Forward	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	Clermont ve ark., 2013
<i>chuA</i> - Reverse	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
<i>yjaA</i> - Forward	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	Clermont ve ark., 2013
<i>yjaA</i> - Reverse	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC		
<i>TspE4C</i> -Forward	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	Clermont ve ark., 2013
<i>TspE4C</i> - Reverse	CGCGCCAACAAAGTATTACG		
<i>arpA</i> - Forward	GATTCCATCTTGTCAAAATATGCC	301	Clermont ve ark., 2013
<i>arpA</i> - Reverse	GAAAAGAAAAGAATTCCCAAGAG		
<i>acek</i> - Forward	AACGCTATTCGCCAGCTTGC	400	Clermont ve ark., 2013
<i>acek</i> - Revers	TCTCCCCATACCGTACGCTA		

3.2.5. Antibiyotik Duyarlılık Testi

İzole edilen tüm GSBL sentezleyen ve üretmeyen *E. coli* suşlarının antibiyotik duyarlılıkları 15 farklı antibiyotik kullanılarak CLSI (2015) standartlarına göre disk difüzyon yöntemi ile araştırılmıştır. McFarland 0.5 yoğunluğuna göre ayarlanan

bakteriyel süspansiyonlar eküvyonla MH Agar (Oxoid, UK) besiyeri üzerine yayılarak kuruması beklenmiş ve imipenem-IMP (10 µg), ampisilin-AMP (10 µg), amoksisilin/klavulanik asit-AMC (30 µg), gentamisin-GN (10 µg), tetrasiklin-TE (30 µg), seftazidim-CAZ (30 µg), nalidiksik asit-NA (30 µg), sefotaksim-CTX (30 µg), aztreonam-ATM (30 µg), sefoksitin-FOX (30 µg), sefalotin-KF (30 µg), doksisilin-DO (30 µg), siprofloksasin-CIP (5 µg), kloramfenikol-C (30 µg), trimetoprim-sulfametoksazol-SXT (1.25/23.75 µg) diskleri yerleştirilmiştir (Şekil 3.4). Plaklar 37°C’de 18-24 saatlik inkübe edildikten sonra antibiyotik disklerinin çevresindeki inhibisyon zonu ölçülmüş ve sonuçlar CLSI (2015) standartlarına göre değerlendirilmiştir.



Şekil 3.4. Antibiyotik duyarlılık testi

3.2.6. Beta-laktamaz Genlerinin Belirlenmesi

TEM, OXA, SHV ve CTX-M tip beta-laktamazların varlığının belirlenmesi Ahmed ve ark. (2007) tarafından bildirilen primerler ve yöntem kullanılarak yapılmıştır (Çizelge 3.3). Elde edilen amplikonların çift yönlü DNA dizi analizleri yapılarak BLAST programı ile GenBank’da yer alan dizilerle karşılaştırılarak (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) GSBL tip ve alt tipleri belirtilmiştir. DNA dizi analizi için hizmet alımı (Refgen, Ankara) yapılmıştır.

Çizelge 3.3. GSBL tip ve alt tiplerinin belirlenmesinde kullanılan primerler

Primerin İsmi	Primerin Sekansı (5' - 3')	Amplikon Boyutu (bp)	Kaynaklar
<i>blaTEM</i> - Forward	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	1080	Ahmed ve ark., 2007
<i>blaTEM</i> - Reverse	GACAGTTACCAATGCTTAATC		
<i>blaSHV</i> - Forward	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	797	Ahmed ve ark., 2007
<i>blaSHV</i> - Reverse	GATTTGCTGATTTGCTCGG		
<i>blaOXA</i> -Forward	TCAACTTTCAAGATCGCA	610	Ahmed ve ark., 2007
<i>blaOXA</i> - Reverse	GTGTGTTTAGAATGGTGA		
<i>blaCTX-M</i> - Forward	CGCTTTGCGATGTGCAG	551	Ahmed ve ark., 2007
<i>blaCTX-M</i> - Reverse	ACCGCGATATCGTTGGT		

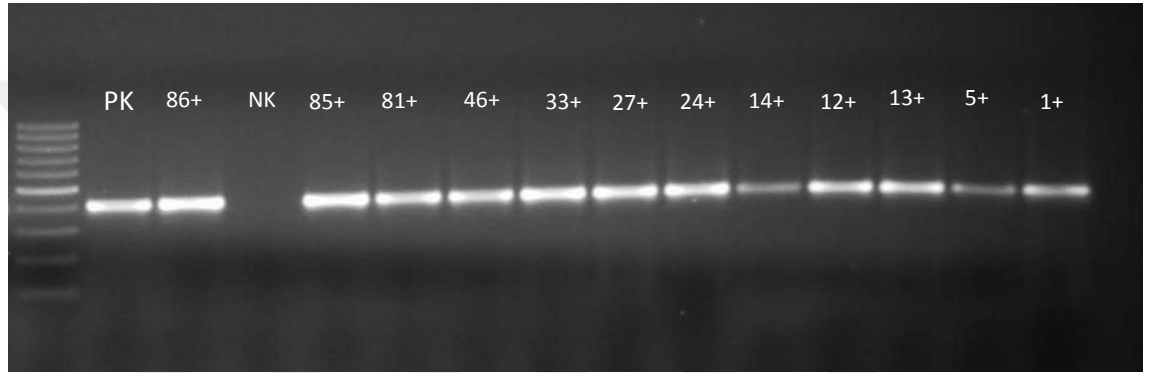
3.2.7. Pulsed-field Jel Elektroforezi (PFGE)

Pulsed-field jel elektroforezi, Durmaz ve ark. (2009) tarafından önerilen yöntemle göre Türkiye Halk Sağlığı Kurumu'nda (Ankara) yaptırılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. GSBL Sentezleyen *E. coli* İzolasyonu ve Tanımlanması

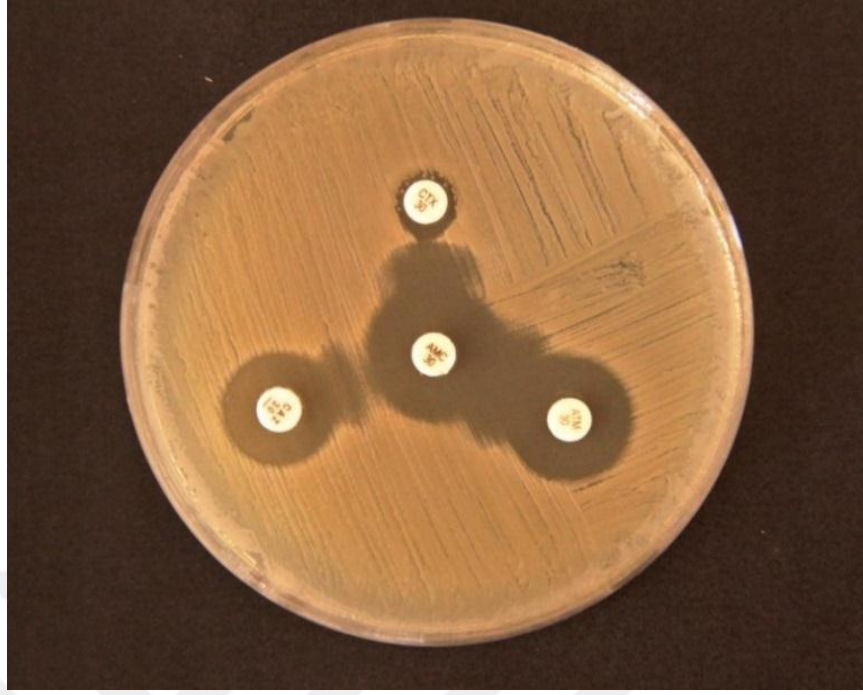
İncelenen Sürk peyniri örneklerinden küflü olan 1'inden (1/29) ve taze olan örneklerden ise 11'inden (11/58) olmak üzere 87 Sürk peyniri örneğinin toplam 12'sinin (%13.8) fenotipik yöntemlerle GSBL yönünden pozitif *E.coli* olduğu tanımlanmıştır. İzolatların hepsi 16S rRNA varlığı bakımından incelenmiş ve PZR analizi sonucunda pozitif bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. *E. coli* spesifik 16S rRNA primerleri kullanılarak yapılan PZR bulguları

4.2. GSBL Sentezleyen *E. coli* Suşlarının Fenotipik Doğrulaması

Çift disk sinerji metodunda sonuçlarına göre, incelenen 87 Sürk peynirinden 12'sinde (1, 5, 12, 13, 14, 24, 27, 33, 46, 81, 85 ve 86 nolu izolatlar) AMC diskinde doğru genişleme veya AMC ile etrafındaki disklerden herhangi biri arasında bakterinin üremediği bir sinerji alanı gözlemlenmiş (Şekil 4.2) ve *E. coli* suşlarının GSBL pozitif olduğu fenotipik olarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.1).



