

**T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**



**ÇİĞ VE YARI-PIŞMIŞ BAZI ET ÜRÜNLERİNDE *SALMONELLA*
SPP. VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN BELİRLENMESİ VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BERKAY BOZKURT

BALIKESİR, HAZİRAN - 2018

T.C.
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI



**ÇİĞ VE YARI-PIŞMIŞ BAZI ET ÜRÜNLERİNDE *SALMONELLA*
SPP. VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN BELİRLENMESİ VE
ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

YÜKSEK LISANS TEZİ

BERKAY BOZKURT

Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN (Tez Danışmanı)

Doç. Dr. Reyhan İRKİN (Eş Danışmanı)

Prof. Dr. Tülin AŞKUN

Prof. Dr. Olga SAK

Doç. Dr. Efe SEZGİN

BALIKESİR, HAZİRAN - 2018

KABUL VE ONAY SAYFASI

BERKAY BOZKURT tarafından hazırlanan “**ÇİĞ VE YARI-PİŞMİŞ BAZI ET ÜRÜNLERİNDE *SALMONELLA SPP.* VE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*'UN BELİRLENMESİ VE ANTİBİYOTİK DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI**” adlı tez çalışmasının savunma sınavı 27.06.2018 tarihinde yapılmış olup aşağıda verilen jüri tarafından oy birliği / oy çokluğu ile Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Biyoloji Eğitimi Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

İmza

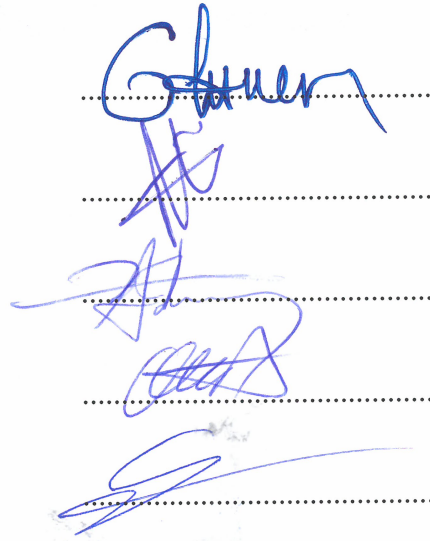
Danışman
Prof. Dr. Güldam TÜMEN

Eş Danışman
Doç. Dr. Reyhan İRKİN

Üye
Prof. Dr. Tülin AŞKUN

Üye
Prof. Dr. Olga SAK

Üye
Doç. Dr. Efe SEZGİN



Jüri üyeleri tarafından kabul edilmiş olan bu tez Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca onanmıştır.

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Prof. Dr. Necati ÖZDEMİR

.....

Bu tez çalışması Balıkesir Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 2016/05 nolu proje ile desteklenmiştir.

ÖZET

**ÇİĞ VE YARI-PİŞMİŞ BAZI ET ÜRÜNLERİNDE *SALMONELLA SPP.* VE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS'UN BELİRLENMESİ VE ANTİBİYOTİK
DİRENÇLİLİKLERİNİN ARAŞTIRILMASI
YÜKSEK LİSANS TEZİ
BERKAY BOZKURT
BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. GÜLENDAM TÜMEN)
(EŞ DANIŞMAN: DOÇ. DR. REYHAN İRKİN)
BALIKESİR, HAZİRAN - 2018**

Bu çalışmada İzmir ve Balıkesir piyasasında 24 marketten toplanan çiğ, yarı pişmiş ve yemeye hazır ürün olarak satışı sunulan; tavuk döner, et döner, tavuk etleri, dana ve kuzu etleri olmak üzere 60 adet numune, *Salmonella spp.* ve *Staphylococcus aureus* varlığı yönünden incelenmiş, identifiye edilen *Salmonella spp.* ve *S. aureus* serotiplerinin disk difüzyon yöntemi ile bazı antibiyotiklere dirençleri belirlenmiştir.

Toplanan 60 adet numuneden *Salmonella spp.* ve *S. aureus* spesifik primerler kullanılarak Real-Time PCR yöntemi ile mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. Patojen mikroorganizma saptanan numunelerin; Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD), Bismuth Sulphide Agar (BSA) ve Egg-Yolk Tellurite emülsiyonu içeren Baird-Parker Agar seçici ortamlarına ekimi yapılmıştır. Oluşan tipik kolonilerin, Plate Count Agar (PCA) içeren petrilere ekiminin ardından farklı antibiyotiklere ait test diskleri de petrideki agar üzerine yerleştirilerek inkübe edilmiştir. Yapılan işlem sonucunda Kloramfenikol, Penisillin G, Basitrasin, Oksitetrasiklin, Sulfametoksazol, Neomisin, Novobiosin, Tetrasiklin, Eritromisin, Ampisilin olmak üzere toplam 10 adet antibiyotiğe karşı duyarlılıkları belirlenmiştir.

Sonuç olarak, toplamda 60 adet çiğ ve yarı-pişmiş et ürünlerinin tümünde enterotoksin oluşturmayacak seviyede *S. aureus*; 6 tanesinde ise *Salmonella spp.* tespit edilmiştir. Yapılan antibiyotik disk difüzyon yöntemi sonucunda *S. aureus*' un Penisillin G, Oksitetrasiklin, Sulfametoksazol, Tetrasiklin, Eritromisin, Ampisilin antibiyotik türlerine; *Salmonella spp.* türlerinin ise Penisillin G, Sulfametoksazol, Eritromisin, Ampisilin antibiyotik türlerine dirençli olduğu saptanmıştır. Toplum tarafından çokça tüketilen bu ürünlerin, *S. aureus* ($\geq 5 \times 10^3$ kob/g) ve *Salmonella spp.* ile kontamine olmasının, gıda zehirlenmeleri bakımından risk faktörü niteliğinde olabileceği belirlenmiştir.

ANAHTAR KELİMELELER: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, Real-Time PCR, Antibiyotik duyarlılığı, çiğ et ürünleri, yarı pişmiş et ürünleri.

ABSTRACT

DETERMINATION OF *SALMONELLA SPP.* AND *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN SOME RAW, READY-TO EAT PRODUCTS AND A RESEARCH ABOUT ANTIBIOTIC RESISTANCES OF THEM
MSC THESIS
BERKAY BOZKURT
BALIKESIR UNIVERSITY INSTITUTE OF SCIENCE
BIOLOGY

(SUPERVISOR: PROF. DR. GULENDAM TUMEN)
(CO-SUPERVISOR: ASSOC. PROF. DR. REYHAN IRKIN)
BALIKESİR, JUNE 2018

In the study 60 samples of raw, semi-cooked and ready to eat chicken doner, meat doner, chicken, beef, and lamb products from 24 markets from Izmir and Balikesir markets are examined for the presence of *Salmonella spp.* and *Staphylococcus aureus*. Antibiotic resistance of the identified *Salmonella spp.* and *S. aureus* serotypes is tested by the disc diffusion method.

The presence of microorganisms in the 60 samples was determined by Real-Time PCR method using *Salmonella spp.* and *S. aureus* specific primers. The samples with the pathogen microorganisms were plated on the selective medium such as Xylose Lysine Desoxycholate (XLD), Bismuth Sulphide Agar (BSA), and Baird-Parker Agar, which contains Egg-Yolk Tellurite emulsion. The colonies were cultivated on Plate Count Agar (PCA), followed by an incubation with different antibiotic discs that were placed on the agar plates. The result of this experiment showed a total of 10 different antibiotic resistance against Chloramphenicol, Penicillin G, Bacitracin, Oxytetracycline, Sulfamethoxazole, Neomycin, Novobiocin, Tetracycline, Erythromycin and Ampicillin.

In conclusion, *S. aureus* was detected in all of the 60 raw and semi-cooked meat samples, however, in levels that will not cause enterotoxic effect. *Salmonella spp.* was detected only 6 of the tested meat samples. The antibiotic disc diffusion method showed that *S. aureus* was resistant to Penicillin G, Oxytetracycline, Sulfamethoxazole, Tetracycline, Erythromycin, and Ampicillin, whereas *Salmonella spp.* was resistant to Penicillin G, Sulfamethoxazole, Erythromycin, and Ampicillin. As these products are consumed frequently, their contamination with *S. aureus* ($\geq 5 \times 10^3$ kob/g) and *Salmonella spp.* can be a risk factor for food poisoning.

KEYWORDS: *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, Real-Time PCR, Antibiotic sensitivity, raw meat products, semi-cooked meat products.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİL LİSTESİ	v
TABLO LİSTESİ	vi
SEMBOL LİSTESİ	vii
ÖNSÖZ	viii
1. GİRİŞ	1
1.1 <i>Salmonella</i>	5
1.1.1 Tarihçe	5
1.1.2 Etiyoloji	6
1.1.3 Patogenez	6
1.1.4 Antibiyotik Dirençliliği.....	7
1.2 <i>Staphylococcus aureus</i>	8
1.2.1 Tarihçe	8
1.2.2 Etiyoloji	8
1.2.3 Patogenez	9
1.2.4 Antibiyotik Dirençliliği	10
1.3 Antibiyotikler.....	11
1.3.1 Antibiyotiklerin Tanımı	11
1.3.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması.....	12
1.3.2.1 Antimikrobiyal Etkiye Göre Sınıflandırma.....	12
1.3.3 Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırma	13
1.3.3.1 Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler	13
1.3.3.2 Hücre Membran Yapısını Bozanlar.....	13
1.3.3.3 Protein Sentezini İnhibe Edenler.....	14
1.3.3.4 Nükleik Asit Sentezini Bozanlar	14
1.3.3.5 Mikrobiyal Metabolik Yolakları Bozanlar	15
1.3.4 Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma	15
1.3.4.1 Beta-Laktamlar	15
1.3.4.2 Makrolidler.....	17
1.3.4.3 Aminoglikozidler	18
1.3.4.4 Tetrasiklinler	19
1.3.4.5 Glikopeptitler	20
1.3.4.6 Kinolonlar.....	20
1.3.4.7 Sülfonamidler.....	21
1.3.4.8 Amfenikoller	22
1.3.4.9 Aminocoumarin.....	22
1.3.4.10 Polipeptitler	23
1.4 Moleküler Teknikler	24
1.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR).....	25
1.4.2 Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, qPCR). 27	
1.4.2.1 Patojen Deteksiyonunda Real-Time PCR Analizi.....	29
2. MATERYAL VE METOD	31
2.1 Materyal.....	31

2.2 Metot.....	31
2.2.1 DNA İzolasyonu	31
2.2.2 Real-Time PCR Analizi	33
2.2.2.1 Standart Seri Oluşturulması	33
2.2.2.2 Primer-Prob Dizaynı ve Optimizasyonu	35
2.2.2.3 Primer Ara Stok Hazırlama	35
2.2.2.4 Analiz	35
2.2.2.5 Elde Edilen Dataların Analizi	37
2.2.3 <i>Salmonella spp.</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Kültüre Edilmesi.....	38
2.2.3.1 <i>Salmonella spp.</i> Analizi.....	38
2.2.3.2 <i>Staphylococcus aureus</i> Analizi	39
2.2.4 Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi	39
2.2.5 İstatiksel Analizler	42
3. BULGULAR	43
3.1 Real-Time PCR Bulguları	43
3.2 <i>Salmonella spp.</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i> 'un Kültür Sonuçları	45
3.3 Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları	45
4. TARTIŞMA	51
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	57
6. KAYNAKLAR.....	59

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1: Benzilpenisilin 'in kimyasal yapısı [81].	16
Şekil 1.2: Ampisilin' in kimyasal yapısı [83].	16
Şekil 1.3: Eritromisin 'in kimyasal yapısı [81].	17
Şekil 1.4: Neomisin' in kimyasal yapısı [92].	18
Şekil 1.5: Tetrasiklin' in kimyasal yapısı [97].	19
Şekil 1.6: Oksitetrasiklin' in kimyasal yapısı [100].	20
Şekil 1.7: Sulfametoksazol'ün kimyasal yapısı [107].	21
Şekil 1.8: Kloramfenikol'ün kimyasal yapısı [111].	22
Şekil 1.9: Novobiosin'in kimyasal yapısı [112].	23
Şekil 1.10: Basitrasin a kimyasal yapısı [115].	24
Şekil 1.11: Polimeraz zincir reaksiyonu analiz basamakları ([122] numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.).	26
Şekil 1.12: Taqman prob mekanizması ([132] numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.).	28
Şekil 2.1: Nanodrop cihazı ile dna konsantrasyonların ölçümü.	32
Şekil 2.2: Standart amplifikasyon eğrisi ve ct değerleri.	34
Şekil 2.3: Plate' lerin real-time pcr cihazına yerleştirilmesi.	37
Şekil 2.4: Petrilerin antibiyotik duyarlılık testi için hazırlanması.	40
Şekil 2.5: Antibiyotik disk uygulanan petrilerin etüv içindeki yerleşimi.	41
Şekil 2.6: Antibiyotik disklerin (Kloramfenikol, Penisillin G, Basitrasin, Oksitetrasiklin, Sulfametoksazol) petri üzerindeki konumları.	41
Şekil 2.7: Antibiyotik disklerin (Neomisin, Novobiosin, Tetrasiklin, Eritromisin, Ampisilin) petri üzerindeki konumları.	42
Şekil 3.1: <i>Staphylococcus aureus</i> 'un antibiyotiklere dirençlilik oranları (%).	50
Şekil 3.2: <i>Salmonella spp.</i> ' nin antibiyotiklere dirençlilik oranları (%).	50

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa</u>
Tablo 2.1: Real-time pcr'da kullanılan primer ve prob dizileri.	34
Tablo 2.2: Real-time pcr karışımı.	36
Tablo 2.3: LightCycler® 480 II cihaz protokolü.	36
Tablo 3.1: Mikroorganizmaların incelenen örneklerdeki oransal dağılımı.....	44
Tablo 3.2: Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık sonuçları.....	49

SEMBOL LİSTESİ

DNA	:	Deoksiribonükleik asit
RNA	:	Ribonükleik asit
<i>Salmonella spp.</i>	:	<i>Salmonella</i> türleri
<i>S. aureus</i>	:	<i>Staphylococcus aureus</i>
USDA	:	Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı
PZR	:	Polimeraz zincir reaksiyonu
qPCR	:	Real-Time PCR
a_w	:	Gıdalardaki su aktivitesi birimi
MRSA	:	Metisilin dirençli <i>Staphylococcus aureus</i>
PBPs	:	Penisilin bağlanma proteinleri
ng	:	Nanogram
T_m	:	Erime sıcaklığı
dNTP	:	Dinükleotit trifosfat
SNP	:	Tek nükleotid mutasyonu
mRNA	:	Mesajcı RNA
tRNA	:	Taşıyıcı RNA
PCA	:	Plate Count Agar
BPW	:	Buffered Peptone Water
RVS	:	Rappaport Vassiliadis Medium
MKTTn	:	Kauffman Tetrathionate Novobiocin Broth
XLD	:	Xylose Lysine Deoxycholate Agar
BSA	:	Bismuth Sulphite Agar
HEK	:	Hektoen Enterik Agar
H₂S	:	Hidrojen Sülfür
Kg	:	Kilogram
ABD	:	Amerika Birleşik Devletleri
WHO	:	Dünya Sağlık Örgütü
FAO	:	Gıda ve Tarım Örgütü

ÖNSÖZ

Öncelikle yüksek lisans hayatımın ve yüksek lisans tezimin her aşamasında katkılarını ve desteğini esirgemeyen, bana en iyi şekilde rehberlik eden değerli ve saygıdeğer hocam Doç. Dr. Reyhan İRKİN' e sayısız teşekkürü borç bilirim.

Yüksek lisans eğitimim boyunca her türlü konuda bana yardımcı olan sevgili hocam Prof. Dr. Gülendamar TÜMEN' e ve bilgi birikimini, desteğini benden esirgemeyen sayın hocam Doç. Dr. Efe SEZGİN' e teşekkürlerimi sunarım.

Tez yazım aşamasında benden yardımlarını esirgemeyen, her zaman yanımda olan Gamze TERLEMEZ' e ve hayatımın her aşamasında benden maddi manevi desteklerini sakınmayan anneme, babama, kız kardeşime sonsuz teşekkür ederim.

1. GİRİŞ

Yeterli miktarda ve dengeli beslenme, sağlıklı bir yaşam sürmemiz ve hastalıklardan korunmamız için oldukça önemlidir. Tüketilen gıdaların sağlık açısından güvenilir olması, doku gelişimi ve yenilenmesi, vücudumuzun verimli bir şekilde çalışması için gerekli temel bir unsurdur. Vücudumuz için gerekli besin değerlerinin büyük bir çoğunluğu et ürünlerinden sağlanmaktadır. Et ürünleri, yapısında buldukları yüksek orandaki protein içeriği, demir, çinko, B12 gibi birçok vitamin ve mineral ile beslenme açısından oldukça önemlidir. 2015 yılı verilerine göre Türkiye’de kişi başına düşen sığır eti tüketimi 13,0 kg, kanatlı eti tüketimi 23,0 kg ve koyun eti tüketimi 7,0 kg olarak belirtilmektedir [1,2].

Et ve et ürünlerinin, birçok tüketici tarafından güvenli bir şekilde tüketilmesi önemli bir ölçüttür. Ancak hammaddelerin üretici firmaya girişinden ürün eldesi basamağına kadar olan süreçte çeşitli nedenlerle gıda kontaminasyonu gerçekleşebilmektedir. Bu durumun önüne geçilebilmesi için hammaddenin fabrikaya taşınması, mal kabul, personel hijyeni, fabrika ekipmanları temizliği, üretim şartları ve depolama işlemleri dahil birçok basamağın iyileştirilmesi gerekmektedir [3].

Mikroorganizma kaynaklı gıda kontaminasyonlarında temizliğe yeteri kadar önem verilmeyip çoğu hijyen basamağı göz ardı edilmektedir. Hayvanların fabrikaya transferi aşamasında dezenfeksiyonu iyi yapılmış temiz araçlar kullanılmalı ve araç taşıma kapasitesi göz önünde bulundurulmalıdır. Üretim aşamasında ise personel ve ekipman temizliği temel basamağı oluşturmaktadır. Gerekli personel muayeneleri düzenli olarak yapılmalı; üretimde ise eldiven kullanımına ve ellerin temizliğine dikkat edilmelidir. Et ürünlerinin hazırlığında, gıda ile temas edebilecek tüm alet ve ekipmanların dezenfekte edilmesi ve yüzey temizliğinin etkin bir şekilde yapılması gerekmektedir. Ayrıca çiğ, yarı-pişmiş ve pişmiş et ürünlerinin ayrı dolaplarda depolanmasına dikkat edilerek olası kontaminasyona fırsat verilmemelidir [3].

Gıdalardaki mikrobiyal aktiviteyi inaktive edici birçok yöntem bulunmaktadır. Sıkça tercih edilen ısı işlem uygulamalarının, gıdalarda gerek kimyasal gerekse fiziksel değişimlere yol açabileceği belirtilmekte olup bakteriyosin kullanımı ve ışınlama gibi farklı uygulamalar ile doğal haline en yakın, mikroorganizma varlığı açısından daha güvenli gıdaların üretilebileceği düşünülmektedir [4].

Ticari olarak temin edilebilen birçok koruyucu, kimyasal sentez ile üretildiğinden bu tür ürünlerin uzun süreli tüketimi, insan sağlığını olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bakteriyosinler, kimyasal koruyucuların aksine, et ve et ürünleri dahil olmak üzere birçok gıda ürününde kullanılan doğal gıda koruyucularıdır. Gram-pozitif veya gram-negatif bakteriler tarafından üretilen bakteriyosinler, protein ve peptit yapılı olup proteazlara karşı duyarlı olduklarından gastrointestinal sistemde sindirilerek insan sağlığı üzerinde olumsuz etki göstermemektedirler. Nisin ve pediosin gibi sıkça kullanılan bakteriyosinler, starter kültür şeklinde veya gıda yüzeyine uygulanarak gıda güvenliğinin sağlanmasına katkıda bulunurlar. Bakteriyosinler, genellikle kendilerine yakın türlere karşı etkinlik göstermeleri ve proteolitik enzimler tarafından inaktive olmaları gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, laboratuvar ortamında elde edilen bakteriyosin etkinliği, çeşitli faktörlerden dolayı gıda ortamında farklılık gösterdiğinden et ve et ürünleri üretim sürecinde tek başına kullanılmalarının yeterli olmadığı belirtilmektedir [5,6,7].

Işınlama, gıdalardaki patojen mikroorganizmaları yok etmek amacıyla gama ışınları veya X ışınları gibi iyonlaştırıcı radyasyonların kontrollü bir şekilde uygulanması işlemidir. Uygulamanın temel amacı, mikroorganizmaların DNA'larına zarar vererek onları gıda ortamında inaktive etmek olup, uygulanan ışınlama işlemi, gıdaların radyoaktif özellikte olmasını engelleyecek seviyede yapılmaktadır. Bu işlem, et ve et ürünlerinin de içinde bulunduğu birçok gıda maddesinde gıda güvenliğini artırarak bozulma ile oluşan kayıpların önüne geçilmesine, raf ömrünün artmasına, aynı zamanda tüketici sağlığını olumsuz etkileyecek önemli sağlık problemlerinin önüne geçilmesine olanak sağlamaktadır.