Şekil 4.2. Çift disk sinerji metodu ile belirlenen GSBL pozitifliği

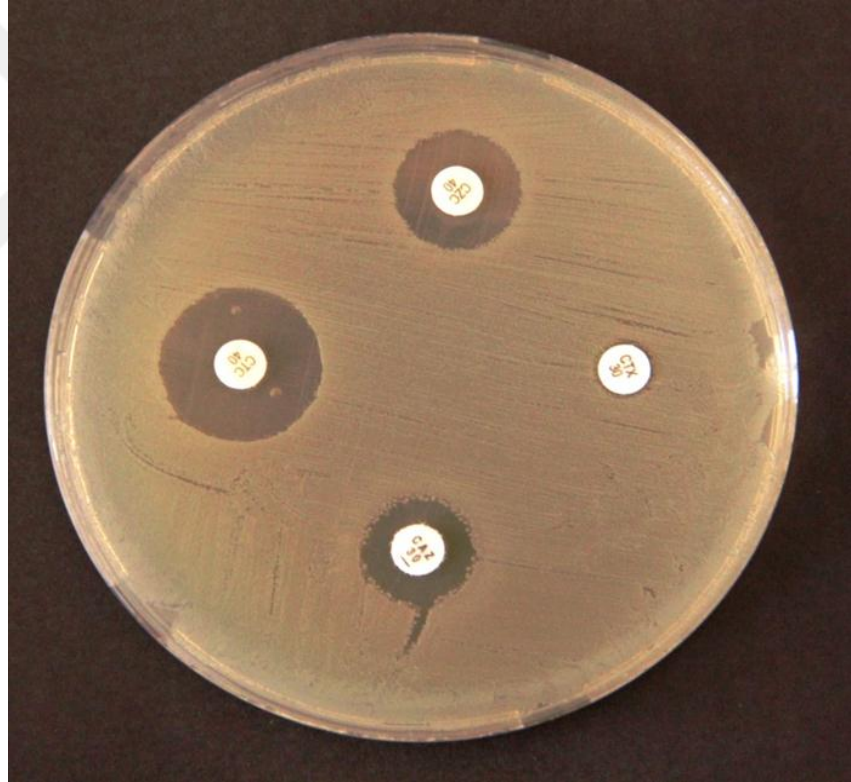
Çizelge 4.1. Çift disk sinerji test sonuçları

İzolat no	Alındığı yer	GSBL Sonuç
1	Kırıkhan	Pozitif
5	Uzun çarşı	Pozitif
12	Uzun çarşı	Pozitif
13	Uzun çarşı	Pozitif
14	Samandağ	Pozitif
24	Merkez	Pozitif
27	Kumlu	Pozitif
33	Kırıkhan(Küflü)	Pozitif
46	Kırıkhan	Pozitif
81	Yayladağ	Pozitif
85	Yayladağ	Pozitif
86	Yayladağ	Pozitif

Arslan ve Özdemir (2008) çift disk sinerji metodu kullanarak, beyaz peynirlerden izole edilen 223 *E. coli* suşunun 36'sını (%16.1), Gündoğan ve Avcı

(2013) hayvansal gıdalardan izole edilen 45 *E.coli* suşunun 20'sini (%44.4) GSBL sentezleyen *E. coli* suşu olarak belirlemişlerdir.

Çalışmamızda disk kombinasyon metodu sonuçlarına göre seftazidim (CAZ) ve seftazidim-klavulanik asit (CZC) arasındaki inhibisyon zonu 1, 5, 12, 13, 14, 24, 27, 33, 46, 81, 85 ve 86 numaralı izolatlar için sırasıyla 6, 3, 3, 9, 5, 4, 2, 1, 1, 0, 2, 4 mm olarak ölçülmüştür. Sefotaksim (CTX) ve seftaksim-klavulanik asit (CTC) arasındaki inhibisyon zonu ise 1, 5, 12, 13, 14, 24, 27, 33, 46, 81, 85 ve 86 numaralı izolatlar için sırasıyla 11, 15, 15, 15, 16, 14, 8, 12, 11, 16, 18, 17 mm olarak tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Disk kombinasyon metoduna göre inhibisyon zonu ≥ 5 mm'den geniş olanlar GSBL pozitif olarak kabul edilmektedir ve analiz sonuçlarımıza göre 12 *E. coli* izolatının tamamı GSBL pozitif olduğu fenotipik olarak doğrulanmıştır (Çizelge 4.2).



Şekil 4.3. Disk kombinasyon metodu ile belirlenen GSBL pozitifliği

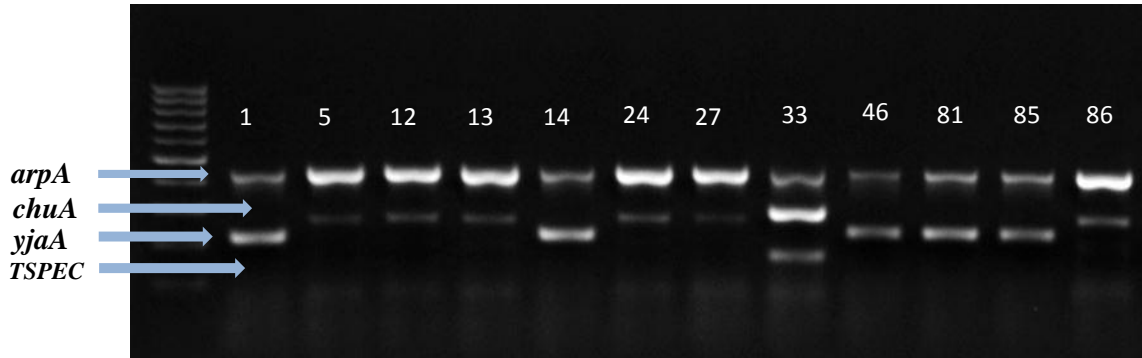
Arslan ve Özdemir (2008) disk kombinasyon metodu ile ev yapımı beyaz peynirlerden izole edilen 223 *E.coli* izolatının 22'sini (%9.9), Pehlivanlar Önen ve ark. (2015) satışa sunulan dondurulmuş veya buzdolabı koşullarında satışa sunulan tavuk etlerinin 81'ini (n=100) ve sığır etlerinde 7'sini (n=100) GSBL pozitif bulmuşlardır.