Işınlama, yüksek enerji ihtiyacı gerektirmeyen, kalıntıya yol açmayan ve yapılan uygulamanın ardından bekleme gerektirmediğinden avantajlı bir yöntem olsa da, yüksek maliyet ve toksin yok etmede yetersiz kalması gibi dezavantajlara sahiptir. Toplum tarafından önyargılı yaklaşımlar mevcut olsa da, uygun dozlarda yapılan ışınlama yönteminin zararının olmadığı WHO ve FAO tarafından belirtilmektedir [8,9].

Patojen mikroorganizmalarla veya bu mikroorganizmaların ürettiği toksin maddelerle enfekte olmuş gıdaların tüketimiyle meydana gelen hastalıklar gıda zehirlenmesi olarak tanımlanmaktadır. Bakteriler kendileri için gerekli uygun sıcaklık ve beslenme koşullarını bulduklarında fazla miktarda üreyebilmektedir. Gıda maddelerinin hazırlanması ve saklanması gerekliliği şartların yerine getirilmemesi, bakterilerin üremesi için gereken ortamın oluşmasına olanak sağlamaktadır [10].

Gıda kaynaklı enfeksiyonların birçoğunda gerek tavuk eti ve kırmızı et ürünleri gerekse yarı-pişmiş et ürünleri önemli yer tutmaktadır. Toplum tarafından sıkça tüketilen bu ürün grupları, fiziksel ve kimyasal özellikleri sebebiyle patojen ve bozulma etmeni birçok mikroorganizmanın gelişmesi için uygun bir ortama sahiptir. Bu mikroorganizmalardan en yaygın olarak tanımlanan türlerin ikisi ise; *Salmonella spp.* ve *S. aureus* 'tur [1,10].

Salmonella, gıda enfeksiyonlarına neden olan temel patojenlerden biridir ve sebep olduğu hastalıklar salmonellozis olarak bilinmektedir. *Salmonella* kaynaklı hastalıkların birçoğu çapraz bulaşma olarak adlandırılan insan, çevresel faktörler ve gıdalar arasında mikroorganizmaların kontamine olan bir yüzeyden kontamine olmamış bir yüzeye geçişiyle meydana gelmektedir [11].

Gıda enfeksiyonlarında sıkça karşımıza çıkan bir diğer patojen mikroorganizma ise *S. aureus* 'tur. Enterotoksin üretimiyle gıda zehirlenmelerine sebep olan stafilokoklar, gerek ülkemizde gerekse dünya genelinde insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Gıda zehirlenmesi sonucunda oluşabilecek belirtiler, tüketilen gıdanın miktarına, tüketicinin bağışıklık durumuna göre değişkenlik göstermektedir [12,13].

Dünya çapında ciddi oranda sağlık problemlerine yol açan *Salmonella* ve *S. aureus* mikroorganizmalarıyla ilgili 1963-1977 yılları arasında ABD’de 651 adet salmonellozis vakası tespit edilmiş olup bunların %21 oranda tavuk, %15 oranda kırmızı et kaynaklı olduğu belirtilmektedir. *Salmonella*’nın 1992-1997 yılları arasında İsveç’te gıda kaynaklı hastalıklara yol açan mikroorganizmalarda ikinci sırada olduğu belirtilmektedir. ABD’de her yıl meydana gelen 24-81 milyon gıda kaynaklı hastalık sonucunda tedavi masrafları ve ürünlerde meydana gelen kayıplar dahil olmak üzere yaklaşık 5-12 milyar dolar harcama söz konusu olduğu belirtilmektedir. *S. aureus* kaynaklı gıda zehirlenmelerinin Japonya’da %25-30, Macaristan’da %40, ABD’de ise %45 oranında gözlemlendiği belirtilmektedir [14,15,16].

Salmonella spp. ve *S. aureus* mikroorganizmalarının standart laboratuvar yöntemleriyle teşhisi, bu organizmaların seçici bir besiyerinde kültüre edilmesine dayanmaktadır. Kültür işleminin ardından gözlemlenen şüpheli kolonilerin hem kimyasal hem de serolojik olarak tanımlanması gerekmektedir. Tüm bu işlemler hem zahmetli hem de zaman alıcı bir süreci oluşturmaktadır [17]. Kalitatif PZR tabanlı teknikler, analiz sonrasında elektroforez gibi bir doğrulama basamağını içermekle birlikte yalnızca patojen mikroorganizmanın varlığına veya yokluğuna dayalı bir sonuç vermektedir [18].

Uzun zaman alan geleneksel yöntemlerin yanı sıra son yıllarda bu süreci oldukça kısaltan Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu) analizi kullanılmaktadır. Real-Time PCR analizi, mikroorganizmaların spesifik olarak saptanmasında hızlı sonuç avantajıyla birlikte, hedeflenen mikroorganizma hakkında hem kalitatif hem kantitatif veriler sağlanmasından dolayı güvenilir bir yöntem olarak kullanılmaktadır.

Günümüzde farklı hayvan hastalıkları nedeniyle veya yem katkısı olarak kullanılan bilinçsiz antibiyotik kullanımının yaygınlaşmasıyla, et ürünleri yoluyla bulaşan patojen mikroorganizmaların antibiyotiklere direnç kazandığı görülmektedir. Çoklu antimikrobiyal dirençli organizmaların ortaya çıkması büyüyen bir problemdir ve büyük bir halk sağlığı tehdidi olarak kabul edilmektedir [19].

Antibiyotiklerin istenmeyen etkileri olarak, bakterilerde direnç oluşmasının yanı sıra hayvan kökenli gıdalarda kalıntı olarak bulunmalarının ve bunların insanlar tarafından tüketilmelerinin doğrudan zehirlenmelere, alerjilere, insan bağırsak florası düzeninin bozulmasına yol açabileceği belirtilmektedir [20, 21].

Bu çalışmada İzmir ve Balıkesir illerinde farklı marketlerden toplanan tavuk ve kırmızı çiğ et ürünleri ile yarı-pişmiş et ürünlerinde Real-Time PCR yöntemi ile *Salmonella spp.* ve *S. aureus* mikroorganizma varlığı analiz edilerek; istenmeyen düzeyde patojen mikroorganizma saptanan örneklerde ise disk difüzyon yöntemiyle mikroorganizmaların çeşitli antibiyotiklere karşı duyarlılıkları belirlenecektir. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda gıda zehirlenmeleri gibi patojen mikroorganizma kaynaklı hastalıkların tedavisinde doğru antibiyotiklerin seçilmesi amaçlanmıştır.

1.1 *Salmonella*

1.1.1 Tarihçe

Salmonella, 1880 yılında Ebert ve Koch isimli bakteriyologlar tarafından bulunmuş olup, 1884 de Gaffky tarafından kültüre edilmiştir. 1900'lü yıllarda Amerika Birleşik Devletleri Tarım Bakanlığı (USDA) mikroorganizma araştırma programını yürüten patolog Dr. Daniel Elmer Salmon'un anısına mikroorganizmaya *Salmonella* adı verilmiştir [22,23].

1888 yılında Alman bakteriyolog August Gärtner, sığır eti tüketmiş bir insandan izole ettiği *Salmonella enteritidis* sayesinde *Salmonella* bakterisinin laboratuvar ortamında doğrulamasını sağlamıştır [24].

Philip Bruce White, *Salmonella* antijenik yapısı üzerinde yaptığı detaylı araştırmalarından sonra 1926 yılında ilk antijenik şemayı yayınlamıştır. 1941 yılında ise Kauffmann, White' ın yapmış olduğu çalışmaları geliştirerek *Salmonella*' yı sahip olduğu yüzey antijenlerine göre serotiplere ayıran Kauffmann-White şemasını yayınlamıştır [25,26]. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology kitabında da yer aldığı gibi *Salmonella* günümüzde *Salmonella enterica* and *Salmonella bongori* olmak üzere 2 türe ayrılmaktadır ve birçok serovar içermektedir [17, 27, 28, 29].

1.1.2 Etiyoloji

Salmonella, *Enterobacteriaceae* ailesinde yer alan gram-negatif bir bakteridir. Fakültatif anaerob özellikte olup, spor oluşturmeyen, hareketli ve yaklaşık 0,7-1,5 x 2-5 µm boyutlarında kapsülsüz basildir. Mezofilik özellik gösteren *Salmonella*, 2–47°C aralığında üreyip gelişebilse de optimum üreme sıcaklığı 37°C'dir. Mikroorganizmaların gelişebilmesi için gereken kullanılabilir su miktarı, su aktivitesi (a_w) olarak tanımlanmaktadır. *Salmonella*, yüksek sıcaklık işlemlerine duyarlı olup, su aktivitesi 0,94-0,99 a_w değer aralığındaki gıdalarda gelişim göstermektedir. Optimal gelişim gösterdiği pH 6,5-7,5 aralığıdır. Genel olarak katalaz, indol, laktoz ve üreaz negatif; nitrat, H₂S, sitrat, oksidaz ve lizin dekarboksilaz pozitifdir. İnsanlardan izole edilen serotiplerin büyük bir çoğunluğu ise *S. enterica* türünde yer almaktadır. Laboratuvar ortamında genellikle MacConkey agar, Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD) veya Hektoen Enterik Agar (HEK) gibi seçici ve ayırt edici besiyerleri ile izole edilmektedir [22,30,31,32].

Hücre duvarı yapısında 3 tip antijen bulundurmaktadır: fagositik etkiye engel olan somatik antijen (O), mikroorganizma tahribatına yol açan kompleman adlı maddenin bakteriye bağlanıp ölmesine engel olan kapsüler antijen (Vi) ve hareket özelliği sağlayan flagellar antijen (H). Bu antijenler *Salmonella*'nın yayılmasını sağlayan virülens faktörlerdir [33].

1.1.3 Patogenez

Salmonella, en yaygın gıda orjinli patojen mikroorganizmalardan biri olup, birçok ülkede gıda kaynaklı salgınlara ve enfeksiyonlara neden olmaktadır. Her yıl dünyanın birçok yerinde görülen yaklaşık 94 milyon *Salmonella* kaynaklı hastalık vakasının 155,000'inin ölümle sonuçlandığı bildirilmekte olup; bu hastalık vakalarının % 85'inin ise gıda kaynaklı olduğu bilinmektedir [34].

Gıda kaynaklı gelişen *Salmonella* enfeksiyonu, tifo ateşi dahil olmak üzere insanlarda çeşitli hastalıklara yol açıp bağışıklık sistemi baskılanmış olan kişilerde ise daha ciddi bir sonuca sebep olmaktadır. Çocuklar, hamileler ve yaşlı insanlar immün sistemleri bakımından daha hassas olduklarından bu tür enfeksiyonlarda etkilenme oranları daha yüksek olmaktadır [10].

Salmonella 'nın gıda maddelerinde düşük miktarda bile bulunması, tüketici için risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu sebeple gıda maddelerinde bulunmasına izin verilmemektedir. *Salmonella* direkt temasla bulaşabileceği gibi kontamine olmuş gıdaların tüketimiyle de insanlara bulaşabilmektedir. Gıda maddelerinin üretim ve işleme teknolojisi, depolama koşulları ve dağıtım esnasında meydana gelebilecek kontaminasyonlar veya soğuk zincirdeki bozulmalar, *Salmonella* riskinin artmasına neden olabilmektedir [35,36,37,38].

1.1.4 Antibiyotik Dirençliliği

Antibiyotiğe dirençli bakterilerle enfekte olmuş gıdalar, halk sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturabilmektedir. Özellikle hayvansal üretim sistemlerinde antibiyotik kullanımı üzerinde sıkı kontrollerin olmaması, tedavi ve büyütme amaçlı olarak yemlere yapılan ilaç takviyeleri bir dizi direnç genini barındıran gıda kaynaklı mikroorganizmaların oranını artırmaktadır. Dirençli mikroorganizmalar, et ve süt gibi hayvansal gıdalarla taşınarak bu ürünleri tüketen insanların sağlığını olumsuz yönde etkilemektedir. Ayrıca direnç mekanizmaları, diğer patojenik bakterilere transdüksiyon, konjugasyon veya transformasyon yolları ile aktarılabileceğinden enfeksiyon tedavileri istenildiği şekilde sonuçlanamayabilmektedir [22,39].

Uzun süreli antibiyotik kullanan insanlarda, bir sonraki tedavi sürecinde ilacın etki mekanizması öncekine göre daha düşük olmaktadır. Zamanla herhangi bir antibiyotiğe karşı direnç kazanmış olan mikroorganizmalar, o antibiyotik ailesine yakın kimyasal özellikteki veya benzer etki mekanizması gösteren diğer antibiyotiklere karşı da dirençli duruma gelebilmektedir. Bu durum çapraz direnç olarak adlandırılmaktadır. Çapraz direnç nedeniyle oldukça önemli birçok antibiyotik grubu etkisiz hale gelebilmektedir [40].

Çoklu antibiyotik direnci gösteren *Salmonella* türleri, birçok ülkede yaygın olarak bulunmaktadır. Özellikle *S. typhimurium* DT104' ün ampisilin, kloramfenikol, streptomisin, sülfonamidler ve tetrasiklin gibi antibiyotiklere karşı çoklu direnç mekanizmasına sahip olduğu belirtilmiştir [17,22].

1.2 *Staphylococcus aureus*

1.2.1 Tarihçe

S. aureus, İskoç cerrah Alexander Ogston tarafından 1880 yılında keşfedilmiştir. Sonraki yıllarda Friedrich Julius Rosenbach tarafından bu isimle adlandırılmıştır [41].

1884 yılında Alman bilim adamı Anton Rosenbach saf kültür ortamında *S. aureus* ve *Staphylococcus albus* türlerini izole etmiştir [42].

1.2.2 Etiyoloji

S. aureus, *Staphylococcaceae* ailesine ait gram-pozitif bir bakteridir. Mikroskop altında üzüm salkımı şeklinde görülmektedir. Spor yapısı oluşturmayıp hareketsiz bir şekilde yaşayan bu bakteri fakültatif anaerob olarak gelişim göstermektedir. 7-45 °C aralığında gelişim gösterse de optimum büyüme sıcaklığı 37°C' dir. 10-48 °C sıcaklık aralığında toksin oluşturabilmektedirler. Optimal gelişim gösterdiği pH aralığı 4,2-9,3 olup, %25'e kadar yüksek tuz konsantrasyonlarında büyüebilmektedirler. Stafilokoklar, diğer gıda ile ilişkili patojenlerden çok daha geniş bir su aktivitesi (a_w) aralığında yetişebilmektedir. Minimum 0,83–0,86 a_w aralığında büyüebilse de $a_w > 0,99$ optimum su aktivitesidir [43,44,45,46].

S. aureus, birçok potansiyel virülens faktöre sahiptir, bunlar; çeşitli yüzey proteinleri, fagositozu inhibe edici faktörler ve dokulara zarar verip hastalık belirtilerine neden olan toksinlerdir. *S. aureus* katalaz pozitif bir bakteridir. Katalaz enzimi sayesinde bakterinin, toksik oksijen radikalleri içeren fagositler tarafından öldürülmesi engellenmiş olur. Tanıları için kolonilerle yapılan bazı testler gerekmektedir. Bunlardan rutin olarak kullanılanları kümelenme faktörü, koagülaz, hemolisin termostabil deoksiribonükleaz testleridir. Sahip oldukları lesitinaz aktivitesi sayesinde yumurta sarısı ilavesi yapılan besiyerlerinde lesitini hidrolize edip seçici olarak ayırt edilebilmektedirler. Koagülaz aktivitesi de ayırt edici bir kriterdir. Tavşan kanı plazmasıyla yapılan test sonucunda ise *S. aureus* bakterisi “clumping factor” isimli çökelme veya kümelenme eylemi gösterirse hücre duvarı yapısındaki koagülaz ve plazma fibrinojeni etkileşimi gerçekleşmiş demektir. Koagülaz üreten diğer suşların aksine yalnızca *S. aureus* koagülaz, clumping factor ve asetoin testlerinin tümüne pozitif yanıt verir [43,44,47,48].

1.2.3 Patogenez

Dünya çapında en yaygın gıda kaynaklı patojenlerden biri *S. aureus*, birçok gıda zehirlenmesi ve nozokomiyal enfeksiyonlara neden olan önemli bir patojendir. Gıda maddelerindeki risk değerlendirmesi, klasik mikrobiyal profilinin belirlenmesi ve standardize edilmiş seçici Baird-Parker ortamı üzerindeki koagülaz pozitif stafilocokların miktar tayinine dayanmaktadır [43,49,50,51,52].

S. aureus ile gıda kontaminasyonu, gıdaların işlenmesi sırasındaki kötü hijyenden veya doğrudan enfekte olmuş hayvanlardan elde edilen gıdalardan kaynaklanmaktadır. Uygun olmayan şartlarda üretim, uzun süreli bekleyişin ardından piyasada satışa sunulan et ve et ürünleri patojen organizma ve enterotoksin varlığı açısından insan sağlığı için önemli risk oluşturmaktadır. Gıda zehirlenmelerinin büyük bir çoğunluğu *S. aureus* suşları tarafından büyüme sırasında yan ürün olarak üretilen enterotoksinlerden kaynaklanmaktadır. Enterotoksinler, polipeptid yapıya sahip, ısıya dirençli virülans faktörlerdir. *S. aureus* temelde 5 adet enterotoksin üretmektedir. Bunlar; sea, seb, sec, sed ve see olup sea ve sed, gıda zehirlenmelerinde en fazla görülen enterotoksin çeşitleridir.

Toksin oluşumu su aktivitesine, ortamın pH' sına ve sıcaklığına bağlı olarak değişkenlik göstermektedir. 10^5-10^8 kob/g aralığındaki *S. aureus* sayısı toksin oluşturma riskine sahiptir. Patojen mikroorganizma tarafından üretilen toksinlerin, gıdaların gramında 1 ng' in üzerinde bulunduğu durumlarda etkili rol oynadığı görülmektedir. Toksinle kontamine olan gıdaların tüketiminden 24 saat sonra, diyare, karın krampları, kusma ve mide bulantısını içeren semptomlar görülmektedir [11,13,48,53,54,55,56,57].

Stafilokok kaynaklı enfeksiyon veya salgınlarmın gerçek sayısının kaydedilen sayıdan daha büyük olabileceği düşünülmektedir, çünkü *S. aureus* gıda zehirlenmelerinin belirtileri her zaman açık bir şekilde ifade edilememektedir [58].

1.2.4 Antibiyotik Dirençliliği

Antibiyotik dirençli bakterilerle meydana gelen gıda kontaminasyonu, halk sağlığına önemli bir tehdit oluşturabilmektedir; çünkü antibiyotik direnci belirleyicileri, potansiyel olarak ciddi bakteriyel enfeksiyonların tedavisini tehlikeye sokan diğer patojenik bakterilere aktarılabilir. *S. aureus*, hastane ortamındaki enfeksiyonların yaklaşık olarak %20 'sini oluşturmaktadır. Yüksek risk grubundaki hamileler, yaşlı hastalar ve bağışıklık sistemi zayıf olan hastalar bu gibi enfeksiyonlardan çok daha fazla etkilenmektedirler. Antibiyotiklerin uygunsuz dozlarda ve zaman aralığında kullanılması, bakteri popülasyonunu artırarak direnç gösteren suşların oluşmasına neden olmaktadır. Antimikrobiyal dirençli bakteriyel patojenlerin ortaya çıkması da önemli bir halk sağlığı sorunudur. Antibiyotiğe dirençli suşlar ise, enfeksiyonların tedavisini zorlaştırarak başarısızlıklara sebep olmaktadır [39,48,59,60].

Edinilmiş antimikrobiyal direnç, sıklıkla plazmidlerin konjugatif transferi yoluyla gelişmektedir. *S. aureus*, beta-laktam antimikrobiyallerini içeren farklı tiplerdeki antibiyotiklere direnç göstermesi nedeniyle, dünya çapında büyük bir endişe kaynağı olmaktadır. Stafilokoklar, sahip oldukları beta-laktamaz enzim aktivitesi ile penisilin grubunda yer alan antibiyotiklerdeki beta-laktam halkasının yapısını bozarak etkisiz hale getirir.

1959 yılında penisilin dirençli *S. aureus* enfeksiyonları için yeni bir ilaç olan metisilin geliştirilmiştir. 1961 yılında ise MRSA olarak bilinen metisilin dirençli *S. aureus*'un bir hastanede tespit edilmesiyle, metisilin tedavide kısa süreli bir rol oynamıştır. Günümüzde neredeyse tüm stafilokok suşlarının penisilin antibiyotiğine dirençli olduğu bilinmektedir [42,48,59,60,61].

1.3 Antibiyotikler

1.3.1 Antibiyotiklerin Tanımı

Antibiyotikler, mikroorganizmalar tarafından üretilen ve bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Doğal yolla veya sentetik olarak üretilen antibiyotikler, yalnızca tıp alanında değil ziraat ve birçok alanda hem enfeksiyonların tedavisinde hem de hayvanlar için büyümeye destek faktörü olarak kullanılmaktadır [62].

Antibiyotiklerin hedef mikroorganizma üzerinde istenilen etkiyi gösterebilmesi için bazı şartların sağlanması gerekmektedir. Bunlardan ilki, hedef mikroorganizma hücrelerinde uygun bir antibiyotik hedefinin bulunmasıdır. Hedef bölgede gerçekleşebilecek modifikasyonlar antibiyotiğin düzgün bir şekilde bağlanmasına izin vermeyeceğinden etki etmesini engelleyecektir. Bir diğeri ise antibiyotiğin inaktive edilmeden veya yapısının değiştirilmeden hedefe yeterli miktarda ulaşabilmesidir [63].

Günümüzde birçok patojenik mikroorganizma, kullanılan antibiyotiklere karşı direnç kazanmış olup büyük bir sağlık tehdidi oluşturmaktadır. İnsan ve hayvan sağlığını olumsuz yönde etkileyen birçok hastalığın tedavisinde kullanılan bu antibiyotikler, fazla miktarlarda veya bilinçsizce tüketildikleri takdirde dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Örneğin, glikopeptid türevi olan avoparcin'in büyüme faktörü olarak hayvan yemlerinde kullanılması sonucunda dirençli mikroorganizmalar gelişebilmektedir [64].

DNA yapısında meydana gelen mutasyonlar sonucunda antibiyotiklere karşı çeşitli direnç genleri gelişebilmektedir. Ayrıca, direnç genini taşıyan DNA dizisinin çeşitli biyokimyasal mekanizmalarla duyarlı bir bakteriye taşınması sonucunda da gelişebilecek bu direnç durumuna kazanılmış direnç adı verilmektedir [61,65].

1.3.2 Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler, çeşitli organizmalardan sentezlenen ve dünya genelinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Mikroorganizmalar üzerinde farklı etkiler göstererek büyümelerine ve gelişmelerine zarar vermektedirler hatta kimi zaman ölümlerine de sebep olabilmektedirler [62].

Antibakteriyel tedaviler, tıbbi uygulamalarda temel yapıtaşlarından birini oluşturup, hastalık sürecinde farmakolojik yönden yarar sağlarlar. Günümüzde halen daha birçok yeni antibakteriyel ajan geliştirilmektedir. Yeni keşfedilen bu antibakteriyel ajanlar, sadece bakterileri inhibe etme kabiliyeti açısından değil, aynı zamanda bakterileri gerçekten öldürdüğünü belirlemek için in vitro olarak test edilmiştir [66].

1.3.2.1 Antimikrobiyal Etkiye Göre Sınıflandırma

Antibiyotikler antimikrobiyal etkilerine bağlı olarak iki sınıfa ayrılırlar [67].

1.3.2.1.1 Bakteriyostatikler

Bakteriyostatikler, bakterilerin üremelerini ve gelişmelerini durdurarak etki gösterirler. Kullanılan antibiyotiğin yanı sıra vücut tarafından etkili bir bağışıklık yanıtının da oluşturulup, bakterilerin fagositik hücreler tarafından temizlenmesi gerekmektedir. Etkin bir savunma mekanizması olmadığı takdirde antibiyotik etkisi ortadan kalktığında mikroorganizmalar üremelerine devam ederler. Bu gruptaki antibiyotiklere örnek olarak: Tetrasiklinler, Makrolitler, Sülfonamidler, Amfenikoller verilebilir [67,68].

1.3.2.1.2 Bakterisidler

Bakterisidler, bakteriler üzerinde ölümcül etki yaratan antibiyotik grubudur. Bu gruptaki antibiyotiklere örnek olarak: Beta-Laktamlar, Polipeptitler, Florokinonlar, Vankomisin, Rifamisin verilebilir [68].

1.3.3 Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırma

Antibiyotikler, etki mekanizmalarına göre 5 ana grupta incelenirler.

1.3.3.1 Hücre Duvarı Sentezini İnhibe Edenler

Bakteri hücreleri, murein olarak da bilinen peptidoglikan tabaka ile kaplıdır. Bu tabaka, bakterinin osmotik basınç gibi değişken çevresel şartlara karşı direnç gösterip hayatta kalması için çok önemlidir. Beta-laktamlar, glikopeptitler, Vankomisin ve Basitrasin hücre duvarı sentezinde yer alan spesifik basamaklara müdahale eden antibiyotik sınıfları arasındadır [69].

1.3.3.2 Hücre Membran Yapısını Bozanlar

Biyolojik membranlar temel olarak lipidler, proteinler ve lipoproteinlerden oluşur. Sitoplazmik membran hücrede su, besin, iyon ve taşıma sistemleri için difüzyon bariyeri olarak rol alır. Ayrıca birçok antimikrobiyal ajan içinde bariyer görevi görür. Ancak bazı antimikrobiyal ajanlar sahip oldukları etki mekanizmaları ile membran geçirgenliğini artırarak hem kendinin hem de diğer bileşiklerin geçişinin kolaylaştırmaktadır. Bu ajanların ilk hareketi hücre zar yapısını bozarak kendilerinin hücreye girmesine ve spesifik metabolik süreçleri engellemesine izin vermektir. Polimiksinler ve Gramisidin bu grupta yer alan antibiyotiklerdir [68,70].

1.3.3.3 Protein Sentezini İnhibe Edenler

Santral dogma, hücrelerde genetik bilgi akışını sağlayan ve moleküler biyolojinin temelini oluşturan bir olaydır. Replikasyon, transkripsiyon ve translasyon olmak üzere 3 basamaktan oluşur. DNA'nın replikasyon basamağında kendini eşlemesinden sonra transkripsiyon basamağında bu DNA'dan RNA sentezi yapılır. Translasyon evresinde ise ribozomda yer alan bağlanma bölgelerinde mRNA' daki kodonların tRNA' lardaki uygun antikodonlarla birleşmesi sonucunda polipeptit zinciri oluşturulur [71].

Ribozom, 30S ve 50S olmak üzere iki alt birimden oluşur. Protein sentezini inhibe eden ilaçlar en geniş antibiyotik sınıfları arasındadır. Bu ilaçlar, 50S inhibitörleri ve 30S inhibitörleri olarak iki sınıfa ayrılırlar [69,72].

30S alt birimine bağlanan inhibitörler, mRNA kodonunun tRNA antikodonu ile birleşmesini engelleyerek translasyon evresine zarar verir. 50S alt birimine veya uzama faktörlerine bağlanan inhibitörler ise, translasyon evresinde yer alan adımlara müdahale ederler [73]. Aminoglikozidler ve tetrasiklinler 30S alt birimine bağlanan inhibitörler arasında yer alırlar [74].

50S ribozom inhibitörlerine örnek olarak makrolidler (eritromisin), linkozamidler (klindamisin), streptograminler (dalfopristin-kuinupristin), amfenikoller (kloramfenikol) ve oksazolidinonlar (linezolid) verilebilir [75,76].

1.3.3.4 Nükleik Asit Sentezini Bozanlar

Sentetik olarak üretilen filorokinolon grubu antibiyotikler ve Novobiosin, topoizomeraz II (DNA giraz) ve topoizomeraz IV grubu enzimleri hedef alarak replikasyon aşamasında bu enzimlere bağlanırlar. Sebep oldukları topoizomeraz inhibisyonu sebebiyle açılan DNA'nın yeniden birleşmesi engellenir. Oluşan DNA kırıkları sonucunda hücre ölümü gerçekleşir [77].

Bakterisidal etki gösteren rifamisin, aktif bir şekilde transkripsiyonu gerçekleştiren RNA polimeraz enziminin β alt birimine bağlanarak enzimi inhibe eder. Sonuç olarak RNA sentezini bloke etmiş olur [78].

1.3.3.5 Mikrobiyal Metabolik Yolakları Bozanlar

Bakteriyostatik etki gösteren trimetoprim ve sülfonamidler, çeşitli biyosentez basamaklarını bloke ederek hücrede folik asit metabolizmasını inhibe ederler [70].

1.3.4 Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırma

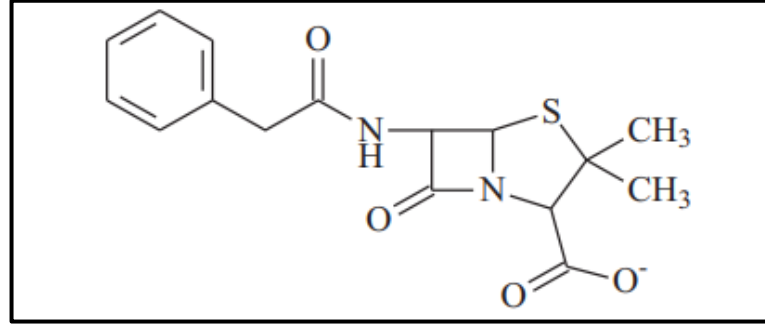
Antibiyotiklerin kimyasal yapılarına göre sınıflandırılması 10 başlık altında incelenecektir.

1.3.4.1 Beta-Laktamlar

Beta-laktam grubu antibiyotikler, bakteriyel hücre duvarının sentezi için gerekli olan proteinlere etki ederek ya hücre büyümesini engeller ya da hücrenin ölümüne yol açarlar. Günümüzde en yaygın olarak kullanılan antibiyotik grubu olup, tüm üyeleri yapısında beta laktam halkası içermektedir. Penisilinler, sefalosporinler, karbapenemler, monobaktamlar olmak üzere 4 ana grupta incelenirler [79].

Penisillin G (benzilpenisilin), penisilinlerin doğal penisilin grubunda yer alan, genellikle gram-pozitif mikroorganizmaların neden olduğu bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılan bir antibiyotiktir. Bakterisidal aktiviteye sahip olan Penisillin G, bakteriyel hücre duvarında yer alan penisilin bağlayan proteinlere (PBPs) bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe eder. [80].

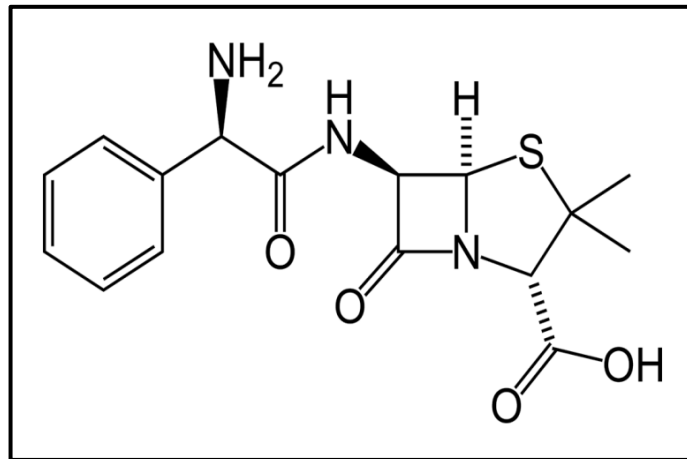
Benzilpenisilin' in kimyasal yapısı Şekil 1.1'de şematik olarak gösterilmiştir [81].



Şekil 1.1: Benzilpenisilin 'in kimyasal yapısı [81].

Ampisilin, penisilinlerin aminopenisilinler grubunda yer alan bir antibiyotiktir. Ampisilin, karbenisilin ve amoksisilin gibi bazı antibiyotikler, farklı yan zincirlerle yarı sentetik olarak geliştirilmiştir. Bu yan zincirler, antibiyotiklere, bazı bakteriyel suşlar tarafından üretilen belirli enzimlerin degradesi kapasitesinden kaçınma özelliği verdiği gibi bakteriyel hücre duvarlarının dış zarından antibiyotiklerin hareketini kolaylaştırma yeteneğini de vermektedir [79,82].

Ampisilin 'in kimyasal yapısı Şekil 1.2' de şematik olarak gösterilmiştir [83].



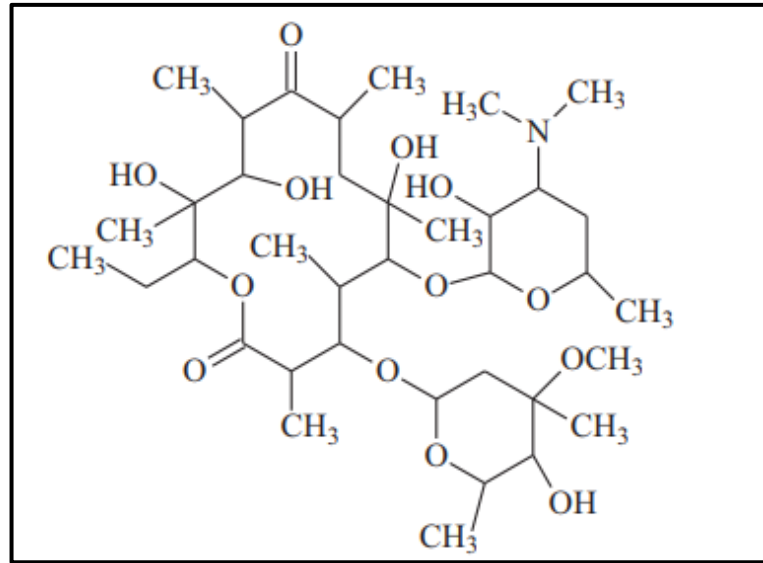
Şekil 1.2: Ampisilin' in kimyasal yapısı [83].

1.3.4.2 Makrolidler

Makrolidler, bakteriyel protein sentezini etkili bir şekilde inhibe ederek mikroorganizmaları öldürür veya inhibe ederler. Doğal veya yarı sentetik yolla üretilenlerdir [84].

Eritromisin, ribozomun 50S ribozomal alt birimlerine bağlanarak peptidil transferaz aktivitesini inhibe ederek translasyonun gerçekleşmesini engeller. Eritromisin, ilaç konsantrasyonu ve organizmaya bağlı olarak bakteriyostatik veya bakterisid gibi davranabilmektedir [85,86,87,88].

Eritromisin 'in kimyasal yapısı Şekil 1.3' de şematik olarak gösterilmiştir [81].



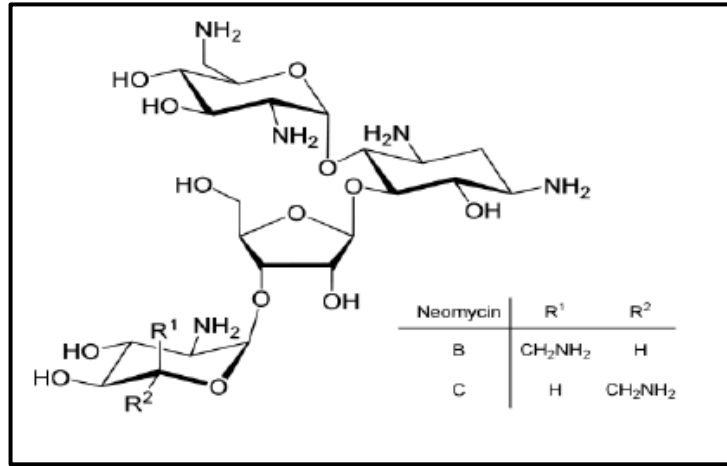
Şekil 1.3: Eritromisin 'in kimyasal yapısı [81].

1.3.4.3 Aminoglikozidler

Geniş bir antimikrobiyal etkiye sahip olan Aminoglikozidler, genellikle *Mycobacterium tuberculosis* ve metisilin dirençli *S. aureus* gibi ölümcül enfeksiyonlara yol açan mikroorganizmaların tedavisinde kullanılmaktadır [89,90].

Neomisin, aminoglikozid bir antibiyotik olup ribozomlarda 30S alt birimine bağlanarak kodonun yanlış okunmasına sebep olarak protein sentezini inhibe eder [91].

Neomisin 'in kimyasal yapısı Şekil 1.4' de şematik olarak gösterilmiştir [92].



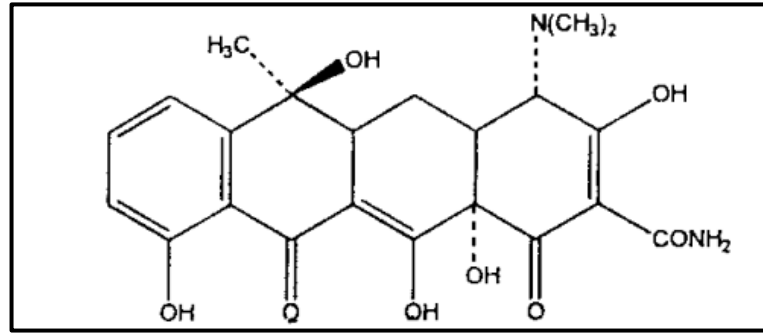
Şekil 1.4: Neomisin' in kimyasal yapısı [92].

1.3.4.4 Tetrasiklinler

Tetrasiklinler bakteriyostatik olarak kabul edilmektedir, ancak yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal bir etkiye de sahip olabilmektedir. Protein sentezi, tetrasiklinler tarafından inhibisyon için hücrede ana hedef olmaktadır [93,94,95,96].

Tetrasiklinler, ribozomun 30S alt birimine geri dönüşümlü olarak bağlanmaktadır [79,93,97].

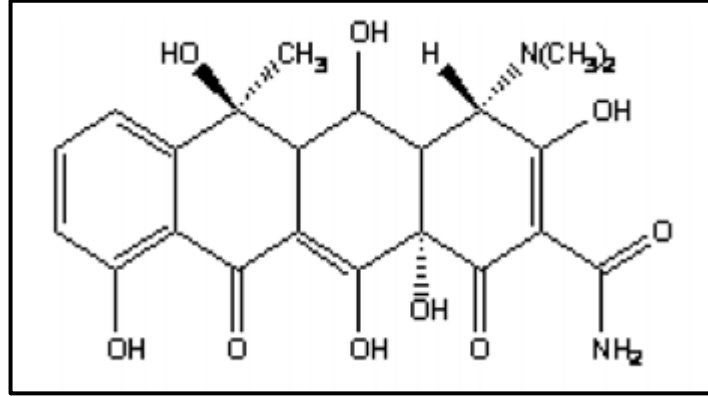
Tetrasiklin'in kimyasal yapısı Şekil 1.5' de şematik olarak gösterilmiştir [97].



Şekil 1.5: Tetrasiklin'in kimyasal yapısı [97].

Oksitetrasiklinler, RNA'nın transferini bloke etmek ve protein sentezini önlemek gibi birçok geniş spektrumlu antimikrobiyal özelliklere sahiptir. Oksitetrasiklin, translasyonu inhibe ederek hücre büyümesini inhibe etmektedir [98,99,100].

Oksitetrasiklin 'in kimyasal yapısı Şekil 1.6' da şematik olarak gösterilmiştir [100].



Şekil 1.6: Oksitetrasiklin' in kimyasal yapısı [100].

1.3.4.5 Glikopeptitler

Glikopeptitler, gram-pozitif patojenlerin neden olduğu ciddi enfeksiyonlara karşı tedavi için kullanılan en yaygın antibiyotik sınıfıdır. Vankomisin ve teikoplanin gibi glikopeptitler bu bakterilerin tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Glikopeptid antibiyotikler peptidoglikan tabakasında bulunan açil-D-ala-D-ala yapısına bağlanarak hücre duvarı sentezini inhibe etmektedir [101,102].

1.3.4.6 Kinolonlar

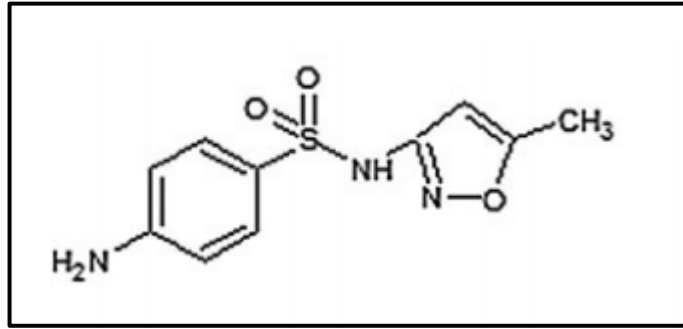
Kinolonlar, sentetik yapılu antibiyotikler olup bakterisidal etki gösterir. Nalidiksik asit üretilen ilk kinolon grubu antibiyotiktir. Kinolonlar iki temel bakteriyel enzimi hedef alır: DNA giraz ve DNA topoizomeraz IV. Her iki enzim de hücre büyümesi ve bölünmesi için gereklidir [77,103,104].

1.3.4.7 Sulfonamidler

Antimikrobiyal aktiviteye sahip sulfonamidler, farklı yollarla sınıflandırılabilen büyük bir ilaç grubunu temsil etmektedir. Sülfanilamidler normal sıcaklık ve basınç koşullarında stabil bir maddedir. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı etkili olan geniş bir antimikrobiyal spektruma sahiptirler [105,106].

Sulfametoksazol, folik asit sentezine müdahale eden bakteriyostatik bir sulfonamid antibiyotiktir [106].

Sulfametoksazol 'ün kimyasal yapısı Şekil 1.7' de şematik olarak gösterilmiştir [107].

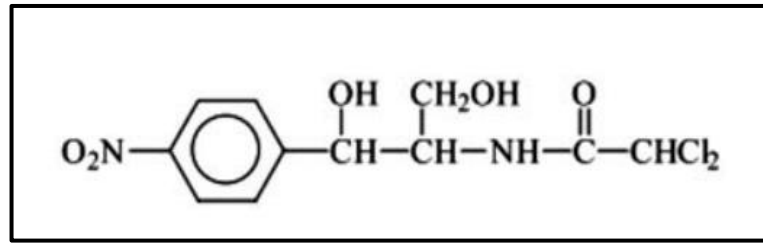


Şekil 1.7: Sulfametoksazol'ün kimyasal yapısı [107].