Çizelge 4.2. Disk kombinasyon metodu sonuçları

İzolat no:	Seftazidim (CAZ)	Seftazidim/Klavulanik asit (CZC)	Sefotaksim (CTX)	Sefotaksim/Klavulanik asit (CTC)
1	12	18	9	20
5	14	17	6	21
12	16	19	8	23
13	9	18	6	21
14	11	16	8	24
24	12	16	8	22
27	12	14	8	16
33	15	16	8	20
46	14	15	8	19
81	15	15	6	22
85	14	12	0	18
86	14	18	0	17

4.3. GSBL Sentezleyen *E. coli* Suşlarının Filogenetik Gruplarının Belirlenmesi

Filogenetik tiplendirme sonuçlarına göre 12 GSBL sentezleyen izolatın 7'si (%58.4) E grubuna, 3'ü (%25) C grubuna ve 2'si (%16.6) A grubuna ait bulunmuştur (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. Multipleks PZR analizi jel görüntüsü

Clermont ve ark. (2000) filogenetik gruplardan A ve B1 gurubuna dahil olan suşların patojenik olmadıkları, daha çok kommensal suşlar oldukları, buna karşın B2 ve D suşlarının ise virulent suşlar olduklarını vurgulamıştır. Ancak son yıllarda gündeme getirilen yeni sınıflandırmaya göre ortaya çıkan yeni grupların (C ve E) patojenitelerine yönelik literatürde veri bulunmamaktadır. Bu özelliğinden dolayı, çalışmamız elde edilen bulguların tartışılması hakkında bir ilk teşkil etmektedir.

Pehlivanlar Önen ve ark. (2015) tavuk ve sığır etlerinden izole edilen GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarının çoğunluğunun (%62.1) D1, Valat ve ark. (2012) ise Fransa'da hastalıklı ve ölü sığırlardan izole ettikleri *E. coli* suşlarının çoğunlukla (%55.4) A filogenetik grubuna ait olduğunu bildirmişlerdir. Çin'de ise hayvansal kaynaklı gıdalardan izole ettikleri GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarında baskın grubun A (%52.3) olduğu belirlenmiştir (Zheng ve ark., 2012). Trkov ve ark. (2014) Slovenya'da satışa sunulan çiğ et, balık, salata, fırıncılık ürünleri gibi farklı gıda ürününde yaptıkları çalışmada, elde ettikleri 84 *E. coli* izolatının 42 sinin (%50) filogenetik grubunun A ve 30'unun (%35.7) ise B1 grubuna, 10'nun (%11.9) D grubuna ve 2'sinin (%2.4) ise B2 ait olduğunu saptamışlardır.

Çizelge 4.3. PZR ile belirlenen filogenetik gruplar

İzolat no	Filogenetik grup	Belirlenen genler
1	A	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>
5	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>
12	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>
13	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>
14	A	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>
24	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>
27	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>
33	E	<i>arpA</i> , <i>chuA</i> ve TspE4C2
46	C	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>
81	C	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>
85	C	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>
86	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>

4.4. Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

GSBL sentezleyen *E.coli* antibiyotik duyarlılık test görüntüsü Şekil 4.5’de, sonuçları ise Çizelge 4.4 ve Şekil 4.6’de gösterilmiştir.



Şekil 4.5. Antibiyotik duyarlılık test görüntüsü

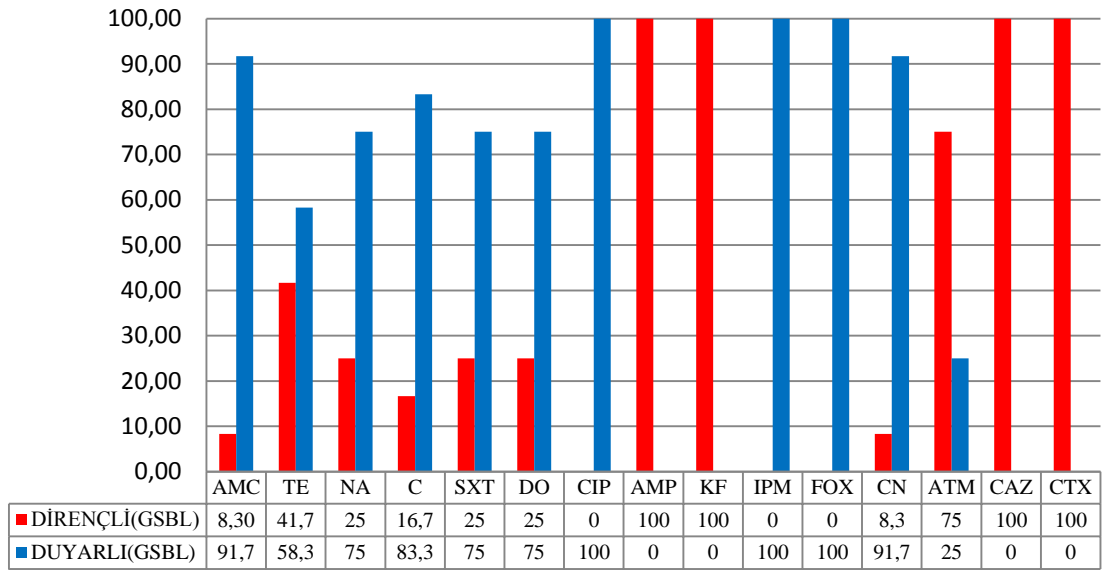
Uygulanan antibiyotik duyarlılık testi ile GSBL tanımı kapsamında seftazidim ve sefotaksim gibi 3. kuşak sefalosporin grubu antibiyotiklere dirençli olması izolatların GSBL pozitif olduğunu doğrulamıştır.

İzole edilen GSBL sentezleyen 12 *E. coli* suşunun amoksisilin klavulanik asit, tetrasiklin, nalidiksik asit, kloramfenikol, trimetoprim-sulfametoksazol, doksisilin, gentamisin ve aztreonam’a sırasıyla %8.3, %41.7, %25.0, %16.7, %25.0, %25.0, %8.3, %75.0 oranında dirençli bulunmuştur. GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarının ampisilin, seftazidim, sefotaksim ve sefalotin antibiyotiklerine %100 dirençli olduğu ve imipenem, sefoksitin antibiyotiklerine ise %100 duyarlı olduğu gözlemlenmiştir.

Çizelge 4.4. GSBL sentezleyen *E.coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Antibiyotik ismi	Dirençli, n (%)	Duyarlı, n (%)
Amoksisilin-klavulanik asit	1 (8.3)	11 (91.7)
Tetrasiklin	5 (41.7)	7 (58.3)
Nalidiksik asit	3 (25.0)	9 (75)
Kloramfenikol	2 (16.7)	1 (83.3)
Trimetoprim-sulfametoksazol	3 (25.0)	9 (75)
Doksisilin	3 (25.0)	9 (75)
Siprofloksasin	-	12 (100)
Ampisilin	12 (100)	-
Sefalotin	12 (100)	-
İmipenem	-	12 (100)
Sefoksitin	-	12 (100)
Gentamisin	1 (8.3)	11 (91.7)
Aztreonam	9 (75)	3 (25)
Seftazidim	12 (100)	-
Sefotaksim	12 (100)	-