1.3.4.8 Amfenikoller

Bakteriyostatik olarak görev yapan amfenikoller grubu içinde en yaygın olarak kullanılan antibiyotik kloramfenikoldür. Ribozomun 50 S alt birimine bağlanarak peptidil transferaz enzimini inhibe eder ve protein sentezini durdurur. Bu antibiyotiğe karşı gelişen en önemli direnç, antibiyotiğin asetilasyonuna sebep olan asetil transferaz enzimini kodlayan genin plazmid ile diğer mikroorganizmalara aktarımıdır [108,109,110].

Kloramfenikol 'ün kimyasal yapısı Şekil 1.8' de şematik olarak gösterilmiştir [111].



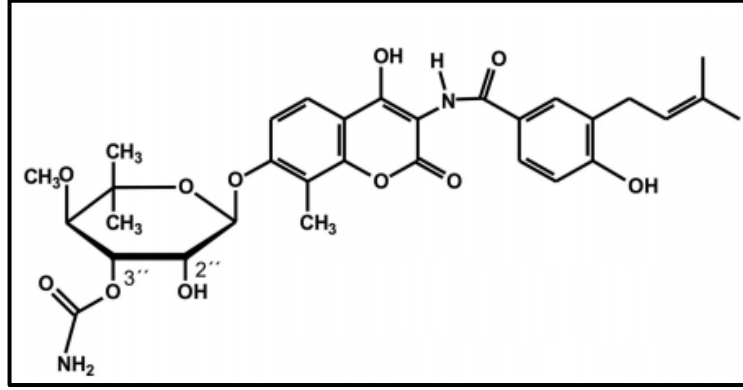
Şekil 1.8: Kloramfenikol'ün kimyasal yapısı [111].

1.3.4.9 Aminocoumarin

Aminocoumarin antibiyotikler DNA giraz enziminin B alt birimine bağlanarak bu enzimin aktivitesini bloke ederler. *S. aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* gibi gram-pozitif patojenlere karşı güçlü aktiviteler gösterirler [112].

Novobiosin, *Streptomyces niveus* tarafından üretilen ve insan enfeksiyonlarının tedavisi için lisanslanmış tek aminocoumarin'dir [112,113].

Novobiosin 'in kimyasal yapısı Şekil 1.9' da şematik olarak gösterilmiştir [112].

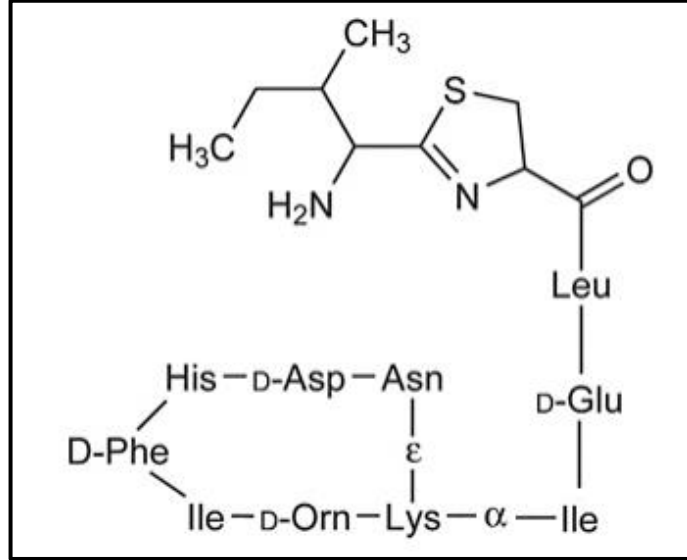


Şekil 1.9: Novobiosin'in kimyasal yapısı [112].

1.3.4.10 Polipeptitler

Basitrasin, hücre duvarı sentezi sırasında bakteriyel ölüme yol açan peptidoglikan öncüllerinin akışını kesmektedir. Ana bileşen Basitrasin A olup, antimikrobiyal etki çoğunlukla bu molekül tarafından sağlanmaktadır. Hücre duvarı üretiminde lipid taşıyıcı olarak görev yapan bir moleküle bağlanarak bakteriyel hücre duvarı biyosentezine müdahale eder [114,115].

Basitrasin 'in kimyasal yapısı Şekil 1.10' da şematik olarak gösterilmiştir [115].



Şekil 1.10: Basitrasin a kimyasal yapısı [115].

1.4 Moleküler Teknikler

Mikroorganizma deteksiyonu için kullanılan en yaygın moleküler yöntemlerden ikisi Polimeraz zincir reaksiyonu ve Real-Time PCR analiz yöntemleridir. Bu iki teknik aşağıda detaylı olarak açıklanacaktır.

1.4.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

Polimeraz zincir reaksiyonu, küçük miktarlardaki biyolojik örnek ile sekans verilerinden türetilen oligonükleotid primerlerinin in vitro amplifikasyonunu sağlayarak DNA fragmanlarının oluşumuna izin veren bir tekniktir. 1984 yılında Kary Mullis tarafından keşfedilen polimeraz zincir reaksiyonu, bilimde bir devrim olarak kabul edilmiştir. Dr. Kary Banks Mullis bu buluşundan dolayı 1993 yılında Nobel Kimya ödülünü kazanmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu, tıp, genetik, biyoteknoloji ve adli tıp alanında birçok uygulamaya sahiptir [116,117,118].

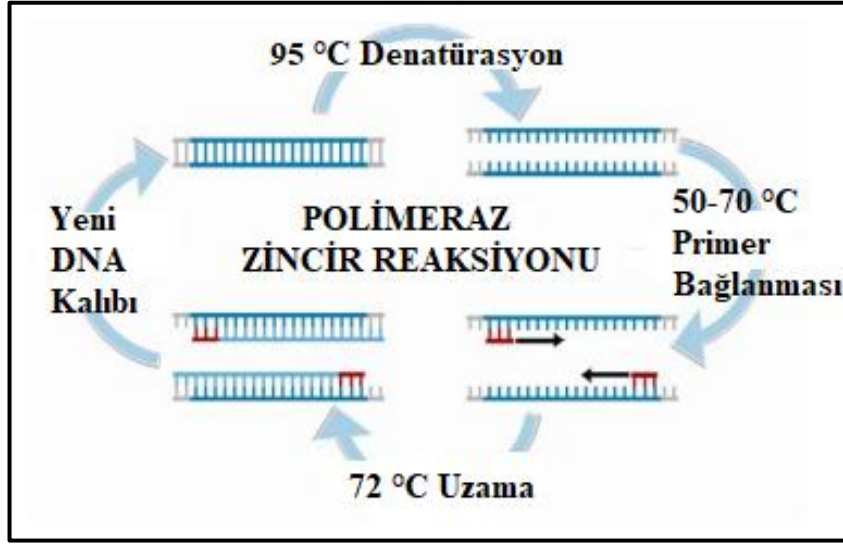
PZR için gerekli başlangıç materyali hedef sekans niteliğindeki bir DNA fragmentidir ve temelde 3 adımdan oluşmaktadır:

Denatürasyon: Çift sarmallı DNA, 2 adet tek zincirli DNA ipliği elde edilene kadar 95°C' de ısıtılarak denatüre edilir.

Bağlanma: Mevcut sıcaklık 50-70°C aralığına düşürülerek hedef diziye spesifik olan primerlerin hedef diziye bağlanması sağlanır.

Uzama: Sıcaklık 72°C' ye artırılarak enzim yardımıyla yeni DNA fragmentlerinin sentezi sağlanır. Kısa bir süre içinde hedef sekansın birçok kopyası üretilmiş olur [119,120,121].

Polimeraz zincir reaksiyonunu işlem basamaklarını gösteren şema Şekil 1.11’de verilmiştir [122].



Şekil 1.11: Polimeraz zincir reaksiyonu analiz basamakları ([122] numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.).

Gıda analizlerinde uygulanan PZR tabanlı yöntemlerin birçoğu analiz sonrasında jel elektroforezi gibi bir tespit gerektirir. Hem zahmetli olması hem de fazla zaman alması sebebiyle polimeraz zincir reaksiyonu analizinin yerine daha hızlı ve kantitatif bir moleküler analiz yöntemi olan Real-Time PCR tercih edilmektedir [123,124].

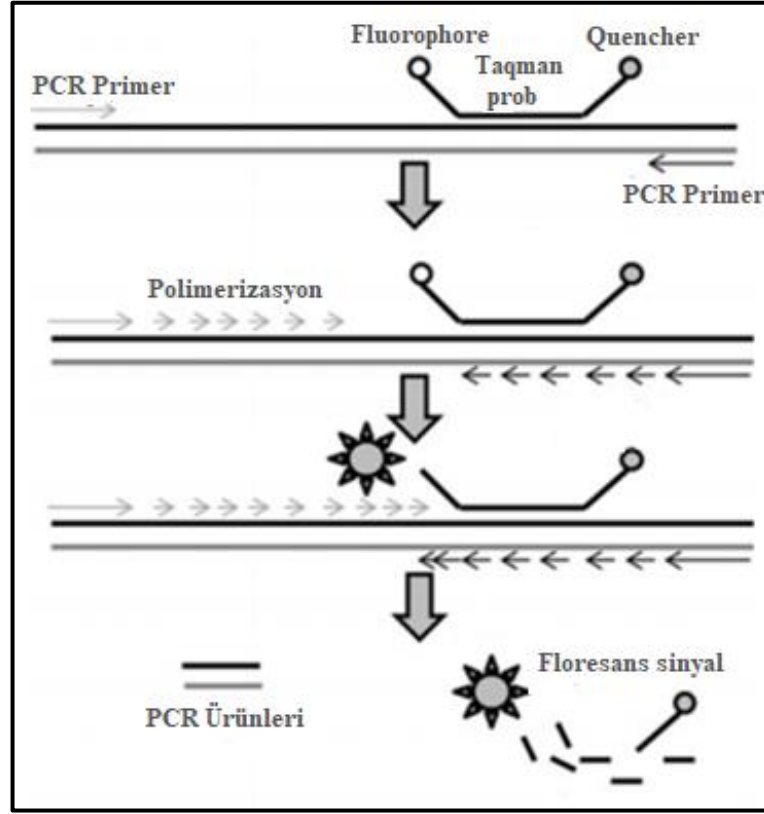
1.4.2 Real-Time PCR (Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu, qPCR)

Higuchi ve arkadaşları, 1993 yayınladıkları Kinetik PZR Analizi isimli çalışmalarıyla Real-Time PCR analizini keşfetmişlerdir [125].

qPCR çok hassas ve güçlü bir DNA analiz aracıdır. PZR ürünlerini reaksiyon sırasında gerçek zamanlı olarak algılayan Real-Time PCR (qPCR), nükleik asitleri ölçmek için “altın standart” teknoloji olarak kabul edilmektedir. Real-Time PCR’ ın temelinde 2 adet tespit yöntemi bulunmaktadır. Bunlardan birincisi, SYBR Green gibi çift iplikli DNA’ya bağlanan boyaların interkalasyonuna dayanır. Bu yöntem kolaylıkla uygulanabildiği gibi herhangi bir floresan işaretli oligonükleotide ihtiyaç duymaz. Dikkatli bir optimizasyonun ardından erime eğrisi analizi kullanılarak spesifik ve spesifik olmayan PZR ürünleri arasındaki farklılık belirlenir. Erime sıcaklığı (T_m), DNA’nın konsantrasyonuna, büyüklüğüne ve nükleotid sekansına bağlı olarak değişkenlik gösterir. İkinci yöntem ise floresan işaretli bir oligonükleotid dizisinin kullanılmasıdır. Bu yöntem hidroliz problemleri veya hibridizasyon problemleri kullanıldığında açığa çıkan floresan sinyal şiddetinin miktarının ölçülmesine dayanmaktadır [123,126,127,128,129,130].

Taqman prob, yaygın olarak kullanılan bir hidroliz probudur. 5’ ucunda Reporter florofor, 3’ ucunda ise Quencer olarak adlandırılan iki gruba işaretlidir. Çoğaltılacak olan hedef DNA’ ya ait primerlerin bağlandığı bölgelerin arasına bağlanarak görev yapar. Primerler, hedef DNA’ya bağlanarak polimerizasyon ile yeni bir zincir oluşturmaya başlar. Taqman proba gelindiğinde Taq DNA polimeraz enziminin sahip olduğu ekzonükleaz aktivitesiyle 5’ ucunda yer alan reporter florofor probdan ayrılarak sinyal oluşumuna yol açar. Ortamdaki ürün sayısı arttıkça floresan sinyal buna bağlı olarak artış gösterir [131].

TaqMan probun çalışmasına ait mekanizmayı gösteren şema Şekil 1.12' de verilmiştir [132].



Şekil 1.12: Taqman prob mekanizması ([132] numaralı kaynaktan uyarlanmıştır.).

Real-Time PCR, analiz işlemi boyunca ortaya çıkan sinyalleri toplar. Böylece amplifikasyonu ve deteksiyonu tek bir adımda birleştirmiş olur. Amplifikasyonun tespit edildiği ilk nokta olan Ct değeri data analizi için önemli bir basamaktır. Çalışılan örnek materyali içindeki DNA miktarı ne kadar fazlaysa hızlı bir floresan sinyali ortaya çıkacak olup düşük bir Ct değeri beklenecektir [133].

Real-Time PCR' da DNA miktarını belirlemek amacıyla, miktarı önceden belirlenen referans DNA'ya ait dilüsyon serisinden standart bir eğri oluşturulmaktadır. Çizilen bu eğri ile analiz edilecek örnekteki bilinmeyen DNA miktarı Ct değerleriyle belirlenir [134].

Ct değeri, amplifikasyon esnasında anlamlı floresan sinyalin eşik değerini aştığı noktayı ifade eder. Analiz esnasında 2 adet kontrol kullanılır. Birincisi, içinde örnek DNA'sı hariç diğer tüm Real-Time PCR analiz karışım bileşenlerini içeren negatif kontroldür. Bu sayede reaksiyondaki olası kontaminasyon tespit edilmiş olur. İkincisi, pozitif sonuç vereceği bilinen saf kültürlerin kullanıldığı pozitif kontrol olup deney bileşenlerinde oluşabilecek olası sorunların tespiti için kullanılır [135].

Hızlı ve güvenilir bir yöntem olan Real-Time PCR, patojen mikroorganizma saptama, gen ekspresyonu analizi, SNP analizi ve kromozom anormalliklerini saptama gibi alanlarda kullanılmaktadır [136].

1.4.2.1 Patojen Deteksiyonunda Real-Time PCR Analizi

Gıda zinciri boyunca gıda kaynaklı patojenlerin hızlı ve uygun maliyetli teşhisi, endüstri ve halk sağlığı açısından önemli bir konudur. Real-Time PCR, yüksek özgüllük, yüksek duyarlılık ve hedef mikroorganizmaların miktarını saptayabilmesi sebepleriyle önemli bir moleküler teknik olarak kullanılmaktadır. Gıda üretim aşamalarında patojen mikroorganizmaların varlığını saptamak amacıyla hızlı, yüksek hassasiyete sahip ve güvenilir bir tekniğin kullanılması son derece önemlidir. Düşük miktardaki bakteri DNA'sından bile hızlı tespit olanağı sağlayan Real-Time PCR analizinin, örneğin tipine ve mikroorganizmanın büyüme fizyolojisine bakılmaksızın mikroorganizma tespiti için diğer yöntemlere göre birçok avantajı bulunmaktadır [50,116,137,138]. Saptanacak mikroorganizmaya özgü primerler kullanılarak, bakterileri kültüre etmeksizin miktarlarını belirleme olanağı sağlamaktadır [139,140].

Karmaşık biyolojik örneklerde patojenlerin tespiti için kullanılan standart kültürel yöntemler zaman alıcı olduğundan dolayı hızlı sonuç veren Real-Time PCR daha kullanışlı bir yöntemdir [123,141].

Salmonella spp. ve *S. aureus* birçok ülkede gıda kaynaklı enfeksiyon ve salgınların önde gelen patojen mikroorganizmalarıdır. Bu organizmaların spesifik tespiti için hızlı ve güvenilir bir metot olan Real-Time PCR analizi gün geçtikçe önem kazanarak daha çok kullanılmaktadır. Real-Time PCR, analiz sırasında izlenebilen ve hedef mikroorganizmanın varlığını gösteren floresan sinyal artışına dayalı bir teknik olduğundan dolayı herhangi bir laboratuvar kontaminasyonu sebebiyle oluşabilecek yanlış pozitif sonuç riskine yer vermemektedir [137,142].

2. MATERYAL VE METOD

2.1 Materyal

İzmir ve Balıkesir illerinin çeşitli market ve kasaplarında farklı markalarda satışa sunulan çiğ ve yarı-pişmiş et ürünleri materyal olarak kullanılmıştır. Farklı zamanlarda toplanan 22 çiğ tavuk eti, 16 çiğ kırmızı et, 14 yarı-pişmiş tavuk eti ve 8 adet yarı-pişmiş kırmızı et olmak üzere toplamda 60 adet ürün steril torbalara konularak soğuk zincir koşullarında laboratuvara getirilmiştir.

2.2 Metot

Bu bölümde, yapılan analizler 5 başlık altında açıklanacaktır.

2.2.1 DNA İzolasyonu

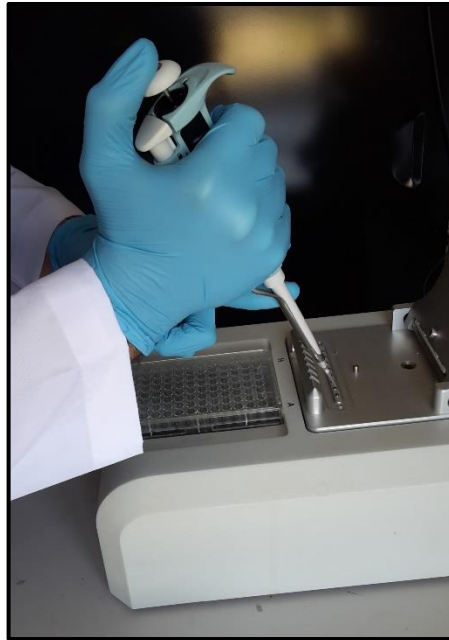
DNA izolasyonu, ticari bir DNA ekstraksiyon kiti olan ROCHE marka High Pure PCR Template Preparation Kit kullanılarak aşağıdaki gibi yapıldı.

1. Ön zenginleştirme kültüründen 1 ml ependorf tüplere alınarak 5000 x g' de 5 dk. santrifüj edildi.
2. Üst kısımda kalan sıvı atılarak pellet üzerine 40 µl Proteinaz K ve 200 µl Liziz Buffer ilave edilerek 70 °C'de 15 dk. bekletildi.
3. İnkübasyon tamamlandıktan sonra, örneklerin üzerine 200 µl Binding Buffer eklenerek mix edildi. Ardından 70°C'de 10 dk. inkübasyona bırakıldı.
4. Daha sonra her tüpe 100 µl isopropanol eklendi ve pipetle mix edildi. Örnek sayısı kadar collection tüp çıkartıldı ve her birine filter tüp yerleştirildi. Hazırlanan bu karışım, filter tüplere aktarıldı. 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.

5. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collectionlara alındı. Her tüpe 500 µl inhibitör Removal Buffer eklendi. 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
6. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collectionlara alındı. Her tüpe 500 µl Wash Buffer eklendi. 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
7. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler yeni collectionlara alındı. Her tüpe 500 µl Wash Buffer eklendi. 8000x g' de 1 dk. santrifüj edildi.
8. Collectionlardaki sıvı döküldü ve tekrar 13000x g' de 10 saniye spin yapıldı. Collection tüpler atıldı ve filtreli tüpler 1,5ml 'lik ependorflara alındı.
9. Her tüpe, önceden ependorflara bölünerek hazırlanmış ve 72 °C'de bekletilmiş olan Elution Buffer' dan 200 µl eklendi. 8000 x g' de 1 dk. santrifüj yapıldı.
10. Filtreli tüpler atıldı ve DNA' lar ependorf tüplerde toplandı.

İzolasyonun ardından elde edilen DNA'ların konsantrasyonları ve saflıkları Nanodrop cihazı ile ölçülerek belirlendi. A_{260}/A_{280} absorbans oranları kontrol edildikten sonra DNA'lar bir sonraki basamak için -20 °C'de muhafaza edildi.

Nanodrop cihazı ile yapılan ölçümler Şekil 2.1' de gösterilmiştir.



Şekil 2.1: Nanodrop cihazı ile dna konsantrasyonların ölçümü.

2.2.2 Real-Time PCR Analizi

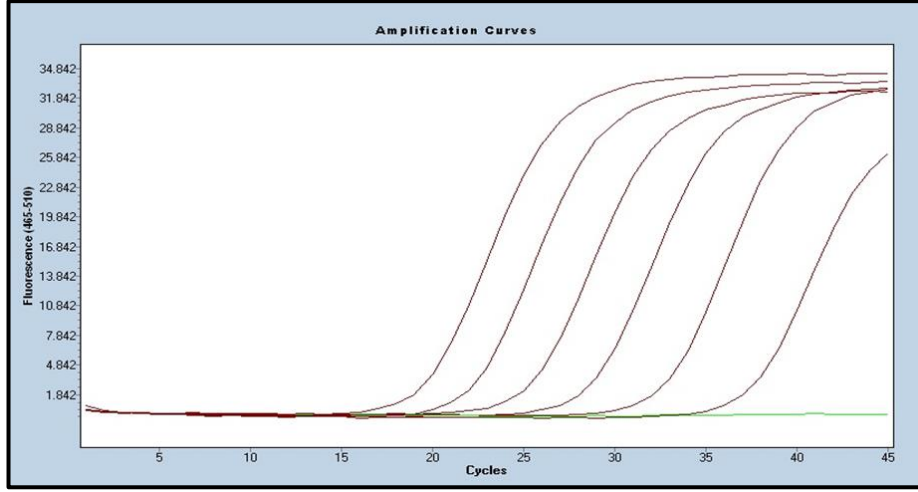
2.2.2.1 Standart Seri Oluşturulması

Öncelikli olarak pozitif örneklerden *S. aureus* ve *Salmonella spp.* spesifik primerler kullanılarak ayrı ayrı PZR yapıldı. Ardından PZR ürünleri agaroz jelde yürütülerek tek ürün olup olmadıkları belirlendi.

PCR ürünleri agaroz jel' den ticari bir kit olan ROCHE marka High Pure PCR Product Purification Kit kullanılarak izole edildi ve yine ticari bir kit olan INVITROGEN marka TOPO® TA Cloning Kit kullanılarak klonlandı. Klonlama sonrası elde edilen plazmidlerde hedef DNA 10^9 hedef molekül/reaksiyon konsantrasyonundadır. 10^9 standart plazmid seri dilüsyon yapılarak en az 7 farklı standart oluşturuldu ve standart eğri bu standartlar kullanılarak çizildi. 10^9 standart tüpü, 40 μ L 10^9 *S. aureus*, *Salmonella spp.* klon DNA'sı içermektedir.

10^9 standartından 10 μ L alınarak yeni bir ependorfa aktarıldı ve üzerine 90 μ L su ilavesinin ardından vortexlenerek 10^8 standartı oluşturuldu. Bu şekilde 10^1 kopya sayısına kadar seri dilüsyon hazırlanarak standartlar oluşturuldu.

Oluşturulan standart seriler, Real-Time PCR analizinde ayrı ayrı çalışılarak Şekil 2.2' de verilen standart eğri oluşturuldu. Örnekler, Real-Time PCR ile çalışılırken bu standartlardan en az 1 tane plate'e eklendi ve konsantrasyon hesaplandı.



Şekil 2.2: Standart amplifikasyon eğrisi ve ct değerleri.

Tablo 2.1: Real-time pcr'da kullanılan primer ve prob dizileri.

Salmonella spp.

Forward: CTCACCAGGAGATTACAACAT

Reverse: AGCTCAGACCAAAGTGACCA

Probe: 5' FAM-CACCGACGGCGAGACCGACTTT-TAMRA 3'

Staphylococcus aureus

Forward: AATTAACGAAATGGGCAGAAACA

Reverse: TGCGCAACACCCTGAACTT

Probe: 5' FAM-AGAAATTA ACTGGATGGTACGCGGAAGA-TAMRA 3'

2.2.2.2 Primer-Prob Dizaynı ve Optimizasyonu

NCBI ve ENSEMBLE gen bankaları kullanılarak *Salmonella spp.* ve *S. aureus* mikroorganizmaları için spesifik primer ve prob dizaynları yapıldı. Analiz için kullanılan primer ve problara ait nükleotid dizileri ayrı ayrı verildi (bkz. Tablo 2.1). Elde edilen primerlerin spesifikliği ise BLAST programı ile kontrol edildi.

Primerlere, kullanım kılavuzlarında yer alan 100 μM için gerekli su miktarı eklenerek 100 μM ' a (yani 100 pmol/ μl 'ye) sulandırıldı. Ardından her parametre için bir sonraki başlıkta anlatılan ara stoklar oluşturularak çalışma yapıldı.

2.2.2.3 Primer Ara Stok Hazırlama

Tablo 2.1' de yer alan Forward (F) ve Reverse (R) primerler kullanılarak ara stok oluşturuldu. Bunun için F ve R primerlerinin 100 μM 'lık ana stoklarından 10 μM alınarak üzerlerine 90 μl su eklendi.

2.2.2.4 Analiz

Her iki mikroorganizma için ayrı ayrı tüplerde reaksiyon karışımları hazırlandı. Bunun için Tablo 2.2' de belirtildiği gibi tek bir reaksiyon için ependorf tüplere 2,6 μl Nükleaz free su, 1' er μl çalışılacak mikroorganizmaya spesifik Forward ve Reverse primerler, 0,4 μl mikroorganizmaya spesifik Taqman prob ve 10 μl enzim ve dNTP miksi eklenerek son hacim 15 μl ' ye tamamlandı. Real-Time PCR analizi için kullanılacak olan plate kuyucuklarına reaksiyon sayısı kadar 15'er μl hazırlanan bu karışımdan yüklendi. Son olarak 5'er μl örnek DNA'sı da kuyucuklara yüklenerek son hacim 20 μl ' ye tamamlandı.

Tablo 2.2: Real-time pcr karışımı.

Reaksiyon Bileşenleri	Tek Reaksiyon için
Nükleaz içermeyen su	2,6 µl
Forward Primer(10uM)	1 µl
Reverse Primer(10uM)	1 µl
Taqman Prob (10uM)	0,4 µl
Enzim ve dNTP miksi	10 µl
Toplam	15 µl
	+
DNA	5 µl
Son Hacim	20 µl

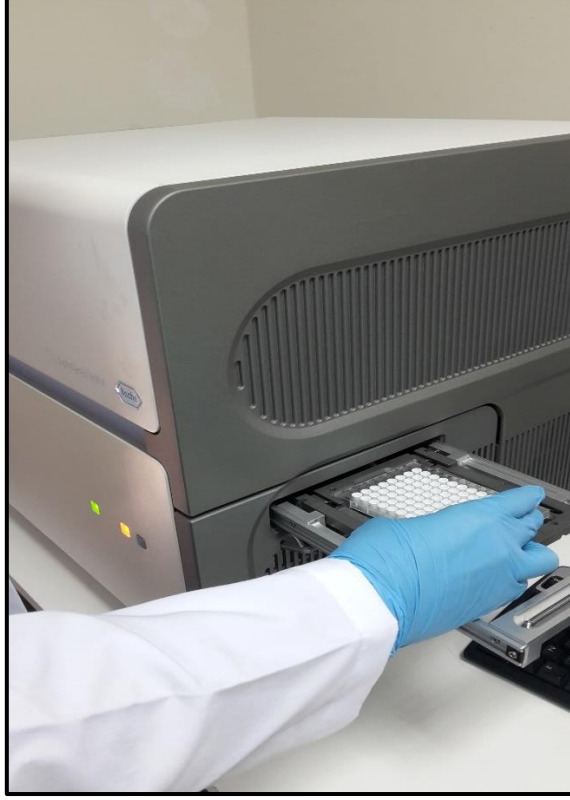
Hazırlanan plate'ler aşağıda özetlenen protokol doğrultusunda analiz edildi:

95°C'de 10 dk. preinkübasyon işleminin ardından 45 döngülük amplifikasyon işlemi uygulandı. Amplifikasyon basamağında 95°C'de 10 sn. denatürasyon, 60°C'de 30 sn. primer bağlaması ve 72°C'de 1 sn. uzama işlemleri gerçekleştirildi. Soğutma basamağı 40°C'de 30 sn. olacak şekilde yapıldı. Roche LightCycler® 480 II cihaz protokolüne ait detaylı içerik Tablo 2.3' de ayrıca gösterilmiştir.

Tablo 2.3: LightCycler® 480 II cihaz protokolü.

Program Adı	Preinkübasyon	Amplifikasyon			Soğutma
Analiz Modu	-	Kantifikasyon			-
Döngü Sayısı	1	45			1
Hedef Sıcaklık [°C]	95	95	60	72	40
Süre	10 dk.	10 sn.	30 sn.	1 sn.	30 sn.
Sıcaklık Artış Hızı [°C/s]	20	20	20	20	20
Okuma Modu	-	-	-	Tek	-

Hazırlanan plate'lerin Roche LightCycler® 480 II cihazındaki görüntüsü Şekil 2.3' de gösterilmiştir.



Şekil 2.3: Plate' lerin real-time pcr cihazına yerleştirilmesi.

2.2.2.5 Elde Edilen Dataların Analizi

Elde edilen dataların analizi, LightCycler® 480 II yazılımında, mikroorganizma var-yok tespiti ve kantitasyon için “Absolute Quantitation Second Derivative” analizi kullanılarak belirlendi. Bu analizde, konsantrasyonu bilinen saf kültürün seri dilüsyonunun ardından oluşturulan standart eğri kullanılarak hesaplama yapıldı. Grafik üzerinde yer alan Ct değerleri ile DNA miktarı arasında ilişki kurularak her bir örneğin DNA konsantrasyonu hesaplandı.

2.2.3 *Salmonella spp.* ve *Staphylococcus aureus*'un Kültüre Edilmesi

2.2.3.1 *Salmonella spp.* Analizi

Salmonella analizi ISO 6579 prosedürüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

Seçici Olmayan n Zenginleştirme:

Analiz için ayrılan et örneklerinin her birinden 25 g alınarak aseptik olarak 225 ml tamponlanmış peptonlu su içerisine transfer edildi. Homojenize edilen rnekler 34-38°C' de 18 saat inkübe edildi.

Seçici Zenginleştirme:

İçerisinde 10'ar ml Rappaport Vassiliadis Medium (RVS) Broth ve Muller Kauffman Tetrathionate Novobiocin Broth (MKTTn) bulunan tüplere n zenginleştirme kültüründen 0,1 ml (RVS için) ve 1 ml (MKTTn için) transfer edildi. Rappaport Vassiliadis Medium tüpleri 42 °C'de, Muller Kauffman Tetrathionate Novobiocin Broth tüpleri ise 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Seçici – Ayırt edici Besi Ortamına Ekim:

İnkübasyon süresi tamamlanan her bir seçici zenginleştirme kültüründen Xylose Lysine Desoxycholate Agar (XLD) ve Bismuth Sulphite Agar (BSA) ortamlarına ze ile kültür transfer edildi ve tek koloni düşecek biçimde çizim yapıldı. Ekim işlemi gerçekleştirilen petriyerler 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

İnkübasyon süresi sonunda tipik *Salmonella* kolonilerinin varlığına bakıldı. Bu selektif agarlardan iki veya daha fazla tipik koloni seçildi. *Salmonella* kolonilerinin söz konusu besi ortamlarında oluşturduğu tipik kolonilerin görünüşleri aşağıdaki gibi olmalıdır:

Bismuth Sulphite Agar: Genellikle etrafı kahverengi-siyah zonla çevrili kahverengi-gri-siyah koloniler gözlemlenir. Koloni çevresinde yer alan besi ortamı rengi başta kahverengi olup inkübasyon süresi arttıkça siyaha dönüşür.

Xylose Lysine Desoxycholate Agar: Ortası siyah, pembe-kırmızı kolonilerdir. *Salmonella* 'ya ait kültür parlak siyah merkezli koloniler olarak gözlenebileceği gibi neredeyse tamamen siyah koloniler olarak da gözlemlenebilir. H₂S üretmeyen *Salmonella* varyantları pembe kolonilere sahip olup koyu pembe merkeze sahiptir.

2.2.3.2 *Staphylococcus aureus* Analizi

Analize alınan et örneklerinden 25 g alınarak aseptik olarak 225 mL Buffered Peptone Water'a (BPW) transfer edilerek homojenize edildi. 10⁻¹'lik dilüsyon hazırlandıktan sonra Egg-Yolk Tellurite emülsiyonunu içeren Baird-Parker Agara 0,1 ml hazırlanan dilüsyondan alınıp ekim yapıldı. Petriler 37°C' de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Baird-Parker Agar, içerdiği yumurta sarısı emülsiyonu ve tellurit bileşenlerinden dolayı selektif bir besiyeri olarak kullanılmaktadır [143].

İnkübasyon sonrasında *S. aureus* kolonilerinin varlığına bakıldı. Bu selektif agarlardan 2-3 tipik koloni seçildi. 24 saatlik inkübasyonun ardından *S. aureus* kolonileri siyah veya gri, şeffaf zon oluşturan, parlak ve düzgün bir görünüme sahiptir [144].

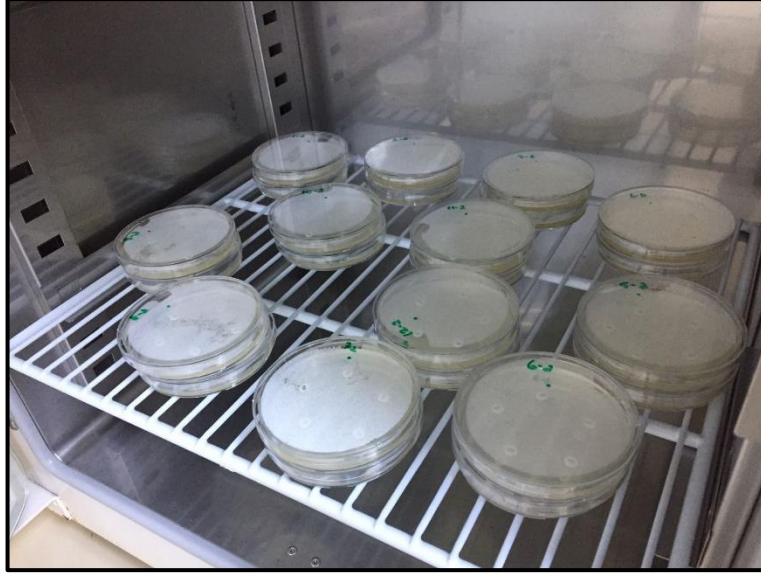
2.2.4 Antibiyotik Duyarlılığının Belirlenmesi

Antibiyotik duyarlılıkları, Kirby-Bauer Disk Difüzyon yöntemi ile belirlendi. Öncelikle petrilerdeki inkübasyonun ardından hem *Salmonella spp.* hem de *S. aureus* petrilerinde oluşan tipik koloniler sıvı besiyerlerine transfer edildi ve Mc Farland türbiditesi standart 0,5' e ayarlandı.

Steril bir öze yardımıyla, hazırlanan mikroorganizmaların kültürlerinden 100 µl alınarak Plate Count Agar (PCA) içeren petriye yayma ekim yapılarak inoküle edildi ve 5 dakika kadar bekletildi. Petrilerin test için hazırlanışı Şekil 2.4' de gösterilmiştir. Kloramfenikol, Penisillin G, Basitrasin, Oksitetrasiklin, Sulfametoksazol, Neomisin, Novobiosin, Tetrasiklin, Eritromisin, Ampisilin olmak üzere toplam 10 adet antibiyotiğe ait diskler, petrideki agar üzerine yerleştirilerek 37°C'de 18 saat inkübe edildi. Antibiyotik disk uygulanmış petrilerin inkübatör içerisindeki görüntüleri Şekil 2.7' de verilmiştir.

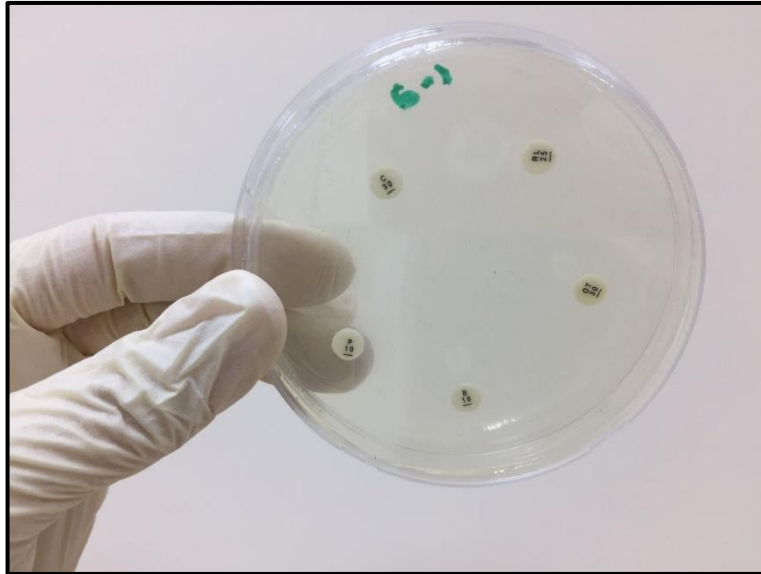


Şekil 2.4: Petrilerin antibiyotik duyarlılık testi için hazırlanması.

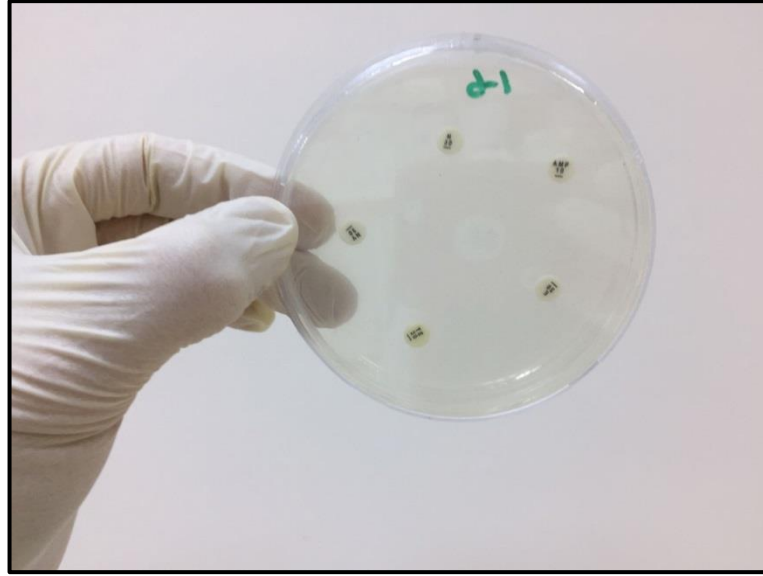


Şekil 2.5: Antibiyotik disk uygulanan petrilerin etüv içindeki yerleşimi.

10 farklı antibiyotik diskin petri üzerindeki yerleşimi Şekil 2.5 ve Şekil 2.6’ da gösterilmiştir.



Şekil 2.6: Antibiyotik disklerin (Kloramfenikol, Penisillin G, Basitrasin, Oksitetrasiklin, Sulfametoksazol) petri üzerindeki konumları.



Şekil 2.7: Antibiyotik disklerin (Neomisin, Novobiosin, Tetrasiklin, Eritromisin, Ampisilin) petri üzerindeki konumları.

İnkübasyonun ardından antibiyotik diskler etrafındaki zon çapları ölçülerek mikroorganizmaların antibiyotiklere karşı direnç durumları belirlendi.

2.2.5 İstatiksel Analizler

Verilerin analizi (s x k) kontenjans tablosu Ki-kare testleri kullanılarak yapıldı. Sonuçlar yorumlanırken $p < 0,05$ değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi [145,146].

3. BULGULAR

İzmir ve Balıkesir piyasasında *Salmonella spp.* ve *S. aureus* varlığını belirlemek amacıyla market, pazar ve kasaplarda satışa sunulan çiğ, yarı pişmiş ve yemeye hazır; tavuk döner, et döner, tavuk etleri, dana ve kuzu etleri olmak üzere 60 adet numune alınarak steril koşullarda laboratuvara getirilmiştir. Alınan örnekler, Real-Time PCR analizi ile patojen mikroorganizma varlığı yönünden incelenmiş olup, Türk Gıda Kodeksi verilerine göre istenmeyen seviyede bakteri tespit edilen örneklerde disk difüzyon yöntemi ile 10 farklı antibiyotikte dirençlilik durumu belirlenmiştir.

3.1 Real-Time PCR Bulguları

Mikroorganizma varlığının belirlenmesi için *Salmonella spp.* ve *S. aureus* suşlarına spesifik primer ve probler kullanılarak yapılan çalışmada toplamda 60 adet çiğ ve yarı-pişmiş et ürünü analiz edildi. Tespit edilen mikroorganizmaların örneklerdeki oransal dağılımı Tablo 3.1’ de verilmiştir.

Çalışmamızda 22’si çiğ tavuk eti, 16’ sı çiğ kırmızı et olmak üzere toplamda 38 adet çiğ et ürünü incelendi. Çiğ et ürünleri için mikroorganizma bulguları aşağıdaki gibidir:

Salmonella spp. bulguları: 22 adet çiğ tavuk eti örneğinin 6’sında *Salmonella spp.* tespit edildi. Buna karşılık çiğ kırmızı ette *Salmonella spp.* varlığına rastlanmadı.

S. aureus bulguları: $5,0 \times 10^3$ kob/g ve üzeri sayıda mikroorganizma barındıran et ürünleri Türk Gıda Kodeksinin kanatlı eti ve kırmızı et kalitesi için yayınlamış olduğu tebliğe [147] göre tüketim açısından uygunsuz olarak kabul edilmektedir. Yaptığımız çalışmada 22 adet çiğ tavuk örneğinin 5’ inde; 16 adet çiğ kırmızı et örneğinin 2’sinde ise $5,0 \times 10^3$ kob/g ve üzeri bakteri sayısına sahip *S. aureus* tespit edildi.

Çalışmamızda 14'ü yarı-pişmiş tavuk eti, 8'i yarı-pişmiş kırmızı et olmak üzere toplamda 22 adet yarı-pişmiş et ürünü incelendi. Bu yarı-pişmiş et ürünleri için mikroorganizma bulguları aşağıdaki gibidir:

Salmonella spp. bulguları: İncelenen yarı-pişmiş et ürünlerinin hiçbirinde *Salmonella spp.* varlığına rastlanmadı.