Antibiyotik duyarlılık testi

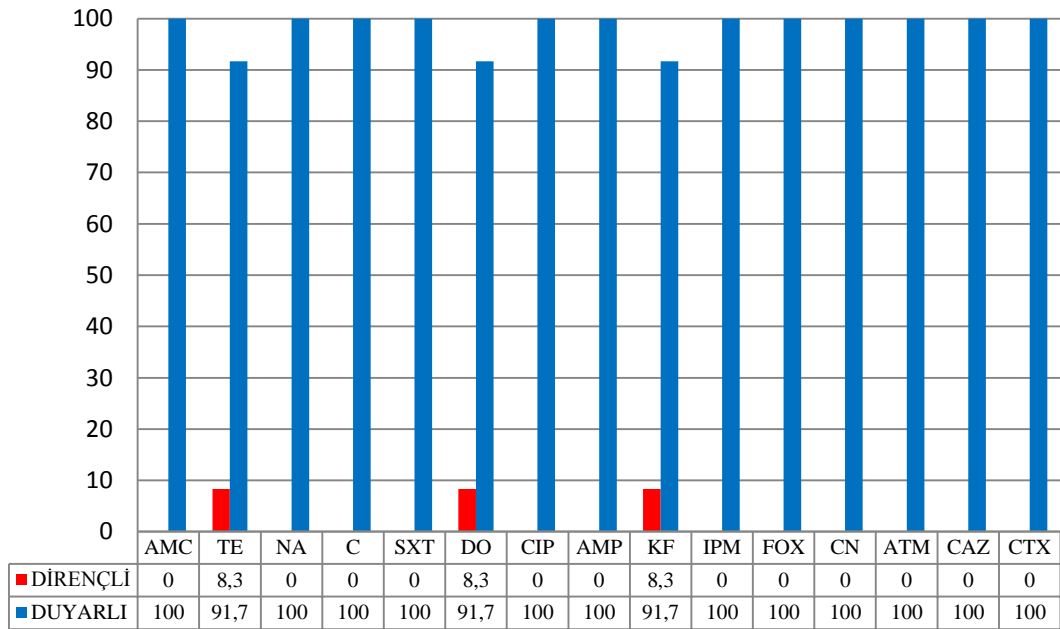


Şekil 4.6. GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

GSBL izolasyonu yapılan örneklerden GSBL negatif 12 *E. coli* suşunun antibiyotik duyarlılık testi sonuçları Çizelge 4.5’de ve Şekil 4.7’de gösterilmiştir. Antibiyotik duyarlılık testi sonucuna göre, GSBL sentezlemeyen *E. coli* izolatlarının tamamının amoksisilin-klavulanik asit, nalidiksik asit, kloramfenikol, trimetoprim-sulfametoksazol, siprofloksasin, ampisilin, imipenem, sefoksitin, gentamisin, aztreonam, seftazidim, sefotaksim antibiyotiklerine duyarlı, tetrasiklin, doksisisilin ve sefalotin antibiyotiklerine ise %91.7 oranında duyarlı olduğu gözlemlenmiştir.

Bulunan sonuçlara göre, GSBL pozitif olan suşlarda çoğul antibiyotik direncine sahip oldukları yapılan bu çalışma ile de karşılaştırılmalı olarak ortaya koyulmuştur. GSBL pozitif suşların diğer sınıftan antibiyotiklere de, özellikle florokinolon, aminoglikozid ve trimetoprim-sulfametoksazol, dirençli olduğu ve bunun ortaya çıkmasında dirençlere aracılık eden genetik mekanizmanın çoğunlukla bakterinin plasmid gibi taşınabilir genetik materyalinde ortak kodlanmasından dolayı olduğu ortaya konulmuştur (Bradford, 2001).

Antibiyotik duyarlılık testi



Şekil 4.7. GSBL negatif *E.coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık testi sonuçları

Çizelge 4.5. GSBL negatif *E.coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılık test sonuçları

Antibiyotik	Dirençli, n (%)	Duyarlı, n (%)
Amoksisilin-klavulanik asit	-	12 (100)
Tetrasiklin	1 (8.3)	11 (91.7)
Nalidiksik asit	-	12 (100)
Kloramfenikol	-	12 (100)
Trimetoprim-sulfametoksazol	-	12 (100)
Doksisilin	1 (8.3)	11 (91.7)
Siprofloksasin	-	12 (100)
Ampisilin	-	12 (100)
Sefalotin	1 (8.3)	11 (91.7)
İmipenem	-	12 (100)
Sefoksitin	-	12 (100)
Gentamisin	-	12 (100)
Aztreonam	-	12 (100)
Seftazidim	-	12 (100)
Sefotaksim	-	12 (100)

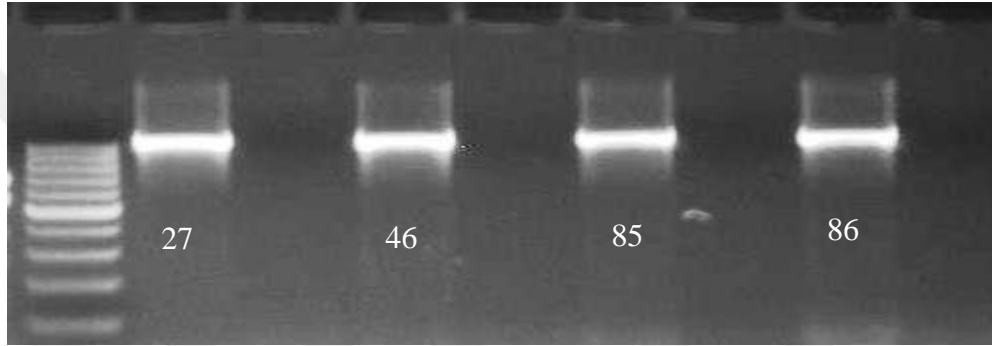
Gündoğan ve Avcı (2013) tavuk, kıyma, süt ve beyaz peynirlerden GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarıyla yaptıkları çalışmada izolatların ampisilin direncini %100, sefotaksim direncini %33.3, aztreonam direncini %28.9, tetrasiklin direncini %77.8 seftazidim direncini %8.9 ve siproflaksosin direncini %31.1 olarak bildirmişlerdir. Yaptığımız çalışmada benzer şekilde GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarımızın tamamında ampisilin direnci tespit edilirken diğer antibiyotiklere direnç oranı daha yüksek bulunmuştur. Slovenya’da taze Bryndza peynirlerinde izole edilen 45 *E. coli* suşundan 19’unun GSBL pozitif olduğu belirlenmiştir (Vrabec ve ark., 2015).

Bavyera süt ve sığır çiftliklerinde GSBL sentezleyen *E. coli* prevalansını belirlemek amacı ile yapılan çalışmada ise elde edilen 170 izolatın ampisilin direnci %100, sefotaksim direnci %95.3, aztreonam direnci %84.1 olarak belirlenmiştir (Schmid ve ark., 2013). Elde edilen bu sonuçlar bizim çalışmamızdaki sonuçlarla benzerlik göstermektedir. Bu sonuçlara karşılık, Schmid ve ark. (2013) seftazidim

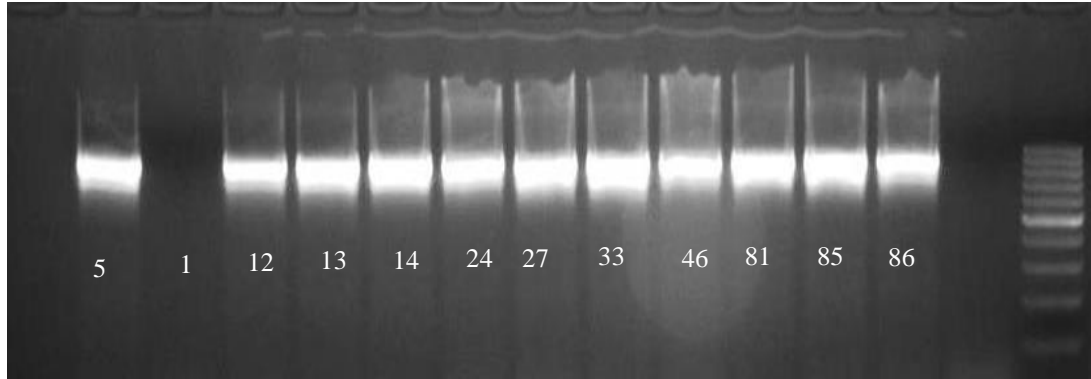
antibiyotiğine direnci %32.4 olarak rapor eder iken, çalışmamızdaki seftazidim antibiyotiğine direnç %100 olarak gözlemlenmiştir.

4.5. GSBL Tip ve Alt Tiplerinin Belirlenmesi

Beta-laktamaz genleri PZR görüntüleri TEM geni Şekil 4.8’de ve CTX-M geni Şekil 4.9’de verilmiştir. Genlerin tam alt tiplerinin belirlenmesi amacı ile PZR ürünleri Refgen-Ankara’da Sanger yöntemiyle sekanslatılmış, veriler BLAST programı ile GenBank’da yer alan dizilerle karşılaştırılmıştır (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Beta-laktamaz sentezleyen gen karakterizasyonu Çizelge 4.6.’de verilmiştir.



Şekil 4.8. TEM geni agaroz jel elektroforez görüntüsü



Şekil 4.9. CTX-M geni agaroz jel elektroforez görüntüsü

Çizelge 4.6. GSBL izolatlarından belirlenen beta-laktamaz tip ve alt tipleri

İzolat no	Beta-laktamaz tip ve alt tipleri
1	-
5	CTX-M-15
12	CTX-M-15
13	CTX-M-15
14	CTX-M-15
24	CTX-M-15
27	CTX-M-15 + TEM-1b
33	CTX-M-15
46	CTX-M-15 + TEM-1b
81	CTX-M-15
85	CTX-M-15 + TEM-1b
86	CTX-M-15 + TEM-1b

Çalışmamızda ise 87 Sürk peynirinden izole edilen GSBL sentezleyen 12 *E. coli* suşunun gen karakterizasyonu sonuçlarına göre yaygın olarak 11'inde (%58.3) CTX-M-15 geni varlığı gözlemlenmiştir. İzolatların 4'ünde (%33.3) ise CTX-M-15 geni ile TEM-1b geni kombinasyonu olduğu rapor edilmiştir. Yapılan analizlerin sonuçlarına göre 12 *E. coli* suşunun filogenetik grupları, gen çeşitleri, beta-laktamaz tip ve alt tipleri belirlenmiştir (Çizelge 4.7).

Çizelge 4.7. GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarının filogenetik gruplara göre dağılımı.

İzolat no	Filogenetik grup	Gen çeşidi	Beta-laktamaz geni
1	A	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>	-
5	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>	CTX-M-15
12	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>	CTX-M-15
13	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>	CTX-M-15
14	A	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>	CTX-M-15
24	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>	CTX-M-15
27	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>	CTX-M-15 + TEM-1b
33	E	<i>arpA</i> , <i>chuA</i> ve TspE4C2	CTX-M-15
46	C	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>	CTX-M-15 + TEM-1b
81	C	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>	CTX-M-15
85	C	<i>arpA</i> ve <i>yjaA</i>	CTX-M-15 + TEM-1b
86	E	<i>arpA</i> ve <i>chuA</i>	CTX-M-15 + TEM-1b

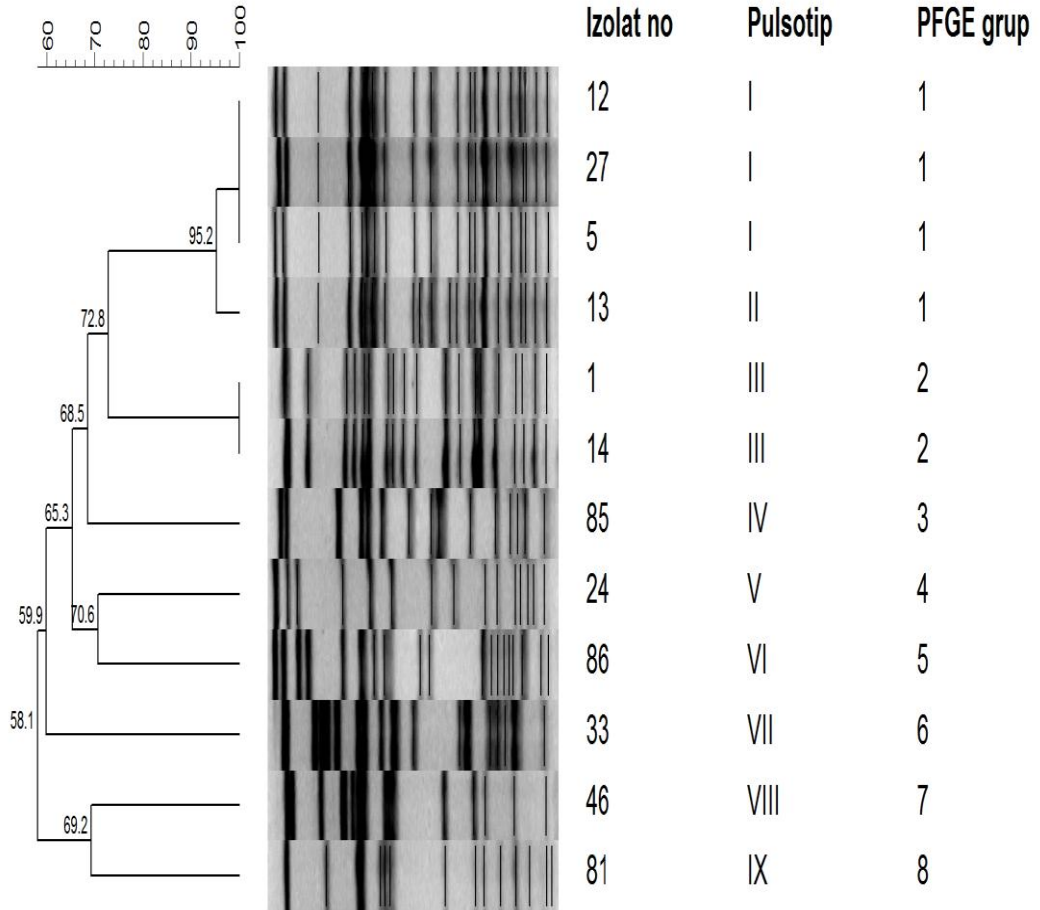
Ramos ve ark. (2013) Portekiz mezbahanelerinde kesime giden sığır ve koyunlardan izole edilen GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarında yaygın olarak CTX-M-1 (%7) geninin belirlendiğini bildirmişlerdir. Geser ve ark. (2012) koyun eti ve sütünden izole edilen GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarında ise yaygın olarak (%85.7) CTX-M grubuna ait olduğunu ve çoğunluğunun ise CTX-M-14 genini içerdiğini tespit etmişlerdir. Amador ve ark. (2009) ise yaptıkları çalışmada Portekiz'de keçi, koyun ve inek sütü peynir izole edilen GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarında yaygın olarak (%80.9) TEM geninin bulunduğunu bildirmişlerdir. Bryndza peynirinde ise %42.22 oranında izole edilen GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarının CTX-M geni içermediği, 15 izolatta TEM 4 izolatta ise SHV geni içerdiği rapor edilmiştir (Vrabec ve ark., 2015).

Buna karşın, Pehlivanlar Önen ve ark. (2015) Türkiye'de tavuk ve sığır etinden izole edilen GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarında yaygın olarak (%44.3) CTX-M-1 geninin varlığını tespit etmişlerdir. Bu çalışmalara ilaveten, Türkiye'de hasta insanlardan elde edilen GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarında CTX-M-15 tipinin en fazla rastlanan GSBL enzim tipi olduğu rapor edilmiştir (Altinkum ve ark. 2013). Buna ilaveten, Pehlivanlar Önen ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada, tavuk eti örneklerinden elde ettikleri GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarında CTX-M-15 tipini de bulmuşlar ve bundan dolayı piyasada satışa sunulan tavuk etlerinin halk sağlığı yönünden tehdit oluşturabileceğini vurgulamışlardır.