S. aureus bulguları: 14 adet yarı-pişmiş tavuk eti örneklerinden 5'in bulunan mikroorganizma sayısının Türk Gıda Kodeksi tebliğine [147] uygun olmadığı ($5,0 \times 10^3$ kob/g ve üzeri) belirlendi.

Tablo 3.1: Mikroorganizmaların incelenen örneklerdeki oransal dağılımı.

Ürün Tipi	İncelenen Örnek Sayısı (n)	Tespit Edilen Mikroorganizma Sayısı (n)	
		<i>Salmonella spp.</i>	<i>S.aureus</i>
Çiğ Et			($5,0 \times 10^3$-3×10^4 kob/g)
Tavuk Eti	22	6	5
Kırmızı Et	16	-	2
Yarı-Pişmiş Et			
Tavuk Eti	14	-	5
Kırmızı Et	8	-	-
Toplam	60	6	12

3.2 *Salmonella spp.* ve *Staphylococcus aureus* 'un Kültür Sonuçları

Yaptığımız çalışmada antibiyotik duyarlılık profillerini inceleyeceğimiz *Salmonella spp.* ve *S. aureus* mikroorganizmalarının selektif kültür yöntemleriyle izolasyonu yapıldı. Kültür için Real-Time PCR analizi sonrasında *Salmonella spp.* ve *S. aureus* ($5,0 \times 10^3$ kob/g ve üzeri) tespit edilen örnekler kullanıldı.

Petrilerdeki inkübasyonun ardından seçilen tipik koloniler antibiyotik duyarlılık testleri için kullanıldı.

3.3 Antibiyotik Duyarlılık Test Sonuçları

Kirby-Bauer Disk Difüzyon Yöntemi kullanılarak, Real-Time PCR ile *Salmonella spp.* ve *S. aureus* varlığı yönünden doğrulan 11 adet çiğ tavuk eti, 2 adet çiğ kırmızı et ve 5 adet yarı-pişmiş tavuk eti örneğinden izole edilen suşların 10 farklı antibiyotiğe karşı olan duyarlılıkları belirlendi.

Bir mikroorganizmanın in vitro ortamda antimikrobiyal ilaçlara karşı verebileceği yanıt 3 Şekilde gelişir:

Duyarlı: Mikroorganizma, yeterli dozda antimikrobiyal ilaç kullanıldığında yüksek konsantrasyonlara ulaşamayıp ortamda inhibe olur.

Orta duyarlı (Intermediyer): Antimikrobiyal ilacın normalden daha fazla dozda kullanılması halinde hedef mikroorganizmaya etkili olabileceğini ifade eder.

Dirençli: Mikroorganizma, uygulanan antimikrobiyal ilaca karşı çeşitli yollarla direnç geliştirmiş olup üremesine devam eder.

Antibiyotik disklerle yapılan inkübasyon sonrasında oluşan ve mikroorganizmaları inhibe edici zon daire Şeklinde gözlendi. Oluşan zon çapları cetvel yardımıyla ölçülerek mikroorganizmaların antibiyotiğe karşı olan duyarlılıkları belirlendi.

***Salmonella spp.*' de görülen direnç bulguları aşağıdaki gibidir:**

- ❖ Kloramfenikol antibiyotiğine karşı %83,33 oranında duyarlı olan *Salmonella*, bu antibiyotiğe %16,66 oranında orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.
- ❖ *Salmonella spp.*' nin Penisillin G antibiyotiğine karşı %100 direnç gösterdiği gözlemlendi.
- ❖ Basitrasin antibiyotiğine karşı %83,33 oranında duyarlı olan *Salmonella*, bu antibiyotiğe %16,66 oranında dirençli olduğu gözlemlendi.
- ❖ *Salmonella spp.*' nin Oksitetrasiklin antibiyotiğine karşı %100 duyarlı davranış gösterdiği gözlemlendi.
- ❖ Sulfametoksazol antibiyotiğine karşı %83,33 oranında direnç gösteren *Salmonella*, bu antibiyotiğe %16,66 oranında orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.
- ❖ Neomisin antibiyotiğine karşı %66,66 oranında duyarlı davranış gösteren *Salmonella*, aynı antibiyotiğe %33,33 oranında orta duyarlı (intermediyer) olduğu gözlemlendi.
- ❖ Novobiosin antibiyotiğine karşı %66,66 oranında duyarlı olan *Salmonella*, aynı antibiyotiğe %33,33 oranında orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.
- ❖ *Salmonella spp.*' nin Tetrasiklin antibiyotiğine karşı %100 duyarlı davranış gösterdiği gözlemlendi.
- ❖ Eritromisin antibiyotiğine karşı %66,66 oranında direnç gösteren *Salmonella*, bu antibiyotiğe %33,33 oranında orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.
- ❖ Ampisilin antibiyotiğine karşı %66,66 oranında direnç gösteren *Salmonella*, bu antibiyotiğe %33,33 oranında orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.

Staphylococcus aureus' da görülen direnç bulguları aşağıdaki gibidir:

- ❖ *S. aureus*, Kloramfenikol antibiyotiğine karşı %100 duyarlı olarak gözlemlendi.
- ❖ Penisillin G antibiyotiğine karşı %83,33 oranında direnç gösteren *S. aureus*, bu antibiyotiğe %16,66 oranında orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.
- ❖ Basitrasin antibiyotiğine karşı %83,33 oranında duyarlı olan *S. aureus*, bu antibiyotiğe %16,66 oranında dirençli olduğu gözlemlendi.
- ❖ Oksitetrasiklin antibiyotiğine karşı %75 direnç gösteren *S. aureus*, bu antibiyotiğe %25 oranda orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.
- ❖ Sulfametoksazol antibiyotiğine karşı %83,33 oranında direnç gösteren *S. aureus*, bu antibiyotiğe %16,66 oranında orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.
- ❖ Neomisin antibiyotiğine karşı %91,66 oranında duyarlı davranış gösteren *S. aureus*, aynı antibiyotiğe %8,33 oranında orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.
- ❖ Novobiosin antibiyotiğine karşı %83,33 oranında duyarlı olan *S. aureus*, aynı antibiyotiğe %16,66 oranında orta duyarlı (intermediyer) olarak gözlemlendi.
- ❖ Tetrasiklin antibiyotiğine karşı %75 oranında direnç gösteren *S.aureus*, bu antibiyotiğe %25 oranında orta duyarlı (intermediyer) gözlemlendi.
- ❖ Eritromisin antibiyotiğine karşı %83,33 oranında direnç gösteren *S. aureus*, bu antibiyotiğe %8,33 oranında orta duyarlı (intermediyer) ve %8,33 oranında duyarlı olarak gözlemlendi.
- ❖ *S. aureus'* un, Ampisilin antibiyotiğine karşı %100 dirençli davranış gösterdiği gözlemlendi.

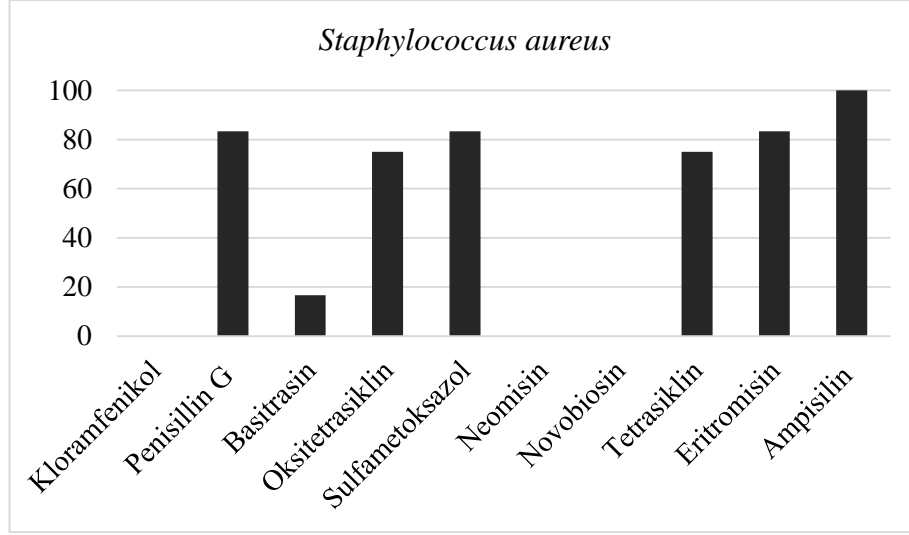
Yapılan antibiyotik duyarlılık test sonuçlarında *Salmonella spp.* ve *S.aureus* mikroorganizmaları için tetrasiklin ve oksitetrasiklin antibiyotiklerinin etkilerinde anlamlı bir farklılık ($p<0,05$) gözlenmiştir.

Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık sonuçlarına ait miktar ve yüzdesel oranlar Tablo 3.2' de verilmiştir.

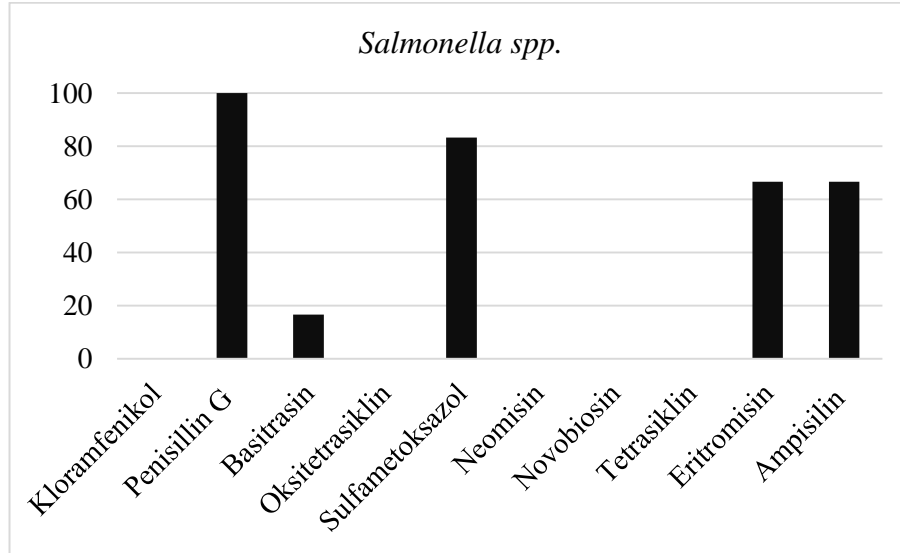
Tablo 3.2: Mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılık sonuçları.

Antibiyotik Çeşidi	Mikroorganizma Sayısı (n)						İstatistiksel Anlamlılık (p)
	<i>Salmonella spp.</i> (toplam n=6)			<i>S. aureus</i> (toplam n=12)			
	<u>Duyarlı</u>	<u>Orta-Duyarlı</u> (Intermediyer)	<u>Dirençli</u>	<u>Duyarlı</u>	<u>Orta-Duyarlı</u> (Intermediyer)	<u>Dirençli</u>	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Kloramfenikol	5 (83,33)	1 (16,66)	0 (-)	12 (100)	0 (-)	0 (-)	0,35
Penisillin G	0 (-)	0 (-)	6 (100)	0 (-)	2 (16,66)	10 (83,33)	0,58
Basitrasin	5 (83,33)	0 (-)	1 (16,66)	10 (88,33)	0 (-)	2 (16,66)	0,99
Oksitetrasiklin	6 (100)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	3 (25)	9 (75)	0,0001
Sulfametoksazol	0 (-)	1 (16,66)	5 (83,33)	0 (-)	2 (16,66)	10 (83,33)	0,99
Neomisin	4 (66,66)	2 (33,33)	0 (-)	11 (91,66)	1 (8,33)	0 (-)	0,41
Novobiosin	4 (66,66)	2 (33,33)	0 (-)	10 (83,33)	2 (16,66)	0 (-)	0,72
Tetrasiklin	6 (100)	0 (-)	0 (-)	0 (-)	3 (25)	9 (75)	0,0001
Eritromisin	0 (-)	2 (33,33)	4 (66,66)	1 (8,33)	1 (8,33)	10 (83,33)	0,35
Ampisilin	0 (-)	2 (33,33)	4 (66,66)	0 (-)	0 (-)	12 (100)	0,11

S. aureus ve *Salmonella spp.* mikroorganizmalarının x eksenleri üzerinde verilen 10 farklı antibiyotiğe karşı göstermiş olduğu direnç yüzdeleri y eksenleri üzerinde belirtilmiş olup detaylı olarak Şekil 3.1 ve Şekil 3.2’ de gösterilmiştir.



Şekil 3.1: *Staphylococcus aureus*'un antibiyotiklere dirençlilik oranları (%).



Şekil 3.2: *Salmonella spp.*'nin antibiyotiklere dirençlilik oranları (%).

4. TARTIŞMA

İzmir ve Balıkesir piyasasında çiğ ve yarı pişmiş olarak satışı sunulan et ürünlerinden yapmış olduğumuz bu çalışmada, Real-Time PCR tekniği kullanılarak *Salmonella spp.* ve *S. aureus* varlığına bakılmış olup, Türk Gıda Kodeksi tebliğine göre uygun olmayan miktarda patojen mikroorganizma saptanan örneklerdeki izolatlarda çeşitli antibiyotiklere direnç durumu incelenmiştir.

Hayvansal gıdalar başta olmak üzere birçok gıda maddesi patojen mikroorganizmalarca oluşabilecek kontaminasyona elverişli bir ortama sahiptir. Üretimden satışı kadar uzanan süreçte gerekli hijyen kurallarına uyulmaması halinde istenmeyen mikroorganizmaların gıda maddelerine bulaşım üremeleri ve enfekte gıdaların tüketimi birçok sağlık problemini de beraberinde getirmektedir. Stafilokoklar, ürettiği enterotoksinler ile gıda zehirlenmelerine sebep olmakta ve sindirim sisteminde yol açtığı sağlık problemleriyle halk sağlığı açısından oldukça önemli bir tehdit oluşturmaktadır. Bu mikroorganizmalar yalnızca insan sağlığı için bir risk faktörü olmayıp, bulaştığı hayvanların sağlığını da olumsuz yönde etkileyerek ölüme kadar gidebilecek ciddi enfeksiyonlara sebep olabilmektedir. Bu sebeple mikroorganizmaların, toplum tarafından yüksek oranda tercih edilip tüketilen et ürünlerindeki olası varlıklarının kolay, hızlı ve güvenilir metotlarca tespit edilmesi gerekmektedir.

Gıda ürünlerinde patojen mikroorganizma varlığının belirlenebilmesi için birçok metot kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemlerin yanı sıra Real-Time PCR analiz yöntemi düşük konsantrasyonlardaki mikroorganizmaları bile saptayabilmesi, hızlı ve güvenilir olması gibi birçok avantajıyla günümüzde en çok kullanılan analiz yöntemlerinden biri haline gelmiştir. Yaptığımız çalışmada sahip olduğu avantajlarından dolayı patojen mikroorganizma varlığının saptanması için Real-Time PCR analizi tercih edilmiştir.

Antibiyotikler, bakterilerin yol açtığı enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Ancak antibiyotiklerin günümüzde fazla miktarda ve bilinçsizce kullanımları, patojen mikroorganizmalarda direnç yeteneği sağlayan çeşitli mekanizmalar geliştirmiştir.

Disk difüzyon yöntemi, bakterilerin çeşitli antibiyotiklere karşı oluşturdukları direnç yanıtını görmek için hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. Bu sebeple izole edilen patojen mikroorganizmaların sebep olduğu enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilen antibiyotikleri belirlemek amacıyla disk difüzyon yöntemi tercih edilmiştir.

Gıdalarda çok düşük seviyede *Salmonella* tespit edilse bile, içinde bulunduğu gıda maddesi risk grubu olarak kabul edilmektedir. Türk Gıda Kodeksi Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliğine göre gıda gruplarında *Salmonella spp.* bulunmaması (0/25 g-mL) gerekmektedir [147,148]. Gerçekleştirmiş olduğumuz bu çalışmada Real-Time PCR analizi sonucunda 60 adet çiğ ve yarı-pişmiş et örneklerinden 6 adet çiğ tavuk eti örneğinde *Salmonella spp.* tespit edilmiştir. Tüm örnekler göz önüne alınırsa tespit edilen *Salmonella* oranı %10' dur. Çiğ kırmızı et ürünlerinde ve yarı-pişmiş et ürünlerinde ise *Salmonella spp.* varlığına rastlanmamıştır.

İzmir ve çevresinde yapılan bir çalışmada, 90 farklı yerden toplanan 260'ı tavuk eti olmak üzere toplamda 360 adet örnekte *Salmonella* izolasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada yer alan sonuçlara göre tavuk eti örneklerinde görülen *Salmonella* oranının %8,84 olduğu tespit edilmiştir. İzole edilen mikroorganizmalarda, farklı antibiyotik grupları için direnç durumu belirlenmiş olup %30,4 amoksisilin, % 78,2 eritromisin, % 43,5 kanamisin, % 39,1 nalidiksik asit, % 78,2 tetrasiklin ve % 52,2 trimetoprim direnci bulunmuştur [149].

Ankara ilindeki marketlerde tüketime sunulan ürünlerle yapılan bir diğer çalışmada 210 adet örnekte *Salmonella* izolasyonu yapıldıktan sonra mikroorganizmaların antibiyotik dirençlilikleri araştırılmıştır. 160 örneğin tavuk orijinli olduğu bu çalışmada 94 (%58,7) tavuk örneğinde *Salmonella* saptanmıştır. İzole edilen *Salmonella* suşlarının 92'si (%98) *Salmonella spp.*, 2'si (%2) *Salmonella paratyphi A* olarak tanımlanmıştır. Tavuk örneklerinde tanımlanan *Salmonella* izolatlarının dirençli oldukları antibiyotik türleri ve oranları (%71,3-%84,1) ampisilin, (%78,7-%95,7) tetrasiklin, (%38,3-%48,9) kloramfenikol, (%41,5-%47,9) streptomisin, (%12,7) trimetoprim/sulfometoksazol, (%81,9) triple sülfonamid, (%19,1) kanamisin, (%13,8) siprofloksasin, (%80,8) nalidiksik asit olarak bulunmuştur [150].

Salmonella varlığını incelemek amacıyla 288 tüketime hazır döner örneği üzerinde yapılan bir çalışmada PZR yöntemi ile yapılan identifikasyon sonucunda 15 örnekte (%5,2) *Salmonella enteritis* tespit edilmiştir [151].

Aydın ilinde farklı satış noktalarından toplanan 100 adet çiğ tavuk eti örneği, *Salmonella spp.* varlığı yönünden incelenmiş ve 15 (%15) örnekte *Salmonella spp.* tespit edilmiştir [38].

Salmonella spp.' nin izolasyonu ve antibiyotik direnç karakterizasyonu üzerine yapılan bir çalışmada Vietnam market ve süpermarketlerinden toplanan 180 et ürününde sığır etini kapsayan 50 örnekte %62 oranında, tavuk etini kapsayan 30 örnekte %53,3 oranında *Salmonella spp.* tespit edilmiştir. Tetrasiklin, ampisilin/amoksisilin, nalidiksik asit, sulfafurazol ve streptomisin antibiyotiklerine direnç durumu sırasıyla %40,7, %22,0, %18,7, %16,5 ve %14,3 olarak bulunmuştur. Kloramfenikol, kanamisin, gentamisin antibiyotiklerine direnç ise %2,2-8,8 arasında saptanmıştır [39].

Ankara piyasasında yapılan bir diğer çalışmada 120 adet tavuk örneğinden yapılan izolasyon, tanımlama ve antibiyotik direnç analizlerinde 16 örnekte (%13) *Salmonella spp.* izole etmiştir. Çalışma sonucunda %75 ampisilin, %94 gentamisin, %75 tetrasiklin, %88 eritromisin, %19 neomisin, %44 streptomisin direnci saptanmıştır [152].

Çin'de yapılan bir çalışmada; 515'i tavuk, 78'i sığır eti ve 80'i kuzu eti olan toplamda 764 perakende et örneğinde *Salmonella* tanınması ve karakterizasyonu çalışılmış olup tüm örnekler göz önüne alındığında 333 örnek (44%) *Salmonella spp.* pozitif bulunmuştur. İzolatların antibiyotik direnç durumları incelendiğinde %67 sulfametoksazol, %58 trimetoprim/sulfametoksazol ve %56 tetrasiklin direnci gözlenmiştir [153].

Güney Kore’de yapılan bir çalışmada tavuk ve sığır etlerini de içeren toplamda 131 adet çiğ et örneğinde *Salmonella* serovarlarının tanımlanması, antibiyotik direnci ve moleküler karakterizasyonu yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda 26 adet tavuk etinin 11’inde (%42,3); 49 adet sığır eti örneğinin ise 1’inde (%2) *Salmonella* saptanmıştır. Antibiyotik direnç profilleri incelendiğinde izole edilen tüm *Salmonella* suşlarının eritromisin dirençli olduğu gözlenmiştir. Streptomisin direnci %22,3, tetrasiklin ve kloramfenikol direnci ise %16,7 olarak belirtilmiştir [154].

Türk Gıda Kodeksi Çiğ Kanatlı Eti ve Hazırlanmış Kanatlı Eti Karışımları Tebliği ve Türk Gıda Kodeksi Çiğ Kırmızı Et ve Hazırlanmış Kırmızı Et Karışımları Tebliğine göre gıdalardaki kabul edilebilir *S. aureus* sayısı en fazla $5,0 \times 10^3$ kob/g olmalıdır [147]. Bu bilgi doğrultusunda toplamda 12 adet örneğin tebliğe uygun olmadığı ($5,0 \times 10^3$ kob/g ve üzeri) belirlenmiştir.