Genetik tiplendirme analizlerinde CTX-M genlerinin dünya çapında yaygınlaşması, dışkı kaynaklı kontaminasyon nedeniyle sağlıklı hayvansal gıdalar için önemli bir risk faktörü olduğu göstermektedir. Bu nedenle, GSBL sentezleyen *E. coli* suşlarında genetik tiplendirme analizlerinin potansiyel sağlık risklerini belirlemek açısından faydalı bir araç olabileceği bildirilmektedir (Ramos ve ark. 2013). İngiltere'de CTX-M-15 genlerinin yaygınlığının hızla gelişen bir sorun olduğu, coğrafi dağılım çeşitliliğinin geniş yayılımının toplum kökenli enfeksiyonların tedavisinde yakından takip edilmesi gerektiği bildirilmiştir (Woodford ve ark., 2004). Aynı endişe edici durum, Çin'de 2003 ve 2012 yıllarında yapılan çalışmalar sonucunda da ortaya konmuştur (Rao ve ark., 2014).

4.6.Pulsed-field Jel Elektroforezi

Pulsed-field jel elektroforezi kullanılarak tiplendirilmeye alınan 12 *E. coli* suşundan 9 farklı pulsotip saptanmıştır (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. Pulsed-field jel elektroforez görünümü

Pulsotiplerden 2 tanesi birbiriyle ayırt edilemez profil gösteren 2-3 suş içermektedir. Pulsotipler arasındaki benzerlik oranı $\geq 85\%$ alındığında 6 suşun klonal olarak ilişkisiz oldukları 6 suşun ise birbirleriyle ilişkili 2 grup içinde toplandıkları kaydedilmiştir.

Pulsed-field jel elektroforezi tekniği dünyada yüksek ayırt etme gücünden dolayı moleküler epidemiyolojide bakterilerin alt tiplendirilmelerinde yirmi yıldır kullanılan altın standart metod olarak kabul edilmektedir (Barrett ve ark. 2006). Bu metodu

kullanarak, Nemoy ve ark. (2005) hastalardan izole ettikleri GSBL sentezleyen 40 *E. coli* suşunun 19 farklı pulsotipi olduğunu bildirmişlerdir. P11, P7 ve P13 pulsotiplerin her birinin 4'er izolatla ilişkili olduğunu, P1, P4, P14 ve P16 pulsotiplerin her birinin 2'şer izolatı kapsadığını ve geriye kalan 12 pulsotipin ise her birinin tek ton, benzersiz, pulsotipi temsil ettiğini bildirmişlerdir. Durmaz ve ark. (2009) ise, pulsed-field jel elektroforezi kullanarak, 174 klinik izolattan elde edilen 50 *E. coli* suşunun DNA parmak izi profilini çıkartarak 19 farklı pulso tip bulmuşlardır. Bu tip çalışmalar, mikroorganizmanın kaynağını ve yayılım hızını göstermesi açısından önemlidir. Ayrıca, bu teknik ile elde edilen veriler, uygulanan önleyici tekniklerinin etkinliklerinin ölçülmesinde de kullanılmaktadır (Maquelin ve ark. 2007; Foley ve ark. 2009).



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Hatay geleneksel süt ürünleri açısından oldukça zengin bir ildir. Özellikle yöreye ait Sürk peyniri, üretim metodu, içerdiği şifalı otlar ve baharatlar, konik yapısı ve turuncu rengi ile ülkemizdeki peynirlerden oldukça farklı ve coğrafi işaret almaya aday bir üründür. Ancak, Hatay ilinde Sürk tüketimi yoğun olmasına karşın ürün genellikle küçük üreticiler tarafından hijyenik olmayan koşullarda üretilmekte ve küçük marketlerde veya yine hijyenik olmayan koşullarda köylüler tarafından üretildikten sonra kent pazarlarında satışa sunulmaktadır. Üretim esnasında hijyen koşullarındaki eksiklik ve bilgisizlikten dolayı Sürk peyniri birçok kontamine mikroorganizma içerebilmektedir. Ancak, bugüne kadar Sürk peynirinde GSBL sentezleyen *E. coli* prevelansı ve bu mikroorganizmanın suşlarının antibiyotik direnci ve antibiyotik direnç mekanizmasında yer alan genlerin moleküler karakterizasyonu belirlenmemiştir.

Bu amaçla Hatay ilindeki satış noktalarından (marketler ve pazarlar) 87 Sürk peyniri örneği toplanmıştır. GSBL sentezleyen *E. coli* izolatlarının antibiyotik duyarlılıkları disk difüzyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. GSBL sentezleyen izolatların filogenetik gurupları ve beta-laktamaz kodlayan genlerin (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA}, ve *bla*_{CTX-M}) varlığının tanımlanmaları PZR ile yapılmıştır. İzolatların alt tiplerleri PFGE kullanılarak yapılmıştır.

İncelenen Sürk peyniri örneklerinin %13.8'inde (n=12) GSBL sentezleyen *E. coli* tespit edilmiştir. İzolatların Tetrasiklin (%41.7), Trimethoprim-Sulfamethaxazole (%25), doksisisilin (%25) ve Kloramphenicol (%25) dirençli oldukları bulunmuştur. Ancak, bütün izolatların imipenem, Siprofloksasin ve Sefoksitine karşı duyarlı oldukları bulunmuştur. On bir adet GSBL sentezleyen *E. coli* izolatında *bla*_{CTX-M15} bulunurken, bu izolatların dört tanesinde aynı zamanda *bla*_{TEM1b} genide bulunmuştur. PFGE sonuçlarına göre, benzerlik oranı \geq %85 alındığında temel alındığında birbirinden farklı sekiz adet küme tespit edilmiştir. Yapılan bütün analizlerin sonuçları Çizelge 5.1'de gösterilmiştir.

Bu çalışma GSBL sentezleyen *E. coli*'nin Sürk peynirlerinde yüksek oranda yaygın olduğunu ve bu peynirin tüketiminin insanlar için ciddi bir kaynak olabileceğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, toplum sağlığını korumak için güvenli bir ürün üretebilmek hem de Sürk peynirinin ulusal ve uluslararası alanda ticarileşmesini sağlayabilmek için, özellikle Coğrafi İşaretleme açısından tescilinin yapılması için,

kontaminasyona kaynaklarının kontrol edilerek üretimin gerçekleştirilmesi gerekmektedir.

Bu durumun temelinde, üreticilerin hijyen ve sanitasyon konusundaki bilgisizliği ve teknoloji alt yapısındaki eksiklik bulunmaktadır. Küresel şartlarda ve büyük aktörlerin rol oynadığı süt sektöründe yörenin ekonomik kalkınmasında rol oynayacak Sürk peynirinin, diğer yöresel ürünlerde olması gerektiği gibi, tüm üretim zincirinin hijyenik şartlarda gerçekleştirilmesi için yörede karar vericiler tarafından etkili politikaların uygulanmasına gerek vardır.

Ayrıca, GSBL sentezleyen *E. coli*'nin tanısında ve moleküler karakterizasyonunda kullanılan moleküler tekniklerin oldukça yararlı olduğu gözlenmiştir. Bu çalışma ile, hayvansal orjinli geleneksel ürünlerde GSBL sentezleyen *E. coli* veya diğer patojenlerin teşhisinin ve takibinin yapılması için hem Hatay ilinde hem de ülkemiz çapında yapılacak yoğun ve sürekli çalışmalara ihtiyaç duyulduğu da ortaya konmuştur.