Stafilokok kaynaklı gıda zehirlenmeleri, bu mikroorganizmaların ısıya dayanıklı enterotoksinler üretmelerine bağlı olarak gerçekleşmektedir. Mikroorganizmadaki toksin üretimi, etin bir gramında bulunan toplam hücre sayısı 100.000’e ulaşınca mevcut olmaktadır [155]. Bu bilgiler doğrultusunda analiz edilen örneklerde, enterotoksin oluşturabilecek seviyede *S. aureus* tespit edilememiştir.

Osman ve ark. 2017 yılında yaptıkları çalışmalarında 100 ithal sığır eti örneğinde 23 adet (%23) stafilokokal izolat elde etmişlerdir. İzole edilen mikroorganizmaların 3’ü *S. aureus*, 6’sı *S. hyicus*, 3’ü *S. intermedius*, 1’i *S. epidermidis*, 1’i *S. hemolyticus*, 1’i *S. hominis*, 3’ü *S. lugdunensis*; 1’i *S. simulans* ve 4’ü *S. scuri* olarak serotiplendirmişlerdir. İzolatlardan %96’ sının penisillin ve sulfametoksazol/trimetoprim dirençli olduğunu; 23 izolattan yalnızca 1’ inin kloramfenikol dirençli olduğunu belirtmişlerdir. İzolatların eritromisin, metisilin, tetrasiklin ve ampisilin antibiyotiklerine ise %50’ den daha az oranda direnç gösterdiklerini gözlemlemişlerdir [49].

Özdemir ve Keyvan 2016 yılında yapmış oldukları araştırmada Ankara’da bulunan çeşitli süpermarketlerden topladıkları sığır, koyun ve piliç etlerini içeren 225 örnekte *S. aureus*’ un izolasyonunu gerçekleştirip, enterotoksijenik özelliklerini gösteren analizler yapmışlardır. İzole ettikleri 114 adet *S. aureus* suşundan 88’inin (%77,1) enterotoksijenik özellik gösterdiğini bulmuşlardır [156].

Ankara’da yapılan bir diğerk çalışmada 50 çiğ et ve tavuk döner örneğini de kapsayan toplamda 100 adet döner örneğinde çeşitli mikroorganizmaların varlığına bakılarak antibiyotik dirençleri belirlenmiştir. Çalışmada elde edilen verilere göre 50 adet çiğ et dönerinde 14 adet (%28) *S. aureus* tespit edilmiştir. Döner örneklerinin %100 (23)’ünün; Gentamisin, Eritromisin, Tetrasiklin, Kloramfenikol, Sefalotin, Streptomisin ve Vankomisin’e duyarlı oldukları bulunmuştur. Çiğ ve pişmiş tavuk döner örneklerinden elde edilen izolatların Ampisilin’e %80 (8), çiğ ve pişmiş et döner örneklerinden elde edilen izolatların ise Ampisilin’e %20 (12) oranında dirençli oldukları tespit edilmiştir [144].

Kaya ve ark. 2015 yılında yapmış oldukları çalışmalarında *S. aureus* ve enterotoksin varlığı yönünden 100 tavuk eti örneğini inceleyerek %30 oranında *S. aureus* kontaminasyonu tespit etmişlerdir. Söz konusu kontaminasyon düzeyinin ise 2×10^1 kob/g ile 1×10^8 kob/g aralığında olduğunu belirtmişlerdir [55].

Adana’ da yapılan bir çalışmada marketlerden temin edilen 50 adet tavuk eti örneğinden izole edilen 30 tane gram-pozitif koktan 4 tanesinin *S. aureus* olduğu tanımlanmıştır. Bu *S. aureus* suşlarının eritromisin direnci %25, tetrasiklin direnci %77,2, vankomisin direnci % 59, teikoplanin direnci %9 ve kloramfenikol direnci %27,2 olarak rapor edilmiştir [157].

Ankara’ da çeşitli marketlerden toplanan ve içlerinde dana kıyma ve tavuk but örneklerinde bulunduğu 100 adet gıda örneğinden izole edilen 232 stafilokok izolatında antibiyotik direnç profili incelenmiştir. Sonuçlara göre suşların 85’i (%36,6) ampisilin’e, 55’i (%23,7) tetrasiklin’e, 46’sı (%19,8) eritromisin’e, 31’i (%13,4) metisilin’e, 18’i (%7,7) kloramfenikol’e dirençli olarak bulunmuştur [158].

Türkiye’ de yapılan bir diğerk araştırmada çeşitli et örneklerinde *S. aureus* varlığı araştırılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre çiğ kırmızı et ve tavuk etini içeren toplamda 150 tane örneğin 80 tanesinde *S. aureus* suşu izole edilmiştir. İzole edilen suşlardan yapılan antibiyotik duyarlılık testlerinde ise 54 adet (% 67,5) Metisilin'e, 70 adet (% 87,5) Basitrasin'e, 43 adet (% 53,8) Penisilin G' ye direnç gözlenmiştir. 74'ünün (% 92,5) Eritromisin' e duyarlı oldukları tespit edilmiştir [159].

İzmir'de gerçekleştirilen bir çalışmada, çeşitli marketlerden toplanan 42 adet tavuk ve hindi eti örneğinde *S. aureus* için tespit, sayım ve tanılama yapılmıştır. İncelenen örneklerin tümünde *S. aureus* tespit edilmiş olup, örneklerdeki patojen *S. aureus* sayısının Mannitol Salt Agar (MSA)' da $1,0 \times 10^3 - 6,5 \times 10^6$ cfu/g aralığında olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda analiz edilen örneklerin *S. aureus* bakımından yeterli kalitede olmadığı ve %9,5'lik kısmının gıda zehirlenmesine sebep olabileceği belirtilmiştir [160].

Kütahya ilinde tavuk etlerinin *S. aureus* varlığı ve antibiyotik duyarlılığını kapsayan çalışmada toplamda 45 adet tavuk örneği çalışılmıştır. Elde edilen 36 adet şüpheli stafilokok suşu üzerinde yapılan polimeraz zincir reaksiyonu analizi sonucunda 12 tanesinin (%26,7) *S. aureus* olduğu tespit edilmiştir. 12 adet *S. aureus* suşunun %16,7 oranda Trimetoprim/sulfametoksazol ve Enrofloksasin' e, %58,3 oranda Tetrasikline, %41,7 Ampisilin'e, %25 Eritromisin'e, %33,3 Amoksisilin' e dirençli olduğu bulunmuştur [161].

İstanbul piyasasında gerçekleştirilen bir çalışmada, farklı firmalardan toplanan kanat, but ve göğüs olmak üzere toplamda 90 adet tavuk örneği, hijyenik kalite açısından değerlendirilmiştir. 2 adet kanat (%6,6), 2 adet but (%6,6) ve 2 adet göğüs (%6,6) örneğinde saptanan *S. aureus*'un hijyenik açıdan ulusal ve uluslararası kriterlere uygun olmadığı gözlenmiştir [162].

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yaptığımız çalışmada tüm çiğ ve yarı-pişmiş et ürünlerinde gözlenen ve tebliğe uygun olmayan *Salmonella spp.* %10 iken *S. aureus* %20 oranındadır. Ülkemizde ve yurtdışında yapılan birçok çalışmada çiğ ve yarı-pişmiş et ürünlerinde değişken oranlarda *Salmonella spp.* ve *S. aureus* olduğu gözlemlenmiştir. Genel olarak çiğ ve yarı-pişmiş et ürünlerinde saptanan patojen mikroorganizma miktarı arasında farklılık görülmektedir. Yarı-pişmiş et ürünlerinde gözlenen daha düşük sayıdaki mikroorganizma varlığının, bu ürünlerin fabrikasyon aşamasında ısı işlemlere maruz kalmasından dolayı sonuçlanabileceğini göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan tüm örnekler göz önünde bulundurulduğunda yalnızca çiğ tavuk etinde *Salmonella* tespit edilmesi ise tedarikçi firmanın kesim şartlarından hazırlanan gıda ürünlerinin satışına kadar olan üretim sürecinde bazı hijyen problemlerinin mevcut olduğu sonucuna varılmaktadır.

Ülkemizde tüketim potansiyeli yüksek olan çiğ ve yarı-pişmiş gıda ürünlerinin, *S. aureus* ve *Salmonella spp.* ile kontamine olması durumunda, gıda zehirlenmeleri bakımından risk faktörü niteliğinde olabileceği belirlenmiştir. Elde edilen sonuçların bir kısmı patojen mikroorganizma yönünden halk sağlığı için uygun bulunmamıştır. Bu nedenle özellikle çiğ et ürünlerinin gerek üretim gerekse marketlere transfer koşullarının iyileştirilmesi gerektiği düşünülmektedir.

Mikroorganizmaların antibiyotiklere olan dirençlilikleri farklılık gösterebildiğinden, olası gıda zehirlenmeleri ve çeşitli hastalık vakalarının tedavisinde mikroorganizmaların antibiyotik duyarlılıkları önceden belirlenerek daha bilinçli bir antibiyotik kullanımı hedeflenmiştir. Ayrıca küçük çocuklar, yaşlılar ve tedavi gören hastalar için patojen bakteriler çok büyük bir risk grubu olduğundan özellikle bu kişilerin sağlıkları açısından selektif ve bilinçli bir tedavinin daha faydalı olacağı düşünülmektedir. Bu sebepler doğrultusunda tedavi sürecinde mikroorganizmaların duyarlı olduğu antibiyotiklerin kullanılması gerekmektedir.

Yaptığımız tüm analizler göz önüne alındığında elde edilen sonuçlarla literatür sonuçları arasında hem benzerlikler hem de farklılıklar gözlemlenmiştir. Farklılıkların bir sebebi çalışılan örneklem sayısının az olması olabilir. Kullanılan moleküler metotlardaki hassasiyet farklılıkları, örneklerin toplanma ve işlenmesindeki farklılıklar da diğer sebepler olabilir.

6. KAYNAKLAR

- [1] İşeri, Ö., ve Erol İ., “Hindi etinden kaynaklanan başlıca bakteriyal infeksiyon ve intoksikasyonlar”, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 56, 47-54, (2009).
- [2] OECD, USDA, BESD-BİR, ve TÜİK, “Seçilmiş Ülkelerin 2015 Yılı Kişi Başına Et Tüketimleri (Kg) [online]”, (08.04.2018), http://www.besd-bir.org/assets/documents/secilmiA_ylkeler_tyketim1.pdf, (2015).
- [3] Akkara, M., “Kanatlı Endüstrisinde Kuru Buz Tekniğinin Kullanım Olanaklarının Araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Celal Bayar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Manisa, (2012).
- [4] Sağdıç, O., Ekici, L., ve Yetim, H., “Gıdaların Muhafazasında Yeni Mikrobiyal İnaktivasyon Metotları”, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, 949-952, (2008).
- [5] Üstündağ Çayır, H., ve Yalçın, H., “Bakteriyosinler ve Gıdalarda Kullanımı”, *Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 5(1), 53-65, (2017).
- [6] Cleveland, J., Montville, J. T., Nes, F. I., and Chikindas, L. M., “Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation”, *International Journal of Food Microbiology*, 71, 1-20, (2001).
- [7] Yang, S. C., Lin, C. H., Sung, T. C., and Fang, J. Y., “Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals”, *Frontiers in Microbiology*, 5, doi: 10.3389/fmicb.2014.00241, (2014).
- [8] Demirci, A. Ş., ve Güner, K. G., “Işınlatma ve Gıda Güvenliği”, *Türkiye 10. Gıda Kongresi*, Erzurum, 949-952, (2008).
- [9] Budak, A., ve Obuz, E., “Gıdalarda İyonize Radyasyon Uygulamaları”, *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, 671-674, (2006).

- [10] Agel, E., “Gıdaların halk sağlığı ve ekonomik açısından nemi”, Tübitak Araştırma Merkezi, *Sağlık Dşnesi ve Tıp Kültürü Platformu*, (2007).
- [11] z, V., Karadayı, Ő., akan, H., Karadayı, B., ve Kaya, A., “Acil tedavi birimlerinde gıda zehirlenmeleri”, *Marmara Medical Journal*, 27, 89-95, (2014).
- [12] Güner, A., Atasever, M., ve Aydemir Atasever, M., “Yeni ortaya çıkan ve tekrar önem kazanan gıda kaynaklı bakteriyel patojenler”, *Kafkas Universitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 18(5), 889-898, (2012).
- [13] akıcı, N., Demirel Zorba, N. N., ve Akçalı, A., “Gıda endüstrisi çalışanları ve stafilokokal gıda zehirlenmeleri”, *Türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 72(4), 337-50, (2015).
- [14] Őener, A., ve Temiz, A., “Tavuk Kesimhane ve İşletmelerinde Kullanılan Ticari Dezenfektanlar ve Etkinlikleri”, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 02(10), 1-28, (2004).
- [15] Kketin, A., ve Milci, S., “*Staphylococcus aureus* ile kontamine olan peynirlerden kaynaklanan gıda zehirlenmeleri”, *Gıda*, 33(3), 129-135, (2008).
- [16] Şenel, Y., ve Başoğlu, F., “Gıda İşletmelerinde Kullanılan Bazı Dezenfektanların Mikroorganizmalar zerine Etkileri”, *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 16, 105-115, (2002).
- [17] Kutu, A., “Kanatlılarda *Salmonella* türlerinin izolasyonu, serotiplendirilmesi ve antibiyotik duyarlılıklarının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Aydın, (2017).
- [18] Ellingson, J. L. E., Anderson, J. L., Carlson, S. A., and Sharma, V. K., “Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products”, *Molecular and Cellular Probes*, 18(1), 51-57, (2004).

- [19] Khan, A. A., Melvin C. D., and Dagdag, E. B., “Identification and molecular characterization of *Salmonella* spp. from unpasteurized orange juices and identification of new serotype *Salmonella* strain *S. enterica* serovar Tempe”, *Food Microbiology*, 24(5), 539-543, (2007).
- [20] Filazi, A., “Hayvansal gıdalardaki antibiyotik kalıntıları ve risklerinin değerlendirilmesi”, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, Ankara, (2012).
- [21] Unal, P., “Tavuk eti ve karaciğerlerinde eritromisin kalıntılarının aranması üzerinde çalışmalar”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (1992).
- [22] İşeri, Ö., “Hindi kıymalarında *Salmonella*’ların varlığı ve antibiyotik dirençliliklerinin belirlenmesi”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2007).
- [23] Meštrović, T., “Salmonella History [online]”, (09.04.2018), <https://www.news-medical.net/health/Salmonella-History.aspx>, (2017).
- [24] Ünlü, A. T., “Tavuklarda *Salmonella* tanısında kültür ve Real Time PCR’ın kullanımı”, Doktora Tezi, *Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2011).
- [25] D’aooust, J. Y., “*Salmonella* species in”: (Eds. Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J.), *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, Washington D.C.: ASM Press, 129-157, (1997).
- [26] Henning, M. W., and Greenfield, E. C., “*Salmonella* bovis-morbificans (Basenau) from an outbreak of food-poisoning in the Cape Province”, *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry*, 8(2), (1937).
- [27] Forshell, L. P., and Wierup, M., “*Salmonella* contamination: a significant challenge to the global marketing of animal foods products”, *Revue Scientifique Technique Office International des Epizooties*, 25(2), 541-554, (2006).

- [28] Le Minor, L., and Popoff, M. Y., “Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*”, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 465–468, (1987).
- [29] Ryan, M. P., O’Dwyer, J. and Adley, C. C., “Evaluation of the Complex Nomenclature of the Clinically and Veterinary Significant Pathogen *Salmonella*”, *BioMed Research International*, (2017).
- [30] Tonbak, F., Atasever, M., ve Çalıcıoğlu, M., “Kanatlı etlerinde *Salmonella* riski”, *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, 12(1), 90-98, doi:10.17094/ataunivbd.309781, (2017).
- [31] Kılınç, Ü., ve Aydın, F., “Kayseri yöresindeki tavukçuluk işletmelerinden toplanan tavuklardan izole edilen *Salmonella* türlerinin antibiyotik duyarlılıkları”, *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 15(1), 35-40, (2006).
- [32] Cilo, B. D., Özmerdiven, G. E., Efe, K., Güleşen, R., Levent, B., Ağca, H., vd., “Güney Marmara bölgesinde izole edilen *Salmonella* serotiplerinin dağılımı ve antibiyotik duyarlılıkları”, *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 45(3), 122-127, doi:10.5222/TMCD.2015.122, (2015).
- [33] Madigan, M. T., and Martinko, J. M., (Ed. Çökmüş, C.), *Brock Biology of Microorganisms*, Eleventh Edition, 714, (2006).
- [34] Todd, B., “Gıda kaynaklı *Salmonella* infeksiyonları ve son durum [online]”, (09.04.2018), <http://www.ggd.org.tr/icerik.php?id=462>, (2013).
- [35] Perelle, S., Dilasser, F., Malorny, B., Grout, J., Hoorfar, J., and Fach, P., “Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples”, *Molecular and Cellular Probes*, 18, 409-420, (2004).
- [36] Zhu, Y., Lai, H., Zou, L., Yin, S., Wang, C., and Han, X., “Antimicrobial resistance and resistance genes in *Salmonella* strains isolated from broiler chickens along the slaughtering process in China”, *International Journal of Food Microbiology*, 259, 43–51, doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.07.023, (2017).

- [37] Yıldırım, Z., Ceylan, Ş., ve Öncül N., “Tokat piyasasında satışı sunulan tavuk etlerinin mikrobiyolojik kalitesinin belirlenmesi”, *Akademik Gıda*, 13(4), 304-316, (2015).
- [38] Altın, B., “Aydın ilinde satışı sunulan kanatlı etlerinde *Salmonella* spp. ve *Campylobacter jejuni* varlığının araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü*, Aydın, (2017).
- [39] Van, T. T. H., Moutafis, G., Istivan, T., Tran, L. T., and Coloe, P. J., “Detection of *Salmonella* spp. in retail raw food samples from vietnam and characterization of their antibiotic resistance”, *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21), 6885–6890, doi.org/10.1128/AEM.00972-07, (2007).
- [40] Yavuz, O., “Antibiyotiklere karşı çapraz direnç”, *Ondokuz Mayıs Üniversitesi Veteriner Fakültesi*, Farmakoloji ve Toksikoloji Anabilim Dalı, Samsun, (2015).
- [41] Lowy, F. D., “*Staphylococcus aureus* infections”, *The New England Journal of Medicine*, 339, 520-532, (1998).
- [42] Orent, W., “A Brief History of Staph [online]”, (10.04.2018), <http://protomag.com/articles/a-brief-history-of-staph>, (2006).
- [43] Food Safety and Inspection Service, “Introduction to the Microbiology of Food Processing”, *United States Department of Agriculture*, (2012).
- [44] Halkman A. K., “Gıda Mikrobiyolojisi II ders notları”, *Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü*, (2013).
- [45] Hennekinne, J. A., De Buyser, M. L., and Dragacci, S., “*Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: Characterization and outbreak investigation”, *FEMS Microbiology Reviews*, 36(4), 815–836, doi.org/10.1111/j.1574-6976.2011.00311.x, (2012).

- [46] Özpınar, N., “Erzincan Tulum Peynirinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus* İzolatlarında Antibiyotik Direncinin ve Biyofilm Oluşturma Özelliğinin Fenotipik ve Genotipik Olarak Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Veteriner Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Kayseri, (2011).
- [47] Foster, T., *Medical Microbiology*, University of Texas Medical Branch, Galveston, (1996).
- [48] Hazımoğlu, Ş., “*Staphylococcus aureus* suşlarında Panton-valentine Lölosidin (Pvl) genlerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimler Enstitüsü*, Aydın, (2011).
- [49] Osman, K., Alvarez-Ordóñez, A., Ruiz, L., Badr, J., ElHofy, F., Al-Maary, K., et al., “Antimicrobial resistance and virulence characterization of *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci from imported beef meat”, *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 1–10, doi.org/10.1186/s12941-017-0210-4, (2017).
- [50] Thapaliya, D., Forshey, B. M., Kadariya, J., Quick, M. K., Farina, S., O’ Brien, A., et al., “Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA”, *Food Microbiology*, 65, 122–129, doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.015, (2017).
- [51] Can, H. Y., Elmalı, M., and Karagöz, A., “Molecular Typing and Antimicrobial Susceptibility of *Staphylococcus aureus* Strains Isolated from Raw Milk, Cheese, Minced Meat, and Chicken Meat Samples”, *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 37(2), 175–180, doi.org/10.5851/kosfa.2017.37.2.175, (2017).
- [52] Loir, Y. L., “*Staphylococcus aureus* and food poisoning [online]”, (10.04.2018), http://www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol11-2/sim0009_full_text.htm,GMR, (2003).