KAYNAKLAR

- Ahmed, A.M., Motoi, Y., Sato, M., Maruyama, A., Watanabe, H., Fukumoto, Y. and Shimamoto, T., 2007. Zoo animals as a reservoir of Gram negative bacteria harboring integrons and antimicrobial resistance genes. **Applied and Environmental Microbiology**, 73, 6686-6690.
- Altinkum, S.M., Ergin, S., Bahar, H. and Torun, M.M., 2013. CTX-M-15 type extended spectrum β -lactamase producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: A developing problem in infected outpatients and hospitalised patients in Istanbul, Turkey. **African Journal of Microbiology Research**, 7, 692-697.
- Aly, M. E. A., Essam, T. M. and Amin, M. A., 2012. Antibiotic Resistance Profile of *E. coli* strains isolated from clinical specimens and food samples in Egypt. **International Journal of Microbiological Research**, 3 (3), 176-182.
- Amador, P., Fernandes, R., Prudêncio, C. and Brito, L., 2009. Resistance to β -lactams in bacteria isolated from different types of Portuguese Cheese. **International Journal of Molecular Sciences**, 10, 1538-1551.
- Ambler, R.P., Coulson, A.F., Frere, J.M., Ghuysen, J.M., Joris, B., Forsman, M., Levesque, R.C., Tiraby, G. And Waley, S.G., 1991. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, 276, 269-270.
- Andiç, S., Tunçtürk, Y., Javidipour, I. and Gençcelep, H., 2015. Effects of different herbs on biogenic amine. **GIDA**, 40 (1), 1-8.
- Anonim, 2013. Dünya ve Türkiye’de Süt Sektör İstatistikleri. Ulusal Süt Konseyi, **1. Basım Mayıs 2014**, Ankara.
- Arslan, S. and Özdemir, F., 2008. Extended spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated from homemade white cheeses: prevalence and antibiotic susceptibility. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 24, 2361-2364.
- Aygun, O., Yaman, M. and Durmaz, H., 2007. A survey on occurrence of Tyrophagus putrescentiae (Acari: Acaridae) in Surk, a traditional Turkish dairy product. **Journal of Food Engineering**, 78 (3), 878-881.
- Aygün, O., Aslantaş, Ö. ve Öner, S., 2004. A survey on the microbiological quality of Carra, a traditional Turkish cheese. **Journal of Food Engineering**, 66, 401-404.
- Bradford, P.A., 2001. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Review**, 14, 933-51.
- Bush, K. and Jacoby, J.A., 2010. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 54, 969-976.
- Carattoli, A., 2008. Animal reservoirs for extended spectrum b-lactamase producers. **Clinical Microbiology Infection**, 14, 117-123.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., and Bingen, E., 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. **Applied Environmetnal Microbiology**, 66, 4555-4558.
- Clermont, O., Christenson, J. K., Denamur, E. and Gordon, D.M., 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and

- detection of new phylo-groups. **Environmental Microbiology Reports**, 5 (1), 58–65.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **Eighteenth informational supplement**. Document M100-S18. Wayne, PA.
- Cokal, Y., Dagdelen, A., Cenet, A., and Gunsen, U., 2012. Presence of *L. monocytogenes* and some bacterial pathogens in two Turkish traditional foods, Mihalic cheese and Hosmerim dessert. **Food Control**, 26, 337-340.
- Çağrı-Mehmetoğlu, A., Yaldırak, G., Bodur, T., Şimşek, M., Bozkır, H. and Eren, M.N., 2011. Incidence of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in two Kasar Cheese processing environments. **Food Control** 22, 762-766.
- Çelikel, A., Akın, M. B. ve Akın, M. S., 2014. Contamination sources of traditional unripened Sürk cheese manufacturing methods. **The 3rd International Symposium on “Traditional Foods from Adriatic to Caucasus**, October 01-04, 2015, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, p.204.
- Çelikyurt, G., 2008. Determination of some properties of Surk cheese and identification of lactic acid bacteria by using PCR method. agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=TR2012000573. Erişim tarihi: 8.11.2015
- Dağlar, D., ve Öngüt, G., 2012. Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamazlar (GSBL) ve tanı yöntemleri. **İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi**, 1, 1-9.
- Dahmen, S., Me'tayer, V., Gay, E., Madec, J-Y. and Haenni, M., 2013. Characterization of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-carrying plasmids and clones of Enterobacteriaceae causing cattle mastitis in France. **Veterinary Microbiology**, 162, 793–799.
- Demirtürk, N. ve Demirdal, T., 2004. Antibiyotiklerde direnç sorunu. Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İnfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, **Kocatepe Tıp Dergisi**, 5: 17- 21.
- Dias, M.T., Brício, S.M.L., Almeida, D.O., Oliveira, L.A.T., Filippis, I. and Marin, V.A., 2012. Molecular characterization and evaluation of antimicrobial susceptibility of enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from minas soft cheese. **Ciência e Tecnologia Alimentos, Campinas**, 32 (4), 747-753.
- Dinç, G., Ata, Z. ve Temelli, S., 2012. Sığır mastitislerinden izole edilen *Escherichia coli* suşlarında genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz aktivitesi ve antibiyotik dirençlilik profilinin incelenmesi. **Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 59, 85-88.
- Doğan, B., 2015. Coğrafi işaret korumasının gelişmekte olan ülkeler için önemi. Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, **E-Journal of New World Sciences Academy. NWSA-Social Sciences**, ISSN: 1306-3111/1308-7444.
- Droge, M., Puhler, A. and Selbitschka, W., 1998. Horizontal gene transfer as a biosafety issue: a natural phenomenon of public concern. **Journal of Biotechnology**, 64, 75-90.
- Durmaz, R., Otlu, B., Koksall, F., Hosoglu, S., Ozturk, R., Ersoy, Y. And Caliskan, A., 2009. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* **Japanese Journal of Infectious Disease**, 62 (5), 372-7.

- Elmalı, G., ve Uylaşer, V., 2012. Geleneksel gıdalardan Çeçil peynirinin üretimi ve özellikleri. **Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi**, 26 (1), 83-92.
- Erkan, M.E., Yesilmen, S., Vural, A. and Bilgetekin, H., 2014. Study for determining the presence of *Brucella* spp, *Salmonella* spp, *E. coli* O157 and some other gram negative microorganisms in fresh cow's cheeses. **International Journal of Nutrition and Food Sciences**, 3 (5), 443-447.
- Fairbrother, J.M. and Nadeau, E., 2006. *Escherichia coli*, on-farm contamination of animals. **Revue scientifique et technique International Office of Epizootics**, 25, 555–569.
- Foley, S. L., Lynne, A. M., and Nayak, R., 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infection*, **Genetics and Evolution**, 9 (4), 430-440.
- Geser, N., Stephan, R., and Hächler, H., 2012. Occurrence and characteristics of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. **BMC Veterinary Research**, 8 (1), 21.
- Guillén, L., Millán. B. and Araque, M., 2014. Caracterización molecular de cepas de *Escherichia coli* aisladas de productos lácteos artesanales elaborados en Mérida, Venezuela. **Asociación Colombiana de Infectología, Infectio**, 18 (3),100-108.
- Gundogan, N., and 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.
- Gülmez, M., ve A. Güven., 2001. Kars ilinde satışa sunulan Çeçil (Civil) peynirlerin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi**, 7, 63-70.
- Harada, K. and Asai, T., 2010. Role of antimicrobial selective pressure and secondary factors on antimicrobial resistance prevalence in *Escherichia coli* from food-producing animals in Japan. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, 1, doi:10.1155/2010/180682.
- Kamber, U., 2005. Kars'da satışa sunulan Kaşar ve Çeçil peynirlerinin bazı mikrobiyolojik ve kimyasal kalite nitelikleri. **Kafkas Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi**, 11 (1), 33-38.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P. and Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, 2, 123–140.
- Keleş, A., Aygün, O. ve Ardiç, M., 2004. Hatay yöresinde taze olarak tüketime sunulan Sürk'ün (Çökelek) bazı mikrobiyolojik ve kimyasal özellikleri. **Veteriner Bilimleri Dergisi**, 3, 59-62.
- Khoshbakht, R., Shahed, A. and Aski, H.S., 2014. Characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Science*, 3 (4), 333-336.