- [53] Bilge, F., ve Karaboz İ., “İzmir’de piyasada açıkta satışı sunulan bazı gıdaların *Staphylococcus aureus* ve enterotoksinleri bakımından incelenmesi”, *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi*, 3(6), 6, (2005).
- [54] Enright, M. C., Day, N. P. J., Davies, C. E., Peacock, S. J., and Spratt, B. G., “Multilocus Sequence Typing for Characterization of Methicillin-Resistant and Methicillin-Susceptible Clones of *Staphylococcus aureus*”, *Journal of Clinical Microbiology*, 38(3), 1008–1015, doi.org/10.1128/AAC.49.5.2098, (2000).
- [55] Kaya, H., Onmaz, N.E., Gönülalan Z., ve Al, S., “Kayseri ilinde tüketime sunulan tavuk etlerinde *Staphylococcus aureus* ve enterotoksin varlığının araştırılması”, *Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 12(2), 93-98, (2015).
- [56] Abdalrahman, L., Wells, H., and Fakhr, M., “*Staphylococcus aureus* is More Prevalent in Retail Beef Livers than in Pork and other Beef Cuts”, *Pathogens*, 4(2), 182–198, doi.org/10.3390/pathogens4020182, (2015).
- [57] Bhunia A.K., “*Foodborne Microbial Pathogens*”, New York: Springer, 125-203, (2008).
- [58] Cha, J. O., Lee, J. K., Jung, Y. H., Yoo, J. I., Park, Y. K., Kim, B. S., et al., “Molecular analysis of *Staphylococcus aureus* isolates associated with staphylococcal food poisoning in South Korea”, *Journal of Applied Microbiology*, 101(4), 864–871, (2006).
- [59] Thapaliya, D., Forshey, B. M., Kadariya, J., Quick, M. K., Farina, S., O’ Brien, A., et al., “Prevalence and molecular characterization of *Staphylococcus aureus* in commercially available meat over a one-year period in Iowa, USA”, *Food Microbiology*, 65, 122–129, doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.015, (2017).
- [60] Chen, S., Zhao, S., White, D. G., Schroeder, C. M., Lu, R., Yang, H., et al., “Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Serovars Isolated from Retail Meats”, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(1), 1–7, doi.org/10.1128/AEM.70.1.1-7.2004, (2004).

- [61] Demirtürk, N., ve Demirdal, T., “Antibiyotiklerde Direnç Sorunu”, *Kocatepe Tıp Dergisi*, 5, 17–21, (2004).
- [62] Topal, M., Şenel, G. U., Arslan Topal, E. I., ve Öbek, E., “Antibiyotikler ve kullanım alanları”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31(3), 121-127, (2015).
- [63] Dzidic, S., Suskovic, J., and Kos, B., “Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects”, *Food Technology and Biotechnology*, 46(1), 11–21, (2008).
- [64] Wegener, H. C., “Antibiotics in animal feed and their role in resistance development”, *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 439–445, (2003).
- [65] Mehta, R., and Champney, W. S., “Neomycin and Paromomycin Inhibit 30S Ribosomal Subunit Assembly in *Staphylococcus aureus*”, *Current Microbiology An International Journal*, 47, 237–243, (2003).
- [66] Pankey, G. A., and Sabath, L. D., “Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram- Positive Bacterial Infections”, *Clinical Infection Diseases*, 38, (2004).
- [67] Nemeth, J., Oesch, G., and Kuster, S. P., “Bacteriostatic versus bactericidal antibiotics for patients with serious bacterial infections: systematic review and meta-analysis”, *Antimicrobial Chemotherapy*, 70, 382-395, (2015).
- [68] Akhan, A. G., “Antibiyotiklerin Sınıflandırılması”, *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu*, (1997).
- [69] Kohanski, M. A., Dwyer, D. J., and Collins, J. J., “How antibiotics kill bacteria : from targets to networks”, *Nature Publishing Group*, 8(6), 423–435, (2010).
- [70] Liwa, A. C., and Jaka, H., “Antimicrobial resistance: Mechanisms of action of antimicrobial agents”, *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, 876–885, (2015).

- [71] Sinan, O., ve Uşak, M., “Protein Sentezinde DNA Eşlenir mi?”, *Middle Eastern and African Journal of Educational Research*, 15, (2015).
- [72] Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., and Steitz, T. A., “The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis”, *Science*, 289, 920–930, (2000).
- [73] Cocito, C., Giambattista, M. D., Nyssen, E., and Vannuffel, P., “Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 39, 7–13, (1997).
- [74] Atabey, C., “Piyasada satışı sunulan peynirlerden elde edilen jenerik *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* suşlarının antibiyotik dirençliliklerinin belirlenerek, mastitis kontrol ve tedavi programlarında kullanılan antibiyotiklerle ilişkisinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Aydın, (2011).
- [75] Katz, L., and Ashley, G. W., “Translation and protein synthesis: macrolides”, *Chemical Reviews*, 105, 499–528, (2005).
- [76] Mukhtar, T. A., and Wright, G. D., “Streptogramins, oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis”, *Chemical Reviews*, 105, 529–542, (2005).
- [77] Drlica, K., and Zhao, X., “DNA Gyrase, Topoisomerase IV, and the 4-Quinolones”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(3), 377–392, (1997).
- [78] Floss, H. G., and Yu, T., “Rifamycins-Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis”, *Chemical Reviews*, 105, 621-632, (2005).
- [79] Etebu, E., and Arikekpar, I., “Antibiotics: Classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives”, *International Journal of Applied Microbiology and Biotechnology Research*, 4, 90–101, (2016).
- [80] DrugBank, “Benzylpenicillin [online]”, (16.04.2018), <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01053>, (2005).

- [81] Hu, Y., Li, J., Zhang, Z., Zhang, H., Luo, L., and Yao, S., “Imprinted sol–gel electrochemical sensor for the determination of benzylpenicillin based on Fe₃O₄@SiO₂/multi-walled carbon nanotubes-chitosans nanocomposite film modified carbon electrode”, *Analytica Chimica Acta*, 698, 61-68, (2011).
- [82] Öncül, O., “Antibiyotikler I”, *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri, Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi*, 31, 23-38, (2002).
- [83] Nikravan, A., “Amoxicillin and Ampicillin Removal from Wastewater by Fenton and Photo-Fenton Processes”, Degree of Master of Science, *Environmental Engineering in the Graduate School of Science and Engineering at Hacettepe University*, (2015).
- [84] Jeli, D., and Antolović, R., “From Erythromycin to Azithromycin and New Potential Ribosome-Binding Antimicrobials”, *Antibiotics*, 5, 29 (2016).
- [85] DrugBank, “Erythromycin [online]”, (16.04.2018), <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00199>, (2005).
- [86] Biteksöz, S., “Eritromisin, Azitromisin ve Klaritromisinin *Stafilococcus aureus* suşları üzerine antibiyotik sonrası etkilerinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (1997).
- [87] Seiple, I. B., Zhang, Z., Jakubec, P., Langlois-mercier, A., Wright, P. M., Hog, D. T. et al., “A platform for the discovery of new macrolide antibiotics”, *Nature*, 533(7603), 338–345, (2016).
- [88] McGuire, J. M., Bunch, R. L., Anderson, R. C., Boaz, H. E., Flynn, E. H., Powell, H. M., et al., “Ilotycin, a new antibiotic”, *Antibiotics and Chemotherapy*, 2, 281–283, (1952).
- [89] DrugBank, “Neomycin [online]”, (16.04.2018), <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00994>, (2005).
- [90] Ergün, G., “Clemizole Benzil Penisilin ve Streptomisin Sülfat antibiyotiklerinin mikrobiyolojik miktar tayini”, Yüksek Lisans Tezi, *Yıldız Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2007).

- [91] Fan, Q., Huang, F., Leadlay, F., and Spencer, J. B., “The neomycin biosynthetic gene cluster of *Streptomyces fradiae* NCIMB 8233 : genetic and biochemical evidence for the roles of two glycosyltransferases and a deacetylase”, *Organic and Biomolecular Chemistry*, 63306–3314, (2008).
- [92] Harmancı, C., “Doğal konak üzerinde yetiştirilen *Pimpla Turionellae* L. (Hymenoptera: Ichneumonidae)’nın Yaşama ve Gelişimine Neomisinin Etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Bülent Ecevit Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Zonguldak, (2015).
- [93] Sánchez, A. R., Rogers, R. S., and Sheridan, P. J., “Tetracycline and other tetracycline-derivative staining of the teeth and oral cavity”, *International Journal of Dermatology*, 43, 709–715, (2004).
- [94] Nelson, M., and Levy, S., “The history of the tetracyclines”, *New York Academy of Sciences*, 16–32, (2011).
- [95] Nguyen, F., Starosta, A. L., Arenz, S., Sohmen, D., Dönhöfer, A. and Wilson, D. N., “Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms”, *Biological Chemistry*, 395(5), 559–575, (2014).
- [96] Sapadin, A. N., and Fleischmajer, R., “Tetracyclines: Nonantibiotic properties and their clinical implications”, *American Academy of Dermatology*, 54(2), 258-65, (2006).
- [97] Chopra, I., and Roberts, M., “Tetracycline Antibiotics : Mode of action, applications molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance”, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 232–260, (2001).
- [98] Chen, W., Liu, W., Pan, N., Jiao, W. and Wang, M., “Oxytetracycline on functions and structure of soil microbial community”, *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 13(4), 967–975, (2013).
- [99] DrugBank, “Oxytetracycline [online]”, (16.04.2018), <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00595>, (2005).

- [100] Xuan, R., Arisi, L., Wang, Q., Yates, S. R., and Biswas, K. C., “Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution”, *Journal of Environmental Science and Health*, 45, 73–81, (2010).
- [101] Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W., and Walsh, C., “Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics”, *Chemical Reviews*, 105, 425-448, (2005).
- [102] Kang, H., and Park, Y., “Glycopeptide Antibiotics: Structure and Mechanisms of Action”, *Journal of Bacteriology and Virology*, 45(2), 67–78, (2015).
- [103] Andersson, M. I., and Macgowan, A. P., “Development of the quinolones”, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1–11, (2003).
- [104] Jacoby, G. A., “Mechanisms of Resistance to Quinolones”, *Clinical Infectious Diseases*, 41, 120–6, (2005).
- [105] Tačić, A., Nikolić, V. Nikolić, L., and Savić, I., “Antimicrobial Sulfonamide Drugs”, *Advanced Technologies*, 6(1), 58-71, (2017).
- [106] Özaras, R., Tabak, F., ve Öztürk, R., “Antibiyotiklerin III”, *İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Akılcı Antibiyotik Kullanımı ve Erişkinde Toplumdan Edinilmiş Enfeksiyonlar Sempozyum Dizisi*, 31, 55-82, (2002).
- [107] Brenner, C. G. B., Mallmann, C. A., Arsand, D. R., Mayer, F. M. and Martins, A. F., “Determination of Sulfamethoxazole and Trimethoprim and Their Metabolites in Hospital Effluent”, *Clean – Soil, Air, Water*, 1–7, (2010).
- [108] Özkurt, Z., ve Çınar Tanrıverdi, E., “Kloramfenikol”, *Türkiye Klinikleri Journal of Infectious Diseases Special Topics*, 10(1), (2017).
- [109] Bektemuroğlu, B., ve Şireli, M., “Kobaylarda kloramfenikol ve florfenikol’ün elektrokardiyogram üzerine etkisi”, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 58, 155-160, (2011).

- [110] Baş, A. L., “Kloramfenikol’ Ün Sığır Polimorfnükleer Lökosit Fonksiyonları Üzerindeki Etkilerinin İn Vitro Ve İn Vivo Araştırılması.”, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Konya, (1994).
- [111] Rossiter, O., Pinheiro, R. B., Duarte, M. M. M. B., Dantas, R. F., Ferreira, A. P., Benachour, M., et al., “Degradation of the antibiotic chloramphenicol using photolysis and advanced oxidation process with UVC and solar radiation”, *Desalination and Water Treatment*, (2013).
- [112] Anderle, C., Stieger, M., Burrell, M., Reinelt, S., Maxwell, A., Page, M., et al., “Biological activities of novel gyrase inhibitors of the aminocoumarin class”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(6), 1982–1990, (2008).
- [113] DrugBank, “Novobiocin [online]”, (16.04.2018), <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01051>, (2005).
- [114] Stone, K. J., and Strominger J. L., “Mechanism of Action of Bacitracin: Complexation with Metal Ion and C55-Isoprenyl Pyrophosphate”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(12), 3223-3227, (1971).
- [115] Bora, K., “Kokültür Koşullarının Basitrasin Üretimine Etkisi”, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, (2009).
- [116] Deepak, S. A., Kottapalli, K. R., Rakwal, R., Oros, G., Rangappa, K. S., Iwahashi, H., et al., “Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes”, *Current Genomics*, 8(4), 234–251, doi.org/10.2174/138920207781386960, (2007).
- [117] White Ink Studio., “Dr. Kary Banks Mullis [online]”, (08.04.2018), <https://www.karymullis.com/biography.shtml>, (2009).
- [118] Lenstra, J.A., “The applications of the polymerase chain reaction in the life sciences”, *Cellular and Molecular Biology*, 41(5), 603-14, (1995).
- [119] Hagen-Mann, K., and Mann, W., “RT-PCR and alternative methods to PCR for in vitro amplification of nucleic acids”, *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 103(3), 150-155, (1995).

- [120] Wilgar, H., “What is PCR (polymerase chain reaction)? [online]”, (10.04.2018), <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-pcr-polymerase-chain-reaction>, (2016).
- [121] Rabinow, P., *Making PCR A Story of Biotechnology*, The University of Chicago Press, (1996).
- [122] Lui, C., Cady, N. C, and Batt, C. A., “Nucleic acid-based detection of bacterial pathogens using integrated microfluidic platform systems”, *Sensors*, 9, 3713-3744, (2009).
- [123] De Medici, D., Croci, L., Delibato, E., Di Pasquale, S., Filetici, E., and Toti, L., “Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real-time PCR to detect *Salmonella enterica* serotype enteritidis in poultry”, *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6), 3456–3461, (2003).
- [124] Vishnubhatla, A., Fung, D. Y. C., Oberst, R. D., Hays, M. P., Nagaraja, T. G., and Flood, S. J., “Rapid 5 nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4131–4135, (2000).
- [125] Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., and Watson, R., “Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions”, *Nature Biotechnology*, (1993).
- [126] Biassoni, R., and Raso, A., *Quantitative Real-Time PCR*, New York: Humana Press, (2014).
- [127] Jia, Y., *Methods in Cell Biology*, United States of America: Academic Press, (2012).
- [128] Kahya, S., “Enfeksiyöz Hayvan Hastalıklarının Teşhisinde Gerçek Zamanlı (Real -Time) PCR’ in Geleneksel PCR’ a göre Avantajları”, *Uludag Universitesi Journal of The Faculty Veterinary Medicine*, 32, 39–44, (2014).
- [129] Klein, D., “Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations”, *Trends in Molecular Medicine*, 8(6), (2002).

- [130] Ririe, K. M., Rasmussen, R. P., and Wittwer, C. T., “Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction”, *Analytical Biochemistry*, 245, 154–160, (1997).
- [131] Navarro, E., Serrano-Heras, G., and Castaño, M.J., “Real-time PCR detection chemistry”, *Clinica Chimica Acta*, 439, 231–250, (2015).
- [132] Botes, M., Kwaadsteniet, M., and Cloete, T. E., “Application of quantitative PCR for the detection of microorganisms in water”, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 91–108, (2013).
- [133] Wong, M. L., and Medrano, J. F., “Real-time PCR for mRNA quantitation”, *BioTechniques*, 39, (2005).
- [134] Stephenson, F. H., *Calculations for Molecular Biology and Biotechnology*, United States of America: Academic Press, 215-320, (2016).
- [135] Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, “Roche Molecular, LightCycler Owner’s manual version 1.5”, Germany, (2008).
- [136] Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jonak, J., Lind, K., et al., “The real- time polymerase chain reaction”, *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 95–125, (2006).
- [137] Malorny, B., Paccassoni, E., Fach, P., Martin, A., Helmuth, R., and Bunge, C., “Diagnostic Real-Time PCR for Detection of *Salmonella* in Food”, *Applied and Environmental Microbiology*, 70(12), 7046–7052, (2004).
- [138] Malorny, B., Bunge, C., and Helmuth, R., “A real-time PCR for the detection of *Salmonella* Enteritidis in poultry meat and consumption eggs”, *Journal of Microbiological Methods*, 70(2), 245–251, (2007).
- [139] Zemanick, E. T., Wagner, B. D., Sagel, S. D., Stevens, M. J., Accurso, F. J., and Harris, J. K., “Reliability of quantitative real-time PCR for bacterial detection in cystic fibrosis airway specimens”, *Plos One*, 5(11), (2010).
- [140] Muldrew, K. L., “Molecular diagnostics of infectious diseases”, *Current Opinion in Pediatrics*, 21(1), 102–111, (2009).

- [141] Nam, H. M., Srinivasan, V., Gillespie, B. E., Murinda, S. E. and Oliver, S. P., “Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples”, *International Journal of Food Microbiology*, 102(2), 161–171, (2005).
- [142] Pochop, J., Ka, M., Hleba, L., Petrová, J., Pavelková, A. and Lopašovský, L., “A Real-Time PCR Detection of Genus *Salmonella* in Meat and Milk Samples”, *Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak University of Agriculture in Nitra*, 46(1), 145–148, (2013).
- [143] Gündoğan, N., Çıtak, S., Yücel, N., ve Devren, A., “A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples”, *Meat Science*, 69, 807-810, (2005).
- [144] Topçu, S., “Ankara’da satışı sunulan döner kebab çeşitlerinden *Listeria Monocytogenes*, *Staphylococcus Aureus*, *Aeromonas Hydrophila* izolasyonu ve çeşitli antibiyotiklere dirençlilikleri”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2006).
- [145] Civelek, M. A., ve Durukan, M. B., *İstatistiksel Analiz, İstatistiksel Bilgi Kullanıcıları için El Kitabı*, Nobel Yayıncılık, (2012).
- [146] Karagöz, M., *İstatistik Yöntemleri*, Ekin Basım Yayın Dağıtım, (2011).
- [147] “Resmî Gazete, Sayı:26221, Anonim, Tebliğ No: 2006/29; Tebliğ No:2006/31, [online]”, (27.04.2018), <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2006/07/20060707-11.htm>, Ankara, (2006).
- [148] “Mikrobiyolojik Kriterler Yönetmeliği, Türk Gıda Kodeksi Resmî Gazete, Sayı:28157, [online]”, (27.04.2018), <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/12/20111229M3-6.htm>, Ankara, (2011).
- [149] Özyurt, T., “İzmir ve çevresinde kanatlı etlerinden izole edilen *Salmonella* türlerinin prevalansı ve antibiyotik dirençlerinin belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, (2011).

- [150] Özgan, E., “Satışa sunulan gıda örneklerinden izole edilen *Salmonella* suşlarının çoklu antibiyotik dirençliliğinin araştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2015).
- [151] Al-shadefat, B., “Tüketim sürecinde döner kebablarda *Salmonella* spp. varlığının araştırılması”, Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Konya, (2011).
- [152] Fidancı, H., “Tavuk etlerinde *Salmonella* serotiplerinin prevalensi ve izole edilen suşlarda antibiyotiklere in vitro direnç”, *ANKEM Dergisi*, 4, 497-501, (1997).
- [153] Yang, B., Qu, D., Zhang, X., Shen, J., Cui, S., Shi, Y., et al., “Prevalence and characterization of *Salmonella* serovars in retail meats of marketplace in Shaanxi, China”, *International Journal of Food Microbiology*, 141(1–2), 63–72, (2010).
- [154] Hyeon, J., Chon, J., Hwang, I., Kwak, H., Kim, M., Kim, S., et al., “Prevalence, antibiotic resistance, and molecular characterization of *Salmonella* serovars in retail meat products”, *Journal of Food Protection*, 74(1), 161–166, (2011).
- [155] Food Safety and Inspection Service, “Introduction to the Microbiology of Food Processing”, *United States Department of Agriculture*, 21-64, (2012).
- [156] Özdemir, H., and Keyvan, E., “Isolation and characterisation of *Staphylococcus aureus* strains isolated from beef, sheep and chicken meat”, *Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 333–338, (2016).
- [157] Yurdakul, N. E., “Tavuk Etlerinden Gram Pozitif Kokların İzolasyonu ve Antibiyotiklere Karşı Dirençliliklerinin Belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Adana, (2008).
- [158] Akgün, S., “Gıda ve Klinik Örneklerden İzole Edilen Koagülaz Pozitif Ve Koagülaz Negatif Stafilokokların Bazı Virulens Özellikleri ve Antibiyotik Dirençliliklerinin Karşılaştırılması”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2012).

- [159] Devren, A., “Çeşitli Et Ürünlerinden İzole Edilen *Staphylococcus aureus*’un Gelişimi Üzerine pH, NaCl ve Potasyum Sorbat’ın Etkisi”, Yüksek Lisans Tezi, *Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, (2004).
- [160] Koçyiğit, A., “İzmir’de çeşitli marketlerde satışa sunulan tavuk ve hindi etlerinde *Staphylococcus aureus* aranması, sayımı ve tanımlanması”, Yüksek Lisans Tezi, *Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, (2002).
- [161] Yılmaz, D., “Tavuk etlerinde *Staphylococcus aureus* prevalansı, biyofilm özellikleri ve antibiyotik duyarlılıklarının belirlenmesi”, Yüksek Lisans Tezi, *Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Kütahya, (2013).
- [162] Baydur, A. Y., “İstanbul’da Satışa Sunulan Tavuk Etlerinin Hijyenik Kalitesi Üzerine Araştırmalar”, Yüksek Lisans Tezi, *İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İstanbul, (2006).