- Kliebe, C., Nies, B.A., Meyer, J.F., Tolxdorff-Neutzling, R.M. and Wiedemann, B., 1985. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 28, 302–307.
- Licitra, G., 2010. World wide traditional cheeses: Banned for business?. **Dairy science and Technology**, 90 (4), 357-374.
- Livermore D. M., (1995). β -lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, 8 (4), 557-84.
- Livermore, D. M., 2008. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, 14 (s1), 3-10.
- Malcata, A. M. C. M., 1996. Microbiological, chemical, biochemical and technological contributions to the characterisation and improvement of Serra da Estrela cheese. **Ph.D. dissertation, Escola Superior de Biotecnologia**, Universidade Catolica Portuguesa, Porto.
- Maquelin, K., Cookson, B., Tassios, P., and Van Belkum, A., 2007. Current trends in the epidemiological typing of clinically relevant microbes in Europe. **Journal of Microbiological Methods**, 69 (1), 222-226.
- Masatcioğlu, T. M. and Avşar, Y. K., 2005. Effect of Flavorings, Storage Conditions and Storage Time on Survival of *Staphylococcus aureus* in Sürk Cheese. **Journal of Food Protection**, 68 (7), 1487-1491.
- McGowan, J. E. and Tenover, F. C., 1997. Control of antimicrobial resistance in the health care system. **Infectious Disease Clinics of North America**, 11 (2), 297-311.
- Naesens, R., Cartuyvels, R., Waumans, L., Gyssens, I.C. and Magerman, K., 2010. Screening to select patients carrying extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae for isolation in Flemish intensive care units: a Swiss cheese strategy. **Journal of Hospital Infection**, 76, 354-372.
- Nagy, B., Szmolka, A., Smole Možina, S., Kovač, J., Strauss, A., Schlager, S., Beutlich, J., Appel, B., Lušicky, M., Aprikian, P., Pászti, J., Tóth, I., Kugler, R. and Wagner, M., 2015. Virulence and antimicrobial resistance determinants of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and of multidrug-resistant *E. coli* from foods of animal origin illegally imported to the EU by flight passengers. **International Journal of Food Microbiology**, 209, 52–59.
- Nemoy, L. L., Kotetishvili, M., Tigno, J., Keefer-Norris, A., Harris, A. D., Perencevich, E. N. and Stine, O. C., 2005. Multilocus sequence typing versus pulsed-field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, 43 (4), 1776-1781.
- Njage, P. M. K. and Buys, E. M., 2014. Pathogenic and commensal *Escherichia coli* from irrigation water show potential in transmission of extended spectrum and AmpC β -lactamases determinants to isolates from lettuce. **Microbial Biotechnology**, 8 (3), 462–473.
- Paterson, D.L., and Bonomo, R.A., 2005. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Review**, 18, 657– 686.

- Pehlivanlar Önen, S., Aslantaş, Ö., Şebnem Yılmaz, E., and Kürekci, C., 2015. Prevalence of β -Lactamase producing *Escherichia coli* from retail meat in Turkey. **Journal of Food Science**, 80 (9), M2023-M2029.
- Pires-dos-Santos, T., Bisgaard, M. and Christensen, H., 2013. Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* causing salpingitis and peritonitis in broiler breeders. **Veterinary Microbiology**, 162, 873–880.
- Ramos, S., Igrejas, G., Silva, N., Jones-Dias, D., Capelo-Martinez, J-L., Caniça, M. and Poeta, P., 2013. First report of CTX-M producing *Escherichia coli*, including the new ST2526, isolated from beef cattle and sheep in Portugal. **Food Control**, 31, 208-210.
- Rao, L., Lv, L., Zeng, Z., Chen, S., He, D., Chen, X., and Liu, Y., 2014. Increasing prevalence of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Escherichia coli* in food animals and the diversity of CTX-M genotypes during 2003–2012. **Veterinary Microbiology**, 172 (3), 534-541.
- Richmond, M.H., and Sykes, R.B., 1973. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. **Advances in Microbial Physiology**, 9, 31-88.
- Roy, C., Foz, A., Segura, C., Tirado, M., Fuster, C. and Reig, R., 1983. Plasmid-determined identified in a group of 204 ampicillin-resistant Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 12, 507-10.
- Schwarz, S., Kehrenberg, C. and Walsh, T. R., 2001. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 17, 431–437.
- Seiffert, S.N., Hilty, M., Perreten, V. And Endimiani, A., 2013. Extended- spectrum cephalosporin-resistant gram-negative organisms in live- stock: an emerging problem for human health? **Drug Resistance Update**, 16, 22–45.
- Sirot, D., 1995. Extended-spectrum plasmid-mediated β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 36 (suppl A), 19-34.
- Şihca, S., 2012. Hatay- Kırıkhan'da satışı sunulan Sürk peynirinden izole edilen laktik asit bakterilerinin tanımlanması ve gıda patojenleri üzerine inhibisyon etkisinin belirlenmesi. **Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi**.
- Tekinşen, K. K. ve Elmalı, M., 2006. Taze Civil (Çeçil) peynirin bazı mikrobiyolojik özellikleri. **Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi**, 1 (3-4) 78-81.
- Tortora, G. J., Funke, B. R., Case, C. L., 2001. Microbiology an Introduction. **Addison Wesley Longman Inc., Sydney**.
- Trkov, M., Rupel, T., Žgur-Bertok, D., Trontelj, S., Avguštin, G., and Ambrožič Avguštin, J., 2014. Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Food Sources. **Food Technology and Biotechnology**, 52 (2), 255-262.
- TÜİK, 2013. Süt ve Süt Ürünleri Üretim İstatistikleri, <http://www.tuik.gov.tr/PreHaberBultenleri.do?id=15935> . Erişim tarihi: 14.02.2014
- Valat, C., Auvray, F., Forest, K., Métayer, V., Gay, E., de Garam, C. P. and Haenni, M., 2012. Phylogenetic grouping and virulence potential of Extended-Spectrum β -

- Lactamase-producing *Escherichia coli* in cattle. **Applied and Environmental Microbiology**, AEM-00351.
- Vrabec, M., Lovayová, V., Dudriková, K., Gallo, J., and Dudriková, E., 2015. Antibiotic resistance and prevalence of Enterococcus spp. and *Escherichia coli* isolated from bryndza cheese. **Italian Journal of Animal Science**, 14 (4).
- Wang, G., Clark, C. G. and Rodgers, F. G., 2002. Detection in *Escherichia coli* of the genes encoding the major virulence factors, the genes defining the O157:H7 serotype, and components of the Type 2 shiga toxin family by multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, 40 (10), 3613–3619.
- Woodford, N., Ward, M. E., Kaufmann, M. E., Turton, J., Fagan, E. J., James, D., and Pearson, A. (2004). Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum β -lactamases in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 54(4), 735-743.
- Yetişmeyen, A., 1995. Süt teknolojisi. **Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Yayınları**, 1420/410.
- Yumuk, Z., Afacan, G., Nicolas-Chanoine, M-H., Sotto, A. and Lavigne, J-P., 2008. Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 62, 284-288.
- Zheng, H., Zeng, Z., Chen, S., Liu, Y., Yao, Q., Deng, Y., and Liu, J. H., 2012. Prevalence and characterisation of CTX-M β -lactamases amongst *Escherichia coli* isolates from healthy food animals in China. **International Journal of Antimicrobial agents**, 39 (4), 305-310.

ÖZGEÇMİŞ

1986 yılında İzmir Karşıyaka ilçesinde doğdum. İlk, orta ve lise eğitimimi Ankara'da tamamladıktan sonra 2004 yılında İstanbul Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünü kazandım ve 2009 yılında mezun oldum. 2011 yılında M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimime başladım. 2014 yılında Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında Yüksek Lisans öğrenimimi tamamladım. 2013 yılında M.K.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Gıda Mühendisliği Anabilim Dalında 2. Yüksek Lisansımı kazandım.

